



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIENCIA ANIMAL  
MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL

ANA MICHELL GARCÍA VARELA

**EFEITO DA INGESTÃO DE EXTRATO ETANÓLICO DE PRÓPOLIS SOBRE A  
PRODUÇÃO, PARÂMETROS FISIOLÓGICOS E BEM-ESTAR DE VACAS  
LEITEIRAS**

MOSSORÓ

2022

ANA MICHELL GARCÍA VARELA

**EFEITO DA INGESTÃO DE EXTRATO ETANÓLICO DE PRÓPOLIS SOBRE A  
PRODUÇÃO, PARÂMETROS FISIOLÓGICOS E BEM-ESTAR DE VACAS  
LEITEIRAS**

Dissertação apresentada ao Mestrado em  
Ciência Animal do Programa de Pós-  
Graduação em Ciência Animal da Universidade  
Federal Rural do Semi-Árido como requisito  
para obtenção do título de Mestre em Ciência  
Animal.

Linha de Pesquisa: Nutrição e Produção.

Orientador: Prof<sup>ª</sup> Dra. Patrícia de Oliveira Lima

Coorientador: Prof. Dr. Dorgival Morais de  
Lima Júnior

MOSSORÓ  
2022

© Todos os direitos estão reservados a Universidade Federal Rural do Semi-Árido. O conteúdo desta obra é de inteira responsabilidade do (a) autor (a), sendo o mesmo, passível de sanções administrativas ou penais, caso sejam infringidas as leis que regulamentam a Propriedade Intelectual, respectivamente, Patentes: Lei nº 9.279/1996 e Direitos Autorais: Lei nº 9.610/1998. O conteúdo desta obra tomar-se-á de domínio público após a data de defesa e homologação da sua respectiva ata. A mesma poderá servir de base literária para novas pesquisas, desde que a obra e seu (a) respectivo (a) autor (a) sejam devidamente citados e mencionados os seus créditos bibliográficos.

G215e

García Varela, Ana Michell. efeito da ingestão de extrato etanólico de própolis sobre a produção, parâmetros fisiológicos e bem-estar de vacas leiteiras / Ana Michell García Varela. - 2022. 40 f. : il.

Orientadora: Patrícia Oliveira Lima Presidente.

Coorientador: Dorgival Moraes de Lima Júnior.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal Rural do Semi-árido, Programa de Pós-graduação em --Selezione um Curso ou Programa--, 2022.

1. aditivo. 2. produção de leite. 3. flavonoides. 4. fenólicos. I. Oliveira Lima Presidente, Patrícia, orient. II. de Lima Júnior, Dorgival Moraes , co-orient. III. Título.

Ficha catalográfica elaborada por sistema gerador automático em conformidade com AACR2 e os dados fornecidos pelo autor(a).

Biblioteca Campus Mossoró / Setor de Informação e Referência

Bibliotecária: Keina Cristina Santos Sousa e Silva

CRB: 15/120

O serviço de Geração Automática de Ficha Catalográfica para Trabalhos de Conclusão de Curso (TCC's) foi desenvolvido pelo Instituto de Ciências Matemáticas e de Computação da Universidade de São Paulo (USP) e gentilmente cedido para o Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (SISBI-UFERSA), sendo customizado pela Superintendência de Tecnologia da Informação e Comunicação (SUTIC) sob orientação dos bibliotecários da instituição para ser adaptado às necessidades dos alunos dos Cursos de

**EFEITO DA INGESTÃO DE EXTRATO ETANÓLICO DE PRÓPOLIS SOBRE A  
PRODUÇÃO, PARÂMETROS FISIOLÓGICOS E BEM-ESTAR DE VACAS  
LEITEIRAS**

Dissertação apresentada ao Mestrado em  
Ciência Animal do Programa de Pós-  
Graduação em Ciência Animal da Universidade  
Federal Rural do Semi-Árido como requisito  
para obtenção do título de Mestre em Ciência  
Animal.

Linha de Pesquisa: Nutrição e Produção

Defendida em: \_\_26\_\_ / \_\_04\_\_ / 2\_\_022\_\_.

**BANCA EXAMINADORA**



---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Patrícia de Oliveira Lima  
Presidente (UFERSA)



---

Prof. Dr. Dorgival Moraes de Lima Júnior  
Membro Examinador interno (UFERSA)



---

Prof. Dr. Thiago Luís A. C. de Araújo  
Membro Examinador interno (UFERSA)

*Em memória ao meu avô Cláudio Porfírio  
Varela Lagos (16-11- -20-08-2020).*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus porque dia a dia me deu forças, me encheu de saúde, sabedoria e coragem para vencer, apesar de todas as adversidades. Agradeço a Deus por esta grande oportunidade com a qual me recompensou.

Agradeço aos meus pais por serem um pilar tão fundamental na minha vida, por me apoiarem e me darem força. Minha mãe, Ana Behira Varela, uma mulher cheia de sabedoria, obrigado por seus conselhos por me encorajar e me fazer sentir que posso. Meu pai, Miguel Humberto García, obrigado por sendo aquele exemplo de humildade e simplicidade por acreditar em mim.

Agradeço aos meus avós por serem essa fonte que fortaleceu minha vontade de continuar. Meu Tata Tulio a vontade de abraçá-lo novamente me motiva todos os dias; minha Avó Ana minha conselheira e torcedora sempre orando por mim, não tenho dúvidas que Deus ouviu suas orações; meu Avô Porfirio dedico minha conquista ao céu, consegui avô; minha Nana Ela obrigada por me incentivar e sempre me lembrar que o tempo voa e que em breve eu estaria com os meus, Os amo!

Agradeço a minha orientadora, Doutora Patrícia Lima, por suas orientações e disponibilidade sempre que precisei e ao meu Coorientador, Doutor Dorgival Junior, por suas orientações, trabalho, disponibilidade e todo tempo dedicado para esclarecer todas as minhas dúvidas e assim a conclusão do trabalho fosse realizada.

Agradeço à Banca Examinadora pela disponibilidade, por aceitar participar da minha defesa e pelas correções indicadas para a melhora do trabalho.

Agradeço aos meus Amigos da vacaria, Carlo Joel, Francisco de Souza, Adriano Pereira, Eguinaldo Barbosa, Ademar Fonseca Dantas, Francisco Diassis Monteiro, Oséas Pereira, por toda a ajuda que me deram, por serem meus colegas de pesquisa e se tornarem parte de minha família. Serei grata a vida toda por ter-lhes conhecido, e a cada um daqueles que indireta o diretamente aportaram ao meu trabalho.

“Todos nós somos gênios, mas se você julgar um peixe pela sua capacidade de escalar uma árvore, ele passará o resto da vida acreditando ser um idiota”. Albert Einstein.

## RESUMO

Foram utilizadas 3 vacas primíparas da raça Holandês, com uma média de 90 dias do período de lactação, com a mesma ordem de parto, a mesma idade e uma média de peso corporal de  $485 \pm 11$  kg. Objetivou-se avaliar o consumo das vacas, o desempenho na produção de leite e parâmetros ficológicos. As vacas foram distribuídas aleatoriamente em quadrado latino 3 x 3 repetidos duas vezes no tempo, com três períodos e três tratamentos. Os tratamentos foram divididos em: tratamento controle 1 (0 ml de extrato etanólico de própolis), tratamento 2 (32 ml/dia de extrato etanólico de própolis), tratamento 3 (64 ml/dia de extrato etanólico de própolis). As vacas foram alojadas em baias individuais semifechadas com ventilação livre durante todo o período experimental e submetidas a duas ordenhas diárias (07:00 h e 13:30 h) realizadas manualmente por um ordenhador experimentado. Cada período teve duração de 17 dias, divididos em 12 dias para adaptação e 5 dias de coleta de dados. Cada quadrado latino teve duração de 51 dias repetidos no tempo, totalizando 102 dias do período experimental. A dieta fornecida para os animais em experimentação consistiu em ração concentrada e silagem de milho, com relação volumoso:concentrado de 50:50. O extrato etanólico de própolis (EEP) testado nas vacas tinha uma concentração de 4,04% de compostos fenólicos totais. A adição de extrato etanólico da própolis na dieta de vacas leiteiras não afetou ( $P > 0,05$ ) consumo dos nutrientes, composição do leite nem os parâmetros sanguíneos. No entanto, houve uma tendência a diferencia na produção de leite, as vacas suplementadas com o maior nível de extrato etanólico da própolis (64 ml/d) produziram mais leite em relação aos demais tratamentos. Entretanto, houve um consumo de matéria seca de 18,96 kg/d e não foi influenciado por a ingesta do estrato da própolis, o consumo de proteína bruta e carboidratos não fibrosos também não foram afetados mantendo uma média de 2,83 kg/d, 6,62 kg/d. Recomendasse a oferta de 64 ml de extrato de própolis por aumentar a produção de leite, melhorar a eficiência alimentar e não influenciar negativamente sobre a qualidade do leite.

**Palavras-chave:** aditivo, produção de leite, flavonoides, fenólicos.

## ABSTRACT

Three primiparous Holstein cows were used, with a half of 90 days of lactation period, with the same calving order, the same age and an average body weight of  $485 \pm 11$ kg. The objective was to evaluate the consumption of cows, performance in milk production and physiological parameters. Cows were randomly assigned to a 3 x 3 Latin square repeated twice in time, with three periods and three treatments. The treatments were divided into: control treatment 1 (0 ml of ethanolic extract of propolis), treatment 2 (32 ml/day of ethanolic extract of propolis), treatment 3 (64 ml/day of ethanolic extract of propolis). The cows were housed in individual semi-closed pens with free ventilation throughout the experimental period and milked twice daily (07:00 h and 13:30 h) performed manually by an experienced milker. Each period lasted 17 days, divided into 12 days for adaptation and 5 days for data collection. Each Latin square lasted 51 days repeated in time, totaling 102 days of the experimental period. The diet provided to the experimental animals consisted of concentrate feed and corn silage, with a forage: concentrate ratio of 50:50. The ethanolic extract of propolis (EEP) tested in cows had a concentration of 4.04% of total phenolic compounds. The addition of propolis ethanol extract in the diet of dairy cows did not affect ( $P > 0.05$ ) nutrient intake, milk composition or blood parameters. However, there was a tendency to differentiate in milk production, cows supplemented with the highest level of propolis ethanol extract (64 ml/d) produced more milk compared to the other treatments. However, there was a dry matter intake of 18.96 kg/d and it was not influenced by the intake of the propolis stratum. 6.62 kg/d. Recommend the supply of 64 ml of propolis extract for increasing milk production, improving feed efficiency and not having a negative influence on milk quality.

**Keywords:** additive, milk production, flavonoids, phenolics.

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Conteúdo nutricional dos alimentos.....	23
Tabela 2 -Consumo de nutrientes e comportamento ingestivo de vacas holandesas tratadas com extrato etanoico de própolis.....	29
Tabela 3 -Composição do leite de vacas holandesas tratadas com extrato etanolico de própolis. .....	30
Tabela 4 -Parâmetros nutricionais e metabólicos de vacas holandesas tratadas com extrato etanolico de própolis.....	31
Tabela 5 -Parâmetros fisiológicos de vacas holandesas tratadas com extrato etanolico de própolis.....	32

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	12
<b>2 REFERÊNCIAL TEÓRICO</b> .....	13
<b>2.1 Fitoquímicos</b> .....	13
<b>2.2 Flavonoides</b> .....	13
<b>2.3 A Própolis</b> .....	17
<b>2.4 Efeito <i>in vitro</i> do extrato de própolis na produção de leite</b> .....	17
<b>2.5 Efeito <i>in vivo</i> do Extrato De Própolis Na Produção De Leite</b> .....	18
<b>3 METODOLOGIA</b> .....	21
<b>3.1 Delineamento experimental</b> .....	21
<b>3.2 Preparação do extrato etanólico da própolis</b> .....	21
<b>3.3 Determinação de compostos fenólicos e flavonoides totais</b> .....	22
<b>3.4 Amostras de leite Produção e composição do leite.</b> .....	25
<b>3.5 Análises do comportamento</b> .....	26
<b>3.6 Coleta de Amostras de Sangue e Análise Hematológica.</b> .....	26
<b>3.7 Análises bioclimatológica</b> .....	27
<b>3.8 Análise Estatística</b> .....	27
<b>4 RESULTADOS</b> .....	29
<b>5 DISCUSSÃO</b> .....	33
<b>6 CONCLUSÃO</b> .....	36
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	37

## 1 INTRODUÇÃO

A produção leiteira está em constante aprimoramento pôr a necessidade de aditivos naturais e a substituição de aditivos sintéticos (BRAVO, Alicia et al., 2018) o extrato de propolis parece ser bastante promissor antimicrobiano, contém substâncias previamente isoladas de plantas e constituintes de origem vegetal que dificilmente seriam conhecidos de outra forma (SALATINO, Antonio et al. 2005.) os aditivos naturais como os extratos de própolis são uma das mais ricas fontes de ácidos fenólicos e flavonoides (SZLISZKA, Ewelina et al. 2009.)

Os aditivos utilizados na nutrição de ruminantes desempenham importante papel como moduladores dos produtos finais da fermentação ruminal, com objetivo de manipular o ecossistema ruminal para melhorar a eficiência produtiva dos ruminantes domésticos (SILVA et al., 2016; FERNANDES, 2021). Constantemente são realizadas pesquisas para atender essas demandas e desenvolver alternativas sustentáveis aos aditivos sintéticos para ruminantes, como uso de taninos (SHIRMOHAMMADLI, Younes; EFHAMISISI, Davood; PIZZI, 2018). Os resíduos da agricultura são ricos em compostos bioativos, incluindo compostos fenólicos, metabólitos secundários encontrados naturalmente nas plantas, que apresentam capacidade antioxidante, anti-inflamatória, cardioprotetora e anticancerígena (JIMENEZ-LOPEZ, C. et al. 2020).

O uso de extratos vegetais, seja na nutrição humana ou animal, é conhecido desde a antiguidade por seus efeitos curativos ou no tratamento de doenças. Além de aditivos fitoquímicos como probióticos, prebióticos, alguns ácidos orgânicos envolvidos em vias metabólicas, ervas e extratos de plantas, podem oferecer alguns dos benefícios que os antibióticos proporcionam (ATAIDES, 2015; CECHINEL FILHO, 2020). Os efeitos benéficos não se restringem à saúde das pessoas, mas também impactam o meio ambiente como resultado de seus impactos positivos nas emissões de metano (NEWBOLD, C. JAMES; RODE, L. M. 2006), maior síntese de proteína microbiana (MORSY, A. S. et al., 2021), maior digestibilidade da fibra (SILVA, Jonilson Araújo da et al. 2014).

Com o objetivo de contribuir as necessidades por produtos mais verde da bovinocultura objetivo-se avaliar o extrato etanólico de própolis na produção, composição do leite e parâmetros fisiológicos de vacas leiteiras. Tendo em vista que a composição da própolis varia em função de fatores como a flora da região, estações do ano e características genéticas das abelhas avaliamos a própolis da região do Rio Grande do Norte.

## **2 REFERÊNCIAL TEÓRICO**

Os aditivos comumente usados na nutrição de ruminantes têm um importante papel como moduladores dos produtos finais da fermentação ruminal. No entanto, o uso indiscriminado de alguns aditivos sintéticos passou a ser questionado. A união europeia proíbe o uso de antibióticos em animais de fazenda 01/02/2022 Wordl Animal Protection – tal finalidade já estava proibida internamente na Europa desde o 01 de janeiro de 2006 (PEREIRA 2017). A saúde e o estado metabólico das vacas leiteiras têm um profundo efeito no desempenho e na qualidade do leite (GROSS 2019). É por essa razão que existe uma crescente necessidade de avaliar substâncias naturais com potencial antimicrobiano que possam modificar positivamente a fermentação microbiana no rúmen.

### **2.1 Fitoquímicos**

Os fitoquímicos são compostos bioativos naturais derivados de plantas e incorporados à ração animal por suas propriedades benéficas que ajudam a melhorar a produtividade e a saúde dos animais. Os fitoquímicos incluem compostos como polifenóis, fitoesteróis, saponinas, alcalóides, salicilatos, glucosinolatos, polifenóis, inibidores de protease, monoterpenos, fitoestrogênios, sulfetos, terpenos, lectinas, entre outros. Podem ser utilizados na forma sólida, seca e moída ou como extratos brutos ou concentrados (BALCELLS, et al. 2012). Produtos naturais, incluindo a própolis brasileira, têm sido considerados para uso na alimentação animal devido sua diversidade fitoquímica.

### **2.2 Flavonoides**

Os flavonoides têm sido utilizados no desenvolvimento de nutracêuticos e medicamentos por apresentarem atividades biológicas relacionadas ao potencial anti-inflamatório, cardioprotetor, anticancerígeno, entre outros. Muitos dos efeitos farmacológicos dos flavonoides se devem à sua ação nos mecanismos de ação antioxidante relacionados à sua capacidade de inibir oxidases, cujo efeito inibitório varia dependendo da concentração, pois alguns inibem em concentrações muito baixas uma determinada enzima, mas requerem concentrações maiores para a inibição. Eles também aumentam a disponibilidade de antioxidantes endógenos e a atividade de enzimas antioxidantes; entretanto, a função biológica mais interessante é manter os níveis de estresse oxidativo abaixo de um ponto crítico do corpo. (HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ; BAQUERO; LARROTA, 2019).

O Brasil possui pelo menos treze tipos distintos de própolis, de acordo com o Quadro 1 que amostra os tipos de própolis de *Apis mellifera* africanizada brasileira e seus respectivos

estados no Brasil, origens botânicas e compostos químicos mais abundantes e/ou importantes (DA CRUZ, 2021).

Quadrado 1 -Tipos de própolis de *Apis mellifera* africanizada brasileira e seus respectivos estados no Brasil, origens botânicas e compostos químicos

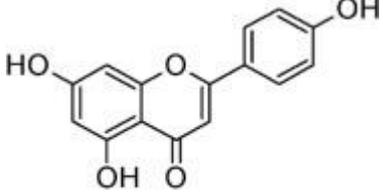
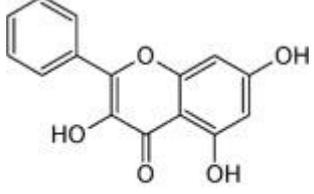
<b>Tipo de própolis</b>	<b>Estado no Brasil</b>	<b>Origem botânica</b>	<b>Compostos químicos mais abundantes e/ou importantes</b>
1	Rio Grande do Sul	Desconhecido	Triterpenóides (meliferona, ácido morônico, ácido anwuweizonic e ácido betulônico).
2	Rio Grande do Sul	Desconhecido	Flavonóides e derivados do ácido cinâmico.
3 (Própolis de álamo)	Paraná	Choupos ( <i>Populus L.</i> , Família <i>Salicaceae</i> )	Principalmente flavonóides (crisina, pinocembrina, pinobanksina, apigenina e galangina).
4	Paraná	Desconhecido	Ácido cinâmico e derivados.
5	Paraná	Desconhecido	Flavonóides e derivados do ácido cinâmico.
6 (Própolis marrom)	Bahia	<i>Hyptis divaricado</i>	Benzofenona prenilada.
7	Bahia	Desconhecido	Flavonóides e derivados do ácido benzoico.
8	Pernambuco	Desconhecido	Flavonóides e derivados do ácido benzoico.
9	Pernambuco	Desconhecido	Derivados do ácido cinâmico.
10	Ceará	Desconhecido	Sesquiterpenos.

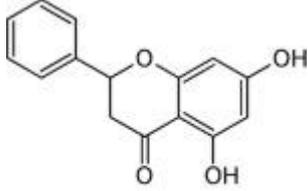
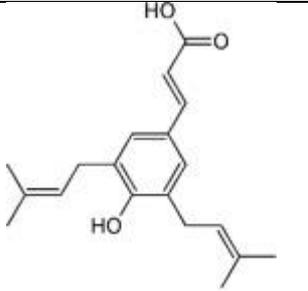
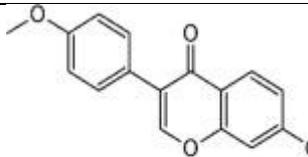
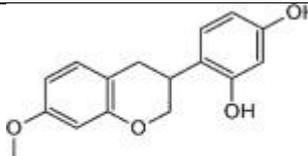
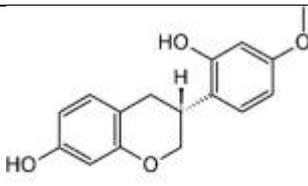
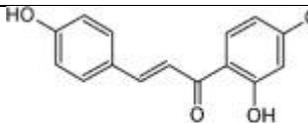
11	Piauí	Desconhecido	Diterpenos.
12 (própolis verde)	São Paulo	<i>Baccharis dracunculifolia</i>	Ácidos cinâmicos prenilados e flavonoides.
13 (própolis vermelha)	Alagoas	<i>Dalbergia ecastophyllum</i>	Principalmente isoflavonóides (formononetina, vestitol, neovestitol e daidzeína) e chalconas.

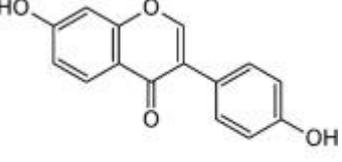
Adaptação de (DA CRUZ, 2021).

No Quadrado 2 mostram-se os compostos isolados de diferentes tipos de própolis brasileira e sua atividade inibitória (SILVA, 2018; DA CRUZ, 2021).

Quadrado 2 -Compostos isolados de diferentes tipos de própolis brasileira.

Molécula	Tipo de própolis	Principal via anti-inflamatóriaReferência
 <p><b>Apigenin</b></p>	Própolis tipo 3 (Própolis de álamo)	Inibição de citocinas inflamatórias, ativação de ERK 1/2 e NF-κB e de migração de neutrófilos.
 <p><b>Galangin</b></p>	Própolis tipo 3 (Própolis de álamo)	Inibição da ativação de neutrófilos, citocinas inflamatórias e fosforilação de ERK e NF-κB

 <p><b>Pinocebrin</b></p>	Própolis tipo 3 (Própolis de álamo)	Inibição de citocinas inflamatórias (TNF- $\alpha$ ), fosforilação de I $\kappa$ B $\alpha$ , ERK1/2, JNK e p38MAPK e migração de neutrófilos.
 <p><b>Artepillin C</b></p>	Própolis tipo 12 (Própolis Verde)	Inibição da migração de neutrófilos e da ativação de NF- $\kappa$ B
 <p><b>Formononetin</b></p>	Própolis tipo 13 (Própolis vermelha)	Inibição da migração de leucócitos e ativação de NF- $\kappa$ B
 <p><b>Neovestitol</b></p>	Própolis tipo 13 (Própolis vermelha)	<u>Inflamação aguda:</u> Reduz a migração de neutrófilos ao diminuir ICAM-1 <u>Inflamação crônica:</u> Diminui a pontuação clínica e o dano articular em um modelo de artrite induzida por colágeno
 <p><b>Vestitol</b></p>	Própolis tipo 13 (Própolis vermelha)	Inibição da migração, rolamento e adesão de neutrófilos; inibição de CXCL1/KC e CXCL2/MIP2 e quimiotaxia de neutrófilos via bloqueio do influxo de cálcio
 <p><b>Isoliquiritigenin</b></p>	Própolis tipo 13 (Própolis vermelha)	Inibição da adesão da expressão de neutrófilos, ICAM-1, VCAM-1 e E-selectina e translocação da subunidade p65 de NF- $\kappa$ B

 <p style="text-align: center;"><b>Daidzein</b></p>	Própolis tipo 13 (Própolis vermelha)	Inibição da migração de neutrófilos, liberação de citocinas inflamatórias, receptor TLR4 e ativação de NF-κB
--	---	--

Adaptação de (SILVA, 2018; DA CRUZ, 2021).

Entre os agentes naturais mais promissores, a própolis brasileira tem sido considerada rica fonte de compostos bioativos conhecidos e principalmente inexplorados com propriedades farmacológicas (BORRELLI, et al., 2018). Estas características têm despertado interesses científicos nas últimas décadas. No entanto, a própolis, ou cola de abelha, tem apresentado variabilidade química devido a diversificação dos ecossistemas apícolas, o que dificulta sua padronização e, conseqüentemente, à sua consolidação como fármaco nos sistemas de saúde. Por outro lado, esta composição diversificada tornou a própolis uma fonte de diversas moléculas biologicamente ativas, principalmente agentes antioxidantes, antibacterianos e anticancerígenos.

Ao longo dos anos têm sido realizados estudos com uso da própolis na nutrição de animais não ruminantes (ESTUDO A; ESTUDO B; ESTUDO C) e principalmente em pequenos ruminantes (ESTUDO X; ESTUDO Y; ESTUDO Z); contudo, estudos realizados com bovinos leiteiros são poucos (ESTUDO W). A própolis e os ácidos fenólicos de seus compostos ativos, podem ser utilizados como um aditivo alimentar alternativo e natural. São descritos efeitos como aumento de desempenho, da qualidade e vida útil dos produtos ruminantes (leite e carne), e redução da produção de metano (KARA, et al., 2014), indicando que a própolis pode ser um importante recurso para uso na nutrição dos ruminantes.

### 2.3 A Própolis

A própolis é uma substância natural, produzida pelas abelhas a partir da goma de várias plantas. Contém vários compostos químicos, incluindo vários compostos fenólicos como flavonóides (galangina, quercetina), ácido cinâmico e seus derivados (ácido clorogênico, ácido ferrúlico, éster fenílico do ácido cafeico), vários esteróides, aminoácidos e aldeídos e cetonas voláteis (BORRELLI, F. et al 2002). A composição está intimamente relacionada à ecologia da flora de cada região visitada pelas abelhas, o que também influencia a sua coloração.

### 2.4 Efeito *in vitro* do extrato de própolis na produção de leite

SANTANA, et al. (2012) avaliaram a atividade bactericida de extratos etanólicos de própolis (0 a 0,5 mg/ml) *in vitro* contra *Staphylococcus aureus* isolado de vacas com inflamação mamária. Os autores relataram diminuição do crescimento de *S. aureus* em meio BHI, morte de células *S. aureus* ressuspensas no leite, e dose bactericida pelo menos 20 vezes maior. Além disso, foram reveladas por imagens de microscopia de força atômica, alterações morfológicas e de tamanho das células de *S. aureus* expostas a EEP (0,5 mg ml<sup>-1</sup>), indicando que EEP pode ser eficaz contra cepas de *S. aureus* causadoras de mastite.

MORSY, A. S. et al. (2015) Conduziram o estudo para comparar os efeitos de extratos etanólicos de própolis vermelha brasileira (BRP) e própolis marrom egípcia (EBP) caracterizados por diferentes compostos individuais na degradação ruminal de nutrientes e na metanogênese. Os compostos majoritários do extrato BRP foram isoflavonóides e chalconas, que representaram 0,43 do total. Isoflavonóides e ácidos graxos saturados compuseram 0,53 do extrato de EBP onde o extrato de BRP 25 µg aumentou a degradabilidade da matéria orgânica verdadeira (TDOM), a supressão de metano (CH<sub>4</sub>) e a GP total foi a monensina, Tanto os extratos BRP quanto EBP aumentaram (P<0,05) a produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) totais e de todos os principais (acetato, propionato, butirato). A amônia ruminal permaneceu inalterada pelos tratamentos, mas os extratos de própolis reduziram (P<0,05) a contagem de protozoários. Concluindo em que os extratos de própolis embora com composições muito diferentes parecem agir de forma semelhante. Os dois tipos de própolis em modificar a degradação ruminal de nutrientes e mitigar a formação de metano foram comparáveis.

### **2.5 Efeito *in vivo* do Extrato De Própolis Na Produção De Leite**

Foi estudado o efeito antioxidante de um extrato de própolis e vitamina E no sangue e leite de vacas leiteiras alimentadas com dieta contendo óleo de linhaça usando - óleo de linhaça + PBP, 1,2 g/kg MS; - óleo de linhaça + PBP + vitamina E, 375 UI/kg MS, segundo SANTOS, Nadine Woruby et al. (2016). As dietas contendo PBP e PBP combinadas à vitamina E não afetaram o consumo de MS e a composição química do leite. As dietas fornecidas às vacas não alteraram a produção de leite e composição de proteína e lactose.

AGUIAR, S. C. et al. (2014) avaliaram o efeito da alimentação de compostos fenólicos de extratos de própolis para vacas leiteiras na produção de leite, composição de ácidos graxos do leite e capacidade antioxidante do leite, usando uma quantidade de 3,81, 3,27 e 1,93 mg de compostos fenólicos/kg de MS ingerida onde concluíram que a adição de própolis às dietas não teve efeito sobre o consumo de MS nem as concentrações de gordura, proteína e lactose no leite

não foram afetadas, produção de leite, eficiência de conversão alimentar, concentração de sólidos do leite ou escore de células somáticas mas a própolis melhora a qualidade do leite quando adicionada à dieta de vacas leiteiras, mas diferentes quantidades de compostos fenólicos podem influenciar os efeitos benéficos dos produtos à base de própolis no leite.

Os PBP reduziram o RD de proteína bruta dietética, A própolis também teve um efeito positivo no metabolismo do nitrogênio ruminal a eficiência da síntese de proteínas microbianas e os parâmetros sanguíneos não foram afetados pela adição de PBP AGUIAR, Sílvia Cristina de et al. (2014). A inclusão de própolis em dietas para vacas leiteiras tem efeitos positivos no metabolismo de proteínas no rúmen.

AKBARIAN, Abdollah et al. (2016) relata que os aditivos fotoquímicos antioxidantes têm potencial com estresse térmico crônico sob condições desafiadoras em outras espécies animais. A dose de (3 g/kg) de flavonoides foi capaz de melhorar o estado oxidativo em diferentes tecidos semelhante a 250 mg/kg de vitamina C. SAHIN, Kazim et al. (2013) identificaram 22 componentes no extrato; farnesol (um sesquiterpenóide) sendo o mais abundante, seguido pela flavona crisina, 1-propen-1tiol e 1-ciclohexeno-1-metanol. Independentemente da suplementação de epigallocatequina-3-galato abordando seu papel na mediação das respostas ao estresse oxidativo.

STELZER, Fábio Selva et al. (2009) quando avaliaram o desempenho de vacas leiteiras alimentadas com concentrado em diferentes níveis associados ou não à própolis com uma quantidade 34 ml de extrato etanólico da própolis associado ao consumo e digestibilidade aparente de nutrientes, produção e composição do leite, peso vivo, eficiência alimentar e uso de concentrado para produção de leite, declararam que não houve interação entre os níveis de concentrado e própolis, e não houve efeito do PEE para os parâmetros avaliados. A adição de própolis não altera o consumo, digestibilidade e desempenho de vacas com produção acima de 20 kg de leite/dia.

O teor de gordura do leite e a composição de ácidos graxos podem ser significativamente alterados por meio de mudanças na dieta nutricional das vacas leiteiras, oferecendo assim a oportunidade de responder às forças do mercado e às recomendações de saúde humana (Lock e Shingfield, 2004). Assim, a própolis pode ser uma alternativa para melhorar a qualidade do leite, manipulando o metabolismo lipídico e modificando a composição de AG no leite.

Apesar das informações dos trabalhos existentes, os autores concordam em que há necessidade de mais pesquisas sobre a ação dos princípios ativos dos extratos de própolis, fitoquímicos e sua associação *in vivo*, principalmente avaliando o consumo, desempenho na produção e composição do leite, perfil hematológico e enzimas antioxidantes e comportamento

animal (KOLLING, 2016). Ainda há muito trabalho e estudos a ser feito para conseguir o esclarecimento das contradições encontradas na literatura e alcançar a padronização dos diferentes tipos de própolis, para que os extratos vegetais possam ser adotados.

### 3 METODOLOGIA

O experimento foi realizado no setor de bovinocultura leiteira da Universidade Federal Rural do Semiárido (UFERSA) Mossoró, no estado do Rio Grande do Norte, Brasil. O protocolo experimental do trabalho foi devidamente submetido e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal Rural do Semi-Árido –UFERSA em reunião no dia 27 de abril de 2021.



#### 3.1 Delineamento experimental

Neste estudo foram utilizadas 3 vacas da raça Holandês, primíparas, aos 90 dias do período de lactação, com a mesma ordem de parto, a mesma idade e uma média de peso corporal de  $485 \pm 11$  kg, distribuídas aleatoriamente em quadrado latino  $3 \times 3$ , dois quadrados repetidos no tempo, com três períodos e três tratamentos (0, 32 e 64 ml/dia de EEP), totalizando 18 observações (6 por tratamento). As vacas foram alojadas em baias individuais semifechadas com ventilação livre durante todo o período experimental e submetidas a duas ordenhas diárias (07:00 h e 13:30 h) realizadas manualmente por um ordenhador experimentado. Cada período teve duração de 17 dias, divididos em 12 dias para adaptação e cinco dias de coleta de dados. Cada quadrado latino teve duração de 51 dias repetidos no tempo, totalizando 102 dias experimentais.

#### 3.2 Preparação do extrato etanólico da própolis

O aditivo a base de própolis utilizados nos tratamentos foi elaborado no Laboratório de Análises dos Alimentos (LANIS/UFERSA). A própolis bruta foram obtidas de forma comercial. Para a obtenção do extrato de própolis se compraram 7 kg de própolis marrom bruta.



utilizaram-se 30 g de própolis bruta triturada para cada 100 ml de solução de álcool etílico (70%), para uma fermentação por um período de 10 dias (STRADIOTTI JÚNIOR, 2004). Posteriormente, foi feita a centrifugada da mistura para facilitar a separação dos sólidos e líquidos a uma velocidade de 3600 rpm durante 4 minutos e posteriormente armazenada em botelhas de vidro cor âmbar. O extrato etanólico da própolis foi fornecido com ajuda de um dosador manual o que permitiu facilitar a suplementação diária do aditivo além de garantir o 100% da ingesta.



### 3.3 Determinação de compostos fenólicos e flavonoides totais

Os fenóis totais foram determinados conforme a metodologia de Meda et al. (2005), através do uso do reagente Folin-Ciocalteu. A partir do extrato etanólico de própolis (30g/100ml), diluiu-se 0,5ml para 200 ml com etanol em seguida retiraram-se alíquotas de 0,5 ml, adicionou-se 2,5ml do reagente Folin-Ciocalteu (0,2N) em tubo de ensaio, após 5 minutos, colocou-se 2 ml de carbonato de sódio (75 g/L) e em seguida mantido em repouso por 2 h ao abrigo da luz. A absorbância foi medida em espectrofotometria Gehaka modelo UV-340G a

760nm, utilizando branco metanol. Os resultados obtidos foram extrapolados em curva de calibração obtida com padrão ácido gálico (20 a 200 ppm), e expressos em gramas equivalente ácido gálico (EAG)/L de extrato.

Para a determinação dos flavonoides totais seguiu-se metodologia descrita na literatura (MEDA et al., 2005), com adaptações. Alíquota de 5,0 ml do extrato diluído (5 ppm) foi misturada com 5 ml de cloreto de alumínio (2%), em tubo de ensaio. Após 10 minutos, a absorbância foi lida com no espectrofotômetro Gehaka modelo UV-340G em comprimento de onda de 415 nm, utilizando como branco a amostra com metanol sem AlCl<sub>3</sub> para cada amostra. Uma curva de quercetina (5 a 50 mg/L) foi usada como padrão. O conteúdo de flavonoides foi expresso em gramas de equivalente quercetina (EQ)/L de extrato.

Quadrado 3 -compostos fenólicos e flavonoides presentes no extrato da própolis.

<b>Amostra</b>	<b>EAG %</b>	<b>±SD</b>
Ext EtOH própolis	<b>4,04</b>	<b>0,03</b>
<b>Amostra</b>	<b>EQ %</b>	<b>±SD</b>
Ext EtOH própolis	<b>1,98</b>	<b>0,01</b>

Fenóis totais, EAG g/L EAG = equivalente ácido gálico

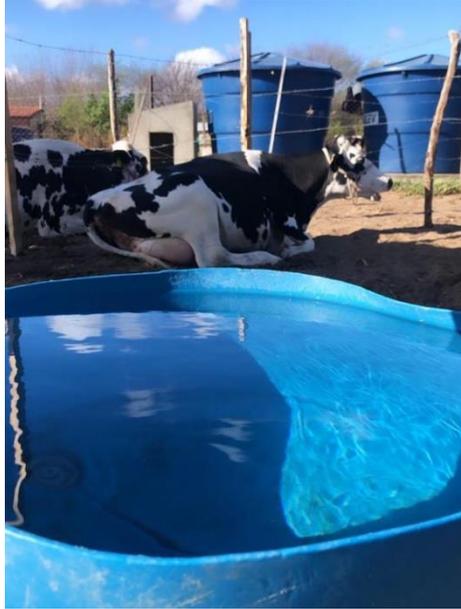
Flavonoides totais, EQ g/L EQ = equivalente quercetina.

A dieta experimental com a qual os animais foram alimentados consistiu em uma ração concentrada e silagem de milho, com uma relação volumoso: concentrado 50:50 teores de concentração.

Tabela 1- Conteúdo nutricional dos alimentos.

	CONCENTRADO 50%	SILAGEM 50%
MS	88,53	41,79
MM	6,54	4,98
PB	21,36	8,64
EE	4,67	2,48
FDN	18,51	49,50

Os tratamentos foram divididos da seguinte maneira; tratamento controle 1 (0ml de extrato etanólico de própolis), tratamento 2 (32ml/d de extrato etanólico de própolis), tratamento 3 (64ml/d de extrato etanólico de própolis). As vacas foram mantidas com água fornecida ad libitum.



O aditivo de extrato etanólico de própolis foi subministrada diretamente na boca do animal com a ajuda de um dosador logo após cada refeição, isso para facilitar a ingestão, sendo fornecido duas vezes ao dia depois das ordenhas as quais foram realizadas manualmente por um ordenhador experimentado às 7:00 h e às 13:30 h. O consumo de alimentos foi monitorado diariamente, as sobras da ração totalmente misturada foram coletadas e pesadas todos os dias para garantir uma sobra de 10 ou 15% por animal.



Esse experimento consistiu em três períodos experimentais cada quadrado de 17 dias cada um, 12 dias para adaptação e 5 dias para a coleta de amostras e dados. Previamente foi realizado o análises bromatológico de cada uma das silagens que foram ofertadas na ração.

Nos primeiros três dias do período de coleta foram coletadas amostras de sobras dos cochos de cada vaca respectivamente as quais foram levadas para o laboratório onde passaram a ser congeladas para serem feitos posteriormente análises de digestibilidade dos alimentos no Laboratório de Nutrição Animal da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, sendo determinados os teores de matéria seca (MS), proteína bruta (PB), matéria mineral (MM), fibra insolúvel em detergente neutro (FDN), fibra insolúvel em detergente ácido (FDA), extrato etéreo (EE), lignina e celulose, de acordo com a metodologia descrita por Silva e Queiros (2019), carboidratos não fibrosos (CNF) foram calculados de acordo com Silva e Queiros (2019), sendo  $CNF\% = 100 - (\%FDN + \%PB + \%EE + \%cinzas)$ .

As amostras das sobras foram coletadas nos primeiros 3 dos 5 dias do período de coleta de dados, foi realizada a secagem em estufa com circulação forçada de ar à temperaturas de 55 °C por 72 horas para a determinação de MS, seguidamente as amostras foram trituradas com moino, peneira de 1mm, posteriormente armazenados em recipientes plásticos e analisado para MM, Cinzas, PB, EE e FDN segundo o sugerido por Silva e Queiroz (2019).

### **3.4 Amostras de leite Produção e composição do leite.**

Foi realizado um controle de leite onde o leite foi pesado os 17 dias de cada período para avaliar a produção de leite, no dia um coletou-se uma amostra de leite de manhã e tarde de cada vaca em cada período experimental, as amostras foram armazenadas em um recipiente com gelo e levadas ao laboratório onde foram analisadas imediatamente.

Amostras de leite (50 ml) foram coletadas em recipientes plásticos e armazenadas em refrigeração para posteriormente determinar com o uso de Milkoscan (Bentley - Bélgica) o conteúdo de:

- Gordura (%)
- Proteína (%)
- Lactose (%)
- Sólidos totais (%)
- Extrato seco desengordurado (%)
- Gordura (g)

- Proteína (g)
- Lactose (g)

### 3.5 Análises do comportamento

Análise de comportamento ingestivo foi realizado um dia por uma vez por período de 12 h (iniciado às 07:00 h e culminando às 19:00h) em intervalos de 5 min, os animais foram submetidos a observações visuais individuais. Durante o período noturno, as observações foram feitas com iluminação artificial. Foram registrados os tempos diários de alimentação, ruminação, ingesta de Água e ócio, de acordo com FERREIRA, A.C. et al. (2017)

Foi observado e contado tanto o número de mastigações ruminadas quanto os bolos ruminados por esse período de tempo. Além disso, o tempo e o número de mastigações de cada bolo ruminal para cada animal foram registrados como também tempo de postura dos animais de pé e deitado, contabilizados as vezes que defecou e urinou cada uma delas.

### 3.6 Coleta de Amostras de Sangue e Análise Hematológica.

As amostras de sangue foram coletadas com agulhas estéreis 10×25 mm por punção da veia jugular esquerda em tubos de 10 ml no 5 dia do período de colheita obtidas 4h após a refeição da manhã. Após a coleta, as amostras foram centrifugadas para a obtenção do soro a 3.000 rpm/10 min. Posteriormente, o soro foi fracionado e armazenado em tubos de microcentrífuga de 0,5 ml que foram congelados a -20°C.



As análises séricas foram realizadas em um analisador bioquímico semiautomático (BIOPLUS 2000 ®; Mossoró RN, Brasil). Foram determinadas as concentrações de:

- Proteína total (g/dl)
- Albumina (g/dl)
- Ureia (mg/dl)
- Creatinina (mg/dl)
- Glicose (mg/dl)
- AST (U/L)
- Colesterol (mg/dl)
- Triglicerídeos (mg/dl)

### **3.7 Análises bioclimatológica**

Em cada período experimental uma análises de bioclimatologia foram realizadas. Coletou-se dados de velocidade do vento, umidade relativa, temperatura do globo ao sol e temperatura do globo a sombra para o ambiente, temperatura retal, frequência respiratória e medições de temperatura da superfície corporal foram captadas do lado oposto ao rumem de cada vaca, a pratica da captura das imagem foi realizada com ajuda de uma câmara termográfica infravermelha, cada dado foi coletado por um período de 11 horas (07:00 as 17:00 horas) com intervalos de 1 hora.

Cada termograma foi armazenado e posteriormente analisado pelo software ThermaCAM Researcher Pro 2.10, foram obtidas as temperaturas do tronco, olho, focinho e orelha, foram coletadas aproximadamente 396 imagens termográficas, todas as imagens tomadas com cuidado para uma boa qualidade, para uma melhor leitura das análises no software e resultados confiáveis.

### **3.8 Análise Estatística**

Os dados foram submetidos à análise de máxima verossimilhança restrita pelo procedimento MIXED do SAS OnDemand, considerando período e animal como efeitos aleatórios e tratamento como efeitos fixos segundo o modelo a seguir:  $Y_{ijk} = \mu + A_i + P_j + T_k + \epsilon_{ijk}$ , em que  $Y_{ijk}$  = variáveis observadas,  $\mu$  = média geral,  $A_i$  = efeito do animal  $i$ ;  $P_j$  = efeito

do período  $j$ ;  $T_k$  = efeito do tratamento  $k$ ; e  $\epsilon_{ijk}$  = erro aleatório. Para análises do segundo delineamento, foi incluída classe de temperatura ambiental como efeito fixo conforme modelo a seguir:  $Y_{ijkl} = \mu + A_i + P_j + T_k + C_l + \epsilon_{ijkl}$ , em que  $Y_{ijkl}$  = variáveis observadas,  $\mu$  = média geral,  $A_i$  = efeito do animal  $i$ ;  $P_j$  = efeito do período  $j$ ;  $T_k$  = efeito do tratamento  $k$ ;  $C_l$  = efeito da classe de temperatura ambiental  $l$  e  $\epsilon_{ijkl}$  = erro aleatório. Considerou-se  $P < 0,05$  como efeitos significativos e  $P > 0,05$  e  $< 0,10$  como tendência. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey.

#### 4 RESULTADOS

O consumo de matéria seca (18,96 kg/d), proteína bruta (2,83 kg/d), fibra insolúvel em detergente neutro (7,36 kg/d) e carboidratos não fibrosos (6,62 kg/d) das vacas não foi influenciado pela administração de EP (Tabela 2). A administração de 64 ml/dia de EP aumenta o tempo de alimentação ( $P < 0,05$ ) e reduz ( $P < 0,10$ ) a procura por água.

Tabela 2 -Consumo de nutrientes e comportamento ingestivo de vacas holandesas tratadas com extrato etanoico de própolis

	Oferta de extrato de própolis			EPM <sup>1</sup>	P-Valor
	0 ml/d	32 ml/d	64 ml/d		
Matéria seca kg/d	19,03	18,50	19,37	0,267	0,2570
Proteína bruta kg/d	2,85	2,76	2,90	0,045	0,2232
Materia Mineral kg/d	1,46	1,48	1,47	0,040	0,9668
Extrato etéreo kg/d	0,69	0,65	0,70	0,021	0,3829
Fibra insolúvel em detergente neutro kg/d	7,30	7,28	7,52	0,276	0,4288
Carboidratos não-fibrosos kg/d	6,73	6,37	6,77	0,218	0,1835
Tempo de alimentação (min)	43,00 <sup>b</sup>	46,5 <sup>ab</sup>	49,83 <sup>a</sup>	1,144	0,0081
Tempo de ruminação (min)	33,00	37,00	31,00	1,696	0,3564
Tempo de ocio (min)	61,50	52,16	57,66	2,181	0,2222
Procura por agua (min)	6,50 <sup>ab</sup>	8,33 <sup>a</sup>	5,50 <sup>b</sup>	0,639	0,0780

<sup>1</sup>Erro padrão da média. <sup>ab</sup> Médias diferentes pelo teste de Tukey ( $P < 0,10$ ) na mesma linha recebem letras diferentes.

A oferta de 64 ml/dia de EP tendeu a aumentar a produção de leite e a eficiência alimentar bruta de vacas (Figura 1).

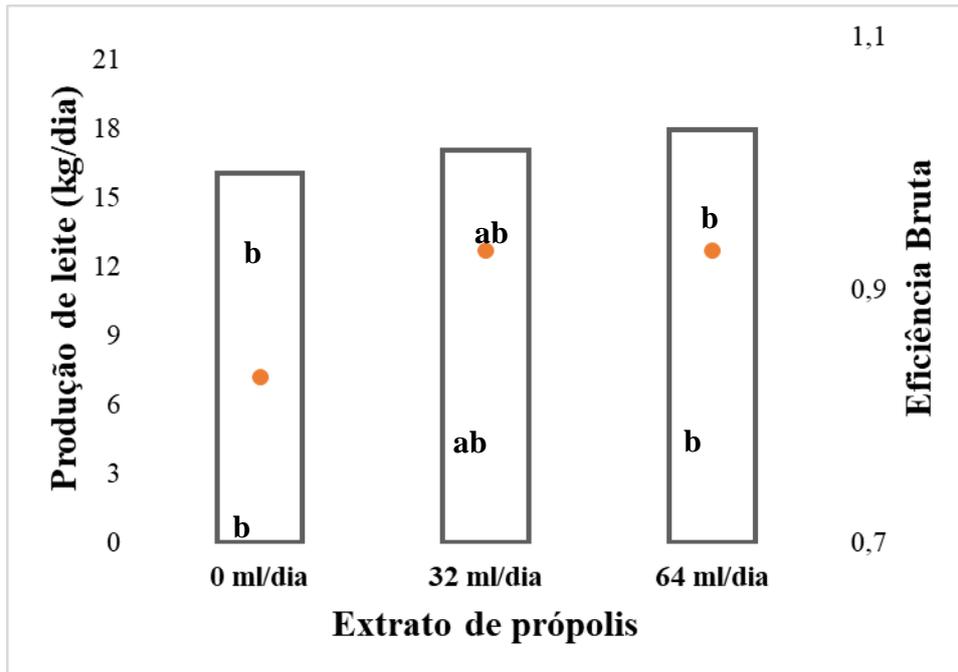


Figura 1. Produção de leite (kg/dia) e eficiência alimentar bruta de vacas holandesas tratadas com extrato etanólico de própolis. Produção de leite: EPM=0,815, p-Valor=0,0663; Eficiência alimentar bruta: EPM=0,042, p-Valor=0,0535.

Os teores de gordura (% e g), proteína (% e g), lactose (% e g) e sólidos totais (%) do leite das vacas não foram influenciados pela oferta de EP.

Tabela 3 -Composição do leite de vacas holandesas tratadas com extrato etanólico de própolis.

	Níveis de extrato de própolis			EPM <sup>1</sup>	P-Valor
	0 ml/d	34 ml/d	64 ml/d		
Gordura (%)	3,88	3,98	3,54	0,232	0,5721
Proteína (%)	3,75	3,51	3,44	0,082	0,3041
Lactose (%)	5,49	5,21	5,11	0,121	0,4185
Sólidos totais (%)	10,18	9,54	9,34	0,221	0,3014
Extrato seco desengordurado (%)	6,22	5,55	5,8	0,170	0,2978
Gordura (g)	0,56	0,68	0,64	0,053	0,3714
Proteína (g)	0,54	0,6	0,61	0,038	0,4068
Lactose (g)	0,79	0,89	0,91	0,056	0,4071

<sup>1</sup>Erro padrão da média.

A oferta de EP não influenciou nos teores de glicose (média), ureia, proteína total, colesterol total, triglicerídeos séricos de vacas holandesas.

Tabela 4 -Parâmetros nutricionais e metabólicos de vacas holandesas tratadas com extrato etanólico de própolis

	Níveis de extrato de própolis			EPM <sup>1</sup>	P-Valor
	0 ml/d	32 ml/d	64 ml/d		
Proteína total (g/dl)	6,28	6,45	6,16	0,153	0,3864
Albumina (g/dl)	3,21	2,9	2,96	0,195	0,2887
Ureia (mg/dl)	25,11	24,73	22,18	2,167	0,7185
Creatinina (mg/dl)	1,66	1,66	1,59	0,036	0,6413
Glicose (mg/dl)	58,03	60,3	58,83	2,353	0,8373
AST (U/L)	72,83	83,76	82,9	5,459	0,3367
Colesterol (mg/dl)	113	109,4	108,3	4,366	0,7879
Triglicerídeos (mg/dl)	13,88	14,48	15,43	1,155	0,5438

<sup>1</sup>Erro padrão da média.

Exceto pela temperatura retal, os parâmetros fisiológicos das vacas não foram influenciados ( $P > 0,05$ ) pela oferta do EP (Tabela 5).

Tabela 5 -Parâmetros fisiológicos de vacas holandesas tratadas com extrato etanolico de própolis.

Variável	Extrato de própolis (ml/dia)			Temperatura Ambiente			EPM	P-Valor		
	0	32	64	< 32	32-34	>34		P	CT	P x CT
Temperatura Retal (°C)	38,19 <sup>b</sup>	38,33 <sup>a</sup>	38,20 <sup>b</sup>	38,25	38,30	38,18	0,04	0,0283	0,2713	0,5488
Frequência Respiratória (r/min)	57,46	58,87	57,25	54,11 <sup>B</sup>	57,95 <sup>AB</sup>	61,52 <sup>A</sup>	0,76	0,5525	0,0164	0,5482
Temperatura do Tronco	35,72	36,13	35,90	35,43 <sup>B</sup>	36,88 <sup>A</sup>	36,44 <sup>A</sup>	0,11	0,1532	0,0117	0,4486
Temperatura Ocular	36,37	36,39	36,24	35,60	43,72	37,06	0,08	0,5245	0,0019	0,2235
Temperatura Focinho	33,68	33,43	33,50	32,68 <sup>B</sup>	33,81 <sup>A</sup>	34,12 <sup>A</sup>	0,11	0,5231	<.0001	0,4613
Temperatura orelha	35,87	35,97	36,01	35,25 <sup>B</sup>	36,08 <sup>A</sup>	36,53 <sup>A</sup>	0,11	0,8127	0,0036	0,4814

EPM = erro padrão da média; P = efeito da oferta de própolis; CT = efeito da classe de temperatura ambiental; PxCT = interação entre P e CT; <sup>ab</sup> Médias com letras minúsculas diferentes na mesma linha diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%; <sup>ABC</sup> Médias com letras maiúsculas diferentes na mesma linha diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

## 5 DISCUSSÃO

A nossa hipótese era que a oferta do extrato etanólico da própolis alterasse a microbiota ruminal influenciando a eficiência do uso dos nutrientes.

A adição de extrato etanólico da própolis na dieta de vacas leiteiras não afetou ( $P > 0,05$ ) consumo dos nutrientes, composição do leite nem os parâmetros sanguíneos. No entanto, houve uma tendência a diferença ( $P \geq 0,05$ ,  $P \leq 0,10$ ) na produção de leite, as vacas suplementadas com o maior nível de extrato etanólico da própolis produziram mais leite em relação aos demais tratamentos.

Esperava-se que ocorresse uma alteração no consumo de matéria seca nas novilhas, já que aditivos fitoquímicos em níveis elevados pode interferir na ingestão de matéria seca e na digestibilidade dos nutrientes LILLEHOJ, Hyun et al. (2018). Entretanto, nesse estudo mantiveram uma média de consumo de matéria seca de 18,96 kg/d. Provavelmente a quantidade de 64 ml/d de extrato etanólico da própolis ofertado não foi suficiente para promover alterações importantes sobre a degradação da fibra da dieta. Levando em consideração que a dieta usada em nosso experimento tinha uma relação volumoso: concentrado 50:50, pode-se considerar que as vacas regularam o consumo de matéria seca por um componente físico que está associado à capacidade de distensão do rúmen-retículo em função do teor de fibra em detergente neutro da ração (SILVA, 2016). A adição de aditivos fitoquímicos na dieta de novilhas confinadas, não influenciou o consumo de matéria seca e o desempenho dos animal (OLIVEIRA, A. P. et al. 2013).

Outros autores que avaliaram a inclusão de níveis crescentes de óleo de soja e extrato etanólico de própolis bruta na alimentação de cabras leiteiras, sobre o consumo e fermentação ruminal, demonstraram que nenhum dos aditivos avaliados apresentou efeito sobre o consumo de matéria seca, nutrientes e sobre os parâmetros ruminais estudados (AGIAR, 2009).

Aditivos fitonutrientes têm efeitos metabólicos que não estão relacionados às suas atividades no rúmen de fermentação ruminal *in vitro*. Em gado leiteiro não identificaram o uso de fitoquímicos como potencial modulador da fermentação ruminal, outros estudos relatam que o uso de esse fitoquímico (LILLEHOJ, Hyun et al. 2018) aumenta a matéria seca e a ingesta de água em gado de corte, possivelmente isso explique a tendência a diferencia do tempo no bebedor das novilhas suplementadas com os diferentes níveis de extrato de própolis em comparação ao tratamento controle.

Os animais consumiram uma média de 2,83 kg/d de proteína bruta e 6,62 kg/d de carboidratos não fibrosos. Esses consumos não foram influenciados pela suplementação do EP. Esperava-se que o consumo de proteína bruta fosse maior e tivéssemos uma resposta associada

com as variáveis sanguíneas dos animais. Contudo, essas respostas não foram exibidas. A diminuição das proteínas totais no plasma está relacionada com deficiência proteica na alimentação. Estima-se que dietas com menos de 10% de proteína causam diminuição dos níveis proteicos no sangue, KAWANO (1997).

Normalmente os aditivos fitoquímicos alteram o padrão de uso de nitrogênio no ambiente ruminal, numerosos estudos falharam em indicar uma diferença no N de ureia no sangue ou no leite de animais que receberam óleos essenciais, o líquido ruminal quando é associado com níveis crescentes de própolis ocorre uma redução nas concentrações de nitrogênio amoniacal, associado à redução da desaminação de aminoácidos e/ou à redução da taxa de crescimento de bactérias fermentadoras de aminoácidos na presença de própolis ÖZTURK, Hakan et al. (2010). Nesse processo de redução de nitrogênio são selecionando determinados grupos de bactérias esses grupos selecionados são mais eficientes no uso de aminoácidos, mas são menos eficientes no uso da ureia. Esperávamos uma resposta sanguínea como uma menor quantidade de ureia no sangue, que indicasse que a proteína estava sendo melhor aproveitada o que houvesse uma menor degradação proteica no ambiente ruminal.

Alto consumo de proteína no rúmen, resulta em alta concentração de ureia sérica, sendo este um indicador sensível e imediato da ingestão proteica HERDT (2000). No entanto, a digestibilidade ruminal reduzida não teve efeito sobre os níveis de nitrogênio ureico no sangue em novilhas de corte suplementadas com óleos essenciais. Isso pode indicar que algumas espécies de bactérias produtoras de hiper-amônia são menos sensíveis a alguns fitoquímicos TEDESCHI (2021). Com esses achados poderíamos especular que a dose de extrato etanólico de própolis não seria o suficiente para lograr esta alteração.

Podemos concluir que o extrato etanólico nessas concentrações não seria pato-tóxica para as vacas holandesas em período de lactação já que não houve uma lesão hepática que geraria um aumento da aspartato amino transferase no sangue, encontrasse nos níveis permitidos segundo GAVA, Aldo et al. (1997).

Em quanto aos carboidratos não fibrosos não houve efeito, aqui nessa fração de carboidratos não fibrosos, a pesar de ser bastante heterogênea, o principal componente dos carboidratos não fibrosos é o amido que foi vinculado pelo milho da dieta, esse amido normalmente vai influenciar nos níveis de glicose, KNOWLTON, K. F. et al. (1998). Observaram que a infusão de amido abomasal tendeu a aumentar a taxa de perda irreversível de glicose e aumentar a oxidação da glicose. É importante levar em consideração que ruminantes têm mecanismos homeostáticos e homeo fisiológicos muito bem estabelecidos para a regulação da glicose plasmática BAUMAN, D. E.(2000), é por isso que não se espera na

maior parte das vezes um impacto direto da dieta, os indicadores de lipídio, seriam um indicador do status energético do animal.

O tratamento 3 de 64ml/d de extrato etanólico da própolis respondeu de forma equilibrada e ajudou a uma melhor composição do leite (Tabela 3), a presença baixa de sólidos deve-se a redução no conteúdo grasso, mas o conteúdo de proteína e lactose foi melhor do que os tratamentos 1 e 2, o que garantiu uma melhor eficiência o que também vemos reflexo no análise sanguíneo no colesterol reduzido. Não tivemos efeito nas variáveis fisiológicas, proteína total, albumina, creatina, AST, Colesterol e Triglicérides, as vacas não precisaram usar as reservas de energia.

Houve uma tendência de variação quanto ao tempo de alimentação, as vacas que receberam maior nível de própolis permaneceram mais tempo no cocho, isso poderia estar relacionado a que, provavelmente, os animais que consumiram mais nível de própolis tiveram uma mudança no ambiente ruminal e essa mudança foi compensada pelo animal por uma alteração em seu comportamento ingestivo, então ao vez do animal permanecer no cocho consumindo de forma mais estável e linear tivemos o que poderíamos chamar de intermitência de consumo nas vacas alimentadas com diferentes níveis de própolis.

Existem algumas evidências que mostram que os aditivos fotoquímicos antioxidantes têm potencial com estresse térmico crônico sob condições desafiadoras em outras espécies animais AKBARIAN, Abdollah et al. (2016). Esperávamos que houvesse um efeito dos tratamentos de níveis de extrato etanólico da própolis (34ml/d, 64ml/d) sobre os parâmetros da temperatura retal, temperatura do tronco, temperatura ocular, temperatura do focinho, só observamos uma tendência a diferencia entre tratamentos para temperatura retal. Esses resultados coincidem com os achados por SAHIN, Kazim et al. (2006), que mostram a adição de polifenóis extraídos dos tegumentos de sementes de *Tamarindus* indica não provocou alívio do dano oxidativo com o aumento da temperatura. Poderíamos relacioná-lo com que antioxidantes diretos dos flavonóides, basicamente porque esses compostos são pouco absorvidos no intestino, rapidamente metabolizados e excretados, resultando em concentrações fisiologicamente baixas nos tecidos-alvo.

## **6 CONCLUSÃO**

A oferta de 64 ml/d do extrato etanólico de própolis aumenta a produção e eficiência alimentar bruta de vacas em lactação sem influenciar a composição do leite os parâmetros fisiológicos e de bem-estar dos animais.

## REFERENCIAS

- AGUIAR, Sílvia Cristina de. **Produtos à base de própolis (LLOS) na dieta de bovinos mestiços não castrados em confinamento**. 2009. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Maringá.
- AKBARIAN, Abdollah et al. Association between heat stress and oxidative stress in poultry; mitochondrial dysfunction and dietary interventions with phytochemicals. *Journal of animal science and biotechnology*, v. 7, n. 1, p. 1-14, 2016. Disponível em <<https://doi.org/10.1186/s40104-016-0097-5>>
- ATAIDES, Ana Cláudia Cardoso et al. CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA DE EXTRATOS VEGETAIS E UTILIZAÇÃO EM PRODUÇÃO ANIMAL. 2015. <https://repositorio.ifgoiano.edu.br/handle/prefix/35> CECHINEL FILHO, Valdir; ZANCHETT, Camile Cecconi Cechinel. *Fitoterapia Avançada: Uma Abordagem Química, Biológica e Nutricional*. Artmed Editora, 2020.
- BALCELLS, J. et al. Effects of an extract of plant flavonoids (Bioflavex) on rumen fermentation and performance in heifers fed high-concentrate diets. *Journal of animal science*, v. 90, n. 13, p. 4975-4984, 2012. Disponível em <<https://doi.org/10.2527/jas.2011-4955>>
- BAUMAN, D. E. 18 Regulation of Nutrient Partitioning During Lactation: Homeostasis and Homeorhesis. **Ruminant physiology: Digestion, metabolism, growth, and reproduction**, p. 311, 2000.
- BORRELLI, F. et al. Phytochemical compounds involved in the anti-inflammatory effect of propolis extract. *Fitoterapia*, v. 73, p. S53-S63, 2002. Disponível em <<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.06.050>>
- BROUDISCOU, Laurent-Philippe; PAPON, Yves; BROUDISCOU, Anne F. Effects of dry plant extracts on feed degradation and the production of rumen microbial biomass in a dual outflow fermenter. *Animal Feed Science and Technology*, v. 101, n. 1-4, p. 183-189, 2002. Disponível em <[https://doi.org/10.1016/S0377-8401\(02\)00221-3](https://doi.org/10.1016/S0377-8401(02)00221-3)>
- BÜRGER, Peter Johann et al. Comportamento ingestivo em bezerros holandeses alimentados com dietas contendo diferentes níveis de concentrado. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 29, n. 1, p. 236-242, 2000. Disponível em <<https://doi.org/10.1590/S1516-35982000000100031>>
- DA CRUZ, Fernanda Baldomir et al. Avaliação da atividade anti-inflamatória de própolis de abelha *Apis mellifera*: uma revisão. *Research, Society and Development*, v. 10, n. 14, p. e250101421817-e250101421817, 2021. <https://doi.org/10.33448/rsd-v10i14.21817>
- DONNO, Dario et al. Bud Extracts as New Phytochemical Source for Herbal Preparations—Quality Control and Standardization by Analytical Fingerprint. *Phytochemicals—Isolation,*

Characterisation and Role in Human Health, 1st ed.; Rao, AV, Rao, LG, Eds, p. 187-218, 2015. Disponível em < <https://dx.doi.org/10.5772/59759> >

FERNANDES, Leila das Dores. Inclusão de aditivos sobre o consumo e o desempenho de bovinos: uma revisão sistemática e metanálise. 2021. <http://acervo.ufvjm.edu.br/jspui/handle/1/2712>

FERREIRA, A. C. et al. Effect of replacing ground corn and soybean meal with licuri cake on the performance, digestibility, nitrogen metabolism and ingestive behavior in lactating dairy cows. *animal*, v. 11, n. 11, p. 1957-1965, 2017.

GAVA, Aldo et al. Intoxicação por salinomicina em bovinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 17, p. 127-130, 1997. Disponível em < <https://doi.org/10.1590/S0100-736X1997000300007> >

GROSS, Josef Johann; BRUCKMAIER, R. M. Metabolic challenges in lactating dairy cows and their assessment via established and novel indicators in milk. *Animal*, v. 13, n. S1, p. s75-s81, 2019.

HERDT, Thomas H. Ruminant adaptation to negative energy balance: Influences on the etiology of ketosis and fatty liver. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 16, n. 2, p. 215-230, 2000. 10.1016/s0749-0720(15)30102-x.

KAWANO, Tetsu et al. CD1d-restricted and TCR-mediated activation of V $\alpha$ 14 NKT cells by glycosylceramides. **Science**, v. 278, n. 5343, p. 1626-1629, 1997.

KNOWLTON, K. F. et al. Glucose metabolism and milk yield of cows infused abomasally or ruminally with starch. **Journal of Dairy Science**, v. 81, n. 12, p. 3248-3258, 1998. Disponível em < [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(98\)75889-8](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(98)75889-8) >

KOLLING, Giovanni Jacob. Extratos de orégano e chá verde como aditivos para bovinos leiteiros. 2016. <http://hdl.handle.net/10183/143294>

LILLEHOJ, Hyun et al. Phytochemicals as antibiotic alternatives to promote growth and enhance host health. **Veterinary research**, v. 49, n. 1, p. 1-18, 2018.

MEDA, Aline, et al. Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkina Fasan honey, as well as their radical scavenging activity. **Food Chemistry**, v.91, n.3, p.571-577, 2005.

MORSY, A. S. et al. Comparison of the in vitro efficiency of supplementary bee propolis extracts of different origin in enhancing the ruminal degradability of organic matter and

mitigating the formation of methane. *Animal Feed Science and Technology*, v. 199, p. 51-60, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2014.11.004>

OLIVEIRA, A. P. et al. Substituição de monensina sódica por bicarbonato de sódio em dietas de novilhas confinadas. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 65, n. 4, p. 1149-1157, 2013.

OLIVEIRA, Larissa Santana. Agropecuária e Sustentabilidade: a importância da produção de qualidade, visando a proteção do ecossistema. 2021. <https://repositorio.animaeducacao.com.br/handle/ANIMA/17709>

ÖZTURK, Hakan et al. Effects of propolis on in vitro rumen microbial fermentation. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, v. 57, n. 4, p. 217-221, 2010. Disponível em < [10.1501/Vetfak\\_0000002428](https://doi.org/10.1501/Vetfak_0000002428) >

PAULA, Eduardo Marostegan de. Produto com compostos fenólicos da própolis sobre parâmetros digestivos e ruminais, e população de protozoários em bubalinos. 2013. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Maringá.

PEREIRA, Marcella Nunes; SCUSSEL, Vildes Maria. Resíduos de antimicrobianos em leite bovino: fonte de contaminação, impactos e controle. *Revista de Ciências Agroveterinárias*, v. 16, n. 2, p. 170-182, 2017. Disponível em <https://doi.org/10.5965/223811711622017170>

SAHIN, Kazim et al. Berberis vulgaris root extract alleviates the adverse effects of heat stress via modulating hepatic nuclear transcription factors in quails. *British Journal of Nutrition*, v. 110, n. 4, p. 609-616, 2013. Disponível em <<https://doi.org/10.1017/S0007114512005648>>

SAHIN, Kazim et al. Effects of lycopene supplementation on antioxidant status, oxidative stress, performance and carcass characteristics in heat-stressed Japanese quail. *Journal of Thermal Biology*, v. 31, n. 4, p. 307-312, 2006.

SANTANA, Henrique Freitas et al. Bactericidal activity of ethanolic extracts of propolis against *Staphylococcus aureus* isolated from mastitic cows. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 28, n. 2, p. 485-491, 2012. <https://doi.org/10.1007/s11274-011-0839-7>

SILVA, JFC da. Mecanismos reguladores de consumo. **Nutrição de ruminantes. Jaboticabal: FUNEP**, p. 57-78, 2006.

SILVA, Karla Camyla Morais da et al. Os diferentes tipos de própolis e suas indicações: uma revisão da literatura. 2018. <http://dspace.sti.ufcg.edu.br:8080/jspui/handle/riufcg/3303>

- SILVA, Luis Felipe P. et al. CAPÍTULO XIV USO DE PROBIÓTICOS PARA AUMENTO DA EFICIÊNCIA DA FERMENTAÇÃO RUMINAL EM BOVINOS DE CORTE. *Novos Desafios da Pesquisa em Nutrição e Produção Animal*, p. 281. 2016.
- STRADIOTTI JÚNIOR, Deolindo et al. Ação do extrato de própolis sobre a fermentação in vitro de diferentes alimentos pela técnica de produção de gases. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 33, n. 4, p. 1093-1099, 2004.
- STRIDER, Débora de Oliveira. Extrato de chá verde como aditivo para novilhas leiteiras. 2016.
- TEDESCHI, Luis O. et al. Nutritional aspects of ecologically relevant phytochemicals in ruminant production. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 8, p. 155, 2021.
- VELAZQUEZ, E., Tournier, H. A., De Buschiazzo, P. M., Saavedra, G., & Schinella, G. R. Antioxidant activity of Paraguayan plant extracts. **Fitoterapia**, v.74, n.1-2, p.91-97, 2003.
- YURDAKOK-DIKMEN, Begum et al. Effects of phthalates on bovine primary testicular culture and spermatozoa. **Cytotechnology**, v. 71, n. 5, p. 935-947, 2019. Disponível em < <https://doi.org/10.1007/s10616-019-00336-z> >