

Universidade Federal de Juiz de Fora
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas
Mestrado em Comportamento e Biologia Animal

Thaís Barros Rísoli

**PROTOZOÁRIOS CILIADOS (PROTISTA, CILIOPHORA) NO RÚMEN DE
NOVILHOS RECEBENDO DIETA COM MONENSINA OU PRÓPOLIS**

Juiz de Fora

2011

Thaís Barros Rísoli

Protozoários ciliados (Protista, Ciliophora) no rúmen de novilhos recebendo dieta com monensina ou própolis

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, área de concentração: Comportamento e Biologia Animal, da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial obtenção do grau de Mestre.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Marta D'Agosto

Co-orientador: Prof. Dr. Erik Daemon

Juiz de Fora

2011

Ríspoli, Thaís Barros.

Protozoários ciliados (Protista, Ciliophora) no rúmen de novilhos recebendo dieta com monensina ou própolis/ Thaís Barros Ríspoli. – 2011.

62 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Comportamento e Biologia Animal) –
Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2011.

1. Protozoários. 2. Rúmen. 3. Própolis. I. Título.

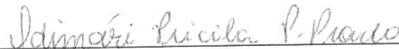
**PROTOZOÁRIOS CILIADOS (PROTISTA, CILIOPHORA) NO RÚMEN
DE NOVILHOS RECEBENDO DIETA COM MONENSINA OU
PRÓPOLIS**

Thaís Barros Rísoli

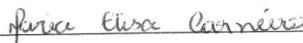
Orientadora: Profª. Dra. Marta D'Agosto

Dissertação apresentada ao Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Juiz de Fora, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas (área de concentração em Comportamento e Biologia Animal).

Aprovada em 18 de fevereiro de 2011.



Profª. Dra. Odimari Pricila Pires do Prado
Universidade Estadual de Maringá



Profª. Dra. Maria Elisa Carneiro
Faculdades Integradas da União Educacional do Planalto Central



Profª. Dra. Marta Távares d'Agosto
Universidade Federal de Juiz de Fora

A minha mãe, com amor.

Ao mestre e amigo Rafael Gióia Martins Neto, com saudades.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter me abençoado todos os dias dessa caminhada.

À minha mãe, Dona Goretti, por sempre cuidar de mim. Amor incondicional.

Aos familiares pela torcida.

Aos meus grandes e verdadeiros amigos, pela torcida, carinho e por entender os momentos de ausência.

À minha orientadora Prof^a. Dr^a. Marta D'Agosto, pela oportunidade e confiança depositada durante todo o trabalho.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Erik Daemon, pela colaboração, conselhos e risadas.

Ao Prof. Dr. Antônio Beraldo, com o auxílio nas estatísticas.

Aos amigos de Laboratório Protozoologia da UFJF, pela cooperação, amizade, ensinamentos compartilhados e principalmente pelos momentos de descontração.

À amiga Odimari Prado, por ter me recebido tão bem em sua terrinha e por ter sido a responsável por essa parceria com a Universidade Estadual de Maringá.

À Prof^a. Dr^a. Lúcia Zeoula da Universidade Estadual de Maringá, por ter me acolhido tão carinhosamente e ter confiado no meu trabalho.

Aos amigos de Maringá, pela ajuda com as coletas, manejo dos animais e carinho com os meus “protôs”. Adorei ter convivido com vocês.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Comportamento e Biologia Animal da Universidade Federal de Juiz de Fora, pela realização do curso.

A todos os professores e funcionários da PPGCB - CBA. Em especial à Tia Rita, por ser tão mãezona.

Aos amigos da Pós-graduação, pela convivência e as boas conversas durante os poucos, mas inesquecíveis eventos da turma.

Agradeço de modo muito especial ao amigo Prof. Dr. Rafael Gióia Martins Neto, sempre presente em meu coração. Ao infinito e além.

Finalmente agradeço a todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho.

A todos, o meu carinho.

“Às vezes o que a gente procura, não é o que a gente procura, mas sim o que a gente encontra”

(Autor desconhecido)

“O essencial é invisível aos olhos”

(Antoine de Saint-Exupéry)

RESUMO

Os protozoários ciliados fazem parte da microbiota ruminal e juntamente com as bactérias, fungos e protozoários flagelados desempenham funções bioquímicas e fisiológicas importantes para os ruminantes, principalmente no metabolismo dos nutrientes. Entretanto, seu papel no rúmen, ainda não é totalmente claro, podendo trazer tanto efeitos benéficos como prejudiciais para a produção animal. O presente estudo objetivou caracterizar as populações de protozoários ciliados no rúmen de novilhos alimentados com dietas adicionadas de monensina ou produtos à base de própolis LLOS, avaliando o impacto da suplementação desses aditivos em curto prazo de tempo sobre as populações de ciliados. Cinco novilhos, fistulados no rúmen e distribuídos no delineamento quadrado latino (5X5) receberam dieta constituída por 47% de silagem de milho e 53% de concentrado à base de milho moído e farelo de soja. Foram testadas dietas sem aditivos (controle), com adição de monensina ou produtos à base de própolis LLOSB1+, LLOSC1+ ou LLOSC1++. As amostras do conteúdo ruminal foram coletadas antes do início de cada período amostral (dia 0) e 8, 15 e 21 dias após o início de cada período amostral, sendo que, no dia de cada coleta foram retiradas amostras antes do fornecimento da dieta experimental (0h) e 3 e 6 horas depois da suplementação. O gênero predominante nas dietas foi o *Entodinium*, representando valor acima de 97% da densidade total de ciliados. As populações de ciliados no rúmen dos novilhos não foram alteradas pela suplementação com o aditivo monensina ou produtos à base de própolis LLOS. O pH ruminal alterou-se apenas entre os tempos de amostragem. As populações de *Entodinium* aumentaram após 15 dias da adição do produto à base de propolis LLOSB1+ e após 21 dias foi verificado um efeito negativo desse aditivo sobre os ciliados, que aumentaram, retornando aos níveis iniciais. Os ciliados diminuíram após 8 dias de adição de monensina na dieta, restabelecendo-se após 15 da suplementação e tornando a diminuir no final do experimento. As populações do gênero *Entodinium* ao longo do experimento foram alteradas durante os períodos experimentais, especialmente com a suplementação dos produtos à base de própolis LLOS o que pode ter influenciado os resultados encontrados. Sugere-se assim, o aumento do período experimental e substituição do delineamento quadrado latino em trabalhos futuros.

Palavras chave: aditivo, antibióticos, bovinos, flavonóides, ionóforos, microbiota ruminal.

ABSTRACT

The ciliated protozoa are part of the rumen microbial and together with bacteria, fungi and flagellate protozoa play important biochemical and physiological functions for ruminants, especially in the metabolism of nutrients. However, its role in the rumen yet is not entirely clear, and it may bring both beneficial and harmful effects to animal production. This study aimed to characterize the ciliated protozoa population in the rumen of steers fed with diets containing monensin or products based on propolis LLOS, evaluating the impact of supplementation of these additives in a short period of time on the abundance of ciliates. Five steers, fistulated in the rumen and distributed in Latin square design (5X5) were fed with a diet consisting of 47% corn silage and 53% concentrate based on grinded corn and bran soybean. Diets were tested without additives (control), with the addition of monensin or products based on propolis LLOSB1+, LLOSC1+ and LLOSC1++. The samples of rumen contents were collected before the start of each sampling period (day 0) and 8, 15 and 21 days after the start of each sampling period, whereas, on each collect day were collected samples before the supply of experimental diet (0 h) and 3 and 6 hours later supplementation. The predominant genus in the diets was the *Entodinium*, representing a value above 97% of the total density of ciliates. The ciliate population in the rumen of steers were not altered by supplementation with the additive monensin or products based on propolis LLOS. Rumen pH changed only between times of sampling. The *Entodinium* population increased after 15 days of the products addition based on propolis LLOSB1+ and after 21 days it was observed a negative effect of this additive on the ciliates. They increased, returning to their initial levels. The ciliates got shorter after 8 days of monensina addition in the diet, reestablishing after 15 days of supplementation and getting shorter again at the end of the experiment. The genus *Entodinium* population throughout the experiment were altered during the experimental periods, especially with the addition of the products based on propolis LLOS which may have affected the results. It is therefore suggested, an increase of the experimental period and the replacement of the Latin square design in future works..

Keywords: additive, antibiotics, cattle, flavonoids, ionophores, rumen microbial.

LISTA DE DESENHOS

| | | |
|-----------|--|----|
| Desenho 1 | Classificação sistemática dos protozoários ciliados do rúmen | 15 |
| Desenho 2 | Aditivo sendo inserido diretamente no rúmen | 32 |
| Desenho 3 | Densidade total de protozoários ciliados ($n \times 10^4$ ciliados/mL) no rúmen de bovinos recebendo dieta com monensina ou produtos a base de própolis LLOS nos tempos de amostragem. | 35 |
| Desenho 4 | pH ruminal de bovinos recebendo dieta com monensina ou produtos a base de própolis LLOS nos tempos de amostragem. | 35 |
| Desenho 5 | Efeito dos produtos à base de própolis LLOS sobre as populações de <i>Entodinium</i> ($n \times 10^6$ ciliados/mL) sob diferentes dias de amostragem (0, 8, 15 e 21 dias). | 44 |
| Desenho 6 | Comportamento das populações de <i>Entodinium</i> no rúmen de bovinos recebendo dieta com monensina ou produtos à base de própolis LLOS, utilizando números índices, onde 1 representa o valor inicial de cada período | 46 |

LISTA DE QUADROS

| | | |
|----------|---|----|
| Quadro 1 | Composição dos ingredientes e da dieta basal. | 31 |
| Quadro 2 | Protozoários ciliados observados no rúmen de novilhos alimentados com dieta adicionada de monensina ou produtos à base de própolis LLOS. | 33 |
| Quadro 3 | Densidade média e desvio padrão (DP) de <i>Entodinium</i> , <i>Charonina</i> , <i>Isotrichidae</i> , <i>Diplodiniinae</i> ($n \times 10^4$ ciliados/mL) e pH no rúmen de novilhos alimentados com dieta adicionada de monensina ou de produtos à base de própolis LLOS. | 34 |
| Quadro 4 | Disposição dos animais no delineamento do quadrado latino durante o experimento. | 42 |
| Quadro 5 | Densidade média e desvio padrão (\pm DP) de <i>Entodinium</i> ($n \times 10^6$ ciliados/mL) no rúmen de novilhos alimentados com dieta adicionada de monensina ou produtos à base de própolis LLOS sob diferentes dias de amostragem (0, 8, 15 e 21 dias) | 44 |
| Quadro 6 | Densidade média e desvio padrão (\pm DP) de <i>Entodinium</i> ($n \times 10^6$ ciliados/mL) no rúmen de novilhos alimentados com dieta adicionada de monensina ou produtos à base de própolis LLOS por 21 dias, em diferentes períodos. | 45 |

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| INTRODUÇÃO | 12 |
| REVISÃO DE LITERATURA | 14 |
| SESSÃO I - Caracterização das populações de protozoários ciliados no rúmen de novilhos recebendo monensina sódica ou produtos a base de própolis | |
| LLOS | 28 |
| SESSÃO II - Efeitos da suplementação da monensina ou de própolis em curto prazo sobre as populações de ciliados no rúmen de bovinos | 39 |
| CONSIDERAÇÕES FINAIS | 49 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 50 |

INTRODUÇÃO

Um dos maiores rebanhos bovinos do mundo está concentrado no Brasil, que tem como principal vantagem o fato de possuir grandes áreas de terras com baixo custo e clima favorável. Entretanto, o Brasil ainda enfrenta alguns problemas devido ao sistema de criação adotado e à sazonalidade das chuvas que não favorecem as pastagens durante o ano todo (Sarcinelli *et al.*, 2007). A busca de produtividade é fundamental na economia de mercado e consiste em fornecer produtos de qualidade e com preço adequado. Com base nisso a cadeia produtiva de carne bovina vem procurando novas tecnologias com o intuito de maximizar a produção, entretanto nessas novas tecnologias ainda são necessárias alguns ajustes.

Vários métodos têm sido sugeridos para modificar a fermentação ruminal e obter aumentos de produtividade em ruminantes como, por exemplo, os aditivos alimentares ionóforos. Os ionóforos são um tipo de antibiótico com capacidade de alterar o fluxo de cátions e íons através da membrana celular dos microrganismos ruminais (Russel & Strobel, 1989). Esses aditivos inibem ou deprimem o crescimento de microrganismos ruminais cujo invólucro celular é composto apenas de parede celular, como por exemplo, as bactérias Gram-positivas (Nicodemo, 2001), principais responsáveis pela formação de ácido acético, butírico, fórmico e hidrogênio durante a fermentação ruminal, e que representam perda de energia por parte do hospedeiro e prejuízo na produtividade animal (Morais *et al.*, 2006).

A monensina sódica é o antibiótico utilizado para melhorar a conversão alimentar em ruminantes, porém nos últimos anos tem sofrido uma série de restrições, principalmente pela União Européia que determinou a proibição do uso de antibióticos como aditivos alimentares para bovinos através do Regulamento nº 1831/2003 em razão do risco de intoxicação e da possível resistência antimicrobiana em humanos relacionada aos antibióticos presentes na alimentação animal (Mathew *et al.*, 2001). Em vista disso, tem crescido o interesse pela utilização de outros aditivos que ofereçam resultados semelhantes aos ionóforos, entretanto sem riscos à saúde humana. A própolis vem se destacando como alternativa para substituição dos aditivos usuais para bovinos por exercer função bacteriostática sobre a maioria das bactérias Gram-positivas e algumas Gram-negativas, (Mirzoeva *et al.*, 1997).

A ação dos aditivos sobre a microbiota ruminal ainda é pouco esclarecido, principalmente em relação às populações de protozoários ciliados ruminais. A monensina reduz as populações de ciliados do rúmen, entretanto esse efeito é transitório e os ciliados podem se adaptar a esse aditivo quando utilizado por períodos mais longos na dieta de

ruminantes (Guan *et al.*, 2006). Ainda são poucos os relatos sobre os efeitos da própolis nas populações de ciliados do rúmen, sendo necessários mais estudos sobre assunto.

Uma série de experimentos vem sendo realizada para avaliar os efeitos de um novo aditivo alimentar a base de própolis em bovinos e bubalinos. A atuação dos produtos à base de própolis LLOS sobre a microbiota ruminal é importante para fundamentar os estudos sobre este novo aditivo. Deste modo, os objetivos do presente trabalho foram avaliar a ocorrência e a densidade das populações de protozoários ciliados no rúmen de novilhos alimentados com dieta composta de 47% de silagem de milho e 53% de concentrado adicionado de monensina ou de produtos à base de própolis LLOS e avaliar o impacto da administração em curto prazo de tempo desses aditivos sobre as populações de ciliados.

REVISÃO DE LITERATURA

1 PROTOZOÁRIOS CILIADOS DO RÚMEN

A participação de microrganismos na digestão dos ruminantes é de fundamental importância, uma vez que estes não produzem enzimas que digerem a celulose (Dehority, 1986). A degradação da parede celular pelos ruminantes é consequência da simbiose entre esses e um número ainda não definido de microrganismos anaeróbios presentes no rúmen (Arcuri *et al.*, 2006). O rúmen fornece condições ideais para a colonização e crescimento desses microrganismos. De acordo com Kozloski (2002) estas condições são: ecossistema anaeróbio, temperatura em torno de 39°C e pH entre 6,0 e 7,0, além de presença permanente de substratos e de atividade fermentativa. A ação da microbiota ruminal sobre o substrato tem especial importância, pois constitui a base da fisiologia digestiva dos ruminantes (Arcuri & Matos, 1992).

Os ciliados do rúmen podem participar com mais de 40% do nitrogênio microbiano total do conteúdo do rúmen e com mais de 60% dos produtos de fermentação ruminal (Hungate, 1966). Esses microrganismos variam entre 10^4 até 10^6 ciliados/mL de conteúdo ruminal (Kamra, 2005). Gruby & Delafond (1843) foram os pioneiros a assinalarem a existência de protozoários ciliados no estômago de ruminantes. A distribuição taxonômica dos ciliados (Desenho 1) é baseada, principalmente, em critérios de sua natureza morfológica através da diferenciação de diversas estruturas celulares, como macro e micronúcleo, disposição e localização da ciliatura e a presença ou ausência de placas esqueléticas, e quando presentes, número e forma (Ogimoto & Imai, 1981).

Protozoários ciliados do rúmen desempenham um papel importante, porém ainda não completamente esclarecido na nutrição dos ruminantes podendo trazer benefícios ou prejuízos na produção animal (Williams & Coleman, 1992; Franzolin & Dehority, 1996a; Lopes *et al.*, 2002; Marcin & Südekum, 2009). Os ciliados ruminais podem ser divididos em dois grupos os entodioniomorfos e os isotriquídeos, sendo o primeiro caracterizado por utilizar preferencialmente partículas insolúveis e encontrados em maior número quando a dieta é a base de forragem; e o segundo participam intensamente na assimilação de carboidratos solúveis e são encontrados em maior densidade quando a dieta é a base de concentrado (Kozloski, 2002).

Filo Ciliophora Doflein, 1901

Subfilo Postciliodesmatophora Gerassimova; Seravin, 1976

Classe Karyorelictea Corliss, 1974

Ordem Protostomatida Small; Lynn, 1985

Subordem (1) Archistomatina Puytorac *et al.*, 1974

Família BUETSCHLIIDAE Poche, 1913

Gênero *Buetschlia* Schuberg, 1888

Gênero *Blepharoconus* Gassovsky, 1919

Gênero *Blepharoprosthium* Bundle, 1895

Gênero *Polymorphella* Corliss, 1960

Gênero *Parabundleia* Imai; Ogimoto, 1983

Subfilo Intramacronucleata Lynn, 1996

Classe Litostomatea Small; Lynn, 1981

Subclasse Trichostomatia Bütschli, 1889

Ordem Vestibuliferida Puytorac *et al.*, 1974

Subordem (1) Trichostomatina Bütschli, 1889

Família ISOTRICHIDAE Bütschli, 1889

Gênero *Isotricha* Stein, 1859

Gênero *Dasytricha* Schuberg, 1888

Gênero *Oligoisotricha* Imai, 1981

Gênero *Microcetus* Orpin; Mathiesen, 1986

Subordem (2) Blepharocorythina Wolska, 1971

Família BLEPHAROCORYTHIDAE Hsiung, 1929

Gênero *Charonina* Strande, 1928

Ordem Entodiniomorphida Reichenow in Doflein ; Reichenow, 1929

Subordem Entodiniomorphina Reichenow in Doflein ; Reichenow, 1929

Família OPHRYOSCOLECIDAE Stein, 1859

Subfamília Entodiniinae Lubrisky, 1957

Gênero *Entodinium* Stein, 1859

Gênero *Campylodinium* Jankowsky, 1957

Subfamília Diplodiniinae Lubrisky, 1957

Gênero *Diplodinium* Schuberg, 1888

Gênero *Eodinium* Kofoid; Maclellan, 1932

Gênero *Eremoplastron* Kofoid; Maclellan, 1932

Gênero *Eudiplodinium* Dogiel, 1927

Gênero *Diploplastron* Kofoid; Maclellan, 1932

Gênero *Polyplastron* Dogiel, 1927

Gênero *Elytroplastron* Kofoid; Maclellan, 1932

Gênero *Metadinium* Awerinzew; Mutafova, 1932

Gênero *Ostracodinium* Dogiel, 1927

Gênero *Enoploplastron* Kofoid; Maclellan, 1932

Subfamília Ophryoscolecinae Lubrisky, 1957

Gênero *Ophryoscolex* Stein, 1859

Gênero *Epidinium* Crawley, 1923

Gênero *Epiplastron* Kofoid; Maclellan, 1932

Gênero *Opisthotrichum* Buisson, 1923

Gênero *Caloscolex* Dogiel, 1927

Durante a fermentação, algumas espécies de ciliados do rúmen ingerem bactérias aderidas às partículas de alimento (Willians & Coleman, 1992; Burow *et al.*, 2005), sendo esse um dos fatores para redução da biomassa bacteriana livre no conteúdo ruminal, o que aumenta a reciclagem intra-ruminal e reduz o fluxo de proteína bacteriana para o intestino delgado do ruminante (Arcuri & Matos, 1992). Contudo, este comportamento predatório tem bases complexas, as quais são estabelecidas entre as várias espécies de protozoários ciliados do rúmen (Eadie, 1962; 1967). Os protozoários ciliados também podem ser utilizados pelo ruminante como fonte de proteínas digestíveis (Kozloski, 2002).

2 FATORES QUE ATUAM NA OCORRÊNCIA E DENSIDADE DAS POPULAÇÕES DE PROTOZOÁRIOS CILIADOS DO RÚMEN.

A ocorrência e densidade de protozoários ciliados no rúmen são influenciados principalmente pela dieta oferecida ao animal, pelo pH do conteúdo ruminal e pelas relações que eles estabelecem entre si e com as populações bacterianas (Marinho, 1982). Em dietas experimentais para ruminantes, deve-se levar em conta a necessidade do animal e dos microrganismos ruminais para a maximização da produção microbiana, otimizando-se a produtividade animal (Kumar *et al.*, 1993).

Em função do sistema de alimentação e dos objetivos e níveis de produção animal, o tipo da dieta oferecida aos ruminantes domésticos pode ser alterado com a suplementação de concentrado, deixando de ser constituída apenas por forrageiras. Entretanto, essa prática pode causar alterações em todo o ecossistema ruminal, incluindo as populações de ciliados (Martinele *et al.*, 2008a). De acordo com Franzolin & Dehority (1996a), a densidade das populações de ciliados amilolíticos, como o *Entodinium*, aumenta à medida que o concentrado é adicionado à dieta de ruminantes, enquanto a densidade das populações de ciliados celulolíticos decresce expressivamente. D'Agosto *et al.* (1998) observaram que em dieta para bovinos à base de silagem de milho com 30% de concentrado o número total de ciliados aumentou significativamente, principalmente *Entodinium*.

Entretanto, Martinele *et al.* (2008a) verificaram que as populações de *Entodinium* não se alteraram com a adição de concentrado em dietas à base de capim-elefante em níveis de 20 e 40% para vacas mestiças holandês-zebu. Contudo, podem ocorrer mudanças nas populações de ciliados no rúmen de bovinos submetidos à mesma quantidade de concentrado e, segundo

Michalowski (1977), isto se deve a outros fatores, tais como o tempo de retenção da digesta, pH e até mesmo características metabólicas individuais do hospedeiro.

O tempo entre o fornecimento do alimento pode alterar a densidade das populações de ciliados. Michalowski (1977) relatou que o número de protozoários ciliados no rúmen de ovinos aumentou cerca de 30% quando o alimento era fornecido duas vezes ao dia em relação à quando o alimento era ministrado apenas uma vez ao dia. Outro fator igualmente citado por influenciar diretamente no número e na composição dos protozoários ciliados do rúmen é o tempo de amostragem após a alimentação (Marinho, 1982). De uma maneira geral, as populações de ciliados no rúmen de bovinos e bubalinos apresentam aumento de densidade no momento do fornecimento do alimento, seguido de um decréscimo nas horas subsequentes e tornando a aumentar antes do fornecimento da próxima alimentação (Franzolin Neto *et al.*, 1991; Nogueira Filho *et al.*, 1998).

A variação do pH do conteúdo ruminal esta estreitamente ligada à composição química da dieta, uma vez que em dietas com grande quantidade de amido ou carboidratos solúveis, os valores de pH diminuem (Coalho *et al.*, 2003; Guan *et al.*, 2006). Isso porque quando se adiciona concentrado às dietas ocorre aumento de microrganismos amilolíticos, principais responsáveis pela produção de ácidos graxos voláteis (AGV) no rúmen, o que provoca redução nos valores do pH ruminal (Bürger *et al.*, 2000). Já as dietas com maior quantidade de celulose e outros carboidratos insolúveis, a redução do pH não é tão acentuada devido ao fato do crescimento das principais bactérias celulolíticas ser comprometido em pH ruminal em torno de 6,0 a 6,1, e totalmente inibido em valores abaixo de 5,9 (Russell & Dombrowski, 1980).

Entretanto, não só a dieta pode afetar o pH ruminal, mas também fatores anátomo-fisiológicos do animal, como o tipo e a frequência de mastigação dos alimentos, produção de saliva, taxa de fermentação e concentração de produtos finais (Franzolin & Dehority, 1996b). Ainda segundo esses autores, o pH tem papel decisivo na manutenção da microbiota ruminal, uma vez que seus valores estão relacionados com a sobrevivência desses no ambiente ruminal.

3. UTILIZAÇÃO DE ADITIVOS NA DIETA DE RUMINANTES

No processo de fermentação dos carboidratos estruturais e não-estruturais e das proteínas realizado pelos microrganismos ruminais muitos de seus produtos finais, como ácidos graxos voláteis (AGV) e a proteína microbiana, são as principais fontes de nutrientes para o ruminante. Já outros produtos da fermentação, como calor, metano e amônia, representam perdas de energia e proteína do alimento para o ambiente (Morais *et al.*, 2006). Segundo esses autores, de 2 até 12% de energia consumida pelos ruminantes pode ser perdida na forma de metano (CH₄), um gás produzido no rúmen durante o processo de fermentação dos carboidratos.

No rúmen, o hidrogênio é produzido durante a fermentação anaeróbia das hexoses, nesse processo fermentativo ele pode ser usado durante a síntese dos ácidos graxos voláteis e da matéria orgânica microbiana e seu excesso é eliminado principalmente pela formação de CH₄, em quantidades variáveis, dependendo da concentração e das proporções relativas dos ácidos produzidos (Eun *et al.*, 2004). Por isso, é necessário conhecer as interações entre os microrganismos, seus produtos metabólicos e o hospedeiro, para que se possa maximizar a produção dos ácidos graxos benéficos (acetato, propionato e butirato) ao hospedeiro maximizando a eficiência de utilização dos nutrientes dietéticas.

A manipulação de dietas com aditivos como os ionóforos tem sido testada com a finalidade de diminuir as perdas de energia e melhorar a conversão alimentar dos ruminantes. No Brasil, somente a monensina e a lasalocida são liberados no uso para ruminantes (Zanine *et al.*, 2006). Esses produtos inibem as bactérias Gram-positivas, principais responsáveis pela formação de ácido acético, butírico, fórmico e hidrogênio, que representam prejuízo para a produtividade animal (Morais *et al.*, 2006).

3.1 Modo de ação da monensina no ambiente ruminal e seus efeitos sobre o metabolismo do hospedeiro

Os ionóforos são um tipo de antibiótico que, seletivamente, reduz ou inibe o crescimento de microrganismos do rúmen, aumentando a produtividade animal, principalmente devido às alterações na fermentação ruminal (Zanine *et al.*, 2006). Eles são

produzidos por diversas linhagens de *Streptomyces* e foram inicialmente utilizados como coccidiostáticos para aves, mas a partir da década de 1970 começaram a ser utilizados na dieta de ruminantes (Nicodemo, 2001). O mecanismo de ação dos ionóforos é baseado em sua capacidade de interagir com íons e cátions passivamente, alterando o seu fluxo através da membrana celular dos microrganismos ruminais (Russel & Strobel, 1989).

A monensina sódica tem uma forte preferência por sódio sobre o potássio. Entretanto, o gradiente de potássio no interior da célula é cerca de 25 vezes maior que o gradiente de sódio, tornando o efluxo de potássio via monensina mais favorável que o efluxo de sódio. A alta concentração intracelular de potássio forma um gradiente importante para tamponar o pH intracelular por meio do mecanismo de troca de K^+/H^+ . O efluxo de potássio resulta em excesso de prótons, levando ao decréscimo no pH intracelular (Russel, 1987). Na tentativa de regular o pH, a célula transporta prótons para o exterior, através de bombas de sódio-potássio (Na/K) e de prótons ATPase, o que a longo prazo gera um queda na concentração de ATP intracelular, o qual ocasiona letargia ou morte celular (Russel & Strobel, 1989). Desta forma, os ionóforos geralmente têm ação bacteriostática e não bactericida (Nagaraja & Taylor, 1987).

Os ionóforos atuam, principalmente, sobre bactérias Gram-positivas, com pouco ou nenhum efeito sobre bactérias Gram-negativas e essa atuação tem relação com fatores de resistência presentes na estrutura de sua parede celular. As bactérias Gram-positivas, cujo invólucro celular é formado apenas por parede celular são mais sensíveis à ação de antibióticos (Nicodemo, 2001). Assim como as Gram-positivas, os protozoários ciliados e fungos também são sensíveis aos ionóforos (Dennis *et al.*, 1986). Entretanto as bactérias Gram-negativas geralmente são resistentes ao uso de ionóforos, por apresentarem além da parede celular, uma membrana peptidoglicana externa (Nicodemo, 2001).

Desta forma, o uso de ionóforos aumenta as populações de bactérias Gram-negativas no rúmen, responsáveis por degradar principalmente o amido formando o propionato, a principal fonte de energia para o animal. Além disso, diminui e/ou inibe as populações de bactérias Gram-positivas que além de degradarem celulose formando o acetato e butirato, também fornecem substrato as metanogênicas que utilizam H_2 e CO_2 para a formação de metano (Nagaraja *et al.*, 1997).

Aditivos ionóforos, tem sido utilizado para minimizar a queda do pH ruminal pela fermentação do amido em ácido láctico (Gomes *et al.*, 2010), em dietas contendo alto teor de alimentos concentrados, prevenindo desta forma a acidose ruminal. A monensina inibe bactérias produtoras de lactato e favorece o desenvolvimento de bactérias que o fermentam para a produção de succinato, um precursor do ácido propiônico (Ipharraguerre & Clark,

2003). Redução da produção de lactato pode aumentar o pH ruminal devido ao seu baixo pKa (3,9) em comparação com o pKa no AGV (4,8), normalmente associados com a fermentação ruminal (Russell & Hino, 1985). Guan *et al.* (2006) observaram que em bovinos recebendo dietas concentradas (80%) a monensina não causou variação no pH ruminal, com exceção da primeira semana de suplementação. Gomes *et al.* (2010) observaram que o pH do conteúdo ruminal de bovinos submetidos a dietas concentrada (80%) não foi afetada pela suplementação de monensina durante 15 dias. Entretanto, Ríspoli *et al.* (2009) verificaram aumento no pH ruminal de novilhos submetidos a monensina pelo período de 18 dias.

A monensina pode reduzir a ingestão de alimentos sem prejuízo ao desempenho de bovinos e diminuindo a relação acetato: propionato no rúmen (Araújo *et al.*, 2006). Rodrigues *et al.* (2007) verificaram que a monensina, quando administrada a bovinos alimentados com volumosos de baixo valor nutritivo, aumentou a proporção molar de propionato em relação ao do acetato e/ou butirato, sem, contudo, alterar a concentração total de AGVs, independentemente da ausência ou presença de suplementação com nitrogênio não-protéico. Entretanto, esses benefícios demonstrados podem ser anulados pela queda do consumo devido às condições de alimentação com forragens de baixa qualidade. Já em bovinos recebendo alto teor de concentrado (80%), a adição de monensina e a combinação entre esse aditivo com levedura aumentou a percentagem de propionato e diminuiu a proporção acetato:propionato (Gomes *et al.*, 2010).

Melhoras na eficiência alimentar com o uso de ionóforos na dieta de ruminantes tem sido observado, entretanto, o seu efeito quanto ao ganho de peso e consumo alimentar tem apresentado resultados variáveis. Utilizando monensina na alimentação de bovinos e bubalinos, Zeoula *et al.* (2008) observaram que à adição de ionóforo foi efetiva em aumentar a fermentação ruminal da matéria seca (MS), reduzir a degradação ruminal da proteína bruta (PB) e elevar o coeficiente de digestibilidade intestinal (CDI) da PB, em dietas contendo 50% de silagem de milho e 50% de concentrado à base de farelo de soja e milho, sem alterar o consumo médio diário. Segabinazzi (2008) observou, em seu trabalho com vacas de descarte, que o consumo de matéria seca não foi influenciado pela adição de monensina. No entanto, o uso de animais adultos, cuja capacidade de ingestão de matéria seca é maior em relação aos mais jovens, pode ter influenciado nesses resultados de consumo.

De modo geral, reduções nos consumos de MS, em bovinos, com a presença de ionóforo nas rações são relatadas na literatura. Bergen & Bates (1984) ressaltaram que o uso de monensina e outros ionóforos nas dietas com alto teor de grãos fornecido aos ruminantes, reduzem a ingestão de alimentos e melhoram a conversão alimentar, mantendo ou

aumentando o ganho de peso diário, sem afetar as características da carcaça. Kuss *et al.* (2008) verificaram que a presença de monensina sódica na dieta de vacas de descarte resultou em decréscimo do consumo de matéria seca e no ganho de peso, porém não alterou a conversão alimentar. Justus Neto & Rossi Júnior (2008) observaram que monensina sódica adicionada à dieta de novilhos confinados, em fase de recria, não influencia o ganho médio diário e a conversão alimentar, porém promove menor consumo de matéria seca.

3.2 Efeito da monensina sobre as populações de protozoários ciliados do rúmen

Em relação aos efeitos sobre as populações de protozoários ciliados do rúmen, a monensina tem apresentado resultados controversos. Dennis *et al.* (1986) foram um dos pioneiros em avaliar a densidade e composição dos protozoários ciliados do rúmen de bovinos, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, submetidos à suplementação de monensina e observaram que o uso desse ionóforo em dietas com alta proporção de concentrado ou volumoso reduzia a contagem total de ciliados ruminais. Esses autores ainda salientaram que a inibição desses microrganismos foi transitória, pois a suplementação prolongada da monensina resultou na seleção de populações resistentes no rúmen de bovino.

Resultados próximos foram observados por Rogers *et al.* (1997), que avaliaram o impacto da suplementação de monensina em curto prazo e em longo prazo de tempo sobre as populações de ciliados ruminais de ovinos, e verificaram que a presença da monensina diminui o total de ciliados em 70% em curto prazo (19 dias) e 50% em longo prazo (96 dias), sugerindo que as populações de ciliados tendem a se restabelecer em longo prazo de suplementação de monensina.

Guan *et al.* (2006) constataram que a monensina reduziu as populações de ciliados no rúmen de novilhos recebendo dietas contendo alto teor (70%) e baixo teor (20%) de concentrado. No entanto, esse efeito redutor da monensina foi apenas temporário, pois foi verificado que as populações de ciliados foram restauradas em três semanas nos bovinos recebendo alto teor de concentrado, e seis semanas nos bovinos recebendo baixo teor de concentrado. A inibição temporária dos ciliados relatada nos estudos acima indica que os protozoários ciliados do rúmen podem se adaptar aos ionóforos, como a monensina, quando utilizado por períodos mais prolongados.

O efeito da monensina também pode variar de acordo com o gênero dos ciliados encontrados no rúmen. Rogers *et al.* (1997) observaram uma redução das populações de *Entodinium* enquanto as populações de *Isotricha* aumentaram, principalmente após 96 dias de suplementação da monensina. Arakaki *et al.* (2000) verificaram aumento das populações de *Dasytricha* com a suplementação da monensina, enquanto as populações de *Entodinium* foram inibidas. Já Kišidayová *et al.* (2009) observaram uma redução na populações de *Entodinium* e *Dasytricha* após 12 dias da adição de monensina em experimentação utilizando fermentador Rusitec, enquanto as populações de *Polyplastron* e *Eodinium* permaneceram iguais. Gomes *et al.* (2010) adicionando monensina em dieta concentrada de novilhos, notaram que as populações de todos os gêneros observados diminuíram, inclusive as do gênero *Isotricha* e *Dasytricha*. De acordo com Karnati *et al.* (2009) uma possível explicação para a toxicidade seletiva da monensina pode ser a diferença na estrutura da membrana celular entre os diferentes gêneros de ciliados do rúmen.

A monensina tem sido relatada por não alterar as populações de ciliados ruminais. De acordo com Valinote *et al.* (2005) a utilização de monensina em dietas contendo 21% da matéria seca (MS) de caroço de algodão não influenciou a densidade das populações de protozoários ciliados no rúmen de bovinos Nelore. Martinele *et al.* (2008b) observaram que as populações de *Entodinium* foram inibidas com a adição de óleo de soja e monensina na dieta fornecida a ovinos. Entretanto, nas dietas contendo apenas monensina, as populações de *Entodinium* não variaram, indicando um efeito tóxico dos lipídeos do óleo de soja, e não da monensina, sobre as populações desse gênero. Karnati *et al.* (2009) testaram a influência da monensina sobre os ciliados do rúmen *in vitro* utilizando o delineamento do quadrado latino e observaram que a monensina não alterou as populações de ciliados dos gêneros observados, com exceção de *Epidinium* que por ser fibrolítico pode ter adsorvido mais monensina presente nas partículas vegetais do que os outros gêneros.

A inibição dos ciliados do rúmen tem implicação direta sobre as populações de bactérias. Oeztuerk *et al.* (2010) avaliando o efeito da monensina sobre a fermentação ruminal *in vitro* de ovinos adultos, observaram que a monensina aumentou o número de bactérias ruminais e que esse efeito pode estar associado com o efeito antiprotozoário da monensina, uma vez que os ciliados ruminais são capazes de engolfar e digerir bactérias (Williams & Coleman, 1992; Burow *et al.*, 2005). Além disso a redução dos ciliados pode afetar as populações de bactérias metanogênicas devido a simbiose existente entre esses microrganismos, onde o hidrogênio produzido pelos ciliados é utilizado pela metanogênicas para a formação do CH₄. Desta forma, a redução no número de ciliados torna-se interessante

uma vez que esses microrganismos podem ser responsáveis por até 37% da metanogênese (Williams & Coleman, 1997).

4. PRÓPOLIS: NOVA ALTERNATIVA COMO ADITIVO ALIMENTAR PARA RUMINANTES

Apesar dos resultados benéficos encontrados pela adição da monensina na dieta de ruminantes (Araújo *et al.*, 2006; Rodrigues *et al.*, 2007; Zeoula *et al.*; 2008), a resistência antimicrobiana em humanos tem sido relacionada aos antibióticos presentes na alimentação animal (Mathew *et al.*, 2001), isso porque os ruminantes podem ser considerados reservatórios de bactérias potencialmente patogênicas (Hess *et al.*, 2004). Alguns isolados bacterianos obtidos de bovinos apresentam resistência múltipla a antibióticos e representam perigo potencial para a saúde humana (Hendriksen *et al.*, 2008), entretanto, a resistência de bactérias ao uso de ionóforos ainda não foi relatada na literatura. Os genes responsáveis pela resistência das bactérias ruminais aos ionóforos não tem sido identificados e há pequena evidência de que esta resistência possa ser transferida de uma bactéria para outra. Por isso, é pouco provável que o uso de ionóforos na alimentação animal cause algum impacto significativo na transferência de resistência a antibióticos dos animais para os humanos (Russel & Houlihan, 2003).

No entanto, por precaução, o uso de ionóforos está proibido na União Européia desde 1º de janeiro de 2006 (Regulamento Comunidade Européia, 2003), com o intuito principal de garantir a segurança dos consumidores. Em vista disso, produtos naturais como a própolis têm sido estudados para manipular a fermentação ruminal e aumentar a eficiência da produção, pois apresentam vários compostos químicos, principalmente flavonóides indicados como principais responsáveis pela atividade antimicrobiana (Bankova *et al.*, 1989; Greenaway *et al.*, 1991; Bankova *et al.*, 1992; Park *et al.*, 1998).

4.1 Modo de ação da própolis no rúmen e seu efeito sobre o desempenho de ruminantes

Os mecanismos de ação antibacteriana da própolis ainda é pouco conhecido. Takaisi-Kikuni & Schilder (1994) observaram que a ação antibacteriana contra *Streptococcus agalactiae* foi complexa, envolvendo vários mecanismos, tais como a formação de estreptococos pseudo-multicelulares; desorganização do citoplasma, da membrana citoplasmática e parede celular e inibição da síntese protéica. De acordo com Mirzoeva *et al.* (1997) a própolis exerce ação bacteriostática sobre a maioria das bactérias Gram-positivas e algumas Gram-negativas, aparentemente pela modificação do *status* bioenergético da membrana bacteriana e inibição de sua motilidade, o que remete à atividade dos ionóforos. Vargas *et al.* (2004) observaram que as bactérias Gram-negativas são menos sensíveis à ação antimicrobiana do extrato alcoólico a 50% de própolis que as Gram-positivas por apresentar parede celular quimicamente mais complexa, sendo que um dos constituintes dessa parede, o lipopolissacarídeo, é que determina a antigenicidade, toxicidade e patogenicidade desses microrganismos.

Pinto *et al.* (2001) constataram que a própolis exerceu efeito antibacteriano através dos extratos etanólico a 10% e, em menor proporção, do metanólico a 10%, sobre bactérias Gram-positivas responsáveis pela incidência de mastite em bovino leiteiro. Entretanto, não mostrou capacidade em inibir o crescimento das Gram-negativas. Loguércio *et al.* (2006) estudaram a atividade *in vitro* do extrato alcoólico de própolis a 50% contra agentes da mastite bovina e verificaram as bactérias Gram-negativas demonstraram percentual de resistência bem mais elevado quando comparadas às Gram-positivas. A ação antibacteriana da própolis sobre as bactérias Gram-positivas é maior devido aos flavonóides, ácidos e ésteres aromáticos presentes na resina, os quais atuam sobre a estrutura da parede celular desses microrganismos (Bankova *et al.*, 2000). Entretanto, a atuação dos flavonóides sobre as bactérias Gram-positivas ainda não está elucidada.

Os flavonóides são grupos de compostos de polifenólicos aromáticos conjugados que compreendem amplo grupo de substâncias naturais não sintetizadas por animais (Harbone & Willians, 2000; Beecher, 2003; Manach *et al.*, 2004). Cerca de 4.000 substâncias diferentes já foram listadas como flavonóides. A presença e a concentração destes compostos são utilizadas como índice de qualidade de amostras da própolis (Lu *et al.*, 2004). Os flavonóides não são os únicos compostos responsáveis pelas propriedades farmacológicas da própolis, diversos

outros compostos têm sido relacionados com suas propriedades medicinais (Awale *et al.*, 2005).

A própolis pode ser utilizada como aditivo nutricional por possuir efeito tóxico sobre as populações de bactérias Gram-positivas (Hino & Russel, 1987). Testando o efeito de treze extratos secos de plantas com alto teor de flavonóides e da própolis sobre a fermentação e metanogênese em cultivos *in vitro* de microrganismos ruminais, Broudiscou *et al.* (2000) utilizando fermentadores de saída dual com dieta de 50% de feno de capim Timóteo e 50% de grãos de cevada e líquido ruminal doado de ovinos, observaram que a adição da própolis aumentou a produção de propionato em 10,3% sem afetar outros ácidos graxos ruminais.

Stradiotti Júnior *et al.* (2004a) observaram que a própolis aumentou a produção do total de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), entretanto, a proporção molar de AGV ruminal não foram alteradas pelo tratamento com própolis. Além disso, os autores verificaram que a própolis foi eficiente em inibir a atividade de desaminação de aminoácidos pelos microrganismos ruminais tanto *in vitro* quanto *in vivo*, resultado importante, uma vez que a proteína é nutriente mais custoso na dieta dos ruminantes, sendo de fundamental valia que parte desse nutriente escape da fermentação pela microbiota ruminal. Stradiotti Júnior *et al.* (2004b) verificaram que a própolis foi eficiente em inibir a produção de gases *in vitro* pelos microrganismos ruminais, além de aumentar a taxa de digestão específica dos carboidratos, indicando a própolis como novo aditivo na nutrição de ruminantes.

De acordo com Oliveira *et al.* (2006), a própolis foi mais eficiente que a monensina em reduzir a produção de amônia de culturas de microrganismos ruminais em meio contendo caseína hidrolisada. Mais recentemente, Prado *et al.* (2010a) testaram produtos à base de própolis LLOS e monensina sódica em dieta à base de silagem de milho e feno de capim-tifton sobre a digestibilidade e parâmetros ruminais de bovinos e observaram que os produtos contendo produtos à base de própolis LLOSC1 e LLOSB3 com 0,018 e 0,0011 mg/g de flavonóides medidos em crisina, respectivamente, propiciaram maior fluxo de proteína microbiana para os intestinos, entretanto mais estudos são necessários para investigar os efeitos dos ionóforos e das concentrações de própolis em dietas à base de forragem.

Yaghoubi *et al.* (2010) observaram que o extrato da própolis com dosagens crescentes de flavonóides e monensina aumentaram a digestibilidade *in vitro* da fibra de detergente ácida (FDA) em dietas 100:0, 50:50 e 20:80 fornecida a ovinos e, além disso, os aditivos reduziram a produção de amônia e a produção de gás metano. Os autores ressaltaram ainda que o extrato da própolis e a monensina afetam a fermentação ruminal de ovinos de modo comparável. Ozturk *et al.* (2010) observaram que extrato etanólico de própolis a 20% e 60% não alteraram

a produção e o perfil de AGV. No entanto, a própolis foi capaz de inibir a concentração de nitrogênio amoniacal (N-NH₃) ruminal, o que pode ajudar a melhorar a retenção de amônia no rúmen.

Em relação ao efeito da própolis sobre o pH ruminal, Lana *et al.* (2005) e Lana *et al.* (2007) não observaram variações nos valores obtidos do conteúdo ruminal de cabras leiteiras recebendo dietas volumosas (67%). O mesmo resultado foi obtido com novilhos (Rísoli *et al.*, 2009) e ovinos recém-abatidos (Ozturk *et al.*, 2010). Entretanto Prado *et al.* (2010a) verificaram que o produto à base de própolis LLOSB3 diminuiu o pH ruminal de bovinos alimentados com dieta volumosa. Resultado semelhante foi observado por Yaghoubi *et al.* (2010), onde o pH ruminal de ovinos decresceram linearmente às doses crescentes de flavonóides extraídos da própolis. Já Oeztuerk *et al.* (2010) observaram que o pH ruminal aumentou com a adição da própolis no conteúdo ruminal de ovinos testado *in vitro*.

4.3 Efeito da própolis sobre as populações de protozoários ciliados do rúmen

Existem poucos relatos da ação da própolis sobre as populações de protozoários ciliados do rúmen. Broudiscou *et al.* (2000) testando extratos vegetais ricos em flavonóides e própolis sobre a fermentação ruminal *in vitro* de ovinos alimentados com dieta volumosa, observaram que as populações de ciliados ruminais tenderam a redução, entretanto esse efeito não foi significativo. Rísoli *et al.* (2009) utilizando produtos à base de própolis LLOS com diferentes concentrações de flavonóides em bovinos e búfalos observaram que o produto à base de própolis LLOSC1 com 0,018 mg/g⁻¹ de flavonóides medidos em crisina promoveu redução nas populações de ciliados no rúmen de bubalinos, enquanto que em bovinos não houve diferença no número de ciliados. Yaghoubi *et al.* (2010) observaram que o número total de protozoários diminuiu linearmente com a adição de doses crescentes de flavonóides extraídos da própolis (0,17; 35; 70 e 140 µm/mL) na dieta de ovinos.

Ozturk *et al.* (2010) e Oeztuerk *et al.* (2010) testando a adição da própolis sobre a fermentação ruminal *in vitro* de ovinos recebendo dieta volumosa verificaram que o número total de protozoários ciliados não foi afetado. Os autores ressaltaram ainda que a razão do perfil de AGV ter se mantido inalterado com a adição da própolis pode estar associado ao fato de não ter ocorrido diminuição nas populações de ciliados, uma vez que a inibição dos ciliados aumenta a produção de propionato e reduz a metanogênese, através de mudança no

metabolismo do hidrogênio (Moss *et al.*, 2000). Tal mudança é nutricionalmente benéfico para o metabolismo energético, pois de todos os AGVs, o propionato é o mais utilizado eficientemente pelos ruminantes (Ozturk *et al.*, 2010).

SEÇÃO I

CARACTERIZAÇÃO DAS POPULAÇÕES DE PROTOZOÁRIOS CILIADOS NO RÚMEN DE NOVILHOS RECEBENDO MONENSINA SÓDICA OU PRODUTOS À BASE DE PRÓPOLIS LLOS

O rúmen abriga um complexo ecossistema composto por microrganismos como bactérias, fungos, protozoários ciliados e flagelados que produzem enzimas capazes de degradar a celulose das plantas, fornecendo assim energia ao seu hospedeiro em uma relação mutualística (Arcuri *et al.*, 2006). O ecossistema anaeróbico, a temperatura em torno de 39° C e pH entre 6,0 até 7,0, além de presença permanente de substratos e de atividade fermentativa são algumas das condições que fazem do rúmen um ambiente favorável ao desenvolvimento contínuo das populações microbianas (Kozloski, 2002).

Os protozoários ciliados desempenham funções bioquímicas e fisiológicas importantes para os ruminantes, principalmente no metabolismo dos nutrientes. Entretanto, seu papel no rúmen, ainda não está totalmente esclarecido, podendo trazer tanto efeitos benéficos como prejudiciais para a produção animal (Franzolin & Dehority, 1996a; Lopes *et al.*, 2002; Marcin & Südekum, 2009). Esses efeitos podem ser determinados pelas alterações no ambiente ruminal, especialmente pela variação da dieta fornecida ao animal.

A dieta é a variável de maior impacto no custo de produção de animal e a utilização de concentrado na dieta tem por objetivo aumentar a velocidade de ganho de peso e acabamento, diminuindo assim o tempo de confinamento (Nogueira *et al.*, 2005). A suplementação de concentrado à dieta pode causar alteração em todo o ecossistema ruminal, e é um dos fatores determinantes na ocorrência e densidade das populações de ciliados do rúmen (Franzolin & Dehority, 1996a; D'Agosto *et al.*, 1996; D'Agosto *et al.*, 1998). Outras características relacionadas ao nível e hábito de consumo e a aspectos fisiológicos quanto à ruminação, salivação e tamponamento ruminal têm marcada influência sobre a ocorrência e densidade das populações de protozoários ciliados do rúmen (Franzolin & Dehority, 1996b). O tempo de amostragem após a alimentação pode influenciar diretamente no número de espécies de ciliados do rúmen (Marinho, 1982).

O pH ruminal é outro fator determinante para o funcionamento do rúmen e sua variação pode ser atribuída à composição química da dieta. Segundo Bürger *et al.* (2000) dietas à base de amido ou carboidratos solúveis diminuem os valores do pH devido

principalmente ao crescimento de microrganismos amilolíticos, principais responsáveis pela produção de AGV no rúmen. Outros fatores como o tipo e a frequência de mastigação dos alimentos, produção de saliva, taxa de fermentação e concentração de produtos finais podem alterar os valores do pH ruminal (Franzolin & Dehority, 1996b).

A busca de alternativas alimentares que resulte em atingir o máximo do potencial produtivo dos ruminantes tem sido o foco dos nutricionistas. Aditivos ionóforos tem sido utilizado com a finalidade de maximizar a síntese de proteína microbiana e a fermentação da fibra em ácidos graxos voláteis e minimizar a metanogênese, a degradação da proteína verdadeira do alimento, a biohidrogenação de ácidos graxos insaturados e, em parte, a fermentação do amido (Zeoula *et al.*, 2008). A monensina e a lasalocida são os principais aditivos ionóforos utilizados no Brasil (Zanine *et al.*, 2006) e atuam inibindo bactérias Gram-positivas, já que a resistência ao ionóforo está relacionada à presença de uma camada lipopolissacarídica, externa à membrana celular, existentes em bactérias Gram-negativas (Nicodemo, 2001). Em relação aos efeitos da monensina sobre os protozoários ciliados do rúmen, Guan *et al.* (2006) constataram um efeito negativo temporário.

Apesar dos resultados benéficos encontrados pela adição da monensina na dieta de ruminantes (Araújo *et al.*, 2006; Rodrigues *et al.*, 2007; Zeoula *et al.*; 2008), a resistência antimicrobiana em humanos tem sido relacionada aos antibióticos presentes na alimentação animal (Mathew *et al.*, 2001) e por precaução, o uso de ionóforos está proibido na União Européia desde 1º de janeiro de 2006 (Regulamento Comunidade Européia, 2003). Em vista disso, pesquisadores têm concentrado esforços em busca de novas alternativas que possam substituir os ionóforos na produção animal.

A própolis tem sido estudada com o objetivo de manipular a fermentação ruminal e aumentar a eficiência da produção animal por ser um produto natural e apresentam vários compostos químicos, principalmente flavonóides indicados como principais responsáveis pela atividade antimicrobiana (Bankova *et al.*, 1992; Park *et al.*, 1998; Park *et al.*, 2000). Além disso, sua ação bacteriostática sobre a maioria das bactérias Gram-positivas e algumas Gram-negativas, aparentemente pela modificação do *status* bioenergético da membrana bacteriana e inibição de sua motilidade, remete à atividade dos aditivos ionóforos (Mirzoeva *et al.*, 1997).

A ação da própolis sobre as populações de ciliados do rúmen ainda não esta elucidada. Broudiscou *et al.* (2000) observaram que a própolis sobre a fermentação ruminal *in vitro* não alterou o número de ciliados do rúmen. Resultado semelhante foi observado por Ozturk *et al.* (2010). Já Rispoli *et al.* (2009) constataram que o produto à base de própolis LLOSC1 com 0,018 mg/g⁻¹ de flavonóides medidos em crisina reduziu apenas as populações de ciliados no

rúmen de búfalos, enquanto que em bovinos as populações de ciliados não foram afetadas pela adição dos produtos à base de própolis LLOSC1 e LLOSA2 com concentrações de flavonóides de 0,018 mg g⁻¹ e 0,001 mg g⁻¹ respectivamente.

Visando contribuir para os estudos da própolis como uma alternativa na substituição da monensina, o presente trabalho teve por objetivo caracterizar as populações de protozoários ciliados no rúmen de novilhos alimentados com dieta adicionada de monensina ou de produtos à base de própolis LLOS.

MATERIAL E MÉTODOS

1 LOCAL E ANIMAIS

O experimento foi conduzido na Fazenda Experimental de Iguatemi (FEI), pertencente à Universidade Estadual de Maringá, PR, no período de outubro de 2008 a fevereiro de 2009 e conduzido de acordo com as normas do Comitê de Conduta Ética no Uso de Animais em Experimentação, desta instituição, conforme parecer de aprovação número 019/2008. As amostras foram analisadas no Laboratório de Protozoologia do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Comportamento e Biologia Animal, pertencente à Universidade Federal de Juiz de Fora, UFJF, no período de novembro de 2009 a fevereiro de 2010.

As coletas do conteúdo ruminal foram obtidas de cinco novilhos mestiços, castrados, com idade aproximada de 12 meses e peso médio de 295±12 kg. Os animais foram submetidos à intervenção cirúrgica para a implantação de cânulas no rúmen e mantidos em baias individuais de 10 m², cobertas, providas de comedouro e bebedouro, com piso de concreto, e com as laterais fechadas com madeira.

2 DIETAS

A dieta basal fornecida aos animais foi composta de 47% de silagem de milho e 53% de concentrado formulado à base de milho moído e farelo de soja (Quadro 1), com base na

matéria seca (MS), além de mistura mineral-vitamínico. A dieta foi balanceada, de acordo com o National Research Council - NRC (2000), para atender às exigências de manutenção e crescimento (0,35 kg/d) dos animais, porém, a ingestão da ração foi restrita a 2,1% do peso corporal.

Quadro 1. Composição dos ingredientes e da dieta basal.

| Ingrediente | Silagem milho | Milho moído | Farelo de soja | Uréia | Supl. Mineral ¹ | Dieta |
|---------------------------------|-------------------|-------------|----------------|-------|----------------------------|-------|
| Dieta (% matéria seca) | 47 | 43,4 | 7,29 | 0,93 | 1,75 | 100 |
| Matéria seca | 26,56 | 89,52 | 91,03 | 99,00 | 100,00 | 42,42 |
| | % da matéria seca | | | | | |
| Matéria orgânica | 95,93 | 98,99 | 92,99 | | | 94,88 |
| Proteína bruta (PB) | 7,19 | 8,15 | 49,58 | 274,9 | | 13,10 |
| Fibra em detergente neutro | 58,82 | 8,51 | 13,60 | | | 29,52 |
| FDNcp ² | 48,70 | | | | | 27,58 |
| Fibra em detergente ácido | 14,18 | 2,75 | 7,87 | | | 15,95 |
| Extrato etéreo | 2,46 | 3,46 | 2,28 | | | 2,83 |
| Matéria mineral | 4,07 | 1,10 | 7,01 | | 100 | 5,90 |
| Carboidratos totais | 86,25 | 87,29 | 41,12 | | | 81,46 |
| Carboidratos não fibrosos | 34,41 | 78,78 | 27,52 | | | 52,41 |
| PIDN ³ (% da PB) | 32,70 | | | | | 8,17 |
| PIDA ⁴ (% da PB) | 31,30 | | | | | 8,09 |
| Nutrientes digestíveis totais | | | | | | 66,8 |
| Energia digestível (Mcal/kg) | | | | | | 3,92 |
| Energia metabolizável (Mcal/kg) | | | | | | 3,22 |

¹Composição por kg de produto: Ca – 90 g; P – 65 g; Na – 145 g; S – 4,69 g; I – 60 mg; Mn – 1050 mg; Se – 10 mg; Zn – 2880 mg; Cu – 1200 mg; Fe – 1500 mg; Co – 80 mg. ²FDNcp = Fibra em Detergente Neutro corrigido para Proteína e Cinzas; ³PIDN = Proteína insolúvel em detergente neutro; ⁴PIDA = Proteína insolúvel em detergente ácido.

Foram testadas dietas sem aditivos, ou com monensina ou produtos à base de própolis LLOSB1+, LLOSC1+ ou LLOSC1++, cada produto contendo respectivamente 0,022; 0,036 e 0,054 mg/g de flavonóides totais medidos em crisina, por dose diária (Prado, 2005). Os produtos à base de própolis LLOS foram produzidos no Laboratório de Farmacotécnica da UEM, conforme Franco & Bueno (1999), e estão patenteados como propriedade intelectual no PI 0605768-3. Os produtos LLOS utilizados no presente trabalho apresentam a mesma diluição alcoólica (1) e diferem na concentração de própolis (B < C) e dosagem (+ < ++).

Os extratos de própolis foram secos em spray dryer, assim apresentavam-se na forma de pó, e o fubá de milho foi usado como excipiente, de forma que as doses diárias ficassem contidas em 10 g de produto final (extrato + excipiente). A monensina sódica foi fornecida através de um produto comercial (Rumensin® - 100, Elanco), na dose de 200 mg/animal/dia. As dietas experimentais foram fornecidas aos animais duas vezes ao dia, em duas porções iguais, pela manhã (8 horas) e à tarde (16 horas), sendo o concentrado e o volumoso misturados no momento do fornecimento. Os aditivos referentes a cada dieta foram inseridos

diretamente no rúmen no momento de cada alimentação em cada turno, sendo 1g de monensina e 5g de extrato de própolis LLOS (Desenho 2).



Desenho 2. Aditivo sendo inserido diretamente no rúmen.

3 DELINEAMENTO E ANÁLISES ESTATÍSTICAS

O experimento foi realizado em delineamento quadrado latino 5X5 com cinco períodos de 21 dias, mantendo-se intervalo de seis dias entre cada período, com o intuito de minimizar os efeitos residuais da dieta anterior. Foi considerada a média das subparcelas de tempo. As análises estatísticas das variáveis foram interpretadas de acordo com Ayres *et al.* (2007) e as médias foram submetidas à análise de variância Kruskal-Wallis e teste de medidas Student-Newman-Keuls com probabilidade de 5%.

4 COLETAS DO CONTEÚDO RUMINAL

As coletas de conteúdo ruminal para verificação do pH e para a contagem de protozoários ciliados foram realizadas 15 dias após o início do fornecimento das dietas experimentais aos animais. No momento da coleta foram retiradas amostras de conteúdo ruminal antes (0 hora) do fornecimento das dietas experimentais aos novilhos, 3 e 6 horas depois.

O conteúdo ruminal coletado para análises quantitativas dos protozoários ciliados foi filtrado em tecido gaze e espremido manualmente. As amostras foram fixadas em igual volume de formalina a 18,5%, seguindo proposta de Dehority (1984) com modificações de D'Agosto & Carneiro (1999). O líquido ruminal foi armazenado em recipiente plástico vedado e identificado. A quantificação e a identificação foram realizadas em câmara de contagem Sedgewick-Rafter em 100 campos independentes. O procedimento para identificação foi baseado em Ogimoto & Imai (1981). O valor de pH ruminal foi aferido imediatamente após a obtenção das amostras de líquido ruminal, utilizando um pHmetro digital Tecnal TEC- 3MP.

RESULTADOS

Os gêneros observados da subfamília Diplodiniinae foram analisados em conjunto e estão referidos como Diplodiniinae, por representarem menos de 2% do total de ciliados observados. Pelo mesmo motivo, os gêneros *Dasytricha* e *Isotricha* foram analisados em conjunto e estão referidos como Isotrichidae (Quadro 2).

Quadro 2. Protozoários ciliados observados no rúmen de novilhos alimentados com dieta adicionada de monensina ou produtos à base de própolis LLOS.

| Família | Subfamília | Gêneros |
|--------------------|---------------|--|
| Blepharocorythidae | | <i>Charonina</i> (Strande, 1928) |
| Isotrichidae | | <i>Dasytricha</i> (Stein, 1859) <i>Isotricha</i> (Schuberg, 1888) |
| Ophryoscolecidae | Entodiniinae | <i>Entodinium</i> (Stein, 1859) |
| | Diplodiniinae | <i>Diplodinium</i> (Schuberg, 1888) <i>Polyplastron</i> (Dogiel, 1927) <i>Eodinium</i> (Kofoid & Maclellan, 1932) <i>Diploplastron</i> (Kofoid & Maclellan, 1932) <i>Elytroplastron</i> (Kofoid & Maclellan, 1932) |

A ocorrência dos gêneros de ciliados observados e a densidade das populações variaram conforme os hospedeiros e dietas. Apenas o gênero *Entodinium* foi observado em todos os animais e em todas as dietas, sendo o gênero predominante representando acima de 97% da densidade total de ciliados (Quadro 3). As populações de *Entodinium* diminuíram numericamente com a adição dos aditivos, sendo esta queda mais acentuada na adição da monensina, entretanto, essas alterações não foram significativas ($H= 5.35$, $p= 0,25$). A

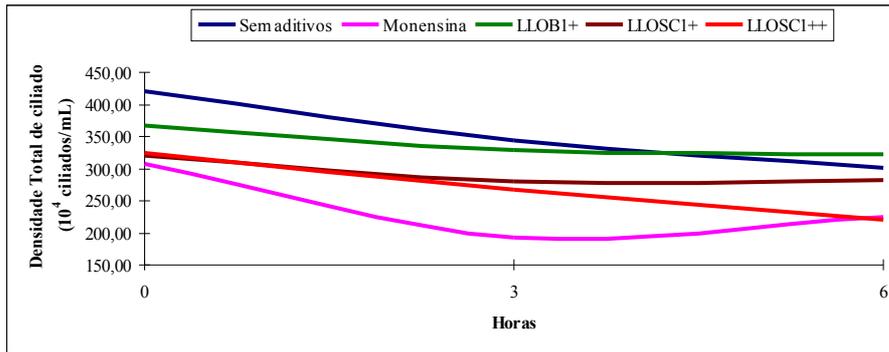
densidade total de protozoários ciliados foi próxima a densidade de *Entodinium* e, da mesma maneira, o número total de ciliados não foi alterado ($H= 5.47$, $p= 0,24$) (Quadro 3).

Quadro 3. Densidade média e desvio padrão (DP) de *Entodinium*, *Charonina*, Isotrichidae, Diplodiniinae ($n \times 10^4$ ciliados/mL) e pH no rúmen de novilhos alimentados com dieta adicionada de monensina ou de produtos à base de própolis LLOS

| Protozoários Ciliados ($n \times 10^4$ ciliados/mL) | Variável | Dietas | | | | | (p) Kruskal-Wallis |
|--|----------|-------------|-----------|-----------|-----------|-------------|--------------------|
| | | Sem Aditivo | Monensina | LLOS B1+* | LLOS C1+* | LLOS C1+++* | |
| <i>Entodinium</i> | Média | 350,82 | 237,05 | 331,80 | 289,60 | 264,19 | 0,25 |
| | % | 98,85 | 98,30 | 97,78 | 98,44 | 97,64 | |
| | DP | 161,20 | 120,40 | 146,90 | 127,10 | 79,30 | |
| <i>Charonina</i> | Média | 0,53 | 0,08 | 0,02 | 0,05 | 0,03 | 0,86 |
| | % | 0,15 | 0,03 | 0,01 | 0,02 | 0,01 | |
| | DP | 1,30 | 0,10 | 0,10 | 0,10 | 0,10 | |
| Isotrichidae** | Média | 1,67 | 0,64 | 5,19 | 1,00 | 5,37 | 0,20 |
| | % | 0,47 | 0,27 | 1,53 | 0,34 | 1,98 | |
| | DP | 2,40 | 1,00 | 10,00 | 2,10 | 9,00 | |
| Diplodiniinae*** | Média | 1,80 | 3,38 | 2,32 | 3,56 | 1,00 | 0,11 |
| | % | 0,51 | 1,40 | 0,68 | 1,21 | 0,37 | |
| | DP | 1,78 | 4,08 | 2,13 | 4,58 | 1,00 | |
| Total | Média | 354,82 | 241,15 | 339,33 | 294,21 | 270,59 | 0,24 |
| | DP | 162,30 | 122,20 | 148,80 | 127,60 | 83,60 | |
| pH | Média | 5.95 | 5.90 | 5.95 | 5.93 | 6.01 | 0,69 |
| | DP | 0,50 | 0,50 | 0,30 | 0,20 | 0,40 | |

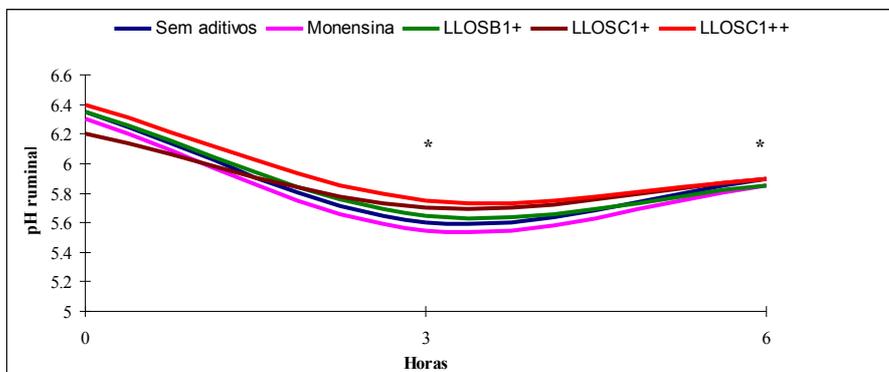
*Produtos à base de extrato de própolis: LLOS B1+ = 0,022mg/g; LLOS C1+ = 0,036mg/g; LLOS C1++ = 0,054mg/g de flavonóides totais em crisina segundo Prado (2005). ***Isotricha* e *Dasytricha* agrupados. ****Eodinium*, *Diploplastron*, *Polyplastron*, *Metadinium*, *Diplodinium* e *Elytroplastron* agrupados. $p > 0,05$ = não significativo.

Assim como nas populações de *Entodinium*, não foram observadas alterações nas populações de *Charonina* ($H= 1.29$, $p= 0,86$), Isotrichidae ($H= 5.86$, $p= 0,20$), Diplodiniinae ($H= 5.05$, $p= 0,11$) em relação às dietas. Em relação aos tempos de amostragem, foi verificado que a densidade total de ciliados registrados demonstrou tendência à queda entre três e seis horas após a alimentação com os aditivos (Desenho 3), porém esse efeito não foi significativo em nenhuma dieta ($H= 10.46$, $p= 0,08$).



Desenho 3. Densidade total de protozoários ciliados ($n \times 10^4$ ciliados/mL) no rúmen de bovinos recebendo dieta com monensina ou produtos à base de própolis LLOS nos tempos de amostragem. Produtos à base de extrato de própolis: LLOB1+ = 0,022mg/g; LLOSC1+ = 0,036mg/g; LLOSC1++ = 0,054mg/g de flavonóides totais em crisina, segundo Prado (2005).

Os valores de pH ruminal não foram alterados ($H= 2.22$, $p= 0,69$) com a adição da monensina ou dos produtos à base de própolis LLOB1+, LLOSC1+ e LLOSC1++ (Quadro 3). Foi observado, entretanto, variações do pH ruminal entre os tempos de amostragem. O pH ruminal diminuiu nos instantes de 3 e 6 horas após o fornecimento da dieta, independente do aditivo e de sua dosagem ($H= 12.63$, $p< 0,05$) (Desenho 4).



Desenho 4. pH ruminal de bovinos recebendo dieta com monensina ou produtos à base de própolis LLOS nos tempos de amostragem. Produtos à base de extrato de própolis: LLOB1+ = 0,022mg/g; LLOSC1+ = 0,036mg/g; LLOSC1++ = 0,054mg/g de flavonóides totais em crisina, segundo Prado (2005). * $p< 0,05$ entre 0 e 3 horas e entre 0 e 6 horas.

DISCUSSÃO

O gênero *Entodinium* é geralmente o mais representativo no ambiente ruminal de bovinos, independente da suplementação de aditivos (D'Agosto *et al.*, 1998; Ríspoli *et al.*, 2009; Gomes *et al.*, 2010). Os ciliados da ordem Entodiniomorpha ingerem preferencialmente carboidratos insolúveis suspensas no fluido ruminal, sendo encontrados em maior número quando a dieta fornecida a bovinos é volumosa, já os ciliados da família Isotrichidae ocorrem em maior número quando a dieta fornecida a bovinos é rica em concentrado, pois esses ciliados têm grande capacidade de ingerir carboidratos solúveis e grânulos de amido (Kozloski, 2002). Entretanto, muitas espécies do gênero *Entodinium* apresentam grande capacidade de ingerir partículas de amido, sendo consideradas amilolíticas (Franzolin & Dehority, 1996a).

No presente estudo, a predominância do gênero *Entodinium* foi observada na dieta sem aditivos, indicando que a presença dos aditivos avaliados não influenciou neste efeito que, dentre outros fatores, pode estar relacionado à dieta concentrada (50%) ou pelo fato desse gênero apresentar maior número de espécies. Contudo é importante ressaltar que os ciliados do gênero *Entodinium* apresentam diferentes características anatômicas, fisiológicas e bioquímicas, podendo apresentar papel diverso na microbiota ruminal (Williams & Coleman, 1992). A densidade total de ciliados foi próxima da densidade das populações de *Entodinium*, justamente por esse gênero ter representado mais de 97% em todas as dietas.

Os resultados encontrados para os ciliados em relação à adição da monensina foram semelhantes aos relatados por Martinele *et al.* (2008b), Karnati *et al.* (2009), Ríspoli *et al.* (2009) e Ortolan *et al.* (2010), onde as populações de ciliados não se alteraram com a inclusão desse aditivo na alimentação de bovinos. Já Guan *et al.* (2006) constataram efeito redutor da monensina sobre os ciliados no rúmen de novilhos submetidos à dietas com 80% de concentrado, no entanto, esse efeito redutor foi apenas temporário, pois foi verificado que após três semanas da suplementação da monensina as populações de ciliados voltavam a seu estágio inicial.

Dennis *et al.* (1986) e Rogers *et al.* (1997) verificaram que as populações de ciliados diminuem com a exposição inicial à monensina e entre a terceira e sexta semana retornam ao número de pré-suplementação do aditivo, indicando que esses microrganismos podem se adaptar ao uso de ionóforos. Uma possível explicação sobre o fato de a monensina não ter alterado as populações de ciliados ruminais é a forma como o trabalho foi conduzido. Ortolan

et al. (2010) salientaram que o curto período experimental delineado pelo quadrado latino, com um período de 28 dias, pode ter influenciado na ausência de efeito da monensina sobre as populações de ciliados no rúmen de bovinos. O mesmo delineamento também foi adotado nos trabalhos de Valinote *et al.* (2005), Martinele *et al.* (2008b), Karnati *et al.* (2009) e Ríspoli *et al.* (2009), onde não foram observadas variações das populações de ciliados no rúmen de bovinos e ovinos com a adição de monensina na dieta.

Assim como as bactérias Gram-positivas, os protozoários ciliados e fungos também são sensíveis à ação da monensina por não possuírem membrana protetora externa (Dennis *et al.*, 1986). Desta forma, era de se esperar que a monensina provocasse alguma alteração nas populações de ciliados, principalmente, os amilolíticos como os *Entodinium*, uma vez que este gênero é predominante em dietas com alto teor de concentrado, o que não foi observado no presente trabalho, indicando que o grau de sensibilidade à monensina pode variar de acordo com o gênero de protozoário ciliado (Rogers *et al.*, 1997; Arakaki *et al.*, 2000; Karnati *et al.*, 2009; Kišidayová *et al.*, 2009).

Assim como observado na dieta contendo monensina, os aditivos à base de própolis não alteraram as populações de ciliados no rúmen de bovinos, concordando com os trabalhos realizados com bovinos (Ríspoli *et al.*, 2009) e ovinos (Broudiscou *et al.*, 2000; Oeztuerk *et al.*, 2010 e Ozturk *et al.*, 2010). A redução ou inibição dos ciliados seria interessante para a produtividade animal uma vez que esses microrganismos diminuem a liberação de metano, desviando equivalentes redutores de metano para a síntese de propionato no rúmen (Ozturk *et al.*, 2010).

O pH ruminal dos bovinos recebendo as diferentes dietas não variou, concordando com os trabalhos realizados por Gomes *et al.* (2010), com monensina e Lana *et al.* (2005), Lana *et al.* (2007), Ríspoli *et al.* (2009) e Ozturk *et al.* (2010), com própolis. Contudo, pequenas variações no pH ruminal podem alterar totalmente a microbiota ruminal, sendo um importante dado no aspecto fisiológico do hospedeiro.

Segundo Russell & Dombrowski (1980) o crescimento das principais bactérias celulolíticas pode ser comprometido em pH ruminal em torno de 6,0 a 6,1, e totalmente inibido em valores abaixo de 5,9. Quando os ruminantes são alimentados com elevadas proporção de volumoso na dieta, o pH ruminal é geralmente entre 6,9 e 7,0, mas quando a dieta oferecida é rica em concentrado, o pH ruminal tende a diminuir (Slyter, 1976). Além disso, os ionóforos são capazes de diminuir a produção de ácido láctico, uma vez que inibem o crescimento das populações microbianas Gram-positivas, principais responsáveis pela

formação desse tipo de ácido (Russell & Wallace, 1997), o que contribui para a elevação do pH.

A variação do pH ruminal durante os tempos de amostragem coincidem com os trabalhos realizados por Franzolin & Dehority (1996a) e Coelho *et al.* (2003), onde o pH ruminal diminui entre duas a seis horas após o fornecimento de alimento ao animal, o que segundo Dehority (2003) corresponde ao máximo de produção de ácidos resultantes da atividade fermentativa, a qual acarreta o decréscimo da densidade total de protozoários ciliados. No presente estudo foi observado que a densidade total de ciliados no rúmen de bovinos recebendo aditivos monensina e produtos à base de própolis não se alteraram entre os tempos de amostragem (0, 3 e 6 horas) discordando dos resultados obtidos por Franzolin Neto *et al.* (1991) e Nogueira Filho *et al.* (1998) onde as populações de ciliados do rúmen de bovinos, exceto os isotriquídeos, apresentam aumento de densidade no momento da alimentação seguido de decréscimo nas horas subsequentes, tornando a aumentar antes do fornecimento da próxima alimentação.

SEÇÃO II

EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO DE MONENSINA OU PRÓPOLIS EM CURTO PRAZO SOBRE AS POPULAÇÕES DE CILIADOS NO RÚMEN DE BOVINOS

O rúmen representa um ecossistema complexo e dinâmico por apresentar microrganismos com a característica de se adaptar as variações do ambiente ruminal impostas principalmente por mudança na dieta dos animais (Kozloski, 2002). A fermentação de alimentos no rúmen é catalisada por uma comunidade densa e diversa de microrganismos anaeróbios, incluindo bactérias, fungos e protozoários ciliados e flagelados (Arcuri *et al.*, 2006). Existe um crescente interesse na utilização de novas tecnologias para modificar o papel desempenhado por esses microrganismos, com o objetivo de melhorar a eficiência de utilização dos nutrientes.

O principal efeito da adição de ionóforos à dieta é a alteração da fermentação ruminal. Não só as bactérias Gram-positivas são sensíveis a monensina, os protozoários ciliados ruminais também apresentam essa característica (Dennis *et al.* 1986) e sua redução é importante para a produtividade animal e para o meio ambiente, uma vez que os ciliados contribuem para a metanogênese, através do fornecimento de H₂ produzido durante a fermentação dos carboidratos (Willians & Coleman, 1997). Quando grupos específicos de microrganismos que contribuem na metanogênese ou que causam desanimação excessiva de aminoácidos são inibidos, mais energia e nitrogênio são disponibilizados para o hospedeiro, melhorando o desempenho do animal (Russell & Mantovani, 2002).

O tempo de suplementação da monensina nas dietas de ruminantes tem apresentado relevância em se tratando de alterações nas populações de ciliados. Segundo Rogers *et al.* (1997) a suplementação de monensina em dieta concentrada fornecida a ovinos durante o período de 19 dias reduziu em 70% o número total de ciliados e 50% no período de 96 dias de suplementação desse ionóforo. Guan *et al.* (2006) verificaram que a adição de monensina reduziu as populações de ciliados do rúmen e que as mesmas foram restauradas em três semanas de suplementação nos bovinos recebendo alto teor de concentrado (70%), e seis semanas de suplementação nos bovinos recebendo baixo teor de concentrado. Arakaki *et al.* (2000) observaram aumento no número total de protozoários ciliados no rúmen de novilhos recebendo monensina durante 124 dias.

Garcia *et al.* (2000) verificaram que o número total de ciliados reduziu após a adição da monensina durante 18 dias na dieta de ovinos. Kišidayová *et al.* (2009) observaram a diminuição das populações de ciliados *in vitro* após 12 dias de suplementação com monensina. Neto *et al.* (2009) constataram a queda das populações de ciliados no rúmen de vacas não-lactantes após 20 dias de suplementação da monensina. Já Gomes *et al.* (2010) observaram a diminuição das populações de ciliados após 20 dias da suplementação da monensina na dieta fornecidas a novilhos Nelore. Ozturk *et al.* (2010) verificaram que a adição de monensina por 28 dias sobre a fermentação ruminal *in vitro* de ovinos provocou redução na contagem total de ciliados do rúmen. Entretanto, não foi avaliado nos trabalhos relatados o efeito da monensina ao longo de todo o experimento sobre as populações de ciliados do rúmen.

A própolis contém compostos antimicrobianos e vem sendo testado em substituição da monensina como aditivo alimentar, porém, seu efeito sobre as populações de ciliados do rúmen ainda é pouco estudado. Os poucos trabalhos existentes na literatura relatam que a própolis não altera as populações de ciliados no rúmen (Broudiscou *et al.*, 2000; Ozturk *et al.*, 2010; Oeztuerk *et al.*, 2010), com exceção do trabalho apresentado por Ríspoli *et al.* (2009), onde a própolis promoveu redução nas populações de ciliados no rúmen de bubalinos, enquanto que em bovinos não houve diferença entre os tratamentos. No entanto, nenhum trabalho foi realizado avaliando o impacto da própolis sobre as populações de ciliados durante todo o período de suplementação. Com base nisso, o objetivo do trabalho foi determinar o impacto da suplementação da monensina ou produtos à base de própolis LLOS em curto prazo sobre as populações de ciliados no rúmen de novilhos.

MATERIAL E MÉTODOS

1 LOCAL, ANIMAIS

O experimento foi conduzido na Fazenda Experimental de Iguatemi (FEI), pertencente à Universidade Estadual de Maringá, PR, no período de outubro de 2008 a fevereiro de 2009 e conduzido de acordo com as normas do Comitê de Conduta Ética no Uso de Animais em Experimentação, desta instituição, conforme parecer de aprovação número 019/2008. As

amostras foram analisadas no Laboratório de Protozoologia do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Comportamento e Biologia Animal, pertencente à Universidade Federal de Juiz de Fora, UFJF, no período de novembro de 2009 a fevereiro de 2010.

As coletas do conteúdo ruminal foram obtidas de cinco novilhos, castrados, com idade aproximada de 12 meses e peso médio de 295 ± 12 kg. Os animais foram submetidos à intervenção cirúrgica para a implantação de cânulas no rúmen e mantidos em baias individuais de 10 m^2 , cobertas, providas de comedouros e bebedouros, com piso de concreto, e com as laterais fechadas com madeira.

2 DIETAS

A dieta basal fornecida aos animais foi composta de 47% de silagem de milho e 53% de concentrado formulado à base de milho moído e farelo de soja (TAB. 1), com base na matéria seca (MS), além de mistura mineral-vitamina. A dieta foi balanceada, de acordo com o National Research Council - NRC (2000), para atender as exigências de manutenção e crescimento ($0,35 \text{ kg/d}$) dos animais, porém, a ingestão da ração foi restrita a 2,1% do peso corporal.

As dietas experimentais diferiram somente em relação à adição ou não de aditivos. Foram testadas dietas sem aditivos, ou com monensina ou produtos à base de própolis LLOSB1+, LLOSC1+ ou LLOSC1++, cada produto contendo respectivamente 0,022; 0,036 e 0,054 mg/g de flavonóides totais medidos em crisina, por dose diária (Prado, 2005). Os produtos à base de própolis LLOS foram produzidos no Laboratório de Farmacotécnica da UEM, conforme Franco & Bueno (1999), e estão patenteados como propriedade intelectual no PI 0605768-3. Os produtos LLOS utilizados no presente trabalho apresentam a mesma diluição alcoólica (1) e diferem na concentração de própolis ($B < C$) e dosagem ($+ < ++$).

Os extratos de própolis foram secos em spray dryer, assim apresentavam-se na forma de pó, e o fubá de milho foi usado como excipiente, de forma que as doses diárias ficassem contidas em 10 g de produto final (extrato + excipiente). A monensina sódica foi fornecida através de um produto comercial (Rumensin® - 100, Elanco), na dose de 200 mg/animal/dia. As dietas experimentais foram fornecidas aos animais duas vezes ao dia, em duas porções iguais, pela manhã (8 horas) e à tarde (16 horas), sendo o concentrado e o volumoso misturados no cocho das baias. Os aditivos referentes a cada dieta foram inseridos

diretamente no rúmen no momento de cada alimentação em cada turno, sendo 1g de monensina e 5g de extrato de própolis LLOS (FIG. 2).

3 DELINEAMENTO E ANÁLISES ESTATÍSTICAS

O experimento foi realizado em delineamento quadrado latino 5X5 com cinco períodos de 21 dias, mantendo-se intervalo de seis dias entre cada período, visando assim minimizar os efeitos residuais da dieta anterior. A ordem como os animais foram inseridos no delineamento esta disposto no Quadro. 4. Foi considerada a média das subparcelas de tempo. As análises estatísticas das variáveis foram interpretadas de acordo com Ayres *et al.* (2007). Os resultados encontrados para avaliar o efeito dieta x dias foram submetidos à análise de variância Kruskal-Wallis pelo teste de medida Student-Newman-Keuls a 5% E os resultados encontrados para avaliar o efeito dieta x período foram submetidos à análise de variância ANOVA pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Quadro 4. Disposição dos animais no delineamento do quadrado latino durante o experimento.

| Períodos | Tratamentos | | | | |
|----------|--------------|-----------|----------|----------|-----------|
| | Sem aditivos | Monensina | LLOS B1+ | LLOS C1+ | LLOS C1++ |
| 1 | A3 | A4 | A2 | A1 | A5 |
| 2 | A1 | A5 | A3 | A4 | A2 |
| 3 | A4 | A2 | A1 | A5 | A3 |
| 4 | A2 | A1 | A5 | A3 | A4 |
| 5 | A5 | A3 | A4 | A2 | A1 |

A1, A2, A3, A4 e A5 = números diferentes indica animais diferentes.

4 COLETAS DO CONTEÚDO RUMINAL

As coletas de conteúdo ruminal para verificação do pH e para a contagem de protozoários ciliados foram realizadas antes de iniciar o período de coleta (dia 0), e 8, 15 e 21 dias após o início do fornecimento das dietas experimentais aos animais. Em cada dia de coleta foram retiradas amostras de conteúdo ruminal antes (0 hora) do fornecimento das dietas experimentais aos novilhos, 3 e 6 horas depois.

O conteúdo ruminal coletado para análises quantitativas dos protozoários ciliados foi filtrado em tecido gaze e espremido manualmente. As amostras foram fixadas em igual

volume de formalina a 18,5%, seguindo proposta de Dehority (1984) com modificações de D'Agosto & Carneiro (1999). O líquido ruminal foi armazenado em recipiente plástico vedado e identificado. A quantificação e a identificação foram realizadas em câmara de contagem Sedgewick-Rafter em 100 campos independentes. O procedimento para identificação foi baseado em Ogimoto & Imai (1981). O valor de pH ruminal foi aferido imediatamente após a obtenção das amostras de líquido ruminal, utilizando um pHmetro digital Tecnal TEC- 3MP.

RESULTADOS

O gênero *Entodinium* foi observado em todos os dias de amostragem durante o experimento, em todas as dietas, sendo o mais representativo com 97% do total de ciliados registrados. Por esses motivos, as análises da comunidade de protozoários ciliados nos bovinos recebendo aditivos em curto prazo foram baseadas neste gênero.

A adição de monensina, as populações de *Entodinium* oscilaram durante os 21 dias de suplementação do ionóforo (Quadro. 5). Os ciliados apresentaram queda significativa após 8 dias de suplementação do ionóforo, restabelecendo-se no dia 15 e tornando a diminuir no final do experimento ($H= 4.92$, $p< 0,05$). Foi observado que independente da suplementação dos aditivos, as populações de *Entodinium* aumentaram progressivamente nos dias 8 e 15 e diminuíram nos dia 21 ($H= 14.03$, $p< 0,05$) (Quadro. 5).

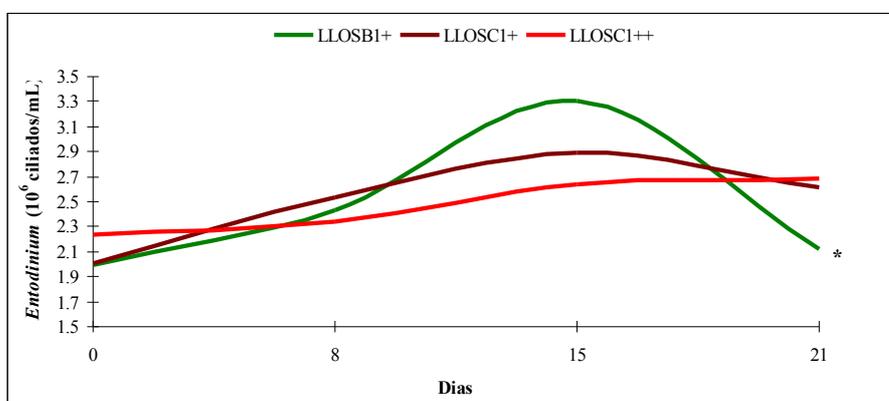
Em relação a adição do produto à base de própolis LLOSb1+ aumentou as populações de *Entodinium* após 15 dias de sua suplementação (Quadro. 5), no entanto, após 21 dias foi verificado efeito negativo desse aditivo sobre os ciliados, que retornaram aos níveis observados antes (dia 0) e após 8 dias da adição do referido própolis ($H = 7.94$, $p< 0,05$).

Quadro 5. Densidade média e desvio padrão (\pm DP) de *Entodinium* ($n \times 10^6$ ciliados/mL) no rúmen de novilhos alimentados com dieta adicionada de monensina ou produtos à base de própolis LLOS sob diferentes dias de amostragem (0, 8, 15 e 21 dias)

| Dia ¹ | <i>Entodinium</i> (10^4 ciliados/mL) | | | | |
|------------------|---|--------------------------------------|--------------------------------------|------------------------|------------------------|
| | Sem aditivos | Monensina | LLOSBI+* | LLOSC1+* | LLOSC1++* |
| 0 | 1,76 ^a ($\pm 0,98$) | 2,47 ^a ($\pm 0,76$) | 1,99 ^a ($\pm 0,99$) | 2,01 ($\pm 1,19$) | 2,24 ($\pm 1,04$) |
| 8 | 2,87 ^{bc} ($\pm 1,10$) | 1,79 ^b ($\pm 0,77$) | 2,43 ^{ab} ($\pm 1,17$) | 2,53 ($\pm 1,55$) | 2,34 ($\pm 0,98$) |
| 15 | 3,50 ^b ($\pm 1,61$) | 2,37 ^{ab} ($\pm 1,20$) | 3,31 ^b ($\pm 1,46$) | 2,89 ($\pm 1,27$) | 2,64 ($\pm 0,79$) |
| 21 | 2,51 ^{ac} ($\pm 1,64$) | 1,81 ^{ab} ($\pm 0,94$) | 2,12 ^a ($\pm 1,09$) | 2,61 ($\pm 1,50$) | 2,68 ($\pm 0,81$) |
| | (p < 0,05) | (p < 0,05) | (p < 0,05) | (p = 0,19) | (p = 0,40) |

*Produtos à base de extrato de própolis: LLOSBI+ = 0,022mg/g; LLOSC1+ = 0,036mg/g; LLOSC1++ = 0,054mg/g de flavonóides totais em crisina segundo Prado (2005) ¹Dias após o fornecimento das dietas experimentais durante o experimento. ^{a, b, c}Médias seguidas por letras distintas, na linhas, diferem entre si a 5% de probabilidade.

Os produtos à base de própolis LLOSC1+ e LLOSC1++, que se diferenciam apenas na dosagem, demonstraram o mesmo padrão de efeito de LLOSBI+, que possui a concentração de própolis menor que os outros produtos a base de própolis, sobre as populações de *Entodinium* (Desenho. 5), com aumento progressivo nos dias 8 e 15 e queda no dia 21 retornando aos níveis iniciais, porém os valores não foram significativos ($H = 4.66$, $p = 0,12$).



Desenho 5. Efeito dos produtos à base de própolis LLOS sobre as populações de *Entodinium* ($n \times 10^6$ ciliados/mL) sob diferentes dias de amostragem (0, 8, 15 e 21 dias).

Produtos à base de extrato de própolis: LLOSBI+ = 0,022mg/g; LLOSC1+ = 0,036mg/g; LLOSC1++ = 0,054mg/g de flavonóides totais em crisina, segundo Prado (2005). * $p < 0,05$ entre os dias 0, 8, 15 e 21 na dieta com LLOSBI+.

Durante a dieta sem aditivo foi observado que as populações de *Entodinium* se dividiram em dois grupos distintos, colocando-se como iguais nos períodos 1, 4 e 5 e em outro grupo, os períodos 2 e 3 ($F = 4.03$, $p < 0,05$). Em relação à adição de monensina na dieta

dos bovinos foi possível notar tendência a queda das populações de *Entodinium* durante o período 4 entretanto o efeito não foi significativo ($F= 2.42$, $p= 0,059$) (Quadro 6).

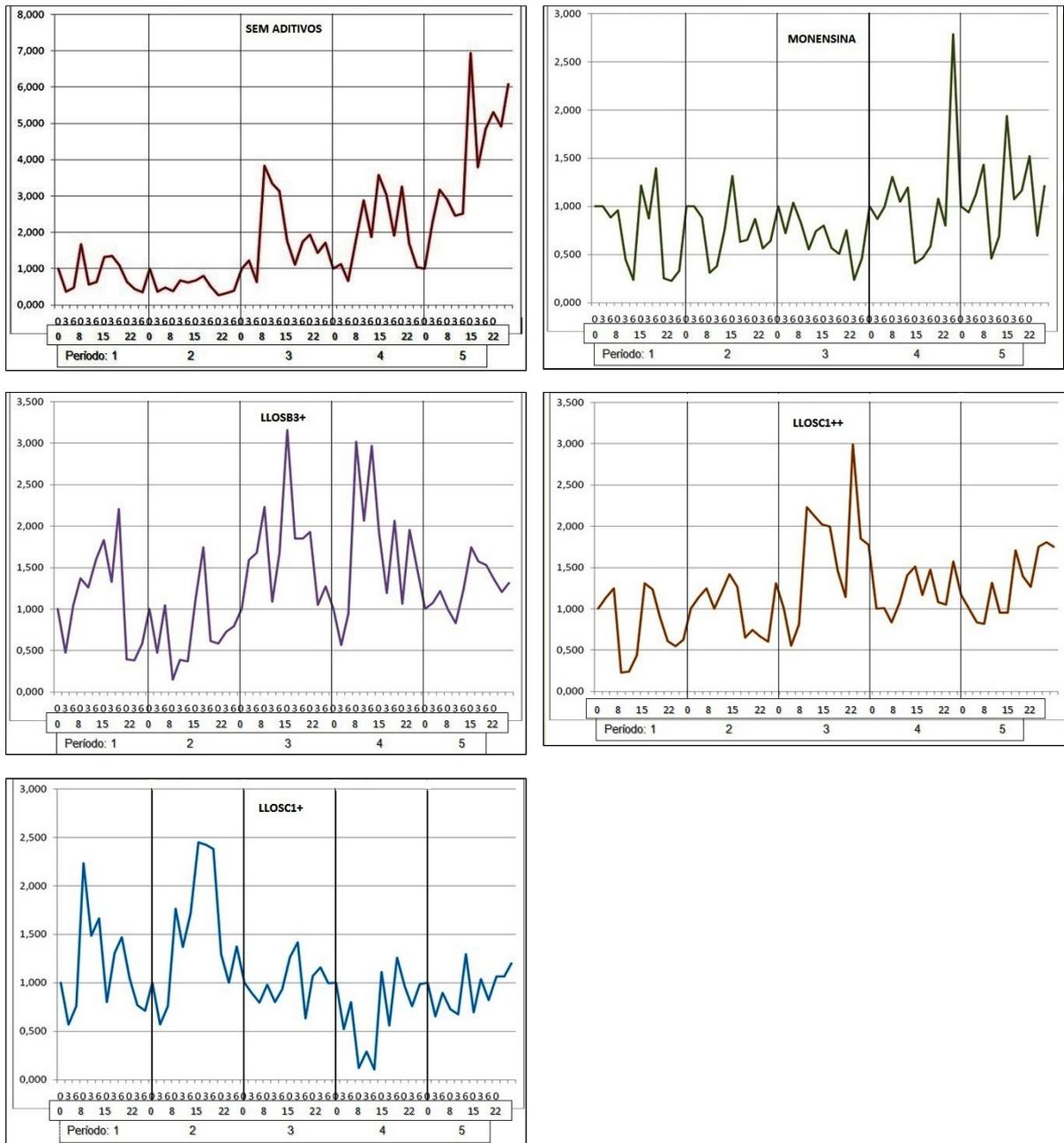
As populações do gênero *Entodinium* ao longo do experimento foram alteradas durante os períodos experimentais, especialmente com a suplementação dos produtos à base de própolis LLOS (Quadro 6). Na dieta contendo LLOSB1+ foi observado que as populações de *Entodinium* aumentaram significativamente no período 5 ($F= 10.89$, $p< 0,05$). Na dieta contendo LLOSC1+ as populações se dividiram em três grupos distintos, em que são considerados iguais nos períodos 1 e 4, períodos 1, 2 e 3 e no período 5 ($F= 25,26$, $p< 0,05$). Na dieta contendo LLOSC1++ ocorreu a formação de dois grupos de comunidade de *Entodinium*, com separação entre os períodos 1, 2, 3 e 4 e os períodos 1, 3, 4 e 5 ($F= 2.84$, $p< 0,05$).

Quadro 6. Densidade média e desvio padrão (\pm DP) de *Entodinium* ($n \times 10^6$ ciliados/mL) no rúmen de novilhos alimentados com dieta adicionada de monensina ou produtos à base de própolis LLOS por 21 dias, em diferentes períodos

| Período | <i>Entodinium</i> (10^6 ciliados/mL) | | | | |
|---------|---|------------------------|-------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|
| | Sem aditivos | Monensina | LLOSB1+* | LLOSC1+* | LLOSC1++* |
| 1 | 3,05 ^a ($\pm 1,65$) | 2,17 ($\pm 1,22$) | 2,71 ^a ($\pm 1,10$) | 2,00 ^{ab} ($\pm 0,85$) | 2,38 ^{ab} ($\pm 1,19$) |
| 2 | 2,00 ^b ($\pm 0,80$) | 2,22 ($\pm 0,83$) | 1,81 ^a ($\pm 1,04$) | 2,62 ^a ($\pm 1,13$) | 3,07 ^b ($\pm 0,87$) |
| 3 | 1,72 ^b ($\pm 0,93$) | 2,40 ($\pm 0,80$) | 1,71 ^a ($\pm 0,60$) | 2,36 ^a ($\pm 0,51$) | 2,10 ^{ab} ($\pm 0,87$) |
| 4 | 2,81 ^a ($\pm 1,38$) | 1,39 ($\pm 0,81$) | 1,94 ^a ($\pm 0,90$) | 1,06 ^b ($\pm 0,57$) | 2,05 ^{ab} ($\pm 0,41$) |
| 5 | 3,67 ^a ($\pm 1,69$) | 2,37 ($\pm 0,86$) | 4,00 ^b ($\pm 0,84$) | 4,46 ^c ($\pm 1,03$) | 2,66 ^a ($\pm 0,79$) |
| | $p< 0,05$ | $p= 0,059$ | $p< 0,05$ | $p< 0,05$ | $p< 0,05$ |

*Produtos à base de extrato de própolis: LLOSB1+ = 0,022mg/g; LLOSC1+ = 0,036mg/g; LLOSC1++ = 0,054mg/g de flavonóides totais em crina segundo Prado (2005). ^{a, b, c}Médias seguidas por letras distintas, nas linhas, diferem entre si a 5% de probabilidade.

Observando o comportamento das populações de *Entodinium* durante todo o experimento foi possível notar forte ascendência das populações nos períodos 4 e 5 em todas as dietas (Desenho 6). A monensina demonstrou ação redutora regularmente eficaz sobre os ciliados durante os períodos 3 e 4. As fortes oscilações nas contagens dos ciliados durante as dietas à base de própolis LLOS indicam indefinição da tendência, principalmente nos períodos 1, 2 e 3. Analisando a fase inicial de cada período em cada dieta, onde os animais não haviam recebido nenhum aditivo nos dias anteriores, foi possível verificar que contagens das populações diminuíram em todos os tratamentos, entretanto com várias oscilações entre os dias amostrais (Desenho 6).



Desenho 6. Comportamento das populações de *Entodinium* no rúmen de bovinos recebendo dieta com monensina ou produtos à base de própolis LLOS, utilizando números índices, onde 1 representa o valor inicial de cada período.

Produtos à base de extrato de própolis: LLOSBS1+ = 0,022mg/g; LLOSC1+ = 0,036mg/g; LLOSC1++ = 0,054mg/g de flavonóides totais em crisina segundo Prado (2005). 1, 2, 3, 4 e 5= períodos amostrais. 0, 8, 15 e 21= dias de coleta em cada período experimental. 0, 3 e 6 = horas de cada dia experimental

DISCUSSÃO

Os produtos à base de própolis LLOS aumentaram as populações de *Entodinium* nos dias 8 e principalmente no dia 15, mas somente em LLOSB1+, com 0,022mg/g de flavonóides totais em crisina, esse efeito foi significativo. O LLOSB1+ possui menor concentração de flavonóides em relação aos outros produtos LLOS, entretanto outros compostos podem estar atuando sobre as populações de ciliados ruminais (Prado *et al.* 2010b). Ríspoli *et al.* (2009) observaram que a própolis LLOSC1, com 0,018 mg/g de flavonóides, também aumentou as populações de *Entodinium* em bovino recebendo dieta com 50% de concentrado a base de milho, entretanto esse aumento não foi significativo em bovinos.

Os entodínios observados em bovinos que receberam os produtos à base de própolis LLOS apresentaram resultados contrários aos observados com a adição de monensina, indicando que o modo de ação da própolis sobre as populações de protozoários ciliados pode ser diferente ao da monensina. Prado *et al.* (2010b) testando cepas bacterianas tolerantes a produtos à base de própolis LLOS sugeriram que cepas Gram-positivas são tolerantes à própolis e que o seu mecanismo que envolve a inibição da RNA-polimerase bacteriana, pode estar relacionada com a predominância dessa bactéria. Já os ionóforos atuam, principalmente, sobre bactérias Gram-positivas, com pouco ou nenhum efeito sobre bactérias Gram-negativas (Nicodemo, 2001).

Os resultados observados na adição de monensina sobre as populações de *Entodinium* durante os dias de amostragem são semelhantes aos apresentados por Guan *et al.* (2006) e Rogers *et al.* (1997) que testaram o efeitos da monensina em curto prazo sobre as populações de ciliados no rúmen de bovinos e ovinos, respectivamente. Esses autores observaram que as populações de ciliados no rúmen diminuíram nas duas primeiras semanas de suplementação da monensina à dieta e que na terceira semana as populações de ciliados foram restauradas aos níveis de pré-suplementação. Arakaki *et al.* (2000) verificaram aumento da densidade total de ciliados de novilhos recebendo monensina adicionada à dieta, porém essa observação foi verificada somente após 41 dias de suplementação, sugerindo que a inibição dos ciliados pelo ionóforo é transitória e que a adição contínua da monensina pode resultar na seleção de uma comunidade de protozoários ciliados resistente.

O aumento das populações do gênero *Entodinium* observado na dieta sem aditivos durante os dias 8 e 15 pode ter ocorrido devido ao teor de concentrado na dieta (50%), uma

vez que muitas espécies do gênero *Entodinium* apresentam grande capacidade de ingerir partículas de amido, sendo consideradas amilolíticas (Franzolin & Dehority, 1996a). Resultado semelhante foi relatado por Arakaki *et al.* (2000) que durante o período de 124 dias notaram um crescimento nas populações de ciliados no rúmen de novilhos recebendo dieta com altos teores de concentrado (50% e 70%) sem a suplementação de qualquer aditivo alimentar.

O efeito de período observado sobre as contagens de ciliados do gênero *Entodinium* indica que a rotação dos animais no delineamento na sequência do quadrado latino pode ter influenciado no resultado final. Assim como observado por Martinele *et al.* (2008b), a variação da composição dos ciliados ao longo dos períodos experimentais permite questionar se o tempo destinado a adaptação dos animais aos aditivos na sequência dos períodos propostos pelo quadrado latino foi suficiente para restabelecer a comunidade de *Entodinium*, principalmente nas dietas contendo a própolis. Sugere-se que a diferença observada na comunidade de ciliados ao longo de 21 dias com a adição de aditivos ocorreu em função de fatores metabólicos individuais envolvidos, tanto da espécie, como do hospedeiro (Franzolin & Dehority, 1996b; D'Agosto *et al.*, 1998; Siqueira & D'Agosto, 2003).

Outro ponto importante observado no comportamento das populações de *Entodinium* ao longo do experimento foi a forte ascendência das populações nos períodos 4 e 5, indicando que o intervalo entre um período e outro pode não ter sido suficiente para minimizar ou inibir os efeitos residuais da dieta anterior. O sinergismo das dietas pode ter influenciado neste efeito. No trabalho realizado por Arakaki *et al.* (2000) foi observado que as populações de *Entodinium* diminuíram com a adição da monensina e levedura isoladamente, porém a combinação dos dois aditivos aumentaram a densidade das populações do ciliado, indicando que o sinergismo entre as dietas precisam ser melhor investigados.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo apresentou a caracterização e ocorrência dos protozoários ciliados no rúmen de bovinos e seu comportamento em curto prazo mediante a ação dos aditivos alimentares monensina e produtos à base de própolis LLOS em diferentes concentrações de flavonóides. Aspectos relacionados com a influência desses aditivos sobre os ciliados foram abordados, verificando-se que não houve alteração nas populações de ciliados observados mediante aos diversos tratamentos.

Em relação ao impacto dos aditivos durante um curto espaço de tempo sobre as populações verificou-se que os produtos à base de própolis LLOS aumentaram as populações de ciliados ao longo de 21 dias, sendo mais efetivo o produto LLOS B1+. Os produtos à base de própolis LLOS suplementados em curto prazo é menos efetivo na inibição das populações de protozoários ciliados que a monensina, sugerindo que a sensibilidade desses microrganismos para a própolis seja diferente à apresentada para monensina. Entretanto, o menor período experimental adotado pelo quadrado latino para o presente trabalho pode ter influenciado os resultados, visto que diferenças nas populações de ciliados entre os períodos foram observadas.

O entendimento da dinâmica populacional dos protozoários mediante a ação de própolis como aditivo alimentar pode ajudar nos estudos a cerca desse produto para substituição da monensina. Entretanto para tal estudo, sugere-se que o delineamento quadrado latino, muito comumente utilizado nas avaliações de parâmetros ruminais por apresentar inúmeras vantagens como, por exemplo, número reduzido de animais e conseqüentemente baixo custo com a experimentação, seja substituído por outro modelo experimental com períodos mais longos, onde um grupo de animais seja submetido ao mesmo tratamento durante todo o experimento, uma vez que o sinergismo dos tratamentos é um aspecto importante a ser considerado, principalmente em se tratando de microbiota ruminal.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAKAKI, L.C.; STAHRINGER, R.C.; GARRET, J.E.; DEHORIT, B.A. The effects of feeding monensin and yeast culture, alone or in combination, on the concentration and generic composition of rumen protozoa in steers fed on low-quality pasture supplemented with increasing levels of concentrate. **Animal Feed Science and Technology**, v. 84, n. 1-2, p. 121-127, 2000.

ARAÚJO, J.S.; PEREZ, J.R.O.; PAIVA, P.C.A.; PEIXOTO, E.C.T.M.; BRAGA, G.C.; OLIVEIRA, V.; VALLE, L.C.D. Efeito da monensina sódica no consumo de alimentos e pH ruminal em ovinos. **Archives of Veterinary Science**, v. 11, n. 1, p. 39-43, 2006.

ARCURI, P.B.; LOPES, F.C.F.; CARNEIRO, J.C. Microbiologia do rúmen. In: PIRES, A.V.; OLIVEIRA, S.G.; BERCHIELLI, T.T. **Nutrição de ruminantes**. Jaboticabal: Funep, 1. ed. 2006. p.111-150.

ARCURI, P.B.; MATOS, L.L. Microbiologia do Rúmen. **Informativo Agropecuário**, v. 16, n. 175, p. 05-08, 1992.

AWALE, S.; SHRESTHA, S.P.; TEZUKA, Y.; UEDA, J.; MATSUSHIGE, K.; KADOTA, S. Neoflavonoids and related constituents from nepalese própolis and their nitric oxide production inhibitory activity. **Journal of Natural Products**, v. 68, n. 6, p. 858-864, 2005.

AYRES, M, AYRES JÚNIOR, M.& AYRES, D.L. **BioEstat 5.0: Aplicações Estatísticas nas áreas das ciências Bio-Médicas**. 5. ed. Belém, Pará, 2007.

BANKOVA, V.S.; CASTRO, S.L.D.; MARCUCCI, M.C. Própolis: recent advances in chemistry and plant origin. **Apidologie**, v. 31, n. 1, p. 3-15, 2000.

BANKOVA, V.; DYULGEROV, A.; POPOV, S. Própolis produced in Bulgaria and Mongolia: phenolic compounds and plant origin. **Apidologie**, v. 23, n. 1, p. 79-85, 1992.

BANKOVA, V.; POPOV, S.; MAREKOV, N. L. Isopentenyl cinnamates from poplar buds and própolis. **Phytochemistry**, v. 28, n. 3, p. 871-873, 1989.

BEECHER, G.R. Overview of dietary flavonoids: nomenclature, occurrence and intake. **Journal of Nutrition**, v. 133, n. 10, p. 3248-3254, 2003.

BERGEN, W.G.; BATES, D.B. Ionophores: their effect on production efficiency and mode of action. **Journal of Animal Science**, v. 58, n. 6, p. 1465-1483, 1984.

BROUDISCOU, L.P.; PAPON, Y.; BROUDISCOU, A.F. Effects of dry plant extracts on fermentation and methanogenesis in continuous culture of rumen microbes. **Animal Feed Science and Technology**, v. 87, n. 3-4, p. 263-277, 2000.

BÜRGER, P.J.; PEREIRA, J.C.; VALADARES FILHO, S.C.; SILVA, J.F.C.; QUEIROZ, A.C.; CECON, P.R.; MAGIERO, D. Fermentação ruminal e eficiência microbiana em bezerros holandeses alimentados com dietas contendo diferentes níveis de concentrado. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 29, n. 1, p. 215-224, 2000.

BUROW, L.C.; GOBIUS, K.S.; VANSELOW, B.A.; KLIEVE, A.V. A lack of predatory interaction between rumen ciliate protozoa and Shiga-toxin producing *Escherichia coli*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 40, n. 2, p. 117-122, 2005.

COALHO, M.R.; NOGUEIRA FILHO, J.C.M.; CUNHA, J.A.; LIMA, C.G. Estudo dos protozoários ciliados em bovinos consumindo dietas com diferentes níveis de proteína não degradável no rúmen. **Acta Scientiarum**, v. 25, n. 1, p. 193-199, 2003.

D'AGOSTO, M.; CARNEIRO, M.E.; NETTO, C.M.M.; ARCURI, P.B. Avaliação dos ciliados do rúmen de bovinos mantidos com duas dietas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 48, n. 3, p. 353-361, 1996.

D'AGOSTO, M.; SANTA-ROSA, M.R.; AROEIRA, L.J.M.; LOPES, F.C.F. Influência da dieta no comportamento da população de ciliados do rúmen. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 50, n. 2, p. 153-159, 1998.

D'AGOSTO, M.; CARNEIRO, M.E. Evaluation of lugol solution used for counting rumen ciliates. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 16, n. 3, p. 725-729, 1999.

DEHORITY, B.A. Evaluation of subsampling and fixation procedures used for counting rumen Protozoa. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 48, n. 1, p. 182-185, 1984.

DEHORITY, B.A. Protozoa of the digestive tract of herbivorous mammals. **Insect Science and its Application**, v. 1, n. 3, p. 279-296, 1986.

DEHORITY, B.A. **Rumen microbiology**: an introduction to the micro-organisms in the rumen, their activities and interactions in the digestion of plant materials. Nottingham: Universidade Press, 2003. 372p.

DENNIS, S.M.; NAGARAJA, T. G.; DAYTON, A.D. Effect of lasalocida, monensin and thiopeptin on rumen protozoa. **Research in Veterinary Science**, v. 41, n. 3, p. 251–256, 1986.

EADIE, J.M. The development of rumen microbial populations in lambs and calves under various conditions of management. **Journal of General Microbiology**, v. 29, n. 4, p. 563-578, 1962.

EADIE, J. M. Studies on the Ecology of certain Rumen Ciliate Protozoa. **Journal of General Microbiology**, v.49, n. 2, p. 175-194, 1967.

EUN, J.S.; FELLNER, V.; GUMPERTZ, M.L. Methane production by mixed ruminal cultures incubated in dual flow fermentors. **Journal of Dairy Science**, v. 87, n. 1, p. 112-121, 2004.

FRANCO, S. L.; BUENO, J. H. F. Otimização de processo extrativo de própolis. **Infarma**, v. 11, n. 11-12, p. 48-51, 1999.

FRANZOLIN, R.; DEHORITY, B.A. Effect of prolonged high-concentrate feeding on ruminal protozoa concentrations. **Journal of Animal Science**, v. 74, n. 11, p. 2803-2809. 1996a.

FRANZOLIN, R.; DEHORITY, B.A. Efeitos do pH ruminal e ingestão alimentar na defaunação em ovinos sob rações concentradas. **Revista da Sociedade Brasileira de Zootecnia**, v. 25, n. 6, p. 1207-1215, 1996b.

FRANZOLIN NETO, R.; NOGUEIRA FILHO, J.C.M.; OLIVEIRA, E.M. Efeitos de dietas com diferentes níveis de proteína sobre os protozoários ciliados no rúmen de búfalos (*Bubalus bubalis* L.). **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 26, n. 4, p. 487-493, 1991.

GARCIA, C.C.G.; MENDOZA, M.G.D.; GONZÁLES, M.S.; COBOS, P.M.; ORTEGA, C.M.E.; RAMIREZ, L.R. Effect of a yeast culture (*Saccharomyces cerevisiae*) and monensin on ruminal fermentation and digestion in sheep. **Animal Feed Science and Technology**, v. 83, n. 2, p. 165-170, 2000.

GOMES, R.C.; ANTUNES, M.T.; NOGUEIRA FILHO, J.C.M.; ÍTAVO, L.C.V.; LEME, P.R. Leveduras vivas e monensina em dietas de alto concentrado para bovinos: parâmetros ruminais e degradabilidade “*in situ*”. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 11, n. 1, p. 202-216, 2010.

GRUBY, D.; DELAFOND, O. Recherches sur les animalcules se développant em grand nombre dans l'estomac et dans les intestins pendant la digestion des animaux herbivores et carnivores. **Comptes Rendus de l'Academie des Sciences**, v. 17, n. 1, p. 1304-1308, 1843.

GREENAWAY, W.; MAY, J.; SCAYSBROOK, T.; WHATLEY, F.R. Identification by Gas-Chromatography Mass-Spectrometry of 150 compounds in própolis. **Zeitschrift Fur Naturforschung**, v. 46, n. 3, p. 111-121, 1991.

GUAN, H.; WITTENBERG, K.M.; OMINSKI, K.H.; KRAUSE, D.O. Efficacy of ionophores in cattle diets for mitigation of enteric methane. **Journal of Animal Science**, v. 84, p. 1896-1906, 2006.

HARBONE, J.B.; WILLIAMS, C.A. Advances in flavonoid research since 1992. **Phytochemistry**, v. 55, n. 6, p. 481-504, 2000.

HENDRIKSEN, R.S.; MEVIUS, D.J.; SCHROETER, A.; TEALE, C.; JOUY, E.; BUTAYE, P.; FRANCO, A.; UTINANE, A.; AMADO, A.; MORENO, M.; GREKO, C.; STARK, K.D.; BERGHOLD, C.; MYLLYNIEMI, A.L.; HOSZOWSKI, A.; SUNDE, M.; AARESTRUP, F.M. Prevalence of antimicrobial resistance among bacterial pathogens and indicator bacteria in pigs in different European countries from year 2002 - 2004. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 50, n. 19, p. 1-10, 2008.

HESS T.F.; GRDZELISHVILI, I.; SHENG, H.Q.; HOVDE, C.J. Heat inactivation of *E. coli* during manure composting. **Compost Science and Utilization**, v. 12, n. 4, p. 314–322. 2004.

HINO, T.; RUSSEL, J.B. Relative contribution of ruminal bacteria and protozoa to the degradation of protein *in vitro*. **Journal of Animal Science**, v. 64, n. 1, p. 261-270, 1987.

HUNGATE, R. E. **The rumen and its microbes**. 1. ed. New York: Academic Press, 1966.

IPHARRAGUERRE, I.R.; CLARK, J.H. Usefulness of ionophores for lactating dairy cows: a review. **Animal Feed Science and Technology**, v.106, n.1-4, p.39-57, 2003

JUSTUS NETO, C; ROSSI JUNIOR, P. Influência da monensina sódica, probiótico (*Saccharomyces cerevisiae*) e complemento mineral orgânico (cromo) na dieta de novilhos confinados. **Archives of Veterinary Science**, v. 13, n. 4, p. 274-279, 2008.

KAMRA, D.N. Rumen microbial ecosystem. **Current Science**, v. 89, n. 1, p. 124-134, 2005.

KARNATI, S.K.R.; YU, Z.; FIRKINS, J.L. Investigating unsaturated fat, monensin, or bromoethanesulfonate in continuous cultures retaining ruminal protozoa. II. Interaction of treatment and presence of protozoa on prokaryotic communities. **Journal of Dairy Science**, v. 92, n. 8, p. 3861-3873, 2009.

KIŠIDAYOVÁ, S.; LAUKOVÁ, A.; JALČ, D. Comparison of Nisin and Monensin Effects on Ciliate and Selected Bacterial Populations in Artificial Rumen. **Folia Microbiologica**, v. 54, n. 6, p. 527–532, 2009.

KOZLOSKI, G.V. **Bioquímica dos ruminantes**. 1. ed. Santa Maria: UFSM. 2002.

KUMAR, R.; SANGWAN, D.C.; BHATIA, S.K. PRADHON, K.; SAGAR, V.; SINGH, S. Intraruminal metabolism and nutrient digestion in cattle and bovine fed low grade roughages supplemented with protein sources. **Indian of Journal Animal Science**, v. 63, n. 5, p. 561-565, 1993.

KUSS, F.; LEONIR, J.R.; PASCOALI, L.; SANTOS, A.P.; MENEZES, L.F.G.; OSMARI, M.P. Desempenho de vacas de descarte recebendo dietas com ou sem monensina. **Ciência Rural**, v. 38, n. 1, p. 173-177, 2008.

LANA, R.P.; CAMARDELLI, M.M.L.; QUEIROZ, A.C.; RODRIGUES, M.T.; EIFERT, E.C.; MIRANDA, E.N.; ALMEIDA, I.C.C. Óleo de Soja e Própolis na Alimentação de Cabras Leiteiras. **Revista Brasileira Zootecnia**, v. 34, n. 2, p. 650-658, 2005.

LANA, R.P.; CAMARDELLI, M.M.L.; RODRIGUES, M.T.; EIFERT, E.C.; OLIVEIRA, M.VM.; STRADIOTTI JÚNIOR, D.; OLIVEIRA, J.S. Óleo de soja e própolis na alimentação de cabras leiteiras: consumo de matéria seca e de nutrientes e parâmetros de fermentação ruminal. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.36, n.1, p.191-197, 2007.

LOGUÉRCIO, A.P.; GROFF, A.C.M.; PEDROZZO, A.F. WITT, N.M.; SILVA, M.S.; VARGAS, A.C. Atividade *in vitro* do extrato de própolis contra agentes bacterianos da mastite bovina. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, n. 2, p. 347-349, 2006.

LOPES, F.C.F.; AROEIRA, L.J.M.; ARCURI, P. B.; DAYRELL, M. S.; VITTORI, A. Efeitos da defaunação em ovinos alimentados com cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*, L.) adicionada de uréia. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 54, n. 2, p. 180-188, 2002.

LU, Y.; WU, C.; YUAN, Z. Determination of hesperetin, cinnamic acid and nicotinic acid in própolis with micellar electrokinetic capillary chromatography. **Fitoterapia**, v. 75, n. 3-4, p. 267-276, 2004.

LYNN, D. H.; SMALL, E. Phylum Ciliophora (Doflein, 1901). In: LEE, J. J., BRADBURY, P. C.; LEEDALE, G. F. **An Illustrated Guide to the Protozoa**. 2ed. Allen Press Inc., Lawrence, KS. 2002. p. 371-656.

MANACH, C.; SCALBERT, A.; MORAND, C.; RÉMÉSY, C.; JIMÉNEZ, L. Polyphenols: food sources and bioavailability. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 79, n. 5, p. 727-747, 2004.

MARCIN, A.; SÜDEKUM, K.-H. Nutritive defaunation of the rumen in steers with subsequent refaunation using a cryopreserved monoculture of *Entodinium caudatum*. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 93, n. 01, p. 44–51, 2009.

MARINHO, A.A.M. Ciliados do rúmen – Sua dinâmica e importância no metabolismo digestivo dos ruminantes – Revisão. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v. 464, n. 77, p. 241-255, 1982.

MARTINELE, I.; SIQUEIRA-CASTRO, I. C. V.; D'AGOSTO, M. Protozoários ciliados no rúmen de bovinos alimentados com dietas de capim-elefante e com dois níveis de concentrado. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 9, n. 1, p. 74-81, 2008a.

MARTINELE, I.; EIFERT, E.C.; LANA, R.P.; ARCURI, P.B.; D'AGOSTO, M. Efeito da monensina e do óleo de soja sobre os protozoários ciliados do rúmen e correlação dos protozoários com parâmetros da fermentação ruminal e digestivos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 37, n. 6, p. 1129-1136, 2008b.

MATHEW, A.G.; BECKMANN, M.A.; SAXTON, A.M. A comparison of antibiotic resistance in bacteria isolated from swine herds in which antibiotics were used or excluded. **Journal of Swine Health and Production**, v. 9, n. 3, p. 125-129, 2001.

MICHALOWSKI, T. Diurnal changes in concentration of rumen ciliates and in occurrence of dividing forms in water buffalo (*Bubalus bubalus*) fed once daily. **Applied Environmental Microbiology**, v. 33, n. 4, p. 802-804, 1977.

MIRZOEVA, O.K.; GRISHANIN, R.N.; CALDER, P.C. Antimicrobial action of própolis and some of its components: the effects on growth, membrane potential and motility of bacteria. **Microbiological Research**, v. 152, n. 3, p. 239-246, 1997.

MORAIS, J.A.S.; BERCHIELLI, T.T.; REIS, R.A. Aditivos. In: BERCHIELLI, T.T.; PIRES, A.V.; OLIVEIRA, S.G. **Nutrição dos ruminantes**. 1.ed. Jaboticabal: Funep, 2006. p. 544-589.

MOSS, A.R.; JOUANY, J.P.; NEWBOLD, J. Methane production by ruminants: its contribution to global warming. **Annales de Zootechnie**, v. 49, p. 231-253, 2000

NAGARAJA, T.G., NEWBOLD, C.J., VAN NEVEL, C.J., DEMEYER, D.I. Manipulation of ruminal fermentation. In: HOBSON, P.N. & STEWART, C.S. **The Rumen Microbial Ecosystem**. 2. ed. London: Blackie Academic & Professional, 1997. p. 523-632.

NAGARAJA, T.G.; TAYLOR, M.B. Susceptibility and resistance of ruminal bacteria to antimicrobial feed additives. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 53, n. 7, p. 1620-1625, 1987.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrient requirements of domestic animals**. 8. ed. Washington, D.C.: National Academy Press, 2000.

NETO, G.B.; BERNDT, A.; NOGUEIRA, J.R.; DEMARCHI, J.J.A.A.; NOGUEIRA, J.C. Monensin and protein supplements on methane production and rumen protozoa in bovine fed low quality forage. **South African Journal of Animal Science**, v. 39, supl. 1, p. 280-283, 2009.

NICODEMO, M.L.F. Uso de aditivos na dieta de bovinos de corte. **Documentos 106**. Campo Grande: Embrapa Gado de Corte. 2001. 54p. Disponível em: <<http://www.cnpqg.embrapa.br/publicacoes/doc/doc106/>>. Acesso em: 31 mar. 2008.

NOGUEIRA, K.A.; NOGUEIRA FILHO, J.C.M.; LEME, P.R.; VALINOTE, A.C.; LUZ, S.; CUNHA, J.A. . Substituição do milho pela polpa de citros sobre a fermentação ruminal e protozoários ciliados. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, v. 27, n. 1, p. 145-149, 2005.

NOGUEIRA FILHO, J.C.M.; OLIVEIRA, M.E.M.; TOLEDO, L.R.A.; VELLOSO, L. Protozoários ciliados no rúmen de zebuínos e bubalinos submetidos a dietas com volumosos e concentrados. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 33, n. 6, p. 993-999, 1998.

OEZTUERK, H.; EMRE, B.; SAGMANLIGIL, V.; PISKIN, I.; FIDANCI, U.R.; PEKCAN, M. Effects of Nisin and Própolis on ruminal fermentation *in vitro*. **Journal of Animal and Veterinary Advances**, v. 9, n. 21, p. 2752-2758, 2010.

OGIMOTO, K.; IMAI, S. **Atlas of Rumen Microbiology**. Tokyo: Japan Scientific Societies Press, 1981.

OLIVEIRA, J.S.; QUEIROZ, A.C.; LANA, R.P.; MANTOVANI, H.C.; GENEROSO, R.A.R. Efeito da monensina e da própolis sobre a atividade de fermentação de aminoácidos *in vitro* pelos microrganismos ruminais. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 35, n. 1, p. 275-281, 2006.

ORTOLAN, J.H.; SOARES, W.V.; LEME, P.R.; NOGUEIRA, J.C.M. Degradabilidade ruminal e população de protozoários ciliados no rúmen de novilhos nelore alimentados com dieta com alto concentrado suplementada com levedura viva, monensina sódica e salinomicina. **Boletim da Indústria Animal**, v. 67, n. 1, p. 17-25, 2010.

OZTURK, H.; PEKCAN, M.; SIRELI, M.; FIDANCI, U. R. Effects of própolis on *in vitro* rumen microbial fermentation. **Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi**, v. 57, n. 01, p. 217-221, 2010.

PARK, Y.K.; HOO, M.H.; ABREU, J.A.S.; IKEGAKI, M.; CURY, J.A.; ROSALEN, P.L. Antimicrobial activity of propolis on oral microorganisms. **Current Microbiology**, v. 36, p. n. 1, 24-28, 1998.

PARK, Y.K.; IKEGAKI, M.; ALENCAR, S.M. de. Classificação da própolis brasileira a partir de suas características físico-químicas e propriedades biológicas. **Mensagem Doce**, v. 58, n. 1, p. 2-7, 2000.

PINTO, M.S.; FARIA J.E.; MESSAGE, D.; CASSINI, S.T.A.; PEREIRA, C.S.; GIOSO, M. M. Efeito de extratos de própolis verde sobre bactérias patogênicas isoladas do leite de vacas com mastite. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 38, n. 6, p. 278-283, 2001.

PRADO, O.P.P. **Produto à base de própolis na nutrição de ruminantes (LLOS)**. 2005. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Estadual de Maringá, Maringá. 2005.

PRADO, O.P.P.; ZEOULA, L.M.; MOURA, L.P.P.; FRANCO, S.L.; PRADO, I.N.; GOMES, H.C.C. Digestibilidade e parâmetros ruminais de dietas à base de forragem com adição de própolis e monensina sódica para bovinos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 39, n. 6, p. 1336-1345, 2010a.

PRADO, O.P.P.; ZEOULA, L.M.; MOURA, L.P.P.; FRANCO, S.L.; PAIVA, S.B.; ARCURI, P.B. Isolation and expeditious morphological, biochemical and kinetic characterization of própolis-tolerant ruminal bacteria. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 39, n. 9, p.2048-2054, 2010b.

REGULAMENTO COMUNIDADE EUROPÉIA Nº1831/2003 do parlamento Europeu e do Conselho de 22 de setembro de 2003, relativo aos aditivos destinados à alimentação animal. **Jornal Oficial da União Européia L 268/29**, 18.10.2003.

RÍSPOLI, T.B.; RODRIGUES, I.L.; MARTINS-NETO, R.G.; KAZAMA, R.; PRADO, O.P.P.; ZEOULA, L.M.; ARCURI, P.B. Protozoários ciliados do rúmen de bovinos e bubalinos alimentados com dietas suplementadas com monensina ou própolis. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 44, n. 1, p. 92-97, 2009.

RODRIGUES, P.H.M.; PEIXOTO JÚNIOR, K.C.; MORGULLIS, S.C.F.; SILVA, E.J.A.; MEYER, P.M.; PIRES, A.V. Avaliação da monensina administrada pela forma convencional ou por dispositivo de liberação lenta (bólus) em bovinos alimentados com forragens de baixo valor nutritivo e suplementados ou não com uréia. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 36, n. 6, p. 1937-1944, 2007.

ROGERS, M.; JOUANY, J.P.; THIVEND, P.; FONTENOT, J.P. The effects of short-term and long-term monensin supplementation, and its subsequent withdrawal on digestion in sheep. **Animal Feed Science and Technology**, v. 65, n.1, p. 113-127, 1997.

RUSSELL, J.B. A proposed mechanism of monensin action in inhibiting ruminal bacterial growth: Effects on ion flux and protonmotive force. **Journal of Animal Science**, v. 64, n. 5, p. 1519-1525, 1987.

RUSSELL, J.B.; DOMBROWSKI, D.B. Effect of pH on the efficiency of growth by culteres of rumen bacteria in continous culture. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 39, n. 3, p. 604, 1980.

RUSSELL, J. B.; HINO, T. Regulation of lactate production in *Streptococcus bovis*: A spiraling effect that contributes to rumen acidosis. **Journal of Dairy Science**, v. 68, n. 7, p. 1712–1721, 1985.

RUSSELL, J.B.; HOULIHAN, A.J. Ionophore resistance of ruminal bacteria and its potential impact on human health. **FEMS Microbiology Reviees**, v. 27, n. 1, p. 65-74, 2003.

RUSSELL, J. B.; MANTOVANI, H. C. The bacteriocins of ruminal bacteria and their potential as an aiternative to antibiotics. **Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology**, v. 4, n. 4, p. 347-55, 2002.

RUSSELL, J.B.; STROBEL, H.J. Mini review. Effect of ionofores on ruminal fermentation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 55, n. 1, p. 1-6, 1989.

RUSSELL, J.B.; WALLACE, R.J. Energy-yielding and energyconsuming reactions. In: HOBSON, P.N.; STEWART, C.S. **The rumen microbial ecosystem**. 2.ed. London: Blackie Academic & Professional, 1997. p. 267-268.

SARCINELLI, M.F.; VENTURINI, K.S.; SILVA, L.C. Produção de Bovinos – Tipo Carne. **Boletim Técnico - PIE-UFES:00307**. Espírito Santo: Universidade Federal do Espírito Santo. 2007. 8p. Disponível em: www.agais.com/telomc/b00307_carne_bovinodecorte.pdf. Acesso em: 05.10.2010.

SEGABINAZZI, L.R. **Aditivo a base de extratos vegetais como alternativa à monensina sódica na dieta de vacas de corte terminadas em confinamento**. 2008. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2008.

SIQUEIRA, I.C.V.; D'AGOSTO, M. Comportamento e perfil de comunidade de protozoários ciliados no rúmen de bovinos. **Revista Brasileira de Zootecias**, v. 5, n. 2, p. 225-242, 2003.

SLYTER, L.L. Influence of acidosis on rumen function. **Journal of Animal Science**, v. 43, n. 4, p. 910-929, 1976.

STRADIOTTI JÚNIOR, D.; QUEIRÓZ, A.C.; LANA, R.P.; PACHECO, C.G.; EIFERT, E. C.; NUNES, P.M.M. Ação da própolis sobre a desaminação de aminoácidos e a fermentação ruminal. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 33, n. 4, p. 1086-1092, 2004a.

STRADIOTTI JÚNIOR, D.; QUEIRÓZ, A.C.; LANA, R. P.; PACHECO, C. G.; AMARDELLI, M.M.L.; DETMANN, E.; EIFERT, E.C.; NUNES, P.P.M.; OLIVEIRA, M. V.M. 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, 2004b.

TAKAISI-KIKUNI N.B., SCHILDER H. Electron microscopic and microcalorimetric investigations of the possible mechanism of the antibacterial action of a defined própolis provenance. **Planta Medicine**, v.60, n.2, p.222-227, 1994.

VALINOTE, A.C.; NOGUEIRA FILHO, J.C.M.; LEME, P.R.; SILVA, L.S.; CUNHA, J.A. Fontes de lipídeos e monensina na alimentação de novilhos e sua relação com a população de protozoários ciliados do rúmen. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 34, n. 4, p. 1418-1423, 2005.

VARGAS, A.C.; LOGUERCIO, A.P.; WITT, M.M.C.; SILVA, M.S.; VIANA, L.R. Atividade antimicrobiana “*in vitro*” de extrato alcoólico de própolis. **Ciência Rural**, v. 34, n. 1, p. 159-163, 2004.

WILLIAMS, A.G., COLEMAN, G.S. **The rumen protozoa**. 1. ed. New York Inc: Springer-Verlag., 1992.

WILLIAMS, A.G.; COLEMAN, G.S. The rumen protozoa. In: HOBSON, P.N.; STEWART, C.S. 2.ed. **The rúmen microbial ecosystem**. London: Blackie Academic & Professional, 1997. p.73-139.

YAGHOUBI, S.M.J.; GHORBANI, G.R.; RAHMANI, H.R.; NIKKHAH, A. Flavonoids Manipulation of Rumen Fermentation: An Alternative for Monensin? **Agricultural Segment**, v. 1, n. 1, p. 1508-1515, 2010.

ZANINE, A.M.; OLIVEIRA, J.S.; SANTOS, E.M. Importância, uso, mecanismo de ação e retorno econômico dos ionóforos na nutrição de Ruminantes. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, v. 3, n. 6, p. 1-6, 2006. Disponível em: <http://www.revista.inf.br/veterinaria/>. Acesso em: 16 de maio de 2009.

ZEOULA, L.M.; BELESE, J.R.F.; GERON, L.J.V.; MAEDA, E.M.; PRADO, I.N.; PAULA, M.C. Digestibilidade parcial e total de rações com a inclusão de ionóforo ou probiótico para bubalinos e bovinos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 37, n. 3, p. 563-571, 2008.