Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"

# Estratégias alimentares para redução das taxas de morbidade em bezerros leiteiros

Marina Gavanski Coelho

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

Piracicaba
2023

Marina Gavanski Coelho
Médica Veterinária

# Estratégias alimentares para redução das taxas de morbidade em bezerros leiteiros

versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador:
Profa. Dra. CARLA MARIS MACHADO BITTAR

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

Piracicaba
2023

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

Coelho, Marina Gavanski

Estratégias alimentares para redução das taxas de morbidade em bezerros leiteiros / Marina Gavanski Coelho. - - versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2023.

89 p.

Tese (Doutorado) - - USP / Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. Leite acidificado 2. Diarreia 3. Microbioma fecal 4. Óleos essenciais I. Título

Ao meu marido João Pedro e meu filho José.

**Dedico**

# AGRADECIMENTOS

A Deus, a Ele toda honra e toda glória.

À minha família pelo apoio e incentivo. Por entenderem minha ausência e por se fazerem presentes apesar da distância.

À profª Carla pelos anos de orientação, serei sempre uma admiradora de sua dedicação e de seu trabalho. Tenho orgulho de ter feito parte de seu grupo por todos esse anos.

Aos meus colegas do CCB. Nesses 7 anos de bezerreiro conheci muitas pessoas especiais que nem caberiam aqui, e sou grata a cada uma delas.

À todos os estagiários externos que foram cruciais para o andamento dos trabalhos no campo.

À Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"e ao Departamento de Zootecnia pela oportunidade de realização deste curso.

Aos meus colegas e antigos professores e orientadores da saudosa UNICENTRO que continuaram a me ajudar e aconselhar durante todos esses anos de pós-graduação.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão das bolsas de estudos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo financiamento do projeto de pesquisa.

À empresa Biochem pelo financiamento parcial do experimento 2, em especial ao Dr. Ricardo Manzano pelo auxílio e acompanhamento da pesquisa.

A todos que, de alguma forma, colaboraram para a realização deste trabalho.

Muito obrigada!

*Faz o que deves e está no que fazes.*

*Fazei tudo por Amor – Assim não há coisas pequenas: tudo é grande. – A perseverança nas pequenas coisas, por Amor, é heroísmo.*

São Josemaria Escrivá

SUMÁRIO

RESUMO ..... 8
ABSTRACT ..... 9
1. INTRODUÇÃO ..... 11
Referências ..... 12
2. REVISÃO DE LITERATURA ..... 15
2.1. Morbidade e principais doenças ..... 15
2.2. Nutrição no período de aleitamento ..... 18
2.3. Estratégias alimentares para redução de morbidade e aumento de desempenho ..... 23
Referências ..... 29
3. ESTUDO COMPARATIVO DE DIFERENTES DIETAS LÍQUIDAS PARA BEZERROS LEITEIROS E SEU IMPACTO NO DESEMPENHO E COMUNIDADE MICROBIANA DURANTE EPISÓDIOS DE DIARREIA ..... 42
Resumo ..... 42
Abstract ..... 42
3.1. Introdução ..... 43
3.2. Material e Métodos ..... 44
3.3. Resultados ..... 51
3.4. Discussão ..... 57
3.5. Conclusão ..... 61
Referências ..... 63
4. AVALIAÇÃO DA SUPLEMENTAÇÃO DA DIETA LÍQUIDA COM *BLEND* DE ÓLEOS ESSENCIAIS NO DESEMPENHO E SAÚDE DE BEZERROS LEITEIROS ..... 67
Resumo ..... 67
Abstract ..... 67
4.1. Introdução ..... 68
4.2. Material e Métodos ..... 69
4.3. Resultados ..... 73
4.4. Discussão ..... 78
4.5. Conclusão ..... 81
Referências ..... 84
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS ..... 87

APÊNDICES ..... 89

# RESUMO

## Estratégias alimentares para redução das taxas de morbidade em bezerros leiteiros

As doenças infecciosas, em especial a diarreia e as broncopneumonias, são importantes causas de morbidade e mortalidade de bezerros em todo o mundo. As perdas econômicas vão desde a perda dos bezerros, diminuição do desempenho e produção futura, até gastos excessivos com medicamentos muitas vezes utilizados de forma errada ou desnecessária. O uso de antimicrobianos de forma terapêutica ou profilática têm sido cada vez mais questionada, bem como o uso de aditivos antimicrobianos já foram proibidos em diversos países para combater a resistência de microrganismos, um problema de saúde pública. Desta forma, a pesquisa por métodos naturais de profilaxia de doenças e melhora do desempenho são cada vez mais necessárias. No primeiro estudo, foi avaliado o efeito de três dietas líquidas no bdesempenho, incidência de diarreia e comunidade microbiana durante a ocorrência de diarreia em bezerros leiteiros. Trinta e cinco bezerros leiteiros (20 machos e 15 fêmeas) foram utilizados em delineamento em blocos ao acaso e divididos em três tratamentos – leite integral refrigerado (LI), leite integral acidificado (LA) e substituto lácteo (SL). Ingestão, escore fecal e temperatura retal foram avaliados diariamente, enquanto desempenho e parâmetros sanguíneos foram avaliados semanalmente durante o período pré-desaleitamento. Amostras fecais de bezerros diarreicos foram coletadas para avaliação da comunidade bacteriana. Bezerros alimentados com LI apresentaram maior peso corporal ao desaleitamento, ganho médio diário, medidas corporais e concentração de metabólitos sanguíneos relacionados à nutrição. Os bezerros alimentados com LA apresentaram menor temperatura retal e dias com febre. Além disso, os bezerros alimentados com SL apresentaram menor concentração de beta-hidroxibutirato e maior incidência de diarreia. Quanto a comunidade bacteriana fecal, em nível composicional, observou-se maior abundância dos gêneros *Fusobacterium* e *Ruminococcus* (LA), *Prevotella* (LI) e *Lactobacillus* (SL). Nas fezes dos bezerros diarréicos aleitados com LA e SL, também observou-se a presença de alguns gêneros bacterianos benéficos. No segundo estudo foi avaliada a inclusão de um *blend* comercial a base de óleo de hortelã-pimenta, eucalipto e cristais de mentol sob a saúde e desempenho de bezerros leiteiros. Trinta e nove bezerros leiteiros (33 machos e 6 fêmeas) foram utilizados em dois tratamentos – Sucedâneo lácteo diluído a 14% de sólidos (SL) e sucedâneo lácteo acrescido do *blend* comercial de óleos essenciais (SLOE). Ingestão, escore fecal e de saúde e temperatura retal foram avaliados diariamente, desempenho avaliado semanalmente e parâmetros sanguíneos nas semanas 1, 2, 3, 4 e 8. Bezerros alimentados com SLOE apresentaram tendência de maior consumo de matéria seca total no período de aleitamento, mas não foram observados outros efeitos da suplementação do *blend* de óleos essenciais no desempenho. No entanto, os bezerros SLOE apresentaram menor escore de saúde e menos dias com escore de saúde ≥ 4 (sugestivo para broncopneumonia). A suplementação de bezerros com óleos essenciais pode ser uma alternativa para reduzir a ocorrência de problemas respiratórios.

Palavras-chave: Leite acidificado, Diarreia, Microbioma fecal, Óleos essenciais

## ABSTRACT

### Feeding strategies to reduce morbidity rates in dairy calves

Infectious diseases, especially diarrhea and bronchopneumonia, are important causes of morbidity and mortality in calves around the world. Economic losses includes loss of calves, decreased performance and future production, and excessive administration of medicine that are often used incorrectly or unnecessary. The use of antimicrobials in as therapeutic or prophylactic treatments has been increasingly questioned, and the use of antimicrobial additives has already been banned in several countries to prevent the resistance of microorganisms, a public health problem. In this way, the search for natural methods of disease prophylaxis and performance improvement are increasingly necessary. The effect of three liquid diets on performance, diarrhea incidence and microbial community during the occurrence of diarrhea in dairy calves was evaluated. Thirty five dairy calves (20 males and 15 females) were used in randomized block design, and divided into three treatments – refrigerated whole milk (WM), acidified whole milk (AWM) and milk replacer (MR). Intake, fecal score and rectal temperature were assessed daily, while performance and blood parameters were assessed weekly during the pre-weaning period. Fecal samples from diarrheal calves were collected for bacterial community assessment. Calves fed WM had higher body weight at weaning, average daily gain, body measurements and concentration of blood metabolites. The calves fed AWM had lower rectal temperature and days with fever. In addition, calves fed MR had a lower concentration of beta-hydroxybutyrate and a higher incidence of diarrhea. As for the fecal bacterial community, at the compositional level, there was a greater abundance of the genera *Fusobacterium* and *Ruminococcus* (AWM), *Prevotella* (WM) and *Lactobacillus* (MR). In the feces of diarrheal calves fed AWM and MR, the presence of some beneficial bacterial genera was also observed. In the second study, the inclusion of a commercial blend based on peppermint oil, eucalyptus and methol crystals was evaluated on the health and performance of dairy calves. Thirty-nine dairy calves (33 males and 6 females) were used in two treatments – milk replacer diluted to 14% solids (MR) and milk replacer plus commercial blend of essential oils (MREO). Intake, fecal and health score and rectal temperature were assessed daily, performance assessed weekly and blood parameters at weeks 1, 2, 3, 4 and 8. Calves fed MREO tended to present a higher total dry matter intake during the preweaning period; however no other differences were observed for calves performance. Nevertheless, MREO calves had a lower health score and fewer days with a health score ≥ 4 (suggestive of bronchopneumonia). The supplementation of calves with essential oils may be an alternative to reduce the occurrence of respiratory problems.


Keywords: Acidified milk, Diarrhea, Fecal microbiome, Essential oils

# 1. INTRODUÇÃO

A criação de fêmeas leiteiras produtivas depende do bom manejo de bezerros (Abuelo, 2020), e envolve gastos econômicos significativos, estimados em cerca de 20% do gasto total das fazendas leiteiras (Boulton et al., 2017). As perdas por morte e doenças dos bezerros, especialmente durante o período pré-desaleitamento, ainda são inaceitavelmente altas. A ocorrência de óbito no período perinatal, definida como a duração do nascimento até 48h de vida, varia de 3% a 9% em rebanhos leiteiros em todo o mundo (Compton et al., 2017). Mas após esta fase, as taxas de mortalidade ainda são bastante altas, com valores de 6,0% no Brasil (Alta Cria, 2021) e de 6,4% nos EUA (USDA, 2018).

O sucesso da fase de criação de bezerros leiteiros deve incluir uma combinação de aspectos que garantam o bom crescimento, que atendam às necessidades nutricionais e minimize fatores causadores da quebra da homeostase corpórea (Gomes et al., 2021). Os desafios enfrentados pelos bezerros a partir do nascimento, aliados a um sistema imunológico ainda inexperiente, tornam esses animais mais susceptíveis a infecções intestinais e das vias respiratórias. Além disso, a manutenção do microbioma, especialmente quando se avalia o equilíbrio entre microrganismos intestinais benéficos e patogênicos, é fundamental para manter a saúde e desempenho dos bezerros (Virgínio Jr. e Bittar, 2021).

O impacto do estresse, causado pelas diferentes enfermidades, além de acarretar em perdas econômicas indiretas, está relacionado ao aumento dos índices de morbidade e mortalidade, baixo desempenho, atraso reprodutivo e menor produção de leite futura (Lorenz et al., 2011; Tahmasbi et al., 2014). Na fase inicial da vida, as bezerras são constantemente expostas a desafios de ordem e natureza diversas.

Dentre os desafios iniciais, o mais importante é a perda da proteção materna após o nascimento. Assim, faz-se necessário o fornecimento de colostro nas primeiras horas de vida para que o animal absorva anticorpos produzidos por sua mãe, até que possa produzir seus próprios anticorpos, quando seu sistema imune passa a ser mais experiente, e ser capaz de sobreviver diante da exposição a agentes ambientais e patogênicos (Hulbert e Moisá, 2016).

Porém, a susceptibilidade dos bezerros às doenças e a resposta aos agentes patogênicos não dependem apenas do grau de proteção proporcionado pelo colostro materno, mas também da exposição aos patógenos ambientais, do manejo nutricional e da condição de saúde geral do animal. Bezerros que receberam colostro de forma adequada, podem assim mesmo apresentar doenças se o desafio imposto pelo ambiente e nutrição resulte em estresse que ultrapasse a capacidade do sistema imune dos bezerros (Kertz et al., 2017).

Desta forma, algumas estratégias podem ser realizadas a fim de reduzir o desafio ao qual os bezerros são submetidos, como é o caso da melhoria da qualidade microbiológica do leite, seja por

pasteurização ou acidificação do alimento (Yanar et al., 2006), ou o uso de aditivos alimentares que potencializam a ação do sistema imune e são alternativas naturais que minimizam a utilização de antimicrobianos (um problema de saúde pública cada vez mais debatido e que impõe mudanças pelo mercado importador), como é o caso dos aditivos fitogênicos, principalmente os óleos essenciais (Durmic e Blache, 2012).

Embora a indústria pecuária tenha melhorado muito o manejo do rebanho bovino, as instalações e os cuidados com os bezerros, há a necessidade de pesquisar terapias alternativas, como aditivos alimentares naturais, para lidar com o uso reduzido de antimicrobianos e reduzir ainda mais a morbidade e mortalidade dos bezerros. Assim, o objetivo deste projeto foi avaliar diferentes estratégias alimentares a fim de contribuir para minimizar a ocorrência das principais enfermidades em bezerros leiteiros e consequentemente melhorar o desempenho.

## Referências

Abuelo, A. 2020. Symposium review: Late-gestation maternal factors affecting the health and development of dairy calves. J. Anim. Sci. 103: 3882-3893.

Azevedo, R. A. de, R.M. Meneses, R.O.S. Silva, S.G. Coelho, V. Chiogna Júnior, V. Gomes. 2021. Alta CRIA 2021. Uberaba, MG: Editora Scienza.

Boulton, A.C., J. Rushton, e D.C. Wathes. 2017. An empirical analysis of the cost of rearing dairy heifers from birth to first calving and the time taken to repay these costs. Animal. 11:1372-1380.

Compton, C.W.R., C. Heuer, P.T. Thomsen, T.E. Carpenter, C.V.C. Phyn and S. McDougall. 2017. Invited review: A systematic literature review and meta-analysis of mortality and culling in dairy cattle. J. Anim. Sci, 100:1-16.

Durmic, Z., and D. Blache. 2012. Bioactive plants and plant products: Effects on animal function, health and welfare. Anim. feed sci. technol. 176:150-162.

Gomes, V., K.M. Madureira, J.R.J. Borges, F.A. Pinheiro, C.C. Martin, C.C. Baccili and F.J. Benesi. 2021. Doenças na fase de aleitamento e práticas de manejo sanitário na criação de bezerra. RBB. 1: 27-62.

Hulbert, L. E., and S.J. Moisá. 2016. Stress, immunity, and the management of calves. J. Anim. Sci. 99:3199-3216.

Júnior, G.F.V. and C.M.M. Bittar. 2021. Microbial colonization of the gastrointestinal tract of dairy calves–a review of its importance and relationship to health and performance. Anim. Health Res. Rev.1-12.

Kertz, A.F., T.M. Hill, J.D. Quigley, A.J. Heinrichs, J.G. Linn and J.K. Drackley. 2017. A 100-Year Review: Calf nutrition and management. J. Anim. Sci. 100:10151-10172.

Lorenz, I., J.F. Mee, B. Earley, and More, S.J. 2011. Calf health from birth to weaning. I. General aspects of disease prevention. Ir. Vet. J. 64:1-8.

Tahmasbi, A.M., S.H.J. Abadi and A.A. Naserian. 2014. The effect of 2 liquid feeds and 2 sources of protein in starter on performance and blood metabolites in Holstein neonatal calves. J. Anim. Sci. 97:363-371.

USDA. 2018. Dairy 2014: Health and management practices on U.S. dairy operations, 2014. USDA-Animal and Plant Health Inspection Service (APHIS)-Veterinary Services (VS)-Center for Epidemiology and Animal Health (CEAH), Fort Collins, CO. https: / /www.aphis.usda.gov/ animal health/nahms/ dairy/ downloads/ dairy14/ Dairy14 dr PartIII .pdf.

Yanar, M., O. Güler, B. Bayram, and J. Metin. 2006. Effects of feeding acidified milk replacer on the growth, health and behavioural characteristics of Holstein Friesian calves. Turkish J. Vet. Anim. Sci. 30:235-241.

# 2. REVISÃO DE LITERATURA

## 2.1. Morbidade e principais doenças

A fase de criação, que geralmente compreende as primeiras 8 a 12 semanas de vida, nada mais é que um período de adaptação do bezerro recém-nascido. O bezerro precisa se adaptar a um ambiente de temperatura variável, com alta carga de patógenos, às alterações para obtenção de nutrientes, e por fim, realizar a transição do sistema gastrintestinal de um pré-ruminante especialista em digerir leite para um ruminante que obtém a maior parte de sua energia através da fermentação ruminal de forragens.

Além das particularidades da imaturidade imunitária e de estresses comuns a essa transição, as bezerras ainda podem ser influenciadas negativamente por dietas restritivas, manejos estressantes e protocolos de vacinação inapropriados. O sucesso da criação está diretamente ligado a inúmeros fatores que se relacionam diretamente com a taxa de morbidade e mortalidade das bezerras, como a biotécnica da reprodução utilizada, tempo de permanência da mãe com a cria (Vogels et al., 2013), estação do ano do nascimento (Santman Berends et. al., 2019), intervenção ao parto (Murray et al., 2015), peso ao nascimento (Winderyer et al., 2014), falha da transferência de imunidade passiva (Furman-Fratczak et al., 2011), qualidade microbiológica da dieta líquida, entre outros.

Esses aspectos podem agir como importantes fatores de estresse e, consequentemente, de maior susceptibilidade dos bezerros, principalmente nas primeiras 3 semanas de vida. O amadurecimento do sistema imune adaptativo das bezerras é um processo lento e gradual que ocorre entre o nascimento e a puberdade, de acordo com os desafios antigênicos na fase pós-natal (Svensson et al., 2003). Desta forma, além da minimização desses desafios, o manejo de colostragem é fundamental para a prevenção de doenças, ao menos durante as primeiras semanas de vida, pois é ele quem fornecerá os anticorpos necessários para combatê-las (Hulbert e Moisá, 2016).

As doenças infeciosas são a segunda maior causa de mortalidade nos bezerreiros, ficando atrás apenas dos óbitos ainda na maternidade (até 48h de vida), em decorrência de alterações relacionados ao parto propriamente dito (Azevedo et al., 2020). Embora as taxas de mortalidade relatadas para essa fase variem muito por idade; status de transferência de imunidade passiva; tipo de manejo; instalações; estação do ano; país e/ou região, a enterite e a Doença Respiratória Bovina (DRB), principalmente a broncopneumonia, surgem como as razões mais comuns para mortes relacionadas a doenças em bezerros (Heinrichs e Heinrichs, 2011; Windeyer et al., 2014).

O grande impacto econômico relacionado a essas enfermidades, está desde o custo imediato com o tratamento e diminuição do desempenho, até seu impacto no desenvolvimento e produção de leite futura, conforme apontado por diversos estudos (Heinrichs e Heinrichs, 2011; Staton et al., 2012;

Damiaans et al., 2018). Além disso, existe o custo de reposição das fêmeas que vieram a óbito. O custo de criação é bastante significativo, mas o custo de adquirir uma novilha pronta é muito maior. Portanto, se o objetivo é manter ou expandir o tamanho do rebanho, o manejo de doenças é um foco apropriado ao técnico e ao produtor (Wathes et al., 2008; Urie et al., 2018).

As enterites, que têm como principal sinal clinico a diarreia, e que por esse motivo é popularmente conhecida por esse termo, é a doença mais importante em bezerros com menos de 30 dias de idade (Fariña e Chilibroste, 2019; Schild et al., 2020; Urie et al., 2018). Enquanto a DRB, pode variar quanto a realidade de cada propriedade, pode ocorrer durante todo o período de criação, inclusive ao desaleitamento, mas comumente afeta bezerros mais velhos (mais de 30 dias de idade; Azevedo et al., 2020).

A diarreia, embora muito estudada, ainda é a principal causa infecciosa associada à mortalidade em bezerros neonatos (Choi et al., 2020). As diarreias neonatais ocorrem nas primeiras semanas de vida e são definidas pelo aumento da frequência e/ou volume de defecação. As diarreias neonatais são reconhecidas pela complexidade de sua etiologia, relacionada aos mecanismos de patogenicidade e evasão do sistema imune utilizados pelos agentes causais, bem como as interações entre ambiente, nutrição e manejo, além de fatores fisiológicos e imunológicos inerentes ao hospedeiro. Por esse motivo, a diarreia é tida como uma doença multifatorial (Morrison, 2019; Renaud et al., 2021).

Os principais enteropatógenos envolvidos na síndrome diarreica de neonatos são *rotavírus, coronavírus, Salmonella spp.,* patotipos de *Escherichia coli* e *Cryptosporidium spp.,* que podem ocasionar episódios de diarreia por diferentes mecanismos (Naylor, 1999; Foster e Smith, 2009). No entanto, é comum que mais de um agente esteja envolvido no mesmo episódio de diarreia e que esta ocorra por associação dos mecanismos supracitados, isso gera uma interação complexa dos microrganismos comensais com os invasores que levam à disbiose. A disbiose é o desequilíbrio da microbiota que pode ser primária ou secundária a diarreia, em virtude da ação dos microrganismos patogênicos, ou seja, mesmo alterações como a hipo ou hipermotilidade podem por si só favorecer a disbiose e o crescimento de patógenos (Fattinger et al., 2021).

Independentemente do agente causador e do mecanismo patogênico, a sintomatologia clínica é semelhante para a maioria dos casos. De maneira geral, a diarreia pode ser leve a intensa, a depender do grau de acometimento do bezerro e pode ser classificada em escores, de acordo com a consistência das fezes (Larson et al., 1977; McGuirk, 2008). Os quadros graves de diarreia podem apresentar complicações como hipertermia, associadas às infecções bacterianas, variáveis de desidratação, acidose metabólica e alterações eletrolíticas, principalmente em relação à concentração plasmática de sódio, potássio, cloro e bicarbonato. Todas essas alterações podem levar à depressão, diminuição do reflexo

de sucção, fraqueza, anorexia e, em casos graves, morte (Philips, 1985; Naylor 1999; Freitas, 2009 e 2013; Trefz et al., 2013).

Os tratamentos adotados comumente como protocolo nas propriedades visam combater a infecção e inflamação com a utilização de antimicrobianos e anti-inflamatórios, desde o início do quadro diarreico, muito embora isso já tenha sido criticado a bastante tempo. A reposição hidroeletrolítica, por sua vez, embora seja aconselhada desde o início dos sinais clínicos, é utilizada erroneamente na rotina, apenas em casos severos com prostração e prognóstico já desfavorável (Freitas et al., 2009 e 2010).

A diarreia é responsável por alta morbidade em bezerros de até três semanas de idade, com acometimento de até 90 a 100% dos animais nessa faixa etária, e contribuem em 50% a 75% para as mortes em bezerros neonatos (Langoni et al., 2004; Freitas, 2009; Alta Cria, 2019). Dessa forma, já que a sensibilidade de reconhecimento precoce da doença pelo produtor é bastante baixa, cerca de 58% (Foster e Smith, 2009), medidas preventivas devem ser utilizadas para limitar os fatores de risco que desafiam e comprometem a saúde e capacidade de resposta dos animais. O manejo é o fator que mais influencia as taxas de mortalidade dos bezerros jovens (Radostits et al., 2007), e os fatores de risco ambientais para a diarreia estão associados, principalmente, com o grau de higiene das instalações e a qualidade nutricional e microbiológica da dieta ofertada.

A DRB, por sua vez, é um termo utilizado para contemplar um conjunto de doenças que podem acometer o trato respiratório superior e inferior, e que são de difícil diagnóstico específico. A DRB é mais frequente em bezerras entre a quarta e oitava semana de vida, sendo reportada incidência nacional em torno de 23,4% na fase pré-desaleitamento (Azevedo et al., 2020). Dados globais levantados pelo USDA reportam que as doenças respiratórias são responsáveis por 24% das mortes no período de aleitamento e 58,9% em animais após o desaleitamento (USDA, 2018). As doenças associadas a DRB são de alta incidência na criação de bezerros e consideradas, juntamente com a diarreia, as maiores causas de mortalidade em animais jovens (Azevedo et al., 2020; Ferraro et al., 2021). Além disso, bezerros que apresentam diarreia possuem maior probabilidade de manifestarem DRB.

As manifestações clínicas mais comuns são inapetência, anorexia, dispneia, tosse, corrimento nasal e ocular, hipertermia, taquicardia, exacerbação e alteração dos ruídos respiratórios (Gomes et al., 2021). Dentre os principais patógenos encontrados estão os vírus como o *Vírus Respiratório Sincicial Bovino, Vírus da Parainfluenza Bovina, Herpesvírus, Rotavírus, Vírus da Diarreia Viral Bovina, Adenovírus Bovino* e *Coronavírus.* As bactérias são responsáveis pelas infecções secundárias, sendo as principais a *Pasteurella multocida, Mannheimia haemolytica, Histophilus somnus, Actinomyces pyogenes e Mycoplasma bovis* (Fulton et al., 2004).

O controle é baseado no diagnóstico rápido, tratamento específico do agente, identificação dos fatores de risco e adoção de boas práticas de manejo que reduzam o impacto desses fatores sobre

a saúde dos bezerros (Gorden e Plummer, 2010). Após o nascimento, a adoção de medidas para redução da ocorrência de falha de transferência de imunidade passiva, cura de umbigo, controle e prevenção de comorbidades, manutenção de ambiente limpo, seco e confortável, nutrição, vacinação e mitigação do estresse associado aos manejos são indispensáveis (Gorden e Plummer, 2010; Chase et al., 2008).

Na busca de desenvolver uma forma rápida de detecção da DRB em fazendas que gere maiores chances de cura, desenvolveu-se um escore de saúde voltado ao trato respiratório. McGuirk (2008) desenvolveu o *Calf Health Scoring Criteria* (CHSC), em que se avalia a temperatura retal, secreção nasal, secreção ocular, tosse com indução, e posição de cabeça e orelhas, os quais são pontuados de zero a três, de acordo com a gravidade. Bezerros com a soma total dos parâmetros ≥4 são positivos para DRB.

As lesões pulmonares irreversíveis causadas pelas broncopneumonias promovem redução do ganho de peso diário e diminuição da produtividade na primeira lactação, maior risco de não sobreviverem até um ano de vida, além de causar aumento da idade ao primeiro parto e menor produção de leite (Gomes et al., 2021).

Dada a variedade de fatores de risco envolvidos, agentes, lesões e sua localização no sistema respiratório, o diagnóstico específico é incerto e a doença, multifatorial (Coutinho, 2004). Por esses motivos, aspectos e características inerentes à propriedade, aos animais e ao manejo precisam ser analisados (Urban-Chmiel et al., 2012).

O tratamento das broncopneumonias (principal DRB) é baseado no uso de antimicrobianos e anti-inflamatórios não estereoidais. A escolha do antimicrobiano não deve ser feita de maneira aleatória, sendo importante levar em consideração o agente infeccioso, histórico e cronicidade da doença (Constable et al., 2017). Entretanto, ainda mais importante que reconhecer e tratar de forma correta a doença, se mostra muito mais vantajoso e econômico prevenir para que não ocorram, ou ocorram de forma mais branda, fazendo com que o controle seja mais eficaz (Foster e Smith, 2009).

Estratégias que auxiliem no desenvolvimento e melhorem o status de saúde das bezerras são importantes para redução da incidência de doenças e/ou recuperação mais rápida. Procedimentos que reduzem a suscetibilidade do animal a patógenos e estressores, e ajudam a mudar essa via, podem melhorar o desempenho e a produtividade futuros (Drackley, 2008). Neste contexto, o desenvolvimento de estratégias individuais e de rebanho especificas, buscando minimizar os impactos econômicos negativos sobre a criação das bezerras em curto e longo prazo são de extrema importância.

## 2.2. Nutrição no período de aleitamento

É possível afirmar que a nutrição de bezerros não deve ter apenas por objetivo atingir as metas de crescimento propostas pelo programa de alimentação, mas também de promover a saúde e o bem-

estar. Para que o sistema imune atue de forma eficaz no combate de infecções e processos inflamatórios ele precisa de aporte adequado de nutrientes.

Segundo Drackley (2008) a exigência de energia metabolizável para mantença de um bezerro de 45 kg de peso corporal é de 1,75 Mcal/d. Dessa forma, em um sistema de aleitamento convencional (agora chamado de restrito pelo NASEM, 2021), quando se fornece o volume diário de 4L, por exemplo, grande parte dos nutrientes são utilizados para mantença e resta muito pouco para suprir ganho de peso satisfatório e ainda perdas adicionais, como o combate às doenças. De forma simplista, quando a dieta não atende eficientemente o necessário para pleno funcionamento dos sistemas corporais, ela pode estar diretamente relacionada a um novo fator de estresse que culmina no baixo desempenho e maior susceptibilidade dos bezerros a patógenos.

Portanto, programas de aleitamento com maiores volumes de leite ou sucedâneo do leite (pelo menos 20% do peso vivo ao nascimento), permitem que maior aporte de nutrientes seja direcionado para crescimento, ganho de peso e atendimento de exigências do sistema imune. Dessa forma, pode proporcionar redução nas taxas de morbidade e mortalidade, além de melhor desempenho.

Além disso, diversos estudos têm demonstrado efeitos positivos duradouros da maior ingestão de nutrientes na fase de aleitamento, em especial nos primeiros 30 dias de idade, sobre a saúde e produção de leite futuras (Gelsinger et al., 2016; Korst et al., 2017). Programas de aleitamento de estratégia convencional, onde bezerros são alimentados com quantidade restrita (geralmente volume fixo de 4L/d) de leite ou sucedâneo lácteo têm como principal justificativa o incentivo a maior ingestão de concentrado inicial antes do desaleitamento.

Estudos demonstram que bezerros alimentados com mais de 6L/d de dieta líquida consomem significativamente menos concentrado inicial antes de iniciar o processo de desaleitamento (de Passillé e Rushen, 2016; Benetton et al., 2019; Neave et al., 2019). de Passillé e Rushen (2016) relataram que os bezerros que receberam 12 L/d de leite levaram em média 54 dias para consumir pelo menos 200 g/d de ração por 3 dias consecutivos.

Segundo Neave et al. (2019) bezerros aleitados com sucedâneo lácteo à vontade levaram pelo menos 36 dias para consumirem 40g/d e 47 dias para consumirem 225g/d. No entanto, a baixa ingestão de concentrado não comprometeu o desempenho. O grande entrave, é que a ingestão de concentrado é responsável pelo fornecimento de substrato necessário para o desenvolvimento ruminal e manutenção do desempenho pós-desaleitamento (Jasper e Weary, 2002).

Por esse motivo, os programas de aleitamento intensivos devem estar associados a manejos que permitam alcançar essa maior ingestão de concentrado. Isso vai garantir o desenvolvimento do rúmen e permitir melhor aproveitamento dos nutrientes da dieta líquida que auxiliam na melhora do

quadro de saúde dos bezerros, sem prejudicar o desempenho ou tornar esse bezerro mais susceptível a doenças após o desaleitamento.

Algumas alternativas podem ser utilizadas para beneficiar o consumo de concentrado inicial mesmo em programas de aleitamento intensivo, como a oferta de maiores volumes somente nas 4-6 primeiras semanas de vida, diferentes formas de aleitamento programado e/ou estratégias mais graduais de desaleitamento visando promover saúde e desempenho pré e pós-desaleitamento (de Passillé et al., 2011; Rosenberger et al., 2017; Dennis et al., 2018).

O volume de dieta líquida oferecido por refeição, mudanças no intervalo de alimentação, composição e temperatura da dieta líquida, uso de aditivos e comportamento dos tratadores podem ser fatores estressantes e/ou capazes de alterar perfis hormonais, de esvaziamento gástrico e de motilidade intestinal. Bezerros saudáveis são capazes de contornar essas pequenas mudanças, porém, bezerros que já acumulam outros desafios ambientais e individuais estão mais susceptíveis ao surgimento e agravamento de doenças, bem como ao baixo desempenho (Dennis et al., 2018).

Além da qualidade nutricional, a qualidade microbiológica do leite ou sucedâneo do leite são fundamentais para reduzir o seu impacto sobre a saúde dos bezerros. Segundo Aust et al. (2012) a qualidade microbiológica da dieta líquida fornecida está intimamente ligada a ocorrência de enfermidades, como pneumonia e diarreia. No leite integral, o crescimento bacteriano causa degradação de nutrientes e alteração da qualidade nutricional, o que interfere diretamente no desempenho dos bezerros, haja vista que essa é a principal fonte de energia para o crescimento durante essa fase (Todd et al., 2010; Khan et al., 2011).

A qualidade e constância da dieta líquida não interfere apenas na saúde e desempenho dos bezerros, mas também no desenvolvimento da microbiota intestinal, responsável por uma série de funções metabólicas e imunológicas (Gomez et al., 2017). As bactérias comensais do intestino protegem contra invasões de microrganismos patogênicos e ajudam a manter a integridade da barreira intestinal (Fukuda et al., 2014; Bottacini et al., 2014).

A dieta líquida possui em sua composição oligossacarídeos que selecionam uma microbiota intestinal altamente adaptada, todavia esses importantes componentes têm concentração variável de acordo com a dieta utilizada (Pacheco et al., 2015). Ao utilizar sucedâneos lácteos, o tipo e a disponibilidade de nutrientes são diferentes daquela observada no leite, o que pode trazer grandes impactos na colonização do intestino do bezerro (Virgínio Júnior et al., 2021). Outro fator relacionado ao sucedâneo que impacta na colonização intestinal, é que a taxa de digestão da matéria seca, tende a ser menor em comparação ao leite integral (Hill et al., 2010).

Os bezerros com menor diversidade microbiana, de acordo com avaliação em amostras fecais, também estão associados a maiores taxas de incidência de diarreia e pneumonia (Oikonomou et al.,

2013). Esses achados são possíveis, pois o estabelecimento da microbiota do TGI, também estimula o desenvolvimento do sistema imunológico (Haneda et al., 2012).

A dieta sólida, por sua vez, não possui grande importância nutricional nas primeiras semanas, tendo em vista que seu consumo é bastante baixo. Porém, de qualquer forma, a utilização de alimentos concentrados a partir dos primeiros dias de vida tem por objetivo estimular o consumo precoce e fornecer aos poucos, substrato para o desenvolvimento do epitélio ruminal e preparar o bezerro para o consumo exclusivo de sólidos após o desaleitamento.

Nesta fase, recomenda-se uso de concentrados com, no mínimo, 20% de proteína bruta (NASEM, 2021). Porém, alguns estudos demonstram que bezerros que consomem concentrado com maior teor proteico tendem a ter maior consumo (Akayezu et al., 1994; Whalin et al., 2021). Além disso, programas de aleitamento intensivo exigem concentrado com mais teor de proteína bruta, pois a exigência para o crescimento se torna maior ao passo que o bezerro consome mais energia através da dieta líquida (Whalin et al., 2021). Assim, para animais em aleitamento intensivo, o NASEM (2021) sugere concentrados com teores de proteína entre 22 e 25%. De acordo com Stamey et al. (2012) o peso corporal vazio de bezerros alimentados com concentrado contendo 26% de proteína bruta foi maior do que os de bezerros alimentados com 21,5% em sistema de aleitamento convencional. Portanto, assume-se que níveis mais altos de proteína inicial podem ser uma estratégia para promover o desenvolvimento do rúmen, estimulando a ingestão de concentrado inicial e maior crescimento microbiano. Associado a isso, o consumo de concentrado proporciona maior disponibilidade de nutrientes ao bezerro, principalmente a partir dos 30 dias de idade, quando seu consumo passa a ser significativo e aumenta gradativamente até o desaleitamento (Baldwin et al., 2004).

Os ingredientes que compõem o concentrado devem ser palatáveis a fim de estimular o consumo e ter adequada digestibilidade, geralmente concentrados iniciais de bezerros tem como ingredientes principais farelo de soja e milho. Alimentar os bezerros com carboidratos prontamente fermentáveis aumenta a produção de ácidos graxos voláteis no rúmen, o que é necessário para estimular o desenvolvimento do epitélio ruminal (Baldwin et al., 2004).

Elevadas concentrações de amônia ruminal, acetato, propionato e butirato foram detectadas em bezerros alimentados com dietas à base de milho e trigo em comparação com bezerros alimentados com dietas à base de cevada e aveia (Bannink et al., 2008; Suárez et al., 2006). Além disso, o peso dos pré-estômagos e o crescimento das papilas foram maiores em bezerros alimentados com dietas à base de milho e trigo (Khan et al., 2008). A espessura da mucosa foi maior em bezerros alimentados com dietas à base de amido e pectina em comparação com bezerros em dietas à base de fibra em detergente neutro (Lesmeister e Heinrichs et al., 2004).

Dessa forma, o fornecimento de volumosos pode ser feito a partir dos 30 dias de idade, com objetivo de estimular mecanicamente o desenvolvimento ruminal. É importante que o consumo de

volumoso seja limitado antes dos 2 meses de idade, com intuito de evitar efeito de enchimento ruminal e diminuição do consumo de concentrado, maior responsável pelo desenvolvimento ruminal (Lin et al., 2020).

O desaleitamento representa momento crítico para os bezerros, em função da interrupção do fornecimento da dieta líquida, remanejamento dos indivíduos para grupos em ambiente desconhecido (Hulbert et al., 2011). O estresse decorrente dessas transformações impacta significativamente a atividade imunológica e torna esse período de grande risco para queda no desempenho e ocorrência de doenças, principalmente tristeza parasitária bovina e pneumonia. Por esse motivo, quanto mais gradual for essas mudanças melhor é a adaptação dos bezerros.

Por fim, independente da dieta líquida e da ração total, a água de beber é considerada um nutriente fundamental para o desenvolvimento ruminal e sua microbiota, por isso, deve ser fornecida desde o primeiro dia de idade (Broucek, 2020). O consumo de água até os 30 dias de idade pode ser relativamente baixo, acompanhado pelo baixo consumo de alimentos sólidos por essa faixa etária. Em geral, o consumo aumenta gradativamente na medida que aumenta o consumo de alimento sólido.

No entanto, observa-se animais no dia do nascimento com consumo de água superior a 1 kg (Gottardo et al., 2002), dessa forma, água limpa deve ser fornecida à vontade em todas as fases de vida do animal. Além da relevância nutricional e participação no desenvolvimento ruminal, a ingestão de água independente do fornecimento de dieta líquida torna-se nutriente importante diante da alta incidência de diarreias em bezerros neonatais.

Nos últimos anos, tem crescido o interesse na promoção da saúde animal por meios naturais, geralmente relacionados a nutrição, de prevenção de doenças para reduzir a necessidade de antimicrobianos e estabilizar a saúde intestinal (Cardoso et al., 2016; Dai et al., 2021).

O aleitamento com dieta acidificada é comum desde a década de 80 (Bush e Nicholson, 1987). No entanto, recentemente o interesse nesse manejo tem aumentado em alguns sistemas de produção (Hill et al., 2013), graças à melhoria relacionada as taxas de diarreia bem como à visível necessidade, principalmente do ponto de vista de saúde, de alimentar bezerras com maiores volumes de leite (Overvest et al., 2016), já que a acidificação inibe o crescimento de patógenos presentes na dieta e no trato gastrointestinal.

O uso de aditivos alimentares também vem sendo uma importante estratégia na diminuição da morbidade dos sistemas de criação, bem como uma alternativa natural ao uso de antimicrobianos (Kertz et al., 2017; Renaud et al., 2019). À exemplo, estão os óleos essenciais que demonstram ter propriedades antimicrobianas (Bampidis et al., 2006). Alguns estudos têm demonstrado as vantagens quanto a prevenção de doenças infecciosas, incluindo a diarreia (Bampidis et al., 2006; Kertz et al., 2017).

A preocupação do público com o bem-estar animal tem aumentando constantemente (Costa et al., 2019), levando as partes interessadas a pensar de forma mais inovadora e eficiente de alimentar e manejar bezerros.

## 2.3. Estratégias alimentares para redução de morbidade e aumento de desempenho

### 2.3.1. Acidificação da dieta

A acidificação da dieta líquida tem por finalidade a conservação quando não há acesso a refrigeração ou pasteurização; além disso, é uma alternativa quando o custo do sucedâneo lácteo está elevado, sendo ainda um estímulo para o produtor optar por programas de aleitamento que fornecem maior quantidade de dieta líquida; e principalmente, reduzir a incidência e/ou a severidade da diarreia. Isso porque, este processo é capaz de tornar nula ou reduzir drasticamente a proliferação bacteriana por longos períodos (Coelho et al., 2020).

Segundo Todd et al. (2017), bezerros que consomem leite com elevada carga microbiana tendem a apresentar maior risco de morbidade e mortalidade e menor desempenho na fase de cria do que bezerros alimentados com leite de qualidade superior (Todd et al., 2017). A acidificação é um método preventivo para diminuir o uso de antimicrobianos, cujo uso excessivo para tratar, e até mesmo prevenir diarreia, contribuiu para levar ao desenvolvimento de resistência a antibióticos na saúde humana e animal.

O leite acidificado é preparado pela adição de ácidos orgânicos ao leite como conservante, sem a necessidade de refrigeração (Anderson, 2008). Os ácidos são conhecidos como conservadores eficazes para constituintes tanto da alimentação humana, quanto animal (Stewart et al., 2005; Foley e Otterby, 1995). Eles diminuem o crescimento e a sobrevivência de bactérias patogênicas no leite (Richard et al., 1988; Parker et al., 2016). Anderson (2013), em estudo com leite integral acidificado com ácido fórmico, não registrou crescimento de coliformes, nem de Staphylococcus após um tempo de contato de 1h a pH 4,1. Anderson (2008) demonstrou que o armazenamento pode ser realizado por até 3 dias a depender da região e suas condições climáticas. Já Coelho et al. (2020) demonstraram que a conservação por 12h foi possível, inclusive, em localidades onde a temperatura ambiental é mais elevada.

A acidificação é uma técnica que pode ser realizada na fazenda apenas seguindo a recomendação de atingir o pH alvo de 4,0 a 4,5. O volume necessário de ácido/L de leite para atingir esse pH é variável de acordo com o ácido utilizado e a composição nutricional da dieta líquida. A redução do pH a uma faixa entre 4,0 - 4,5 inibe o crescimento das principais bactérias, leveduras e fungos, associados a deterioração do leite e causadores de diarreia em bezerros (Anderson, 2008).

A acidificação pode ser realizada com a inclusão de diversos ácidos orgânicos, mas os principais presentes na literatura são o cítrico (Anderson, 2008), lático (Coelho et al., 2020), fórmico (Li et al., 2019; Chen et al., 2020) e clorídrico (Zhang et al., 2017). As pesquisas apontam melhores resultados para a utilização do ácido fórmico (Todd et al., 2010; Todd et al., 2017; Chase, 2011; Anderson, 2013; Güller et al., 2006).

O principal receio relacionado ao uso da dieta acidificada é a aceitabilidade dos bezerros. Pelos dados da literatura é possível observar que o fornecimento de leite acidificado é mais comum em programas de aleitamento à vontade, e nesse tipo de aleitamento geralmente ocorre uma pequena redução (1 a 2L) em comparação a bezerros que não recebem dieta acidificada (Guler et al., 2006; Todd et al., 2013; Todd et al., 2018). No estudo de Ribeiro et al. (2009), o consumo total não foi reduzido, mas sim o volume de cada visitação ao aleitador automático, sendo necessário mais visitações para atingir o mesmo consumo final.

Ao trabalhar com dietas de volume mais restrito, Coelho et al. (2020) não observaram diferença de consumo para bezerros que consumiam dieta líquida correspondente a até 20% do peso vivo ao nascimento. Por outro lado, os mesmos autores ao trabalharem com leite acidificado com ácido fórmico no mesmo volume de fornecimento, observaram uma pequena queda de consumo nas primeiras semanas de vida em comparação ao leite não acidificado (Coelho et al., 2022). De forma geral, o consumo não é afetado pela dieta líquida acidificada e o desempenho tende a ser similar ao observado com o leite refrigerado ou pasteurizado (Deng et al., 2017; Coelho et al., 2020; Coelho et al., 2022). No entanto, alguns autores encontraram melhora da eficiência alimentar em bezerros que consumiam dieta acidificada, o que foi atribuído a diminuição da incidência de diarreia (Todd et al., 2017; Todd et al., 2018 e Zheng et al., 2021).

A principal vantagem atribuída ao uso da dieta acidificada é, portanto, a redução da incidência e melhora dos dados relacionados a diarreia nos bezerros. Segundo Fallon e Harte (1986), essa característica se dá basicamente por dois meios: a já citada redução da taxa de proliferação de microrganismos patogênicos no leite durante sua estocagem; mas também pela acidificação do trato digestório, que pode ser favorável para processos de digestão através da formação do coágulo abomasal, e concomitante diminuição da taxa de multiplicação dos patógenos no trato digestório inferior. Todd (2013) encontrou menor pH fecal avaliando em diversas horas do dia em bezerros consumindo sucedâneo acidificado, confirmando a acidificação do trato digestório.

A acidificação pode tornar o ambiente desfavorável ao crescimento de bactérias patogênicas sensíveis ao pH mais baixo e, além disso, modular a microbiota intestinal a ponto de favorecer o crescimento de microrganismos benéficos, como *Lactobacillus, Bifidobacterium e Faecalibacterium* (Deng et al., 2017), que irão competir por substrato com os microrganismos patogênicos. Embora estes

autores não tenham analisado o escore fecal, investigaram a expressão de genes da mucosa intestinal e sugeriram uma melhora nas condições gerais de saúde.

Em geral, os estudos com leite acidificado têm mostrado resultados benéficos para a saúde dos bezerros, conforme demonstrado nos resultados de Virginio Júnior et al. (2021) para a comunidade bacteriana. O fornecimento de leite integral acidificado se mostrou uma alternativa para o período de aleitamento, considerando a microbiota intestinal que foi bastante abundante quando comparada ao substituto lácteo, mesmo que os bezerros tenham sido menos eficientes do que aqueles alimentados com leite integral. Todd (2013) encontrou redução da frequência de diarreias e outras afecções, concluindo que a acidificação diminuiu o desafio de doenças nos bezerros em aleitamento ad libitum.

Além disso, para Coelho et al. (2020), a acidificação do leite aumentou a idade para o primeiro caso de diarreia quando comparado ao leite integral (15 vs. 9 dias). Yanar et al. (2006) também encontraram resultados semelhantes ao acidificar o substituto do leite com ácido fórmico. Embora o uso de ácido fórmico no processo de acidificação seja aceitável, Zou et al. (2017) observaram maiores escores de inflamação no jejuno e íleo.

A alimentação com substitutos lácteos acidificados preveniu o rápido crescimento de organismos patogênicos no trato alimentar (Erickson et al., 1989; Todd et al., 2016). Portanto, alguns resultados mostraram que a alimentação com leite ou sucedâneo acidificado melhorou o escore de consistência fecal (Chen et al., 2020), diminuiu a proporção de dias de diarreia (Yanar et al., 2006) e reduziu a taxa de diarreia (Li et al., 2022).

### 2.3.2. Suplementação com óleos essenciais

O uso de aditivos fitogênicos na produção animal têm sido uma alternativa frequente ao uso de antimicrobianos (Kertz et al., 2017; Renaud et al., 2019). A maioria dos aditivos naturais são provenientes de algumas espécies de plantas e compreendem metabólitos secundários que foram relatados anteriormente como benéficos para a saúde humana ou animal.

Os óleos essenciais, principalmente, vêm sendo amplamente estudados como aditivos melhoradores de desempenho e imunomoduladores em bezerros. Os óleos essenciais demonstram ter propriedades antiparasitárias e antimicrobianas (Bampidis et al., 2006), com efeitos positivos já descritos quanto a redução do crescimento de microrganismos patogênicos intestinais (Spanghero et al., 2009), melhora de desempenho e menor ocorrência de diarreia (Bampids et al., 2006; Soltan, 2009).

Resultados já foram demonstrados também quanto a contribuição para a prevenção do estresse oxidativo (Simitzis, 2017) e na melhora da resposta imune para alterar a atividade fagocítica dos leucócitos e inibir o sistema complemento (Pérez-Rosés et al., 2015). Segundo Calsamiglia et al.

(2007), os óleos essenciais funcionam de forma semelhante aos ionóforos, um tipo de aditivo alimentar antimicrobiano promotor de crescimento.

Na planta, os óleos essenciais exercem importantes funções para proteção da planta, principalmente por danos causados pela radiação UV-B, microrganismos e herbívoros, dando-lhes sabor e odor característicos (Bosabalidis, 2002). Em termos químicos, os óleos essenciais consistem em uma mistura de metabólitos secundários, comumente formados por fenilpropanóides e terpenóides, entre outros (Calsamiglia et al., 2007).

Um dos mecanismos mais importantes dos extratos de plantas, e mais explorados na produção animal, é o de ação antimicrobiana, que tem origem basicamente na ação de seus metabólitos secundários. Por esse motivo, um único extrato de planta pode ter uma infinidade de mecanismos de ação contra microrganismos, o que torna ainda mais dificultoso seu estudo e utilização individual (Chessa et al., 2013).

Os principais meios de ação relacionados a esses metabólitos incluem ruptura da membrana celular, inibição enzimática, privação de substrato e prevenção da colonização bacteriana, entre outros (Wink, 2018). Além disso, a administração de *blends* que permitem a inclusão de diferentes metabólitos secundários vegetais, que normalmente têm níveis de inclusão diferentes produz efeitos sinérgicos, o que auxilia em várias respostas benéficas, como maior biodisponibilidade, eficiência aprimorada e redução de efeitos indesejáveis e dosagem eficaz (Reddy et al., 2020).

Para o óleo essencial de eucalipto foram descritos modos de ação através de distúrbios na parede celular e na membrana (Lambert et al., 2001; Oussalah et al., 2006), o que pode levar à perda significativa de ATP intracelular (Oussalah et al., 2006; Turgis et al., 2009), indução da síntese de proteínas de choque térmico (Burt et al., 2007), perturbação do pH (Turgis et al., 2009; Oussalah et al., 2006), e alterações intracitoplasmáticas (Becerril et al., 2007).

A menta (*Mentha piperita* L.; também conhecida como hortelã) contém uma variedade de compostos que são classificados como óleo essencial de hortelã-pimenta e componentes não essenciais (Kamatou et al., 2013). O óleo essencial de hortelã-pimenta é composto principalmente de mentol, mentona, neomentol e iso-mentona (Radivojac et al., 2021). O cristal de mentol é obtido da extração do composto de mesmo nome, e passa por diversos processos como aquecimento, filtragem, desidratação e congelamento, para que haja cristalização. É o mentol o principal responsável pelo aroma característico da hortelã (Messaoudi et al., 2021).

Os extratos de hortelã são amplamente descritos quanto a proteção do sistema gastrointestinal e respiratório. O efeito gastroprotetor do mentol se dá através da atividade anti-inflamatória atribuída principalmente à secreção de muco, que está relacionada à produção de prostaglandina E2 (PGE2) e ativação do canal K+-ATP e efeito antissecretor (Rozza et al., 2013). O extrato

de hortelã-pimenta também inibe a contração muscular induzida por carbacol envolvendo gânglios autonômicos, e tem efeitos anti-inflamatórios e analgésicos, especialmente em doenças respiratórias (Sousa et al., 2010).

Evidências crescentes demonstram que o óleo essencial de hortelã-pimenta (OEP) possui poderosa atividade antimicrobiana (Zouari-Bouassida et al., 2018). O OEP exibe efeitos inibitórios sobre as bactérias patogênicas *Staphylococcus aureus, Streptococcus faecalis, Bacillus subtilis, Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* (Metin et al., 2021; Valková et al., 2021).

Evidências estabeleceram que o OEP pode suprimir pneumonia por *Streptococcus, Salmonella enteritidis* e *Salmonella typhi* (Mimica-Dukic e Bozin, 2008). O mentol demonstrou atividade contra patógenos Gram-negativos (Bouyahya et al., 2017). Além disso, essas substâncias podem atuar em sinergia com outros agentes para produzir efeitos antimicrobianos contra microrganismos Gram-positivos e Gram-negativos (Al-Mariri et al., 2012).

As infecções virais possuem grande importância na saúde de bezerros, principalmente quanto a saúde do trato respiratório. Numerosos metabólitos secundários de plantas, como óleos essenciais, flavonóides, saponinas, taninos, alcalóides, ligninas, terpenos e ácidos fenólicos, expressam atividade antiviral significativa contra diferentes vírus (Jassim e Naji, 2003; Chiang et al., 2003). O óleo essencial de *Eucalyptus camaldulensis*, por exemplo, reduziu a multiplicação de *rotavírus* e *herpervírus*, mas não teve efeito na multiplicação de *adenovírus* (El-Baz et al., 2015).

O modo de ação antiviral permanece pouco compreendido, mas alguns fatores devem ser levados em consideração, o principal deles é se o vírus é envelopado ou não, pois o efeito antiviral observado costuma ser maior para vírus envelopados (Yamada et al., 2009; Siddiqui et al., 1996). Na maioria dos estudos que tratam do modo de ação antiviral, o foco tem sido na inibição da absorção viral às células hospedeiras ou no exame da eficácia dos antimicrobianos vegetais contra a multiplicação intracelular do vírus (Gilling et al., 2014).

Embora o número de estudos que tratam dos mecanismos de ação dos óleos essenciais esteja aumentando, ainda há muitas questões a serem respondidas antes que o mecanismo preciso seja revelado. Esta é ao mesmo tempo uma das principais limitações para os óleos essenciais, ao passo que amplia sua utilização como antimicrobianos (Zhao et al., 2022).

Na produção animal, os extratos de plantas podem influenciar o desenvolvimento do trato gastrointestinal, a atividade microbiológica ruminal, melhorar a eficiência alimentar e diminuir as principais doenças neonatais (Benchaar et al., 2008; Cobellis et al., 2016). Estudos focados na ação dos óleos essenciais como promotores de crescimento para suínos e aves mostram efeitos positivos da suplementação, geralmente associados a efeitos no trato gastrointestinal (Stamilla et al., 2020; Zhai et al., 2020).

Nessas espécies, a suplementação com óleo essencial aumentou a digestibilidade, melhorou atividade de enzimas pancreáticas, alterou a microbiota, impactou a absorção de aminoácidos nos intestinos e, consequentemente, a taxa de conversão alimentar (El-Hack et al., 2020). A suplementação também aumenta os níveis de imunoglobulinas e a resposta imune (Carrubba et al., 2020), diminui os patógenos específicos nas fezes (Ebani et al., 2019; Gómez-García et al., 2019) e apresenta um efeito antioxidante (Puvaca et al., 2019).

No entanto, existem dados inconsistentes entre outras espécies, provavelmente explicado pela complexidade das moléculas dos óleos essenciais e as diferenças entre os muitos tipos de TGI (Stevanović et al., 2018). Estudos anteriores mostraram que a suplementação de óleos essenciais no concentrado inicial de bezerros melhora o desempenho (Jeshari et al., 2016; Liu et al., 2020) e diminui a gravidade da diarreia (Katsoulos et al., 2017).

Os efeitos da suplementação na dieta líquida são escassos e não demonstram consistência. Isto é provavelmente devido a variações na dosagem e o perfil químico e concentrações dos compostos bioativos nos extratos de plantas, bem como diferentes composições de dieta e estratégias de manejo animal (Froehlich et al., 2017; Scharen et al., 2017).

Bezerros suplementados com *blend* de óleos essenciais (óleo de eucalipto, cristal de mentol, óleo de menta; os mesmos óleos utilizados em nosso estudo) no sucedâneo do leite demonstraram aumento no desempenho, melhor saúde geral, bem como redução do uso de antibióticos antes do desaleitamento (Soltan, 2009). A suplementação deste *blend* na dosagem de 94 mg/d no sucedâneo reduziu o consumo de matéria seca, melhorou a eficiência alimentar, aumentou as concentrações de proteína total e albumina no soro sanguíneo, diminuiu os dias com diarreia e melhorou o escore de saúde. O autor manteve a suplementação após o desaleitamento na água de beber (15,6 mg de OE/L) e apontou melhora no desempenho dos bezerros nessa fase com maior ganho de peso diário e melhora da eficiência alimentar (Soltan, 2009).

No entanto, Santos et al. (2015) relataram que óleos essenciais (uma mistura de carvacrol, cineol, cinamaldeído e óleo de pimenta) em sucedâneos do leite (400 mg/kg de sucedâneo do leite) ou suplementados em uma combinação de sucedâneos do leite (200 mg/kg) e concentrado inicial (200 mg/kg) não teve efeito sobre o desempenho, escore fecal e microbiota intestinal de bezerros leiteiros.

De acordo com Seifzadeh et al. (2017), a adição de *blend* à base de 7 extrativos de plantas, dentre eles menta e eucalipto, aumentou o GMD, o consumo de concentrado inicial e a concentração sérica de BHB em bezerros leiteiros. Com base nos dados da literatura, é possível certificar que além do método de suplementação (na dieta líquida ou sólida), o tipo de planta da qual o extrato é obtido também afeta os resultados.

Além disso, se houver aquecimento do extrato durante a preparação do concentrado e o maior contato com o ambiente, pode haver oxidação, evaporação ou conversão de compostos secundários de óleos essenciais (OE) (Turek e Stintzing, 2013). Portanto, a suplementação de OE através dieta líquida pode maximizar a conservação da qualidade e seus efeitos esperados (Kaba et al., 2018).

Entretanto, os estudos ainda são bastante recentes, quando comparados a outros aditivos como os probióticos, por exemplo (Gheisar e Kim, 2018). Além disso, a grande variedade de óleos essenciais existente pode tornar difícil a consolidação desses produtos como eficientes na mitigação de problemas sanitários durante a fase de cria. Por esse motivo, são comercializados geralmente na forma de *blends*, ou seja, vários extratos na mesma composição. Assim, são necessários ainda mais estudos para entender suas diferentes formas de ação e possibilidades na criação de bezerros.

## Referências


Akayezu, J.M., J.G. Linn, D.E. Otterby, W.P. Hansen and D.G. Johnson. 1994. Evaluation of calf starters containing different amounts of crude protein for growth of Holstein calves. J. Dairy Sci. 77:1882-1889.

Al-Mariri, A., G. Saour and R. Hamou. 2012. In vitro antibacterial effects of five volatile oil extracts against intramacrophage Brucella abortus 544. Iran. J. Med. Sci., 37:119.

Anderson, N.G. 2008. Experiences with free-access acidified-milk feeding in Ontario. Proceedings of Annual Meeting of American Association of Bovine Practitioners.41:2-24.

Anderson, N.G. 2013. Group housing and feeding of milk-fed calves: Moving closer to nature's way. OMAFRA Infosheet. Disponível em: <http://www.omafra.gov.on.ca/english/livestock/dairy/facts/grouphousing.htm#deliv er y>. Acesso em: 02/08/2022.

Aust, V., K. Knappstein, H.J. Kunz, H. Kaspar, J. Wallmann, M. Kaske. 2012 Feeding untreated and pasteurized waste milk and bulk milk to calves: Effects on calf performance, health status and antibiotic resistance of faecal bacteria. J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. 97:1091-1103.

Azevedo, R.A., A.M. Teixeira, C.M.M. Bittar, et al. 2020. Alta Cria. Uberaba, Minas Gerais, 1ª Ed. 2020.108p.

Baldwin, R.L., K.R. McLeod, J.L. Klotz, R.N. Heitmann. 2004. Rumen development, intestinal growth and hepatic metabolism in the pre- and postweaning ruminant. J. Dairy Sci. 87:55-65.

Bampidis, V.A., V. Christodoulou, P. Florou-Paneri and E. Christaki. 2006. Effect of dried oregano leaves versus neomycin in treating newborn calves with colibacillosis. J. Vet. Med. 53: 154-156.

Bannink, A., J. France, S. Lopez, W.J.J. Gerrits, E. Kebreab, S. Tamminga and J. Dijkstra. 2008. Modelling the implications of feeding strategy on rumen fermentation and functioning of the rumen wall. Anim. Feed Sci. Technol. 143:3-26.

Becerril, R., R. Gómez-Lus, P. Goni, P. López, C. Nerín. 2007. Combination of analytical and microbiological techniques to study the antimicrobial activity of a new active food packaging containing cinnamon or oregano against E. coli and S. aureus. Anal. Bioanal. Chem. Res. 388:1003-1011.

Benchaar, C., S. Calsamiglia, A.V. Chaves, G.R. Fraser, D. Colombatto, T.A. McAllister and K.A. Beauchemin. 2008. A review of plant-derived essential oils in ruminant nutrition and production. Anim. Feed Sci. Technol. 145:209-228.

Benetton, J.B., H.W. Neave, J.H.C. Costa, M.A.G. Von Keyserlingk and D.M. Weary. 2019. Automatic weaning based on individual solid feed intake: Effects on behavior and performance of dairy calves J. Dairy Sci. 102:5475-5491.

Bosabalidis, A.M. 2002. Structural features of Origanum sp. Med. Arom. Plants-Industrial Prof. 25:11-64.

Bottacini, F., M. Ventura, D. Van Sinderen and M. O'Connell Motherway. 2014. Diversity, ecology and intestinal function of bifidobacteria. Microbial cell factories, 13:1-15.

Bouyahya, A., A. Et-Touys, Y. Bakri, A. Talbaui, H. Fellah, J. Abrini, and N. Dakka. 2017. Chemical composition of Mentha pulegium and Rosmarinus officinalis essential oils and their antileishmanial, antibacterial and antioxidant activities. Microb. Pathog., 111:41-49.

Broucek, J. 2020. Water consumption, performance, and health in calves: a review. J. Anim. Behav. Biometeorol. 7:164-169.

Burt, S.A., R. van der Zee, A.P. Koets, A.M. de Graaff, F. van Knapen, W. Gaastra and E.J. Veldhuizen. 2007. Carvacrol induces heat shock protein 60 and inhibits synthesis of flagellin in Escherichia coli O157: H7. Appl. Environ. Microbiol. 73:4484-4490.

Bush, R.S. and J.W.G. Nicholson. 1987. Effect of two acids and formalin in calves milk on feed consumption and performance. Can. J. Anim. Sci. 67:1129-1131.

Calsamiglia, S., M. Busquet, P.W. Cardozo, L. Castillejos, A. Ferret. 2007. Invited review: essential oils as modifiers of rumen microbial fermentation. J. Dairy Sci. 90:2580-2595.

Cardoso, C.L., D. Somwe and G. Esposito. 2016. Neonate immunity, growth, and puberty in dairy calves: Influence of dietary conjugated linoleic acid supplementation of the dam. J. Anim. Sci. 94:373-373.

Carrubba, A., L. Abbate, M. Sarno, F. Sunseri, A. Mauceri, A. Lupini, and F. Mercati. 2020. Characterization of Sicilian rosemary (Rosmarinus officinalis L.) germplasm through a multidisciplinary approach. Planta, 251:1-15.

Chase, C.C., D.J. Hurley and A.J. Reber. 2008. Neonatal immune development in the calf and its impact on vaccine response. Vet. Clin. N. Am. Food Anim. Pract. 24:87-104.

Chase, L.E. 2011. Preservatives and acidifying chemicals for milk. Cornell University, Ithaca. Disponível em: <http://www.atticacows.com/documentView.asp?docID=4910>. Acesso em: 24/08/2022.

Chen, Y., Y. Gao, S. Yin, S. Zhang, L. Wang and Y. Qu. 2020. Effect of acidified milk feeding on the intake, average daily gain and fecal microbiological diversity of Holsten dairy calves. Asian-Australas. J. Anim. Sci. 33:1265.

Chessa, M., A. Sias, A. Piana, G.S. Mangano, G.L. Petretto, M.D. Masia and G. Pintore. 2013. Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil from Mentha requienii Bentham. Nat. Prod. Res. 27:93-99.

Chiang, L.C., H.Y. Cheng, M.C. Liu, W. Chiang and C.C. Lin. 2003. In vitro anti-herpes simplex viruses and anti-adenoviruses activity of twelve traditionally used medicinal plants in Taiwan. Biol. Pharm. Bull. 26:1600-1604.

Choi, K.S., J.H. Kang, H.C. Cho, D.H. Yu and J. Park. 2021. Changes in serum protein electrophoresis profiles and acute phase proteins in calves with diarrhea. Can. J. Vet. Res. 85:45-50.

Cobellis, G., M. Trabalza-Marinucci and Z. Yu. 2016. Critical evaluation of essential oils as rumen modifiers in ruminant nutrition: A review. Sci. Total Environ. 545:556-568.

Coelho, M. G., F.L.M. Silva, M.D. Silva, A.P. Silva, A.M. Cezar, G.S. Slanzon, E. Miqueo, A.F. de Toledo and C.M.M. Bittar. 2020. Acidified milk for feeding dairy calves in tropical raising systems. J. Anim. Feed Sci. 29:215–223.

Coelho, M.G., G.F. Virgínio Júnior, C.R. Tomaluski, A.F. de Toledo, M.E. Reis, S.C. Dondé, C.M.M. Bittar. 2022. Comparative study of different liquid diets for dairy calves and the impact on performance and the bacterial community during diarrhea. Sci. Rep. 12:1-13.

Constable, P.D., W. Kenneth, K.W. Hinchcliff, S.H. Done, W. Grünberg. 2017. Veterinary Medicine: A textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats. Elsevier Health Sciences.

Costa, J.H., M.C. Cantor, N.A. Adderley and H.W. Neave. 2019. Key animal welfare issues in commercially raised dairy calves: social environment, nutrition, and painful procedures. Can. J. Anim. Sci. 99:649-660.

Dai, J., C. Li, H. Cui and L. Lin. 2021. Unraveling the anti-bacterial mechanism of Litsea cubeba essential oil against E. coli O157: H7 and its application in vegetable juices. Int. J. Food Microbiol. 338:108989.

Damiaans, B., S. Sarrazin, E. Heremans and J. Dewulf. 2018. Perception, motivators and obstacles of biosecurity in cattle production. Vlaams Diergeneeskd Tijdschr. 87:150-163.

De Passillé, A.M., and J. Rushen. 2016. Using automated feeders to wean calves fed large amounts of milk according to their ability to eat solid feed. J. Dairy Sci. 99:3578-3583.

De Passillé, A.M., T.F. Borderas and J. Rushen. 2011. Weaning age of calves fed a high milk allowance by automated feeders: Effects on feed, water, and energy intake, behavioral signs of hunger, and weight gains. J. Dairy Sci. 94:1401-1408.

de Sousa, A.A.S., P.M.G. Soares, A.N.S. de Almeida, A.R. Maia, E.P. de Souza, and A.M.S. Assreuy. 2010. Antispasmodic effect of Mentha piperita essential oil on tracheal smooth muscle of rats. J. Ethnopharmacol. 130:433-436.

Dennis, T.S., F.X. Suarez-Mena, T.M. Hill, J.D. Quigley, R.L. Schlotterbeck and L. Hulbert. 2018. Effect of milk replacer feeding rate, age at weaning, and method of reducing milk replacer to weaning on digestion, performance, rumination, and activity in dairy calves to 4 months of age. J. Dairy Sci. 101:268-278.

Drackley, J.K. 2008. Calf nutrition from birth to breeding. Vet. Clin. N. Am. Food Anim. Pract. 24:55-86.

Ebani, V.V., S. Nardoni, F. Bertelloni, G. Tosi, P. Massi, L. Pistelli, and F. Mancianti. 2019. In vitro antimicrobial activity of essential oils against Salmonella enterica serotypes Enteritidis and Typhimurium strains isolated from poultry. Molecules, 24:900.

El-Baz, F.K., K. Mahmoud, W.M. El-Senousy, O.M. Darwesh and A.E. ElGohary. 2015. Antiviral–antimicrobial and schistosomicidal activities of Eucalyptus camaldulensis essential oils. Int. J. Pharm. Sci. Ver. Res. 31:262-268.

El-Hack, A., E. Mohamed, M. Alagawany, A.M.E. Abdel-Moneim, N.G. Mohammed, A.F. Khafaga and S.S. Elnesr. 2020. Cinnamon (Cinnamomum zeylanicum) oil as a potential alternative to antibiotics in poultry. Antibiotics. 9:210.

Erickson, P.S., D.J. Schauff and M.R. Murphy. 1989. Diet digestibility and growth of Holstein calves fed acidified milk replacers containing soy protein concentrate. J. Dairy Sci. 72:1528-1533.

Fallon, R.J. and F.J. Harte. 1986. Effect of Methods of Weaning Calves off Automatic Calf Feeders on Their Performance. Irish J. Agric. Food Res. 213-221.

Fariña, S.R., and P. Chilibroste. 2019. Opportunities and challenges for the growth of milk production from pasture: The case of farm systems in Uruguay. Agric. Syst. 176:102631.

Fattinger, S.A., M.E. Sellin and W.D. Hardt. 2021. Salmonella effector driven invasion of the gut epithelium: breaking in and setting the house on fire. Curr. Opin. Microbiol. 64:9-18.

Ferraro, S., G. Fecteau, J. Dubuc, D. Francoz, M. Rousseau, J.P. Roy and S. Buczinski. 2021. Scoping review on clinical definition of bovine respiratory disease complex and related clinical signs in dairy cows. J. Dairy Sci. 104:7095-7108.

Foley, J.A. and D.E. Otterby. Availability, storage, treatment, composition, and feeding value of surplus colostrum: A review. J. Dairy Sci. 61:1033-1060.

Foster, D.M. and G.W. Smith. 2009. Pathophysiology of diarrhea in calves. Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract. 25:13-36.

Freitas, M. D. 2013. Avaliação de soluções eletrolíticas orais em bezerros neonatos durante o curso da diarreia.

Freitas, M.D., E.J. Facury Filho, M.B. Heinemman, P.M. Ferreira, A.U. de Carvalho, A. Lage and M.G. Ferreira. 2009. Determinação do perfil hidroeletrolítico e do equilíbrio ácido-básico de bezerras hígidas de três aos trinta dias de idade. Cienc. Anim. Bras. 1:70-75.

Freitas, M.D., M.G. Ferreira, P.M. Ferreira, A.U. Carvalho, A.P. Lage, M.B. Heinemann, E.J. Facury Filho. 2010. Equilibrio eletrolítico e ácido-base em bovinos. Ciênc. Rural. 40:2608-2615.

Froehlich, K.A., K.W. Abdelsalam, C. Chase, J. Koppien-Fox, and D.P. Casper. 2017. Evaluation of essential oils and prebiotics for newborn dairy calves. J. Anim. Sci. 95:3772-3782.

Fukuda, S. and H, Ohno, H. 2014. Gut microbiome and metabolic diseases. In Seminars in immunopathology. Springer Berlin Heidelberg. 103-114.

Fulton, R.G., R.E. Briggs, M.E. Payton, A.W. Confer, J.T. Saliki, J.F. Ridpath, L.J. Burge, G.C. Duff. 2004. Maternally derived humoral immunity to Bovine Viral Diarrhea Virus (BVDV)1a, BVDV1b, BVDV2, Bovine Herpesvirus1, Parainfluenza-3 Virus Bovine Respiratory Syncytial Virus, Mannheimia haemolytica and Pasteurella multocida in beef calves, antibody decline by half-life studies and effect on response to vaccination. Vaccine. 22:643-649.

Furman-Fratczak, K., A. Rzasa and T. Stefaniak. 2011. The influence of colostral immunoglobulin concentration in heifer calves' serum on their health and growth. J. Dairy Sci. 94:5536-5543.

Gelsinger, S.L., A.J. Heinrichs and C.M. Jones. 2016. A meta-analysis of the effects of preweaned calf nutrition and growth on first-lactation performance. J. Dairy Sci. 99:6206-6214.

Gilling, D.H., M. Kitajima, J.R. Torrey and K.R. Bright. 2014. Antiviral efficacy and mechanisms of action of oregano essential oil and its primary component carvacrol against murine norovirus. J. Appl. Microb. 116:1149-1163.

Gomez, D.E., and J.S. Weese. 2017. Viral enteritis in calves. Can. Vet. J. 58:1267.

Gómez-García, M., C. Sol, P.J. de Nova, M. Puyalto, L. Mesas, H. Puente and A. Carvajal, A. 2019. Antimicrobial activity of a selection of organic acids, their salts and essential oils against swine enteropathogenic bacteria. Porc. Health Manag. 5:1-8.

Gorden, P.J. and P. Plummer. 2010. Control, management, and prevention of bovine respiratory disease in dairy calves and cows. Vet. Clin. N. Am. Food Anim. Pract. 26:243–259.

Gottardo, F., S. Mattiello, G. Cozzi, E. Canali, E. Scanziani, L. Ravarotto, V. Ferrante, M. Verga, I. 2002. Andrighetto The provision of drinking water to veal calves for welfare purpose. J. An. Sci. 80:2362-2372.

Guler, O., M. Yanar, B. Bayram and J.A.L.E. Metin. 2006. Performance and health of dairy calves fed limited amounts of acidified milk replacer. S. Afr. J. Anim. Sci. 36:149-154.

Haneda, T., Y. Ishii, H. Shimizu, K. Ohshima, N. Iida, H. Danbara, N. Okada. 2012. Salmonella type III effector SpvC, a phosphothreonine lyase, contributes to reduction in inflammatory response during intestinal phase of infection. Cell. Microbiol. 14:485-499.

Heinrichs, A.J. and B.S. Heinrichs. 2011. A prospective study of calf factors affecting first-lactation and lifetime milk production and age of cows when removed from the herd. J. Dairy Sci. 94:336-341.

Hill, T.M., H.G. Bateman II, J.M. Aldrich, J.D. Quigley and R.L. Schlotterbeck. 2013. Evaluation of ad libitum acidified milk replacer programs for dairy calves. J. Dairy Sci. 96:3153-3162.

Hill, T.M., H.G. Bateman, J.M. Aldrich and R.L. Schlotterbeck. 2010. Effect of milk replacer program on digestion of nutrients in dairy calves. J. Dairy Sci. 93:1105-1115.

Hulbert, L.E. and S.J. Moisá. 2016. Stress, immunity, and the management of calves. J. Dairy Sci. 99:3199-3216.

Hulbert, L.E., C.J. Cobb, J.A. Carroll and M.A. Ballou. 2011. The effects of early weaning on innate immune responses of Holstein calves. J. Dairy Sci, 94:2545-2556.

Jasper, J. and D.M. Weary. 2002. Effects of ad libitum milk intake on dairy calves. J. Dairy Sci. 85:3054-3058.

Jassim, S.A., and M.A. Naji. 2003. Novel antiviral agents: a medicinal plant perspectiveJ. Appl. Microbiol. 95:412-427.

Jeshari, M., A. Riasi, A.H. Mahdavi, M. Khorvash and F. Ahmadi. 2016. Effect of essential oils and distillation residues blends on growth performance and blood metabolites of Holstein calves weaned gradually or abruptly. Lives. Sci. 185:117-122.

Kaba, T., B. Abera and T. Kassa. 2018. Esophageal groove dysfunction: a cause of ruminal bloat in newborn calves. BMC Vet.Res. 14:1-5.

Kamatou, G.P., I. Vermaak, A.M. Viljoen and B.M Lawrence. 2013. Menthol: a simple monoterpene with remarkable biological properties. Phytochemistry. 96:15-25.

Katsoulos, P.D., M.A. Karatzia, C.I. Dovas, G. Filioussis, E. Papadopoulos, E. Kiossis and H. Karatzias. 2017. Evaluation of the in-field efficacy of oregano essential oil administration on the control of neonatal diarrhea syndrome in calves. Res. Vet. Sci. 115:478-483.

Kertz, A.F., T.M. Hill, J.D. Quigley III, A.J. Heinrichs, J.G. Linn and J.K. Drackley. 2017. A 100-Year Review: Calf nutrition and management. J. Dairy Sci. 100:10151-10172.

Khan, M.A., D.M. Weary and M.A.G. Von Keyserlingk .2011. Hay intake improves performance and rumen development of calves fed higher quantities of milk. J. Dairy Sci. 94:3547-3553.

Khan, M.A., H.J. Lee, W.S. Lee, H.S. Kim, S.B. Kim, S.B. Park and Y.J. Choi. 2008. Starch source evaluation in calf starter: II. Ruminal parameters, rumen development, nutrient digestibilities, and nitrogen utilization in Holstein calves. J. Dairy Sci. 91:1140-1149.

Korst, M., C. Koch, J. Kesser, U. Müller, F.J. Romberg, J. Rehage and H. Sauerwein. 2017. Different milk feeding intensities during the first 4 weeks of rearing in dairy calves: Part 1: Effects on performance and production from birth over the first lactation. J. Dairy Sci. 100:3096-3108.

Lambert, R.J.W., P.N. Skandamis, P.J. Coote, G.J. Nychas. 2001. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. J. Appl. Microbiol. 91:453-462.

Langoni, H., A.C. Linhares, F.A.D. Avila, A.V. Da Silva and A.O. Elias. 2004. Contribution to the study of diarrhea etiology in neonate dairy calves in São Paulo state, Brazil. Braz J Vet Res Anim Sci. 41:313-319.

Larson, L.L., F.G. Owen, J.L. Albright, R.D. Appleman, R.C. Lamb and L.D. Muller. 1977. Guidelines toward more uniformity in measuring and reporting calf experimental data. J. Dairy Sci. 60:989-991.

Lesmeister, K.E. and A.J. Heinrichs. 2004. Effects of corn processing on growth characteristics, rumen development, and rumen parameters in neonatal dairy calves. J. Dairy Sci. 87:439-3450.

Li, J.H., M.H. Yousif, Z.Q. Li, Z.H. Wu, S.L. Li, H.J. Yang and Z.J. Cao. 2019. Effects of antibiotic residues in milk on growth, ruminal fermentation, and microbial community of preweaning dairy calves. J. Dairy Sci. 102:2298-2307.

Li, N., W. Zhao, S. Song, H. Ye, W. Chu, Y. Guo, L. Xiao. 2022. Diarrhoea outbreak caused by coinfections of Cryptosporidium parvum subtype IIdA20G1 and rotavirus in pre-weaned dairy calves. Transbound. Emerg. Dis.

Lin, S., L. Fang, X. Kang, S. Liu, M. Liu, E.E. Connor and C.J. Li. 2020. Establishment and transcriptomic analyses of a cattle rumen epithelial primary cells (REPC) culture by bulk and single-cell RNA sequencing to elucidate interactions of butyrate and rumen development. Heliyon, 6:04112.

Liu, T., H. Chen, Y. Bai, J. Wu, S. Cheng, B. He and D.P. Casper. 2020. Calf starter containing a blend of essential oils and prebiotics affects the growth performance of Holstein calves. J. Dairy Sci. 103:2315-2323.

McGuirk, S.M. 2008. Disease management of dairy calves and heifers. Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract. 24:139-153.

Messaoudi, M., A. Rebiai, B. Sawicka, M. Atanassova, H. Ouakouak, I. Larkem, and N. Benchikha. 2021. Effect of Extraction Methods on Polyphenols, Flavonoids, Mineral Elements, and Biological Activities of Essential Oil and Extracts of Mentha pulegium L. Molecules, 27:11.

Metin, S., B.I. Didinen, I. Telci, and O. Diler. 2021. Essential oil of Mentha suaveolens Ehrh. composition and antibacterial activity against bacterial fish pathogens. Anais da Academia Brasileira de Ciências, 93.

Mimica-Dukic, N. and B. Bozin. 2008. Mentha L. species (Lamiaceae) as promising sources of bioactive secondary metabolites. Curr. Pharm. Des., 14:3141-3150.

Mohammadi Gheisar, M. and L.H. Kim. 2018. Phytobiotics in poultry and swine nutrition–a review. Ital. J. Anim. Sci. 17:92-99.

Morrison, S.Y., P.A. LaPierre, K.N. Brost and J.K. Drackley. 2019. Intake and growth in transported Holstein calves classified as diarrheic or healthy within the first 21 days after arrival in a retrospective observational study. J. Dairy Sci. 102:10997-11008.

Murray, C.F., D.M. Veira, A.L. Nadalin, D.M. Haines, M.L. Jackson, D.L. Pearl and K.E. Leslie. 2015. The effect of dystocia on physiological and behavioral characteristics related to vitality and passive transfer of immunoglobulins in newborn Holstein calves. Can. J. Vet. Res. 79:109-119.

NASEM (National Academies of Sciences, Engineering, and Medicine). 2021. Nutrient Requirements of Dairy Cattle. 8th rev. ed. Natl. Acad. Press, Washington, D.C.

Naylor, J. M. 1999. Oral electrolyte therapy. Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract. 15:487-504.

Neave, H.W., J.H. Costa, J.B. Benetton, D.M. Weary and M.A. von Keyserlingk. 2019. Individual characteristics in early life relate to variability in weaning age, feeding behavior, and weight gain of dairy calves automatically weaned based on solid feed intake. J. Dairy Sci. 102:10250-10265.

Oikonomou, G., A.G.V. Teixeira, C. Foditsch, M.L. Bicalho, V.S. Machado and R.C. Bicalho. 2013. Fecal microbial diversity in pre-weaned dairy calves as described by pyrosequencing of metagenomic 16S rDNA. Associations of Faecalibacterium species with health and growth. PloS one. 8:63157.

Oussalah, M., S. Caillet, M. Lacroix. 2006. Mechanism of action of Spanish oregano, Chinese cinnamon, and savory essential oils against cell membranes and walls of Escherichia coli O157: H7 and Listeria monocytogenes. J. Food Prot. 69:1046-1055.

Overvest, M.A., R. Bergeron, D.B. Haley and T.J. DeVries. 2016. Effect of feed type and method of presentation on feeding behavior, intake, and growth of dairy calves fed a high level of milk. J. Dairy Sci. 99:317-327.

Pacheco, A.R., D. Barile, M.A. Underwood and D.A. Mills. 2015. The impact of the milk glycobiome on the neonate gut microbiota. Annual review of animal biosciences. 3:419.

Parker, A.M., J.K. House, M.S. Hazlton, K.L. Bosward, V.L. Mohler, F.P. Maunsell, P.A. Sheehy. 2016. Milk acidification to control the growth of Mycoplasma bovis and Salmonella Dublin in contaminated milk J. Dairy Sci. 99:9875-9884.

Perez-Roses, R., E. Risco, R. Vila, P. Penalver, S. Canigueral. 2015. Effect of some essential oils on phagocytosis and complement system activity. J. Agric. Food Chem. 63:1496-1504.

Phillips, W.A., and VonTungeln, D.L. 1985. The effect of yeast culture on the poststress performance of feeder calves. Nutr. Rep. Int, 32:287.

Puvača, N., I. Čabarkapa, A. Petrović, V. Bursić, R. Prodanović, D. Soleša, and J. Lević. 2019. Tea tree (Melaleuca alternifolia) and its essential oil: antimicrobial, antioxidant and acaricidal effects in poultry production. Poult. Sci. J. 75:235-246.

Radivojac, A., O. Bera, Z. Zeković, N. Teslić, Z. Mrkonjić and D. Bursać Kovačević .2021. Extraction of Peppermint Essential Oils and Lipophilic Compounds: Assessment of Process Kinetics and Environmental Impacts with Multiple Techniques. Molecules. 26:2879.

Radostitis O.M., C.C. Gay, K.W. Hinchcliff, P.D. Constable. 2007. Veterinary Medicine, A textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs, and goats, 10th edn. Saunders-Elsevier, Philadelphia. 1286–1296.

Reddy, M.V., G. Kumar, G. Mohanakrishna, S. Shobana and R.I. Al-Raoush. 2020. Review on the production of medium and small chain fatty acids through waste valorization and CO2 fixation. Biores. Techn. 309:123400.

Renaud, D.L., C. Rot, J. Marshall and M.A. Steele. 2021. The effect of Cryptosporidium parvum, rotavirus, and coronavirus infection on the health and performance of male dairy calves. J. Dairy Sci. 104:2151-2163.

Renaud, D.L., D.F. Kelton, J.S. Weese, C. Noble and T.F. Duffield. 2019. Evaluation of a multispecies probiotic as a supportive treatment for diarrhea in dairy calves: A randomized clinical trial. J. Dairy Sci. 102:4498-4505.

Ribeiro, M.D., J.C. Pereira, A.C. De Queiroz, P.R. Cecon, E. Detmann, J.A. Gomes Azevêdo. 2009. Performance of dairy calves fed milk, milk replacer or post- weaning concentrate with acidifiers. Rev. Bra. Zoot. 38:959-963.

Richard, A. L.; Muller, L. D.; Heinrichs, A. J. 1988. Ad libitum or twice daily feeding of acidified milk replacer to calves housed individually in warm and cold environments. J. Dairy Sci. 71:2193-2202.

Rosenberger, K., J.H.C. Costa, H.W. Neave, M.A.G. Von Keyserlingk, and D.M. Weary. 2017. The effect of milk allowance on behavior and weight gains in dairy calves. J. Dairy Sci. 100:504-512.

Rozza, A.L. and C.H. Pellizzon. 2013. Essential oils from medicinal and aromatic plants: a review of the gastroprotective and ulcer-healing activities. Basic. Clin. 27:51-63.

Santman-Berends, I.M.G.A., Y.H. Schukken and G. Van Schaik. 2019. Quantifying calf mortality on dairy farms: Challenges and solutions. J. Dairy Sci. 102:6404-6417.

Santos, F.H.R., M.R. De Paula, D. Lezier, J.T. Silva, G. Santos and C.M.M. Bittar .2015. Essential oils for dairy calves: effects on performance, scours, rumen fermentation and intestinal fauna. Animal, 9:958-965.

Schären, M., C. Drong, K. Kiri, S. Riede, M. Gardener, U. Meyer and S. Dänicke. 2017. Differential effects of monensin and a blend of essential oils on rumen microbiota composition of transition dairy cows. J. Dairy Sci. 100:2765-2783.

Schild, C.O., R.D. Caffarena, A. Gil, J. Sánchez, F. Riet-Correa and F. Giannitti. 2020. A survey of management practices that influence calf welfare and an estimation of the annual calf mortality risk in pastured dairy herds in Uruguay. J. Dairy Sci. 103:9418-9429.

Seifzadeh, S., F. Mirzaei Aghjehgheshlagh, H. Abdibenemar, J. Seifdavati and B. Navidshad. 2017. The effects of a medical plant mix and probiotic on performance and health status of suckling Holstein calvesItal. J. Anim. Sci. 16:44-51.

Siddiqui R.R., H. Ahmad, C.S. Shakoor, A.F.M. Ehteshamuddin, S. Shiree. 1996. Antimicrobial activity of essential oils. Part II. Pak. J. Scient. Ind. Res. 39:43-47.

Simitzis, P.E. 2017. Enrichment of animal diets with essential oils—a great perspective on improving animal performance and quality characteristics of the derived products. Medicines. 4:35.

Soltan, M.A. 2009. Effect of essential oils supplementation on growth performance, nutrient digestibility, health condition of Holstein male calves during pre-and post-weaning periods. Pakist. J. Nutri. 8:642-652.

Spanghero, M., P.H. Robinson, C. Zanfi, and E. Fabbro. 2009. Effect of increasing doses of a microencapsulated blend of essential oils on performance of lactating primiparous dairy cows. Anim. Feed Sci. Technol. 153:153-157.

Stamey, J.A., N.A. Janovick, A.F. Kertz and J.K. Drackley. 2012. Influence of starter protein content on growth of dairy calves in an enhanced early nutrition program. J. Dairy Sci. 95:3327-3336.

Stamilla, A., N. Russo, A. Messina, C. Spadaro, A. Natalello, C. Caggia and M. Lanza. 2020. Effects of Microencapsulated Blend of Organic Acids and Essential Oils as a Feed Additive on Quality of Chicken Breast Meat. Animals, 10:640.

Stanton, A.L., D.F. Kelton, S.J. LeBlanc, J. Wormuth and K.E. Leslie. 2012. The effect of respiratory disease and a preventative antibiotic treatment on growth, survival, age at first calving, and milk production of dairy heifers. J. Dairy Sci. 95:4950-4960.

Stevanović, Z.D., J. Bošnjak-Neumüller, I. Pajić-Lijaković, J. Raj and M. Vasiljević, M. 2018. Essential oils as feed additives—Future perspectives. Molecules. 23:1717.

Stewart, S., S. Godden, R. Bey, P. Rapnicki, J. Fetrow, R. Farnsworth, M. Scanlon, Y. Arnold, L. Clow, K. Mueller, C. Ferrouillet. 2005. Preventing bacterial contamination and proliferation during the harvest, storage and feeding of fresh bovine colostrum. J. Dairy Sci. 88:2571-2578.

Svensson, C., K. Lundborg, U. Emanuelson and S.O. Olsson. 2003. Morbidity in Swedish dairy calves from birth to 90 days of age and individual calf-level risk factors for infectious diseases. Prev. Vet. Med. 58:179-197.

Todd, C.G. 2013. An Investigation into the Effects of Free-Access Acidified Milk Replacer Feeding Programs on the Productivity and Welfare of the Calf. 283 p. Tese (Doutorado em Filosofia da Medicina Populacional) - The University of Guelph, Ontario, 2013.

Todd, C.G., K.E. Leslie, S.T. Millman, J.M. Sargeant, H. Migdal, K. Shore, N.G. Anderson, T.J. Devries. 2016. Milk replacer acidification for free- access feeding: effects on the performance on health of veal calves. J. Anim. Sci. 6:234-246.

Todd, C.G., K.E. Leslie, S.T. Millman, V. Bielmann, N.G. Anderson, J.M. Sargeant, T.J. Devries. 2017. Clinical trial on the effects of free-access acidified milk replacer feeding program on the health and growth of dairy replacement heifers and veal calves. J. Dairy Sci. 100:1-13

Todd, C.G., S.T. Millman, K.E. Leslie, N.G. Anderson, J.M. Sargeant and T.J. DeVries. 2018. Effects of milk replacer acidification and free-access feeding on early life feeding, oral, and lying behavior of dairy calves. J. Dairy Sci.101:8236-8247.

Todd, C.G., T.J. Devries, K.E. Leslie, J.M. Sargeant, K. Shore, N.G. Anderson, S.T. Millman, S. 2010. Effects of free-access feeding and milk replacer acidification on calf performance and development of digestive anatomy. J. Anim. Sci. 87:514-520, 2010.

Trefz, F.M., A. Lorch, M. Feist, C. Sauter-Louis, I. Lorenz. 2013. The prevalence and clinical relevance of hyperkalaemia in calves with neonatal diarrhoea. Vet. J. 195:350-356.

Turek, C. and F.C. Stintzing. 2013. Stability of essential oils: a review. Compr. Rev. Food Sci. Food Saf. 12:40-53.

Turgis, M., J. Han, S. Caillet, and M. Lacroix. 2009. Antimicrobial activity of mustard essential oil against Escherichia coli O157: H7 and Salmonella typhi. Food control. 20:1073-1079.

Urie, N. J., J.E. Lombard C.B. Shivley, C.A. Kopral, A.E. Adams, T.J. Earleywine and F.B. Garry. 2018. Preweaned heifer management on US dairy operations: Part V. Factors associated with morbidity and mortality in preweaned dairy heifer calves. J. Dairy Sci. 101:9229-9244.

USDA. 2018. Dairy 2014: Health and management practices on U.S. dairy operations, 2014. USDA-Animal and Plant Health Inspection Service (APHIS)-Veterinary Services (VS)-Center for Epidemiology and Animal Health (CEAH), Fort Collins, CO. https: / /www.aphis.usda .gov/ animal health/nahms/ dairy/ downloads/ dairy14/ Dairy14 dr PartIII .pdf.

Valková, V., H. Ďúranová, L. Galovičová, N.L. Vukovic, M. Vukic and M. Kačániová. 2021. In Vitro antimicrobial activity of lavender, mint, and rosemary essential oils and the effect of their vapours on growth of Penicillium spp. in a bread model system. Molecules, 26:3859.

Virgínio Júnior, G. F., M.G. Coelho, A.F. de Toledo, H. Montenegro, L.L. Coutinho, C.M.M. Bittar. 2021a. The Liquid Diet Composition Affects the Fecal Bacterial Community in Pre-weaning Dairy Calves. Front. Anim. Sci. 2:12.

Virgínio Júnior, G.F., M.G. Coelho, A.F. de Toledo, H. Montenegro, L.L. Coutinho and C.M.M. Bittar. 2021b. The liquid diet composition affects the fecal bacterial community in pre-weaning dairy calves. Front. Vet. Sci. 2:649468.

Vogels, Z., G.M. Chuck and J.M. Morton. 2013. Failure of transfer of passive immunity and agammaglobulinaemia in calves in south-west V ictorian dairy herds: prevalence and risk factors. Aust. Vet. J. 91:150-158.

Wathes, D.C., J.S. Brickell, N.E. Bourne, A. Swali and Z. Cheng. 2008. Factors influencing heifer survival and fertility on commercial dairy farms. Animal, 2:1135-1143.

Whalin, L., D.M. Weary and M.A. Von Keyserlingk. 2021. Understanding behavioural development of calves in natural settings to inform calf management. Animals, 11:2446.

Windeyer, M.C., K.E. Leslie, S.M. Godden, D.C. Hodgins, K.D. Lissemore and S.J. LeBlanc. 2014. Factors associated with morbidity, mortality, and growth of dairy heifer calves up to 3 months of age. Prev. Vet. Med. 113:231-240.

Wink, M. 2018. Plant secondary metabolites modulate insect behavior-steps toward addiction? Front. Physiol. 9:364.

Yamada, A.N., R. Grespan, A.T. Yamada, E.L. Silva, S.E. Silva-Filho, M.J. Damião and R.K.N. Cuman. 2013. Anti-inflammatory activity of Ocimum americanum L. essential oil in experimental model of zymosan-induced arthritis. Am. J. Chinese Med., 41: 913-926.

Yanar, M., O. Güler, B. Bayram and J. Metin. 2006. Effects of feeding acidified milk replacer on the growth, health and behavioural characteristics of Holstein Friesian calves. Turkish J. Vet. Anim. Sci. 30:235-241.

Zhai, H., Y. Luo, W. Ren, G. Schyns and P. Guggenbuhl. 2020. The effects of benzoic acid and essential oils on growth performance, nutrient digestibility, and colonic microbiota in nursery pigs. Anim. Feed Sci. Technol. 262:114426.

Zhang, R., X. Dong, M. Zhou, Y. Tu, N. Zhang, K. Deng, Q. Diao. 2017. Oral administration of Lactobacillus plantarum and Bacillus subtilis on rumen fermentation and the bacterial community in calves. J. Anim. Sci. 88:755-762.

Zhao, R., W. Guan, X. Zhou, M. Lao, and L. Cai. 2022. The physiochemical and preservation properties of anthocyanidin/chitosan nanocomposite-based edible films containing cinnamon-perilla essential oil pickering nanoemulsions. LWT. 153:112506.

Zheng, J., C. Sorensen, R. Li, H. An, C.F. Hildebolt, M.A. Zayed and M.K. Hastings. 2021. Deteriorated regional calf microcirculation measured by contrast-free MRI in patients with diabetes mellitus and relation with physical activity. Diab. Vasc. Dis. Res. 18:14791641211029002.

Zou, Y., Y. Wang, Y. Deng, Z. Cao, S. Li and J. Wang. 2017. Effects of feeding untreated, pasteurized and acidified waste milk and bunk tank milk on the performance, serum metabolic profiles, immunity, and intestinal development in Holstein calves. J. Anim. Sci. Biotechnol. 8:53.

Zouari-Bouassida, K., M. Trigui, S. Makni, L. Jlaiel, S. Tounsi. 2018. Seasonal variation in essential oils composition and the biological and pharmaceutical protective effects of Mentha longifolia leaves grown in Tunisia. BioMed Res. Inter.

# 3. ESTUDO COMPARATIVO DE DIFERENTES DIETAS LÍQUIDAS PARA BEZERROS LEITEIROS E SEU IMPACTO NO DESEMPENHO E COMUNIDADE MICROBIANA DURANTE EPISÓDIOS DE DIARREIA

## Resumo

A composição da dieta líquida pode afetar o desempenho de bezerros leiteiros e a incidência de diarreia. Foi avaliado o efeito de três dietas líquidas no desempenho, incidência de diarreia durante o período de aleitamento e a comunidade microbiana durante a ocorrência de diarreia em bezerros leiteiros. Ao nascimento, 35 bezerros leiteiros (20 machos e 15 fêmeas) foram blocados de acordo com sexo e peso ao nascer e aleatoriamente designados para um dos três tratamentos – leite integral refrigerado (LI), leite integral acidificado (LA) e substituto lácteo (SL). Ingestão, escore fecal e temperatura retal foram avaliados diariamente, enquanto desempenho e parâmetros sanguíneos foram avaliados semanalmente durante o período de aleitamento. Amostras fecais de bezerros diarreicos foram coletadas e uma amostra inicial e uma final para cada episódio foram selecionadas. A comunidade bacteriana foi avaliada através do sequenciamento da região V3-V4 do gene 16S rRNA na plataforma Illumina MiSeq e analisada usando o pipeline DADA2. Bezerros alimentados com LI apresentaram maior peso corporal ao desaleitamento, ganho médio diário, medidas corporais e concentração de metabólitos sanguíneos. Os bezerros alimentados com LA apresentaram menor temperatura retal e dias com febre. Além disso, os bezerros alimentados com SL apresentaram menor concentração de beta-hidroxibutirato e maior incidência de diarreia. A comunidade bacteriana fecal de bezerros com diarreia apresentou dissimilaridade entre o LA e os demais tratamentos. Em nível composicional, observou-se maior abundância dos gêneros Fusobacterium e Ruminococcus (LA), Prevotella (LI) e Lactobacillus (SL). Nas fezes dos bezerros diarréicos LA e SL, também observou-se a presença de alguns gêneros bacterianos benéficos. O desempenho e a incidência de diarreia de bezerros leiteiros foram influenciados pela dieta líquida consumida e pela composição bacteriana durante o episódio de diarreia.

**Palavras-chave:** Leite acidificado, Substituto lácteo, Diarreia, Microbioma

## Abstract

The liquid diet composition can affect dairy calves' performance and diarrhea incidence. The effect of three liquid diets on performance, incidence of diarrhea, and microbial community during diarrhea occurrence in dairy calves were evaluated. At birth, 35 dairy calves (20 male and 15 female) were randomly assigned to one of three treatments – refrigerated whole milk (WM), acidified whole milk (AWM), and milk replacer (MR). Intake, fecal score, and rectal temperature were evaluated daily, and performance and blood parameters were evaluated weekly during the preweaning period. Fecal samples from diarrheic calves were collected, and one initial and one final sample for each episode were selected. The bacterial community was assessed through sequencing of the V3-V4 region of the 16S rRNA gene on the Illumina MiSeq platform and analyzed using the DADA2 pipeline. Calves fed WM had higher body weight at weaning, average daily gain, body measurements, and concentration of blood metabolites. The AWM-fed calves had lower rectal temperature and fever days. Moreover, the MR-fed calves had lower beta-

hydroxybutyrate concentration and a higher incidence of diarrhea. The fecal bacterial community of diarrheic calves showed dissimilarity among the AWM and the other treatments. At the compositional level, we observed a higher abundance of Fusobacterium and Ruminococcus genera (AWM), Prevotella (WM), and Lactobacillus (MR). In the feces of the AWM and MR diarrheic calves, we also observed the presence of some beneficial bacterial genera. The performance and incidence of diarrhea of dairy calves were influenced by the liquid diet consumed and the bacterial composition of diarrhea.

**Keywords:** Acidified milk, Milk replacer, Diarrhea, Microbiome

## 3.1. Introdução

O período de aleitamento dos bezerros geralmente varia de 60 a 90 dias e, na maioria das vezes, são desaleitados aos 90 dias de idade (Virgínio Júnior et al., 2021). Assim, a dieta líquida fornecida desempenha um papel importante, pois fornece os principais nutrientes para o desenvolvimento do bezerro e substrato para o crescimento microbiano (Vírginio Júnior e Bittar, 2021).

O leite integral e o sucedâneo do leite são as principais dietas líquidas utilizadas em muitos países (Vasseur et al., 2010; USDA, 2014; Santos e Bittar, 2015). O leite integral é uma opção de alta qualidade, mas com considerável oscilação de nutrientes, associada a maiores custos; os substitutos do leite, por sua vez, podem ser uma alternativa mais constante, o que pode facilitar o manejo, mas pode representar um desafio para a saúde intestinal e desempenho de bezerros jovens de acordo com sua formulação (Glosson et al., 2015; Bittar et al., 2018).

Além disso, a maturidade do trato gastrointestinal e a digestão intestinal determinam a digestibilidade e a utilização de nutrientes pelo bezerro. No entanto, a digestibilidade pode ser afetada tanto pela qualidade nutricional quanto microbiológica (Bittar et al., 2018). A qualidade microbiológica, em particular, é muitas vezes negligenciada. Assim, bezerros recém-nascidos podem ser expostos diariamente a patógenos pela ingestão da dieta, o que pode levar a doenças infecciosas, endotoxinas perigosas e distúrbios intestinais (Deng et al., 2017).

A diarreia neonatal em bezerros é um distúrbio intestinal que causa muitas perdas econômicas aos produtores de leite devido à mortalidade e morbidade, elevando os custos veterinários e reduzindo o desempenho. Assim, há necessidade iminente de estabelecer estratégias para influenciar positivamente a composição e o equilíbrio da microbiota intestinal, o que pode reduzir a ocorrência e gravidade da diarreia e melhorar a saúde e o desempenho geral dos bezerros. O processo de acidificação da dieta líquida é uma alternativa interessante para solucionar este problema. Previne o crescimento de vários microrganismos patogênicos, diminui problemas digestivos e diarreicos, melhora o desempenho, melhora a composição bacteriana intestinal e aumenta a população de microrganismos

benéficos como *Bifidobacterium e Lactobacillus* (Virgínio Júnior et al., 2021; Todd et al., 2017; Coelho et al., 2020; Zou et al., 2017).

A maior incidência de diarreia nas primeiras semanas de vida pode afetar a homeostase dos ecossistemas microbianos intestinais (Virgínio Júnior et al., 2021). A microbiota tem demonstrado ser peça central para a manutenção da boa saúde e das principais funções dos organismos animais, especialmente do trato gastrointestinal (Vírginio Júnior e Bittar, 2021; Khalil et al., 2022) . Slanzon et al. (2022) observaram que bezerros com diarreia e deprimidos apresentaram maior abundância relativa de *Streptococcus gallolyticus* e *Escherichia coli*, e bezerros com diarreia, tanto ativos quanto deprimidos, tiveram menor abundância relativa de *Bifidobacterium longum* em comparação com bezerros saudáveis. Gomes et al. (2021) também atribuíram a maior população de *Bifidobacterium* no microbioma fecal a bezerros mais saudáveis.

Portanto, este estudo teve como objetivo comparar o desempenho, a incidência de diarreia e os parâmetros metabólicos de bezerros da raça Holandesa alimentados com diferentes dietas líquidas (leite integral, leite integral acidificado ou sucedâneo do leite). O segundo objetivo deste estudo foi comparar o efeito das diferentes dietas líquidas sobre a comunidade bacteriana fecal desses bezerros durante a ocorrência de diarreia. Nossa hipótese é que essas diferenças estão associadas à composição da dieta líquida; além disso, acreditamos que a acidificação do leite pode beneficiar o desempenho dos bezerros por efeitos gastrointestinais, conforme relatado anteriormente.

## 3.2. Material e Métodos

### 3.2.1. Animais, delineamento experimental e tratamentos

Todos os procedimentos com bezerros foram aprovados de acordo com os protocolos aprovados pela Escola Superior de Agricultura 'Luiz de Queiroz' da Universidade de São Paulo, Brasil. Todos os procedimentos experimentais foram aprovados seguindo a ética pelo Comitê Institucional de Cuidado e Uso de Animais da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Brasil (Protocolo nº 2018.5.586.11.7). Confirmamos que este estudo foi realizado em conformidade com as diretrizes de Pesquisa em Animais: Relatórios de Experimentos In Vivo (ARRIVE).

O presente estudo foi realizado no Bezerreiro Experimental da Escola Superior de Agricultura 'Luiz de Queiroz', Universidade de São Paulo, Brasil, de fevereiro a maio de 2019. Durante este período, a temperatura média foi de 23,2 ± 1,7 °C, max 29,6 ± 1,3 °C e min 17,1 ± 2,3 °C e umidade relativa média de 78,5%.

Trinta e cinco bezerros recém-nascidos da raça Holandesa (20 machos: 32,84 ± 2,4 kg; e 15 fêmeas: 28,22 ± 1,6 kg; média ± DP) foram utilizados no delineamento de blocos completos casualizados. Os bezerros foram blocados de acordo com sexo, data de nascimento e peso ao nascer. Os bezerros eram provenientes da fazenda leiteira da universidade e de uma fazenda comercial próxima, e foram transportados para o bezerreiro experimental imediatamente após o nascimento.

Todos os bezerros foram alimentados com 10% do peso ao nascer de colostro de alta qualidade (> 50 g IgG/L) nas primeiras 6 h de vida (Godden et al., 2008). A transferência passiva foi avaliada 48 h após a colostragem. A proteína sérica média (TSP) foi de 6,0 g/dL, sugerindo uma adequada transferência imune passiva (Godden et al., 2019).

Os bezerros foram alimentados com 6 L/d de dieta líquida fornecida em baldes abertos divididos em 2 refeições (7h00 e 17h00), de acordo com os tratamentos: 1) leite integral refrigerado (LI; n = 12); 2) leite acidificado (LA; pH 4,5; n = 10); ou 3) substituto de leite comercial (SL; n = 13). O leite integral era coletado a cada dois dias na sala de ordenha, sendo uma metade refrigerado a 5°C e a outra metade acidificada até pH 4,5. O processo de acidificação foi feito de acordo com Coelho et al. (2020). O leite foi acidificado com adição de ácido fórmico (ácido fórmico 85%, Dinâmica Química Contemporânea Ltda, SP, Brasil) pelo menos 12h antes do aleitamento e mantido em temperatura ambiente.

O substituto lácteo (SL; Sprayfo Azul, Sloten do Brasil Ltda, SP, Brasil; Tabela 1) foi diluído a 14% de sólidos em água potável. A composição média do leite foi: 3,8% gordura, 3,3% proteína, 4,4% lactose, 12,6% sólidos totais e contagem de células somáticas (CCS) de 340.000 células/mL. Todas as dietas líquidas foram aquecidas a 38 – 40◦C antes da alimentação e fornecidas a partir de 2 dias de vida até o desaleitamento (56 d). Todos os bezerros foram desaleitados gradualmente aos 52 dias de idade, reduzindo a oferta de dieta líquida em 1 litro por dia até o desaleitamento completo aos 56 dias.

### 3.2.2. Instalações e consumo

Os bezerros foram alojados em gaiolas suspensas individuais (113 × 140 cm) com camas de serragem em um galpão ventilado durante os primeiros 14 dias. No dia 15, os bezerros foram realocados para um abrigo de madeira individual ao ar livre (1,35 m de altura, 1 m de largura e 1,45 m de profundidade) e contido por coleira e corrente (2 m de comprimento), permitindo uma área adequada para caminhada, mas sem contato físico com outros bezerros. Os bezerros tiveram livre acesso à água e concentrado inicial comercial (Ração Bezerra Ag Milk Agroceres Multimix Nutrição Animal Ltda., Rio Claro, SP, Brasil; Tabela 1). O concentrado inicial foi fornecido antes do aleitamento matinal e ficou disponível até o dia seguinte, quando as sobras foram pesadas para mensuração do consumo diário.

**Tabela 1.** Composição química do concentrado inicial e substituto lácteo.

| | Concentrado inicial[1] | Substituto lácteo[2] |
|---|---|---|
| Matéria seca, g | 900,9 | 964,8 |
| | ----------g/kg MS---------- | |
| Cinzas | 73,0 | 87,2 |
| Proteína bruta | 232,2 | 229,0 |
| Extrato etéreo | 29,6 | 187,8 |
| FDN[3] | 168,6 | 11,3 |
| CNF[4] | 510,2 | 510,4 |

[1]Ração Bezerra Ag Milk Agroceres Multimix Nutrição Animal Ltda., Rio Claro, SP, Brasil; [2]Sprayfo Azul, Sloten from Brazil Ltda, SP, Brasil: 25.000 UI Vit A, 5.000 UI Vit D3, 336 UI/kg Vit E, 300 mcg/kg Se, 10 mg/kg Cu e 90 mg/kg of Fe); [3]FDN, Fibra em detergente neutro; [4]CNF, Carboidrato não fibroso

### 3.2.3. Amostragem e análises laboratoriais

As amostras de concentrado inicial e substituto de leite foram coletadas mensalmente para determinação da composição química da dieta ofertada. As amostras foram secas (MA035, Marconi, Piracicaba, São Paulo, Brasil) a 55°C por 72 h e moídas em moinho de peneira Wiley de 1 mm (Marconi). A MS foi determinada por secagem das amostras em estufa a 105°C por 24 h (método AOAC 925,40) e cinzas por incineração das amostras em forno mufla a 550°C por 4h (método AOAC 942,05). A análise de fibra em detergente neutro (FDN) foi realizada utilizando um analisador de fibra Ankom 2000 (Ankom Tech. Corp., Fairport, NY), α-amilase estável ao calor e sulfito de sódio foram incluídos na análise de FDN (Van Soest et al., 1991). A concentração total de nitrogênio foi determinada usando o equipamento Leco TruMac N (Leco Corporation, St. Joseph, MI; método AOAC 968.06) e a proteína bruta (PB) foi calculada multiplicando o nitrogênio total por 6,25. A concentração de extrato etéreo (EE) foi determinada usando éter de petróleo (método AOAC 920.39). A concentração de CNF das dietas foi estimada de acordo com a seguinte equação: CNF (%) = 100% − (% FDN + % PB + % gordura + % cinzas), segundo Mertens (1997). Amostras de leite a granel foram coletadas quinzenalmente durante todo o período do experimento para análise de sólidos totais (ST) por espectroscopia de infravermelho com transformador de Fourier (Lefier et al., 1996) e contagem de células somáticas (CCS) por citometria de fluxo (Clínica do Leite, Piracicaba, Brasil). A composição média do leite integral foi de 3,84% de gordura, 3,29% de proteína, 4,44% de lactose; 12,57% de % de sólidos totais e 326 x 103/mL de contagem de células somáticas (CCS). A composição do concentrado inicial e substituto comercial estão descritos na Tabela 1.

### 3.2.4. Medidas corporais e parâmetros sanguíneos

Os bezerros foram pesados ao nascimento e semanalmente até a oitava semana de idade em balança mecânica (ICS-300, Coimma Ltda., Dracena, SP, Brasil), sempre antes do aleitamento matinal. As medidas corporais também foram registradas semanalmente. A altura da cernelha e a largura de garupa foram medidas com o auxílio de uma régua com escala em centímetros (Carci, São Paulo, SP, Brasil), e para o perímetro torácico foi utilizada uma fita métrica com escala também em centímetros (Bovitec, São Paulo, SP, Brasil).

Amostras de sangue foram obtidas semanalmente por punção venosa da veia jugular, sempre 2h após a alimentação matinal. As amostras foram coletadas em três tubos (Vacuette do Brasil, Campinas, SP, Brasil) contendo fluoreto de sódio como antiglicolítico e EDTA de potássio como anticoagulante para obtenção de plasma, K3 EDTA para obtenção de plasma, ou ativador de coágulo para obtenção de soro. Os tubos foram imediatamente colocados em gelo e transportados para o laboratório.

Uma alíquota de sangue do tubo K3 EDTA foi utilizada para o hematócrito capilar utilizando uma centrífuga de microhematócrito a 2.000 x g por 10 min (modelo SPIN 1000, Microspin, São Paulo, Brasil). As amostras foram centrifugadas a 2.000 × g por 15 min a 4°C para separar o soro e o plasma e então armazenadas a -10°C para análise subsequente. Os indicadores metabólicos foram determinados no Sistema Automático de Bioquímica (SBA-200, CELM, Barueri, SP, Brasil). Kits enzimáticos comerciais específicos (Labtest Diagnóstica S.A., Lagoa Santa, MG, Brasil) foram utilizados para analisar glicose plasmática (ref. 85), proteína sérica total (ref. 99) e lactato (ref. 116). A determinação do ácido beta-hidroxibutírico (BHBA) foi realizada utilizando o kit de enzimas RANBUT (Ref.: RB1007; RANDOX Laboratories - Life Sciences Ltd., Crumlin, UK).

### 3.2.5. Escore fecal e pH

O escore fecal foi monitorado diariamente quanto à fluidez das fezes: (0) regular e firme; (1) macio; (2) aquoso; (3) fluido, conforme Calf Health Scoring Criteria, publicado anteriormente pela Universidade de Wisconsin (Madison) por McGuirk (2008). O episódio de diarreia foi considerado quando os bezerros apresentaram escore fecal ≥ 2 por mais de um dia consecutivo (Renaud et al., 2020). A taxa de diarreia foi calculado de acordo com a fórmula adaptada de Li et al. (2019), Taxa de diarreia = (dias com diarreia ÷ dias avaliados) × 100.

Os bezerros com pontuação ≥ 2 receberam uma solução de reidratação oral (1 g de cloreto de potássio, 80 g de dextrose, 4 g de bicarbonato de sódio e 5 g de cloreto de sódio por litro de água morna) às 11h em volume equivalente a 8% do peso vivo. A temperatura retal dos bezerros foi aferida diariamente com termômetro digital, sendo considerada febre quando os bezerros apresentavam mais de 39,4°C. Os problemas de saúde foram monitorados e tratados de acordo com as recomendações veterinárias. O pH fecal foi medido semanalmente, 2h após o aleitamento da manhã, utilizando-se 4g de fezes adicionados a 4 mL de água deionizada, utilizando-se pHmetro digital de bancada (modelo tec-5, Tecnal Ltda.), conforme Channon et al. (2004).

### 3.2.6. Avaliação da comunidade de bactérias fecais em bezerros com diarreia

#### 3.2.6.1. Amostras de diarreia fecal

Amostras fecais foram coletadas de bezerros que apresentaram escore fecal ≥ 2 (caso positivo para episódio de diarreia) por dois dias consecutivos. Assim, iniciou-se a coleta no segundo dia de diarreia, sendo repetida diariamente até as fezes apresentarem escore normal (≤ 1). Em seguida, o episódio foi delimitado por pelo menos dois dias de escore fecal zero. Em média, os bezerros começaram a ter diarreia no dia 14,5.

As amostras foram coletadas manualmente com luva diretamente da ampola retal, e as luvas foram descartadas a cada coleta para evitar contaminação cruzada entre as amostras. Caso nenhum material fosse coletado no momento da coleta, aquele dia de coleta não era considerado, mas continuava no dia seguinte caso o escore permanecesse ≥ 2. Cerca de 2g de fezes foram obtidas em cada coleta e colocadas em tubos estéreis e imediatamente congeladas a -20◦ C.

Um total de 117 amostras foram coletadas de 27 bezerros durante todo o período experimental. Para analisar a comunidade bacteriana fecal de bezerros com diarreia, selecionou-se aleatoriamente amostras de quatro por tratamento. Selecionou-se animais com pelo menos dois episódios de diarreia. Uma exceção foi feita para o grupo LA, pois apenas três animais atenderam aos critérios de seleção. O quarto animal para este tratamento foi selecionado por apresentar maior período de diarreia (6 dias).

Após a seleção dos animais, foram selecionadas amostras específicas de cada episódio diarreico. Para os animais com maior duração de diarreia (> 3 dias), selecionou-se uma amostra do dia inicial e uma amostra do dia final do episódio coletado. Para bezerros que apresentaram diarreia por < 3 dias, apenas amostras do dia inicial do episódio foram selecionadas. No total, foram selecionadas 42 amostras para analisar a comunidade bacteriana diarreica fecal. Em média de idade, as amostras de

diarreia foram coletadas nos dias 13,16 e 22,17, respectivamente para início e término do primeiro episódio, e nos dias 24, 36 e 34, respectivamente, para início e término no segundo episódio.

#### 3.2.6.2. Extração de DNA, preparação da biblioteca e sequenciamento

A extração de DNA de amostras fecais foi realizada com o kit de extração QIAamp® Fast DNA Stool Minikit (Qiagen, Hilden, Alemanha), seguindo o protocolo do fabricante e as modificações sugeridas por Yu e Morrison (2004).

As bibliotecas foram preparadas seguindo as recomendações da Illumina e descritas no estudo de Virginio Junior et al. (2021). Os primers utilizados para amplificação locus-específica de bactérias flanqueiam a região V3-V4. As sequências de adaptadores Illumina, que foram hibridizadas com as sequências imobilizadas na lâmina de sequenciamento são: 16S Amplicon PCR Forward Primer: 5' TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGGNGGCWGCAG; 16S Amplicon PCR Reverse Primer: 5' GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACTACHVGGGTATCTAATCC. O sequenciamento foi realizado no sistema Illumina Miseq (Illumina, San Diego, CA, EUA) e as leituras produzidas foram 2 × 250 bp.

#### 3.2.6.3. Processamento de sequências de rRNA 16S

Os dados de sequenciamento do gene 16S rRNA foram analisados usando o QIIME2 versão 2019.10. Primeiramente, as sequências paired-end foram mescladas usando o método PEAR (Zhang et al., 2014), as sequências foram demultiplexadas e o controle de qualidade foi realizado com o DADA2 (Callahan et al., 2016), utilizando o método de consenso para remover quaisquer sequências quiméricas e de baixa qualidade restantes. Após a filtragem, aproximadamente 2,47 milhões de leituras de alta qualidade (em média, ~60.000 leituras por amostra). Em seguida, as amostras foram rarefeitas para 21.700 sequências, seguindo o número da amostra mais baixa, e os singletons e doubletons foram removidos. A classificação taxonômica foi realizada com 97% de similaridade utilizando o banco de dados Silva v.132 (Quast et al., 2012), e a matriz gerada foi posteriormente utilizada para análises estatísticas.

### 3.2.7. Análises estatísticas

#### 3.2.7.1. Análise dos dados de desempenho, saúde e metabolismo

O delineamento experimental foi em blocos casualizados e os bezerros foram alocados em blocos de acordo com o peso ao nascer, data de nascimento e sexo. As diferenças de peso dentro dos blocos não foram superiores a 2 kg, enquanto a idade dos bezerros variou no máximo 15 dias. Os dados de crescimento, ingestão, metabólitos sanguíneos e escore fecal foram analisados como medidas repetidas no tempo usando o procedimento MIXED do pacote estatístico SAS (versão 5.0, SAS Institute Inc., Cary, NC, EUA) para modelos mistos. O modelo incluiu tratamento, semana (idade dos bezerros) e a interação entre tratamento e semana como efeitos fixos. O efeito bloco foi incluído no modelo como efeito aleatório e semana como medida repetida (modelo 1), e o sujeito das medidas repetidas utilizadas foi animal (tratamento). Modelo estatístico 1: $Yijk = \mu + Ti + bj + eij + Sk + (TS)ik + eijk$, onde: Yijk – variável de resposta, μ – média geral, Ti – efeito fixo do tratamento, bj – efeito aleatório de bloco, eij – erro residual (A), Sk – efeito fixo da idade dos bezerros (semana da coleta de dados/amostra), (TS)ik – efeito fixo da interação tratamento × idade, eijk – erro residual (B). As estruturas de covariância "composite symmetry, heterogeneous composite symmetry, self-regressive, heterogeneous, unstructured, banded, variance, toeplitz, antidependence and heterogeneous toeplitz" foram testadas e definidas de acordo com o menor valor obtido para "Akaike's Information Criterion Corrected" (AICC).

Para dados que foram agrupados para criar uma única medida, como dias com diarreia e dias com febre, foi usado o PROC MIXED do pacote estatístico SAS de acordo com o modelo 2. O modelo incluiu tratamento como efeito fixo e bloco como efeito aleatório, e bezerro dentro do tratamento foi incluído como um efeito aleatório. As médias foram obtidas para todas as variáveis de resposta por meio do comando LSMEANS. O teste de Tukey realizou as comparações entre os tratamentos quando houve significância na análise de variância. Modelo estatístico 2: $Yijk = \mu + Ti + bj + eij$, onde: Yijk – variável resposta, μ – média geral, Ti – efeito fixo do tratamento, bj – efeito aleatório de bloco, eij – erro residual. Para todas as análises, a significância foi declarada em $P < 0,05$.

#### 3.2.7.2. Análise dos dados de comunidade bacteriana fecal

As análises estatísticas foram realizadas comparando os tratamentos e o tempo. Os dados foram apresentados juntos quando o efeito do tempo foi insignificante. Inicialmente, os dados foram verificados quanto à distribuição normal pelo teste de Shapiro-Wilk e homogeneidade de variância pelo teste de Levene, que indicou distribuição não normal. Assim, a análise de correspondência (AC) avaliou a estrutura da comunidade bacteriana usando Canoco 5 (Biometrics, Wageningen, Holanda). Usamos

PERMANOVA (Anderson, 2001) bidirecional para testar se os tratamentos e o tempo abrigavam comunidades microbianas significativamente diferentes. As medidas de diversidade e riqueza de Shannon foram calculadas com base na matriz taxonômica no nível da OTU usando o software PAST 4.01 (Hammer et al., 2001). Para comparar a composição das comunidades bacterianas entre os tratamentos, utilizou-se o software Statistical Analysis of Metagenomic Profile (STAMP) (Parks et al., 2014). A tabela OTU no nível de filo e gênero gerado a partir de QIIME 2 foi inserido. Os valores P foram calculados usando um teste de Tukey-Kramer bilateral, e a correção foi feita usando a taxa de falsa descoberta de Benjamini-Hochberg (Benjamini et al., 1995).

## 3.3. Resultados

### 3.3.1. Desempenho

O consumo, GMD e medidas corporais aumentaram com a idade (P < 0,01; Tabela 2). Maior consumo de dieta líquida foi observado para os bezerros alimentados com SL, seguido pelos bezerros LI e LA (Tabela 2; P < 0,0001); entretanto, houve efeito da interação idade x dieta líquida, e as diferenças ocorreram apenas até a 4ª semana de idade (P < 0,004; Figura 1a). No entanto, a dieta líquida não afetou o consumo de concentrado inicial. Maior consumo de matérica seca total (CMST) foi observado para bezerros alimentados com SL do que LA (P < 0,04; Tabela 2). A eficiência alimentar também teve efeito da idade com variações durante o período pré-desaleitamento (P < 0,01) e foi menor para os bezerros alimentados com SL (P = 0,02). Não houve diferença no peso ao nascer, mas os bezerros alimentados com LI apresentaram maior peso ao desaleitamento (P < 0,01), maior altura de cernelha e maior GMD durante o período pré-desaleitamento (P < 0,01; Tabela 2). Um efeito de interação idade x dieta líquida foi observado para largura de garupa e perímetro torácico (P < 0,03 e P = 0,01, respectivamente), com bezerros alimentados com LI tendo maior perímetro torácico e largura de garupa na sexta e sétima semana até desaleitamento, respectivamente, do que bezerros alimentados com SL (Figura. 1b e 1c).

**Tabela 2.** Desempenho de bezerros leiteiros alimentados com diferentes dietas líquidas durante o período pré-desaleitamento.

| | Tratamentos[1] | | | EPM[2] | P-valor[3] | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | LI | LA | SL | | T | I | T × I |
| Consumo de MS, kg/d | | | | | | | |
| Dieta líquida | 0,785[b] | 0,752[c] | 0,825[a] | 0,0055 | <0,0001 | <0,0001 | 0,004 |
| Concentrado inicial | 0,21 | 0,17 | 0,19 | 0,04 | 0,66 | < 0,01 | 0,85 |
| Total | 0,96[ab] | 0,90[b] | 0,99[a] | 0,03 | 0,04 | < 0,01 | 0,77 |
| Peso, kg | | | | | | | |
| Ao nascimento | 30,69 | 31,63 | 30,74 | 1,80 | 0,24 | - | - |
| Ao desaleitamento | 70,54[a] | 63,56[b] | 61,15[b] | 2,59 | < 0,01 | - | - |
| GMD, kg/d | 0,70[a] | 0,58[b] | 0,54[b] | 0,02 | < 0,01 | < 0,01 | 0,08 |
| Eficiência alimentar | 0,74[a] | 0,70[a] | 0,52[b] | 0,06 | 0,02 | < 0,01 | 0,32 |
| Medidas corporais, cm | | | | | | | |
| Altura de cernelha | 81,5[a] | 79,1[b] | 79,1[b] | 1,08 | 0,01 | < 0,01 | 0,54 |
| Largura de garupa | 22,6[a] | 22,2[a] | 21,8[b] | 0,35 | 0,05 | < 0,01 | 0,03 |
| Perímetro torácico | 87,6 | 86,4 | 85,5 | 1,22 | 0,08 | < 0,01 | 0,01 |

[1]LI, leite refrigerado; LA, leite acidificado; e SL, substituto do leite; [2]EPM – erro padrão da média; [3]T- efeito do tratamento, I- efeito de idade, TxI - efeito da interação tratamento x idade (P < 0,05)

### 3.3.2. Parâmetros sanguíneos

Os parâmetros sanguíneos avaliados mostraram efeitos da idade (P < 0,01; Tabela 3), com aumento da concentração de BHB e diminuição das concentrações de proteína sérica total (PST), lactato e glicose à medida que os bezerros ficam mais velhos.

**Tabela 3.** Metabólitos sanguíneos de bezerros leiteiros alimentados com diferentes dietas líquidas durante o período pré-desaleitamento.

| | Tratamentos[1] | | | EPM[2] | P-valor[3] | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | LI | LA | SL | | T | I | TxI |
| Proteína total, g/dL | 5,88 | 5,78 | 5,74 | 0,105 | 0,55 | < 0,01 | 0,01 |
| Lactato, mg/dL | 13,9[a] | 11,2[b] | 12,8[a] | 0,47 | 0,01 | < 0,01 | 0,51 |
| Glicose, mg/dL | 134,8[a] | 111,0[b] | 117,4[b] | 3,28 | < 0,01 | < 0,01 | 0,27 |
| BHB, mmol/L | 0,129[a] | 0,141[a] | 0,081[b] | 0,008 | < 0,01 | < 0,01 | 0,45 |

[1]LI, leite refrigerado; LA, leite acidificado; e SL, substituto do leite; [2]EPM – erro padrão da média; [3]T- efeito do tratamento, I- efeito de idade, TxI - efeito da interação tratamento x idade (P < 0,05)

As menores concentrações de lactato (P = 0,01) foram observadas para os bezerros alimentados com LA (P < 0,01). A concentração de glicose foi a maior para os bezerros do tratamento LI (P < 0,01).

No entanto, a menor concentração de BHB foi observada para bezerros alimentados com SL (P < 0,01). Não houve diferença entre os tratamentos para PST, mas foi observado um efeito de interação idade x dieta líquida, e na terceira e quarta semana de idade, LI resultou em uma concentração maior do que bezerros alimentados com SL (Figura. 1d). (P = 0,01; Tabela 3).

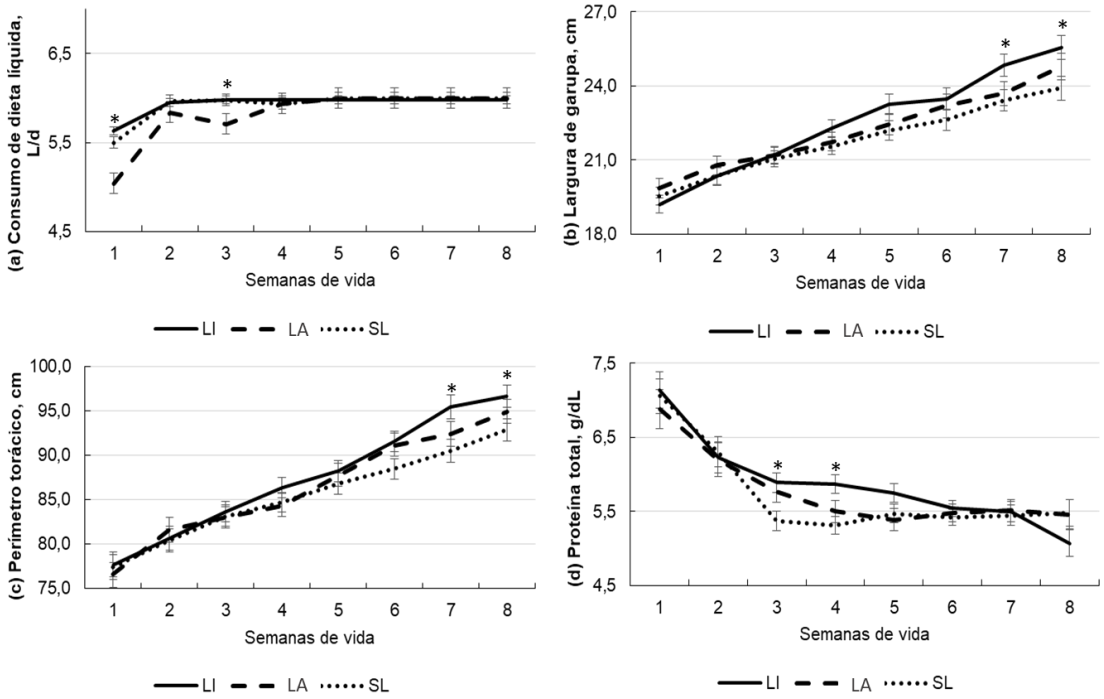


Figura 1. Consumo, desempenho e metabólitos sanguíneos de bezerros alimentados com diferentes dietas líquidas. (a) Consumo de dieta líquida; (b) largura de garupa; (c) perímetro torácico and (d) proteína sérica total. * denota diferença estatística P < 0,05 para os menores valores de LA em (a); e LI superior a SL em (b), (c) e (d).

### 3.3.3. Diarreia e temperatura retal

A idade afetou o escore fecal, pH fecal e temperatura retal (P < 0,01). O escore fecal aumentou até a terceira semana de vida, mas diminuiu no decorrer das semanas (Figura 2). Além disso, os bezerros alimentados com SL tiveram maiores escores fecais (P = 0,01; Tabela 4), dias com diarreia (P = 0,04), além de taxas de diarreia mais altas em 0-56 dias (P = 0,03) e 0-10 dias (P = 0,04) em comparação com animais LI. Os bezerros que recebiam LI apresentaram temperaturas retais mais altas do que os bezerros aleitados com LA (P = 0,01). Além disso, os bezerros LA tenderam a ter um menor número de dias com febre (P = 0,06).

Tabela 4. Diarreia e temperatura retal de bezerros leiteiros alimentados com diferentes dietas líquidas durante o período pré-desaleitamento.

| | Tratamentos[1] | | | EPM[2] | P-valor[3] | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | LI | LA | SL | | T | I | TxI |
| Escore fecal | 0,68[b] | 0,77[ab] | 0,98[a] | 0,08 | 0,01 | < 0,01 | 0,43 |
| Dias com diarreia | 6,92[b] | 9,40[ab] | 12,69[a] | 1,55 | 0,04 | - | - |
| Taxa de diarreia, % | | | | | | | |
| 0-56 d | 12,20[a] | 16,80[ab] | 22,80[b] | 2,16 | 0,03 | - | - |
| 0-10 d | 3,30[a] | 5,00[ab] | 16,90[b] | 4,15 | 0,04 | - | - |
| 11-30 d | 20,80 | 25,50 | 37,30 | 5,63 | 0,10 | - | - |
| 31-56 d | 9,00 | 14,60 | 13,90 | 3,81 | 0,53 | | |
| pH fecal | 6,61 | 6,61 | 6,71 | 0,08 | 0,61 | < 0,01 | 0,12 |
| Hematócrito, % | 27,91 | 28,09 | 25,99 | 0,83 | 0,14 | 0,96 | 0,21 |
| Temperatura retal, ºC | 38,51[a] | 38,35[b] | 38,41[ab] | 0,04 | 0,01 | < 0,01 | 0,99 |
| Dias com febre | 2,83[b] | 1,04[a] | 2,54[b] | 0,55 | 0,06 | - | - |

[1]LI, leite refrigerado; LA, leite acidificado; e SL, substituto do leite; [2]EPM – erro padrão da média; [3]T- efeito do tratamento, I- efeito de idade, TxI - efeito da interação tratamento x idade (P < 0,05)

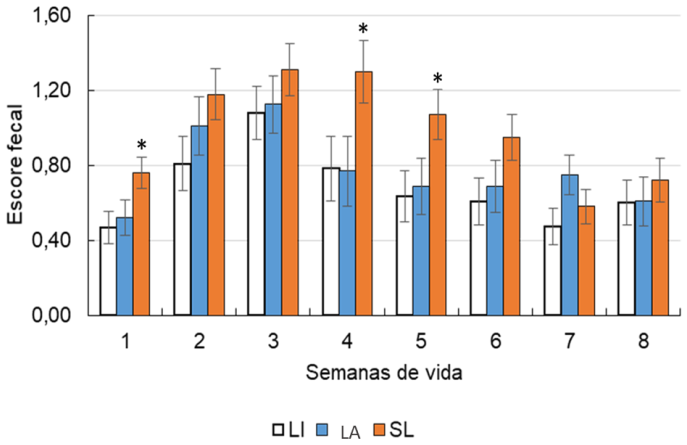


**Figura 2.** Escore fecal de bezerro leiteiros alimentados com diferentes deitas líquidas. Efeito de idade com P < 0,001. * denota diferença estatística P < 0,05 para os maiores valores de SL.

### 3.3.4. Comunidade bacteriana fecal

A estrutura da comunidade bacteriana de amostras fecais durante episódio de diarreia mostrou dissimilaridade entre as amostras do grupo LA e os grupos LI e SL (Figura 3a; P <0,01). A análise de correspondência (AC) mostrou apenas diferenças entre os índices não influenciados pelas dietas líquidas (Shannon; P = 0,632; e Riqueza, P = 0,720; Figura 3b). Além disso, não foram observadas

diferenças entre os momentos "inicial e final" ou "episódios" (P > 0,05). Diante desse resultado, os dados a seguir serão apresentados como um resultado misto.

A abundância geral em nível de filo está representada na Figura 4a. No geral, mais de 60% das sequências foram classificadas como *Firmicutes*, seguidas por *Bacteroidetes* (17%), *Fusobacteria* (10%), *Proteobacteria* (8,1%), *Actinobacteria* (4,2%), *Epsilonbacteraeota* (0,2%). Os dez ASVs mais abundantes (Amplicon Sequence Variant) foram representados em gráfico de barras na Figura 4b. A abundância de Fusobacterium foi maior no LA em relação aos demais tratamentos (P = 0,049). Três ASVs foram classificados como *Lactobacillus*, mas apenas dois foram significativamente diferentes entre os tratamentos, sendo o mais abundante em SL e o menor em LA (P < 0,001 e P = 0,015, respectivamente). O ASV classificado como *Prevotella* apresentou maior abundância nos bezerros alimentados com LI do que nos demais tratamentos (P = 0,031). Além disso, o ASV classificado como *Ruminococcus* foi mais abundante em LA e menos abundante em SL (P = 0,037).

Em uma comparação pareada em nível de gênero na composição bacteriana, houve diferenças significativas entre bezerros alimentados com LA e LI para 15 ASVs diferentes, mas apenas aqueles classificados como *Lactobacillus*, *Erysipelotrichaeae*, *Megasphaera* e *Diallister* foram maiores em animais alimentados com LI. Na comparação LI versus SL (Fig. 5b), todos os cinco ASVs foram significativamente maiores em animais alimentados com SL. Finalmente, ao comparar LA e SL (Figura 5c), dos sete ASVs estatisticamente diferentes, apenas *Howardella* e *Faecalibacterium* foram maiores em animais alimentados com LA.

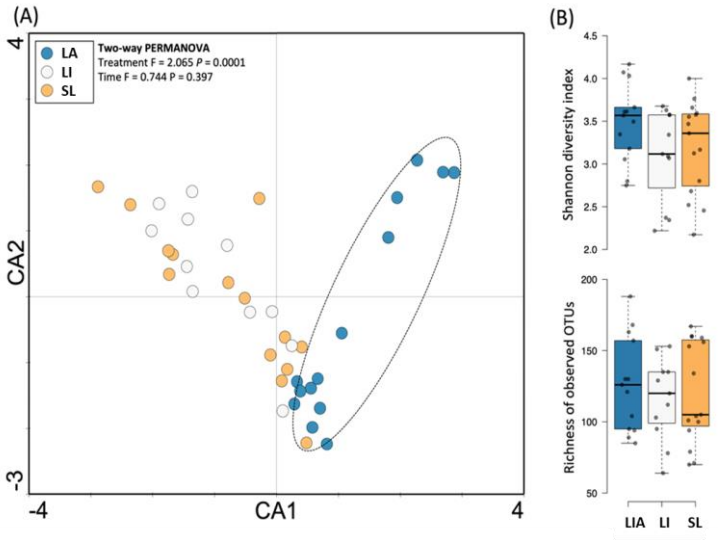


Figura 3. . Estrutura e diversidade microbiana em amostras de fezes durante episódios de diarreia de bezerros leiteiros alimentados com diferentes dietas líquidas. (A) Análise correspondente (CA); (B) Índices de diversidade, Shannon and richness.

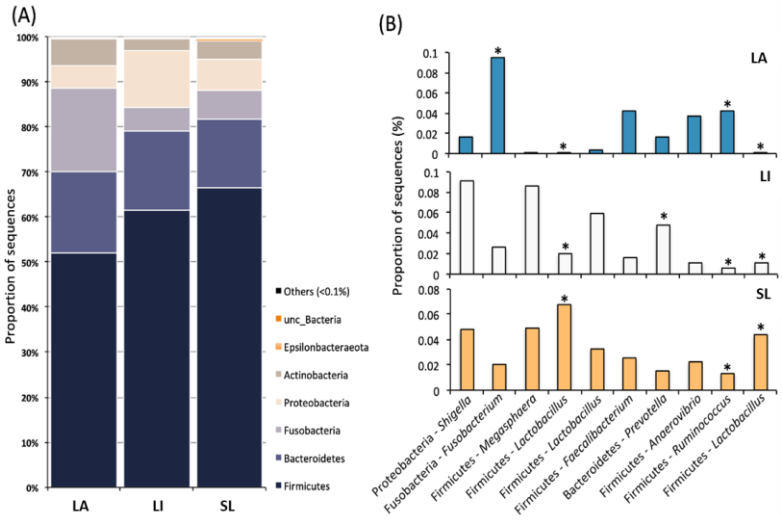


Figura 4. . Composição bacteriana em amostras de fezes durante episódios de diarreia de bezerros leiteiros alimentados com diferentes dietas líquidas. (A) Abundância geral de filo; e (B) Top 10 ASVs mais abundantes. * Denota diferença estatística de P < 0,05 para maior abundância de Fusobacteirum para LA; maior abundância em SL e menor em LA para Lactobacillus; maior abundância de Prevotella para LI; e maior abundância de Ruminococcus em LA e menor em SL.

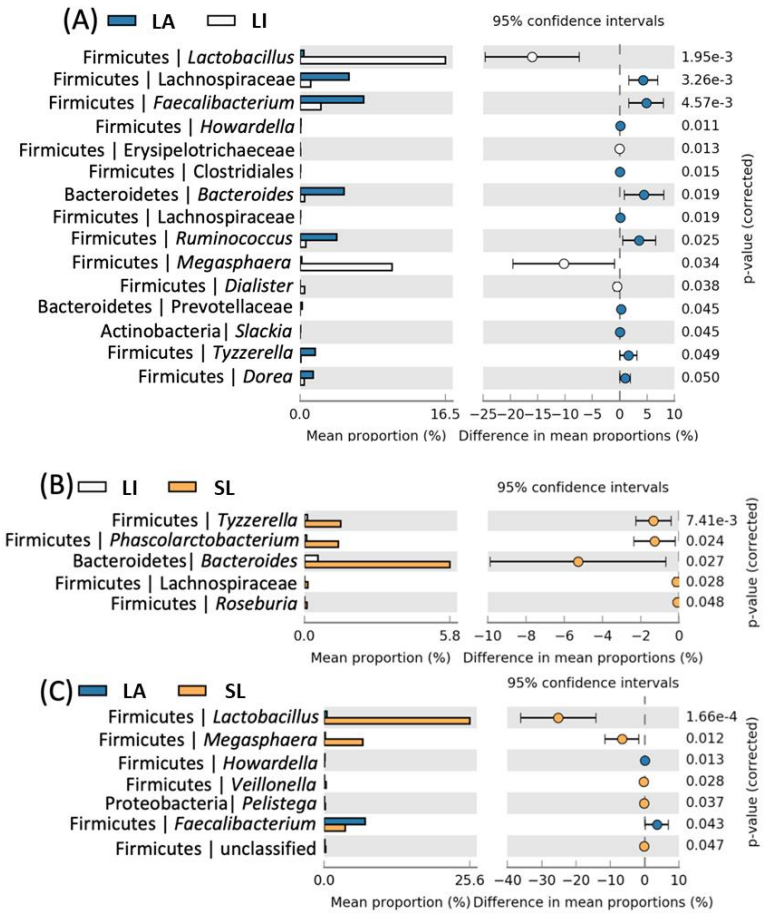


Figura 5. Composição de gênero bacteriano em amostras de fezes durante episódios de diarreia de bezerros leiteiros alimentados com diferentes dietas líquidas. Gráfico de dispersão baseado no Welch's t-test com correção de Benjamini-Hochberg construído em STAMP (P < 0,05). (A) Diferenças entre LA e LI; (B) diferenças entre LI e SL, e (C) LA e SL.

## 3.4. Discussão

### 3.4.1. Desempenho

O leite integral geralmente é a primeira opção de alimentação para bezerros leiteiros no período de aleitamento (Virgínio Júnior e Bittar, 2021). A composição natural do leite integral é completa, incluindo vários hormônios, anticorpos, glicanos, glicoconjugados, antimicrobianos, sendo uma excelente fonte de substrato para o crescimento da microbiota intestinal (Pacheco et al., 2015). Nosso estudo mostra que essa composição completa e complexa, associada ao volume de alimentação adequado (6 L/d) pode promover desempenho superior em relação ao substituto de leite.

O leite integral apresenta vantagens em relação ao sucedâneo devido ao maior teor energético e melhor equilíbrio de nutrientes, principalmente aminoácidos (Bittar et al., 2018; Drackley et al., 2006). Além disso, a nutrição adequada pode estimular um aumento da resposta imune em bezerros durante o período de crescimento e levar a uma diminuição das taxa de doenças (Ohtsuka et al., 2006), além de maior peso ao desaleitamento, maior largura de garupa e perímetro torácico nas últimas semanas do período de aleitamento. Isso significa que os bezerros que receberam LI ganharam mais peso e foram mais eficientes, mas também apresentaram melhoras em todas as medidas corporais avaliadas.

Segundo Coelho et al. (2020) a acidificação do leite é um método de preservação da qualidade microbiológica, pois o pH mais baixo é desfavorável à sobrevivência e ao crescimento de microrganismos patogênicos. Todd et al. (2017) sugeriram que o processo de acidificação altera a palatabilidade do leite o suficiente para diminuir o consumo, mas sem afetar o desempenho. Em nosso estudo, a palatabilidade do leite acidificado pode ter influenciado a ingestão nas três primeiras semanas de vida, mas após esse período, o consumo foi o mesmo dos bezerros alimentados com LI. No entanto, embora a eficiência tenha sido semelhante à dos bezerros alimentados com LI, os bezerros da dieta LA apresentaram GMD e peso final semelhantes aos dos bezerros alimentados com SL. A combinação do tipo de ácido utilizado, pH e volume da dieta líquida provavelmente influencia a ingestão da dieta líquida nas primeiras semanas de vida.

O processo de acidificação com ácido fórmico em pH entre 4 e 4,5 também demonstrou limitar a ingestão voluntária de bezerros que consomem sucedâneo de leite ad libitum em aproximadamente 1 L/d (Todd et al., 2016). No entanto, não foram observadas diferenças na ingestão no período de aleitamento entre LI e LA em pH 4,2, a um volume de 6 L/d com ácido lático (Coelho et al., 2020). Em estudos de alimentação restrita (8% do PV) de dieta acidificada com ácido fórmico (pH 4,8), não foi observada diminuição da ingestão comparado ao controle (Yanar et al., 2006; Metin et al., 2006). Além disso, o tipo de ácido deve ser cuidadosamente considerado, pois Zou et al. (2017) observaram maiores

escores de inflamação no jejuno e íleo em bezerros alimentados com dieta líquida acidificada com ácido fórmico. Nenhuma informação foi encontrada para os outros ácidos usados.

A literatura sugere que os sucedâneos do leite utilizados na alimentação intensiva devem ser superiores a 24% de proteína (Soberon et al., 2021). No entanto, a maioria das formulações não possui essa inclusão e inclui ingredientes de origem não láctea (Bittar et al., 2018), o que reduz a digestibilidade e utilização da dieta líquida nas primeiras semanas quando o trato gastrointestinal não está totalmente desenvolvido para digerir esse tipo de nutriente (Bittar et al., 2018; Quigley et al., 2021). O sucedâneo do leite utilizado neste estudo contém fontes de gordura não lácteas, conforme citado por Virginio Junior et al. (2021).

O tipo de dieta líquida pode afetar os aspectos positivos dos fatores biologicamente ativos no leite integral que geram efeitos lactócrinos, podendo inclusive atribuir maior produção a longo prazo em relação ao sucedâneo (Moran et al., 2011). Estudos recentes sugerem que a ingestão de nutrientes do leite integral ou do substituto de leite durante o período de aleitamento altera a expressão fenotípica para a produção de leite em longo prazo (Moallem et al., 2010). Além disso, Górka et al. (2011) observaram que bezerros alimentados com sucedâneo de leite apresentaram menor desenvolvimento intestinal, peso de órgãos e comprimento de microvilosidades do que bezerros alimentados com leite integral. Os autores também concluíram que alterações no desenvolvimento intestinal, além de influenciarem os dados de desempenho, consequentemente interferem no estado metabólito geral, o que pode afetar indiretamente o bom funcionamento do sistema imunológico. Isso não corrobora com os dados de metabólitos sanguíneos e diarreia para tratamento de SL.

### 3.4.2. Metabólitos sanguíneos

Em uma meta-análise de dados de digestibilidade de diferentes dietas líquidas à base de leite integral ou sucedâneo de leite por Quigley et al. (2021), os autores observaram que a digestibilidade de alguns nutrientes (MS, N e gordura) atingiu seu máximo aos 30 dias de idade. Eventualmente, qualquer distúrbio intestinal (como a diarreia) ou qualidade da dieta líquida que afete a ingestão ou digestibilidade da dieta pode afetar negativamente o desempenho dos animais. Essa informação poderia explicar porque os animais dos grupos LA e SL apresentaram menor desempenho e glicose plasmática, ou mesmo o grupo SL apresentar menor proteína sérica nas semanas 3 e 4.

Segundo Quigley et al. (1991) o BHB é um indicador indireto do desenvolvimento ruminal, e sua concentração aumenta de acordo com a ingestão de concentrado. No entanto, não houve diferenças na ingestão inicial, sugerindo que a composição da dieta líquida é quem explica diferenças no desempenho e concentrações de metabólitos selecionados. A maior glicose para bezerros

alimentados com LI pode ser explicada pela maior lactose e digestibilidade dessa dieta líquida, enquanto o maior BHB para bezerros alimentados com LI e LA pode ser explicado pelo maior teor de gordura de ambos em relação ao SL.

Por outro lado, a dieta líquida também pode afetar a concentração plasmática de insulina e IGF-1, que são importantes na estimulação da proliferação das células epiteliais do rúmen (Baldwin, 1999; Zitnan et al., 2012). O estudo de Górka et al. (2011) relatou comprimento de papila menor no saco dorsal craniano em bezerros alimentados com substituto lácteo do que em bezerros alimentados com leite integral e observou relações positivas entre peso do retículo-ruminal e do intestino delgado ou com atividade enzimática da borda em escova. Esses efeitos também explicariam a baixa concentração de BHB para o grupo SL, uma vez que não houve diferença na ingestão inicial entre os tratamentos. Isso indica que o menor desempenho associado a maiores distúrbios entéricos (ou seja, diarreia) e menor concentração de metabólitos afetaram negativamente o desenvolvimento ruminal dos bezerros deste grupo.

### 3.4.3. Diarreia e temperatura retal

O efeito das diferentes dietas líquidas sob a diarreia foi bastante pronunciado. Embora os animais do grupo LI tenham apresentado maior temperatura retal e maior número de dias com febre, a taxa e os dias com diarreia foram menores. De acordo com Todd et al. 2006, a acidificação da dieta líquida tende a aumentar a fluidez das fezes, mas não está associada a outros sinais de infecção intestinal. Essa informação pode estar relacionada ao nosso estudo, uma vez que os animais apresentaram valores intermediários para achados de diarreia, mas a temperatura retal e os dias com febre foram menores. Metin et al. (2006) demonstraram que embora a consistência fecal seja mais fluida em bezerros que consomem dieta acidificada, o número de intervenções veterinárias é menor, sugerindo que a acidificação do trato digestivo pode promover o crescimento de microrganismos benéficos e inibir a proliferação de patobiontes (Virginio Júnior et al., 2021).

Além disso, o efeito da acidificação no trato intestinal pode explicar porque observamos dissimilaridade na estrutura da comunidade bacteriana das fezes de bezerros diarréicos em comparação com o grupo LI ou SL. Todos os tratamentos aumentaram os escores fecais na 2ª e 3ª semanas de vida; mas, os bezerros alimentados com SL apresentaram escores fecais maiores do que LI, sem diferir do LA. No entanto, é importante notar que a taxa de diarréia foi maior para bezerros alimentados com SL do que LI e intermediário para bezerros alimentados com LA durante todo o período e nos primeiros 10 dias de idade. Esta taxa de diarréia alta e intermediária afetou negativamente o desempenho dos bezerros alimentados com SL e LA, respectivamente. Segundo Cho e Yoon (2014) os primeiros 21 dias

de vida são muito desafiadores, pois os bezerros são altamente suscetíveis a infecções entéricas, uma das principais causas de mortalidade nessa fase. As infecções entéricas estão associadas à disbiose no microbioma intestinal, inflamação do tecido intestinal (Khalil et al., 2022; Becker et al., 2015) e menor desempenho, como observado no tratamento de SL.

### 3.4.4. Microbioma fecal durante episódios de diarreia

A comunidade bacteriana fecal em bezerros diarréicos apresentou maior abundância de ASVs associados ao gênero *Prevotella*, cujas cepas foram mencionadas em algumas revisões como patobiontes e associadas à disbiose e inflamação intestinal em humanos (Larsen, 2017; Precup e Vodnar, 2019). Apesar dessa associação, em ruminantes, o gênero Prevotella desempenha um papel importante na degradação de uma vasta quantidade de nutrientes (Rubino et al., 2017), e seu aumento nas fezes e rúmen de bezerros está associado ao consumo de concentrados, como observado em estudos anteriores do nosso laboratório (Virginio Junior et al., 2021a; Virginio Junior et al., 2021b; Virginio Junior et al., 2021c). No entanto, animais alimentados com LI foram associados a uma microbiota intestinal benéfica composta por *Lactobacillus* e *Faecalibaterium* (Virginio Junior et al., 2021a).

O estudo de Virginio Junior et al. (2021a) utilizou 15 animais saudáveis de nosso estudo (5 de cada tratamento), e embora as amostras de diarreia em nosso estudo não tenham mostrado alta abundância desses grupos microbianos, seus efeitos durante o período pré-desaleitamento podem ter auxiliado no combate a outras bactérias patogênicas, além de trazer benefícios à saúde dos animais. A maior abundância de ASVs associada aos gêneros *Fusobacterium*, *Faecalibacterium*, *Ruminococcus* e *Bacteroides* pode indicar que há de fato um benefício da acidificação para o trato intestinal durante episódios de diarreia, uma vez que essas bactérias são produtoras de butirato.

O butirato é uma fonte de crescimento de colonócitos e indica um ambiente intestinal saudável (Li et al., 2020; Zafar et al., 2021; Oikonomou et al., 2013; Elolimy et al., 2019). Um estudo recente tentou melhorar a saúde de bezerros manipulando a composição microbiana intestinal precoce com suplementação oral de *Faecalibacterium prausnitzii* (Foditsch et al., 2015), uma bactéria negativamente associada à diarreia de bezerros (Oikonomou et al., 2013). A administração oral de *F. prausnitzii* durante a primeira semana de vida reduziu efetivamente a incidência de diarreia e morte de bezerros relacionada à diarreia durante as primeiras 7 semanas de vida (Foditsch et al., 2015).

Uma maior incidência de diarreia para os animais SL parece estar associada à composição do substituto do leite. Virginio Junior et al. (2021) mencionaram que a composição do substituto pode ter induzido uma maior abundância de bactérias patobiontes no intestino posterior dos bezerros. Um ponto

interessante é a maior abundância de ASVs relacionados ao gênero *Lactobacillus* durante a diarreia. A abundância desse gênero pode minimizar e controlar os efeitos da diarreia e outras infecções, principalmente porque esses animais também apresentaram maior número de dias com febre. Além disso, cepas de *Lactobacillus* foram associadas a menor incidência de infecções entéricas, distúrbios e maior estimulação do sistema imunológico da mucosa (Abbe et al., 1995; Macfarlane et al., 2007).

Este também foi um achado em um estudo de Slanzon et al. (2022) pois bezerros com diarreia apresentaram maior população de Lactobacillus. Esses autores desenvolveram um modelo para prever doenças gastrointestinais com base na composição do microbioma fecal, e a *presença de Eggerthella lenta*, *Bifidobacterium longum* e *Collinsella aerofaciens* foi associada a um resultado clínico saudável. A presença de espécies de E. coli e Lactobacillus apresentou os maiores coeficientes positivamente associados à predição de doença GI.

A abundância de *Tyzzerella* ainda não foi relacionada a nenhum estado de saúde ou doença em bezerros leiteiros, mas em humanos, a abundância deste gênero tem sido associada a pacientes com doença de Crohn ou dietas de baixa qualidade (Olaisen et al., 2021; Liu et al., 2019) o que pode indicar uma possível ocorrência no intestino de bezerros leiteiros. O mesmo ocorre para o gênero *Veillonella*, associado à produção de compostos tóxicos (i.e., NH3, H2S, aminas e outros) pela degradação de proteínas (Brüssow et al., 2013).

## 3.5. Conclusão

Em conclusão, o desempenho e a saúde dos bezerros leiteiros foram influenciados pela ingestão de dieta líquida e pela composição bacteriana da diarreia. A baixa abundância de bactérias patobiontes no leite integral pode indicar que outros microrganismos patogênicos causam os episódios diarreicos, e talvez os componentes bioativos do leite previnam bactérias oportunistas, ao contrário do que foi observado no sucedâneo lácteo. Além disso, o processo de acidificação pode induzir abundantemente bactérias benéficas e protetoras da mucosa em episódios diarreicos.

O leite integral foi a melhor escolha de dieta líquida, promovendo maior desempenho e menor impacto negativo na saúde animal com base na análise do microbioma. O leite acidificado pode ser uma alternativa interessante para situações de dificuldade de refrigerar o leite integral, com ocorrência intermediária de diarreia, mas desempenho inferior, embora a microbiota durante os episódios de diarreia tenha sido benéfica. Além disso, o uso de sucedâneo do leite para bezerros deve ser feito com cautela, principalmente durante as três primeiras semanas de vida.

## Referências

Abe, F., N. Ishibashi and S. Shimamura. 1995. Effect of Administration of Bifidobacteria and Lactic Acid Bacteria to Newborn Calves and Piglets. J. Dairy Sci. 72:2838–2846.

Anderson, M.J. 2001. A new method for non-parametric multivariate analysis of variance. Austral Ecol. 26:32–46.

Baldwin, R. 1999. The proliferative actions of insulin, insulin-like growth factor-I, epidermal growth factor, butyrate and propionate on ruminal epithelial cells in vitro. Small Rumin. Res. 32:261–268.

Becker, C., M.F. Neurath and S. Wirtz. 2015 The Intestinal Microbiota in Inflammatory Bowel Disease. ILAR J. 56:192–204.

Benjamini, Y. and Y. Hochberg. 1995. Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. J. R. Stat. Soc. Ser. B 57:289–300.

Bittar, C.M.M., J.T. Silva da and H. Chester-Jones. 2018. Macronutrient and amino acids composition of milk replacers for dairy calves. Rev. Bras. Saúde e Produção Anim. 19:47–57.

Brüssow, H. 2013. Microbiota and healthy ageing: observational and nutritional intervention studies. Microb. Biotechnol. 6:326–334.

Callahan, B.J. et al. 2016. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. Nat. Methods. 13:581–583.

Channon, A.F., J.B. Rowe and R.M. Herd. 2004. Genetic variation in starch digestion in feedlot cattle and its association with residual feed intake. Aust. J. Exp. Agric. 44:469.

Cho, Y. and K.J. Yoon. 2014. An overview of calf diarrhea - infectious etiology, diagnosis, and intervention. J. Vet. Sci. 15:1.

Coelho, M.G. et al. 2020. Acidified milk for feeding dairy calves in tropical raising systems. J. Anim. Feed Sci. 29:215–223.

Deng, Y.F. et al. 2017. Influence of dairy by-product waste milk on the microbiomes of different gastrointestinal tract components in pre-weaned dairy calves. Sci. Rep. 7:42689.

dos Santos, G. and C.M.M. Bittar. 2015. A survey of dairy calf management practices in some producing regions in Brazil. Rev. Bras. Zootec. 44:361–370.

Drackley, J.K., R.M. Blome, K.S. Bartlett and K.L. Bailey. 2006. Supplementation of 1% L-glutamine to milk replacer does not overcome the growth depression in calves caused by soy protein concentrate. J. Dairy Sci. 89:1688–1693.

Elolimy, A. et al. 2019. Supply of Methionine During Late-Pregnancy Alters Fecal Microbiota and Metabolome in Neonatal Dairy Calves Without Changes in Daily Feed Intake. Front. Microbiol. 10:1–20.

Foditsch, C. et al. 2015. Oral Administration of Faecalibacterium prausnitzii Decreased the Incidence of Severe Diarrhea and Related Mortality Rate and Increased Weight Gain in Preweaned Dairy Heifers. PLoS One 10:e0145485.

Glosson, K.M. et al. 2015. Effect of supplementing pasteurized milk balancer products to heat-treated whole milk on the growth and health of dairy calves. J. Dairy Sci. 98:1127–1135.

Godden, S. 2008. Colostrum Management for Dairy Calves. Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract. 24:19–39.

Godden, S.M., J.E. Lombard and A.R. Woolums. 2019. Colostrum Management for Dairy Calves. Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract. 35:535–556.

Gomes, V., K.M. Madureira, J.R.J. Borges, F.A. Pinheiro, C.C. Martin, C.C. Baccili and F.J. Benesi. 2021. Doenças na fase de aleitamento e práticas de manejo sanitário na criação de bezerra. RBB. 1:27-62

Gomez, D.E., L.G. Arroyo, M.C. Costa, L. Viel, L. and J.S. Weese. 2017. Characterization of the Fecal Bacterial Microbiota of Healthy and Diarrheic Dairy Calves. J. Vet. Intern. Med. 31:928–939.

Górka, P. et al. 2011. Is rumen development in newborn calves affected by different liquid feeds and small intestine development? J. Dairy Sci. 94:3002–3013.

Hammer, D.A.T., P.D. Ryan., Ø. Hammer and D.A.T. Harper. 2001. Past: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. Palaeontol. Electron. 4:178.

Khalil, A., A. Batool and S. Arif. 2022. Healthy Cattle Microbiome and Dysbiosis in Diseased Phenotypes. Ruminants 2:134–156.

Larsen, J.M. 2017. The immune response to Prevotella bacteria in chronic inflammatory disease. Immunology. 151:363–374.

Lefier, D., R. Grappin and S. Pochet. 1996. Determination of fat, protein, and lactose in raw milk by Fourier transform infrared spectroscopy and by analysis with a conventional filter-based milk analyzer. J. AOAC Int. 79:11–7.

Li, L., J. Qu, X. Xin, S. Yin and Y. Qu. 2019. Comparison of Reconstituted, Acidified Reconstituted Milk or Acidified Fresh Milk on Growth Performance, Diarrhea Rate, and Hematological Parameters in Preweaning Dairy Calves. Animals 9:778.

Li, M. et al. 2020.Intestinal microbes derived butyrate is related to the immunomodulatory activities of Dendrobium officinale polysaccharide. Int. J. Biol. Macromol. 149:717–723.

Liu, Y. et al. 2019.Dietary quality and the colonic mucosa–associated gut microbiome in humans. Am. J. Clin. Nutr. 110:701–712.

Macfarlane, G.T., H. Steed and S. Macfarlane. 2007. Bacterial metabolism and health-related effects of galacto-oligosaccharides and other prebiotics. J. Appl. Microbiol. 104: 070907095856003.

McGuirk, S.M. 2008. Disease Management of Dairy Calves and Heifers. Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract. 24:139–153.

Metin, J., M. Yanar., O. Güler, B. Bayram and N. Tüzemen, N. 2006. Growth, health and behavioural traits of dairy calves fed acidified whole milk. Indian Vet. J. 83:976–979.

Moallem, U. et al. 2010. Long-term effects of ad libitum whole milk prior to weaning and prepubertal protein supplementation on skeletal growth rate and first-lactation milk production. J. Dairy Sci. 93:2639–2650.

Moran, J.B. 2011. Factors Affecting High Mortality Rates of Dairy Replacement Calves and Heifers in the Tropics and Strategies for Their Reduction. Asian-Australasian J. Anim. Sci. 24:1318–1328.

Ohtsuka, H. et al. 2005. Effect of Nutritional Conditions on Changes in Leukocyte Populations in Japanese Black Calves. J. Vet. Med. Sci. 67:183–185.

Oikonomou, G. et al. 2013. Fecal Microbial Diversity in Pre-Weaned Dairy Calves as Described by Pyrosequencing of Metagenomic 16S rDNA. Associations of Faecalibacterium Species with Health and Growth. PLoS One 8, e63157.

Olaisen, M. et al. 2021. Bacterial Mucosa-associated Microbiome in Inflamed and Proximal Noninflamed Ileum of Patients With Crohn's Disease. Inflamm. Bowel Dis. 27:12–24.

Pacheco, A.R., D. Barile, M.A. Underwood and D.A. Mills. 2015. The Impact of the Milk Glycobiome on the Neonate Gut Microbiota. Annu. Rev. Anim. Biosci. 3:419–445.

Parks, D.H., G.W. Tyson, P. Hugenholtz and R.G. Beiko. 2014. STAMP: statistical analysis of taxonomic and functional profiles. Bioinformatics. 30:3123–3124.

Precup, G. and D.C. Vodnar. 2019. Gut Prevotella as a possible biomarker of diet and its eubiotic versus dysbiotic roles: a comprehensive literature review. Br. J. Nutr. 122:131–140.

Quast, C. et al. 2012. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. Nucleic Acids Res. 41:D590–D596.

Quigley, J.D., L.A. Caldwell, G.D. Sinks and R.N. Heitmann. 1991. Changes in Blood Glucose, Nonesterified Fatty Acids, and Ketones in Response to Weaning and Feed Intake in Young Calves. J. Dairy Sci. 74:250–257.

Quigley, J.D., T.S. Dennis, F.X. Suarez-Mena, T.M. Hill and K.M. Aragona. 2021 Meta-analysis of effects of age on intestinal digestibility of liquid feeds in young calves. JDS Commun. 2:114–117.

Renaud, D.L., L. Buss, J.N. Wilms and M.A. Steele. 2020. Technical note: Is fecal consistency scoring an accurate measure of fecal dry matter in dairy calves? J. Dairy Sci. 103:10709–10714.

Rubino, F. et al. 2017. Divergent functional isoforms drive niche specialisation for nutrient acquisition and use in rumen microbiome. ISME J. 11:932–944.

Slanzon, G.S. et al. 2022. Fecal microbiome profiles of neonatal dairy calves with varying severities of gastrointestinal disease. PLoS One 17:e0262317.

Soberon, F., E. Raffrenato, R.W. Everett and M.E. Van Amburgh. 2012. Preweaning milk replacer intake and effects on long-term productivity of dairy calves. J. Dairy Sci. 95:783–793.

Todd, C.G. et al. 2017. Clinical trial on the effects of a free-access acidified milk replacer feeding program on the health and growth of dairy replacement heifers and veal calves. J. Dairy Sci. 100:713–725.

Todd, C.G. et al. 2016. Milk Replacer Acidification for Free-Access Feeding: Effects on the Performance and Health of Veal Calves. Open J. Anim. Sci. 06:234–246.

United States Department of Agriculture. 2014. Dairy 2014: Dairy Cattle Management Practices in the United States. National Animal Health Monitoring Systems http://www.aphis.usda.gov/nahms.

Van Soest, P.J., J.B. Robertson and B.A. Lewis. 1991. Methods for Dietary Fiber, Neutral Detergent Fiber, and Nonstarch Polysaccharides in Relation to Animal Nutrition. J. Dairy Sci. 74:3583–3597

Vasseur, E. et al. 2010. A survey of dairy calf management practices in Canada that affect animal welfare. J. Dairy Sci. 93:1307–1316.

Virgínio Júnior, G.F. and Bittar, C.M.M. 2021. Microbial colonization of the gastrointestinal tract of dairy calves – a review of its importance and relationship to health and performance. Anim. Heal. Res. Rev. 1–12.

Virginio Junior, G.F. et al. 2021. Does algae β-glucan affect the fecal bacteriome in dairy calves? PLoS One 16:e0258069.

Virgínio Júnior, G.F. et al. 2021a. Ruminal and Fecal Bacteriome of Dairy Calves Fed Different Levels and Sources of NDF. Animals 11:2705.

Virgínio Júnior, G.F. et al. 2021b. The Liquid Diet Composition Affects the Fecal Bacterial Community in Pre-weaning Dairy Calves. Front. Anim. Sci. 2:12.

Yanar, M., O. Güler, B. Bayram and J. Metin. 2006. Effects of feeding acidified milk replacer on the growth, health and behavioural characteristics of holstein-friesian calves. Turkish J. Vet. Anim. Sci. 30:235–241.

Yu, Z. and M. Morrison. 2004. Improved extraction of PCR-quality community DNA from digesta and fecal samples. Biotechniques 36:808–812.

Zafar, H. and M.H. Saier. 2021. Gut Bacteroides species in health and disease. Gut Microbes 13:1848158.

Zhang, J., K. Kobert, T. Flouri and A. Stamatakis. 2014. PEAR: a fast and accurate Illumina Paired-End reAd mergeR. Bioinformatics. 30:614–620.

Zitnan, R. et al. 2012. Diet induced ruminal papillae development in neonatal calves not correlating with rumen butyrate. Vet. Med. (Praha). 50:472–479.

Zou, Y. et al. 2017. Effects of feeding untreated, pasteurized and acidified waste milk and bunk tank milk on the performance, serum metabolic profiles, immunity, and intestinal development in Holstein calves. J. Anim. Sci. Biotechnol. 8:53.

# 4. AVALIAÇÃO DA SUPLEMENTAÇÃO DA DIETA LÍQUIDA COM *BLEND* DE ÓLEOS ESSENCIAIS NO DESEMPENHO E SAÚDE DE BEZERROS LEITEIROS

## Resumo

A suplementação de bezerros leiteiros com óleos essenciais na dieta líquida pode afetar a incidência e a gravidade de doenças infecciosas e consequentemente afetar o desempenho desses animais. Foi avaliada a inclusão de um *blend* de óleos essenciais comercial à base de óleo de hortelã-pimenta, eucalipto e cristais de mentol e seu efeito no desempenho e saúde durante o período pré e pós-desaleitamento de bezerros leiteiros. Ao nascimento, 42 bezerros leiteiros (37 machos e 5 fêmeas) foram blocados de acordo com sexo e peso ao nascer e aleatoriamente designados para um dos dois tratamentos – sucedâneo lácteo diluído a 14% (SL) e sucedâneo lácteo acrescido do *blend* de óleo essenciais (SLOE) na dose de 4 mL por bezerro por dia, divididos em duas refeições durante os primeiros 28 dias de vida. Os animais foram alojados de forma individual e receberam 6L/d da dieta líquida, divididos em duas refeições, além de concentrado inicial e água à vontade. Ingestão, escore fecal, escore de saúde e temperatura retal foram avaliados diariamente, desempenho semanalmente e parâmetros sanguíneos nas semanas 1, 2, 3, 4 e 8. Bezerros alimentados com SLOE apresentaram tendência de maior consumo de matérica seca total durante o período de aleitamento, mas não foram observados outros efeitos da suplementação do *blend* de óleos essenciais no desempenho. No entanto, os bezerros SLOE apresentaram menor escore de saúde e menos dias com escore de saúde ≥ 4 (sugestivo para bezerros positivos para broncopneumonia). A suplementação de bezerros com óleos essenciais pode ser uma alternativa para reduzir a ocorrência de problemas respiratórios.

**Palavras-chave:** Óleo de eucalipto, Óleo de hortelã-pimenta, Cristais de mentol, Broncopneumonias

## Abstract

Supplementation of dairy calves with essential oils in the liquid diet can affect the incidence and severity of infectious diseases and consequently affect performance of these animals. The inclusion of a commercial essential oil blend based on peppermint, eucalyptus and menthol crystals and its effect on performance and health during the pre and post-weaning period of dairy calves was evaluated. At birth, 39 dairy calves (33 males and 6 females) were blocked according to sex and birth weight and randomly assigned to one of two treatments - milk replacer diluted at 14% (MR) and milk replacer plus essential oil blend (MREO) at a dose of 4 mL per calf per day, divided into two meals during the first 28 days of life. Calves were inidvidually housed and fed 6L/d of the liquid diet, divided in two meals, and received starter concentrate and water free-choice. Intake, fecal score, health score and rectal temperature were evaluated daily, performance weekly and blood parameters at week 1, 2, 3, 4 and 8. Calves fed MREO tended to present a higher total dry matter intake during the preweaning period; however no other differences were observed for calves performance. Nevertheless, MREO calves had a lower health score and fewer days with a health score ≥ 4 (suggestive of bronchopneumonia). The supplementation of

calves with essential oils may be an alternative to reduce the occurrence of respiratory problems.

**Keywords:** Eucalyptus oil, Peppermint oil, Menthol crystals, Bronchopneumonia

## 4.1. Introdução

Um programa adequado de criação de bezerros deve abranger aspectos que considerem desempenho, redução do estresse, atendimento às necessidades nutricionais e manejo sanitário para otimizar o estado de saúde do bezerro. Sabe-se que os indicadores desse período não estão apenas relacionados com o sucesso do programa de criação, mas também com a produção de leite futura (Khan et al., 2011; Heinrichs e Heinrichs, 2011).

Problemas nutricionais e doenças neonatais, especialmente diarreia e síndrome respiratória, são alguns exemplos de impactos negativos na vida produtiva de fêmeas de reposição. Eles podem atuar como estressores, diminuindo a imunidade, aumentando a suscetibilidade do animal a outros distúrbios, aumentando as taxas de mortalidade (McGuirk, 2008; Chase, 2008).

Portanto, estratégias que auxiliem na nutrição adequada e melhorem o desenvolvimento e a saúde são essenciais para reduzir a morbidade e mortalidade e acelerar o desenvolvimento das bezerras (Drackley, 2008). A estratégia mais comum para esse fim é o uso de antibióticos promotores de crescimento, porém sua utilização vem sendo severamente criticada e proibida em diversos países (Sneeringer et al., 2015).

Com isso, surge a importância de alternativas mais naturais como os aditivos fitogênicos, os quais são definidos como compostos secundários de plantas (Jouany et al., 2007). Algumas de suas propriedades são atividades antissépticas e antimicrobianas que interferem no funcionamento de células bacterianas, fúngicas e protozoárias (Benchaar et al., 2008), apresentando eficiência semelhante aos antibióticos para o tratamento de algumas doenças. Esses compostos também contribuem para a prevenção do estresse oxidativo (Greathead et al., 2003) e podem alterar a atividade fagocitária dos leucócitos e inibir o sistema complemento (Jouany et al., 2007).

Estudos utilizando óleos essenciais como promotores de crescimento bovinos mostram os efeitos positivos da suplementação, geralmente associados a efeitos no trato gastrointestinal (TGI) (Soltan, 2009; Giannenas et al., 2011), e aumento dos níveis de imunoglobulinas e resposta imune (Carrubba et al., 2020). Estudos anteriores mostraram que a suplementação de óleos essenciais no concentrado de bezerros melhora o desempenho (Jeshari et al., 2016; Liu et al., 2020) e diminui a

gravidade da diarreia (Katsoulos et al., 2017). No entanto, os efeitos da suplementação na dieta líquida são escassos.

Este estudo teve por objetivo avaliar se a suplementação de uma mistura comercial de óleos essenciais (SLOE) em substituto lácteo (SL) afeta o desempenho e a saúde de bezerros leiteiros nos períodos pré e pós-desaleitamento.

## 4.2. Material e Métodos

### 4.2.1. Animais, delineamento experimental e tratamentos

O Comitê de Ética em Pesquisa em Animais da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" / Universidade de São Paulo aprovou todos os procedimentos envolvendo animais neste estudo (Protocolo nº. 9808150621).

O experimento foi conduzido no Bezerreiro Experimental "Evilásio de Camargo", do Departamento de Zootecnia da ESALQ/USP, localizado na cidade de Piracicaba – SP, no período de setembro a março de 2022. Foram utilizados 42 bezerros machos (n=37; 38,37 ± 1,84Kg) e fêmeas (n=6; 30,24 ± 1,16Kg) recém-nascidos da raça Holandês, em delineamento de blocos casualizados. Os bezerros foram blocados de acordo com sexo, data de nascimento e peso ao nascimento. Os bezerros foram colostrados com duas doses de substituto de colostro (SCCL®, Saskatoon, Canada), totalizando 200g IgG por bezerro, nas primeiras 6h de vida (Godden, 2008). O valor de Brix sérico foi considerado adequado para transferência de imunidade segundo as recomendações de Godden et al. (2019), com média de 9,2% de brix ± 1,16.

Os bezerros recebiam 6L/d de substituto lácteo comercial (Nurture Prime, Cargill Alimentos Ltda., Itapira, SP, Brasil) diluído a 14%, ofertado em balde suspenso com bico, divididos em duas refeições (7h00 e 17h00). O substituto era acrescido ou não de um *blend* de óleos essenciais (BronchoVest, Biochem) de acordo com os tratamentos: 1) Substituto lácteo (SL; n = 19); 2) Substituto lácteo acrescido de 2mL de óleo essencial/trato (SLOE; n = 20), portanto, a dose total diária era de 4mL durante os primeiros 28 dias de vida.

O produto utilizado é composto de três princípios ativos (óleo de eucalipto, óleo de hortelã-pimenta e cristais de mentol). Antes da utilização, o produto foi diluído em água destilada na concentração de 1:10, conforme a recomendação do fabricante, armazenado em frasco de vidro âmbar e mantido em local sem luminosidade até o momento do fornecimento. A mistura de óleos essenciais foi pipetada (2mL) com o auxílio de uma pipeta de plástico e adicionada ao substituto lácteo já medido (3L) no próprio recipiente de oferta aos bezerros do tratamento SLOE, o qual era imediatamente oferecido ao bezerro.

O substituto lácteo foi diluído em água potável entre 41-42°C que após a mistura atingia a temperatura de 38-39°C para o fornecimento. Os bezerros foram desaleitados gradualmente a partir dos 51 dias de vida, reduzindo 1L por dia até o completo desaleitamento aos 56 dias de vida. Após o desaleitamento, os bezerros permaneciam nos abrigos individuais até 70 dias de vida, quando finalizou o período experimental.

### 4.2.2. Instalações e consumo

Logo após o nascimento, os bezerros foram alocados em abrigos individuais do tipo gaiola suspensa (113 x 140 cm) com tapete de borracha coberto por cama de maravalha em barracão com ventilação natural durante os primeiros 21 dias de vida. A partir do dia 22 de vida, os bezerros eram realocados para abrigos individuais externos do tipo "tropical" (1,35 m de altura x 1 m de largura e 1,4 m de profundidade) em gramado e contidos por coleiras e corrente (2 m). Os abrigos contavam com suporte para concentrado e água.

Os bezerros tinham livre acesso a concentrado comercial (Start milk 20% Nutrimax Nutrição Animal Ltda., Salto de Pirapora, SP, Brasil) até atingir o consumo máximo de 2,5 kg ao dia. O concentrado foi fornecido imediatamente após o fornecimento da dieta líquida pela manhã e as sobras eram pesadas no dia seguinte para mensuração do consumo diário. A partir do desaleitamento, os bezerros passavam a receber feno de gramínea de qualidade em livre acesso em balde preso ao chão do abrigo.

As amostras de concentrado inicial, feno e sucedâneo do leite foram coletadas mensalmente para determinação da composição química da dieta ofertada. As amostras foram moídas em moinho de peneira Wiley de 1 mm (Marconi). A MS foi determinada por secagem das amostras em estufa a 105°C por 24 h (método AOAC 925,40) e cinzas por incineração das amostras em forno mufla a 550°C por 4h (método AOAC 942,05). A análise de fibra em detergente neutro (FDN) foi realizada utilizando um analisador de fibra Ankom 2000 (Ankom Tech. Corp., Fairport, NY), α-amilase estável ao calor e sulfito de sódio foram incluídos na análise de FDN (Van Soest et al., 1991). A concentração total de nitrogênio foi determinada usando o aparelho Leco TruMac N (Leco Corporation, St. Joseph, MI; método AOAC 968.06) e a proteína bruta (PB) foi calculada multiplicando o nitrogênio total por 6,25. A concentração do extrato etéreo (EE) foi determinada usando éter de petróleo (método AOAC 920.39). Análise bromatológica dos ingredientes da dieta estão apresentadas na Tabela 5.

**Tabela 5.** Composição químico-bromatológica do substituto lácteo, concentrado e feno

| | Substituto lácteo[1] | Concentrado[2] | Feno |
|---|---|---|---|
| Matéria seca, % | 89,7 | 88 | 82,5 |
| Matéria mineral, % MS | 9,7 | 9,9 | 6,2 |
| Proteína bruta, % MS | 22,6 | 21,8 | 9,3 |
| Extrato etéreo, % MS | 19 | 3 | 2,5 |
| FDN[3], % MS | - | 28,4 | 74,7 |

[1]Nurture Prime, Cargill Alimentos Ltda., Itapira, SP, Brasil [2]Start milk 20% Nutrimax Nutrição Animal Ltda., Salto de Pirapora, SP, Brasil; [3]Fibra em detergente neutro

### 4.2.3. Medidas corporais e parâmetros sanguíneos

Os bezerros foram pesados ao nascimento e semanalmente até a 10ª semana de vida utilizando uma balança mecânica (ICS-300, Coimma Ltda., Dracena, SP, Brazil), sempre antes do aleitamento da manhã. Medidas corporais também foram realizadas a cada duas semanas. Altura de cernelha e largura de garupa eram medidas com auxílio de uma régua com escala em centímetros (Carci, São Paulo, SP, Brazil), e a circunferência torácica, era medida com auxílio de uma fita com escala também em centímetros (Bovitec, São Paulo, SP, Brazil).

Amostras de sangue foram coletadas nas semanas 1, 2, 3, 4 e 8 de vida por venipuntura da veia jugular externa, 2h após o aleitamento da manhã. As amostras foram coletadas em 3 tubos, um contendo fluoreto de sódio como antiglicolítico e EDTA potássio como anticoagulante para obtenção do plasma, outro K3 EDTA para obtenção do plasma e o último com ativador de coágulo para obtenção do soro. Os tubos foram imediatamente processados em laboratório.

Uma alíquota de sangue do tubo contendo K3 EDTA foi retirada com auxílio de capilar para análise de hematócrito utilizando centrífuga de microhematócrito na rotação de 2,000 x g por 10 minutos (model SPIN 1000, Microspin, São Paulo, Brazil). As demais amostras de sangue foram centrifugadas a 2,000 x g por 20 minutos a 4ºC para separar soro ou plasma e então eram armazenadas em tubetes a -10ºC para posterior análise.

Os indicadores metabólicos foram determinados no Sistema Automático de Bioquímica (SBA-200, CELM, Barueri, SP, Brasil). Kits enzimáticos comerciais específicos (Labtest Diagnóstica S.A., Lagoa Santa, MG, Brasil) foram utilizados para analisar glicose plasmática (ref. 85) e proteína sérica total (ref. 99). A determinação de beta-hidroxibutirato (BHB) foi realizada utilizando o kit de enzimas RANBUT (Ref.: RB1007; RANDOX Laboratories - Life Sciences Ltd., Crumlin, UK).

### 4.2.4. Escore fecal e de saúde

O escore fecal foi monitorado diariamente através da avaliação da fluidez das fezes: (1) regular e firme; (2) macio; (3) aquoso; (4) fluido, conforme Larson et al. (1977). O episódio de diarreia foi considerado quando os bezerros apresentaram escore fecal ≥ 3 por mais de um dia consecutivo. A taxa de diarreia foi calculada de acordo com a fórmula adaptada de Li et al. (2019), Taxa de diarreia = (dias com diarreia ÷ dias avaliados) × 100.

Os bezerros com pontuação ≥ 3 receberam uma solução de reidratação oral (80 g de dextrose, 4 g de bicarbonato de sódio e 5 g de cloreto de sódio por litro de água morna) às 11h. A temperatura retal dos bezerros foi aferida diariamente com termômetro digital, sendo considerada febre quando os bezerros apresentavam mais de 39,4°C. Os animais eram avaliados diariamente utilizando o Calf Health Scoring Criteria, escore desenvolvido pela Universidade de Wisconsin-Madison, que contempla os seguintes critérios para detecção da DRB: temperatura retal, tosse, secreção nasal, secreção ocular e posição da cabeça e orelhas, pontuados de 0 a 3 de acordo com a intensidade dos sinais, como apresentado no Anexo I. A soma das pontuações ≥4,0 indica positividade para DRB.

Os bezerros recebiam tratamento com antimicrobiano quando apresentavam algum indicativo de acometimento sistêmico, como febre, anorexia e/ou apatia, ou quando apresentavam algum tipo de alteração à ausculta pulmonar que era realizada semanalmente, de acordo com a recomendação veterinária.

### 4.2.5. Análises estatísticas

O delineamento experimental utilizado foi em blocos casualizados, os bezerros foram alocados em blocos de acordo com o peso ao nascer, data de nascimento e sexo. As diferenças de peso dentro dos blocos não foram superiores a 2 kg, enquanto a idade dos bezerros variou no máximo 15 dias. Os dados de crescimento e ingestão, escore fecal e de saúde foram analisados como medidas repetidas no tempo usando o procedimento MIXED do pacote estatístico SAS (versão 5.0, SAS Institute Inc., Cary, NC, EUA) para modelos mistos. O modelo incluiu tratamento, semana (idade dos bezerros) e a interação entre tratamento e semana como efeitos fixos. O efeito bloco foi incluído no modelo como efeito aleatório e semana como medida repetida (modelo 1), e o sujeito das medidas repetidas utilizadas foi o animal (tratamento). Modelo estatístico 1: $Yijk = \mu + Ti + bj + eij + Sk + (TS)ik + eijk$, onde: $Yijk$ – variável de resposta, $\mu$ – média geral, $Ti$ – efeito fixo do tratamento, $bj$ – efeito de bloco aleatório, $eij$ – erro residual (A), $Sk$ – efeito fixo da idade dos bezerros (semana da coleta de dados/amostra), $(TS)ik$ – efeito fixo da interação tratamento × idade, $eijk$ – erro residual (B). As estruturas de covariância "simetria composta, simetria composta heterogênea, autorregressiva, autorregressiva heterogênea, não estruturada, bandada, componentes de variância, toeplitz, antidependência e toeplitz

heterogênea" foram testadas e definidas de acordo com o menor valor obtido para "Akaike's Information Criterion corrigido" (AICC).

Para dados que foram agrupados para criar uma única medida, como dias de diarreia, dias com febre, dias com tosse, taxa de diarreia, foi usado o PROC MIXED do pacote estatístico SAS de acordo com o modelo 2. O modelo incluiu tratamento como efeito fixo e blocos como efeito aleatório, e bezerro dentro do tratamento foi incluído como um efeito aleatório. As médias foram obtidas para todas as variáveis de resposta por meio do comando LSMEANS. O teste de Tukey realizou as comparações entre os tratamentos quando houve significância na análise de variância. Modelo estatístico 2: $Yijk = \mu + Ti + bj + eij$, onde: Yijk – variável resposta, μ – média geral, Ti – efeito fixo do tratamento, bj – efeito de bloco aleatório, eij – erro residual. Para todas as análises, a significância foi declarada em $P < 0,05$ e tendência quando o valor de P estava entre 0,06 e 0,1.

## 4.3. Resultados

### 4.3.1. Desempenho pré-desaleitamento

As variáveis de consumo, GMD, EA e medidas corporais aumentaram com a idade (P<0,0001; Tabela 6). Não houve efeito da suplementação com o óleo essencial para o desempenho pré-desaleitamento (P>0,05). O consumo de concentrado apresentou interação tratamento x idade (P=0,052), com diferença entre os tratamentos durante a sétima semana, sendo superior para o tratamento SLOE (P<0,05; Figura 6a). Essa interação refletiu em uma tendência (P=0,07; Tabela 6) do consumo total de MS também ser maior para os bezerros do tratamento SLOE (Tabela 6).

**Tabela 6.** Desempenho pré-desaleitamento de bezerros leiteiros alimentados com substituto lácteo contendo ou não *blend* de óleos essenciais

| | Tratamento[1] | | EPM[2] | Valor – P[3] | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | SL | SLOE | | T | S | TxS |
| **Consumo** | | | | | | |
| Concentrado, MS g/d | 348,21 | 413,46 | 47,453 | 0,294 | <,0001 | 0,052 |
| MS total, g/d | 1081,8 | 1170,0 | 33,32 | 0,070 | <,0001 | 0,151 |
| **Peso, kg** | | | | | | |
| Ao nascimento | 36,37 | 36,40 | 1,454 | 0,945 | - | - |
| Ao desaleitamento | 59,06 | 61,54 | 1,834 | 0,280 | - | - |
| **GMD, kg/d** | 0,41 | 0,44 | 0,023 | 0,415 | <,0001 | 0,634 |
| **EA** | 0,39 | 0,38 | 0,022 | 0,920 | <,0001 | 0,701 |
| **Medidas corporais, cm** | | | | | | |
| Altura de cernelha | 82,4 | 82,7 | 0,787 | 0,575 | <,0001 | 0,456 |
| Largura de garupa | 22,6 | 22,6 | 0,315 | 0,927 | <,0001 | 0,451 |
| Perímetro torácico | 84,7 | 85,4 | 0,853 | 0,351 | <,0001 | 0,277 |

[1]SL, Substituto lácteo; SLOE, Substituto lácteo com óleo essencial; [2]EPM – Erro padrão da média; [3]T – efeito de tratamento, S - efeito de semana, TxS – Efeito da interação tratamento x semana (P<0,05)

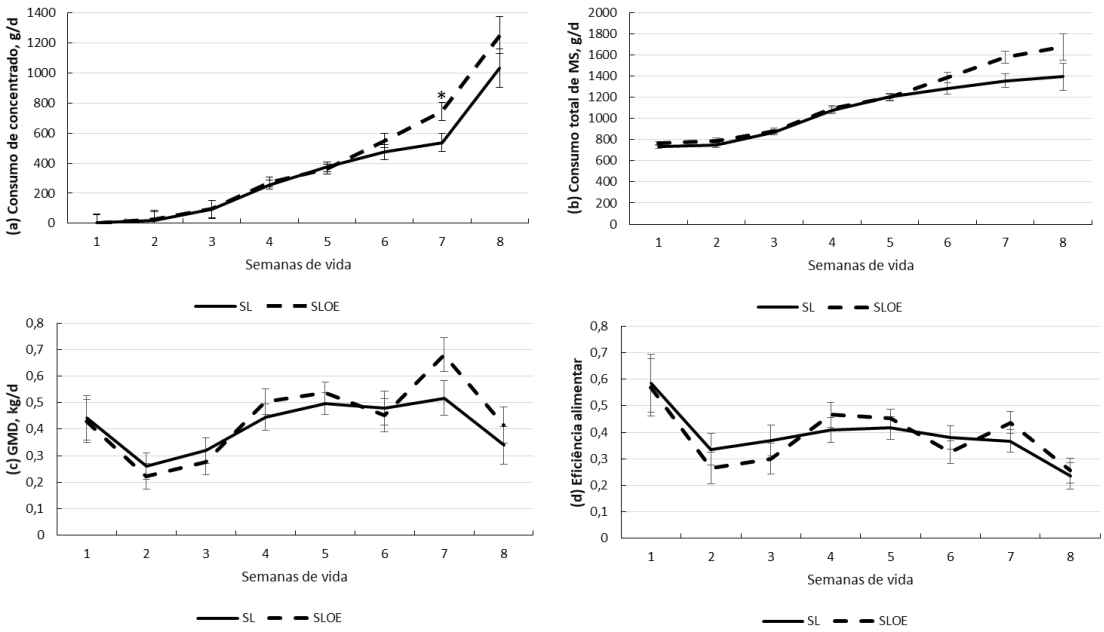


**Figura 6.** Desempenho pré-desaleitamento de bezerros leiteiros alimentados com substituto lácteo contendo ou não *blend* de óleos essenciais; (a) Consumo de concentrado, (b) Consumo total de matéria seca, (c) Ganho médio diário e (d) Eficiência alimentar. * denota diferença estatística P < 0,05 para os maiores valores de SLOE.

### 4.3.2. Desempenho pós-desaleitamento

As variáveis de consumo, GMD e EA aumentaram de acordo com a idade (P <0,05; Tabela 7).

**Tabela 7.** Desempenho pós-desaleitamento (56-70d) de bezerros leiteiros alimentados com substituto lácteo contendo ou não *blend* de óleos essenciais

| | Tratamento[1] | | EPM[2] | Valor – P[3] | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | SL | SLOE | | T | S | TxS |
| **Consumo** | | | | | | |
| Concentrado, MS g/d | 2098,8 | 2237,3 | 88,77 | 0,172 | 0,0001 | 0,124 |
| Feno, MS g/d | 100,1 | 108,1 | 8,10 | 0,453 | 0,0001 | 0,9377 |
| MS total, g/d | 2200,0 | 2334,5 | 86,94 | 0,186 | <,0001 | 0,120 |
| **Peso, kg** | | | | | | |
| Ao desaleitamento | 59,06 | 61,54 | 1,834 | 0,279 | - | - |
| Ao final | 70,88 | 74,13 | 2,160 | 0,229 | - | - |
| **GMD kg/d** | 0,85 | 0,87 | 0,068 | 0,753 | 0,0270 | 0,084 |
| **EA** | 0,40 | 0,37 | 0,028 | 0,406 | 0,0001 | 0,015 |
| **Medidas corporais, cm** | | | | | | |
| Altura de cernelha | 89,5 | 90,5 | 0,847 | 0,322 | - | - |
| Largura de garupa | 24,7 | 25,4 | 0,305 | 0,099 | - | - |
| Perímetro torácico | 97,4 | 99,5 | 0,198 | 0,100 | - | - |

[1]SL, Substituto lácteo; SLOE, Substituto lácteo com óleo essencial; [2]EPM – Erro padrão da média; [3]T – efeito de tratamento, S - efeito de semana, TxS – Efeito da interação tratamento x semana (P<0,05)

As variáveis de desempenho pós-desaleitamento não apresentaram efeito da suplementação com óleos essenciais (P>0,05; Tabela 7). Apenas EA apresentou efeito de interação tratamento x idade (P=0,01). Houve tendência para maior largura de garupa e perímetro torácico (P=0,09 e P=0,10, respectivamente; Tabela 7) para os bezerros do tratamento SLOE.

### 4.3.3. Metabólitos sanguíneos

Os parâmetros sanguíneos avaliados mostraram efeito de idade (P<0,0001; Tabela 8), a proteína apresentou uma diminuição na terceira e quarta semana (Figura 7a), enquanto a glicose apresentou diminuição na oitava semana de vida (Figura 7b). O betahidroxibutirato também apresentou efeito de idade (P<0,0001), com diminuição nas primeiras semanas e aumento na oitava semana de vida (Figura 7c). Os metabólitos não apresentaram efeito de tratamento ou interação tratamento x idade (P>0,05; Tabela 8).

**Tabela 8.** Metabólitos sanguíneos de bezerros leiteiros alimentados com substituto lácteo contendo ou não *blend* de óleos essenciais

| | Tratamento[1] | | EPM[2] | Valor – P[3] | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | SL | SLOE | | T | S | TxS |
| Proteína total, g/dL | 6,67 | 6,66 | 0,144 | 0,935 | <0,0001 | 0,839 |
| Glicose, mg/dL | 112,2 | 108,4 | 2,17 | 0,198 | <0,0001 | 0,345 |
| Beta-hidroxibutirato, mmol/L | 0,149 | 0,154 | 0,015 | 0,833 | <0,0001 | 0,636 |

[1]SC, Substituto lácteo; SLOE, Substituto lácteo com óleo essencial; [2]EPM – Erro padrão da média; [3]T – efeito de tratamento, S - efeito de semana, TxS – Efeito da interação tratamento x semana (P<0,05)

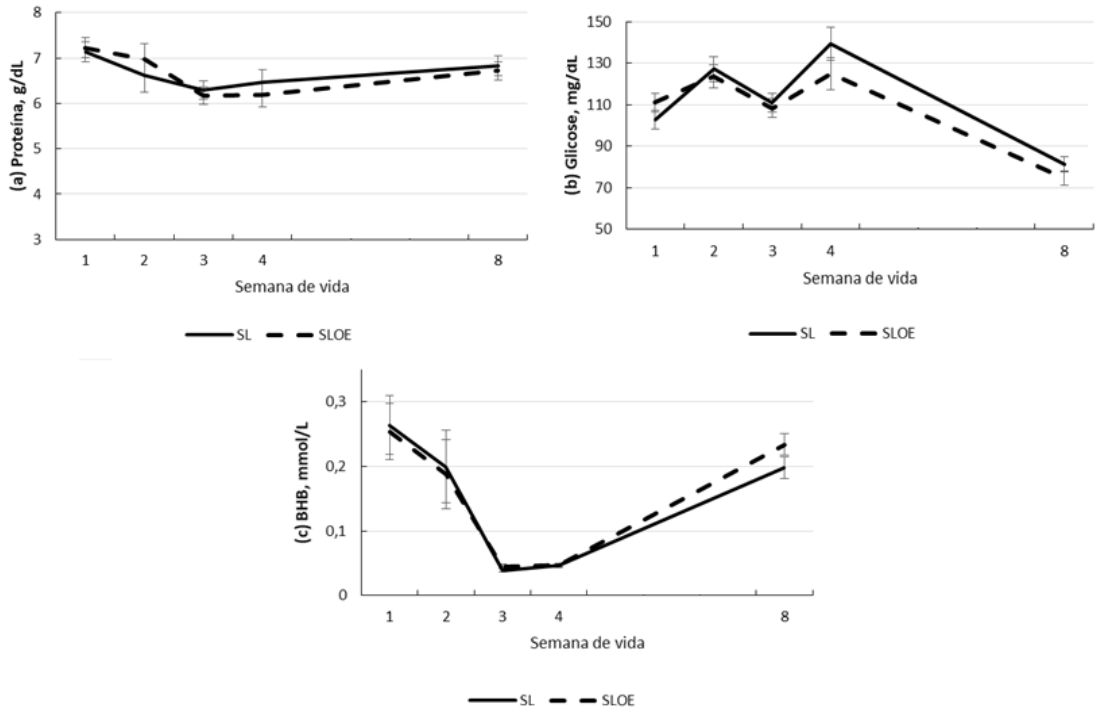


**Figura 7.** Metabólitos sanguíneos pré-desaleitamento de bezerros leiteiros alimentados com substituto lácteo contendo ou não *blend* de óleos essenciais; (a) Proteína total, (b) Glicose e (c) Beta-hidroxibutirato.

### 4.3.4. Escore fecal e de saúde

A idade afetou o escore fecal, escore de saúde e hematócrito durante o período pré-desaleitamento (P<0,05; Tabela 9). As variáveis avaliadas não apresentaram efeito de interação tratamento x semana (P>0,05). O escore de saúde e o total de dias com escore de saúde ≥4 durante a fase de aleitamento foi maior para bezerros não suplementados com o *blend* (P<0,05; Tabela 9). Dias com tosse, número de intervenções e escore de saúde pós-desaleitamento apresentaram uma

tendência de serem maiores para o tratamento SL (P=0,07; P=0,09; P=0,07, respectivamente; Tabela 9). As demais variáveis de saúde não sofreram efeito de tratamento (P>0,05).

**Tabela 9.** Diarreia e saúde de bezerros leiteiros pré e pós-desaleitamento alimentados com substituto lácteo contendo ou não *blend* de óleos essenciais.

| | Tratamento[1] | | EPM[2] | Valor – P[3] | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | SL | SLOE | | T | S | TxS |
| **Pré-desaleitamento** | | | | | | |
| Taxa de diarreia | 20,66 | 21,94 | 1,973 | 0,640 | - | - |
| Escore fecal | 1,96 | 2,01 | 0,053 | 0,516 | <,0001 | 0,138 |
| Dias com diarreia | 14,46 | 15,35 | 1,381 | 0,640 | - | - |
| Dias com escore fecal 4 | 2,88 | 2,67 | 0,609 | 0,799 | - | - |
| Escore de saúde | 1,37 | 1,03 | 0,115 | 0,01 | 0,05 | 0,327 |
| Dias com escore de saúde ≥ 4 | 4,26 | 1,40 | 1,005 | 0,05 | - | - |
| Dias com tosse | 11,52 | 4,80 | 2,532 | 0,07 | - | - |
| Dias com febre | 1,74 | 1,60 | 1,668 | 0,793 | - | - |
| Intervenções | 1,39 | 0,92 | 0,217 | 0,09 | - | - |
| Hematócrito | 25,96 | 26,76 | 0,722 | 0,436 | <,0001 | 0,449 |
| **Pós-desaleitamento** | | | | | | |
| Escore de saúde | 0,96 | 0,68 | 0,169 | 0,07 | 0,2298 | 0,655 |
| Hematócrito | 26,22 | 26,09 | 0,901 | 0,905 | 0,3922 | 0,512 |

[1]SL, Substituto lácteo; SLOE, Substituto lácteo com óleo essencial; [2]EPM – Erro padrão da média; [3]T – efeito de tratamento, S - efeito de semana, TxS – Efeito da interação tratamento x semana (P<0,05)

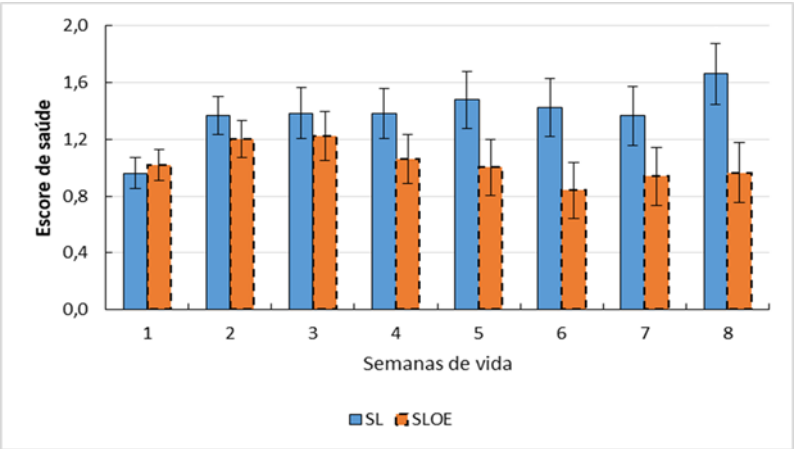


**Figura 8.** Escore de saúde pré-desaleitamento de bezerros leiteiros alimentados com substituto lácteo contendo ou não *blend* de óleos essenciais.

## 4.4. Discussão

### 4.4.1. Desempenho pré e pós-desaleitamento

A taxa de crescimento de bezerros alimentados com sucedâneo lácteo é influenciada pela composição de ingredientes e ingestão de nutrientes (Zhang et al., 2019). Bezerros que recebem sucedâneo tendem a possuir ambiente abomasal menos ácido (Smith e Sissons 1975; Constable et al., 2005) e desenvolvimento intestinal mais lento, o que influencia diretamente em seu desempenho (Górka et al., 2011). O GMD dos bezerros durante a fase de aleitamento foi aquém de outros resultados que já obtivemos nas mesmas condições (Coelho et al., 2022).

De forma geral, a nutrição quando adequada, melhora a resposta imune dos bezerros e consequentemente diminui a ocorrência das principais doenças infecciosas (Ohtsuka et al., 2006). Estudos com óleos essenciais na alimentação de bezerros leiteiros demonstram que esses compostos podem funcionar de forma semelhante aos ionóforos (um tipo de antibiótico promotor de crescimento utilizado como aditivo alimentar; Calsamiglia et al., 2007), quando suplementados via concentrado inicial. Eles podem influenciar o desenvolvimento do trato gastrointestinal, a atividade microbiológica do rúmen, melhorar a eficiência alimentar e diminuir as doenças neonatais (Benchaar et al., 2008; Cobellis et al., 2016).

A suplementação com óleos essenciais é realizada comumente via concentrado, entretanto, o consumo para bezerros é baixo nas primeiras semanas (Suarez-Mena et al., 2015) e, concomitantemente, esse é o período de maior ocorrência das doenças entéricas (McGuirk, 2008), o que justifica sua utilização via dieta líquida. Existem diferenças descritas na literatura quanto a aceitabilidade dos OEs, porém estas variam quanto ao método de fornecimento, planta utilizada e processo de extração (Benchaar et al., 2008), com variação ainda entre espécie e categoria animal (Stevanović et al., 2018).

A depressão do consumo relacionada aos extratos secundários de plantas, parece ser uma preocupação importante (Bach et al., 2012; Ginane et al., 2011). O sabor amargo característico desses ingredientes demonstra ter efeitos negativos na palatabilidade se manifestando na rejeição alimentar (Ginane et al., 2011; Katsoulus et al., 2017) ou diminuição do consumo (Ahmed et al., 2009; Kolling et al., 2016). A estratégia de fornecer esses compostos no sucedâneo lácteo têm demonstrado ser benéfica quanto ao consumo (Fathi et al., 2009). Montoro et al. (2011) atribuiu essa melhor aceitação à presença de aditivos palatabilizantes nesses alimentos. Soltan (2009) utilizando os mesmos extratos utilizados em nosso estudo, porém com dose mais baixa (3mL ou 281 mg/bezerro/dia), não observou diferença no consumo do sucedâneo.

Por esses motivos, em nosso estudo também não houve diferença no consumo da dieta líquida, mesmo utilizando uma dose maior (4 mL), o que pode estar relacionado ao método de fornecimento em balde com bico; a quantidade de dieta líquida fornecida (3L/refeição) que gera maior estímulo de fome comparado com dieta à vontade ou até mesmo pelo uso do sucedâneo que possui agentes palatabilizantes em sua formulação.

O período de fornecimento reduzido aos primeiros 28 dias de vida foi determinado nesse estudo por também coincidir com o período de janela imunológica dos bezerros, ou seja, quando estão mais suscetíveis às principais doenças infecciosas (McGuirk, 2008), visando também uma maior aplicabilidade econômica do produto. Esse pode ser um dos motivos de não terem sido encontradas grandes alterações quanto a desempenho pré e pós-desaleitamento. Por outro lado, outros autores que suplementaram durante todo o período de aleitamento também não encontraram importantes alterações de desempenho (Santos et al., 2015; Campolina et al., 2021). Soltan (2009) observou que a ingestão de MST foi diminuída em bezerros suplementados com 0,09, 0,187 ou 0,281 g/bezerro/dia durante todo o período de aleitamento com *blend* de OE semelhante ao do presente estudo (óleo de eucalipto, cristal de mentol e óleo de hortelã), no entanto, a taxa de conversão alimentar foi melhor.

Beneficios adicionais dos OEs foram relatados, como aumento da ingestão de concentrado inicial (Hill et al., 2007), aumento do consumo de matéria seca (Swedzinski et al., 2020), eficiência alimentar (Jeshari et al., 2016; Kazemi-Bonchenari et al., 2018) e ganhos de peso corporal (Hill et al., 2007; Santos et al., 2015). Embora em nosso estudo não tenha sido observado efeito do óleo essencial para os parâmetros de desempenho durante a fase de aleitamento, os bezerros suplementados apresentaram tendência de maior consumo de matéria seca total no período de aleitamento. No entanto, esta tendência não se manteve após o desaleitamento.

A tendência em estimular a ingestão promovida pelo OE pode estar ligada a melhora da saúde geral, uma vez que esses compostos podem controlar a proliferação de bactérias patogênicas. Froehlich et al. (2017) demonstrou que a suplementação de bezerros com *blend* de OE (carvacrol, cariofileno, p-cimeno, cineol, terpineno e timol) na dose de 2,5 g/d resultou em maiores GMD e medidas corporais; e aumento da imunidade em comparação ao grupo controle e ao grupo que recebia o mesmo *blend* em dose maior. Em nosso estudo, os bezerros apresentaram melhor escore de saúde que pode contribuir para a melhoria do desempenho próximo ao desaleitamento.

Nos estudos de Cakir (2004) e Salazar et al. (2019) os bezerros que recebiam suplementação com OE durante a fase da aleitamento, não demonstraram diferença nos dados de desempenho durante o período de aleitamento. Contudo, observaram aumento significativo no GMD e EA após o desaleitamento o que mostra um efeito residual positivo dos OE até 15 dias após sua interrupção. Em nosso estudo, os bezerros SLOE apresentaram apenas uma tendência em melhorar as medidas corporais após o desaleitamento, o que pode estar relacionado ao período de oferta do *blend*, que foi

apenas durante os primeiros 28 dias de vida. De forma geral, os bezerros apresentaram desempenho bastante aquém ao esperado. É comum que bezerros que recebem sucedâneo lácteo tenham um desempenho menor quando comparado a bezerros que recebem leite integral (Coelho et al., 2022). Contudo, os bezerros do nosso experimento foram drasticamente desafiados pela alta ocorrência de tristeza parasitária bovina e broncopneumonia durante todo o período experimental.

### 4.4.2. Metabólitos sanguíneos

Alguns autores estabeleceram relação da suplementação com óleos essenciais com o aumento da imunidade através da maior produção de imunoglobulinas G e M o que resultava em aumento da proteína sérica total dos bezerros (Froehlich et al., 2017; Jahani-Azizabadi et al., 2022). Estudos anteriores confirmaram que a concentração de IgG foi menor em bezerros com diarreia grave do que em bezerros saudáveis (Villarroel et al., 2013). Nesse estudo, a diarreia não foi uma importante problemática aos bezerros, o que pode ter colaborado para não haver diferença entre os tratamentos para proteína sérica.

Alguns autores descrevem que o uso de óleos essenciais pode aumentar a sensibilidade à insulina, o que pode ocasionar alterações na via da glicose e redução da glicose sanguínea (Campolina et al., 2021; Katsoulos et al., 2017). Ardekani et al. (2010) relataram que o uso de óleo de cominho causou diminuição da glicose, colesterol e triglicerídeos no soro de camundongos. Soltan (2009) e Hosoda et al. (2006) não encontraram alteração na concentração de glicose sérica pela adição de óleo de hortelã, eucalipto e cristais de mentol. No presente estudo, a glicose também não sofreu efeito do uso de óleos essenciais, porém reduziu drasticamente na última semana de aleitamento para ambos os grupos. A menor concentração de glicose no plasma no período de desaleitamento está associada ao aumento da ingestão de alimentos sólidos, principalmente concentrado, refletindo uma mudança no precursor energético de glicose para ácidos graxos voláteis provenientes da fermentação ruminal (Khan et al., 2008). Por esse mesmo motivo, o indicador de desenvolvimento ruminal beta-hidroxibutirato apresenta comportamento contrário com significativo aumento próximo ao desaleitamento.

### 4.4.3. Saúde

De forma geral, os aditivos fitogênicos possuem efeitos benéficos promissores ao reduzir microorganismos patogênicos intestinais que são responsáveis pela diarreia em bezerros, e promover a melhora da resposta imune e, assim, melhorar a saúde geral, o desempenho e o estado metabólico

do bezerro (Katsoulos et al., 2017; Stefanska et al., 2021), além de redução do uso de antibióticos durante o período de aleitamento (Soltan, 2009).

No presente estudo, a diarreia não foi um desafio importante, mas sim a tristeza parasitária bovina e a broncopneumonia. Por esse motivo, os parâmetros relacionados a diarreia não sofreram efeito da suplementação com *blend* de óleos essenciais, apenas o escore fecal apresentou efeito de idade, já que os bezerros tendem a ser mais susceptíveis nas primeiras semanas de vida (Aghakeshimiri et al., 2017). Contudo, houve diferença na saúde geral quando são considerados os parâmetros relacionados ao escore de saúde. O escore utilizado nesse estudo, desenvolvido por McGuirk (2008), é específico para trato respiratório, e a autora considera positivo para broncopneumonia o bezerro que recebe escore ≥ 4.

Os bezerros SLOE apresentaram menor escore de saúde, menos dias com escore ≥ 4, além de tendência a ter menos dias com tosse e menor necessidade de intervenção medicamentosa. Bampidis et al. (2006) relatou que o uso de extrato de orégano pode ser tão eficaz quanto a neomicina (aditivo antibiótico) na prevenção de doenças em bezerros. Os OE tendem a limitar a oportunidade de populações bacterianas desenvolverem resistência espontânea, tornando-os importantes candidatos para suplementação alimentar visando prevenção de doenças (Yap et al., 2014). Froehlich et al. (2017) relataram que a suplementação com OEs resultou em maior GMD e peso corporal, além do aumento da imunidade através do aumento da produção de imunoglobulinas.

A pneumonia geralmente está associada à fase pós-desaleitamento. No entanto, pode afetar bezerros mais jovens. Os problemas respiratórios são causados por uma combinação de fatores relacionados ao estado de imunidade, nutrição, tipo de alojamento e estação do ano, e geram prejuízo importante com medicamentos, cronicidade e perda de desempenho (McGuirk, 2008). Segundo Furneri et al. (2012) e Perumal Samy et al. (2013) os OEs possuem compostos secundários bioativos com atividade antibacteriana capazes de reduzir a incidência de diarreia e infecções respiratórias em bezerros leiteiros. Além disso, Hill et al. (2007) observaram que bezerros alimentados com um *blend* comercial de OE tiveram melhor desempenho e crescimento no d 0-35 do experimento. E a principal via pela qual os OEs podem afetar o desempenho de bezerros em aleitamento será por seus efeitos antimicrobianos, antioxidantes e/ou anti-inflamatórios (Oh et al., 2017).

## 4.5. Conclusão

Pode-se concluir que embora o desempenho não tenha sido afetado, a saúde dos bezerros foi influenciada pela suplementação da dieta líquida com óleos essenciais. Os possíveis efeitos antimicrobianos, antioxidantes e anti-inflamatórios desses compostos fitogênicos, principalmente com

ação no trato respiratório, resultaram em melhora da saúde dos bezerros que receberam o *blend,* indicada pelo menor escore de saúde e menor gravidade do quadro clínico tendo em vista redução dos dias com escore de saúde sugestivo para pneumonia nos bezerros do tratamento SLOE.

Frente a isso, os óleos essenciais podem ser uma alternativa importante na prevenção de doenças respiratórias em bezerros neonatos, bem como, substituto relevante ao uso de aditivos antibióticos na alimentação desses animais, embora mais estudos precisem ser realizados.

## Referências

Abe, F., N. Ishibashi, and S. Shimamura. 1995. Effect of Administration of Bifidobacteria and Lactic Acid Bacteria to Newborn Calves and Piglets. J. Dairy Sci. 78:2838–2846.

AghakeshmirI, F. et al. 2017. Effects of neonatal diarrhea and other conditions on subsequent produc tive and reproductive performance of heifer calves. Vet. Res. Communic..41:107- 112.

Ahmed, A.A., N.I. Bassuony, S.E.S. Awad, A.M. Aiad, S.A. Mohamed. 2009. Adding natural juice of vegetables and fruitage to ruminant diets (B) nutrients utilization, microbial safety and immunity, effect of diets supplemented with lemon, onion and garlic juice fed to growing buffalo calves. World J. Agric. Sci. 5:456-465.

Albenberg, L.G., and G.D. Wu. 2014. Diet and the Intestinal Microbiome: Associations, Functions, and Implications for Health and Disease. Gastroenterology. 146:1564–1572.

Ardekani, M.S., M. Khanavi, P. Taheri, N. Samadi, E. Safaripour and F. Salimpour. 2010. The Essential Oil Composition of Ajuga chamaecistus Ging. subsp. tomentella Rech. f. J. Essent. Oil-Bear. Plants. 13:45-51.

Bach, J.J and I.R. Villalba. 2012. Ipharraguerre Interactions between mild nutrient imbalance and taste preferences in young ruminants J. Anim. Sci., 90:1015-1025.

Bampidis, V.A., V. Christodoulou, P. Florou-Paneri and E. Christaki. 2006. Effect of dried oregano leaves versus neomycin in treating newborn calves with colibacillosis. J. Vet. Med. 53: 154-156.

Benchaar, C., S. Calsamiglia, A.V. Chaves, G.R. Fraser, D. Colombatto and T.A. McAllister. 2008. A review of plant-derived essential oils in ruminant nutrition and production. Anim Feed Sci Technol. 145:209–228.

Cakir A. 2004. Composição do óleo essencial e ácidos graxos dos frutos de Hippophae rhamnoides L. (Sea Buckthorn) e Myrtus communis L. da Turquia. Biochem. Syst. Eco. 32: 809–816.

Calsamiglia, S., M. Busquet, P.W. Cardozo, L. Castillejos, A. Ferret. 2007. Invited Review: Essential Oils as Modifiers of Rumen Microbial Fermentation. J. Dairy Sci. 90: 2580–2595.

Campolina, J.P., S.G. Coelho, A.L. Belli, F. Samarini Machado, L.G. Pereira, Tomich, T.R. M.M. Campos. 2021. Effects of a blend of essential oils in milk replacer on performance, rumen fermentation, blood parameters, and health scores of dairy heifers. PloS one. 16:e0231068.

Carrubba, A., L. Abbate, M. Sarno, F. Sunseri, A. Mauceri, A. Lupini, and F. Mercati. 2020. Characterization of Sicilian rosemary (Rosmarinus officinalis L.) germplasm through a multidisciplinary approach. Planta, 251:1-15.

Chase, C.C., D.J. Hurley and A.J. Reber. 2008. Neonatal immune development in the calf and its impact on vaccine response. Vet. Clin. N. Am. Food Anim. Pract. 24:87-104.

Cobellis, G., M. Trabalza-Marinucci and Z. Yu. 2016. Critical evaluation of essential oils as rumen modifiers in ruminant nutrition: A review. Sci Total Environ. 545–546:556–568.

Coelho, M.G., G.F. Virgínio Júnior, C.R. Tomaluski, A.F. de Toledo, M.E. Reis, S.C. Dondé, C.M.M. Bittar. 2022. Comparative study of different liquid diets for dairy calves and the impact on performance and the bacterial community during diarrhea. Sci. Rep. 12:1-13.

Constable, P.D.; A.F. Ahmed and N.A. Misk. 2005. Effect of suckling cow's milk or milk replacer on abomasal luminal pH in dairy calves. J. Vet. Intern. Med. 19:97–102.

Drackley, J.K. 2008. Calf nutrition from birth to breeding. Vet. Clin. N. Am. Food Anim. Pract. 24:55-86.

Fathi M.H., A. Riasi and A. Allahresani. 2009. The effect of vanilla flavoured calf starter on performance of Holstein calves. J. Anim. Feed Sci., 18:412-419.

Froehlich, K.A., K.W. Abdelsalam, C. Chase, J. Koppien-Fox, and D.P. Casper. 2017. Evaluation of essential oils and prebiotics for newborn dairy calves. J. Anim. Sci. 95:3772-3782.

Furneri, P.M., L. Mondello, G. Mandalari, D. Paolino, P. Dugo, A. Garozzo and G. Bisignano. 2012. In vitro antimycoplasmal activity of Citrus bergamia essential oil and its major components. Eur. J. Med. Chem. 52:66-69.

Gelsinger, S.L., A.J. Heinrichs and C.M. Jones. 2016. A meta-analysis of the effects of preweaned calf nutrition and growth on first-lactation performance. J. Dairy Sci. 99:6206-6214.

Giannenas, I., J. Skoufos, C. Giannakopoulos, M. Wiemann, O. Gortzi, S. Lalas and I. Kyriazakis. 2011. Effects of essential oils on milk production, milk composition, and rumen microbiota in Chios dairy ewes. J. Dairy Sci. 945569-5577.

Ginane, R.B. and A. Favreau-Peigné. 2011. Perception and hedonic value of basic tastes in domestic ruminants. Physiol. Behav., 104:666-674.

Godden, S. 2008. Colostrum Management for Dairy Calves. Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract. 24:19–39.

Godden, S.M., J.E. Lombard and A.R. Woolums. 2019. Colostrum Management for Dairy Calves. Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract. 35:535–556.

Górka, P.; Z.M. Kowalski, P. Pietrzak, A. Kotunia, W. Jagusiak, R. Zabielski. 2011. Is rumen development in newborn calves affected by different liquid feeds and small intestine development? J. Dairy Sci. 94:3002–3013.

Greathead, H. 2003. Plants and plant extracts for improving animal productivity. Proc. Nutr. Soc. 62:279-290.

Heinrichs, A.J. and B.S. Heinrichs. 2011. A prospective study of calf factors affecting first-lactation and lifetime milk production and age of cows when removed from the herd. J. Dairy Sci. 94:336-341.

Hill, T.M., H.G. Bateman II, J.M. Aldrich and R.L. Schlotterbeck. 2007. Effects of the feeding rate of high protein calf milk replacers. Prof. Anim. Sci. 23:649-655.

Hosoda, K., K. Kuramoto, B. Eruden, T. Nishida and S. Shioya. 2006. The effects of three herbs as feed supplements on blood metabolites, hormones, antioxidant activity, IgG concentration, and ruminal fermentation in Holstein steers. Asian. Australas. J. Anim. Sci. 19:35-41.

Jahani-Azizabadi, H., H. Baraz, N. Bagheri and M.H. Ghaffari. 2022. Effects of a mixture of phytobiotic-rich herbal extracts on growth performance, blood metabolites, rumen fermentation, and bacterial population of dairy calves. J. Dairy Sc. 105:5062-5073.

Jeshari, M., A. Riasi, A.H. Mahdavi, M. Khorvash and F. Ahmadi. 2016. Effect of essential oils and distillation residues blends on growth performance and blood metabolites of Holstein calves weaned gradually or abruptly. Lives. Sci. 185:117-122.

Jouany, J.P. and D.P. Morgavi. 2007. Use of 'natural'products as alternatives to antibiotic feed additives in ruminant production. Animal. 10:1443-1466.

Katsoulos P.D., M.A. Karatzia, C.I. Dovas, G. Filioussis, E. Papadopoulos, E. Kiossis. 2017. Evaluation of the infield efficacy of oregano essential oil administration on the control of neonatal diarrhea syndrome in calves. Res. Vet. Sci. 115:478-483.

Kazemi-Bonchenari M., R. Falahati, M. Poorhamdollah, S.R. Heidari, A. Pezeshki. 2018. Essential oils improved weight gain, growth and feed efficiency of young dairy calves fed 18 or 20% crude protein starter diets. J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. 102:652-661.

Khan, M.A., D.M. Weary and M.A.G. Von Keyserlingk. 2011. Hay intake improves performance and rumen development of calves fed higher quantities of milk. J. Dairy Sci. 94:3547-3553.

Khan, M.A., H.J. Lee, W.S. Lee, H.S. Kim, S.B. Kim, S.B. Park and Y.J. Choi. 2008. Starch source evaluation in calf starter: II. Ruminal parameters, rumen development, nutrient digestibilities, and nitrogen utilization in Holstein calves. J. Dairy Sci. 91:1140-1149.

Kolling, G.J., D.J. Panazzolo, A.M. Gabbi, M.T. Stumpf, dos Passos, B. M, da Cruz, A. E, V. Fischer. 2016. Oregano extract added into the diet of dairy heifers changes feeding behavior and concentrate intake. Sci. World J.

Larson, L.L., F.G. Owen, J.L. Albright, R.D. Appleman, R.C. Lamb and L.D. Muller. 1977. Guidelines toward more uniformity in measuring and reporting calf experimental data. J. Dairy Sci. 60:989-991

Li, L., J. Qu, X. Xin, S. Yin and Y. Qu. 2019. Comparison of Reconstituted, Acidified Reconstituted Milk or Acidified Fresh Milk on Growth Performance, Diarrhea Rate, and Hematological Parameters in Preweaning Dairy Calves. Animals 9:778.

Liu T, Chen H, Bai Y, Wu J, Cheng S, He B, et al. Calf starter containing a blend of essential oils and prebiotics affects the growth performance of Holstein calves. J Dairy Sci 2020; 103(3): 2315-2323.

McGuirk, S.M. 2008. Disease management of dairy calves and heifers. Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract. 24:139-153.

Mertens, D.R. 1997. Creating a system for meeting the fiber requirements of dairy cows. J. Dairy Sci. 80:1463-1481.

Montoro, I.I. and A. Bach. 2011. Effect of flavoring a starter in a same manner as a milk replacer on intake and performance of calves. Anim. Feed Sci. Technol., 164:130-134.

Oh, S.Y., W. Yun, J.H. Lee, C.H. Lee, W.K. Kwak, and J.H. Cho. 2017. Effects of essential oil (blended and single essential oils) on anti-biofilm formation of Salmonella and Escherichia coli. J. Anim. Sci. Techn. 59:1-5.

Ohtsuka, H. et al. 2006. Effect of Nutritional Conditions on Changes in Leukocyte Populations in Japanese Black Calves. J. Vet. Med. Sci. 67:183–185.

Perumal Samy, R., J. Manikandan and M. Al Qahtani. 2013. Evaluation of aromatic plants and compounds used to fight multidrug resistant infections. Evid. Based Complementary Altern. Med.

Salazar, L.F., L.A. Nero, M.E. Campos-Galvão, C.S. Cortinhas, T.S. Acedo, L.F. Tamassia and M.I. Marcondes. 2019. Effect of selected feed additives to improve growth and health of dairy calves. PloS one. 14:e0216066.

Santos, F.H.R., M.R. De Paula, D. Lezier, J.T. Silva, G. Santos and C.M.M. Bittar .2015. Essential oils for dairy calves: effects on performance, scours, rumen fermentation and intestinal fauna. Animal, 9:958-965.

Smith, R.H. and J.W. Sissons. 1975. The effect of different feeds, including those containing soya-bean products, on the passage of digesta from the abomasum of the preruminant calf. Br. J. Nutr. 33:329–349.

Sneeringer, S., J. MacDonald, N. Key, W. McBride and K. Mathews. 2015. Economics of Antibiotic Use in U.S. Livestock Production, ERR-200, U.S. Washington, DC: United States Department of Agriculture, Economic Research Service.

Soltan, M.A. 2009. Effect of essential oils supplementation on growth performance, nutrient digestibility, health condition of Holstein male calves during pre-and post-weaning periods. Pakist. J. Nutri. 8:642-652.

Stefańska, B., J. Sroka, F. Katzer, P. Goliński and W. Nowak. 2021. The effect of probiotics, phytobiotics and their combination as feed additives in the diet of dairy calves on performance, rumen fermentation and blood metabolites during the preweaning period. Anim. Feed Sci. Technol. 272:114738.

Stevanović Z., J. Bošnjak-Neumüller, I. Pajić-Lijaković, J. Raj, M. Vasiljević. 2018. Essential Oils as Feed Additives—Future Perspectives. Molecules. 23:1717.

Suarez-Mena, F.X., A.J. Heinrichs, C.M. Jones, T.M. Hill, J.D. Quigley. 2015. Digestive development in neonatal dairy calves with either whole or ground oats in the calf starter. J Dairy Sci. 98:3417–3431.

Swedzinski C., K.A. Froehlich, K.W. Abdelsalam, C. Chase, T.J. Greenfield, J. Koppien-Fox, D.P. Casper. 2020. Evaluation of essential oils and a prebiotic for newborn dairy calves. Transl. An. Sci. 4:75–83.

Tomaluski, C.R., M.G. Coelho, A.F. de Toledo, G.F.V Júnior, A.P. da Silva, S.C. Dondé and Bittar and C.M.M. Bittar. 2022. Passive transfer, health, performance, and metabolism of calves fed different sources of colostrum. Liv. Sci. 258:104868.

Van Soest, P.J., J.B. Robertson and B.A. Lewis. 1991. Methods for Dietary Fiber, Neutral Detergent Fiber, and Nonstarch Polysaccharides in Relation to Animal Nutrition. J. Dairy Sci. 74:3583–3597

Villarroel, A., T.B. Miller, E.D. Johnson, K.R. Noyes and J.K. Ward. 2013. Factors affecting serum total protein and immunoglobulin G concentration in replacement dairy calves. Advan. Dairy Res.

Webster, J. 1986. Calf husbandry: Health and welfare. Reprinted by Collins Professional and Technical Books. 202.

Yap, P.S.X., B.C. Yiap, H.C. Ping and S.H.E. Lim. 2014. Essential oils, a new horizon in combating bacterial antibiotic resistance. Open Microbiol. J. 8:6.

Zhang, R., W. Zhang, Y.I. Bi, Y. Tu, Y. Beckers, H.C. Du, Q.Y. Diao. 2019. Early Feeding Regime of Waste Milk, Milk, and Milk Replacer for Calves Has Different Effects on Rumen Fermentation and the Bacterial Community. Animals. 9:443.

## 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Bezerros neonatos são altamente suscetíveis a doenças de caráter infeccioso, principalmente à diarreia neonatal e broncopneumonias. As perdas relacionadas à essas enfermidades incluem custo com medicamentos, diminuição de desempenho, aumento da idade ao primeiro parto e diminuição de produtividade futura. Embora essas doenças sejam multifatoriais, existem estratégias preventivas que podem reduzir suas incidências, como a melhoria da qualidade microbiológica da dieta líquida fornecida e a utilização de aditivos fitogênicos com ação antimicrobiana.

Ambas estratégias utilizadas neste estudo demonstraram haver vantagens em sua utilização. A acidificação pode induzir o crescimento de bactérias benéficas durante episódios de diarreia e pode ser uma alternativa considerável a depender da possibilidade de refrigeração da dieta e do sistema de aleitamento utilizado. O uso de extratos secundários de plantas foi positivo na melhoria do status de saúde dos bezerros.

# APÊNDICES

**APÊNDICE A.** Sistema de escore padronizado pela Universidade de Wisconsin (CHSC). Adaptado de MCGUIRK, 2008

SCHOOL OF VETERINARY MEDICINE
University of Wisconsin-Madison

| Calf Health Scoring Criteria | | | |
|---|---|---|---|
| 0 | 1 | 2 | 3 |
| Temperatura Retal | | | |
| 37 – 38,2 | 38,3 - 38,8 | 38,9 – 39,3 | ≥ 39,4 |
| Tosse | | | |
| Ausente | Indução única | Induções múltiplas (poucas espontâneas ou ocasionais) | Induções Multiplas |
| Secreção Nasal | | | |
| Ausente | Unilateral, seromucosa | Bilateral mucopurulenta | Bilateral e purulenta |

| Secreção Ocular | | | |
|---|---|---|---|
| Ausente | Pouca | Moderada | Intensa |

| Posição de orelha e cabeça | | | |
|---|---|---|---|
| Normal | Agitação da cabeça e orelha | Ligeira inclinação | Head tilt ou queda bilateral |