**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Própolis vermelha como aditivo para bezerros leiteiros em
aleitamento: efeitos no desempenho, metabolismo e saúde**

Giovana Simão Slanzon

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestra em Ciências. Área de concentração: Ciência
Animal e Pastagens

**Piracicaba
2018**

Giovana Simão Slanzon
Engenheira Agrônoma

**Própolis vermelha como aditivo para bezerros leiteiros em aleitamento:
efeitos no desempenho, metabolismo e saúde**

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientadora:
Profa. Dra. **CARLA MARIS MACHADO BITTAR**

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestra em Ciências. Área de concentração: Ciência
Animal e Pastagens

Piracicaba
2018

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA – DIBD/ESALQ/USP**

Slanzon, Giovana Simão

Própolis vermelha como aditivo para bezerros leiteiros em aleitamento: efeitos no desempenho, metabolismo e saúde / Giovana Simão Slanzon. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2018.
83 p.

Dissertação (Mestrado) - - USP / Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. Hemograma 2. Diarreia 3. Imunidade 4. Ganho de peso I. Título

Aos meus avós, Antônio, Maria Neusa, César e Aparecida
Dedico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus e a Nossa Senhora por sempre estarem presentes na minha vida.

Agradeço à minha família, especialmente aos meus pais, Angélica e Fernando, pelo esforço, educação e suporte para que as portas do conhecimento se abrissem para mim.

Agradeço ao meu companheiro de vida, Gustavo Henrique, por sempre me lembrar de viver a vida com leveza e alegria.

Agradeço à minha tão querida orientadora Carla. Nunca vou conseguir colocar em palavras o quanto sou grata pelo meu caminho ter se cruzado com o seu.

Agradeço a todos os membros do grupo de Pesquisa em Metabolismo Animal, da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. Marcos, Marina, Ana Paula, Milaine, Gercino, Aryani, Ana Paula Araújo, Andrea. E também aos estagiários do grupo, Amanda, Graziela, Juliana, Rafaela, Samyra e Vitor. Sem vocês esse trabalho não seria possível.

Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

Agradeço à Universidade de São Paulo pela minha formação como Engenheira Agrônoma e agora pela oportunidade de cursar o programa de mestrado em Ciência Animal e Pastagens.

Agradeço as pessoas que me antecederam no Grupo de Pesquisa em Metabolismo Animal e que contribuíram muito para a minha formação. Jackeline, Flávia, Marília, Natalia, Evangelina, Thais, Marcelo, Glauber e Eduardo. Vocês me inspiraram a percorrer esse caminho.

Agradeço à Idalina, que com tanto carinho e atenção cuida de nós e do bezerreiro experimental Evilásio de Camargo.

A todos que de alguma forma contribuíram com esse trabalho, agradeço de coração.

Sumário

RESUMO	7
ABSTRACT	8
1 INTRODUÇÃO	9
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	11
2.1 Desafios sanitários da criação de bezerras leiteiras	11
2.2 Resistência aos Antibióticos e Segurança Alimentar	13
2.3 Caracterização da Própolis	16
2.4 A Própolis como um aditivo natural	18
2.5 Composição Química da Própolis Vermelha	22
2.6 Propriedades Biológicas da Própolis	24
3 MATERIAL E MÉTODOS	29
3.1 Local, animais e manejo alimentar	29
3.2 Preparação do extrato de própolis	31
3.3 Análise do Extrato Alcoólico de Própolis	32
3.4 Composição da própolis	33
3.5 Análise Bromatológica dos Alimentos	33
3.6 Desempenho e Desenvolvimento Corporal	35
3.7. Escore fecal	35
3.8 Ocorrência de doenças	36
3.9 Análises sanguíneas	37
3.10 Hemograma	38
3.11 Transferência de imunidade passiva	39
3.12 Análise estatística	40
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
4.1 Consumo e desempenho	43
4.2 Escore fecal e ocorrência de doenças	49
4.3 Parâmetros sanguíneos	57
5 CONCLUSÕES	69
REFERÊNCIAS	70

RESUMO

Própolis vermelha como aditivo para bezerros leiteiros em aleitamento: efeitos no desempenho, metabolismo e saúde

A própolis é um produto natural elaborado pelas abelhas e vendido comercialmente, muito conhecida pela sua capacidade antimicrobiana, antioxidante e anti-inflamatória. Esse trabalho teve como objetivo caracterizar a influência da própolis vermelha no desempenho, metabolismo e ocorrência de doenças em bezerros leiteiros suplementados diariamente. Foram utilizados 32 bezerros recém-nascidos colostrados e alojados individualmente com acesso a água e concentrado inicial. Os animais foram colocados em blocos de acordo com o peso ao nascer, data de nascimento e sexo, distribuídos em dois tratamentos: 1) Controle e 2) Suplementação diária de 4mL/dia de extrato alcoólico de própolis (30%) no leite integral. O consumo de alimentos e o escore de saúde e fecal foram monitorados diariamente, já as pesagens foram realizadas semanalmente. Amostras de sangue foram colhidas semanalmente, duas horas após o aleitamento da manhã, para realização de hemograma, determinação de hematócrito e das concentrações de glicose, proteína total, β -hidroxibutirato, lactato, ureia, além da capacidade de ligação de ferro. O tratamento não apresentou efeito para os dados de consumo, ganho de peso e desempenho ($P>0,05$). No entanto, os animais suplementados com própolis vermelha apresentaram significativa redução no escore fecal e no número de dias com diarreia ($P<0,05$). Para os parâmetros sanguíneos, apenas a contagem de eritrócitos totais sofreu efeito do tratamento, apresentando redução em sua concentração nos animais suplementados ($P<0,05$). O extrato de própolis vermelha brasileira tem grande potencial como alternativa natural para diminuir a incidência de diarreia em bezerros leiteiros, reduzindo a utilização de antibióticos nos sistemas de criação de bezerras.

Palavras-chave: Hemograma; Diarreia; Imunidade; Ganho de peso.

ABSTRACT

Red propolis as an additive for preweaned dairy calves: effects on performance, metabolism and health

This study aimed to characterize the influence of propolis or bee glue in the performance, metabolism and diseases of dairy calves. Propolis is a natural product collect by bees and sold commercially, well know for its antibacterial, antioxidant and anti inflammatory effects and the ability to improve the immunity system, both for humans and for animals. For ruminants, there are many positive effects that can contribute positively to animal productivity. Thirty two newborn calves were individually housed, with free access to water and concentrate, and fed 6 L/day of whole milk. The animals were blocked according to their birth weight, birth date and sex, distributed in two treatments: 1) Control and 2) Daily supplementation of 4mL / day of red propolis alcoholic extract (30%) in milk. Food consumption, fecal score and health score of bronchopneumonia were monitored daily, and the weight of the calves were measured every week. Samples of blood were collected weekly, two hours after morning milk feeding, for hemogram and hematocrit determination. Determination of blood glucose, protein, β -hydroxybutyrate, lactate, urea and iron binding capacity have also been done to evaluate effects on metabolism and oxidative stress. Starter feed intake, daily weight gain and body measurements were not affected by the red propolis supplementation ($P>0.05$). Blood parameters were also not affected ($P>0.05$), exception made for the red blood count, which were lower in animals supplemented with ethanolic red propolis extract ($P<0.05$). Fecal score and days with diarrhea were significantly affected by the treatment ($P<0.05$). Fecal score and days with diarrhea were inferior in animals supplemented with red propolis extract. Propolis has a big potential as a natural alternative to improve calves health, reducing the incidence of diarrhea and as a consequence, the use of antibiotics in calf rearing systems.

Keywords: Hemogram; Diarrhea; Immunity; Weight gain.

1 INTRODUÇÃO

A procura por alimentos que não coloquem em risco a saúde pública ou humana tem crescido rapidamente nos últimos anos, como reflexo da preocupação do consumidor com alimentos produzidos em sistemas intensivos (GALDINO, 2012). O fator primordial que faz com que as pessoas paguem mais caro por alimentos livres de contaminantes e resíduos químicos é o fator relacionado a saúde humana (WILLIAMS, 2002). Em contrapartida, a pressão econômica força os produtores de leite a melhorarem sua produtividade, o que os leva a práticas cada vez mais intensivas (GONZALEZ-MEJIA et al., 2018). A utilização de meios para aumentar a produtividade pode levar a mudanças na composição final do produto. Stergiadis et al. (2012) observaram que a concentração de vários componentes nutricionais desejáveis presentes no leite diminuíram com a intensificação da produção. Dessa forma, a economia globalizada desafia os produtores a se tornarem empreendedores rurais eficientes e competitivos, que busquem por ganho de produtividade, redução dos custos e ao mesmo tempo a melhoria na qualidade final do leite (ALMEIDA E YAMAGUCHI, 1999).

No desafio de produzir alimentos em grande escala, os antibióticos são ferramentas utilizadas por muitos produtores no manejo do rebanho, especialmente durante a fase de criação dos animais jovens (QUIGLEY et al., 1977). Bezerros leiteiros estão expostos a diversos patógenos causadores de doenças e se o seu sistema imune não estiver suficientemente fortalecido, a incidência de doenças pode ser elevada. Como os distúrbios metabólicos afetam diretamente o desempenho dos animais, muitos produtores utilizam os antibióticos como instrumentos para curar enfermidades de forma exacerbada e sem observar os sinais dos animais. Afinal, saúde não é apenas a ausência de doença e sim a habilidade de resistir a contaminações, entradas de parasitas e distúrbios metabólicos (SOARES et al., 2011). O tratamento veterinário deve ser considerado sempre um complemento e nunca um substituto as boas práticas de manejo. O domínio de terapias e tratamentos alternativos é um dos principais fatores de sucesso para o produtor de leite (WELLER, 1998). Deve-se sempre priorizar a prevenção e quando houver algum distúrbio com necessidade de intervenção, procurar as possíveis causas e não somente combater os sintomas (SOARES et al., 2011).

A própolis tem sido apontada para o tratamento de inúmeras enfermidades, tanto na medicina humana como na veterinária, tendo apresentado efeitos positivos sobre a saúde do animal (MELLO-PEIXOTO et al., 2009). Em função de suas propriedades antimicrobianas, anti-inflamatória, antioxidante, antiviral e imunomodulatória (LUSTOSA et al., 2008), a própolis apresenta um alto potencial para ser utilizada em grande escala nos sistemas produtivos para a prevenção e tratamento de doenças características da fase de desenvolvimento dos bezerros. A própolis vermelha foi recentemente encontrada no Brasil com alta ação biológica (BISPO JUNIOR et al., 2012). Suas propriedades apresentam alta atividade sobre diversos gêneros de bactérias, especialmente sobre as gram-positivas (PINTO et al., 2001).

Para que a atividade leiteira seja economicamente rentável é de extrema importância o bom crescimento das bezerras, associado a baixas taxas de morbidade e mortalidade. Uma vez que os custos com mortalidade e enfermidades representam grande parcela dos custos totais, a eficiência depende do manejo nutricional e de instalações, mas principalmente da saúde dos bezerros (DAVIS; DRACKLEY, 1998). Levantamentos mostram que a principal causa de mortalidade de bezerros nos Estados Unidos ocorre devido distúrbios gastrointestinais, como a diarreia (USDA, 2007). Resultante dessas complicações, os produtores aumentam cada vez mais a inclusão de aditivos que tenham efeito no controle de diarreias, já que essa representa a principal moléstia que acomete os bezerros nas primeiras semanas de vida causando baixos índices de desempenho animal (SOARES, 2013). O uso de antibióticos pode apresentar vantagens no desempenho dos animais, de forma que seu uso começou a ser feito de forma exacerbada, com dosagens altas, acarretando consequências negativas, como por exemplo, a resistência a antibióticos, que se tornou uma preocupação para a saúde pública (HEINRICHS et al., 2003).

Na busca por métodos naturais com ações profiláticas, a utilização da própolis na alimentação de bezerros pode apresentar resultados positivos. Esse trabalho tem como objetivo avaliar o efeito do extrato alcoólico da própolis vermelha no desempenho, metabolismo e ocorrência de doenças em bezerros leiteiros.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Desafios sanitários da criação de bezerras leiteiras

Para a propriedade leiteira apresentar sucesso é necessário que todos os fatores inseridos dentro desse sistema produtivo sejam manejados de maneira eficiente e uma dessas práticas é o bom crescimento das bezerras. Esse sucesso depende de diversos fatores, entre eles, a nutrição, o ambiente e a saúde dos bezerros (DAVIS; DRACKLEY, 1998). A criação de animais jovens tem grande impacto econômico na propriedade, já que o manejo aplicado durante essa fase, assim como o histórico de saúde dos animais, afeta diretamente a vida produtiva futura desses animais (TOZER; HEINRICHS, 2001).

Uma vez que os ruminantes não realizam a transferência de imunoglobulinas para o feto durante a gestação, devido ao tipo de placenta sindesmocorial, os recém-nascidos devem ingerir colostro para adquirir imunidade passiva, garantindo a defesa do seu organismo até que seu próprio sistema imune esteja maduro (TIZARD, 1998). O colostro, primeira secreção láctea após a ordenha da vaca após o parto contém diversas imunoglobulinas, mas a IgG é a principal imunoglobulina presente no colostro, representando cerca de 85% das imunoglobulinas totais (BUTLER, 1983). Existem quatro fatores principais para realizar a transferência de imunidade passiva com sucesso: fornecer um colostro com quantidades adequadas de imunoglobulinas (>50 mg/mL de IgG), fornecer o volume adequado, durante as primeiras horas de vida e minimizar a contaminação bacteriana presente no colostro (WEAVER et al., 2000; JHONSON et al., 2007; GODDEN, 2008). O intestino do bezerro permite a absorção de moléculas grandes, incluindo a imunoglobulinas, temporariamente durante as primeiras horas de vida (BEAM et al., 2009).

Quando um desses fatores não são atendidos, ocorre falha na transferência de imunidade passiva (FTIP). A FTIP está diretamente relacionada aos altos índices de mortalidade, morbidade e menor produtividade futura. A avaliação de transferência de imunidade passiva pode ser realizada através de diferentes ferramentas, no entanto, todas procuram avaliar a concentração de IgG circulante na corrente sanguínea dos bezerros. Como a imunoglobulina G, proveniente do colostro, tem influência sobre a concentração da proteína séria, a determinação da proteína total é um método indireto

para estimar a concentração de IgG no soro sanguíneo de bezerros (FEITOSA et al., 2001; PAULETTI et al., 2002).

As falhas durante o processo de transferência de imunidade passiva contribuem para a alta incidência de diarreias nos animais, sendo ela responsável pela morte de 52% de bezerros na fase de aleitamento (QUIGLEY et. al., 1994). A diarreia pode ser um distúrbio relacionado a um fator isolado ou influenciada por diversos motivos, como por exemplo: o ambiente, manejo incorreto, nutrição não adequada ou a baixa capacidade do sistema imunológico em combater agentes patológicos (BENESI, 1999). Esse aspecto faz dessa enfermidade, na maioria das vezes, uma patologia multifatorial devido aos diversos desafios que os animais jovens enfrentam.

Os fatores não infecciosos relacionados a ocorrência de diarreia em bezerros leiteiros podem ser melhores definidos como falhas no manejo. Uma das causas de diarreia não infecciosa está relacionada com a nutrição não adequada da vaca durante o período de pré parto, já que, tanto a quantidade como a qualidade do colostro, são afetadas negativamente quando as exigências de energia e proteína das vacas não são atendidas (STOLTENOW, VINCENT, 2003). A dieta oferecida para os bezerros também pode ocasionar distúrbios metabólicos. O fornecimento de leite descarte, ração com ingredientes não apropriados, dieta formulada erroneamente e substitutos de leite de baixa qualidade ou com erros de diluição, podem ocasionar diarreia. Outros fatores associados a ocorrência de diarreia em bezerros leiteiros são: temperaturas muito elevadas, chuva, corrente de ar fria, umidade, instalações não adequadas, falta de higiene, alta densidade animal e lotes contaminados, pois podem aumentar a exposição dos animais agentes infecciosos.

Quando o animal está imunodeficiente, microrganismos presentes no meio ambiente agem de maneira oportunista provocando distúrbios metabólicos e sinais clínicos. Os principais patógenos causadores da diarreia de etiologia infecciosa são as bactérias (*Escherichia coli* e *Salmonella*), vírus e os protozoários (*Cryptosporidium*) (DAVIS, DRACKLEY, 1998). O animal com diarreia pode apresentar fezes de diferentes colorações dependendo da quantidade de muco ou coágulos de sangue. Devido à perda de água pela diarreia, outros sintomas são os olhos fundos, desidratação e fraqueza, podendo até apresentar temperatura corporal alta dependendo da causa da doença. As diarreias não infecciosas podem ser causadas por dietas inadequadas, práticas incorretas no manejo ou falta de higiene. Segundo

Stoltenow e Vincent (2003) outros fatores que influenciam a ocorrência de diarreias não infecciosas nos rebanhos de animais jovens é a exposição dos animais a ambientes inadequados e a incapacidade do tratador em manejar animais recém-nascidos.

Em países tropicais, como o Brasil, a época do ano exerce grande influência no desempenho dos bezerros leiteiros, já que no verão os bezerros acometidos por diarreia passam por uma desidratação mais severa (SANTOS, 2013). As consequências da diarreia, como a acidose e a desidratação agravam o quadro e podem levar o animal a morte (LEAL et al., 2008), trazendo grandes prejuízos econômicos a propriedade. Doenças como pneumonia e a diarreia representam prejuízos diretos com medicamentos e taxas de mortalidade, refletindo diretamente na vida adulta do animal em relação a sua futura produção. Em um estudo realizado por Heinrichs e Heinrichs (2011) foi observado que a incidência de doenças durante os quatro primeiros meses de vida de bezerros leiteiros, assim como a frequência de tratamentos com antibióticos realizados para tais distúrbios, afetou negativamente a produção durante a primeira lactação.

Funções específicas do sistema imunológico são responsáveis por exercerem ações de defesa. O sistema gastrointestinal, apesar de sua principal função ser digerir e absorver nutrientes, também é responsável por evitar que agentes patogênicos sejam incorporados no organismo (KREHBIEL et al., 2003). Quando microrganismos infecciosos ameaçam a saúde do animal, o sistema imunológico é ativado e através de seus anticorpos (imunoglobulinas) e diversas células (linfócitos, neutrófilos, eosinófilos, monócitos e macrófagos), que combatem os patógenos para evitar infecções e preservar a saúde do hospedeiro (MACHADO et al., 2004). A ativação do sistema imune e a prevenção de doenças através de mecanismos naturais, deve ser cada vez mais utilizada pelos produtores que buscam bons resultados no desempenho de seus animais.

2.2 Resistência aos Antibióticos e Segurança Alimentar

Os antibióticos são amplamente utilizados nos sistemas de criação animal para prevenir doenças e distúrbios metabólicos, assim como para melhorar a eficiência alimentar. No entanto, a preocupação pública sobre a rotina de utilização desses medicamentos na produção animal é crescente devido o aparecimento de bactérias

resistentes aos antibióticos que ameaçam a saúde humana, se fazendo necessário encontrar novas alternativas aos antibióticos (BENCHAAAR et al., 2008). Em muitas partes do mundo industrializado os antibióticos são vistos como “ferramentas” que auxiliam a criação de bezerros durante a fase de aleitamento (QUIGLEY et al., 1997), mas essa prática pode trazer inúmeros prejuízos para a saúde humana, animal e para o ambiente. Na criação de bezerras em sistemas intensivos os animais jovens são repostos de forma contínua e esse padrão de criação acaba estabelecendo uma alta pressão infecciosa sobre os bezerros. Esta prática faz com que a utilização de antibióticos seja considerada essencial para diminuir a morbidade e mortalidade de bezerros em decorrência de doenças como diarreia, septicemia e doenças respiratórias (CONSTABLE, 2003).

Em contrapartida, os autores Waltner-Toews et al (1986) constataram que bezerras que foram tratadas para pneumonia durante os primeiros três meses de vida, apresentaram 2,5 vezes mais propensão a morrer após noventa dias, em comparação com as bezerras que não foram tratadas. Bezerras com histórico de saúde em que receberam tratamento para diarreia, tiveram 2,5 vezes mais propensão de serem vendidas por motivos produtivos do que as bezerras não tratadas. Outro fator encontrado pelos autores relacionando saúde e produção foi que animais que foram tratadas para diarreia apresentaram 2,9 vezes mais chances de parir depois de 900 dias (30 meses) de idade do que outras bezerras. A ocorrência de doenças durante a fase de criação acarreta sérias consequências em longo prazo. A utilização de medicamentos não é totalmente eficiente, já que as consequências futuras afetam a saúde dos animais e o rendimento econômico do produtor.

Walker et al. (2012) realizaram um estudo para caracterizar a morbidade, mortalidade e o uso de antibióticos nos sistemas de criação de bezerros nos Estados Unidos. Através de um questionário, os autores identificaram que 18% dos animais tiveram diarreia e 73% desses animais foram tratados com antibióticos, 9% dos bezerros apresentaram doenças respiratórias e 82% receberam tratamento com antibiótico. No entanto, apenas dois terços das propriedades entrevistadas (65%) apresentavam protocolos de tratamento para as doenças. Os autores também observaram que 50% dos bezerros tratados para diarreia receberam mais de um tipo de antibiótico. Cinquenta e quatro por cento dos produtores entrevistados reportaram

utilizar antibióticos para prevenir e não somente para curar diarreia e doenças respiratórias.

Ainda faltam dados para entender como é a tomada de decisão do produtor brasileiro em relação ao uso de antibióticos, mas já é conhecido que seu uso é realizado, na maioria das vezes, de forma indiscriminada, sem respeitar as indicações de cada medicamento e sem o auxílio de um médico veterinário. Segundo Berge et al. (2009), a utilização de antimicrobianos sem a presença dos sinais clínicos podem levar à uma potencial diarreia associada ao uso de antibióticos, afetando o ganho de peso dos animais e o aumentando os custos nos sistemas de criação. Se os antibióticos fossem usados apenas para casos de diarreia em que os animais apresentassem febre, inapetência ou depressão, dez dólares seriam economizados por bezerro (BERGE et al., 2009).

Outro fator relevante que ameaça a segurança alimentar, é o fornecimento de leite descarte. Santos e Bittar (2015) identificaram que o leite descarte é a segunda dieta mais utilizada pelas propriedades brasileiras. Aproximadamente 35% dos 179 produtores entrevistados utilizam o leite descarte como a principal dieta líquida, pois entendem que é vantajoso para o sistema produtivo. No entanto, o fornecimento de leite descarte com resíduo de antibiótico proveniente de vacas em tratamento, promove maior resistência bacteriana e aumenta a ocorrência de diarreia devido à alta carga bacteriana presente no leite descarte. Muito embora a inclusão de antibióticos na dieta de bezerros leiteiros seja proibida no Brasil, o seu uso descontrolado ainda é empregado para o tratamento de doenças na maior parte das propriedades leiteiras.

Os autores Wierup et al. (1975) investigaram a incidência de resistência da bactéria *E. coli*, isolada de fezes de bezerros, à antibióticos. A bactéria *Escherichia coli* proveniente de bezerros, cujo o antibiótico era fornecido junto com o alimento, desenvolveu resistência não só apenas ao antibiótico fornecido, como também a outros tipos de antibióticos. Os autores Hinton et al. (1984) também constataram que bactérias *E. coli* provenientes de animais alimentados por substitutos de leite com antibiótico em sua composição, apresentaram múltiplas resistências a diversos antibióticos, tanto no período de aleitamento como também na fase seguinte ao desaleitamento. A utilização de antibióticos na produção animal seleciona bactérias resistentes aos antibióticos utilizados para a saúde humana, o dano real parece

pequeno, mas ao longo dos anos poderá trazer desvantagens tanto para a saúde humana como animal (PHILLIPS et al. 2004).

À introdução de medidas preventivas contra doenças em rebanhos leiteiros faz com que a produção caminhe para um rumo mais sustentável, dependendo cada vez menos de insumos, como os medicamentos antibióticos utilizados atualmente em grande escala. No entanto, o avanço na produção leiteira deve estar sempre vinculado à higiene e à segurança alimentar, já que a presença de resíduos químicos ameaça à saúde pública (GALDINO et al., 2012). Substâncias de plantas tóxicas, resíduos de pesticidas, herbicidas, antimicrobianos ou a contaminação por microrganismos são ameaças à segurança do leite (LIENER, 2002). Os resíduos antimicrobianos no leite podem ocasionar alergias graves e ter um efeito adverso para com a saúde humana, além de promover a resistência dos microrganismos (DENOBILO, 2002). Para manter a efetividade dos fármacos é necessário utilizá-los de forma selecionada e avaliada por um profissional, já que a resistência bacteriana se tornou uma das maiores preocupações modernas da área médica que envolve a área veterinária e a produção animal (GALDINO et al., 2012). Segundo Tikosfsky et al. (2003), se a utilização de antimicrobianos é a principal responsável pela pressão seletiva que promove o desenvolvimento da resistência, então reduzir sua utilização nos sistemas produtivos irá consequentemente diminuir a resistência.

2.3 Caracterização da Própolis

A própolis é uma substância utilizada desde a antiguidade, principalmente no Egito (LOFTY, 2006). Também foi muito empregada na Grécia, como demonstrado pela origem de seu nome, devido sua eficiência em curar feridas (MAKASHVILI, 1978). Obteve o reconhecimento de suas propriedades medicinais por médicos gregos e romanos e ainda é um dos agentes terapêuticos mais antigos utilizados nos dias de hoje (HASHEMI, 2016). Mas foi apenas na década de 80 em que o interesse pela própolis surgiu no Brasil, através do trabalho do imigrante alemão Ulrich Breyer e seu livro “Abelhas e saúde”, onde são demonstradas as propriedades terapêuticas da própolis e sua utilização como antibiótico natural (LIMA, 2006).

Formada por uma mistura complexa, constituída por material resinoso e balsâmico, as abelhas utilizam materiais resultantes de diversos processos botânicos de

diferentes partes das plantas para produzir a própolis (LUSTOSA et al., 2008). Além desses compostos, as abelhas na colmeia adicionam secreções salivares e enzimas (PEREIRA et al., 2002). A palavra própolis é originária do grego pro: em defesa, e polis: comunidade, ou seja, em defesa da comunidade (PEREIRA et al., 2002). É utilizada pelas abelhas para reparar favos de mel, fechar pequenas frestas, embalsamar insetos mortos e proteger a colmeia da invasão de microrganismos (GHISALBERTI, 1979). A composição da própolis é determinada pela distribuição da biodiversidade ao redor da colmeia (KUMAZAWA et al., 2004). Segundo BANKOVA (2005), se compararmos amostras de própolis de diferentes localidades, seria como se estivéssemos comparando plantas que pertencem a diferentes famílias, devido sua variabilidade química e consequentemente a divergência das propriedades farmacológicas entre as amostras.

Sua composição também pode variar de acordo com a época do ano em uma mesma região (SFORCIN et al., 2000). Os fatores que determinam a preferência das abelhas por determinadas plantas ainda não foram descobertos, mas é conhecido que elas selecionam as suas fontes vegetais (SALATINO et al., 2005). Os autores Sahinler e Kaftanoglu (2005) acreditam que essa seleção esteja relacionada a atividade antimicrobiana da resina, já que para as abelhas, a própolis é utilizada como um antisséptico, protegendo a colmeia. Dessa forma, as substâncias presentes na própolis estão diretamente relacionadas com a composição química da resina da planta de origem (CASTRO et al., 2007). De modo geral, a composição da própolis bruta contém 50 - 60% de resinas e bálsamos, 30 - 40% de ceras, 5 - 10% de óleos essenciais, 5% de grão de pólen, além de microelementos e pequenas quantidades de vitaminas (GHISALBERTI, 1979; PARK et al., 2002.)

Alguns elementos estão presentes em todas as amostras de própolis, já outros componentes são característicos apenas de determinadas própolis derivadas de espécies vegetais particulares de uma região (VARGAS et al., 2004). Foram observadas diferenças significativas na composição química das própolis tropicais, especialmente a própolis brasileira, em relação à própolis oriundas de regiões da zona temperada (TRUSHEVA et al., 2006). Em regiões tropicais a amplitude farmacológica da própolis é maior do que em regiões temperadas, devido a maior variedade de espécies vegetais (BANKOVA, 2005). Por isso, a determinação geográfica e botânica do local é de grande importância para padronizar as amostras e realizar de forma

efetiva a aplicação terapêutica (ALENCAR et al., 2005). Outro componente que afeta a sua composição final é a espécie de abelhas responsáveis pela produção da própolis (KOO; PARK, 1997). Dessa forma, a atividade antibacteriana do extrato etanólico de própolis também será afetado de acordo com as abelhas melíferas da região (DAUGSCH, 2008). Os autores Silici e Kutluca (2005) compararam a própolis coletada por três espécies diferentes de abelhas melíferas de uma mesma região e encontraram diferenças na capacidade de ação antibacteriana.

Os principais compostos químicos presentes na própolis são: ácidos e ésteres alifáticos, ácidos e ésteres aromáticos, açúcares, álcoois, aldeídos, ácidos graxos, aminoácidos, esteroides, cetonas, charconas e di-hidrocharconas, flavonoides (flavonas, flavonóis e flavononas), terpenóides, proteínas, vitaminas B1, B2, B6, C, E, bem como vários minerais (MENEZES, 2005). Segundo Marcucci (1996) estão presentes também em sua constituição elementos inorgânicos como o cobre, manganês, ferro, cálcio, alumínio, vanádio e silício. Entre esses compostos, o de maior relevância para estudo é o grupo dos flavonoides (LIMA, 2006), que são compostos fenólicos que compreendem um extenso grupo de compostos naturais não sintetizados pelos animais (BEECHER, 2003). Diversas substâncias já foram classificadas como flavonoides, entre elas apigenina, quercetina, hesperetina, rutina, luteolina, genisteína, daidzeína, antocianidina, kanferol e entre outras (MENEZES, 2005). Aos flavonoides e também aos ácidos fenólicos, são atribuídos a potencial ação biológica da própolis (VOLPI; BERGONZINI, 2006). Portanto, a presença desses compostos e suas concentrações são indicadores utilizados para qualifica-la (LU et al., 2004). No entanto, suas diversas atividades farmacológicas podem também decorrer das interações entre seus vários compostos químicos (KROL et al., 1993)

2.4 A Própolis como um aditivo natural

Com a necessidade de amenizar os riscos sanitários e ambientais na produção de alimentos surge a necessidade de pesquisar substâncias que possam ser utilizadas com a mesma finalidade dos antibióticos, mas que não gere resistência dos microrganismos e resíduos no produto final. A procura por aditivos considerados alternativos tem como objetivo melhorar a eficiência alimentar, minimizando os riscos de contaminação e reduzir o uso de drogas antimicrobianas da dieta animal (SELEM, 2012). De maneira geral, o uso de aditivos com ação antimicrobiana tem o objetivo de

promover melhores índices produtivos e de conversão alimentar, agindo também na estabilização do ambiente ruminal e na proteção do sistema gastrointestinal contra agentes causados de doenças (FERNANDES et al., 2008).

A própolis se apresenta como um aditivo natural para controlar doenças e também atuar de forma preventiva nos animais, promovendo a imunidade. Estudos indicam que a atividade antibacteriana da própolis sobre as bactérias causadoras de infecções em animais de produção combate o agente causador da doença sem desenvolver resistência (MOT et al., 2014). Embora muitos de seus mecanismos de ação sejam desconhecidos, as investigações sobre as propriedades farmacológicas da própolis têm sido conduzidas sobretudo nas áreas médica e veterinária. Infelizmente, os dados sobre a utilização da própolis em longo prazo em ruminantes ainda são limitados, especialmente seu efeito sobre os parâmetros sanguíneos e bioquímicos (SELEM, 2012).

No trabalho realizado por Yucel et al. (2015) foi comprovado o efeito benéfico da tintura de própolis (2 mL/d) na prevenção de diarreia em bezerros, o que afetou consequentemente o desempenho dos animais de forma positiva. O experimento teve duração de 35 dias e a tintura de própolis foi fornecida diariamente a partir do primeiro dia de vida, através de uma seringa com uma pipeta em espiral, sempre após o aleitamento. Os autores não observaram nenhuma ocorrência de diarreia no grupo de bezerros suplementados com própolis e o escore fecal desses animais permaneceu abaixo de 2 durante todo o período experimental. Já os animais do grupo controle, apresentaram maior escore fecal durante a segunda e terceira semana de vida ($P < 0,05$). A suplementação reduziu a ocorrência de diarreias e aumentou o ganho de peso e desenvolvimento dos animais. Uma vez que a ocorrência de diarreia causada por bactérias é principal causa de perda de peso, atraso no desenvolvimento e até a morte de bezerros durante o período neonatal, seu controle melhora o desempenho. As vantagens de estudar substâncias com ação preventiva a essa enfermidade irão beneficiar não só a saúde dos animais, como também a produtividade leiteira, já que segundo Waltner-Toews, Martin e Meek (1986), bezerras que tiveram diarreia tem maiores chances de serem descartadas precocemente.

Estudos realizados por Peravian et. al. (2014) compararam o efeito da própolis solúvel com a ação da monensina em dietas de bezerras leiteiras. Os autores

observaram os efeitos positivos do aditivo biológico (própolis) em comparação com o aditivo sintético (monensina), através do maior consumo de matéria seca após o período de aleitamento. Dessa forma, os autores sugerem que a própolis pode melhorar o desempenho de bezerros leiteiros, já que a suplementação com monensina resultou nas menores taxas de consumo de matéria seca e peso corporal. Os autores também avaliaram o efeito da própolis em pó nos metabólitos plasmáticos e hematócrito das bezerras. O estudo comprovou que a suplementação com 1000 mg/L de própolis, dos 14 aos 65 dias, apresentou grande capacidade de melhorar as respostas imune das bezerras através de seus efeitos na concentração de IgG, em comparação com a monensina.

O estudo realizado por Yaghoubi et al. (2007) sugere que os flavonoides são os responsáveis por afetar diretamente a imunidade humoral dos bezerros, melhorando assim o seu crescimento e desenvolvimento dos animais de acordo com a idade. Plantas vasculares, que apresentam tecidos condutores especializados, como o xilema e o floema, sintetizam flavonoides durante seu desenvolvimento, os quais são acumulados nas células das plantas (HAVSTEEN, 2002). Evolutivamente, como a forragem foi a principal fonte de flavonoides na dieta dos bezerros, surge a dúvida se esse alimento desempenha ou não importante função durante o período de transição do bezerro recém-nascido para um ruminante funcional. A principal fonte de flavonoides na dieta de bezerros provém de forragens fresca, mas infelizmente pesquisas direcionadas para o fornecimento de forragem para animais jovens vem diminuindo ao longo dos anos, já que tem pouco efeito no processo de desenvolvimento ruminal. O fornecimento de forragem normalmente recebe destaque unicamente por ser fonte de fibra, estimulando a mastigação e a salivação, mas como os ruminantes foram criados desde o princípio com dietas ricas em forragens, possivelmente os flavonoides também apresentem grande importância como agentes para o estabelecimento microbiano e para a expansão epitelial do retículo-rúmen (YAGHOUBI et al., 2007).

Outra aplicação farmacológica da própolis foi observada pelo autor HEINZEN (2012), que avaliou a utilização do extrato alcoólico da própolis (EAP) a 30% no controle de helmintose em bezerros naturalmente infestados. Administraram-se por via oral direta 10 mL de EAP, a cada oito horas, por quatro dias consecutivos. Os autores verificaram redução média de 48,8% dos valores de OPG (contagem de ovos

por grama de fezes), em 83% dos animais. Dessa forma, a própolis se apresenta como uma ferramenta terapêutica complementar para o controle de helmintose em bovinos, especialmente importante para os sistemas de criação agroecológicos, orgânicos e biodinâmicos, onde o uso de parasiticidas químicos é um fator limitante para a produção e proibido pela certificação.

Durante o período de aleitamento, o animal jovem se torna um ruminante funcional e maior atenção deve ser dada aos processos de fermentação ruminal, os quais são responsáveis por tornar a produtividade mais eficiente. Os autores Stradiotti Jr et al. (2001) observaram que a própolis fornecida via dieta sólida possui capacidade farmacológica capaz de inibir o crescimento de microrganismos em ruminantes. Assim como os ionóforos, a própolis é eficaz em promover mudanças na fermentação ruminal através de propriedade bacteriostática sobre as bactérias gram positivas. Os autores demonstraram a capacidade da própolis em reduzir a produção de amônia pelos microrganismos ruminais através de resultados *in vitro* e também *in vivo*. A administração de inóforos tem como objetivo melhorar a eficiência energética e a produção de ácidos graxos voláteis através da inibição do crescimento de microrganismos específicos, dessa forma reduzir a produção de metano e consequentemente promover o aumento da eficiência energética alimentar pelos ruminantes (RUSSELL & STROBEL, 1989).

Em outro trabalho, os autores Stradiotti et al. (2004a) demonstraram que a própolis se mostrou eficiente em diminuir a produção de gases em estudos *in vitro*, já que a fermentação de carboidratos e proteínas está diretamente relacionada com a produção de AGVs no rúmen e é acompanhada pela produção de hidrogênio, que parte é utilizado para crescimento microbiano, mas em sua maioria é direcionado para a produção de metano pelas bactérias metanogênicas. Pouco se sabe ainda a respeito dos mecanismos de ação da própolis na manipulação da fermentação ruminal, mas segundo Mirzoeva et al. (1997) seus efeitos são similares aos observados para os inóforos, suas substâncias agem através da alteração da permeabilidade da membrana bacteriana alterando o fluxo de íons através da membrana. Assim, a própolis pode ser considerada como uma substância de caráter ionóforo, pois apresenta substâncias capazes de melhorar a eficiência do processo fermentativo diminuindo a produção de gases pelos microrganismos ruminais (STRADIOTTI et al., 2004a).

2.5 Composição Química da Própolis Vermelha

Até 2000 as própolis brasileiras foram classificadas em doze grupos principais de acordo com suas características físico-químicas, cinco delas da região sul, uma do sudeste e seis do nordeste brasileiro (PARK et al., 2000). Mais recentemente surgiu uma própolis de coloração avermelhada, então um novo grupo foi identificado e classificado como o grupo 13, o qual possui composição física e química diferente dos demais (AGUIAR et al., 2003). A própolis vermelha foi encontrada em colmeias localizadas na região costeira do nordeste brasileiro, especificamente no mangue de Alagoas e apresenta forte ação biológica (ALENCAR et al., 2007). Silva et al. (2008) monitoraram as abelhas da região do manguezal com o objetivo de observar seus comportamentos e preferências vegetativas, para determinar qual planta era visitada pelas abelhas para coletar a resina para a produção de própolis. Através da análise físico química da microflora da resina produzida na área de mangue, os autores concluíram que a origem botânica da própolis vermelha é a planta *Dalbergia ecastophyllum*, uma espécie de leguminosa rica em flavonoides (SILVA et al., 2008). Ao determinar a ação antibacteriana desse novo grupo de própolis, Bastos et al. (2008) observaram que o extrato obtido de regiões brasileiras possui maior ação biológica em comparação com os extratos norte-americanos. Os flavonoides estão entre os compostos mais ativos da resina presente na própolis vermelha, os quais agem através de diferentes processos fisiológicos e realizam diversas funções (RUFATTO et al., 2017). A própolis vermelha apresenta composição química diferente das demais e se destaca por ser rica em isoflavonoides. Os isoflavonoides são compostos que ocorrem quase que exclusivamente na família Leguminosae (PICCINELLI et al., 2005). A Tabela 2.5.1 apresenta um sumário dos compostos presentes na própolis vermelha e suas funções na planta de origem, assim como sua potencial ação em microrganismos e animais.

Tabela 2.5.1 – Ações dos compostos da própolis vermelha na planta e organismo.

	Compostos	Ação na planta	Ação no organismo	Referências
Flavonoides	Liquiritigenin, Daidzein, Dalbergin, Isoliquiritigenin, Formononetin, Biochanin A, Vestitol, Neovestitol, Homopterocarpina, Medicago e 4',7-dimethoxy-2'-isoflavonola.	Proteção da radiação UV, proteção contra microrganismos, ação antioxidante, inibição enzimática.	Antimicrobianas, antifúngicas, anticâncer, antioxidante, anti-inflamatória, estrogênica.	Alencar et al., 2007; Dausch et al., 2008; Donnelly et al., 1973; Frozza et al., 2013; Kole et al., 2011; Nani et al., 2017; Nijveldt et al., 2001; Rufer e Kulling, 2006.
Compostos Fenólicos	Elemicin, Trans-anetol e Methyl eugenol.	Defesa contra microrganismos patogênicos e contra a luz solar.	Anti-inflamatória e antioxidante.	Balasundram et al., 2006; Rufatto et al., 2017; Huang et al., 2010; Trusheva et al., 2006.
Terpenos	Éster do ácido oleico, Limoneno, α -cubebene e β -cariofileno.	Atrair insetos durante a polinização.	Analgésica, anti-inflamatória, antimicrobiana, antifúngica, antiviral e atividade antiparasitas.	Alencar et al., 2007; Nunes et al., 2019; Rufatto et al., 2017; Paduch et al., 2007.

2.6 Propriedades Biológicas da Própolis

Atividade antimicrobiana

As atividades antimicrobianas mais estudadas da própolis são suas atividades antibacteriana e antifúngica (KUJUMGIEV et al., 1999). Por ser um produto rico em flavonoides e outros compostos, sua potente atividade antimicrobiana permite classificá-la como um poderoso antibiótico natural (MIORIN et al., 2003). No entanto, a composição química da própolis e seus efeitos antimicrobianos divergem de acordo com a sazonalidade e suas condições geográficas (SFORCIN et al. 2001). Apesar de suas distintas composições, Popova et al. (2004) observaram que amostras de própolis da Europa apresentam capacidade antimicrobiana similar as amostras brasileiras. De maneira geral, os compostos responsáveis pela alta atividade antibacteriana são: pinocembrina, pinostrobin, galangina, os ácidos prenil p-cumárico, ferúlico, cafeico e diterpênico, que provavelmente agem através de um mecanismo de ação baseado na inibição do RNA-polimerase bacteriano (DASTIDAR et al., 2004; CAPASSO; CASTALDO, 2002; UZEL et al., 2005).

Elementos como os flavonoides, o ácido caféico, ácido benzóico, ácido cinâmico, possivelmente atuam na membrana ou parede celular dos microrganismos ocasionando danos funcionais e estruturais (SCAZZOCCHIO et al., 2005). Extratos de própolis comercializados no Brasil demonstram maior atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas, e menor atividade contra as bactérias Gram-negativas (REZENDE et al., 2006). Talvez essa menor atividade ocorra devido a presença de parede celular quimicamente mais complexa e maior teor lipídico, provocando maior resistência, nas bactérias gram-negativas (VARGAS et al., 2004). No entanto, os autores Uzel et al. (2005) identificam que os constituintes da própolis são ativos contra a bactéria Gram-negativa *Escherichia coli*, inibindo seu crescimento (UZEL et al., 2005). A própolis também apresentou atividade contra a bactéria Gram-negativa *Salmonella typhimurium* (ORSI et al., 2005). Ambas representam ameaças para a saúde animal no sistema produtivo leiteiro.

Os flavonoides encontrados em grandes quantidades na própolis são responsáveis também pela efetividade contra a infecção e replicação viral (DEBIAGGI et al., 1990). Amoros et al. (1992) demonstraram a atividade antiviral da própolis *in vitro*, através da

presença do composto 3-methyl-but-2-enyl caffeate que reduziu a concentração do vírus e a síntese de DNA viral eficientemente. A própolis também apresentou ação antiviral eficiente ao ter seu efeito analisado in vitro sobre a proliferação do vírus da gripe de aves, inibindo o crescimento destes vírus (KUJUMGIEV et al., 1999).

Anti-inflamatória

A inflamação é uma resposta fisiológica do organismo, a qual é ativada pela liberação de mediadores químicos pelo tecido injuriado. Os mediadores químicos são moléculas envolvidas na resposta inflamatória, responsáveis por modular os eventos fisiológicos desse processo. Entre eles estão as aminas vasoativas (histaminas e serotoninas), eicosanóides (metabólitos do ácido araquidônico, prostaglandinas e leucotrienos), fatores de agregação de plaquetas (PAF), citocinas (interleucina e TNF), quininas (bradiquinina), radicais livres de oxigênio, entre outros (OHISHI, 2000). As células inflamatórias que produzem essas substâncias são os leucócitos polimorfonucleares (neutrófilos, eosinófilos, basófilos), células endoteliais, mastócitos, macrófagos, monócitos e linfócitos (FIALA et al., 2002). O ácido araquidônico é armazenado na membrana celular e, ao ocorrer danos no tecido, esse ácido graxo é convertido em prostaglandinas através da ciclooxigenases, a qual é responsável por iniciar a inflamação. A própolis apresenta algumas substâncias que inibem a enzima ciclooxigenase e consequentemente a inflamação no tecido (SIGAL; RON, 1994). De acordo com Lustosa et al. (2008), a atividade anti-inflamatória observada na própolis ocorre devido a presença dos flavonoides. Esta atividade anti-inflamatória seria resultante da supressão da síntese de prostaglandinas e de leucotrienos pelos macrófagos (MENEZES, 2005).

Já se sabe que a resposta febril é parte integrante da reação inflamatória aguda, sendo mediada principalmente por uma citocina, a interleucina 1, de efeitos múltiplos sobre vários tecidos (VOLTARELLI, 1994). A elevação da temperatura corporal é uma resposta fisiológica do animal para sua defesa, auxiliando o animal hospedeiro de diversas maneiras (KLUGER, 1991). Altas temperaturas aumentam as respostas imunológicas do animal, potencializando sua imunidade inata por meio dos neutrófilos e fagócitos e também sua imunidade adaptativa, através da proliferação dos linfócitos e a produção de anticorpos (JHONSON, 2005). A febre também é responsável por tornar o ambiente menos favorável para os patógenos (JHONSON, 2005), já que

muitos patógenos apresentam temperaturas adequadas para seu crescimento (KLUGER et al., 1975).

O aumento na temperatura corporal é intencional e altamente controlado pelo organismo (JHONSON, 2005). As citocinas são um grupo de proteínas que representam papéis complexos na saúde e na doença, modulando as funções das células contidas dentro do sistema imune. A febre é causada por citocinas pró-inflamatórias que inibem a taxa de disparo dos neurônios sensíveis ao calor no hipotálamo (DINARELLO, 1987). Para os animais atingirem temperaturas febris é necessário que eles aumentem sua produção de calor assim como a conservação de calor, ambas simultaneamente (JHONSON, 2005). A cada °C de febre, a taxa metabólica aumenta em torno de 13% (KLUGER, 1991).

O ácido fenil éster caféico (CAPE), também presente na própolis, possui atividade contra a inflamação, inibindo a liberação do ácido araquidônico da membrana celular, suprimindo assim as atividades das enzimas COX-1 (associada a produção de prostaglandinas) e COX-2 (presente nos locais de inflamação) (BORELLI et al., 2002). A própolis inibe a síntese de prostaglandinas, ativa a glândula timo e auxilia o sistema imune através da indução da atividade fagocítica, estimulando a imunidade celular (KOSALEC et al., 2005). Os autores Krol et al. (1996) identificaram na própolis outros quinze compostos que apresentam também atividade anti-inflamatória, entre eles ácido salicílico, a apigenina, o ácido felúrico. Diversas doenças estão associadas aos processos fisiológicos inflamatórios e podem apresentar diferentes causas (MENEZES, 2005). Lozoya et al. (2002) observou em um estudo clínico que a administração de quercetina, um dos componentes presente na própolis, reduziu a dor abdominal em casos de diarreia aguda em humanos. Dessa forma, a utilização da própolis pode ser benéfica para evitar futuros danos nos tecidos dos animais.

Antioxidante

O aumento das taxas de radicais livres está associado a ocorrência de diversas doenças (DEVASAGAYAM et al., 2004). A própolis contém uma série de compostos com propriedades de remover esses radicais livres em excesso do organismo (MARQUELE et al., 2005). Os flavonoides e outros compostos fenólicos que estão presentes na própolis são substâncias que apresentam alta atividade antioxidativa (BURDA; OLESZEK, 2001). Os principais elementos responsáveis por essa atividade

antioxidante da própolis são: benzil cafetato, ácido fenil cafeico éster (CAPE) e galangina (RUSSO et al., 2002). O propol também é outro composto eliminador de radicais e está presente na própolis brasileira (BASNET et al., 1997), assim como o caempferol e fenil cafetato (KUMAZAWA et al., 2004). Scheller et al. (1994) observaram que a utilização do extrato de própolis prolongou a vida de ratos devido a sua ação antioxidante.

Imunomodulatória

A própolis é uma substância formada por elementos complexos que estimulam de forma natural o sistema imune, promovendo a resistência a infecções e patógenos, pois segundo Sforcin et al. (2005) ela promove a produção de anticorpos. A modulação do sistema imune pode ocorrer através da potencialização ou através da supressão de elementos do sistema imunológico (KIRKLEY, 1999). Segundo Fisher et al. (2008), a sua atividade de imunomodulação ocorre de forma contraditória, as vezes sendo estimulante e outras vezes inibidora de determinados eventos imunológicos, sendo esses efeitos antagônicos oriundos, dentre outros fatores, da complexidade química da própolis. Um dos mecanismos de ação moduladores do sistema imune proporcionado pela própolis é através da ativação dos macrófagos (ORSOLIC; BASIC, 2003), aumentando assim sua capacidade fagocítica (ORSI et al., 2000). Os macrófagos desempenham um importante papel na defesa do organismo por meio da fagocitose, geração de radicais livres, mediação de processos inflamatórios e secreção de diversas substâncias como enzimas e citocinas (FISCHER et al., 2008).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local, animais e manejo alimentar

O trabalho foi realizado no bezerreiro experimental “Evilásio de Camargo” do Departamento de Zootecnia da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” - USP/ESALQ, situado na cidade de Piracicaba, SP. Foram utilizados 32 bezerros mestiços Holandês-Jersey, machos e fêmeas, provenientes do rebanho da ESALQ/USP. O experimento ocorreu entre o período de março a agosto de 2017. Nesse período a temperatura média foi 24 °C, com máximas de 32,1 °C e mínimas de 5,1°C. A umidade relativa média do período registrada foi de 76%, com máxima de 99,6% e mínima de 31,2%. A pluviosidade média entre os meses de março a agosto foi de 89,5 mm. Após o nascimento, os animais foram separados da mãe e receberam no mínimo 4L de colostro de alta qualidade (> 60 mg de Ig /mL) nas primeiras 6h de vida. A transferência de imunidade passiva foi avaliada através da leitura de proteína sérica total em refratômetro (DEELEN et al., 2014). Os animais receberam 6L de leite integral diariamente, divididos em duas refeições (7h00 e 17h00) e tiveram livre acesso à água e ao concentrado inicial (Ração Bezerra Ag Milk Agrocere Multimix Nutrição Animal Ltda., Rio Claro, São Paulo, Brasil). O concentrado foi fornecido toda manhã, ad libitum pesando-se a sobra do dia anterior, de forma a se obter o consumo diário.

O delineamento experimental foi o de blocos casualizados, considerando-se peso ao nascer e sexo para blocagem, sendo os animais distribuídos nos seguintes tratamentos: 1) Controle; 2) Suplementação de 4 mL/d de extrato de própolis vermelha (30%) adicionados ao leite durante todo o período experimental (56 dias). Para a suplementação via leite, a própolis foi misturada no momento do fornecimento do leite para os animais (Figura 3.1), o qual era realizado em baldes (Figura 3.2), sendo fornecido 2 mL de extrato de própolis vermelha durante o aleitamento da manhã e mais 2 mL durante o aleitamento do período da tarde. O desaleitamento foi realizado gradualmente a partir da 8ª semana, quando se encerrou o período experimental.

Os animais foram alojados em abrigos individuais, sendo contidos por meio de coleira e corrente fixada ao solo, de modo a impedir o contato físico entre os bezerros (Figura 3.3). Os abrigos individuais, com suporte para comedouro e balde para água,

foram mudados de local diariamente com o intuito de manter os animais sempre em local limpo e seco para se deitar.

Figura 3.1 - EAP sendo misturado ao leite

Figura 3.2 – Aleitamento em baldes.

Figura 3.3 - Área experimental.

3.2 Preparação do extrato de própolis

A própolis utilizada para a preparação do extrato foi oriunda do estado de Alagoas e produzida por abelhas (*Apis mellifera*) a partir da seiva encontrada na planta Rabo-de-Bugio, uma vegetação característica dos manguezais do litoral alagoano. A extração da própolis foi feita de acordo com Alencar et al. (2007) com algumas modificações. A própolis bruta (Figura 3.4) foi moída em moinho KNIFETEC 1095 Sample Mill – Foss Tecator (Hillerroed, Dinamarca), até atingir a consistência de pó fino (Figura 3.5) e então misturada com álcool etílico (C_2H_5OH) em proporção de 30 % (300g de própolis vermelha em pó: 1 L de álcool etílico). Após misturada e agitada, a preparação ficou em banho-maria (Dunbnoff, NOVATECNICA, Piracicaba, Brasil) por aproximadamente duas horas em temperatura média de 45 °C (Figura 3.6). Após a extração, a preparação foi mantida em geladeira por aproximadamente 12 horas e na manhã seguinte, foi filtrada em filtros de papel Whatman no. 1 (Maidstone, Reino Unido) (Figura 3.7), obtendo-se o extrato alcoólico de própolis a 30% para fornecimento aos animais.

Figura 3.4 - Própolis vermelha bruta.

Figura 3.5 - Processo de moagem.

Figura 3.6 – Solução em banho-maria.

Figura 3.7 – Processo de filtragem.

3.3 Análise do Extrato Alcoólico de Própolis

A análise do extrato alcóolico da própolis vermelha brasileira utilizada durante todo o período experimental foi realizada no Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo (USP), Piracicaba, SP, Brasil. O cromatograma foi obtido através do método de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), assim como descrito por Bueno-Silva et al. (2017). A composição química do extrato de própolis foi obtida através do instrumento Fase Reversa HPLC, equipado com uma coluna Shimadzu ODSA (RP-18, tamanho da coluna 4.6 × 250 mm; tamanho de partícula 5 µm) e um detector arranjo de diodos (SPD-M10AVp, Shimadzu Co., Kyoto, Japão). O extrato foi filtrado (0.22 µm de diâmetro – Millipore) e anteriormente injetado 20 µL de cada amostra no sistema HPLC. A coluna foi eluída utilizando-se um gradiente linear de água (solvente A) e metanol (solvente B), começando com 40%B e aumentando até a concentração de 60% B (45 minutos). A concentração foi mantida a 90% B (45- 75 minutos) antes de decair para 30% o solvente B (75- 85 minutos), sendo a taxa de solvente de 1 mL/minuto. O cromatograma foi monitorado a 280 nm. Os seguintes padrões de ácidos fenólicos e flavonoides (Extrasynthese Co and Sigma–Aldrich, Lyon, França) foram examinados: formonetina, daidzeína, biochanina A, catequina, epicatequina, rutina, propil galato, ácido ferúlico, quercetina, liquiritigenina,

isoliquiritigenina, ácido p-cumárico ((≥98–99% pureza), neovestitol e vestitol (≥ 60%, isolado por HPLC semi-preparativo).

3.4 Composição da própolis

Através da cromatografia, obtida pelo método HPLC, é possível verificar que os compostos Daidzeina, Vestitol, Neovestitol, Formononetina e Biochanina A, estavam presentes no extrato alcóolico de própolis vermelha (Figura 3.8). De acordo com a Tabela 2.5.1, esses compostos apresentam diversas atividades, entre elas a ação antimicrobiana, antioxidante e anti-inflamatória.

Figura 3.8 - Cromatograma obtido por HPLC do extrato alcóolico da própolis vermelha brasileira. Sendo, 1: Daidzeina; 2: Vestitol; 3: Neovestitol; 4: Formononetina; 5: Biochanina A.

A própolis vermelha apresenta composição química complexa, sendo que mais de 300 compostos já foram reportados em amostras de própolis vermelha, quando analisadas de diferentes maneiras (RUFATTO et al., 2017).

3.5 Análise Bromatológica dos Alimentos

Os alimentos ofertados aos animais (leite integral e concentrado) tiveram amostras colhidas durante o período experimental para posteriores análises bromatológicas (Tabela 3.1 e 3.2). As amostras de leite foram analisadas pela Clínica do Leite-ESALQ/USP e as amostras de concentrado foram analisadas no Laboratório de Bromatologia do Departamento de Zootecnia - ESALQ /USP.

Tabela 3.1 – Média da composição do leite integral ofertado para os bezerros durante o período de experimento.

	Alimento
	Leite integral
Teor de Gordura, %	3,78
Teor de Proteína, %	3,34
Teor de Lactose, %	4,49
Teor de Sólidos Totais, %	12,59
Teor de Extrato Seco Desengordurado, %	8,81
Contagem Células Somáticas (x mil/mL)	429

As amostras de concentrado foram moídas em moinho de facas com peneira com crivos de 1 mm para a determinação de matéria seca (MS) em estufa a 105°C até obter peso constante da amostra, matéria mineral (MM) por incineração completa da amostras após a determinação da matéria seca, extrato etéreo (EE) por extração com éter de petróleo durante cinco horas em extrator Soxhlet de acordo com Association of Official Analytical Chemists – AOAC (1990), proteína bruta (PB) através de combustão, conforme método de Dumas, utilizando-se o analisador de nitrogênio modelo FP-528 (Leco Corporation, St. Joseph, MI, EUA) e fibra insolúvel em detergente neutro (FDN) pelo método descrito por Van Soest, Robertson e Lewis (1991).

Os nutrientes digestíveis totais (NDT) foram determinados por meio da fórmula proposta por Weiss (1993):

$$\text{NDT} = 0.98 \times (100 - \text{FDN}_N - \text{PB} - \text{MM} - \text{EE} - 1) + 0.93 \times \text{PB} + 2.25 \times \text{EE} + 0.75 \times (\text{FDN}_N - \text{lignina}) \times [1 - (\text{lignina}/\text{FDN}_N)^{0.667}] - 7$$

Onde,

FDN_N: N insolúvel no FDN;

PB, EE, FDN e MM são expressos em % da MS

Tabela 3.2 – Ingredientes e composição química bromatológicas do concentrado.

	Alimento
	Concentrado ¹
Matéria seca, %	86,2
Matéria mineral, % MS	7,9
Proteína bruta, % MS	23,4
Extrato etéreo, % MS	3,6
FDN, %MS	16,3
Nutrientes digestíveis totais (NDT), %MS	78,6

⁽¹⁾ Ração Bezerra Ag Milk Agrocere Multimix Nutrição Animal Ltda.

3.6 Desempenho e Desenvolvimento Corporal

Os animais foram pesados ao nascer e semanalmente até completarem 8 semanas de vida utilizando-se balança mecânica (ISO-300, Coimma Ltda., Dracena, SP, Brasil), sempre antes do fornecimento da dieta líquida da manhã. Após cada pesagem, os animais tiveram a altura de cernelha, largura da garupa e perímetro torácico aferidos. Para obtenção da altura de cernelha e largura da garupa foi utilizada régua biométrica. O perímetro torácico foi aferido através de fita flexível. Ambos equipamentos apresentam escala em centímetros.

3.7. Escore fecal

As fezes foram avaliadas diariamente, no período da manhã, de acordo com sua coloração, consistência e componentes conforme Larson et al. (1977). A classificação foi realizada conforme a fluidez (1; normal; 2: mole; 3: aquosa; 4: fluida) e a severidade, anotando-se o número de dias com diarreia. Foi considerado como diarreia o escore fecal maior ou igual a três. Os animais que apresentaram escore fecal maior ou igual a 3 receberam solução de hidratação oral, composta por 25 gramas de dextrose, 10 gramas de bicarbonato de sódio e 5 gramas de cloreto de sódio, diluído em 1 litro de água. Essa solução era fornecida no volume de 2 litros por bezerro, no período entre os horários de aleitamento da manhã e da tarde, para não atrapalhar o consumo dos animais.

Figura 3.9 – Classificação do escore fecal de acordo com a fluidez (1; normal; 2: mole; 3: aquosa; 4: fluida).

3.8 Ocorrência de doenças

O monitoramento da saúde dos animais foi realizado diariamente, sendo registradas a temperatura corporal, diagnósticos, intervenções e os medicamentos ministrados. Antibioticoterapia foi realizada somente quando o animal apresentou febre e sintomas de depressão, como recusa da dieta líquida, sendo realizada conforme indicações de médico veterinário.

A ocorrência de doenças nos animais foi calculada de acordo com Costa e Kale (2009). O cálculo de prevalência das doenças apresentadas no presente estudo foi realizado através da medida denominada prevalência pontual, definida como a frequência de casos existentes de determinada doença, em uma população em um dado momento. A prevalência pontual é estimada como a proporção de indivíduos de uma população de estudo de tamanho N que apresentam a doença de interesse no instante t.

$$Pt = Ct/Nt$$

Onde $Ct = Nt - N't$ e representa o número de casos prevalente no instante t;

$N't$ refere-se a parcela de indivíduos livres da doença de interesse no instante t;

Nt refere-se ao tamanho da população estudado, no mesmo instante t.

A incidência é a frequência de casos novos de determinada doença, oriundo de uma população sob risco de adoecimento, ao longo de um determinado período de tempo. No presente estudo foram analisadas a incidência acumulada e a taxa de incidência. A incidência acumulada é a proporção que representa a estimativa do risco

de desenvolvimento de uma doença, durante um intervalo de tempo determinado e é calculada pela seguinte equação:

$$IA(t_0 \text{ e } t) = I / N'_0$$

Onde, I representa o número de casos incidentes entre o período t_0 e t ;

N'_0 representa a população de onde se originaram os casos I, constituída por indivíduos não doentes no instante t_0 .

A taxa de incidência é a expressão da frequência com que surgem novos casos de uma doença, por unidade de tempo e com relação ao tamanho de determinada população. A taxa de incidência é calculada como a razão entre o número de casos novos de determinada doença e o total de pessoa-tempo gerado a partir da população de estudo acompanhada. De acordo com a equação:

$$TI(t_0-t) = I/PT$$

Onde, t_0-t refere-se ao intervalo entre a origem t_0 e o instante t ;

I representa o número de casos novos que surgiram entre t_0 e t ;

PT representa a quantidade de pessoa-tempo acumulada pela população, durante o estudo.

No presente estudo, as reincidências de doenças foram levadas em consideração, já que representam a capacidade do indivíduo de reestabelecer sua própria imunidade durante o período de tempo do estudo e também a medida pessoa-tempo, foi adaptada para casos/bezerro/ por dia.

3.9 Análises sanguíneas

Foram colhidas semanalmente amostras de sangue, duas horas após a alimentação da manhã, para traçar o perfil metabólico dos animais durante a fase de aleitamento. As amostras de sangue foram colhidas através de punção da veia jugular com auxílio de tubos vacuolizados contendo fluoreto de sódio como antiglicolítico e EDTA de potássio como anticoagulante, para obtenção de plasma; e tubos vacuolizados com ativador de coágulo, para obtenção de soro. As amostras foram centrifugadas a $2000 \times g$, durante 20 minutos, a temperatura de 4°C , para a obtenção do plasma e soro sanguíneo. Ambos foram armazenados em microtubos plásticos

mantidos em freezer para posterior determinação de glicose, proteína total, β -hidroxibutirato (BHBA), ureia, lactato e capacidade de ligação de Ferro.

Foram utilizados kits comerciais da Labtest Diagnóstica S.A. (Lagoa Santa, MG, Brasil) para determinação de glicose plasmática (Ref. 133-1/500), proteínas totais (Ref. 99), ureia (Ref. 104), lactato (Ref. 116) e capacidade de ligação de ferro (Ref. 41), utilizando-se Sistema Automático para Bioquímica – Modelo SBA 200 (CELM, Barueri, SP, Brasil). A determinação de BHBA foi realizada utilizando-se kit enzimático RANBUT – Ref.: RB1007 (RANDOX Laboratories – Life Sciences Ltd., Crumlin, UK; importado por RANDOX Brasil Ltda., São Paulo, SP, Brasil), utilizando-se também Sistema Automático para Bioquímica – Modelo SBA-200 (CELM, Barueri, SP, Brasil).

3.10 Hemograma

Foi utilizada uma alíquota do sangue, retirada do tubo contendo anticoagulante, para a realização do hematócrito em capilar. Os capilares foram centrifugados em centrífuga de micro hematócrito Modelo SPIN 1000 (MICROSPIN), a 12.000 x g, durante dez minutos. Após centrifugação foram feitas leituras dos tubos capilares em régua própria para hematócrito, sendo expresso o resultado em porcentagem (%).

Para a determinação da contagem total de eritrócitos foi foram diluídos 20 μ L da amostra de sangue em 4 mL no Líquido de Gower (proporção de 1:200), sendo a mistura homogeneizada cuidadosamente. Uma pequena quantidade dessa amostra diluída foi pipetada na abertura lateral da câmara de Neubauer espelhada, fazendo o líquido penetrar por capilaridade entre a câmara e a lamínula. Através de um microscópio, foram feitas as contagens em cinco quadrantes menores localizados no centro da área marcada da câmara de Neubauer, sendo determinada a quantidade de hemácias/ μ L pela seguinte equação:

$$\text{Hemácias}/\mu\text{L} = \sum q. 5. 10^6 . 200$$

Onde:

$\sum q$ = soma da contagem de eritrócitos de 5 quadrantes da câmara de Neubauer.

Para a determinação da contagem total de leucócitos foram diluídos 20 μ L da amostra de sangue em 0,4 mL no Líquido de Turk (proporção de 1:20), sendo a

mistura homogeneizadas cuidadosamente. Uma pequena quantidade dessa amostra diluída foi pipetada na abertura lateral da câmara de Neubauer espelhada, fazendo o líquido penetrar por capilaridade entre a câmara e a lamínula. Utilizando um microscópio, foram feitas as contagens nos quatro quadrantes localizados nas extremidades da área marcada da câmara de Neubauer, sendo determinada a quantidade leucócitos/ μL pela seguinte equação:

$$\text{Leucócitos}/\mu\text{L} = (\sum q / 4) \cdot 10 \cdot 20$$

Onde:

$\sum q$ = soma da contagem de leucócitos dos 4 quadrantes da extremidade da câmara de Neubauer.

3.11 Transferência de imunidade passiva

A adequada transferência de imunidade passiva está entre as principais etapas na criação de bezerras leiteiras. No presente estudo foram fornecidos 4L de colostro de alta qualidade durante as primeiras 6h de vida dos animais, conforme recomendado por Godden (2008), o que garantiu concentrações médias superiores a 5,5 g/dL, ou seja, adequada transferência de imunidade passiva. O sucesso da colostragem foi avaliado através da mensuração da proteína sérica através de refratômetro óptico em amostras de sangue de 48h de vida (Tabela 3.3).

Tabela 3.3 – Média da concentração de proteína total sérica (g/dL) as 48 horas de vida em bezerros suplementados ou não com extrato de própolis vermelha (30%).

	Tratamentos ¹				P < ²
	Controle	Própolis	T	I	T x I
Proteína total sérica, g/dL	6,0 $\pm$ 0,84	5,6 $\pm$ 0,84	0,257	.	.

(¹) C= controle, P= 4 mL/dia de extrato alcóolico de própolis vermelha a 30%.

(²) T= efeito do tratamento; I= efeito da idade dos animais; T x I= efeito da interação tratamento e idade dos animais.

A linha preta na Figura 3.10 representa o valor mínimo indicado para realizar a adequada transferência de imunidade passiva. No entanto, a avaliação individual mostra que alguns animais apresentaram valores inferiores, caracterizando falha na transferência de imunidade passiva (FTIP). Contudo, não houveram diferenças, sendo observados 4 animais com FTIP em cada grupo experimental. Estas falhas podem ter ocorrido por fatores fisiológicos, já que todos os animais receberam colostro de alta

qualidade em volume e tempo adequado. Um fator que deve ser levado em consideração ao realizar a avaliação de transferência de imunidade passiva, é a hidratação do animal no momento da coleta do sangue, já que a porcentagem de água presente no organismo do animal pode alterar os resultados. No entanto, os dados foram coletados 2 horas após o fornecimento de leite no período da manhã.

Figura 3.10 – Concentração de proteínas totais (g/L), após 48 horas de vida, em bezerros suplementados ou não com própolis vermelha.

3.12 Análise estatística

O delineamento experimental foi o de blocos casualizados, sendo os animais alocados nos blocos de acordo com seu peso ao nascer, sexo e data de nascimento. Os dados de desempenho, metabólitos sanguíneos e hemograma foram analisados como medidas repetidas no tempo com auxílio do procedimento MIXED do pacote estatístico SAS (version 5.0, SAS Institute Inc., Cary, NC), para modelos mistos, conforme modelo 1, sendo as semanas de coleta consideradas como medidas repetidas. Dentre as 15 diferentes estruturas de covariância testadas, a que melhor se ajustou ao modelo estatístico foi escolhida baseado no menor valor do critério de informação Akaike corrigido (AICC) (WANG; GOONEWARDENE, 2004). O modelo incluiu como efeitos fixos os efeitos de Tratamento, semana (idade dos animais) e a interação tratamento e semana. O efeito de Bloco, formado em função da data de nascimento dos animais e peso ao nascer, foi incluído no modelo como efeito aleatório.

Para dados que não foram considerados como medidas repetidas no tempo, foi utilizado o PROC GLM do pacote estatístico SAS (version 5.0, SAS Institute Inc., Cary, NC), de acordo com o modelo 2. O modelo incluiu como efeitos fixos os efeitos de Tratamento, semana (idade dos animais) e a interação Tratamento e semana. O efeito de bloco, formado em função da data de nascimento dos animais, peso ao nascer e sexo, foi incluído no modelo como efeito aleatório.

Para efeito de comparação de médias, foi utilizado o teste t de Student, sendo as médias estimadas através do método dos quadrados mínimos (LSMEANS), com nível de significância de 5%.

$$(1) Y_{ijk} = \mu + T_i + B_j + S_k + TS_{ik} + E_{ijk}$$

Onde,

Y_{ijk} = variável resposta; μ = média geral; T_i = efeito do tratamento (suplementação com própolis); B_j = efeito do bloco;

S_k = efeito da idade dos animais (semana de colheita de dado/amostra); TS = interação entre efeito de tratamento e idade; E_{ijk} = efeito devido ao acaso (resíduo).

$$(1) Y_{ijk} = \mu + T_i + B_j + E_{ij}$$

Onde,

Y_{ijk} = variável resposta; μ = média geral; T_i = efeito do tratamento (suplementação com própolis); B_j = efeito do bloco; E_{ijk} = efeito devido ao acaso (resíduo).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Consumo e desempenho

Não houve efeito da suplementação de EAP ($P>0,05$) no consumo de dieta líquida, sólida ou nos dias para consumir 100g de dieta sólida (Tabela 4.1). No entanto, estes parâmetros foram afetados pela idade dos animais ($P<0,0001$).

Tabela 4.1 – Consumo de leite (L/dia), consumo de concentrado (g/dia) e tempo para consumir 100 gramas de concentrado de bezerros suplementados ou não com extrato de própolis vermelha (30%).

	Tratamentos ¹		P < ²		
	Controle	Própolis	T	I	TxI
Consumo					
Leite (L/d)	6,0±0,008	6,0±0,008	0,9207	<,0001	0,999
Concentrado (g/d)	259,6±36,62	245,7±36,62	0,7909	<,0001	0,501
Dias para consumir 100g	26,3±3,08	26,6±3,08	0,9230	.	.

(¹) C= controle, P= 4 mL/dia de extrato alcóolico de própolis vermelha a 30%.

(²) T= efeito do tratamento; I= efeito da idade dos animais; T x I= efeito da interação tratamento e idade dos animais.

Por um período após o nascimento, a dieta líquida é o principal alimento para os bezerros (DRACKLEY, 2005). As taxas de ganho satisfatórias são obtidas através do volume e qualidade nutricional adequadas (JASPER; WEARY, 2002). Esses fatores, quando atendidos, colaboram melhorando a função imunológica do animal, diminuindo assim as ocorrências de diarreia e pneumonia (GODDEN et al., 2005). O leite integral é considerado um alimento que atende todas as exigências nutricionais dos bezerros, especialmente durante as semanas 2 e 3 em que os bezerros dependem quase que exclusivamente da dieta líquida, já que o consumo de alimentos sólidos é muito reduzido (DRACKLEY, 2008). É possível observar que o consumo de leite pelos animais não foi afetado pela suplementação da própolis e se manteve constante durante todo o período de aleitamento (Tabela 4.1). Apesar do sabor particular do extrato alcóolico da própolis, sendo esse muito acentuado na maioria das vezes, os bezerros não rejeitaram o leite no qual o extrato alcóolico da própolis foi misturado.

As variações nas taxas de consumo de concentrado estão diretamente relacionadas ao volume de dieta líquida fornecida ao animal. Ao avançar o período de crescimento e com o consumo de concentrado, os animais passam para a fase de

transição e suas exigências nutricionais mudam. O consumo de concentrado foi crescente com o avanço da idade dos animais (Figura 4.1), resultado esperado, uma vez que o volume de dieta líquida fornecida se manteve constante ao longo do período experimental e ao avançar da idade as exigências nutricionais favorecem o incremento do consumo de dieta sólida.

Kupcznki et al. (2012) relatou menores taxas de consumo de concentrado em bezerros não suplementados com a própolis, devido a presença dos sintomas de diarreia no décimo quarto dia de vida dos animais, influenciando também, de forma negativa, no ganho de peso. Esperava-se que os animais suplementados apresentassem maior consumo de concentrado, devido a hipótese levantada do efeito positivo da suplementação sobre a ocorrência de doenças.

Figura 4.1 – Consumo de concentrado (g/d) ao longo das semanas, em bezerros suplementados com extrato de própolis vermelha (30%) e animais do tratamento controle.

A variável dias para consumir 100 gramas é um importante fator para avaliar o início do desenvolvimento ruminal dos bezerros e foi de em torno dos 26 dias para ambos os tratamentos (Tabela 4.1). Segundo Bittar e Ferreira (2016) o período de transição do bezerro para um ruminante funcional é influenciado pelo consumo de alimentos sólidos, essencialmente o concentrado inicial. Quanto mais precoce se inicia o consumo, mais rapidamente ocorrerão as mudanças digestivas e metabólicas que levarão esse animal a se tornar um ruminante funcional. O volume de leite ofertado pode ter retardado a procura dos animais pelo concentrado inicial, já que, quanto maior o volume de dieta líquida ofertado, menor será o consumo de alimentos sólidos (JASPER; WEARY, 2002).

Yaghoubi et al. (2007), em um estudo para avaliar diferentes níveis de suplementação com flavonoides, observaram que os animais suplementados com altas doses de flavonoides extraídos da própolis ($3,6 \times 10^{-3}$ g/kg de peso corporal), atingiram o consumo de 680 g/dia anteriormente aos animais que receberam doses menores, ou nenhuma suplementação. Prado-Calixto et al. (2017) em um estudo com o aditivo à base de extrato de própolis em pó em ovinos machos, puderam observar que a administração do extrato de própolis à dieta não alterou o comportamento ingestivo dos animais, não afetando o tempo despendido em alimentação, ruminação, ócio ou ingestão de água. Stradiotti et al. (2004b) comprovaram efeitos *in vitro* da própolis similares aos ionóforos, com a capacidade de realizar a manipulação ruminal e assim aumentar a eficiência. Aparentemente, a suplementação de própolis via dieta sólida tem mais efeitos no consumo de alimentos que a suplementação via dieta líquida, devido aos seus efeitos na população microbiana ruminal.

Não houve efeito da suplementação de EAP ($P > 0,05$) no peso corporal, ganho de peso ou medidas de crescimento (Tabela 4.2). No entanto, estes parâmetros foram afetados pela idade dos animais ($P < 0,0001$).

Tabela 4.2 – Desempenho e ganho de peso (g/d) de bezerros suplementados ou não com extrato de própolis vermelha (30%)

	Tratamentos ¹		P < ²		
	Controle	Própolis	T	I	T x I
Peso corporal, Kg					
Inicial	35,8 ± 1,20	35,1 ± 1,20	0,9999	.	.
Final	72,5 ± 1,64	73,6 ± 1,64	0,9999	.	.
Média do período total	51,6 ± 1,12	51,4 ± 1,12	0,8875	<,0001	0,3496
Ganho de peso, g/d					
Média do período total	654,5 ± 23,41	694,2 ± 23,53	0,1756	<,0001	0,2685
Medidas de crescimento, cm					
Altura de cernelha	81,2 ± 0,66	81,6 ± 0,66	0,4154	<,0001	0,1169
Perímetro torácico	86,2 ± 0,81	86,7 ± 0,81	0,2857	<,0001	0,1950
Largura da garupa	22,2 ± 0,24	22,1 ± 0,24	0,7738	<,0001	0,0680

(¹) C= controle, P= 4 mL/dia de extrato alcóolico de própolis vermelha a 30%.

(²) T= efeito do tratamento; I= efeito da idade dos animais; T x I= efeito da interação tratamento e idade dos animais.

O peso corporal dos bezerros se apresentou crescente ao longo do período de aleitamento (Figura 4.2). Yaghoubi et al. (2007) observaram efeitos positivos da suplementação com flavonoides no peso corporal dos bezerros, com maior peso

corporal durante a quinta semana de vida para animais suplementados com maiores doses ($3,6 \times 10^{-3}$ g/kg vs $7,3 \times 10^{-5}$ g/kg de peso corporal). Durante a sexta semana de vida, os animais suplementados com altas doses também apresentaram maior peso corporal em relação aos animais que receberam baixas quantidades de flavonoides ou nenhuma suplementação. Os autores sugerem que os flavonoides apresentam a capacidade de melhorar as taxas de crescimento dos bezerros. Esperava-se que a suplementação com EAP aumentasse o peso final dos bezerros, já que sua ação imunomodulatória apresenta capacidade para afetar de forma positiva a saúde dos animais e consequentemente o desempenho.

Figura 4.2 – Peso corporal de bezerros leiteiros suplementados com própolis vermelha ou não, nas primeiras oito semanas de vida.

Segundo Drackley (2008) dietas restritas (4L/d) possibilitam apenas atender as necessidades energéticas do animal para sua manutenção, sobrando apenas entre 200 a 300 gramas para promover seu crescimento em situações térmicas neutras. O ganho de peso médio durante o período de experimento foi superior a esse valor em ambos os tratamentos, uma vez que os animais foram aleitados com 6L/d, permitindo o bom desempenho dos animais durante o período de aleitamento (Figura 4.3).

Figura 4.3 – Ganho de peso médio diário de bezerros leiteiros suplementados com própolis vermelha ou não, nas primeiras oito semanas de vida.

Kupcznki et al. (2012) analisaram diferentes doses de extrato etanólico de própolis a 10% adicionados ao substituto de leite em bezerros leiteiros da raça Simental. Durante os primeiros 21 dias de idade animais suplementados com 4 mL de própolis por dia apresentaram maior peso corporal em relação aos animais do grupo controle, mas não houve diferença de ganho de peso ou peso corporal para o restante do período. Diferente da própolis utilizada por Kupcznki et al., a própolis vermelha utilizada no presente estudo não apresentou efeito significativo para o ganho de peso diário e para o peso corporal dos animais em nenhuma semana de vida. Em contrapartida, Morsy et al. (2015) estudaram ovelhas da raça Santa Inês suplementados com 3 gramas de extrato de própolis vermelha por dia durante 21 dias pré-parto e essas apresentaram maior ganho de peso médio diário durante o período de experimento em comparação aos animais não suplementados.

Esperava-se que a suplementação com EAP afetasse positivamente o ganho de peso dos bezerros, especialmente durante as primeiras semanas de vida, período em que os animais apresentam elevadas ocorrências de diarreia que comprometem o consumo e desempenho.

As medidas altura da cernelha, largura da garupa e perímetro torácico foram afetadas pelo fator idade ($P < 0,0001$; Tabela 4.2), as quais aumentaram com o avanço da idade dos bezerros (Figura 4.4). As medidas de desenvolvimento corporal se

correlacionam diretamente com o peso e desenvolvimento dos bezerros (HEINRICHS al., 2007).

Figura 4.4 – Altura de cernelha, largura de garupa, perímetro torácico, ao longo das semanas, de bezerros suplementados com própolis vermelha ou não.

Yaghoubi et al. (2007) levantaram a hipótese de que os flavonoides interferem na resposta imune e afetam diretamente o desempenho dos bezerros da raça Holandês. Apesar da hipótese levantada, os autores também não encontraram efeitos significativos para as medidas de altura de cernelha e comprimento corporal em animais suplementados com flavonoides extraídos da própolis.

4.2 Escore fecal e ocorrência de doenças

Houve efeito da suplementação de EAP no escore fecal dos bezerros ($P=0,0229$), dias com diarreia ($P=0,0234$) e número de dias recebendo soro oral ($P=0,0234$) (Tabela 4.3). Não houve efeito da suplementação de EAP para a variável dias com febre e nem para o hematócrito ($P>0,05$). Por outro lado, houve efeito significativo da idade dos animais para o escore fecal ($P<0,0001$), dias com febre ($P=0,0128$) e para o hematócrito ($P=0,006$).

Tabela 4.3 – Escore de fluidez das fezes, dias com diarreia, dias recebendo soro oral e hematócrito de bezerros suplementados ou não com extrato de própolis vermelha (30%)

	Tratamentos ¹		T	P < ²	
	Controle	Própolis		I	T x I
Escore fecal	1,9 ± 0,07	1,7 ± 0,07	0,0229	<,0001	0,7579
Dias com diarreia	1,7 ± 0,19	1,0 ± 0,19	0,0234	.	.
Dias recebendo soro oral	1,7 ± 0,19	1,0 ± 0,19	0,0234	.	.
Dias com febre	0,4 ± 0,09	0,2 ± 0,09	0,2453	0,0128	0,3285
Hematócrito, %	22,5 ± 0,64	23,2 ± 0,64	0,3600	0,0060	0,9340

(¹) C= controle, P= 4 mL/dia de extrato alcóolico de própolis vermelha a 30%.

(²) T= efeito do tratamento; I= efeito da idade dos animais; T x I= efeito da interação tratamento e idade dos animais.

No presente estudo, o diagnóstico de diarreia foi considerado quando o animal apresentou escore fecal maior ou igual a 3. A suplementação do leite com EAP resultou em efeito esperado conforme a hipótese levantada. Esperava-se que os animais suplementados com própolis diminuíssem o escore fecal devido a atividade antimicrobiana da própolis. Muito embora o valor médio de escore fecal não caracterize diarreia, tanto para animais controle quanto para aqueles suplementados com própolis, a suplementação foi eficiente em reduzir a fluidez das fezes. Como a

diarreia é a principal doença que acomete os bezerros durante as primeiras semanas de vida, com o avançar da idade, os animais apresentam menor escore fecal, explicando assim o efeito da idade ($P < 0,0001$) (Figura 4.5). No entanto, não foi observado interação do tratamento com a idade ($P > 0,05$).

Figura 4.5 – Escore fecal ao longo das semanas de bezerros suplementados com própolis vermelha ou não.

Yucel et al. (2015) estudaram os efeitos da própolis *Pinus ssp.*, originária da região da Turquia, no crescimento e ocorrência de diarreia em bezerros. O grupo de bezerros que recebeu 2 mL de tintura de própolis, desde o primeiro dia de vida até o final do estudo, apresentaram escore fecal abaixo de 2, podendo concluir que a própolis preveniu a ocorrência de diarreia nos animais.

Kupcznki et al. (2012) também observaram resultados semelhantes do efeito da própolis para melhorar o estado de saúde dos animais com a suplementação de própolis no sucedâneo. O fornecimento de 4 mL de EAP a 10% causou significativa diminuição da pontuação de intensidade de diarreia nos animais. Os bezerros que receberam o extrato de própolis apresentaram melhor condição geral de saúde, incluindo melhor avaliação de desidratação.

A dose ideal e a quantidade de dias exatos que a própolis deve ser fornecida aos animais ainda são desconhecidos, no entanto, uma possível explicação para a diminuição do escore fecal é sua potente ação antibacteriana (BASTOS et al., 2008), responsável por diminuir a atividade dos patógenos.

Os animais do grupo controle apresentaram maiores número de dias acometidos pela enfermidade, principalmente nas semanas em que apresentaram o maior escore fecal (fezes mais fluidas), apontando de forma clara o efeito da própolis na diminuição do distúrbio (Figura 4.6).

Figura 4.6 – Dias com diarreia ao longo das semanas de bezerros suplementados com própolis vermelha ou não.

O gráfico de fornecimento de soro oral acompanha o gráfico de dias com diarreia (Figura 4.7). Os animais do grupo controle receberam as soluções orais de hidratação com maior frequência, devido a maior incidência de diarreia (Tabela 4.3). Dessa forma, animais acometidos com tal enfermidade demandam maior tempo de mão de obra gasto com seus cuidados, maior quantidade e, portanto, maior custo com produtos veterinários, além de apresentarem menor desempenho animal, mesmo consumindo a mesma quantidade de alimento.

A manutenção do equilíbrio de água e eletrólitos é um fator crítico para o animal sobreviver (DAVIS; DRACKLEY, 1998). Na maioria dos casos de diarreia, o animal vem a óbito como resultado da perda de eletrólitos e não diretamente pela ação dos agentes responsáveis pela infecção (DESJEUX; BRIEND; BUTZNER, 1997).

Figura 4.7 – Quantidade de dias que foram fornecidos a solução oral comum de hidratação para bezerros leiteiros de acordo com as semanas de vida.

Houve aumento dos valores de hematócrito durante as primeiras semanas de vida, mas com o avançar do tempo, esses valores diminuíram, evidenciando o efeito da idade (Figura 4.8). Os valores de hematócrito obtidos durante o experimento estão dentro da faixa indicada como normal: 18-46% para animais até a quarta semana de vida e 18-41% para animais de cinco a oito semanas (JEZEK et al., 2011). Valores abaixo do considerado como normais, podem indicar anemia, enquanto valores muito elevados indicam desidratação. Apesar dos animais do grupo controle terem apresentado maiores pontuações do escore fecal, os valores de hematócrito se mantiveram dentro da faixa indicada como adequada, não indicando a incidência de desidratação. Esse fato ocorreu, pois, todos os animais com escore fecal maior que 3 foram mantidos hidratados através da solução de hidratação oral, evitando a agravação no quadro de desidratação causada pela diarreia.

Figura 4.8 – Valores de hematócrito (%) de bezerros leiteiros suplementados com própolis vermelha ou não.

O quadro de ocorrência de doenças foi elaborado de acordo com a prevalência das doenças e sua incidência (Tabela 4.4).

Tabela 4.4 – Ocorrência de doenças durante o período de aleitamento em bezerros suplementados ou não com extrato de própolis vermelha (30%)

Doenças	Tratamento	
	Própolis	Controle
Diarreia		
Prevalência pontual, %	25	75
Incidência acumulada, %	25	88
Taxa de incidência, casos/bezerro/dia	0,03	0,09
Pneumonia		
Prevalência pontual, %	12,5	6,25
Incidência acumulada, %	12,5	6,25
Taxa de incidência, casos/bezerro/dia	0,01	0,006
Tristeza Parasitária		
Prevalência pontual, %	18,75	18,75
Incidência acumulada, %	18,75	18,75
Taxa de incidência, casos/bezerro/dia	0,02	0,02

Através dos dados analisados foi possível observar que os animais suplementados com EAP apresentaram menor prevalência de diarreia ao longo do

período experimental (Tabela 4.4), evidenciando o efeito terapêutico da própolis vermelha para a diarreia. A medida de incidência acumulada também demonstrou que os bezerros do grupo controle apresentaram maior risco de desenvolver a doença, constatando o efeito preventivo da suplementação com 4 mL de própolis vermelha para a diarreia.

De acordo com a taxa de incidência, foi possível observar que a frequência com que surgem novos casos de diarreia é muito maior no grupo de bezerros que não foram suplementados com a própolis vermelha. Em alguns casos foi necessário aplicar maior número de doses de antibiótico, já que alguns deles ainda apresentaram reincidência do episódio de diarreia, marcado pelo alto escore fecal e alta temperatura corporal (acima de 39,5 °C).

Esse resultado pode ser explicado pela potente atividade da própolis contra microrganismos infecciosos responsáveis por causar diarreia. Independente da identificação do agente patológico causador da diarreia, a própolis se mostrou eficiente durante o período experimental. Como a diarreia pode apresentar diversas origens microbiológicas, sua ampla atividade foi relatada por diversos autores. Ugur et al. (2000) relataram a eficiência da própolis em controlar infecções causadas pela bactéria *E.coli*, resistente a vários antibióticos. Cueto et al. (2011) estudaram o efeito antiviral de dois extratos de própolis, um obtido na região central do Rio Grande do Sul e outro de origem comercial da região de Minas Gerais e ambos apresentaram atividade antiviral frente ao vírus da diarreia viral bovina (BVDB).

Orsi et al. (2005) estudaram a atividade antibiótica da própolis brasileira sob a *Salmonella enteritidis* e *Salmonella typhimurium* e através desse estudo puderam concluir que a própolis apresenta atividade contra bactérias Gram-negativas, já que a porcentagem de sobrevivência das bactérias diminuiu com o tempo de incubação no extrato etanólico de própolis. Soufy et al. (2017) investigou a atividade do extrato de própolis sob ratos infectados por oócitos de *Cryptosporidium* spp., obtido através de bezerros que apresentavam diarreia com idade entre 3 a 15 dias. Os autores puderam observar que o extrato de própolis proveniente do Egito apresentou atividade sob a Criptosporidiose em ratos, diminuindo entre 91 a 88% a presença de oócitos nas amostras fecais dos ratos.

A tristeza parasitária bovina é um complexo de doenças causados por infecções com a *Babesia* e *Anaplasma* transmitida por carrapatos (*Boophilus microplus*), sua ocorrência é influenciada pela variação climática, práticas de manejo, controle de carrapato e introdução de bovinos susceptíveis (GONÇALVES, 2000). Os sinais clínicos são claros e seu tratamento exige a utilização de antibióticos. Durante todo o período de experimento 6 bezerros apresentaram o quadro clínico, sendo medicados rapidamente para essa enfermidade. A incidência dessa patologia, foi em mesmo número de animais de ambos os grupos, mostrando que a própolis vermelha não apresentou efeito na prevenção da tristeza parasitaria bovina nesse trabalho.

Apesar de muitos estudos confirmarem o efeito antimicrobiano (MARCUCCI et al., 2001), antioxidante (KUMAZAWA et al., 2004) e anti-inflamatória (MONTPIED et al., 2003) da própolis, nesse estudo o extrato alcóolico de própolis vermelha a 30% não foi eficiente em prevenir a incidência e prevalência de pneumonia. Apesar do número de ocorrências não ser alto, ainda assim era esperado que os animais suplementados com o EAP apresentassem menor incidência de pneumonia. Como muitos de seus mecanismos de ação ainda são desconhecidos, mais pesquisas são necessárias para entender melhor a relação da própolis vermelha com a prevenção de pneumonia em bezerros leiteiros. Uma vez que doenças como a pneumonia além de causarem prejuízos diretos com medicamentos e mortalidade, influenciam também na vida produtiva adulta do animal (HEINRICHS, 2011), sua profilaxia através da utilização de produtos naturais é interessante.

Os animais que apresentaram sinais clínicos de diarreia, como fezes fluidas, falta de apetite, desidratação e aumento na temperatura corporal, receberam o tratamento indicado para a doença com antibiótico. No entanto, tais medicamentos apresentam efeito residual, especialmente os de amplo espectro, que persistem no organismo de forma prolongada prevenindo a proliferação de microrganismos após a aplicação do produto. Dessa forma, surge a hipótese de que os animais tratados na terceira semana para diarreia, que em sua maioria foram animais do grupo controle, não apresentaram um ambiente favorável para o crescimento da atividade microbiana na quarta semana de vida, período favorável a ocorrência de doenças respiratórias, como a pneumonia (Figura 4.9).

Os animais suplementados com EAP, apresentaram menor ocorrência de diarreia durante a terceira semana e consequentemente foram tratados com

antibióticos menos vezes. Sendo assim, esses animais apresentaram maiores chances de contrair pneumonia durante a quarta semana de vida, quando comparados com os animais do grupo controle, que apresentavam o efeito residual do medicamento em seu organismo. Esse fato resultou em maior ocorrência de pneumonia no grupo suplementado com EAP, em relação aos animais do grupo controle (Tabela 4.4).

Figura 4.9 - Dias com febre (temperatura $\geq 39,5^{\circ}\text{C}$) ao longo das semanas em bezerros suplementados ou não com própolis vermelha.

Durante as três primeiras semanas de vida, os anticorpos maternos provenientes do colostro permanecem na circulação e após a terceira semana de vida, através da exposição do animal à novos microrganismos, o bezerro começa a desenvolver seu próprio sistema de defesa (HULBERT e MOISÁ, 2015). O bezerro apresenta maior risco de contrair doenças entéricas durante a primeira semana de vida (SVENSSON et al., 2003), no entanto, a partir da quarta semana de vida, o risco de contrair doenças respiratórias aumenta progressivamente (HULBERT e MOISÁ, 2015).

A Tabela 4.5 mostra as doses de medicamentos, antibióticos e anti-inflamatórios, administrados durante todo o período experimental de acordo com a ocorrência de doenças. Os medicamentos foram administrados de acordo com as indicações de bula, considerando-se dose e tempo de tratamento.

Tabela 4.5 – Doses de medicamentos utilizados durante o período de aleitamento em bezerros suplementados ou não com extrato de própolis vermelha (30%).

Tratamento	Tratamento	
	Própolis	Controle
Diarreia		
Doses de antibiótico	20	70
Doses de anti-inflamatório	12	42
Pneumonia		
Doses de antibiótico	10	5
Doses de anti-inflamatório	6	3
Tristeza Parasitária		
Doses de antibiótico	3	3

Animais suplementados com própolis receberam 3,5 vezes menos antibióticos para o tratamento de diarreia que os animais do grupo controle. A mesma diferença existe para o número de doses de anti-inflamatórios utilizados para o tratamento da diarreia. Essa queda no número de doses de medicamentos utilizadas para o tratamento de animais suplementados com a própolis afeta não apenas a saúde animal per se, mas também a saúde pública, diminuindo a contribuição para o desenvolvimento de resistência bacteriana. Outros resultados positivos da suplementação com a própolis são a redução nos gastos com medicamentos, menor mão de obra para tratamento e menor número de intervenções para cuidados veterinários, que quando frequentes, ameaçam o bem-estar dos animais.

4.3 Parâmetros sanguíneos

Não houve efeito da suplementação de EAP ($P > 0,05$) nas concentrações sanguíneas de glicose, proteína total, ureia, lactato, BHBA e para a capacidade de ligação de ferro (Tabela 4.6). No entanto, estes parâmetros foram afetados pela idade dos animais ($P < 0,05$).

Tabela 4.6 –Concentrações plasmáticas de parâmetros sanguíneos de bezerros suplementados ou não com extrato de própolis vermelha (30%).

	Tratamentos ¹		P < ²		
	Controle	Própolis	T	I	T x I
Glicose (mg/dL)	123,5 ± 2,36	127,9 ± 2,37	0,1540	0,002	0,012
Proteína Total (g/dL)	7,0 ± 0,15	6,9 ± 0,15	0,2857	<,0001	0,1950
Uréia (mg/dL)	17,3 ± 0,57	17,5 ± 0,58	0,7499	0,0095	0,7119
Lactato (mg/dL)	14,0 ± 0,71	14,3 ± 0,72	0,8129	<,0001	0,6974
BHBA (mm/dL)	0,12 ± 0,017	0,12 ± 0,017	0,8374	0,0021	0,0383
Capacidade de ligação de Fe	268,3±106,01	269,2±106,66	0,9480	<,0001	0,482

(¹) C= controle, P= 4 mL/dia de extrato alcóolico de própolis vermelha a 30%.

(²) T= efeito do tratamento; I= efeito da idade dos animais; T x I= efeito da interação tratamento e idade dos animais.

Mudanças nutricionais que ocorrem de acordo com o crescimento corporal e o desenvolvimento metabólico de bezerros leiteiros, são também associadas às mudanças dinâmicas nos parâmetros sanguíneos (MOHRI et al., 2007). Dessa forma, o perfil metabólico pode ser utilizado como ferramenta para realizar o monitoramento dos animais, o reconhecimento de deficiências nutricionais, problemas de saúde e avaliar o desempenho do rebanho (DUFFIELD e LEBLANC, 2009). Através dos parâmetros metabólicos é possível realizar o diagnóstico de doenças por meio da comparação com valores encontrados em uma população saudável (KNOWLES et al., 2000).

Animais suplementados com EAP apresentaram maiores concentrações plasmáticas de glicose durante a quarta semana de vida, apresentando efeito da interação suplementação e idade (P=0,012; Figura 4.10). Essa elevação na concentração de glicose nos animais suplementados com EAP pode estar relacionada com a queda no escore fecal e com o menor número de dias com diarreia durante a quarta semana de vida, permitindo aos animais, maior absorção e disponibilidade de glicose. A perda de fluidos que ocorre durante a ocorrência de diarreia, é resultado do aumento da permeabilidade e motilidade intestinal, que irá reduzir a absorção de nutrientes, fluidos e eletrólitos (NAYLOR et al., 1999). Embora sem efeitos significativos, os animais suplementados com EAP também apresentaram maior ganho de peso durante a quarta semana de vida, corroborando com o aumento de glicose plasmática.

Figura 4.10- Concentrações plasmáticas de glicose (mg/dL) de bezerros leiteiros suplementados com própolis vermelha ou não.

Morsy et al. (2016) em um estudo para avaliar o impacto da própolis vermelha brasileira nos metabólitos sanguíneos de 20 ovelhas Santa Inês, observaram efeito da administração oral de 3 gramas de extrato de própolis por ovelha por dia, 21 dias antes do período de parição. Os autores também observaram efeito entre a interação tratamento e semanas de vida, a concentração de glicose foi maior nos animais suplementados com própolis vermelha.

Kupczyński et al. (2012), em um experimento com bezerros da raça Simental suplementados com 2 e 4 mL/dia de extrato alcóolico de própolis, observaram significativa queda nos níveis de glicose plasmática, sendo a maior queda no grupo que recebeu 4 mL/dia de própolis

De acordo com Quigley et al. (2006) a concentração média adequada para bezerras durante a fase de aleitamento pode variar de 80 mg/dL a 120 mg/dL de glicose. Apesar das concentrações plasmáticas de glicose estarem próximas ao máximo indicado para bezerros durante a fase de aleitamentos, os altos níveis de glicose podem ser explicados pelo maior suprimento de lactose via dieta líquida, já que os animais receberam 6 litros de leite integral divididos em duas refeições por dia. Os níveis de glicose plasmática e insulina aumentam de acordo com a lactose e o consumo total de açúcar (HUGI et al., 1997).

O efeito da idade na concentração de proteína total é decorrente das variações ao longo das semanas (Figura 4.11). Houve queda na concentração de proteína total no sangue dos bezerros até a terceira semana, a qual reflete a janela de imunidade dos bezerros, quando o animal perde os anticorpos maternos provenientes do colostro e começa a desenvolver seu próprio sistema imune (HULBERT e MOISÁ, 2015).

Figura 4.11 – Concentrações plasmáticas de proteína total (g/dL) de bezerros suplementados com própolis vermelha ou não.

Diferente dos dados obtidos nesse experimento, Morsy et al. (2016) observaram efeito positivo ($P < 0,05$) da própolis vermelha na concentração de proteína total sanguínea de ovelhas da raça Santa Inês suplementadas 21 dias antes de parir, com 3 gramas de extrato/ovelha/dia. Os autores explicaram esse aumento através da capacidade da própolis em modular o metabolismo da proteína, extraindo a imunoglobulina do plasma durante a formação do colostro na glândula mamária (KANEKO et al. 2008). No presente experimento a própolis não apresentou a capacidade de modular o metabolismo de proteína, evidenciada pela queda nas concentrações de proteína durante a janela de imunidade dos bezerros.

As concentrações de ureia oscilaram durante as semanas, explicando o efeito da idade (Figura 4.12). A dieta exerce forte influência sobre a concentração desse metabólito (TRAYNOR et al., 2006). O desenvolvimento ruminal também é um importante fator que influencia no aumento da absorção de ureia e consequentemente na elevação da sua concentração na circulação plasmática (SHINGU et al., 2007).

Com o avançar da idade, ocorre um aumento na capacidade do epitélio ruminal em absorver amônia e no fígado ser convertida em ureia (KNOWLES et al., 2000). A ureia é sintetizada no fígado a partir da amônia, originada da reação de catabolismo proteico e da absorção intestinal e através da saliva ela pode retornar ao rúmen e atuar como fonte de nitrogênio possibilitando a síntese proteica microbiana (HAYASHI et al., 2006).

Figura 4.12 – Concentrações plasmáticas de ureia (mg/dL) de bezerros leiteiros suplementados com própolis vermelha ou não.

A gliconeogênese é um importante via reguladora dos níveis de glicose, tanto para os bezerros como para o ruminante adulto. Entre os seus principais precursores estão o lactato, propionato, aminoácidos, glicerol e valerato (NAFIKOV; BEITZ, 2007). Durante a fase de aleitamento a dieta dos bezerros é composta em sua maioria por carboidratos não fibrosos, uma fonte rápida de nutrientes que se tornam disponíveis para as bactérias ruminais produzirem lactato (KOZLOSKI, 2002). Nesse estudo as concentrações plasmáticas de lactato reduziram ao longo das semanas (Figura 4.13). No entanto, as concentrações plasmáticas de lactato total se encontram entre os valores descritos como normais, de 6 a 22 mg/dL (KASARI; NAYLOR, 1986).

Figura 4.13 – Concentrações plasmáticas de lactato (mg/dL) de bezerros leiteiros suplementados com própolis vermelha ou não.

As concentrações plasmáticas de β -hidroxibutirato (BHBA) apresentaram efeito significativo para a interação entre o tratamento e a idade ($P=0,0383$). Uma vez que com a idade ocorre o desenvolvimento do rúmen, era esperado que as concentrações de BHBA aumentassem ao longo do período, o que ocorre em resposta ao acréscimo no consumo de alimentos sólidos (QUIGLEY et al, 1991). Ao avançar da idade, o butirato se torna o principal substrato a ser oxidado, diminuindo proporcionalmente o teor de oxidação de glicose pelas células do epitélio ruminal (BALDWIN et al., 2004). Dessa forma, é possível observar o aumento dos níveis de BHBA próximo a oitava semana de vida dos animais, quando se inicia o processo de desaleitamento (Figura 4.14).

Figura 4.14 – Concentrações de BHBA (mm/dL) em bezerras leiteiras suplementadas com própolis vermelha ou não.

Ocorreu redução da capacidade de ligação de ferro durante as semanas de vida dos animais (Figura 4.15). A concentração de ferro tem grande impacto no status oxidativo dos animais, realizando papel importante na proteção do organismo contra o estresse oxidativo (CECILIANI, 2017). Embora as reações de oxidação sejam fundamentais para a vida, elas também podem ser prejudiciais causando danos ao organismo. O ferro quando em sua forma livre participa de reações oxidativas e ajuda a catalisar a formação de radicais livres. Os radicais livres, resultado das reações químicas de oxirredução, apresentam grande potencial para causar danos nas células, órgãos e tecidos, já que são moléculas instáveis e altamente reativas. Por esse motivo, quase sempre o ferro é encontrado no organismo ligado a proteínas de transporte ou armazenamento. A transferrina é a principal proteína transportadora de ferro e ao se ligar a esse elemento protege o organismo.

Dessa forma, compostos altamente antioxidante, podem apresentar alta atividade biológica reduzindo os radicais livres prevenindo a participação do ferro em reações oxidativas. Devido à alta capacidade antioxidante encontrada na própolis vermelha era esperado que os animais suplementados com EAP apresentassem maiores taxas de capacidade de ligação de ferro. No entanto, altos níveis de ferro afetam negativamente a absorção de outros elementos, levando ao estresse oxidativo em nível celular (HANSEN et al., 2010).

Figura 4.15 – Capacidade de ligação de Ferro (µg/dL) em bezerros leiteiros suplementados com própolis vermelha ou não.

Não houve efeito da suplementação de EAP ($P>0,05$) na contagem de leucócitos totais (Tabela 4.7). No entanto, houve efeito na contagem de eritrócitos totais ($P=0,043$). Todos estes parâmetros foram afetados pela idade dos animais ($P<0,05$), mas não houve efeito da interação entre a suplementação com própolis e a idade dos animais ($P>0,05$).

Tabela 4.7- Contagem total de leucócitos e eritrócitos de bezerros suplementados ou não com extrato de própolis vermelha (30%)

	Tratamentos ¹		P < ²		
	Controle	Própolis	T	I	T x I
Leucócitos totais, (x103/µL)					
Média do período total	8,9 ± 0,46	8,2 ± 0,46	0,313	0,0396	0,824
Eritrócitos totais, (x106/µL)					
Média do período total	7,0 ± 0,26	6,3 ± 0,26	0,043	0,0085	0,471

(¹) C= controle, P= 4 mL/dia de extrato alcóolico de própolis vermelha a 30%.

(²) T= efeito do tratamento; I= efeito da idade dos animais; T x I= efeito da interação tratamento e idade dos animais.

No geral, a contagem de eritrócitos totais dos animais suplementados com EAP permaneceram menores (Figura 4.16). No entanto, os resultados encontrados no presente estudo estão dentro dos valores considerados como adequados para bezerros saudáveis, entre $7,54 \times 10^6/\mu\text{L}$ podendo chegar até $6,11 \times 10^6/\mu\text{L}$ (PINNA et al., 2001). A variação nos valores de eritrócitos totais de acordo com a idade dos

animais, também observada por Pinna et al. (2011), explica o efeito da idade ($P=0,0085$) nesse presente estudo. Birgel Junior et al. (2001) também observou a diminuição significativa do número de hemácias no sangue de bovinos leiteiros de acordo com a idade.

Prado-Calixto et al. (2017) em um experimento com ovinos que receberam dietas com aditivos a base de própolis não observaram efeito da própolis sobre os parâmetros hematológicos (eritrócitos, hemoglobinas, hematócrito). Diferente do observado nesse estudo, Kupczyński et al. (2012) relataram o aumento no número de eritrócitos ($P<0,01$) durante a segunda semana de vida, em bezerros que receberam 4 mL/dia de extrato de própolis à 10%. Os autores também observaram que as maiores concentrações de ferro ocorreram nos animais suplementados com 4 mL/dia de própolis, concomitante com a tendência no aumento da contagem de células vermelhas no mesmo período. Dessa forma, não era esperado que a suplementação com EAP diminuísse a contagem de eritrócitos totais, devido sua capacidade antioxidante.

Figura 4.16 – Contagem total de eritrócitos ($\times 10^6/\mu\text{L}$) de acordo com a idade, por bezerros suplementados ou não com própolis vermelha.

Devido a atividade imunoestimulante da própolis, era esperado que a suplementação dos animais com EAP resultasse no incremento dos níveis de leucócitos no sangue. No entanto, diferente do esperado, a contagem de leucócitos totais não apresentou efeito para a suplementação de EAP. A contagem de leucócitos

totais apresentou apenas efeito da idade ($P=0,0396$), devido a variação observada durante as semanas de vida dos animais (Figura 4.17).

Figura 4.17 – Contagem total de leucócitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$) de acordo com a idade, por bezerros suplementados ou não com própolis vermelha.

Morsy et al. (2016) observaram o aumento na contagem de leucócitos em ovelhas Santa Inês suplementadas com própolis vermelha, o qual foi justificado pela presença de isoflavonoides no extrato de própolis, compostos responsáveis por ativar o sistema imune dos animais. O aumento da quantidade de leucócitos pode indicar um efeito imune-estimulante da própolis (NASSAR et al., 2012). No estudo realizado por Peravian et al. (2014) com o objetivo de investigar o efeito da própolis em pó nos metabolitos de bezerros leiteiros, foi observada tendência ($P=0,06$) do efeito do tratamento para contagem de glóbulos brancos. Segundo o estudo, animais que receberam 1 mL de própolis em pó solubilizado no leite tiveram maiores concentrações de leucócitos em comparação aos animais que receberam o aditivo monensina no concentrado inicial, ou os animais que receberam apenas 0,5 mL de própolis em pó solubilizados no leite. Os autores não observaram efeito de tratamento para outros parâmetros avaliados, como a contagem total de eritrócito, concentração de plaquetas e linfócitos. A própolis utilizada no experimento era proveniente da região do Irã.

Apesar dos isoflavonoides estarem presentes nas amostras de própolis, estes não apresentaram ação positiva na contagem de leucócitos totais. Embora sem efeito

significativo, os animais suplementados com EAP apresentaram valores numericamente menores da contagem de leucócitos totais, os quais podem ser explicados pela complexa atividade de imunodulação presente na própolis (FISHER et al., 2008), já que essa se mostrou benéfica para prevenir a diarreia em bezerros.

5 CONCLUSÕES

Apesar de não terem sido observados efeitos no desempenho e metabolismo, a própolis vermelha apresenta-se como alternativa natural para auxiliar na prevenção de diarreia em bezerros leiteiros e como consequência reduzir a utilização de antibióticos nos sistemas de criação de bezerras.

REFERÊNCIAS

- AGUIAR, C. L.; ALENCAR, S. M.; PAREDESGUZMÁN, J. F.; KOO, M. H.; PARK, Y. K. Caracterização físico-química das própolis originárias da região Mata Atlântica do Estado de Alagoas. **Mensagem Doce**, São Paulo, n. 27, p. 15-21, 2003.
- ALMEIDA, A. D.; YAMAGUCHI, L. C. T. Instrumentos de apoio e gerência em unidades de produção de leite. In: **SIMPÓSIO SOBRE A SUSTENTABILIDADE DA PECUÁRIA DE LEITE NO BRASIL**, Anais, Goiânia, p. 201-219, 1999.
- ALENCAR, S. M.; OLDONI, T. L. C.; CASTRO, M. L.; CABRAL, I. S. R.; COSTA-NETO, C. M.; CURY, J. A.; ROSALEN, P. L.; IKEGAKI, M. Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: Red propolis. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 113, n. 2, p. 278-283, 2007.
- AMOROS, M.; SAUVAGER, F.; GIRRE, L. e CORMIER, M. In vitro antiviral activity of propolis. **Apidologie**, v. 23, p. 231-240, 1992.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analyses of the Association of Official Analytical Chemists**. Arlington: AOAC, p. 500, 1990.
- BALASUNDRAM N.; SUNDRAM, K.; SAMMAN, S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: antioxidant activity, occurrence, and potential uses. **Food Chemistry**; v. 99, p. 191-203, 2006.
- BALDWIN, R.L.; McLEOD, K.R.; KLOTZ, J.L.; HEITMANN, R.N. Rumen development, intestinal growth and hepatic metabolism in the pre- and postweaning ruminant. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 87, p. E55-E65, 2004.
- BANKOVA, V.; CHRISTOV, R.; POPOV, S.; PUREB, O. e BOCARI, G. Volatile constituents of propolis. **Zeitschrift für Naturforschung**, v. 49c, p. 6-10, 1994.
- BANKOVA, V. Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. **Journal of Ethnopharmacology**, v.100, p.114-117, 2005.
- BANKOVA, V. Seasonal effect of Brazilian propolis on *Candida albicans* and *Candida tropicalis*. **Journal of Venomous Animals and Toxins**, v. 7, p. 139-144, 2001.
- BASNET, P.; MATSUNO, T. e NEIDLEIN, R. Potent Free Radical Scavenging Activity of Propol Isolated from Brazilian Propolis. **Zeitschrift für Naturforschung**, v. 52c, p. 828-833, 1997.
- BASTOS, E. M. A. F.; SIMONE, M.; JORGE, D. M.; SOARES, A. E. E.; SPIVAK, M. In vitro study of the antimicrobial activity of Brazilian propolis against *Paenibacillus* larvae. **Journal of Invertebrate Pathology**, Marceline, v. 97, n. 3, p. 273-281, 2008.
- BEAM, A. L.; LOMBARD, J. E.; KOPRAL, C. A.; GARBER, L. P.; WINTER, A. L.; HICKS, J. A.; SCHLATER, J. L. Prevalence of failure of passive transfer of immunity in newborn heifer calves and associated management practices on US dairy operations. **Journal of Dairy Science**, v. 92, p. 3973–3980. 2009.
- BEECHER, G.R. Overview of dietary flavonoids: nomenclature, occurrence and intake. **Journal of Nutrition**, v.133, n.10, p.3248S-3254S, 2003.

BENCHAAAR, C.; CALSAMIGLIA S.; CHAVES, A. V.; FRASER, G. R.; COLOMBATTO, D.; MCALLISTER, T. A.; BEUCHEMIN, K. A. A Review of plant-derived essential oils in ruminant nutrition and production. **Animal Feed Science and Technology**, v. 145 n.1-4, p. 209-228. 2008.

BENESI, F.J. Síndrome diarreia dos bezerros. **Revista CRMV-ES**, Vitória, v. 2, n. 3, p. 1013, 1999.

BERGE, A. C. B.; MOORE, D. A.; BESSER, T. E.; SISCHO, W. M. Targeting therapy to minimize antimicrobial use in preweaned calves: Effects on health, growth, and treatment costs. **Journal of Dairy Science**, v.92, p.4707–4714. 2009.

BIRGEL JUNIOR, E.H.; ANGELINO, J.L.; BENESI, F.J.; BIRGEL, E.H. Valores de referência do eritrograma de bovinos da raça Jersey criados no Estado de São Paulo. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 53, n.2, p. 1-9, 2001.

BISPO JUNIOR, W.; MIRANDA, E. O.; ALVINO, W.; ARAUJO, B., SILVAS, D. W.; PORFIRIO, Z. **Atividade antimicrobiana de frações da própolis vermelha de Alagoas, Brasil**. Semina: Ciências Biológicas e da Saúde, Londrina, v. 33, n. 1, p. 03-10. 2012.

BITTAR, C. M. M.; FERREIRA, L. S. Qualidade e composição de alimentos para o desenvolvimento ruminal de bezerras leiteiras. In: 1o. Simpósio de Nutrição de Bovinos de Corte e Leite, 2016, Dracena. **Anais do 1o. Simpósio de Nutrição de Bovinos de Corte e Leite**. Dracena: Unesp, 2016. v. 1. p. 78-92.

BORELLI F.; MAFFI, P.; PINTO, L.; IANARO, A.; RUSSO, A.; CAPASSO, F.; IALENTI, A. Phytochemical compounds involved in the anti-inflammatory effect of propolis extract. **Fitoterapia** 73, p.S53-S63. 2002.

BUENO-SILVA, B.; KAWAMOTO, D.; ANDO-SUGUIMOTO, E.; CASARIN, R. C. V.; ALENCAR, S. M.; ROSALEN, P. L.; MAYER, M. P. A. Brazilian red propolis effects on peritoneal macrophage activity: Nitric oxide, cell viability, pro-inflammatory cytokines and gene expression. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 207, p. 100-107. 2017.

BURDA, S. e OLESZEK, W. Antioxidant and Antiradical Activities of Flavonoids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 2774-2779, 2001.

BUTLER, J.E. Bovine immunoglobulins: An augmented review. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.4, n.1-2, p.43-152, 1983.

CAPASSO, F.; CASTALDO, S. Propolis, an old remedy used in modern medicine. **Fitoterapia** 73: S1-6. 2002.

COSTA, A. J. L.; KALE, P. L. Medidas de Frequência de Doença. In: MEDRONHO, R. A. et al. **Epidemiologia**. São Paulo, Atheneu, p. 13-30. 2009.

CASTRO, M. L.; CURY, J. A.; ROSALEN, P. L.; ALENCAR, S. M.; IKEGAKI, M.; DUARTE, S.; KOO, H.; **Química Nova**, v. 30, p. 1512, 2007.

CECILIANI, F. Anaemia and oxidative stress in calves: an ironclad problem? **Veterinary Record**, p. 263-264. September 9, 2017.

CONSTABLE, P.D. Use of antibiotics to prevent calf diarrhoea and septicemia. **Bovine Practitioner** v. 37, p. 137– 142, 2003.

CUETO, A. P.; ALVES, S. H.; PILAUL, M.; WEIBLENLL, M.; KUBILAÇ, F.; LOVATOL, L. T. Atividade antiviral do extrato de própolis contra o calicivírus felino, adenovírus canino 2 e vírus da diarreia viral bovina. **Ciência Rural**, v.41, n.10, out, 2011.

DAVIS, C.L.; DRACKLEY, J.K. **The development nutrition and management of the young calf**. Ames: Iowa State University Press, p. 339, 1998.

DASTIDAR, S.G.; MANNA, A.; KUMAR, K.A.; MAZUMDAR, K.; DUTTA, N.K.; CHAKRABARTY, A.N.; MOTOHASHI, N. e SHIRATAKI, Y. Studies on the antibacterial potenciality of isoflavones. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 23, p. 99-102, 2004.

DAUGSCH A.; MORAES, C. S.; FORT, P.; PARK, Y. K. Brazilian Red Propolis—Chemical Composition and Botanical Origin. **Evidence Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 5, n.4, p. 435-41. 2008.

DEBIAGGI, M., TATEO, F., PAGANI, L., LUINI, M. e ROMERO, E. Effects of propolis flavonoids on virus infectivity and replication. **Microbiologica**, v. 13, p. 207-213, 1990.

DEELEN, S. M.; OLLIVETT, T. L.; HAINES, D. M. et al. Evaluation of a Brix refractometer to estimate serum immunoglobulin G concentration in neonatal dairy calves. **Journal of Dairy Science**, v.97, p.3838-3844, 2014.

DENOBILO M. **Análise de resíduos dos antibióticos oxitetraciclina, clortetraciclina em leite, por cromatografia líquida de alta eficiência**. Dissertação - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo; 2002.

DESJEUX, J.F.; BRIEND, A.; BUTZNER, J.D. Oral rehydration solution in the year 2000: pathophysiology, efficacy and effectiveness. **Baillière's Clinical Gastroenterology**, Rotterdam, v. 11, p. 509-527, 1997.

DEVASAGAYAM, T.P.; TILAK, J.C.; BOLOOR, K.K.; SANE, K.S.; GHASKADBI, S.S.; LELE, R.D. Free radicals and antioxidants in human health: current status and future prospects. **Journal of the Association of Physicians of India**, v.52, p.794-804, 2004.

DINARELLO, C. A. Interleukins, tumor necrosis fator (cachectin), and interferons as endogenous pyrogens and mediators of fever. **Lymphokines** v.14, p.1-31. 1987.

DONNELLY, D.M.X.; KEENAN, P.J.; PRENDERGAST, J.P. Isoflavonoids of *Dalbergia ecastophyllum*. **Phytochemistry**; v.12, p.1157–1161. 1973.

DRACKLEY, J.K. Early growth effects on subsequent health and performance of dairy heifers. In: Garnsworthy, P.C. **Calf and heifer rearing: Principles of rearing the modern dairy heifer from calf to calving**. Nottingham: Nottingham University Press. chap. 12, p. 213-235, 2005.

DRACKLEY, J.K. **Calf nutrition from birth to breeding**. Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice, Philadelphia, v. 24, p. 55-86, 2008.

DUFFIELD T.F.; LEBLANC S.J. **Interpretation of serum metabolic parameters around the transition period**. Southwest Nutrition and Management Conference, Tempe, AZ, p.106-114. 2009.

FEITOSA, F.L.F.; BIRGEL, E.H.; MIROLA, R.M.S.; PERRI, S.H.V. Diagnóstico de falha de transferência de imunidade passiva em bezerros através da determinação de proteína total e de suas frações eletroforéticas, imunoglobulinas G e M e da atividade da gamaglutamiltransferase no soro sanguíneo. **Ciência Rural, Santa Maria**, v. 31, p. 251-255, 2001.

FERNANDES, L.B.; FRANZOLIN, R.; FRANCO, A.V.M.; CARVALHO, G. Aditivos orgânicos no suplemento concentrado de bovinos de corte mantidos em pastagem. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.9, n.2, p.231-238, 2008.

FIALA, M.; LIU, Q.N.; SAYRE, J.; POP, V.; BRAHMANDAM, V.; GRAVES, M.C. e VINTERS, H.V. Cyclooxygenase-2-positive macrophages infiltrate the Alzheimer's disease brain and damage the blood-brain barrier. **European Journal of Clinical Investigation**, v. 32, n. 5, p. 360-371, 2002.

FISHER, G.; HUBNER, S. O.; VARGAS, G. D.; VIDOR, T. IMUNOMODULAÇÃO PELA PRÓPOLIS. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.75, n.2, p.247-253. 2008

FROZZA, C.O.S; GARCIA, C.S.C.; GAMBATO, G.; SOUZA, M.D.; SALVADOR, M.; MOURA, S. Chemical characterization, antioxidant and cytotoxic activities of Brazilian red propolis. **Food and Chemical Toxicology**; v.52 p.137-42. 2013.

GALDINO M.C.; DOMINGUES P.F.; LAPENNA B.S. A produção de leite orgânico e aspectos de segurança alimentar. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 19, n.4, p. 490-50. 2012.

GHISALBERTI, E. L. **Propolis: A Review**, Bee World, v. 60, p. 59-84. 1979.

GODDEN, S. Colostrum management for dairy calves. **Veterinary Clinics of North America Food Animal Practice**, v.24, p.19–39. 2008.

GODDEN, S.M.; FETROW, J.P.; FEIRTAG, J.M.; GREEN, L.R.; WELLS, S.J. Economic analysis of feeding pasteurized nonsalable milk versus conventional milk replacer to dairy calves. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 226, n. 9, p. 1547-1554, 2005.

GONÇALVES, P. M. Epidemiologia e controle da tristeza parasitária bovina na região Sudeste do Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 30, n. 1, p.187-194, 2000.

GONZALEZ-MEJIA, A.; STYLES, D., WILSON, O., GIBBONS, J. Metrics and methods for characterizing dairy farm intensification using farm survey data. **PLOS ONE** 13(5): e0195286. 2018.

HANSEN, S.L.; ASHWELL, M.S.; MORSE, A.J.; FRY, R.S.; KNUTSON, M.D.; SPEARS, J.W. High dietary iron reduces transporters involved in iron and manganese metabolism and increases intestinal permeability in calves. **Journal of Dairy Science**, v. 93, p. 656–665. 2010.

HASHEMI, J. M..Biological Effect of Bee Propolis: A Review. **European Journal of Applied Sciences**, v.8, n.5, p. 311-318. 2016.

HAVSTEEN, B. H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 96, p. 67–202. 2002.

HAYASHI, H.; KAWAI, M.; NONAKA, I.; TERADA, F.; KATOH, K.; OBARA, Y. Developmental changes in the kinetics of glucose and urea in Holstein calves. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 89, p. 1654–1661, 2006.

HEINRICHS, J. How disease, management, and nutrition of the calf may affecting first lactation and lifetime milk production and age of cows when removed from the herd. In: Simpósio Internacional Leite Integral, 1. Belo Horizonte: **Revista Leite Integral**, p. 36-4. 2011.

HEINRICHS, A.J.; JONES, C.M.; HEINRICHS, B.S. Effects of Mannan Oligosaccharide or Antibiotics in Neonatal Diets on Health and Growth of Dairy Calves. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.86, p. 4064-4069, 2003.

HEINRICHS, A.J.; ERB, H.N.; ROGERS, G.W.; COOPER, J.B.; JONES, C.M. Variability in Holstein heifer heart-girth measurements and comparison of prediction equations for live weight. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, v. 78, p. 333-338, 2007.

HEINRICHS, A. J.; HEINRICHS, B. S. A prospective study of calf factors affecting first-lactation and lifetime milk production and age of cows when removed from the herd. **Journal of Dairy Science**, v. 94 p.336–341. 2011.

HEINZEN E. L., COSENDEY E. T. M. P., JARDIM J. G. Júlia GARCIA R. C., OLIVEIRA N. T. E., OLIVEIRA R. Extract of propolis in the control of helminthiasis in calves - **Acta Veterinaria Brasilica**, v.6, n.1, p.40-44, 2012.

HINTON, M.; RIXSON, P.D.; ALLEN, V.; LINTON, A.H. The persistence of drug resistant *Escherichia coli* strains in the majority faecal flora of calves. **Journal of Hygiene**, v. 93, p.547–557. 1984.

HUANG, W. Y.; CAI, Y. Z.; ZHANG, Y. Natural phenolic compounds from medicinal herbs and dietary plants: potential use for cancer prevention. **Nutrition and Cancer**; v. 62 p. 1-20. 2010.

HUGI, D.; BRUCKMAIER, R. M.; BLUM, J. W. Insulin resistance, hyperglycemia, glucosuria, and galactosuria in intensively milk-fed calves dependency on age and effects of high lactose intake. **Journal of Animal Science** v. 75 p.469–482. 1997.

HULBERT, L. E.; MOISÁ, S. J. Stress, immunity and the management of calves. **Journal of Dairy Science** v. 99 p. 3199-3216. 2015.

JASPER, J.; WEARY, D.M. Effects of ad libitum milk intake on dairy calves. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 85, p. 3054–3058, 2002.

JEZEK, J.; NEMEC, M.; STARRIC, J.; KLINKON, M. Age relates chances and reference intervals of haematological variables in dairy calves. **Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy**, Pulawy, v. 55, p. 471-478, 2011.

JHONSON, R. W. The physiology of immunology: what happens when animals get sick? In: **Dairy Calves and Heifers, integrating biology and management**. Natural Resource, Agriculture and Engineering Service, NRAES 175. p.32-40. 2005.

JOHNSON, J. L.; GODDEN, S. M.; MOLITOR, T.; AMES, T.; HAGMAN, D. Effects of feeding heat-treated colostrum on passive transfer of immune and nutritional parameters in neonatal dairy calves. **Journal of Dairy Science**, v.90, p. 5189–5198. 2007.

JOHNSTON, R.; BUESNEL, D.; MORAN, J. **Growing heifers**. Sydney: NSW Agriculture, 2008. p. 1.1-3.6.

KANEKO, J.J.; HARVEY, J.W., BRUSS, M.L. **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**, 6th ed. Elsevier-Academic Press, Amsterdam. 2008.

KASARI, T.R.; NAYLOR, J.M. Further studies on the clinical features and clinicopathological findings of a syndrome of metabolic acidosis with minimal dehydration in neonatal calves. **Canadian Journal of Veterinary Research**, Ottawa, v. 50, n. 2, p. 502–508, 1986.

KIRKLEY, S.A. Proposed mechanisms of transfusion-induced immunomodulation. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v.6, n.5, p.652-657, 1999.

KLUGER, M. J. Fever: role of pyrogens and cryogens. **Physiol. Ver**, v.71, p. 93-127. 1991.

KLUGER, M. J.; RINGLER, D. H.; ANVER, M. R. Fever and survival. **Science** v. 188, p.166-168. 1991.

KNOWLES, T.G.; EDWARDS, J.E.; BAZELEY, K.J.; BROWN, S.N.; BUTTERWORTH, A.; WARRISS, P.D. Changes in the blood biochemical and haematological profile of neonatal calves with age. **Veterinary Record**, London, v. 147, n. 21, p. 593-598, 2000.

KOLE, L.; GIRI, B.; MANNA, S.K.; PAL, B.; GHOSH, S. Biochanin-A, an isoflavon, showed anti-proliferative and anti-inflammatory activities through the inhibition of iNOS expression, p38-MAPK and ATF-2 phosphorylation and blocking NFkB nuclear translocation. **European Journal of Pharmacology**, v. 653, p. 8-15. 2011.

KOO, M.H. e PARK, Y.K. Investigation of Flavonoid Aglycones in Propolis Collected by Two Different Varieties of Bees in the Same Region. **Bioscience Biotechnology Biochemistry**, v. 61, p. 367-369, 1997.

KOSALEC, I; PEPELNKAJ, S.; BAKMAZ, M., VLADMIR-KNEZEVIC, S. Flavonoid analysis and antimicrobial activity of commercially available propolis product. **Acta Pharmaceutica** v. 55 p. 423-430. 2005.

KOZLOSKI, G.V. **Bioquímica dos ruminantes**. Santa Maria: Editora da Universidade Federal de Santa Maria, p.140. 2002.

KREHBIEL, C.R.; RUST, S.R.; ZHANG, G.; GILLILAND, S.E. Bacterial direct-fed microbials in ruminant diets: Performance response and mode of action. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 81, n. 2, p. 120-132, 2003

KROL, W.; SCHLLER, S.; CZUBA, Z. Inhibition of neutrophils chemiluminescence by ethanol extract of propolis (EEP) and phenolic components. **Journal of Ethnopharmacology**, v.55, p.19-25, 1996.

KROL, W.; SCHELLER, S.; SHANI, J.; PIETSZ, G.; CZUBA, Z. Synergistic effect of ethanolic extract of propolis and antibiotics on the growth of *Staphylococcus aureus*. **Arzneimittelforschung**, v.43, n.5, p.607-609, 1993.

KUJUMGIEV, A.; TSVETKOVA, I.; SERKEDJIEVA, Y.; BANKOVA, V.; CHRISTOV, R. e POPOV, S. Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 64, p. 235-240, 1999.

KUMAZAWA, S., HAMASAKA, T. e NAKAYAMA, T. Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. **Food Chemistry**, v. 84, p. 329-339, 2004.

KUPCZNI, R.; ADAMSKI, M.; FALTA, D.; ROMAN, A. The efficiency of propolis in post-colostral dairy calves. **Archiv Tierzucht** 55 v. 4, p. 315-32. 2012.

LARSON, L.L.; OWEN, F.G.; ALBRIGHT, J.L.; APPLEMAN, R.D.; LAMB, R.C.; MULLER, L.D. Guidelines toward more uniformity in measuring and reporting calf experimental data. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 60, n. 6, p. 989-991, 1977.

LEAL, M.L.R.; CYRILLO, F.C.; MORI, C.S.; MICHIMA, L.E.S.; NICHII, M.; ORTOLANI, E.L.; BENESI, F.J. Modelo de indução de diarreia osmótica em bezerros holandeses. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 6, p. 1650-1657, 2008.

LIENER, I.E. Toxins in cow's milk and human milk. **Journal of Nutritional and Environmental Medicine**. v. 12 p.175-86. 2002.

LIMA, M.G. **A produção de própolis no Brasil**. São João da Boa Vista: São Sebastião Editora e Gráfica. 2006.

LOFTY, M. Biological Activity of Bee Propolis in Health and Disease. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 7. 2006.

LOZOYA, X.; REYNES-MORALES, H.; CHÁVEZ-SOTO, M. A.; del CARMEN M.; SOTO-GONZÁLEZ, Y.; DOUBOVA, S. V. Intestinal anti-spasmodic effect of a phytodrug of *Psidium guajava* folia in the treatment of acute diarrheic disease. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 83, n. 1, p. 19–24. 2002.

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

LUSTOSA, S. R., GALINDO, A. B., NUNES, L. C. C., RANDAU, K. P., NETO, P. J. R. Própolis: atualizações sobre a química e a farmacologia. **Revista Brasileira de Farmacognosia Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.18, n.3, p. 447-454. 2008.

MACHADO, P.R.L.; ARAUJO, M.I.A.S.; CARVALHO, L.; CARVALHO, E.M. Mecanismos de resposta imune às infecções. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, Rio de Janeiro, v. 79, n. 6, p. 647-664, 2004.

MAGALHÃES, H.; FREITAS, M.A.Q.; GONÇALVES, W.M.; SANTOS, J.A.; MEDEIROS, M.I.M.; COSTA, C.H.C.; VOLLU, E.W. Ocorrência, aspectos bacteriológicos e histopatológicos na colibacilose de bezerros. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 26, p. 555-564, 1991.

MAKASHVILI, Z.A. From the history of propolis. In: **Remarkable hive product: Propolis**. Scientific data and suggestions concerning its composition, properties and possible use in therapeutics. APIMONDIA standing commission on beekeeping technology and equipment, Bucharest. 1978.

MARCUCCI, M.C. Propriedades biológicas e terapêuticas dos constituintes químicos da própolis. **Química Nova**, v. 19, p. 529-536. 1996.

MARCUCCI, M. C. et al. Phenolic compounds from Brazilian propolis with pharmacological activities. **Journal of Ethnopharmacology**, Clare, v.74. n.2, p.105-112, 2001.

MARQUELE, F.D.; D I MAMBRO, V.M.; GEORGETTI, S.R.; CASAGRANDE, R.; VALIM, Y.M.; Fonseca, M.J. Assessment of the antioxidant activities of Brazilian extracts of propolis alone and in topical pharmaceutical formulations. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.39, n.3/4, p.455-462, 2005.

MENEZES, H. 2005. PRÓPOLIS: UMA REVISÃO DOS RECENTES ESTUDOS DE SUAS PROPRIEDADES FARMACOLÓGICAS. **Arquivo do Instituto Biológico**, São Paulo, v.72, n.3, p.405-411. 2005

MELLO-PEIXOTO E.C.T.; GARCIA R.C.; DOMINGUES P.F. & ORSI R.O. Utilização de Própolis na Saúde Animal. **Scientia Agricola**, v. 8, p.05-24. 2009.

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

MIORIN, P.L.; LEVY, N.C.J.; CUSTODIO, A.R.; BRETZ, W.A; MARCUCCI, M.C. Antibacterial activity of honey and propolis from *Apis mellifera* and *Tetragonisca angustula* against *Staphylococcus aureus*. **Journal of Applied Microbiology**. v. 95, p. 913-20. 2003.

MOHRI, M.; SHARIFI, K.; EIDI, S. Hematology and serum biochemistry of Holstein dairy calves: Age related changes and comparison with blood composition in adults. **Research in Veterinary Science**, v. 83 p. 30–39. 2007.

MONTPIED, P.; DE BOCK, F.; RONDOUIN, G. et al. Caffeic acid phenethyl ester (CAPE) prevents inflammatory stress in organotypic hippocampal slice cultures. **Molecular Brain Research**, v.115, n.2, p.111- 120, 2003.

MORSY, A.S., SOLTAN, Y.A., SALLAM, S.M.A., KREUZER, M., ALENCAR, S.M., ABDALLA, A.L. Comparison of the in vitro efficiency of supplementary bee propolis extracts of different origin in enhancing the ruminal degradability of organic matter and mitigating the formation of methane. **Animal Feed Science and Technology**, v.199, p. 51–60. 2015.

MOT, D.; TÎRZIU, E.; NICHITA, I. Study of bactericidal properties of propolis. Scientific Papers: **Animal Science and Biotechnologies**, Timisoara, v. 47, n. 1, p. 256–259, 2014.

NAFIKOV, R.A.; BEITZ, D.C. Carbohydrate and lipid metabolism in farm animals. **The Journal of Nutrition**, Rockville, v. 137, p. 702-705, 2007.

NANI, B. D.; FRANCHIN M.; LAZARINI, J. G.; FREIRES, I. A., da CUNHA M. G.; BUENO SILVA B.; ALENCAR, S. M.; MURATA, R. M.; ROSALENN, P. L. Isoflavonoids from Brazilian red propolis down-regulate the expression. Of câncer-related target proteins: A pharmacogenomic analysis. **Phytotherapy Research**, v. 32, n.4, p.750-754. 2018.

NASSAR, S.A.; MOHAMED, A.H.; SOUFY, H. et al. Immunostimulant effect of Egyptian propolis in rabbits. **The Scientific World Journal**, v.2012, p.1-9. 2012.

NAYLOR, J. M. Oral Electrolyte Therapy. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 15, n.3, p.487-504. 1999.

NIJVELDT, R.J.; NOOD, E.V.; HOORN, D.V. BOELEN, P.G.; NORREN, K.V.; LEEUWEN, P.V. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 74, p. 418 – 425. 2001.

NUNES, L.C.; GALINDO, A.B.; DEUS, A.S.O.; RUFINO, D.A.; RANDAU, K.P.; XAVIERM, H.S. Variabilidade sazonal dos constituintes da própolis vermelha e bioatividade em *Artemia salina*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**; v.19 p. 524-9. 2009.

OHISHI, S. Evaluation of time course and inter-relationship of inflammatory mediators in experimental inflammatory reaction. *Yakugaku zasshi*: **Journal of the Pharmaceutical Society of Japan**, v. 120, p. 455-462, 2000.

ORSI, R.O.; FUNARI, S.R.C.; SOARES, A.M.V.C.; CALVI, S.A.; OLIVEIRA, S.L.; SFORCIN, J.M.; BANKOVA, V. Immunomodulatory action of propolis on macrophage activation. **Journal of Venomous Animals and Toxins**, v.6, n.2, p.205-219, 2000.

ORSI, R.O.; SFORCIN, J.M.; FUNARI, S.R.C. e BANKOVA, V. Effects of Brazilian and Bulgarian propolis on bactericidal activity of macrophages against *Salmonella Typhimurium*. **International Immunopharmacology**, v. 5, p. 359-368, 2005.

ORSI, R. O.; SFORCIN, J. M.; RALL, V. L. M.; FUNARI, S. R. C., BARBOSA, L., FERNANDES, J. R. A. Susceptibility profile of *Salmonella* against the antibacterial activity of propolis produced in two regions of Brazil. **J. Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**. v.11, n.2, p.109-116, 2005.

ORSOLIC, N.; BASIC, I. Immunomodulation by water-soluble derivative of propolis: a factor of antitumor reactivity. **Journal of Ethnopharmacology**, v.84, p.265-273, 2003.

PADUCH, R.; KANDERFER-SZERSZEN, M.; TRYTEK, M. Tepenes: substances useful in human healthcare. **Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis**, v. 55, p. 315-327. 2007

PAULETTI, P.; MACHADO NETO, R.; PACKER, I.U.; BESSI, R. Avaliação de níveis séricos de imunoglobulina, proteína e o desempenho de bezerras da raça Holandesa. **Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília**, v. 37, p. 89-94, 2002.

PARK, Y.K.; ALENCAR, S.M.; SCAMPARINE, A. R. P.; AGUIAR, C.L. Própolis produzida no sul do Brasil, Argentina e Uruguai: Evidências físico-químicas de sua origem vegetal. **Ciência Rural**, v. 2, p. 997-1003. 2002.

PARK, Y. K.; Ikegaki, M. H.; ALENCAR, S. M. Classification of Brazilian propolis by physicochemical method and biological activity. **Mensagem Doce**, São Paulo, n. 58, p. 2-7, 2000.

PERAVIAN, P.; REZAVAZDI, K.; NEHZATI, G. **Effect of propolis on plasma metabolites and hematocrit of Holstein calves** Conference: 2014 ADSA-ASAS-CSAS Joint Annual Meeting July, 2014.

PERAVIAN, P.; REZAVAZDI, K.; NEHZATI, G. **The effect of soluble propolis in milk on the performance of Holstein suckling calves** Conference 2014 ADSA – ASAS – CSAS Joint Annual Meeting July, 2014.

PEREIRA, A.S.; SEIXAS, F.R.M.S.; AQUINO, N.F.R. Própolis: 100 anos de pesquisa e suas perspectivas futuras. **Química Nova** v.25, p. 321-326. 2002.

PHILLIPS, I.; CASEWELL, M.; COX, T.; GROOT, B.; FRIIS, C.; JONES, R.; NIGHTINGALE, C.; PRESTON, R.; WADDELL, J. Does the use of antibiotics in food animals pose a risk to human health? A critical review of published data **Journal of Antimicrobial Chemotherapy** n. 53, p. 28–52. 2004.

PICCINELLI, A.L.; FERNANDES, M.C.; CUESTO-RUBIO, O.; HERNANDEZ, I.M.; de SIMONE, F.; RASTRELLI, L. Isoflavonoids Isolated from Cuban Propolis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.53, p. 9010–9016. 2005.

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

POPOVA, M.; BANKOVA, V.; NAYDENSKY, CH.; TSVETKOVA, I.; KUJUMGIEV, A. Comparative study of the biological activity of própolis from different geographic origem: a statistical approach. **Macedonian Pharmaceutical Bulletin**, v.50, p.9-14, 2004.

PRADO-CALIXTO, M. O. P.; MIZUBUTI, I. Y.; RIBEIRO, E. L. A.; PEREIRA, E. S.; SILVA, R. T.; CORLETTTO, N. L.; PEIXOTO, E. L. T.; CARVALHO, L. N.; NIHEI, A. K.; MASSARO JUNIOR, F. L.; SILVA, L. D. F.; SILVA, GALBEIRO, S. Comportamento ingestivo e parâmetros sanguíneos em ovinos que receberam dietas contendo aditivos à base de extratos de própolis em pó. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v.69, n.2, p.381-390, 2017 .

QUIGLEY, J.D., DREWRY, J.J., MURRAY, L.M., IVEY, S.J. Body weight gain, feed efficiency, and faecal scores of dairy calves in response to galactosyl-lactose or antibiotics in milk replacers. **Journal of Dairy Science**. v. 80, p. 1751–1754. 1997.

QUIGLEY, J.D.; SMITH, Z.P.; HEITMANN, R.N. Changes in plasma volatile fatty acids in response to weaning and feed intake in young calves. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 74, p. 258-263, 1991.

QUIGLEY, J.D.; MARTIN, K.R.; BEMIS, D.A.; POTGIETER, L.N.; REINEMEYER, C.R.; ROHRBACH, B.W.; DOWLEN, H.H.; LAMAR, K.C. Effects of housing and colostrum feeding on the prevalence of selected infectious organisms in feces of Jersey calves. **Journal of Dairy Science**. Champaign, v.77, p. 3124-3131, 1994.

QUIGLEY, J.D.; WOLFE, T.A.; ELASSER, T.H. Effects of additional milk replacer feeding on calf health, growth and selected blood metabolites in calves. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.89, p.207-216, 2006.

REZENDE, G.P.S.R.; PIMENTA, F.C.; COSTA, L.R.R.S. Antimicrobial activity of two Brazilian commercial propolis extracts. **Brazilian Journal of Oral Science** n.5, p. 967-970. 2006.

ROCHA, L.; DOS SANTOS, L.R.; ARCENIO, F.; CARVALHO, E. S.; LÚCIO, E.M.R.A.; ARAÚJO, G.L.; TEIXEIRA, L.A.; SHARAPIN, N. Otimização do processo de extração de própolis através da verificação da atividade antimicrobiana. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, n. 13, p.71-74. 2003.

RUFATTO, L. C.; SANTOS, D. A.; MARINHO, F.; HENRIQUES, J. A. P.; ELY, M. R.; MOURA, S. Red propolis: Chemical composition and pharmacological activity. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**; v.7, n.7, p. 591–598, 2017.

RUFER, C.E.; KULLING, S.E. Antioxidant activity of isoflavones and their major metabolites using different in vitro assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 54, p. 2926–2931, 2006.

RUSSELL, J.B.; STROBEL, H.J. Minireview: effect of ionophores on ruminal fermentation. **Applied and Environmental Microbiology**, v.55, n.1, p.1-6, 1989.

RUSO, A.; LONGO, R, VANELLA A. The role of the phenethyl ester of caffeic acid (CAPE) in the inhibition of rat lung cyclooxygenase activity by propolis. **Fitoterapia**, v.73, p.S30-S37, 2002.

SAHINLER, N.; KAFTANOGLU, O. Natural product propolis: chemical composition. **Natural Product Research**, v.19, n.2, p.183-188, 2005.

SALATINO, A.; T EIXEIRA, E.W.; NEGRI, G.; MESSAGE, D. Origin and Chemical Variation of Brazilian Propolis. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v.2, n.1, p.33-38, 2005.

SANTOS, G.; BITTAR, C. M. M. A survey of dairy calf management practices in some producing regions in Brazil. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 44, n. 10, p. 361-371. 2015.

SANTOS, F. H. R. **Avaliação de óleos essenciais e sua via de fornecimento na alimentação de bezerros leiteiros**. Dissertação de Mestrado – Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2013.

SCAZZOCCHIO, F.; D'AURIA F. D.; ALESSANDRINI, D.; PANTANELLA, F. Multifactorial aspects of antimicrobial activity of propolis. **Microbiological Research** n.4, p. 327-333. 2005.

SCHELLER, S.; KROL, W.; SEDLACZEK, R.; ZYDOWICZ, G.; WOJCIK, L. e SHANI, J. Ethanolic extract of propolis (EEP), a natural antioxidant, prolongs life span of male and female mice. **Pharmacology**, v. 3, p. 123-125, 1994.

SELEM, A. S. M. A. **Efeito da própolis sobre a fermentação ruminal, desempenho reprodutivo e produtivo de ovelhas Santa Inês**. Dissertação de Mestrado – Universidade de São Paulo; Piracicaba, 2012.

SFORCIN, J.M.; ORSI, R.O.; BANKOVA, V. Effect of propolis, some isolated compounds and its source plant on antibody production. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 98, p. 301-305, 2005.

SFORCIN, J.M.; FERNANDES JUNIOR, A.; LOPES, C.A.; BANKOVA, V.; FUNARI, S.R. Seasonal effect on Brazilian propolis antibacterial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v.73, n.1-2, p.243-249, 2000.

SHINGU, H.; HAYASHI, H.; TOUNO, E.; OSHIBE, A.; KUSHIBIKI, S.; ODA, S.; KATOH, K.; OBARA, Y. Characteristics of developmental changes in the kinetics of glucose and urea in Japanese Black calves: Comparison with Holstein calves. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 85, p. 2910–2915, 2007.

SIGAL, L.H. e RON, Y. **Immunology and inflammation: basic mechanisms and clinical consequences**, p. 760, Mcgraw-Hill, New York. 1994.

SILVA, B. B.; ROSALEN, P. L.; CURY, J. A., IKEGAKI, M., SOUZA, V. C., ESTEVES, A. SEVERINO, M. A. Chemical Composition and Botanical Origin of Red Propolis, a New Type of Brazilian Propolis. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 5, n.3, p. 313-316. 2007.

SILICI, S. e KUTLUCA, S. Chemical composition and antibacterial activity of propolis collected by three different races of honeybees in the same region. **Journal of ethnopharmacology**, v. 99, p. 69-73, 2005.

SOARES, M. C. **Diarreia e acidose metabólica em bezerros leiteiros: efeitos da composição do concentrado inicial e avaliação de probiótico**. Dissertação de Mestrado – Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2013.

SOARES, J.P.G.; AROEIRA, L.J.M.; FONSECA, A.H.F.; FAGUNDES, G.M., SILVA, J.B. **Produção orgânica de leite: Desafios e perspectivas**. In: Marcondes, M.I. et al., (Org.). Anais do III Simpósio Nacional de Bovinocultura Leiteira e I Simpósio Internacional de Bovinocultura Leiteira. 1 ed. VIÇOSA: Suprema Gráfica e Editora, 2011, v.1, p. 13-43.

SOUFY, H.; EL-BEIH, N. E.; NARS, S. M.; EL-AZIZ, T. H. A.; KHALIL, F. A. M.; AHMED, Y. F.; ZEINA, A. H. A. Effect of Egyptian propolis on cryptosporidiosis in immunosuppressed rats with special emphasis on oocysts shedding, leukogram, protein profile and ileum histopathology. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**. v. 10, n. 3, p. 253-262. 2017.

STOLTENOW, C. L.; VINCENT, L. L. Calf Scours – Causes, Prevention, Treatment. **NDSU Extension Service**, p. 300-303. 2003.

STRADIOTTI, J., D.; QUEIROZ, A.C.; LANA, R.P. GAMA, P.C.; CAMARDELLI, M.M.L.; DETMANN, E. **Ação do extrato de própolis sobre a fermentação in vitro de diferentes alimentos**. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 38. Piracicaba. Anais Piracicaba, SP., 2001.

STRADIOTTI, J. D.; QUEIROZ, A.C.; LANA, R.P.; PACHECO, C.G.; CAMARDELLI, M.M.L.; EIFERT, E.C.; NUNES, P.M.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, 2004a.

STRADIOTTI, J.D.; QUEIROZ, A.C.; LANA, R.P. Ação da própolis sobre a desaminação de aminoácidos e a fermentação ruminal. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.33, n.4, p.1086-1092, 2004b.

STERGIADIS, S.; LEIFERT, C.; SEAL, C.; EYRE, M.; NIELSE, J.; METTE, K.; SLOTS, T.; STEINSHAMN, H.; BUTLER, G. Effect of Feeding Intensity and Milking System on Nutritionally Relevant Milk Components in Dairy Farming Systems in the North East of England. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, n.60, p. 7270–7281. 2012.

SVENSSON, C., LUNDBORG, K., EMANUELSON, U., OLSSON, S. O. Morbidity in Swedish dairy calves from birth to 90 days of age and individual calf-level risk factors infectious diseases. **Preventive Veterinary Medicine**. n. 58, p. 179-197. 2003.

TIKOSFSKY, L. L.; BARLOW, J. W.; SANTISTEBAN, C.; SCHUKKEN, Y. H. A comparison of antimicrobial susceptibility patterns for *Staphylococcus aureus* in organic and conventional dairy herds. **Microbial Drug Resistance**, v.9, n.1, p.39-45. 2003.

TIZARD, I. R. **Imunologia Veterinária**. 5th ed. Rocca, São Paulo, Brazil. 1998.

TOSI, B., DONINI, A., ROMAGNOLI, C. e BRUNI, A. Antimicrobial activity of some commercial extracts of propolis prepared with different solvents. **Phytotherapy research: PTR**, v. 1014, p. 335-336, 1996.

TOZER, P.R.; HEINRICHS, A.J. What affects the cost of raising replacement dairy heifers: a multiple-component analysis. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 84, p. 1836-1844, 2001.

TRAYNOR, J.; MACTIER, R.; GEDDES, C.C.; FOX, J.G. How to measure renal function in clinical practice. **British Medical Journal**, London, v. 333, p. 733-737, 2006.

TRUSHEVA, B.; POPOVA, M.; BANKOVA, V.; SIMOVA, S.; MARCUCCI, M. C.; MIORIN, P. L.; PASIN, F. R.; TSVETKOVA, I. Bioactive constituents of Brazilian red propolis. **Evid Based Complement Alternat. Med.**, n.2, v.2, p. 249-254.2006.

UGUR, A.; BARLAS, M.; CEYHAN, N.; TURKMEN, V. Antimicrobial Effects of Propolis Extracts on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* Strains Resistant to Various Antibiotics and Some Microorganisms. **Journal of Medicinal Food**, v. 3, n.4. 2000.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. **Heifer calf health and management practices on U.S. dairy operations**. Fort Collins, p. 129-132. 2007.

UZEL, A., SORKUN, K., ÖNÇAG, Ö., ÇOGULO, D., GENÇAY, Ö, SALIH, B. Chemical compositions and antimicrobial activities of four different Anatolian propolis samples. **Microbiological Research**, n.160, p. 189-195. 2005.

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

VOLPI, N, BERGONZINI, G. Analysis of flavonoids from propolis by on-line HPLC-electrospray mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis** v.42, p.354-361. 2006.

VOLTARELLI, J. C. Febre e Inflamação. **Medicina, Ribeirão Preto**, v. 27, n.1/2, p. 4-48. 1994.

WALKER, W. L.; EPPERSON, W. B.; WITTUM, T. E.; LORD, L. K.; RAJALA-SCHULTZ, P. J.; LAKRITZ, J. Characteristic of dairy calf ranches: morbidity, mortality, antibiotic use practices, and biosecurity and biocontainment practices. **Journal of Dairy Science**, v. 95, n. 4, p. 2204 – 2214. 2012.

WALTNER-TOEWS, S.W.; MARTIN, S.W., MEEK, A.H. The effect of early calfhood health status on survivorship and age at first calving. **Canadian Journal of Veterinary Research**. Ottawa, v.50, p. 314-317, 1986.

WEAVER, D. M.; TYLER, J. W.; VANMETRE, D. C.; HOSTELER, D. E.; BARRINGTON, G. M. Passive transfer of colostral immunoglobulins in calves. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 14, p.569 – 577. 2000.

WEISS, W.P. Predicting energy values of feeds. In SYMPOSIUM: PREVAILING CONCEPTS IN ENERGY UTILIZATION BY RUMINANTS. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 76, p. 1802-1811, 1993.

WELLER, R.; DAVIES, D. W. R. Somatic cell count and incidence of clinical mastitis in organic milk production. **Veterinary Record**, v.143, p. 365-366. 1998.

WIERUP, M.; LARSSON, K.; HOLTENIUS, P.; JACOBSSON, S.O.; MEANSSON, I. The effect of antibiotic supplementation on antibiotic resistance, transferable antibiotic resistance, morbidity, and growth in calves. **Nordisk Veterinärmedicin**, v. 27, p.253–265. 1975.

WILLIAMS C.M. Nutritional quality of organic food: shades of grey or shades of green? **Proceedings of the Nutrition Society**., v.61, p.19-24. 2002.

YAGHOUBI, S. J.; GHORBANI G. R.; RAHMANI H. R.; NIKKAH A. Growth, weaning performance and blood indicators of humoral immunity in Holstein calves fed supplemental flavonoids **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 92, p. 456- 462. 2007.

YUCEL B.; ONENC A.; KAYA A.; ALTAN O. Effects of Propolis Administration on Growth Performance and Neonatal Diarrhea of Calves. **SOJ Veterinary Science** v. 1, n. 1, p. 102. 2015.