UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CAMPUS DE BOTUCATU

EFEITO DE UM ADITIVO MULTICOMPONENTE NO COMPORTAMENTO, CRESCIMENTO E MICROBIOTA DE BEZERROS LEITEIROS CRIADOS EM GRUPO A BASE DE PASTO

MIRELA BONDEZAN DE ALMEIDA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Zootecnia como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Zootecnia

Botucatu - SP
Março/2026

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CAMPUS DE BOTUCATU

EFEITO DE UM ADITIVO MULTICOMPONENTE NO COMPORTAMENTO, CRESCIMENTO E MICROBIOTA DE BEZERROS LEITEIROS CRIADOS EM GRUPO A BASE DE PASTO

MIRELA BONDEZAN DE ALMEIDA

Orientador: Prof. Dr. Matheus Deniz

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Zootecnia como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Zootecnia

Botucatu - SP
Março/2026

Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que seja citada a fonte.

A447e

Almeida, Mirela Bondezan de

Efeito de um aditivo multicomponente no comportamento, crescimento e microbiota de bezerros leiteiros criados em grupo a base de pasto / Mirela Bondezan de Almeida. -- Botucatu, 2026

70 p. : 2 v.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu

Orientador: Matheus Deniz

1. Zootecnia. 2. Produção animal. 3. Animais comportamento. 4. Ecologia microbiana. 5. Bezerros. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Dados fornecidos pelo autor(a).

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Botucatu

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: EFEITO DE UM ADITIVO MULTICOMPONENTE NO COMPORTAMENTO, CRESCIMENTO E MICROBIOTA DE BEZERROS LEITEIROS CRIADOS EM GRUPO A BASE DE PASTO

AUTORA: MIRELA BONDEZAN DE ALMEIDA
ORIENTADOR: MATHEUS DENIZ

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em Mestre em Zootecnia, área: Nutrição e Produção Animal pela Comissão Examinadora:

Prof.Ass.Dr. MATHEUS DENIZ (Participaçao Presencial)
Departamento de Produção Animal e Medicina Veterinária Preventiva / UNESP / Câmpus de Botucatu - FMVZ

Doutor LEONARDO NAZARIO DE MORAES (Participaçao Presencial)
Laboratório Central Multiusuários-Lacem / Faculdade de Ciências Agronômicas, UNESP, Câmpus de Botucatu

Prof. Assoc. RAFAEL SILVIO BONILHA PINHEIRO (Participaçao Presencial)
Departamento de Produção Animal e Medicina Veterinária Preventiva / UNESP / Câmpus de Botucatu - FMVZ

Botucatu, 12 de março de 2026.

gov.br Documento assinado digitalmente
CLAUDIA CRISTINA MORECI
Data: 30/03/2026 14:09:44-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

BIOGRAFIA DO AUTOR

Mirela Bondezan de Almeida, nascida em 18 de fevereiro de 2001, na cidade de Santo André/SP, filha de Iracides Aparecida Bondezan Almeida e Denis Marcelo de Almeida, ingressou no curso de Zootecnia na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia na Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho" campus de Botucatu, em fevereiro de 2019, e concluiu a graduação em janeiro de 2024. Durante a graduação, realizou iniciação científica no Centro de Biotecnologia Aplicada à Reprodução de Ovinos e Caprinos, do Departamento de Cirurgia Veterinária e Reprodução Animal da FMVZ-UNESP Botucatu. Em março de 2024, iniciou o curso de Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia na Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho" campus de Botucatu, onde foi bolsista pela Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior. Atua na área de Produção Animal, desenvolvendo pesquisas em comportamento, fisiologia e bem-estar animal, com ênfase em bovinocultura leiteira, utilizando abordagem etológica, indicadores de bem-estar, manejo racional e análise de dados experimentais.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, que me deu força nessa jornada e sempre esteve comigo, me iluminando, amparando e me guiando.

Gostaria de agradecer a minha família, meus pais Iracides e Denis que sempre caminharam no sol para que eu pudesse crescer pela sombra. Ao meu irmão, Gabriel, que sempre me apoiou e esteve ao meu lado durante todo esse processo, sem vocês nada disso seria possível.

A Breno Scherrer, pelo apoio constante, pela compreensão e pelo incentivo ao longo de toda essa jornada, sendo fundamental para a realização deste trabalho.

Agradeço a todos meus amigos, que me ajudaram direta e indiretamente nessa jornada, que me ancoraram durante toda a pós-graduação, me ensinando, apoiando e inspirando, sempre dispostos a estarem do meu lado.

Gratifico aqui minha instituição, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" por proporcionar todo ambiente de estudo, professores essenciais e dedicados. Em especial ao meu professor e orientador Prof. Matheus Deniz, por todos os ensinamentos, ajudas, conversas e companheirismo. Sem esquecer de todos os funcionários, administradores, diretores e coordenadores.

Agradeço à Dra. Teresa Cristina Alves pelo apoio, orientação e valiosa contribuição ao longo de todo o desenvolvimento deste trabalho. Estendo meus agradecimentos à Embrapa Pecuária Sudeste e todos lá presente por serem apoio e casa durante tanto tempo.

Agradeço ao Prof. Dr. Caio Cesar Figueiredo, Dr. Leonardo Nazário e Hussnain Rashid, pelo apoio técnico e pela valiosa colaboração nas análises do projeto, fundamentais para a condução e a qualidade deste trabalho.

Agradeço aos colegas Agatha Kubo, Jaqueline Bruno, Luidy Quispe e Letícia Cássia pelo companheirismo, apoio e colaboração durante todas as etapas do experimento, tornando essa trajetória mais leve e significativa.

Agradeço ao meu amigo e fonte de inspiração Thiago Guzella, que, mesmo não estando presente para ver a conclusão deste projeto, foi fundamental em minha trajetória pessoal e acadêmica. Foi por meio de seu incentivo, generosidade e ensinamentos que encontrei minha paixão pela bovinocultura leiteira.

E por último, mas não menos importante, gostaria de agradecer a República Xavaska's House, a qual me acolheu durante minha estadia em Botucatu-SP, obrigada pelo apoio e companheirismo.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

RESUMO GERAL

A fase inicial de vida das bezerras leiteiras é determinante para o desenvolvimento do trato gastrointestinal, microbioma intestinal e comportamento com potenciais impactos no desempenho futuro, especialmente em sistemas tropicais a base de pasto. Assim, o presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos do fornecimento precoce de um aditivo alimentar multicomponente sobre o microbioma, comportamento e crescimento de bezerras leiteiras criadas em grupo em sistema a base de pasto. Participaram deste estudo dezesseis bezerras da raça Kiwi-Cross, acompanhadas desde o nascimento até 12 semanas de idade, distribuídas em dois grupos. O grupo tratamento (n=8) consistiu em bezerras que receberam diariamente via oral um aditivo (3g/animal/dia) composto por probióticos, prebióticos, minerais orgânicos, ácidos graxos essenciais e aminoácidos, enquanto no grupo controle (n=8), as bezerras receberam um placebo (3g/animal/dia). As bezerras foram mantidas em piquetes sob pastejo rotativo. A composição do microbioma fecal foi avaliada por meio do sequenciamento da região V4 do gene 16S rRNA, com coletas realizadas em cinco momentos (24 horas, 15, 30, 60 e 66 dias de vida). As análises contemplaram métricas de diversidade alfa e beta. Paralelamente, foram registrados dados de desempenho zootécnico, ocorrência de enfermidades e parâmetros comportamentais, incluindo tempo de pastejo, ruminação, ócio e posição corporal. Os resultados indicaram que o fornecimento do aditivo não promoveu alterações na estrutura global do microbioma e sim a idade foi o principal fator determinante da estrutura e da diversidade do microbioma intestinal, evidenciando uma sucessão microbiana progressiva ao longo do desenvolvimento das bezerras. A diversidade alfa aumentou com o avanço da idade, enquanto a diversidade beta demonstrou clara separação das comunidades microbianas entre os diferentes momentos de coleta. A avaliação comportamental demonstrou aumento gradual dos comportamentos de pastejo e ruminação com o avanço da idade, refletindo o amadurecimento funcional do rúmen. De forma integrada, os resultados consolidam a fase neonatal como uma janela crítica para a saúde intestinal e evidenciam a supremacia do sistema de criação coletiva na modulação do desenvolvimento dos animais, sobrepondo-se aos efeitos do aditivo alimentar. Assim, a intervenção nutricional assume papel secundário frente aos processos ecológicos naturais de sucessão e maturação do microbioma, ressaltando a importância de abordagens multidisciplinares em sistemas tropicais.

Palavras-chave: microbiota; comportamento; pastejo; ruminação; nutrição funcional.

ABSTRACT

The early life stage of dairy calves is critical for the development of the gastrointestinal tract, intestinal microbiome, and behavior, with potential long-term impacts on animal performance, particularly in tropical pasture-based systems that remain underexplored. Therefore, this study aimed to evaluate the effects of early supplementation with a multicomponent feed additive on the microbiome, behavior, and growth of group-housed dairy calves raised on pasture. Sixteen Kiwi-Cross calves were monitored from birth to 12 weeks of age and randomly assigned to two groups. The treatment group (n = 8) received a daily oral dose of a multicomponent additive (3 g/calf/day) containing probiotics, prebiotics, organic minerals, essential fatty acids, and amino acids, whereas the control group (n = 8) received a placebo at the same dosage. Calves were maintained under rotational grazing in paddocks. Fecal microbiome composition was assessed by sequencing the V4 region of the 16S rRNA gene, with samples collected at five time points (24 h, and 15, 30, 60, and 66 days of age). Microbial analyses included alpha and beta diversity metrics. Additionally, zootechnical performance, health status, and behavioral parameters were recorded, including grazing, rumination, idleness, and body posture. The results showed that the feed additive did not significantly affect the overall microbiome structure. Instead, age was the primary driver of microbiome composition and diversity, indicating a progressive microbial succession throughout calf development. Alpha diversity increased with age, while beta diversity revealed a clear temporal separation of microbial communities. Behavioral observations indicated a gradual increase in grazing and rumination activities over time, reflecting rumen functional maturation. Collectively, these findings identify the neonatal phase as a critical window for intestinal development and highlight the predominant role of group-rearing systems in shaping calf development, surpassing the effects of dietary supplementation. Thus, nutritional interventions appear to play a secondary role relative to natural ecological processes governing microbiome succession and maturation, reinforcing the need for multidisciplinary approaches in tropical production systems.

Keywords: microbiota; behavior; grazing; rumination; functional nutrition.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Representação esquemática do desmame gradual em 6 dias 27
Figura 2. Dinâmica temporal da diversidade alfa do microbioma intestinal de bezerras leiteiras. (A) Evolução da riqueza microbiana estimada pelo índice de Chao1 ao longo dos dias de coleta (24H, D15, D30, D60 e D66); (B) Evolução do índice de diversidade de Shannon ao longo do mesmo período experimental. (B) Evolução do índice de diversidade de Shannon ao longo do mesmo período experimental. 42
Figura 3. Avaliação da dominância na comunidade microbiana através do índice de Simpson. 43
Figura 4. Comparação entre diferentes momentos da abundância relativa durante o período experimental. (A) Gêneros bacterianos diferencialmente abundantes entre as 24 horas de vida e o dia 60; (B) Comparação da abundância relativa de gêneros entre o pós-parto imediato (24H) e o final do período experimental (D66). 44
Figura 6. Biomarcadores microbianos identificados na comparação entre os dias 30 e 60. 46
Figura 7. Variação da abundância de gêneros em comparação ao final do experimento D66 47
Figura 8. Gráfico PCoA por tratamento e dia de coleta. 48
Figura 9. Gráfico PCoA por dia de coleta. 50
Figura 10. Resumo global das associações significativas identificadas pelo modelo linear multivariado (MaAsLin3). 52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Definição dos comportamentos avaliado..... 27
Tabela 2. Representação e descrição dos períodos de coleta das amostras de fezes. 29
Tabela 3. Estimativas posteriores dos modelos de regressão misto com família Poisson para avaliar a influência do aditivo, semana e interação (aditivo*semana) nos comportamentos de pastejo e ruminação de bezerros leiteiros (n=16) criados em grupo e a base de pasto durante o pré-desmame. 33
Tabela 4. Estimativas posteriores de modelos de regressão misto com família Poisson da influência do aditivo, semana e interação (aditivo*semana) nos comportamentos em posição deitada de bezerros leiteiros (n=16) criados em grupo e a base de pasto durante o pré-desmame. 34
Tabela 5. Valores médios ± desvio padrão dos parâmetros de crescimento [peso (kg), ganho médio diário (GMD/kg/dia) e perímetro torácico (PT, cm)] dos grupos controle e tratado durante o período do experimental. 36
Tabela 6. Frequência (número de eventos) de ingestão de leite, água e concentrado por bezerros dos grupos controle e tratado. 38
Tabela 7. Incidência de condições clínicas e percentual de animais acometidos ao longo do experimento. 39
Tabela 8. Cronologia da diarreia e intensidade do manejo terapêutico individual. 40
Tabela 9. Resultados da análise de variância multivariada permutacional (PERMANOVA) baseada na distância de Bray-Curtis para a composição do microbioma intestinal de bezerros. 48
Tabela 10. Caracterização dos animais quanto ao grupo experimental, datas de coleta e status de exposição a antibióticos ao longo do período experimental. 54

LISTA DE ABREVIAÇÕES

Sigla	Descrição
µL	Microlitro
AACG	Ácidos Graxos De Cadeia Curta
ANOVA	Análise de Variância
APC	Antibióticos Promotores De Crescimento
CH4	Metano
CN	Controle Negativo
CO_2	Dioxido de carbono
CONT	Controle
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
FOS	Frutooligossacarídeos
GMD	Ganho Médio Diário
H_2	Gás Hidrogênio
HS	High sensitivity
IATF	Inseminação Artificial Em Tempo Fixo
IM	Intra muscular
mL	Mililitros
MOS	Mananoligossacarídeos
NAD+	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo
NGS	Next Generation Sequencing (Sequenciamento de Nova Geração)
PB	Proteina Bruta
PCoA	Principal Coordinates Analysis (Análise de Coordenadas Principais)
PCR	Reação Em Cadeia Da Polimerase
PERMANOVA	Permutational Multivariate Analysis of Variance
QC	Controle de qualidade
QIIME2	Quantitative Insights Into Microbial Ecology 2
RDP	Ribosomal Database Project
RPM	Rotação Por Minuto
rRNA	RNA ribossomal
TGI	Trato Gastrointestinal
TRAT	Tratamento

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 13
Considerações iniciais 14
1. REVISÃO DE LITERATURA 15
1.1 Importância da fase inicial e impacto das intervenções precoces na pecuária leiteira 15
1.2 Desenvolvimento do trato gastrointestinal de bezerras 17
1.3 Colonização microbiana e papel da microbiota intestinal 18
1.4 Relação entre microbiota ruminal, intestinal e fecal e o delay de resposta microbiana 18
1.5 Estratégias nutricionais e uso de aditivos em bezerras 19
1.6 Bem-estar e comportamento animal na fase inicial 20
2. OBJETIVOS 21
2.1 Objetivo geral 21
2.2 Objetivos Específicos 21
CAPÍTULO 2 23
1. INTRODUÇÃO 24
2. MATERIAL E MÉTODOS 24
2.1 Localização e padrão climático 24
2.2 Área experimental 25
2.3 Animais e tratamentos 25
2.4 Manejo e dieta 26
2.5 Medições 27
2.6 Comportamento 27
2.7 Crescimento 28
2.8 Sanidade 28
2.9 Coleta de fezes 28
3. Análises e processamento de dados do microbioma fecal 29
3.1 Descongelamento das amostras 29
3.2 Extração de DNA 29
3.3 Preparação das bibliotecas 30
4. Análises e processamento de dados do microbioma 31
4.1 Análise Bioinformática 31
4.2 Análises estatísticas do microbioma 32
5. Análise e processamento de dados da avaliação de comportamento e crescimento 32
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO 33
3.1 Comportamento 33
3.2 Crescimento 36
3.3 Ingestão 38
3.4 Sanidade 39
3.5 Microbioma fecal 41
3.5.1 Efeito do antibiótico na coleta de fezes 53

4. CONCLUSÕES 55
Referências 56
IMPLICAÇÕES 66
MATERIAL SUPLEMENTAR 67
Niveis de garantia aditivo multicomponente 67
Matriz núcleo comercial da ração + farelo de soja 67
Certificado CEUA EMBRAPA 68

CAPÍTULO 1

Considerações iniciais

Apesar dos avanços no entendimento da fisiologia, nutrição e microbiota de bezerras leiteiras, persistem lacunas importantes na literatura científica, especialmente no que se refere à integração entre estratégias nutricionais precoces, comportamento alimentar, microbiota e desempenho em sistemas tropicais. A maior parte dos estudos disponíveis foi conduzida em países de clima temperado, em sistemas intensivos de confinamento, com dietas líquidas e sólidas altamente controladas (Khan et al., 2016; Malmuthuge; Guan, 2017; Bach, 2012). Embora esses dados tenham contribuído para o entendimento dos mecanismos fisiológicos, sua extrapolação direta para sistemas a base de pasto requer cautela, dada a diversidade de condições climáticas, tipos de forragem, práticas de manejo e desafios sanitários existentes.

Nos sistemas tropicais, as bezerras têm acesso precoce à pastagem e estão sujeitas a variações térmicas, desafios sanitários ambientais mais intensos e oferta de alimentos sólidos menos padronizada em comparação aos sistemas confinados. Estes fatores afetam diretamente a dinâmica de colonização microbiana, início do pastejo e ruminação, além do desempenho durante a fase de aleitamento (Xiao et al., 2023). Embora existam estudos sobre comportamento ingestivo e ganho de peso de bezerros em condições tropicais (Zanine et al., 2006; Donadio et al., 2025; Alves et al., 2024), estudos que integrem de forma simultânea parâmetros microbiológicos, comportamentais e zootécnicos em bezerras criadas em grupo e a base de pasto ainda são escassos. Esta ausência limita a compreensão dos mecanismos de modulação microbiana em sistemas a base de pasto.

Estratégias nutricionais que favorecem o desenvolvimento precoce do rúmen e a modulação positiva da microbiota intestinal têm se mostrado promissoras. Nesse contexto, o uso de aditivos multifuncionais como compostos que combinam probióticos, prebióticos, minerais orgânicos e outros ingredientes bioativos, tem surgido como alternativa promissora à substituição de antibióticos promotores de crescimento (Chaucheyras-durand; Durand, 2010). A substituição de antibióticos promotores de crescimento por aditivos naturais é uma tendência consolidada, exigindo alternativas eficazes e adaptadas às condições nacionais (MAPA, 2022; Patra Yu, 2012).

A microbiota intestinal das bezerras passa por um processo dinâmico de sucessão ecológica desde o nascimento até a desmama, sendo influenciada por fatores como dieta, ambiente e uso de aditivos (Dos Santos et al., 2016; Malmuthuge et al., 2015). Porém, intervenções precoces podem alterar a trajetória de colonização microbiana. Assim, uma lacuna relevante do conhecimento se concentra no momento ideal de iniciar o fornecimento

do aditivo aos animais, assim como os efeitos duradouros da suplementação com aditivos funcionais na fase inicial de vida.

A literatura indica que intervenções nutricionais precoces, aplicadas nos primeiros dias de vida têm potencial de modular a microbiota intestinal de forma mais profunda e persistente (Malmuthuge; Guan, 2017). Contudo, poucos estudos avaliaram esses efeitos em bezerras mantidas em ambientes tropicais, com alimentação baseada em leite, concentrado e pastagem (natural ou cultivada), o que representa a realidade da maioria das propriedades leiteiras brasileiras. Além disso, a maioria das pesquisas foca em indicadores imediatos, como ocorrência de diarreia, consumo de concentrado e ganho de peso pré-desmame, havendo uma carência de dados sobre parâmetros intermediários, como microbiota, comportamento alimentar, início da ruminação e desempenho até o desaleitamento.

A problemática central que motivou este estudo parte do pressuposto de que o início da vida representa uma janela crítica de oportunidades para intervenções nutricionais com impacto duradouro. Embora aditivos sejam amplamente utilizados para animais em fase adulta, pouco se sabe sobre seus efeitos quando administrados desde as primeiras horas para animais em sistemas a pasto. Assim, nossa hipótese é que a modulação microbiana precoce, associada a oportunidade dos animais expressarem comportamentos naturais em um sistema de criação mais próximo do natural contribui na modulação da microbiota intestinal de bezerros leiteiros.

1. REVISÃO DE LITERATURA

1.1 Importância da fase inicial e impacto das intervenções precoces na pecuária leiteira

O Brasil ocupa atualmente a quarta posição no ranking mundial de produção de leite, com cerca de 35 bilhões de litros anuais, ficando atrás apenas da Índia, Estados Unidos e China (FAO, 2022). Em regiões com maior adoção tecnológica, como Sudeste e Sul, as médias diárias de produção ultrapassam 20 litros por vaca, enquanto em parte do Norte e Nordeste permanecem abaixo de 10 litros (Silva, 2023). Entre os fatores que explicam essa disparidade, destacam-se deficiências no manejo reprodutivo e, principalmente, falhas na criação de bezerras e novilhas; fases críticas que determinam o desempenho produtivo e reprodutivo futuro do rebanho.

O período inicial de vida, que se estende do nascimento ao desmame, é considerado uma janela crítica de desenvolvimento, na qual intervenções nutricionais, sanitárias e ambientais exercem efeitos duradouros sobre a fisiologia, microbiota e a produtividade dos animais (Malmuthuge; Guan, 2017; Meale et al., 2016). Esse conceito, conhecido como programação metabólica, propõe que estímulos precoces (positivos ou negativos) podem modificar

permanentemente a trajetória de crescimento, eficiência alimentar, resposta imune e até a produção na vida adulta (Ockenden et al., 2023; Khan et al., 2011).

A nutrição e o manejo inicial de bezerras exercem influência direta não apenas sobre o desempenho imediato, mas também sobre parâmetros produtivos a longo prazo, como idade ao primeiro parto, taxa de concepção e produção de leite nas primeiras lactações (Sobrinho et al., 2011; Heinrichs; Heinrichs, 2011). Evidências indicam que intervenções precoces favorecem o aumento do ganho de peso pré-desmame, sendo que animais com maior GMD (~100 g/dia) podem produzir até 850 kg adicionais de leite na primeira lactação (Bach, 2012). Esse desempenho está associado ao melhor desenvolvimento mamário, maior capacidade metabólica e preparo fisiológico para a vida adulta. Além disso, maiores pesos ao desmame e melhor escore corporal estão relacionados a maior taxa de concepção à primeira inseminação, maior longevidade produtiva e menor descarte precoce (Heinrichs;Heinrichs, 2011;Godden et al., 2019). Esses efeitos resultam da interação entre nutrição adequada, ambiente sanitário favorável, colostragem eficiente e estratégias que promovem o equilíbrio da microbiota intestinal.

A modulação da microbiota intestinal é um dos principais mecanismos por meio dos quais essa programação precoce se manifesta. A colonização microbiana nas primeiras semanas de vida influencia diretamente a maturação do sistema imune, a digestibilidade e a fermentação ruminal, com impactos sobre o crescimento e a saúde a longo prazo (Malmuthuge; Guan, 2017; Yáñez-Ruiz et al., 2015). Intervenções nutricionais e sanitárias que favorecem o estabelecimento de comunidades microbianas estáveis e benéficas resultam em maior eficiência alimentar e menor incidência de doenças entéricas, enquanto falhas no manejo colostral, na higiene ambiental ou na formulação dietética podem gerar disbiose persistente e comprometer o desempenho futuro (Dias et al., 2018). Outro aspecto decisivo é a velocidade de desenvolvimento ruminal e comportamental, especialmente no que se refere ao início da ruminação e do pastejo. Bezerras que desenvolvem precocemente a função ruminal tendem a apresentar transição alimentar mais eficiente, maior ingestão de matéria seca e melhor adaptação ao desmame (Teixeira et al., 2024). Isso reduz o estresse metabólico da fase de transição e otimiza o uso de energia para o crescimento. Por outro lado, atrasos nesse desenvolvimento prolongam a dependência do leite e elevam os custos de criação.

Apesar dos avanços, ainda persistem lacunas quanto à compreensão dos mecanismos de longo prazo que conectam microbiota, comportamento e desempenho produtivo. A maioria dos estudos se concentra nos efeitos imediatos, como ganho de peso e incidência de diarreia havendo necessidade de mais pesquisas que integrem parâmetros microbiológicos, fisiológicos,

comportamentais e produtivos sob condições tropicais e de pastejo (Malmuthuge; Guan, 2017).

De forma integrada, o comportamento animal pode ser entendido como expressão funcional das adaptações fisiológicas e microbianas que ocorrem no trato digestivo. Assim, a ruminação, o tempo de pastejo e as interações sociais refletem o bem-estar e a eficiência da modulação intestinal promovida por estratégias nutricionais, como o uso de aditivos funcionais. Essa relação bidirecional entre microbiota, fisiologia e comportamento representa um eixo fundamental para a compreensão da resiliência e produtividade de bezerras leiteiras em sistemas sustentáveis. Nesse contexto, a modulação intestinal precoce por exemplo, com o uso de compostos bioativos, desponta como alternativa promissora para reduzir o uso de antibióticos, aprimorar a eficiência alimentar e fortalecer o bem-estar animal em sistemas tropicais.

1.2 Desenvolvimento do trato gastrointestinal de bezerras

O desenvolvimento do trato gastrointestinal (TGI) das bezerras é um processo dinâmico e essencial para a futura eficiência alimentar e produtiva. Ao nascimento, o sistema digestivo apresenta morfologia semelhante à de monogástricos, sendo o abomaso o principal compartimento funcional responsável pela digestão do leite (Khan et al., 2007). Já o rúmen, retículo e omaso encontram-se imaturos, dependendo de estímulos nutricionais para sua plena funcionalidade (Baldwin et al., 2004). Nas primeiras horas de vida, o reflexo do sulco esofágico conduz o leite diretamente ao abomaso, permitindo uma digestão enzimática eficiente. Nesse momento, a colostragem precoce é fundamental não apenas para a transferência de imunoglobulinas, mas também para o estímulo metabólico do epitélio intestinal e preparo para colonização microbiana (Godden et al., 2019; Dos Santos et al., 2017). O desenvolvimento morfofuncional do rúmen depende principalmente da ingestão de alimentos sólidos, em especial concentrados ricos em carboidratos fermentáveis, cuja fermentação gera ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) responsáveis pelo crescimento e vascularização das papilas ruminais (Sander et al., 1959; Silper et al., 2004).

A transição de pré-ruminante para ruminante funcional ocorre entre 8 e 12 semanas e envolve alterações anatômicas, fisiológicas e comportamentais (Khan et al., 2011). Fatores como dieta, frequência alimentar e manejo ambiental influenciam diretamente esse processo (Drackley, 2008). A introdução precoce de concentrado e acesso ao volumoso são práticas recomendadas para acelerar a maturação ruminal e antecipar o desmame sem comprometer o desempenho (NASEM, 2021). Bezerras com atraso na maturação ruminal tendem a apresentar menor ingestão de concentrado e desempenho inferior pós-desmame, enquanto programas alimentares intensivos promovem crescimento acelerado e menor idade ao primeiro parto

(Bartlett al., 2006).

1.3 Colonização microbiana e papel da microbiota intestinal

O trato gastrointestinal das bezerras inicialmente é estéril logo após o nascimento, e é rapidamente colonizado por microrganismos provenientes do ambiente, da mãe e dos alimentos, iniciando um processo de sucessão ecológica que resultará em comunidades estáveis e funcionais (Senn et al., 2020; Malmuthuge et al., 2015). Essa colonização é determinante para o desenvolvimento intestinal e imunológico e influencia o desempenho futuro (Zhang et al., 2024). Nos primeiros dias, predominam microrganismos facultativos como Enterobacteriaceae e Lactobacillus; com o avanço da idade e a introdução de alimentos sólidos, ocorre a substituição gradual por anaeróbios dos filos *Firmicutes* e *Bacteroidetes*, especialmente *Ruminococcaceae* e *Lachnospiraceae*, responsáveis pela fermentação de fibras e produção de AGCC (Rey et al., 2014; Yáñez-ruiz et al., 2015).

A microbiota exerce funções essenciais, como a degradação de polissacarídeos complexos, estimulação do desenvolvimento epitelial, competição com patógenos e modulação do sistema imune (Hooper; Macpherson, 2010; Malmuthuge; Guan, 2017). Fatores como tipo de parto, higiene, qualidade do colostro, tipo de dieta e uso de antimicrobianos influenciam profundamente essa trajetória (Du et al., 2023). Intervenções que favorecem uma colonização saudável, como probióticos, prebióticos e simbióticos, podem melhorar a digestibilidade e reduzir distúrbios intestinais (Chaucheyras-durand; Durand, 2010; Blanch, 2020).

A microbiota inicial é altamente plástica e representa uma janela crítica para intervenções nutricionais com efeitos de longo prazo sobre imunidade e metabolismo (Malmuthuge; Guan, 2017). Em sistemas tropicais e a pasto, como os predominantes no Brasil, a diversidade de compostos bioativos das forragens exerce influência direta sobre a composição microbiana e fermentação intestinal (Dill-mcfarland, 2019). O avanço das tecnologias de sequenciamento (NGS) tem permitido caracterizar com precisão essas comunidades e suas funções metabólicas, utilizando bancos de dados como SILVA, Greengenes e RDP (Pan, 2021; Liu et al., 2021). Tais ferramentas oferecem subsídios valiosos para estratégias nutricionais voltadas à modulação precoce da microbiota em condições tropicais.

1.4 Relação entre microbiota ruminal, intestinal e fecal e o delay de resposta microbiana

O trato gastrointestinal de ruminantes constitui um sistema integrado no qual rúmen, intestinos e cólon interagem funcional e metabolicamente (Malmuthuge; Guan, 2017). Cada

compartimento abriga comunidades microbianas específicas, mas há sobreposição funcional que garante o equilíbrio digestivo e imunológico (Yáñez-ruiz et al., 2015). Da mesma forma, metabólitos e microrganismos provenientes do intestino grosso podem influenciar a fermentação ruminal e a homeostase geral do sistema digestivo (Yan et al 2022), evidenciando uma integração bidirecional entre os compartimentos. Em bezerras jovens, a colonização desses segmentos ocorre de forma coordenada com o amadurecimento anatômico e fisiológico do trato digestivo.

Devido às limitações éticas e logísticas para amostragem direta do rúmen e intestinos, a microbiota fecal tem sido amplamente utilizada como marcador não invasivo da composição microbiana global (Meale et al., 2016). Embora apresente diferenças pontuais, as fezes refletem de maneira confiável a resposta do microbioma a variações nutricionais ou ambientais (Zhao et al., 2022). Um aspecto metodológico relevante é o delay de resposta microbiana, ou seja, o intervalo entre uma mudança fisiológica como o desmame ou alteração dietética e a detecção de diferenças significativas na microbiota fecal. Esse atraso, geralmente entre 48 e 72 horas, decorre do tempo de trânsito intestinal e da estabilização da nova comunidade (Meale et al., 2016).

Considerar o delay é essencial para o correto delineamento experimental e para interpretar com precisão os efeitos das intervenções nutricionais. No presente contexto, a coleta de fezes com defasagem de dois a três dias em relação aos eventos críticos permite capturar respostas reais do microbioma aos desafios fisiológicos. Assim, o monitoramento fecal se apresenta como uma ferramenta ética e eficiente para avaliar a saúde digestiva e a eficiência biológica de bezerras leiteiras criadas em sistemas tropicais.

1.5 Estratégias nutricionais e uso de aditivos em bezerras

A nutrição de bezerras leiteiras evoluiu substancialmente nas últimas décadas, impulsionada pelo reconhecimento do impacto da fase inicial sobre o desempenho futuro e pela necessidade de reduzir o uso de antibióticos promotores de crescimento (Smits et al., 2021). Modelos tradicionais de aleitamento restrito e incentivo precoce ao consumo de concentrado, embora econômicos, frequentemente resultavam em déficit nutricional, baixo crescimento e maior incidência de doenças (Khan et al., 2007; Drackley, 2008). Abordagens modernas, por sua vez, priorizam dietas líquidas mais intensivas, alimentos sólidos de alta qualidade e o uso de aditivos funcionais capazes de melhorar a saúde intestinal, acelerar o desenvolvimento ruminal e otimizar o ganho de peso (NASEM, 2021).

Historicamente, os antibióticos promotores de crescimento (APC), como ionóforos e

antibióticos profiláticos, contribuíram para o controle de doenças entéricas e melhor conversão alimentar (Signorini et al., 2011). Contudo, preocupações com resistência antimicrobiana e exigências de sustentabilidade levaram à restrição de seu uso (MAPA, 2022). Assim, a pesquisa voltou-se para alternativas naturais, como probióticos, prebióticos e simbióticos, capazes de reproduzir os benefícios dos APC sem seus efeitos negativos (Chaucheyras-durand; Durand, 2010; Xavies, J. V. V., 2020).

Os probióticos, microrganismos vivos que promovem o equilíbrio microbiano, têm mostrado reduzir diarreias, melhorar a digestibilidade e aumentar o consumo de concentrado (Isik et al., 2004; Wu et al., 2021). Já os prebióticos, substratos não digeríveis como os mananoligossacarídeos (MOS) e os frutooligossacarídeos (FOS), favorecem o crescimento de bactérias benéficas e reforçam a integridade intestinal (Gibson; Roberfroid, 1995; Cangiano et al., 2020). Quando combinados, formam os simbióticos, que potencializam a colonização microbiana e estabilizam o ambiente intestinal (Li et al., 2020).

Outros aditivos funcionais, como óleos essenciais, ácidos orgânicos e minerais quelatados, possuem propriedades antimicrobianas seletivas, modulam a fermentação ruminal e fortalecem a imunidade (Patra, 2011; Spears, 2008). Formulações multicomponentes, que combinam diferentes classes de ingredientes, têm ganhado destaque por oferecerem efeitos sinérgicos sobre microbiota e metabolismo (Dos Santos et al., 2024). Entre elas, o aditivo multicomponente utilizado neste estudo, representa uma estratégia multifuncional composta por Saccharomyces cerevisiae, prebióticos, minerais orgânicos, ácidos graxos essenciais e aminoácidos. Essa combinação atua simultaneamente na estabilização microbiana, integridade intestinal e metabolismo energético (Patra, 2011; Cangiano et al., 2020).

A administração precoce, nas primeiras semanas de vida, período de maior plasticidade microbiana, pode favorecer o estabelecimento de uma microbiota mais estável e resiliente (Malmuthuge; Guan, 2017; Varada et al., 2022). Assim, as estratégias nutricionais modernas vão além da simples oferta de nutrientes, buscando modular intencionalmente o ambiente intestinal e ruminal. Quando bem aplicadas, essas práticas substituem os antibióticos promotores de crescimento, melhoram indicadores zootécnicos e contribuem para sistemas produtivos mais sustentáveis e éticos.

1.6 Bem-estar e comportamento animal na fase inicial

O comportamento animal constitui uma ferramenta fundamental para avaliar o bem-estar, a adaptação e a eficiência produtiva de bezerras leiteiras. Durante as primeiras semanas de vida, ocorrem intensas mudanças fisiológicas associadas ao desenvolvimento do trato

gastrointestinal e à transição alimentar, refletidas diretamente nos padrões de pastejo e ruminação (Martin; Bateson, 1986; Whiting, 2008).

O início do pastejo e da ruminação marca a transição funcional do sistema digestivo do estado pré-ruminante para ruminante. Geralmente, o pastejo começa entre a 3ª e 6ª semana de vida, e a ruminação entre a 3ª e 5ª, coincidindo com o aumento do consumo de alimentos sólidos e o estabelecimento da microbiota ruminal (Khan et al., 2011; Malmuthuge; Guan, 2017). Esses comportamentos estão associados à produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), como o butirato, que estimulam o crescimento das papilas ruminais e a fermentação eficiente (Sander et al., 1959; Diao et al., 2019). Em sistemas tropicais, variáveis ambientais como conforto térmico, sombreamento, tamanho e faixa etária de grupo, também influenciam o tempo de pastejo, ruminação e repouso (Santos et al., 2022). Além dos aspectos alimentares, o comportamento social é um indicador relevante de bem-estar.

Interações positivas, como lambidas recíprocas e brincadeiras, refletem bom estado emocional, enquanto sinais como sucção cruzada e isolamento indicam desconforto ou desequilíbrio metabólico (De Passillé; Rushen, 2016). Estratégias de manejo, como desmame gradual, enriquecimento ambiental e redução do estresse térmico, são essenciais para promover adaptação e reduzir distúrbios fisiológicos (Dado-senn et al., 2020).

O comportamento deve ser analisado em conjunto com parâmetros fisiológicos e microbiológicos, pois reflete diretamente a adaptação digestiva e a eficiência da modulação intestinal. Padrões estáveis de ruminação e pastejo indicam desenvolvimento ruminal adequado e microbiota funcional equilibrada, enquanto alterações nesses comportamentos podem sinalizar fermentação instável ou desconforto gastrointestinal (Malmuthuge; Guan, 2017). Assim, o estudo do comportamento na fase inicial permite compreender de forma integrada o impacto das intervenções nutricionais e ambientais sobre a saúde, o bem-estar e o desempenho de bezerras leiteiras.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito do fornecimento de um aditivo alimentar multicomponente no comportamento, crescimento e microbiota fecal de bezerros leiteiros criados em grupo a base de pasto.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a influência do fornecimento de um aditivo multicomponente no

comportamento de bezerras leiteiras criadas em grupo em sistema a base de pasto.

- Avaliar o desenvolvimento e modulação da microbiota fecal de bezerras criadas em grupo em sistema a base de pasto.
- Caracterizar o efeito da suplementação de um aditivo multicomponente no perfil de alfa e beta-diversidade da microbiota fecal durante o período de aleitamento e desmame de bezerras leiteiras criadas em grupo em sistema a base de pasto.

CAPÍTULO 2

1. INTRODUÇÃO

O desenvolvimento inicial de bezerras leiteiras é um período crítico que influencia diretamente o desempenho produtivo e reprodutivo na vida adulta. Nesse contexto, a formação da microbiota fecal tem ganhado destaque como um dos fatores envolvidos na saúde intestinal, metabolismo e na resposta imunológica desses animais. A colonização microbiana do trato gastrointestinal ocorre logo após o nascimento e é influenciada por diversos fatores, como o ambiente, dieta, manejo e o contato materno, sendo essencial para o estabelecimento de uma microbiota equilibrada e funcional (Malmuthuge et al., 2015; Jami et al., 2013).

Em sistemas de criação a base de pasto, as bezerras são expostas precocemente a uma diversidade de microrganismos ambientais e dietas mais complexas, o que pode impactar significativamente a composição e a dinâmica da microbiota fecal. Esse tipo de sistema também favorece comportamentos naturais, como pastejo, exploração do ambiente e interação social (Donadio et al., 2025; Alves et al., 2023), que estão associados ao bem-estar animal e podem influenciar indiretamente o desenvolvimento fisiológico e imunológico (Costa et al., 2016; Von Keyserlingk et al., 2009). Além disso, o desenvolvimento comportamental das bezerras está ligado às condições de manejo e ao sistema de criação adotado. Animais criados a pasto tendem a apresentar maior atividade, exploração e adaptação ao ambiente, fatores que podem contribuir para um crescimento eficiente e saudável. Esses aspectos comportamentais, aliados à modulação da microbiota intestinal, desempenham um papel importante na eficiência alimentar e na resistência a doenças (Khan et al., 2016; Meale et al., 2017).

Compreender as interações entre microbiota fecal, desenvolvimento e comportamento de bezerras leiteiras criadas em sistemas a base de pasto é fundamental para o aprimoramento das práticas de manejo em regiões de clima tropical. Esses fatores podem ter implicações diretas no desempenho futuro dos animais, incluindo ganho de peso, idade ao primeiro parto, produção de leite e longevidade produtiva (Soberon et al., 2012), reforçando a importância de estratégias que promovam o equilíbrio microbiológico e o bem-estar desde as fases iniciais da vida.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Embrapa Pecuária Sudeste sob o protocolo número 09/2024. Todos os procedimentos de manejo seguiram as diretrizes de bem-estar animal e foram conduzidos pela Lei Estadual de São Paulo nº 11.977.

2.1 Localização e padrão climático

O experimento foi conduzido entre novembro de 2024 a fevereiro de 2025 (abrangendo as

estações de primavera e verão do hemisfério sul) na Embrapa Pecuária Sudeste, São Carlos, São Paulo, Brasil (21º97′ S e 47°85′ W, 853 m acima do nível do mar). O clima da região é caracterizado como tropical (Cwa), segundo a classificação de Köppen (Alvares et al., 2013). Durante o período experimental, a temperatura média do ar foi de 22,7°C (variação: 14°C – 32,2°C) e a umidade relativa média foi de 55% (variação: 24,5% – 100%).

2.2 Área experimental

O bezerreiro conta com 12 piquetes de aproximadamente 64m² manejados sob sistema de pastejo rotativo (Alves et al., 2024). Os bezerros são criados predominantemente a base de pasto em piquetes (máximo de 5/bezerro/piquete) compostos por *Cynodon nlemfuensis* e livre acesso a água e concentrado. Todos os piquetes são cercados com quatro linhas de fio liso onde os dois centrais possuem corrente elétrica, quatro suportes para o balde individual de fornecimento de leite, dois cochos para ração e um bebedouro do tipo balde, além de serem cobertos por duas faixas de sombreamento artificial.

2.3 Animais e tratamentos

Ao total, 16 bezerras leiteiras (média ± SD; 29,31 ± 3,81 kg) participaram deste estudo. As bezerras foram provenientes de um lote pré-selecionado de vacas da raça Kiwi-Cross que foi submetido à inseminação artificial em tempo fixo (IATF) utilizando sêmen sexado, todos do mesmo touro, para concentrar a parição e evitar a heterogeneidade dos animais para o estudo. As bezerras foram divididas em 4 grupos com 4 animais cada, sendo 2 bezerras do tratamento e 2 do controle. Essa alocação foi realizada para garantir homogeneidade ambiental para os diferentes grupos, sendo o primeiro animal nascido destinado ao respectivo grupo por meio de sorteio. O grupo tratamento (n=8) consistiu em bezerras que receberam aditivo (3g/animal/dia) do nascimento até o desmame (12 semanas de idade).

O aditivo alimentar orgânico é um composto constituído por *Saccharomyces cerevisiae*, ácidos graxos essenciais (ômega 3 e ômega 6), minerais orgânicos (cromo e zinco), aminoácidos, probióticos, prebióticos (MOS) e proteína bruta, (os níveis de garantia são apresentados no material suplementar) que funcionam modulando a síntese de proteína microbiana no rúmen, criando um ambiente favorável para a digestão, funcionando também como um substituto de ionóforos e antibióticos promotores de descimento, o que melhora o desempenho dos animais. Todos os animais do grupo tratamento receberam o aditivo no formato de pasta (3g do aditivo, 4g de melaço de cana e 6g de pasta; excipiente Chemygel®, Chemyunion Ltda., Sorocaba, SP, Brasil), por via oral 2 horas após o fornecimento da dieta

líquida matutina. O grupo controle (n=8) consistiu em bezerras que receberam um placebo (3g/animal/dia) do nascimento até o desmame (12 semanas de idade). Assim como no grupo tratamento, todos os animais do grupo controle receberam o placebo no formato de pasta (4g de melaço de cana e 6g de pasta, excipiente Chemygel®, Chemyunion Ltda., Sorocaba, SP, Brasil), por via oral 2 horas após o fornecimento da dieta líquida matutina.

2.4 Manejo e dieta

As bezerros recém-nascidas foram separadas de suas mães e direcionadas ao bezerreiro, onde foram submetidas aos manejos de pesagem em balança mecânica e também as medições corporais. O coto umbilical foi tratado com solução de iodo a 9% duas vezes ao dia durante três dias consecutivos, e mantido sob tratamento por mais tempo quando necessário. Para a colostragem, na primeira refeição (preferencialmente em até 2 horas após o nascimento), os animais receberam 10% do peso vivo em colostro com BRIX >25% mensurado por refratômetro digital (modelo MA871; Milwaukee Electronics™, Wisconsin, EUA), e fornecido em balde individual (Milkbar) ou, quando necessário, administrado por sonda. Na segunda refeição as bezerras receberam 5% do seu peso vivo em colostro, dentro das primeiras 6 horas de vida. (Godden; Lombard; Woolums, 2019; Lombard et al., 2020). Após 48 horas do fornecimento do colostro, realizou-se a avaliação da transferência de imunidade passiva (valor de referência: >8,4% de BRIX indicaram êxito no processo de colostragem; Bittar; Portal; Pereira, 2018) em refratômetro digital por meio da coleta de sangue da veia jugular em tubo vacuolizado sem anticoagulante, a fim de avaliar a concentração de proteína sérica e verificar se a absorção de imunoglobulinas foi efetiva.

Durante todo o período experimental, as bezerras receberam (2 kg/animal/dia) de concentrado (78% de aveia em grão, 17% de farelo de soja 45% de proteina bruta (PB) e 5% de núcleo mineral para bezerro) fornecido uma vez ao dia após a refeição da manhã, sendo as porções não consumidas substituídas por ração fresca (os níveis de garantia são apresentados no material suplementar). A partir do segundo dia de vida, as bezerras receberam 20% do peso vivo ao nascimento (NASEM, 2021) de leite integral (~39ºC) divididos em duas vezes ao dia (~8h e 16h) por meio de balde individual com bico (Milkbar). Na 8° semana de vida (~60d) iniciou o processo de desmame gradual (figura 1), o desmame teve duração total de 6 dias, onde o fornecimento de leite foi reduzido gradualmente em 50% a cada 2d.



Figura 1. Representação esquemática do desmame gradual em 6 dias.

2.5 Medições

Durante o período experimental, comportamento diurno, parâmetros de crescimento e coletas de fezes foram realizados em períodos pré-determinados.

2.6 Comportamento

Os bezerros foram observados semanalmente do nascimento até a 10° semana de vida (uma semana após o desmame), com registro comportamentais realizados diretamente entre as 8h e 17h. A postura dos bezerros (em pé ou deitados), assim como os comportamentos ativos, ruminação, ócio e pastejo (Tabela 1), foram registrados usando instantâneos com intervalo de 5 minutos (Martin e Bateson, 1986). Os comportamentos de ingestão de leite, água, interações entre os animais e interações dos animais com estruturas foram registrados continuamente, ou seja, sempre que ocorreram. Os comportamentos foram registrados por um observador previamente treinado, observando no máximo dois grupos simultaneamente para garantir a precisão e a consistência na coleta de dados.

Tabela 1. Definição dos comportamentos avaliado

Comportamento	Definição
Atividade	Locomoção, comportamento de brincadeira ou movimentação vigorosa.
Ocioso	Animal acordado, porém, inativo, em pé ou deitado.
Pastando	Ato de morder ou mastigar vegetação de pasto.
Ruminando (em pé)	Animal em pé, realizando movimentos mandibulares característicos da ruminação (mastigação de ração regurgitada).
Ruminando (deitado)	Animal em posição reclinada, realizando movimentos mandibulares característicos da ruminação.
Ruminação total	Tempo total gasto em ruminação, considerando as posições em pé e deitado.
Deitado	Animal em posição reclinada, sem ruminação.

Descansando	Animal deitado, quieto, com os olhos abertos, sem ruminar ou dormir.
Dormindo	Animal deitado, com os olhos fechados.
Ingestão de leite	Animal bebendo ativamente do balde de leite.
Ingestão de água	Animal bebendo água no bebedouro.
Comendo	Consumo de concentrado, feno ou ração pronta a partir do comedouro.
Interação com animais	Comportamentos sociais, incluindo arranhar, lamber, mamada cruzada e cabeçadas de brincadeira.
Interação com as estruturas	Manipulação de baldes, cercas ou outros equipamentos por contato oral ou físico.

2.7 Crescimento

Os bezerros foram pesados e tiveram seus corpos medidos uma vez por semana, desde o nascimento até a 11º semana de vida. Uma balança mecânica foi usada para pesar os bezerros, enquanto as medidas corporais como perímetro torácico (circunferência atrás da cernelha e dos ombros); altura da cernelha (da cernelha ao solo); altura da garupa (ponto mais alto da garupa ao solo) e largura da garupa (distância entre as tuberosidades ilíacas) foram realizadas com o auxílio da fita métrica e hipômetro (Rashad et al., 2022). Além disso, o ganho médio diário (GMD; Equação 1) dos animais foi obtido dividindo a diferença de peso entre duas pesagens consecutivas pelo intervalo de dias entre as pesagens.

$$GMD = \frac{\{Peso_2 - Peso_1\}}{\{\sum dias\}}$$

2.8 Sanidade

Durante o estudo, o estado de saúde dos bezerros foi verificado diariamente por funcionários treinados, utilizando uma lista de verificação padrão da fazenda que abrange as doenças mais comuns que ocorrem no sistema (ex., diarreia, pneumonia e desidratação). Os sinais clínicos registrados durante cada verificação de saúde foram anotados em formulários médicos individuais e quando detectada alguma intercorrência, um veterinário era consultado para o tratamento adequado. Todos as bezerras necessitaram de intervenção veterinária para diarreia, desidratação ou ambas, incluindo suplementação de eletrólitos e/ou antibióticos. Esses casos ocorreram principalmente nas três primeiras semanas de vida.

2.9 Coleta de fezes

Para acompanhar o desenvolvimento da microbiota fecal e potencial resposta ao estresse do desmame, as coletas de fezes foram realizadas em 5 diferentes períodos (Tabela 2). Já é

conhecido que existe um delay (~2 dias; Meale, et al., 2016) na alteração da microbiota fecal após a resposta a um evento estressante. Assim, as coletas das fezes (exceto para o D0) foram realizadas 2 dias após o momento definido para as coletas (ex., a coleta do D15 foi realizada no D17). As amostras (~50g/animal) foram coletadas diretamente da ampola retal. Após a região perianal ter sido higienizada com papel toalha, o ânus foi massageado com luva estéril até a liberação do bolo fecal. Em seguida, foram coletados e armazenados aproximadamente 50 gramas de fezes em saco plástico, o qual foi congelado para posterior processamento e análises. Os sacos foram devidamente etiquetados e rotulados com o número do animal, a data e o momento experimental da coleta, a fim de garantir a rastreabilidade das amostras.

Imediatamente após a coleta, as amostras foram acondicionadas em caixa térmica contendo gelo, a fim de reduzir rapidamente a atividade metabólica microbiana. O tempo entre a coleta e o armazenamento definitivo foi inferior a 10 minutos, sendo as amostras prontamente transferidas para freezer a -80 °C. Esse procedimento foi adotado para minimizar alterações na composição da microbiota fecal, evitando o crescimento ou a proliferação de microrganismos após a coleta e garantindo maior fidelidade aos perfis microbianos originais.

Tabela 2. Representação e descrição dos períodos de coleta das amostras de fezes.

Sigla	Descrição
D0	24 horas após o nascimento, parâmetro do microbioma;
D15	17 dias após o nascimento, início do desenvolvimento ruminal;
D30	32 dias após o nascimento;
D60	62 dias após o nascimento, início do desmame;
D66	68 dias após o nascimento, após o desmame completo;

3. Análises e processamento de dados do microbioma fecal

3.1 Descongelamento das amostras

Previamente as amostras (congeladas) foram fracionadas com faca esterilizadas em campo estéril sob a chama de bico de Bunsen, armazenadas em tubos Falcon devidamente etiquetados para facilitar o manejo e posterior extração. Para o descongelamento controlado das amostras de fezes, as alíquotas foram retiradas do freezer a −80 °C e colocadas em estufa seca a 37 °C, com monitoramento contínuo, sendo retiradas assim que se observou o completo descongelamento. Em seguida, procedeu-se imediatamente às etapas subsequentes da extração de DNA.

3.2 Extração de DNA

A extração de DNA foi realizada utilizando o kit comercial Quick-DNA™ Fecal/Soil Microbe Miniprep Kit (Zymo Research, Irvine, CA, EUA; Cat. No. D6010), confome recomendações do fabricante e incluido os seguintes detalhes: foram pesados 140 µg de amostra em balança de precisão e transferidos para os tubos fornecidos pelo kit (ZR BashingBead™ Lysis Tube, 0,1 & 0,5 mm). Em seguida, foram adicionados 750 µL de BashingBead™ Buffer. Para garantir a lise eficiente dos microrganismos presentes nas amostras, conforme recomendado pelo fabricante, utilizou-se o equipamento Bertin Precellys Evolution®, equipado com suporte para tubos de 2 mL. O protocolo consistiu em quatro ciclos de batimento a 9.000 rpm por 60 segundos, intercalados por intervalos de descanso de 120 segundos, totalizando 4 minutos de batimento, 6 minutos de descanso e 10 minutos de processamento. Para a remoção de RNA e obtenção de DNA bacteriano purificado, foi utilizada PureLink™ RNase A (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA; Cat. No. 12091021), sendo adicionados 20 µL da solução à amostra após a homogeneização. As amostras foram então incubadas em termobloco a 36 °C, sob agitação de 450 rpm por 15 minutos. Ao final dessa etapa, o protocolo seguiu conforme as instruções do fabricante até a completa extração do DNA.

3.3 Preparação das bibliotecas

As bibliotecas foram preparadas seguindo as recomendações da Illumina. Para a amplificação da região V4 do DNA ribossomal 16S (localizada entre as posições 515 F e 806 R), técnica escolhida por sua robustez, ampla validação em estudos ecológicos e adequação para análises comparativas de diversidade microbiana em ruminantes, foi realizada a seguinte reação em cadeia da polimerase (PCR): 1X NEBNext® Q5® Hot Start HiFi PCR aster Mix (NEB, Cat. M0543L), 0,2 nM de cada primer, 12,5 ng de DNA, totalizando um volume de reação de 25 µL. Os primers utilizados foram: forward (5'-TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGGTGYCAGCMGC CGCGGTAA-3') e reverse (5'-GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGA CAGGGACTACNVGGGTWTCTAAT-3').

As condições de termociclagem foram: 1 ciclo a 98ºC por 30 segundos, seguido por 25 ciclos a 98ºC por 10 segundos, 50ºC por 20 segundos e 72ºC por 30 segundos, finalizando com 1 ciclo a 72ºC e manutenção a 4ºC. Como controle de qualidade, foi performado reação de controle negativo (CN) para verificar possível contaminação. O produto de PCR foi purificado utilizando esferas magnéticas AMPure XP Beads (Beckman Coulter, cat. A63881), conforme as recomendações do manual 16S Metagenomic Sequencing Library Preparation

(Illumina) e o tamanho dos fragmentos gerados na reação de PCR foi avaliado por eletroforese em gel de agarose.

As amostras previamente amplificadas foram indexadas (segunda PCR) utilizando o kit Nextera XT Index Kit v2 Set A (Illumina, cat. FC-131-2001) de acordo com o seguinte protocolo de reação de indexação: 1X NEBNext® Q5® Hot Start HiFi PCR Master Mix (NEB, Cat. M0543L), 5 µL de cada índice, 5 µL do produto de PCR previamente purificado, totalizando um volume de reação de 50 µL. As condições de termociclagem foram: 1 ciclo a 98ºC por 30 segundos, seguido por 12 ciclos a 98ºC por 10 segundos, 55ºC por 20 segundos e 72ºC por 30 segundos, finalizando com 1 ciclo a 72ºC e manutenção a 4ºC. O produto de PCR foi purificado utilizando esferas magnéticas AMPure XP Beads (Beckman Coulter, cat. A63881), conforme as recomendações do manual 16S Metagenomic Sequencing Library Preparation (Illumina) purificação da segunda PCR.

As amostras indexadas e purificadas foram quantificadas utilizando o kit de quantificação Qubit™ 1X dsDNA High Sensitivity (HS) (ThermoFisher, Cat. Q33231). Cada amostra foi então diluída para uma concentração final de 4 nM, e em seguida, um pool foi preparado combinando 10 µL de cada amostra. O pool foi novamente quantificado utilizando o mesmo kit Qubit para confirmar a concentração final. A desnaturação da biblioteca, a adição de PhiX (controle interno da Illumina) e o carregamento no cartucho foram realizados de acordo com as instruções do manual 16S Metagenomic Sequencing Library Preparation (Illumina). O sequenciamento foi realizado no equipamento MiSeq (Illumina) utilizando a configuração paired-end e o kit MiSeq Reagent Kit v2 (500 ciclos) (Illumina, cat. MS-102-2003).

4. Análises e processamento de dados do microbioma

4.1 Análise Bioinformática

As análises bioinformáticas foram conduzidas com dados obtidos a partir do sequenciamento de leituras curtas pela plataforma Illumina MiSeq. Inicialmente, os arquivos brutos no formato FASTQ foram importados para o ambiente estatístico **R**, e foram submetidos a um rigoroso controle de qualidade (QC), etapa em que foram avaliados parâmetros como a distribuição do comprimento dos fragmentos, a presença de adaptadores de sequenciamento e a qualidade média por base. Leituras de baixa qualidade foram aparadas ou removidas, garantindo a robustez das análises subsequentes.

Após o pré processamento, as leituras qualificadas foram mapeadas contra sequências de referência de rRNA 16S obtidas do banco de dados SILVA 99% (versão 128). OTUs com

identificação taxonômica incompleta ou classificadas como microrganismos não cultivados foram mantidas na análise, considerando sua relevância para a caracterização global do microbioma intestinal.

As análises de diversidade foram conduzidas de forma complementar, contemplando tanto a alfa-diversidade, que determina a riqueza e a uniformidade microbiana dentro de cada amostra (com índices como Shannon e Simpson), quanto a beta-diversidade, voltada para a comparação entre diferentes amostras e condições experimentais. A diversidade beta foi representada por meio de Análise de Coordenadas Principais (PCoA), possibilitando a visualização das semelhanças e diferenças na composição microbiana entre os grupos avaliados. Os resultados bioinformáticos foram visualizados por meio de gráficos e tabelas gerados automaticamente em R, possibilitando a interpretação da dinâmica temporal do microbioma intestinal dos bezerros durante as diferentes fases de desenvolvimento.

4.2 Análises estatísticas do microbioma

As análises estatísticas foram conduzidas de forma a validar os resultados bioinformáticos. As análises estatísticas foram realizadas em R (versão 4.3.2; R Core Team, 2024) usando o RStudio, considerando como fatores experimentais o tratamento e os dias de coleta (24 horas, 15, 30, 60 e 66 dias). Os índices de diversidade alfa (Shannon e Simpson) foram analisados por meio de modelos estatísticos ajustados para avaliar os efeitos do tempo e do tratamento sobre a estrutura da comunidade microbiana intestinal. Quando identificadas diferenças significativas, foram realizados contrastes múltiplos entre os dias de coleta, permitindo a comparação pareada entre os diferentes períodos experimentais. As médias foram estimadas com seus respectivos erros padrão e intervalos de confiança de 95%. Para o controle do erro do tipo I decorrente de múltiplas comparações, os valores de p foram ajustados utilizando o método de Benjamini–Hochberg (BH). Adotou-se nível de significância de 5% ($p < 0,05$) para todas as análises estatísticas. Dessa forma, o fluxo de análise adotado permitiu uma caracterização abrangente da comunidade microbiana presente nas amostras, assegurando a confiabilidade dos resultados obtidos a partir dos dados de sequenciamento de leituras curtas na plataforma Illumina MiSeq.

5. Análise e processamento de dados da avaliação de comportamento e crescimento

Todas as análises descritivas e confirmatórias foram realizadas em R (versão 4.3.2; R Core Team, 2024) usando o RStudio. A normalidade e a homogeneidade das variâncias para todas as variáveis foram avaliadas usando o teste de Shapiro-Wilk, com avaliações visuais

fornecidas por histogramas e gráficos Q-Q plot. Os dados foram analisados por Modelos Lineares Mistos Generalizados (GLMMs) utilizando tratamento, semana, e sua interação (tratamento*semana) como efeito fixo e grupo e horas como efeito aleatório. Todos os modelos foram ajustados usando o método de aproximação de máxima verossimilhança no pacote lme4 (Bates et al., 2015), e os intervalos de confiança foram estimados usando testes qui-quadrado de Wald do Tipo II.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Comportamento

Não houve influência do tratamento ($p=0.42$) no comportamento de atividades (média ± SE; tratamento: 41.72 ± 2.27; controle: 39.39 ± 2.16) dos bezerros. No entanto, os bezerros que receberam aditivo gastaram mais tempo (78.57 ± 8.1; $p<0.05$) deitados ao longo do tempo do que os bezerros do controle (67.41 ± 7.0). Esses resultados evidenciam que, embora o tratamento isolado não tenha modificado o tempo de repouso, a combinação com o fator tempo influenciou de maneira expressiva o padrão comportamental dos animais ao longo das semanas.

Houve influência da semana nos comportamentos de pastejo e ruminação independente do tratamento (Tabela 3). A cada aumento na semana, os bezerros foram 44% mais propensos a realizar o comportamento de pastejo e 41% mais propenso a realizar o comportamento de ruminação. O aumento na frequência dos comportamentos de pastejo e ruminação com o avanço da idade indica a transição gradual do bezerro de um padrão alimentar lácteo para um comportamento típico de ruminante funcional. Isso reflete o amadurecimento do sistema digestivo e o desenvolvimento do comportamento ingestivo. Essas mudanças são esperadas, uma vez que, com o passar das semanas, ocorre o crescimento e a colonização microbiana do rúmen, associadas ao maior consumo de alimentos sólidos e à redução gradual da dependência do leite (Khan et al., 2011; De Paula Vieira et al., 2012).

O aumento do tempo dedicado ao pastejo e à ruminação demonstra que as bezerras passaram a explorar ativamente o ambiente e o pasto, aprimorando sua capacidade de digestão fibrosa e comportamentos relacionados à alimentação (Bittar et al., 2009). Portanto, os resultados sugerem que o avanço etário está diretamente relacionado à aquisição de comportamentos alimentares maduros, o que constitui um indicador de adaptação fisiológica e comportamental dos animais ao sistema de criação a pasto.

Tabela 3. Estimativas posteriores dos modelos de regressão misto com família Poisson para

avaliar a influência do aditivo, semana e interação (aditivo*semana) nos comportamentos de pastejo e ruminação de bezerros leiteiros (n=16) criados em grupo e a base de pasto durante o pré-desmame.

Pastejo					
Parâmetro	IRR	IC		Valor de Z	p-valor
		Inferior	Superior		
Controle	Ref.	Ref.	Ref.	Ref.	Ref.
Aditivo	0.918	0.664	1.261	-0.525	0.599
Semana	1.442	1.229	1.693	4.487	**<0.001**
Aditivo x Semana	1.012	0.969	1.057	0.557	0.577
Ruminação					
Parâmetro	IRR	IC		Valor de Z	p-valor
		Inferior	Superior		
Controle	Ref.	Ref.	Ref.	Ref.	Ref.
Aditivo	3.342	0.222	1.308	0.872	0.383
Semana	1.417	1.026	1.957	2.121	**0.033**
Aditivo x Semana	0.797	0.554	1.147	-1.219	0.222
Ócio					
Parâmetro	IRR	IC		Valor de Z	p-valor
		Inferior	Superior		
Controle	Ref.	Ref.	Ref.	Ref.	Ref.
Aditivo	1.039	0.586	18.432	0.132	0.895
Semana	0.907	0.737	11.162	-0.920	0.357
Aditivo x Semana	0.995	0.912	1.085	-0.108	0.914

Para o comportamento de ruminação deitado, houve efeito do fornecimento do aditivo (p=0,0002) e da interação entre o aditivo e semana (p=0,001). Isto indica que o efeito do tempo sobre a ruminação variou conforme o grupo de tratamento. O comportamento evoluiu ao longo das semanas de maneira dependente do tratamento (Tabela 4).

Tabela 4. Estimativas posteriores de modelos de regressão misto com família Poisson da influência do aditivo, semana e interação (aditivo*semana) nos comportamentos em posição deitada de bezerros leiteiros (n=16) criados em grupo e a base de pasto durante o pré-desmame.

Ócio Deitado					
Parâmetro	IRR	IC		Valor de Z	p-valor
		Inferior	Superior		
Controle	Ref.	Ref.	Ref.	Ref.	Ref.
Aditivo	1.050	0.876	1.259	0.536	0.592
Semana	1.035	0.866	1.236	0.379	0.704
Aditivo x Semana	1.001	0.971	1.032	0.108	0.914
Ruminando Deitado					
Parâmetro	IRR	IC		Valor de Z	p-valor
		Inferior	Superior		
Controle	Ref.	Ref.	Ref.	Ref.	Ref.
Aditivo	0.570	0.421	0.771	-3.642	**0.0002**
Semana	1.692	1.519	1.885	9.553	**<0.001**
Aditivo x Semana	1.070	1.027	1.114	3.244	**0.001**

Observamos que as bezerras suplementadas com o aditivo multicomponente gastarm mais tempo na posição deitada em comparação ao grupo controle (p = 0,028). Este

comportamento é classicamente interpretado como um indicador positivo de bem-estar animal, sugerindo que os animais do grupo tratado apresentavam maior conforto ou saciedade, visto que o tempo de repouso é considerado uma atividade prioritária para bezerros neonatos (Von Keyserlingk; Weary, 2007). No entanto, em sistemas de produção a pasto, o padrão de repouso pode sofrer variações significativas em função do manejo e da dieta (Zanine et al., 2006). Embora o maior tempo deitada possa indicar conforto, é necessário considerar que, em quadros de desafio sanitário como os observados neste experimento, o repouso prolongado também pode estar associado à conservação de energia para a recuperação metabólica. Contudo, a manutenção do desempenho sugere que a suplementação favoreceu um estado de maior estabilidade, permitindo uma expressão comportamental mais eficiente do descanso.

Os resultados deste estudo indicam que o comportamento de bezerros leiteiros pré-desmame em sistemas a pasto é regido por uma complexa interação entre maturidade fisiológica e estímulos nutricionais. O avanço etário consolidou-se como o principal determinante da aquisição de comportamentos alimentares maduros. O aumento progressivo do pastejo e da ruminação ao longo das semanas, independentemente do tratamento, reflete a transição fisiológica esperada de um sistema alimentar predominantemente lácteo para o de um ruminante funcional. Esse processo é impulsionado pelo amadurecimento do rúmen, intensificação da colonização microbiana e maior consumo de sólidos (Khan et al., 2011; De Paula Vieira et al., 2012), evidenciando a adaptação gradual ao sistema extensivo (Bittar et al., 2009). Embora o aditivo multicomponente não tenha alterado de forma abrupta o repertório de atividades ou os padrões de ócio e ingestão, sugerindo que fatores ambientais e a idade exercem papel central nessas funções, a interação significativa entre aditivo e semana revelou modificações cruciais no comportamento em posição deitada.

O maior tempo de repouso observado nos animais suplementados deve ser interpretado de forma integrada: bem-estar e conforto. Classicamente, a posição deitada é um indicador positivo de bem-estar, associado a conforto físico, saciedade e baixo estresse (Von Keyserlingk; Weary, 2007) e conservação de energia, em animais jovens sob desafios sanitários, como distúrbios entéricos, o repouso prolongado atua como uma estratégia adaptativa. A ativação do sistema imune possui um elevado custo metabólico, logo, deitar-se pode ser uma tentativa de manter a homeostase fisiológica através da economia de energia. Essa mudança comportamental encontra suporte na análise do microbioma fecal. A sucessão ecológica e a maior estabilidade microbiana observadas com o avanço da idade sugerem um amadurecimento do ecossistema. Nos animais suplementados, a modulação da microbiota pode ter favorecido um ambiente intestinal mais resiliente e com menor disbiose. Essa maior

estabilidade pode ter reduzido a necessidade de gastos energéticos em respostas inflamatórias agudas, refletindo-se em um repouso mais eficiente. Tal fenômeno é possivelmente mediado pelo eixo intestino–comportamento, onde mudanças na funcionalidade da microbiota influenciam o hospedeiro por vias neuro imunes e metabólicas, afetando a inflamação sistêmica e o estado geral de saúde (Kraimi, N. et al., 2029).

A manutenção do desempenho produtivo indica que o aumento no tempo deitada nos bezerros suplementados não representou um comprometimento funcional, mas sim um estado de maior estabilidade fisiológica. Enquanto a idade dita o ritmo do desenvolvimento comportamental alimentar, o aditivo multicomponente atua de forma complementar, favorecendo padrões associados ao conforto e à recuperação metabólica. Essa abordagem interdisciplinar reforça que, para compreender a saúde de bezerros a pasto, é indispensável integrar avaliações comportamentais a indicadores microbiológicos e fisiológicos.

3.2 Crescimento

Os bezerros apresentaram evolução corporal consistente ao longo do período experimental, evidenciando ganho de peso e expansão do perímetro torácico em ambos os grupos (Tabela 5). Ao final do período (~74 dias), o ganho médio diário (GMD) foi semelhante entre os grupos, apresentando valores de 0,64 ± 0,17 kg/dia para o Controle e 0,64 ± 0,09 kg/dia para o Tratamento. O uso do aditivo multifuncional não promoveu alterações expressivas na taxa de ganho de peso diário durante o período de aleitamento.

Tabela 5. Valores médios ± desvio padrão dos parâmetros de crescimento [peso (kg), ganho médio diário (GMD/kg/dia) e perímetro torácico (PT, cm)] dos grupos controle e tratado durante o período do experimental.

Grupo	Peso final (kg)	PT inicial (cm)	PT final (cm)	GMD (kg/dia)
Controle	79,16 ± 11,89	73,62 ± 1,58	99,69 ± 4,88	0,64 ± 0,17
Tratamento	74,65 ± 7,93	70,31 ± 3,01	98,88 ± 3,46	0,64 ± 0,09

Em relação ao perímetro torácico, variável frequentemente associada ao desenvolvimento do trato digestivo superior, observou-se crescimento progressivo e proporcional ao aumento do peso corporal. Os valores iniciais foram de 73,62 ± 1,58 cm no grupo Controle e 70,31 ± 3,01 cm no grupo Tratamento, alcançando 99,69 ± 4,88 cm e 98,88 ± 3,46 cm, respectivamente, ao final do experimento. Essa elevação reflete a expansão torácica esperada com o avanço da idade e a maior ingestão de alimentos sólidos.

Os resultados de crescimento indicam que os bezerros apresentaram evolução corporal

adequada ao longo do período experimental, com ganho de peso e aumento progressivo do perímetro torácico em ambos os grupos. A similaridade no ganho médio diário entre os tratamentos demonstra que a suplementação com o aditivo multicomponente não atuou como promotor direto de crescimento durante a fase de aleitamento, mas também não comprometeu o desempenho produtivo dos animais. Os valores observados estão de acordo com aqueles descritos na literatura para bezerros leiteiros criados em sistemas a pasto, refletindo bom manejo nutricional e adaptação às condições experimentais (Bittar & Ferreira, 2019; De Paula Vieira et al., 2012).

Em sistemas de criação a pasto, o crescimento corporal é fortemente influenciado pelo avanço etário, pela ingestão gradual de alimentos sólidos e pelo desenvolvimento do trato digestivo. Nesse contexto, a manutenção de taxas de ganho adequadas ao longo do período pré-desmame, mesmo na presença de desafios sanitários, indica eficiência alimentar e capacidade de adaptação fisiológica dos animais. Assim, a ausência de diferenças no desempenho sugere que os fatores ambientais e de manejo exerceram papel predominante sobre o crescimento, independentemente da suplementação.

O aumento consistente do perímetro torácico observado ao longo do experimento acompanhou o ganho de peso corporal, reforçando sua utilização como indicador indireto do desenvolvimento estrutural e do trato digestivo superior. O crescimento dessa variável reflete a expansão corporal esperada com o avanço da idade e com a maior ingestão de alimentos sólidos, processo diretamente associado ao desenvolvimento ruminal e à transição funcional para a fase de ruminante (Heinrichs, 2005; Khan et al., 2011). A semelhança entre os grupos quanto aos valores finais de perímetro torácico indica desenvolvimento morfofisiológico equivalente.

Quando interpretados de forma integrada aos resultados do microbioma fecal, os achados de crescimento sugerem que, embora a suplementação tenha influenciado a dinâmica microbiana e o comportamento dos animais, essas alterações não se refletiram em incrementos adicionais no ganho de peso. Esse resultado indica que o principal efeito do aditivo pode estar relacionado à estabilidade intestinal e à adaptação fisiológica, e não necessariamente ao aumento da deposição de tecido corporal. Em situações de desafio entérico, a manutenção do desempenho produtivo é um indicador relevante de resiliência, uma vez que distúrbios gastrointestinais frequentemente resultam em prejuízos ao crescimento. Nossos achados demonstram que o crescimento dos bezerros foi predominantemente determinado pelo avanço da idade, pelo sistema de criação a pasto e pelo manejo alimentar adotado. A suplementação com o aditivo multicomponente não promoveu nenhum ganho adicional de desempenho, os

animais mantiveram o crescimento dentro de padrões adequados.

3.3 Ingestão

Descritivamente, o comportamento de ingestão de líquido (leite e água) e concentrado apresentou padrão semelhantes (Tabela 6). No geral, a ingestão de leite foi o evento mais frequente na rotina, sendo registrada em mais de 90% das observações de oferta em ambos os grupos. No entanto, ao observar a frequência de episódios ao longo do dia , a água assumiu um papel central na atividade dos bezerros. Adicionalmente, animais do grupo controle apresentaram maior frequência de ingestão de água em comparação ao grupo tratado, o que pode estar relacionado ao maior tempo em atividades ao longo do dia, conforme evidenciado nas observações comportamentais. Esse maior nível de atividade pode ter aumentado a demanda hídrica desses animais, refletindo em maior número de eventos de consumo de água. Dessa forma, a ingestão hídrica parece estar mais associada ao padrão comportamental e ao nível de atividade dos bezerros do que a efeitos diretos da suplementação alimentar. Já a ingestão de concentrado apresentou a menor frequência relativa, refletindo o comportamento típico de bezerros jovens, cuja adaptação ao consumo sólido ocorre de forma gradual.

Tabela 6. Frequência (número de eventos) de ingestão de leite, água e concentrado por bezerros dos grupos controle e tratado.

Grupo	Leite (n)	Leite (%)	Água (n)	Água (%)	Concentrado (n)	Concentrado (%)
Controle	119	18,2	159	24,3	108	16,5
Tratado	128	18,8	147	21,6	107	15,7

Considerando que todos os animais apresentaram episódios de diarreia, a ingestão voluntária de água atua como um mecanismo crítico de defesa para mitigar a desidratação e manter a volemia, conforme observado por Jessop (2024). Além disso, a literatura indica que a integridade da mucosa intestinal influência diretamente o balanço osmótico; em cenários de alta pressão sanitária, como o verificado neste experimento, animais com maior comprometimento da barreira intestinal podem apresentar uma demanda hídrica aumentada para compensar a má absorção de líquidos no canal intestinal (Liu et al., 2022).

De maneira concomitante, observou-se que o consumo de concentrado, embora ainda em fase incipiente para ambos os grupos (média de 16% das observações), estabelece uma demanda fisiológica por ingestão hídrica adicional. Esse comportamento é essencial para viabilizar a hidratação do substrato sólido no interior do retículo-rúmen, provendo o meio aquoso necessário para a colonização microbiana e para os processos de fermentação inicial.

A literatura estabelece que a disponibilidade de água *ad libitum* é um fator determinante para o sucesso da transição nutricional em bezerros neonatos, a restrição hídrica, ainda que parcial, pode limitar o consumo de matéria seca e, consequentemente, retardar o desenvolvimento das papilas ruminais (Quigley et al., 2001).

No contexto deste estudo, a manutenção da ingestão de água, mesmo em animais com dieta predominantemente líquida, reforça a importância desse recurso na preparação do trato gastrintestinal para o desmame, garantindo que a umidade do conteúdo ruminal permaneça em níveis adequados para a manutenção da homeostase osmótica e atividade enzimática (Jessop, 2024).

3.4 Sanidade

Em nosso estudo, 100% dos animais avaliados (16/16) foram acometidos por diarreia (tabela 7), porém a duração dos episódios variou entre os grupos, o grupo tratamento apresentou diarreia com duração média de ~7,8 dias, enquanto o grupo controle teve média ligeiramente inferior (~7,5 dias). Além de comprometer a integridade da mucosa intestinal e retardar a maturação do trato gastrointestinal, episódios diarreicos estão associados a diversas alterações fisiológicas, como aumento de bactérias oportunistas, diminuição da eficiência de absorção de nutrientes, limitação do crescimento compensatório, mesmo após a recuperação clínica (Liu et al., 2022; Jessop, 2024). De forma semelhante, a pneumonia bovina representou outro desafio relevante, acometendo 56,25% dos bezerros (6/16, 3 animais do tratamento e 3 animais do controle). Os bezerros mantidos em sistemas a pasto podem ser mais suscetíveis à pneumonia devido à maior exposição a variações climáticas e agentes ambientais, como indicado por estudos que relatam maior prevalência de lesões respiratórias em sistemas extensivos. (Fernández, et al., 2020). Esta condição é crítica especialmente no período pós-desmame, quando o estresse e a imunossupressão aumentam a suscetibilidade a patógenos, resultando em menor ganho médio diário e maior risco de descarte precoce (Madureira Ferreira et al., 2024). Processos inflamatórios sistêmicos e o estresse associados à pneumonia podem influenciar indiretamente a homeostase intestinal. Episódios como apatia (25%, 3 animais do tratamento), diarreia sanguinolenta (12,5%, 1 animal do tratamento e 1 animal do controle), cólica, reações locais (inchaço de boleto/picada de abelha) e um caso isolado de clostridiose foram registrados.

Tabela 7. Incidência de condições clínicas e percentual de animais acometidos ao longo do experimento.

Evento / Condição	Percentual de animais afetados	Afetados por tratamento
Diarreia	100%	8 Controle e 8 Tratamento
Apatia	25%	3 Tratamento
Pneumonia / Princípio de Pneumonia	37,5%	3 Controle e 3 Tratamento
Cólica	6,25%	1 Controle
Fezes com sangue / Diarreia sanguinolenta	12,5%	1 Controle e 1 Tratamento
Inchaço / Reações Locais	6,25%	1 Tratamento
Clostridiose	6,25%	1 Controle
Soro Oral (2 L)	81,25%	8 Controle e 7 Tratamento

A análise individual (Tabela 8) reforça a precocidade no início dos episódios diarreicos, manifestando-se em média entre o 3º e o 8º dia de vida. O uso prolongado de antibioticoterapia (até 11 dias consecutivos em um animal do grupo tratado) e a necessidade de fluidoterapia oral em 81,25% (7 animais do tratamento e 8 animais do controle) do lote confirmam a gravidade do desafio sanitário. A disbiose transitória causada tanto pela enfermidade quanto pela pressão seletiva dos antibióticos intensifica a perda de líquidos, justificando a procura por água observada nos dados descritivos de ingestão.

O alojamento coletivo, embora favoreça o bem-estar social, facilita a transmissão horizontal de patógenos entéricos devido ao contato direto entre os animais e ao compartilhamento de áreas de descanso e alimentação (Svensson et al., 2003; Huuki et al., 2022; Gulliksen et al., 2009), o que pode ter contribuído para a taxa de morbidade de 100% observada precocemente. No entanto, é fundamental destacar que nenhum animal veio a óbito em decorrência direta da diarreia neonatal ou da pneumonia, indicando que, apesar do aumento na ocorrência de eventos clínicos, a criação coletiva não comprometeu a viabilidade dos animais. Esses achados sugerem que, sob condições adequadas de manejo, monitoramento sanitário e intervenção precoce, os benefícios associados à criação coletiva, particularmente em termos de bem-estar, adaptação comportamental e fisiológica, sobressaem a taxa de morbidade observada, sem impactos negativos sobre a sobrevivência ou o desempenho geral das bezerras.

Tabela 8. Cronologia da diarreia e intensidade do manejo terapêutico individual.

Animal	Grupo	Nascimento	Início Diarreia	Idade no Início	Duração do tratamento
1484	Controle	08/11/2024	15/11/2024	7 dias	5
1485	Tratamento	09/11/2024	15/11/2024	6 dias	5
1486	Controle	10/11/2024	18/11/2024	8 dias	5
1487	Tratamento	11/11/2024	17/11/2024	6 dias	6
1488	Controle	11/11/2024	18/11/2024	7 dias	6

1489	Tratamento	14/11/2024	20/11/2024	6 dias	11
1490	Tratamento	14/11/2024	20/11/2024	6 dias	10
1491	Controle	15/11/2024	20/11/2024	5 dias	10
1492	Tratamento	18/11/2024	25/11/2024	7 dias	8
1493	Controle	18/11/2024	26/11/2024	8 dias	8
1494	Controle	20/11/2024	26/11/2024	6 dias	9
1495	Tratamento	20/11/2024	28/11/2024	8 dias	8
1496	Controle	21/11/2024	28/11/2024	7 dias	7
1497	Tratamento	21/11/2024	29/11/2024	8 dias	7
1498	Tratamento	24/11/2024	30/11/2024	6 dias	7
1499	Controle	27/11/2024	30/11/2024	3 dias	10

3.5 Microbioma fecal

A análise longitudinal do microbioma fecal, abrangendo desde as primeiras 24 horas de vida até o dia 66 (D66), revelou uma sucessão ecológica robusta, caracterizada pela transição de um ambiente inicialmente aeróbio/facultativo para um ecossistema anaeróbio complexo e estável. Este padrão de maturação é consistente com a literatura sobre a ontogenia microbiana em mamíferos (Claus-walker et al., 2024; Hares et al., 2025). A α-diversidade avaliada pelos índices de riqueza e uniformidade, demonstrou um aumento ($p<0.001$) progressivo ao longo do período experimental, independentemente do tratamento administrado. Conforme observado na Figura 2A, a riqueza de espécies estimada pelo índice Chao1 parte de valores medianos próximos a 600 nas primeiras 24 horas e ascende para patamares superiores a 1000 no D60 e D66. Este cenário inicial de baixa diversidade é esperado, visto que nos primeiros dias, a microbiota é caracterizada pela predominância de microrganismos facultativos que prosperam em ambientes com alta disponibilidade de oxigênio residual (Du et al., 2023).

Comportamento similar foi verificado na Figura 2B, onde o índice de Shannon elevou de ~2.8 (24H) para valores acima de 4.5 nas fases finais. Segundo Melo et al. (2023), o aumento da α-diversidade é um biomarcador crucial de saúde intestinal, associando-se a uma maior resiliência do ecossistema contra perturbações externas. O período D30 é um fator chave no desenvolvimento da microbiota ruminal e na diversidade alfa coincide com um período fisiológico crítico de maturação do rúmen em neonatos ruminais. Estudos longitudinais indicam que a diversidade e composição da microbiota ruminal evoluem rapidamente nas primeiras semanas de vida, com tendência à estabilização após aproximadamente três a seis semanas de idade, refletindo a transição de um ecossistema microbiano inicial para uma comunidade mais complexa e resistente (Lima et al., 2024).

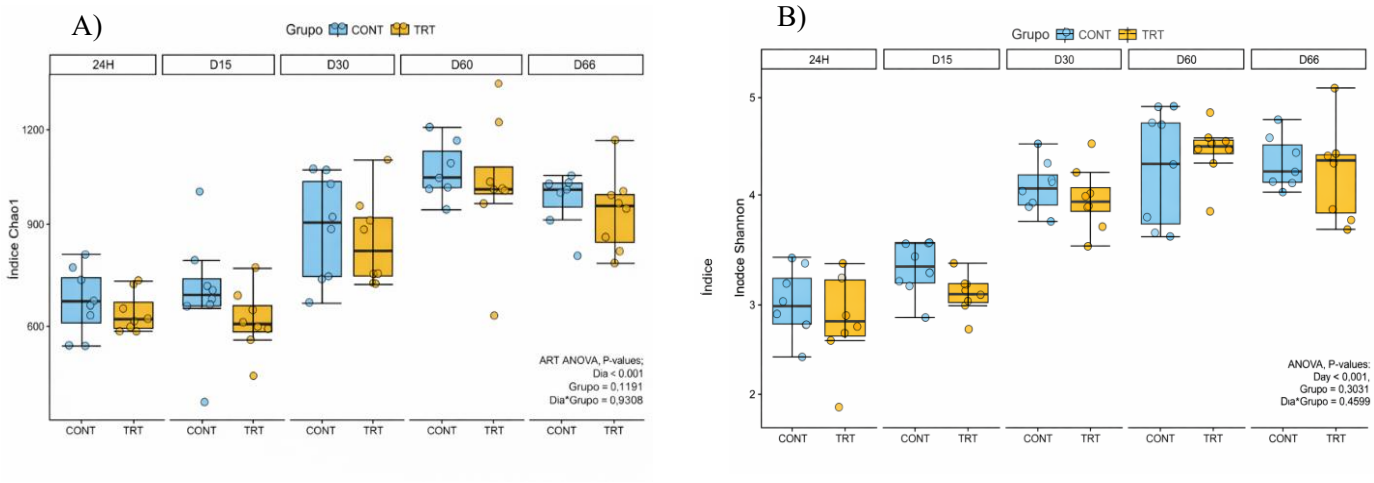


Figura 30. Dinâmica temporal da diversidade alfa do microbioma intestinal de bezerras leiteiras. (A) Evolução da riqueza microbiana estimada pelo índice de Chao1 ao longo dos dias de coleta (24H, D15, D30, D60 e D66); (B) Evolução do índice de diversidade de Shannon ao longo do mesmo período experimental. (B) Evolução do índice de diversidade de Shannon ao longo do mesmo período experimental.

A ingestão de alimentos sólidos, que geralmente aumenta nesse período, estimula a fermentação ruminal e a produção de ácidos graxos voláteis, especialmente butirato e propionato, fatores chave na diferenciação funcional das papilas ruminais e na maturação do epitélio ruminal. Esse processo de fermentação intensificada está associado ao estabelecimento de comunidades bacterianas mais diversificadas e anaeróbicas, garantindo maior estabilidade ecológica e funcional do rúmen (Oliveira et al., 2023; Yáñez-ruiz et al., 2015). Assim, a observação de um ponto de inflexão em D30 em métricas de α-diversidade apoia a ideia de que esse período representa um marco na ontogênese do rúmen, integrando mudanças microbianas com desenvolvimento estrutural e funcional do órgão.

A análise da dominância, representada na Figura 3, confirma que a comunidade se torna mais uniforme com a idade (menor dominância de um único táxon), um indicativo de eubiose. A ausência de diferenças estatísticas entre os grupos (CONT vs. TRT) sugere que a intervenção nutricional foi segura, preservando a ecologia nativa do intestino, um objetivo desejável em tratégias de modulação de precisão (Melo et al., 2023).

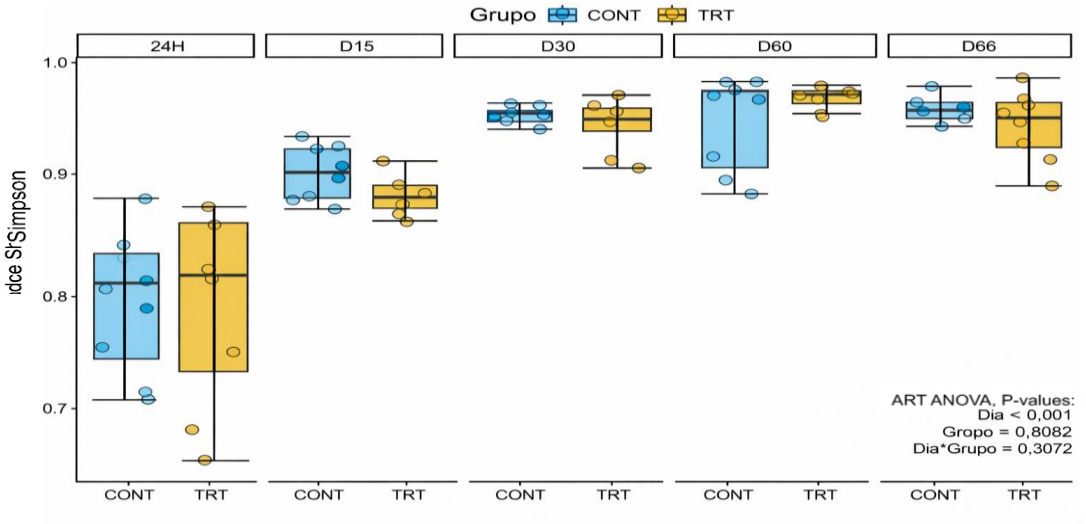


Figura 39. Avaliação da dominância na comunidade microbiana através do índice de Simpson.

A identificação de biomarcadores taxonômicos via MaAsLin3 permitiu mapear a substituição de colonizadores pioneiros por bactérias funcionais maduras. A comparação entre o período neonatal e a fase de acabamento revela uma inversão completa no perfil microbiano. Nas Figura 4 observa-se que as primeiras 24 horas (barras laranjas) são dominadas por Proteobacteria facultativas, incluindo gêneros como *Escherichia, Shigella, Klebsiella e Enterobacter*. Hares et al. (2025) descrevem essa fase inicial como crítica, onde o intestino rico em oxigênio favorece bactérias que podem atuar como patógenos oportunistas se a sucessão for interrompida. Estes achados corroboram Du et al. (2023), que descrevem a predominância inicial de *Enterobacteriaceae*, *Streptococcus* e *Lactobacillus* em nichos ricos em oxigênio. Apesar dessa dominância inicial de facultativos, é importante notar que microrganismos típicos de ruminantes adultos, como arqueias metanogênicas e gêneros fibrolíticos, podem ser detectados já nos primeiros dias de vida, embora em baixas abundâncias (Jami et al., 2013), preparando o terreno para a futura colonização estrita. Em contrapartida, os dias 60 e 66 (barras azuis nas respectivas figuras) são marcados pela abundância de anaeróbios estritos produtores de ácidos graxos de cadeia curta, como *Phocaeicola, Faecalibacterium, Bifidobacterium e Alistipes*. O *Faecalibacterium*, especificamente, é amplamente reconhecido por suas propriedades anti-inflamatórias e produção de butirato (Wang et al., 2014), consolidando o perfil de um intestino saudável e maduro.

A) B)

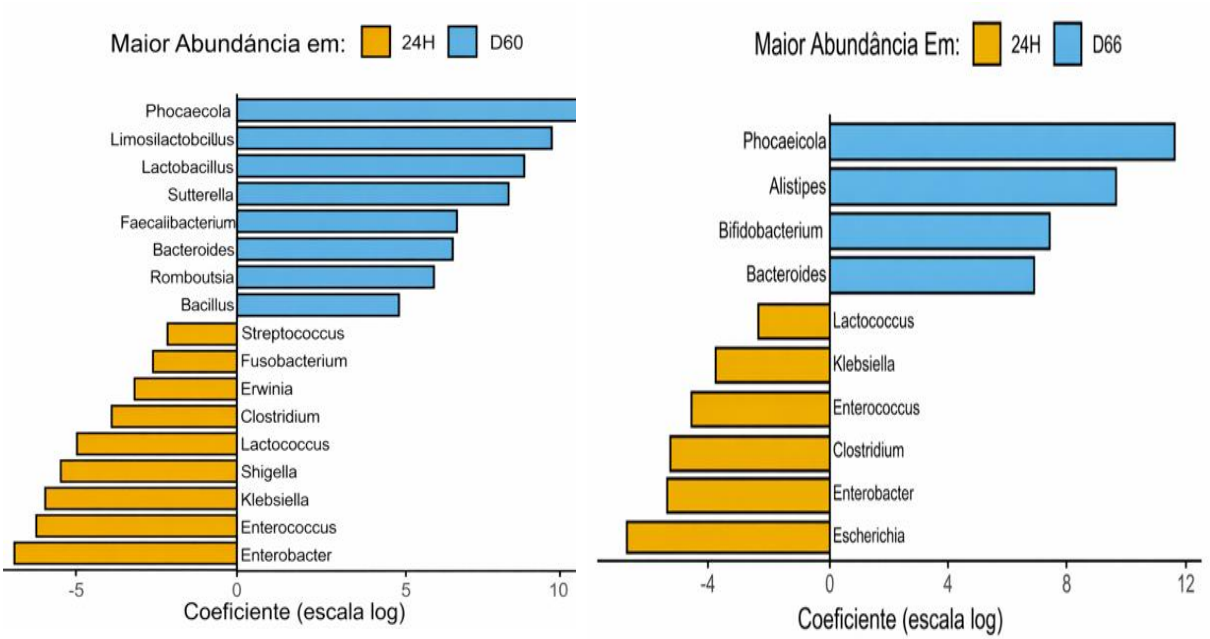


Figura 40. Comparação entre diferentes momentos da abundância relativa durante o período experimental. (A) Gêneros bacterianos diferencialmente abundantes entre as 24 horas de vida e o dia 60; (B) Comparação da abundância relativa de gêneros entre o pós-parto imediato (24H) e o final do período experimental (D66).

A Figura 5 destaca a redução de *Campylobacter* e o aumento de gêneros fermentadores, como *Clostridium* e *Parabacteroides*, no D30, indicando uma transição do microbioma intestinal para um perfil mais maduro e funcional. Esse padrão sugere maior capacidade fermentativa e metabólica da microbiota, associada à produção de ácidos graxos de cadeia curta e à maior estabilidade ecológica do ambiente intestinal, refletindo o avanço do desenvolvimento gastrointestinal dos animais nessa fase (Lima et al., 2024; Yáñez-ruiz et al., 2015).

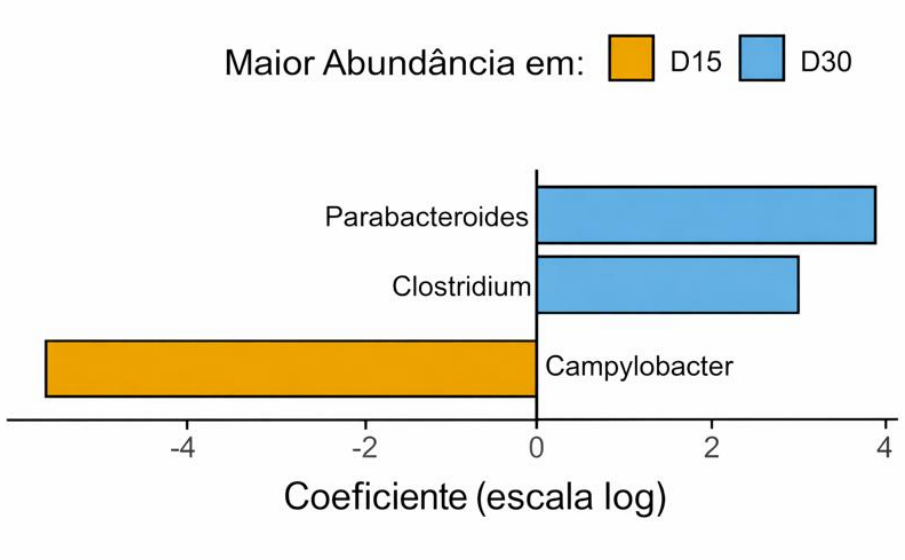


Figura 5. Transição taxonômica observada entre os dias 15 e 30.

Um ponto importante da maturação funcional é evidenciado na Figura 6, onde o metanogênico *Methanobrevibacter*, da família *Methanobacteriaceae*, aparece enriquecido no D60 (coeficiente positivo, barra azul), refletindo o estabelecimento progressivo de microrganismos anaeróbios estritos associados à fermentação avançada e ao desenvolvimento funcional do rúmen. A presença de metanogênicos indica um sistema de fermentação de polissacarídeos altamente eficiente, capaz de remover o H_2 (gás hidrogênio) gerado pela degradação de fibras, o acúmulo excessivo de H_2 no lúmen intestinal é termodinamicamente desfavorável, pois inibe a regeneração de NAD+ e, consequentemente, bloqueia a continuidade da fermentação bacteriana (Claus-walker et al., 2024). O Methanobrevibacter consome o H_2 endógeno para reduzir CO2 (dioxido de carbono) a CH4 (metano), reduzindo a pressão parcial do gás e desviando o fluxo metabólico para a produção de acetato e butirato, maximizando a extração de energia da dieta (Wang et al., 2014).

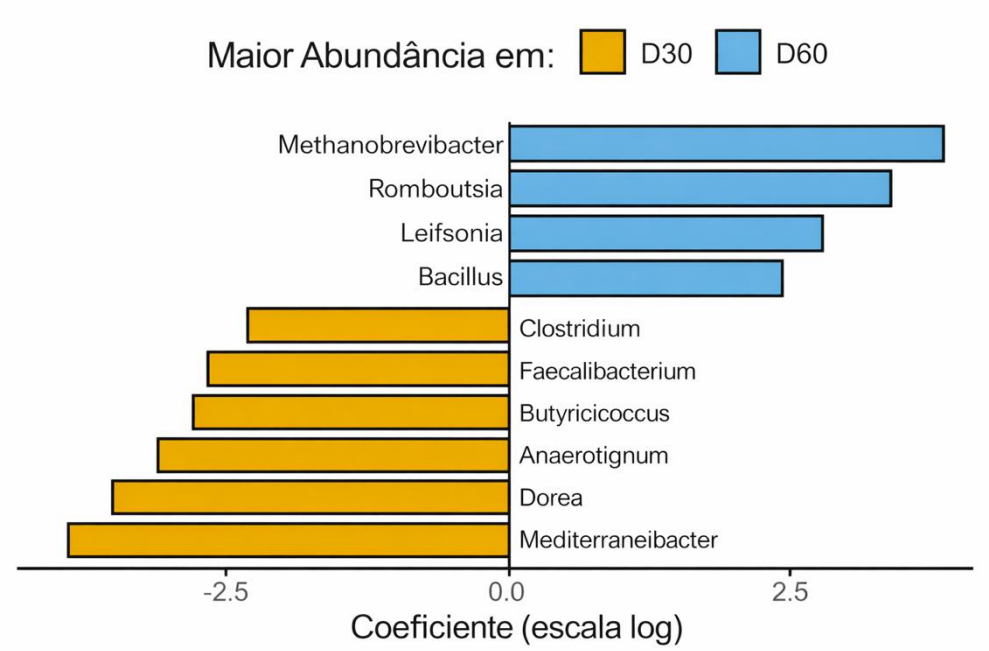


Figura 6. Biomarcadores microbianos identificados na comparação entre os dias 30 e 60.

Interessantemente, as comparações tardias apresentadas na Figuras 7 mostram que gêneros como *Limosilactobacillus* e *Lactobacillu*s têm maior abundância relativa nos dias 30 e 60 em comparação ao D66. Embora os *Lactobacillu*s sejam benéficos, sua redução relativa no final do período pode refletir a competição com a vasta diversidade de Bacteroidetes (ex. *Phocaeicola*) que assumem nichos especializados na degradação de dietas complexas nesta fase. Esta mudança taxonômica é consistente com a expansão de famílias como *Ruminococcaceae* e *Lachnospiraceae*, fundamentais para a fermentação de fibras e produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) (Rey et al., 2014; Yáñez-ruiz et al., 2015). A redução relativa de lactobacilos no final do período pode refletir a competição ecológica descrita por Rey et al. (2014), onde a diversidade de *Bacteroidetes* assume nichos especializados na degradação de carboidratos complexos.

As alterações observadas nos períodos finais também podem ser interpretadas à luz do processo de desmame e da transição nutricional associada. O desmame representa um evento fisiológico e ecológico marcante, caracterizado pela redução da ingestão de dieta líquida e pelo aumento progressivo do consumo de alimentos sólidos, o que modifica substancialmente a disponibilidade de substratos fermentáveis no trato gastrointestinal. Nesse contexto, microrganismos associados à digestão de componentes simples do leite, como os *Lactobacillu*s, tendem a reduzir sua abundância relativa, enquanto táxons especializados na degradação de carboidratos complexos e fibras passam a ocupar nichos

ecológicos dominantes. Assim, as diferenças observadas entre D30, D60 e D66 refletem não apenas o avanço da idade cronológica, mas também a adaptação funcional do microbioma intestinal ao período de transição alimentar imposto pelo desmame, conduzindo a comunidade microbiana a um estado mais estável e compatível com a dieta sólida e com a fisiologia digestiva do período pós-desmame (Rey et al., 2014; Yáñez-ruiz; Abecia; Newbold, 2015; Meale et al., 2017).

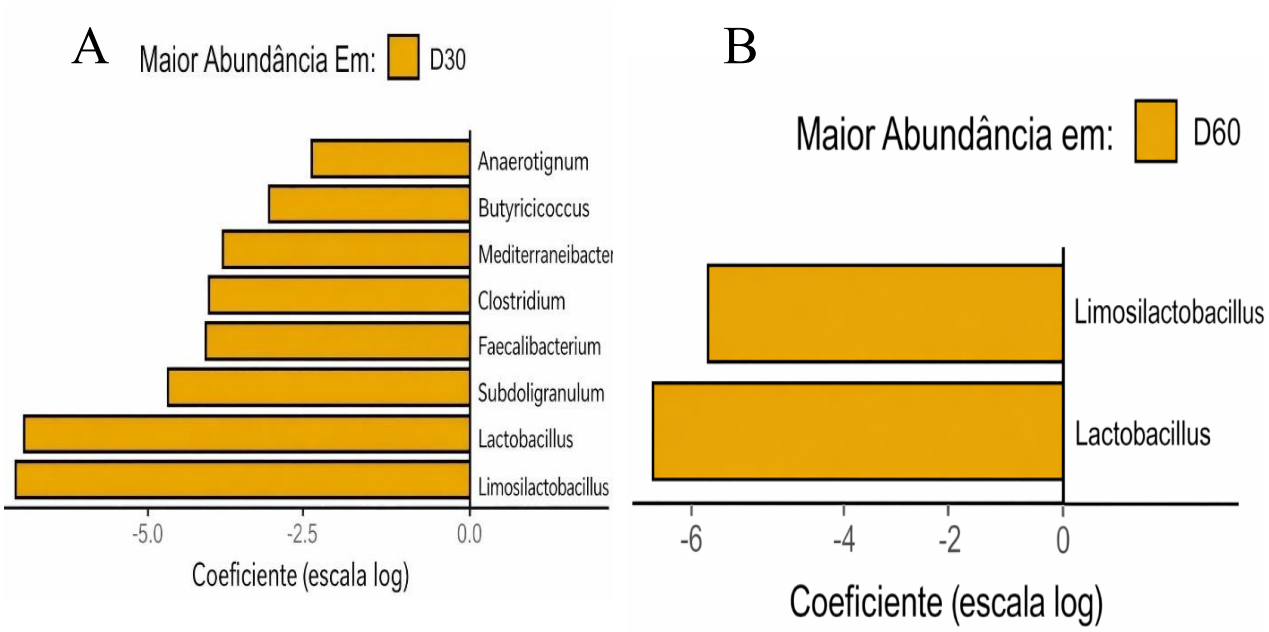


Figura 7. Variação da abundância de gêneros em comparação ao final do experimento D66 (A) Variação da abundância de gêneros da fase intermediária (D30 vs D66); (B) Ajustes finos na composição microbiana na fase final (D60 vs D66)

A ordenação multivariada foi realizada utilizando a Análise de Coordenadas Principais (PCoA), baseada na matriz de dissimilaridade de Bray-Curtis, a partir das abundâncias relativas das unidades taxonômicas. Enquanto a diversidade alfa avaliou a riqueza dentro de cada amostra, a diversidade beta permitiu visualizar a dissimilaridade entre as comunidades ao longo do tempo. A análise de coordenadas principais (PCoA), baseada na distância de Bray-Curtis, revelou um agrupamento distinto das amostras em função da idade dos animais.

Conforme demonstrado na Figura 8, o eixo principal (PCoA1), explicando 24,66% da variação, separa claramente as amostras do período neonatal (24H, agrupadas à esquerda) das fases de transição e acabamento. Observa-se uma migração temporal consistente onde, as amostras de 24H formam um *cluster* isolado e as amostras de D15 e D30 ocupam uma posição

intermediária inferior, e, finalmente, as amostras de D60 e D66 agrupam-se na região superior direita.

Este padrão confirma que a idade é o principal *driver* de variação na estrutura da comunidade microbiana, superando o efeito de qualquer intervenção externa, um fenômeno amplamente documentado na literatura de ruminantes (Jami et al., 2013). Além disso, observa-se uma sobreposição completa entre os elipses ou pontos dos grupos CONT (azul) e TRT (laranja) em todos os períodos de coleta. Isso reforça que o tratamento não induziu disbiose estrutural significativa, permitindo que a sucessão ecológica ocorresse de forma paralela ao grupo controle.

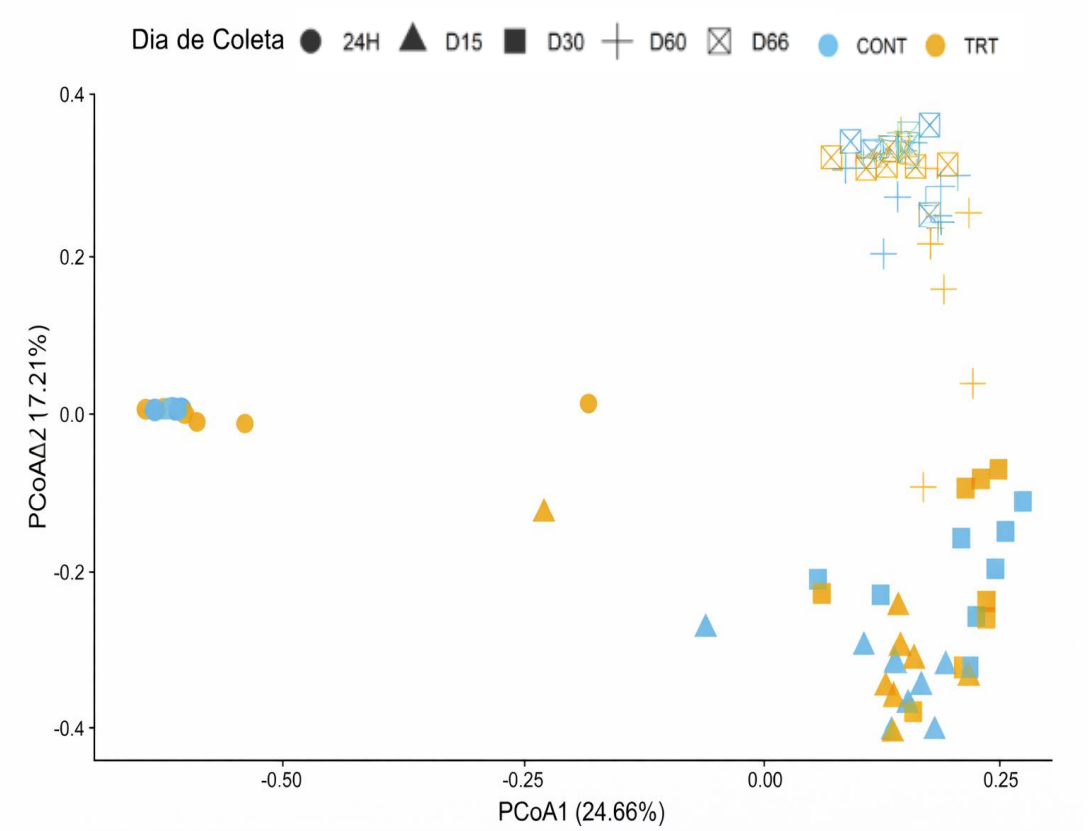


Figura 8. Gráfico PCoA por tratamento e dia de coleta.

A análise estatística multivariada foi conduzida por meio da PERMANOVA (adonis2), considerando os efeitos do tratamento (TREATMENT), do tempo de coleta (COLLECT) e da interação entre esses fatores, com 9.999 permutações.

Tabela 9. Resultados da análise de variância multivariada permutacional (PERMANOVA) baseada na distância de Bray-Curtis para a composição do microbioma intestinal de bezerros.

Fonte de variação	Df	Soma de	R^2	F	p-valor

		quadrados			
Tratamento	1	0,2093	0,0072	0,9336	0,4493
Coleta (Tempo)	4	12,8378	0,4423	4,3128	0,0001
Tratamento × Coleta	4	0,7332	0,0253	0,8174	0,7950
Resíduo	68	15,2481	0,5253	—	—
Total	77	29,0284	1,0000	—	—

Os resultados (tabela 9) indicaram que o tempo de coleta exerceu efeito sobre a estrutura da comunidade microbiana intestinal ($F = 14,3128$; $R^2 = 0,4423$; $p = 0,0001$), explicando aproximadamente 44,2% da variação total observada entre as amostras. Por outro lado, não foi observado efeito do tratamento sobre a β-diversidade ($F = 0,9336$; $R^2 = 0,0072$; $p = 0,4493$), indicando que o tratamento explicou apenas 0,72% da variação total da composição microbiana. Da mesma forma, a interação entre tratamento e tempo não apresentou efeito significativo ($F = 0,8174$; $R^2 = 0,0253$; $p = 0,7950$), sugerindo que a dinâmica temporal do microbioma ocorreu de maneira semelhante nos grupos Controle e Tratamento.

Do ponto de vista biológico, esses resultados indicam que a idade dos bezerros foi o principal fator determinante da estrutura do microbioma intestinal, corroborando estudos que descrevem o período neonatal e pré-desmame como fases de intensa reorganização microbiana. Trabalhos recentes demonstram que, nas primeiras semanas de vida, ocorre uma sucessão ecológica rápida, com substituição de microrganismos pioneiros por comunidades mais complexas e funcionalmente estáveis, fenômeno fortemente associado ao desenvolvimento fisiológico do trato gastrointestinal. (Carrier et al., 2024; Meale et al., 2021; Yáñez-ruiz et al., 2019.).

A ausência de efeito significativo do tratamento sobre a diversidade beta está de acordo com relatos da literatura que indicam que intervenções nutricionais ou aditivos tendem a apresentar efeitos mais evidentes quando o ambiente ruminal e intestinal se encontra mais funcionalmente estabelecido. Em bezerros jovens, a elevada plasticidade do microbioma pode mascarar diferenças estruturais entre grupos, resultando em padrões de composição semelhantes, especialmente quando avaliados por métricas globais como Bray-Curtis (Pitta et al., 2014; Meale et al., 2017; Yáñez-ruiz et al., 2019; Huuki et al., 2016.).

A análise de PERMANOVA pareada, baseada na distância de Bray-Curtis, revelou diferenças na composição do microbioma intestinal (Figura 9) entre todos os dias de coleta avaliados ($p = 0,0001$ para todas as comparações), evidenciando uma forte modulação temporal da comunidade microbiana ao longo do desenvolvimento das bezerras independente do tratamento.

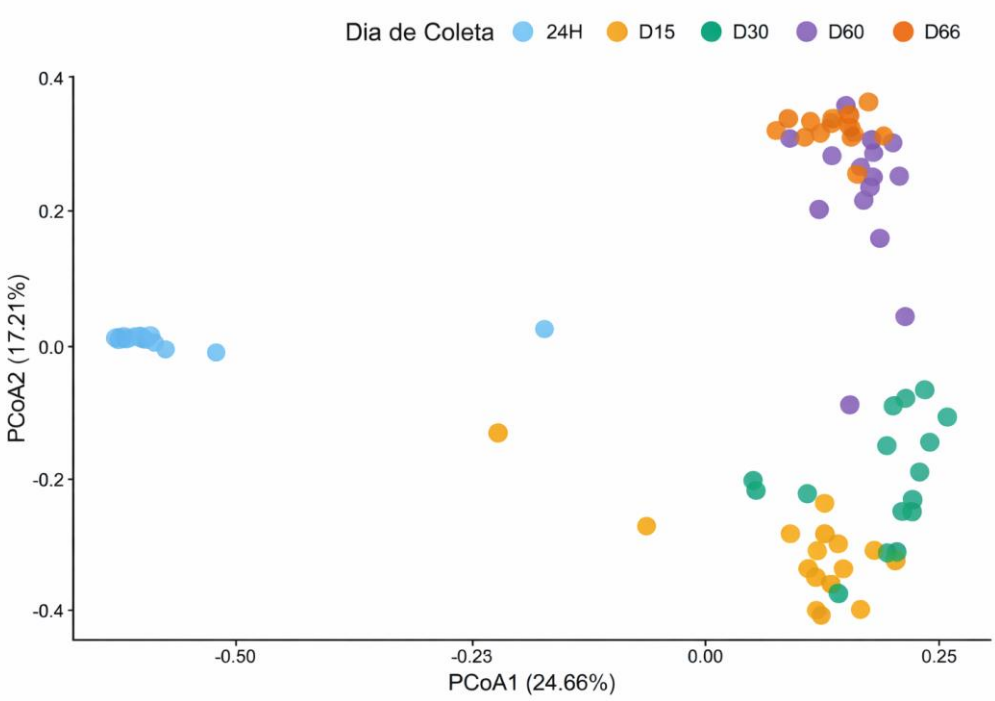


Figura 9. Gráfico PCoA por dia de coleta.

As comparações envolvendo o período de 24 horas apresentaram os maiores valores de R^2, indicando mudanças mais pronunciadas na estrutura microbiana entre o nascimento e os períodos subsequentes. Destacam-se as comparações 24H vs. D30 (R^2 = 0,5080; F = 30,97) e 24H vs. D66 (R^2 = 0,4670; F = 25,41), demonstrando que mais de 46% da variação na composição microbiana foi explicada pelo avanço da idade nesses intervalos. As comparações entre períodos intermediários também foram significativas, porém com menores magnitudes de efeito, como observado em D15 vs. D30 (R^2 = 0,1264) e D30 vs. D60 (R^2 = 0,2130), indicando que, após a colonização inicial, as mudanças na comunidade microbiana tornam-se progressivamente mais graduais.

Mesmo entre os períodos finais (D60 vs. D66), foi observada diferença (R^2 = 0,0813), embora com o menor valor de explicação da variância, sugerindo que o microbioma fecal já se encontrava em um estágio avançado de estabilização, com alterações estruturais mais sutis e graduais. Esse comportamento é consistente com estudos longitudinais que demonstram que, após um período inicial de sucessão ecológica intensa, a microbiota intestinal de ruminantes jovens tende a apresentar menor variabilidade temporal, refletindo maior estabilidade ecológica e funcional do ecossistema (Yáñez-ruiz et al., 2019; Lima et al., 2024).

De forma integrada, os resultados indicam que o microbioma intestinal dos bezerros passa por profundas reorganizações estruturais nas primeiras semanas de vida, seguidas por

um processo progressivo de maturação e convergência composicional ao longo do período experimental. Trabalhos prévios descrevem que essa trajetória de desenvolvimento microbiano é fortemente modulada pela idade, pela adaptação fisiológica do trato gastrointestinal e pela consolidação do ambiente anaeróbio intestinal, fatores que tendem a reduzir a magnitude das diferenças entre períodos consecutivos à medida que os animais envelhecem (Meale et al., 2017; Huuki et al., 2022).

A clara influência do tempo de coleta, associada à ausência de interação tratamento × tempo, reforça a interpretação de que a maturação microbiana seguiu um padrão fisiológico natural, independentemente do grupo experimental. Esse comportamento é consistente com estudos que descrevem uma trajetória comum de desenvolvimento do microbioma intestinal em ruminantes jovens (Yáñez-ruiz et al., 2019; Demey et al., 2019; Lima et al., 2024), marcada por convergência estrutural à medida que os animais envelhecem.

A modelagem linear multivariada (MaAsLin3), apresentada na Figura 10, integra os dados de abundância e prevalência para identificar os principais drivers de variação taxonômica. A análise corrobora que a idade (Tempo) foi o fator determinante na estruturação da comunidade, independente do tratamento. No painel esquerdo (Dot Plot), os coeficientes betas negativos para *Escherichia, Shigella, Klebsiella* e *Enterobacter* nos dias 30 e 60 confirmam a redução significativa desses patógenos oportunistas em relação ao basal. Em contraste, gêneros benéficos como *Limosilactobacillus, Phocaeicola* e *Faecalibacterium* apresentam coeficientes positivos, indicando seu estabelecimento progressivo.

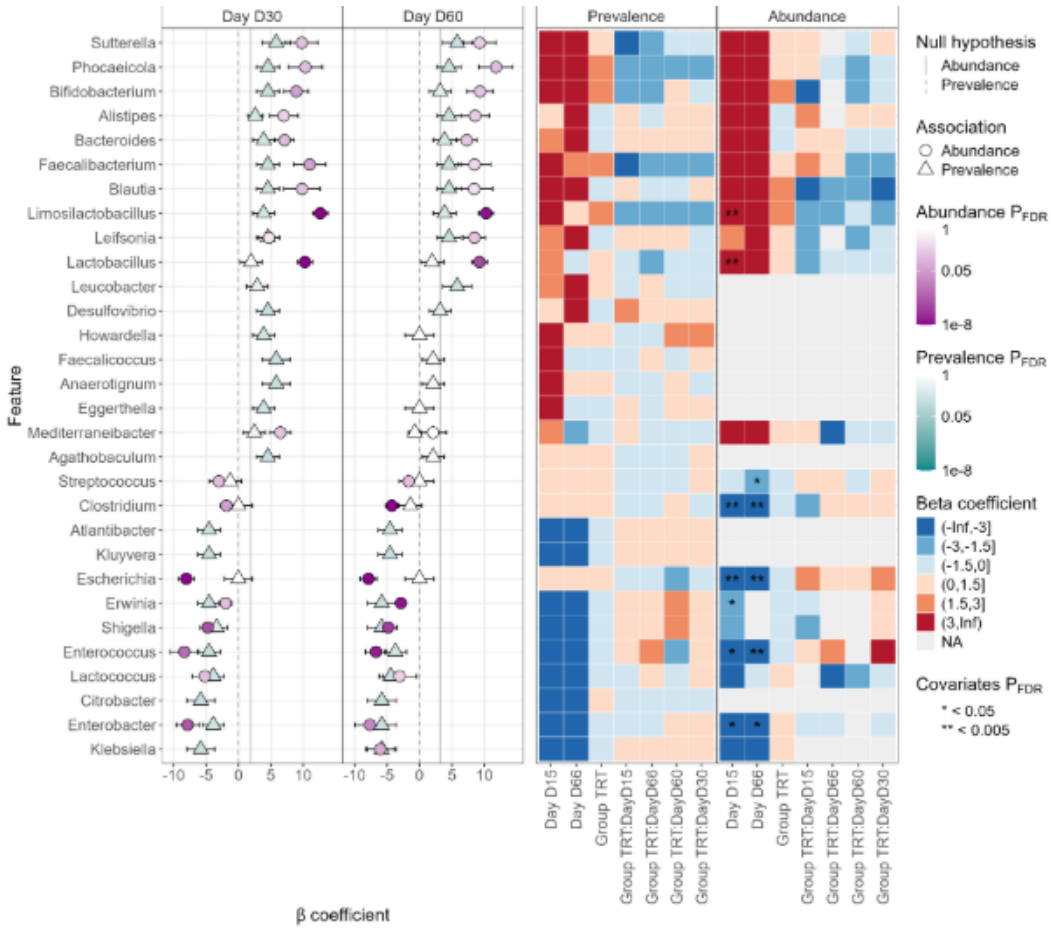


Figura 10. Resumo global das associações significativas identificadas pelo modelo linear multivariado (MaAsLin3).

O mapa de calor (painel direito) detalha a significância estatística ($p < 0.05$, indicado por asteriscos). Observa-se uma zona azul intensa (coeficientes negativos) para *Escherichia* e *Enterococcus* no dia 66, validando a exclusão competitiva desses grupos na fase final. Crucialmente, a coluna referente ao efeito principal do tratamento (Group vs. TRT) e suas interações com o tempo (Group TRT:Day) apresentam predominância de cores neutras e ausência de significância estatística. Isso atesta que a suplementação não perturbou a trajetória natural de maturação do microbioma, preservando a sucessão ecológica desejável observada no grupo controle.

Do ponto de vista ecológico e funcional os resultados deste estudo evidenciam que o desenvolvimento do microbioma fecal das bezerras, do nascimento até os 66 dias de vida, seguiu um padrão de sucessão ecológica resiliente, caracterizado pela transição de uma comunidade dominada por proteobactérias facultativas para um ecossistema anaeróbio complexo. Esta evolução ocorreu a despeito do desafio imposto pela administração terapêutica de antibióticos em todos os animais, fator que reconhecidamente exerce pressão seletiva sobre

a microbiota e pode reduzir a diversidade microbiana (Yáñez-ruiz et al., 2015).

A predominância inicial de gêneros como *Escherichia* e *Shigella* nas primeiras 24 horas reflete não apenas o ambiente intestinal rico em oxigênio do neonato, mas possivelmente uma disbiose transitória exacerbada pela pressão antimicrobiana, favorecendo oportunistas resistentes (Du et al., 2023). Sob a ótica da sanidade, a presença elevada destes patógenos potenciais representa um período de vulnerabilidade imunológica. No entanto, a elevação significativa dos índices de diversidade (Shannon e Chao1) e a redução da dominância (Simpson) ao longo do tempo demonstram a capacidade de recuperação (resiliência) do ecossistema intestinal.

A substituição progressiva desses colonizadores iniciais por bactérias produtoras de butirato, como *Faecalibacterium* e *Phocaeicola*, e o estabelecimento de arqueias metanogênicas (*Methanobrevibacter*) no dia 60, são indicadores diretos de restabelecimento da saúde intestinal e funcionalidade metabólica. A presença destes microrganismos sugere a restauração da barreira mucosa e a eficiência na fermentação de fibras, processos essenciais para o desempenho zootécnico e a exclusão competitiva de patógenos (Wang et al., 2014; Claus-walker et al., 2024). Adicionalmente, a ausência de diferenças na diversidade alfa e beta entre os grupos (Controle *vs.* Tratamento) indica que a intervenção nutricional testada não interferiu negativamente no processo de recolonização pós-antibiótico, podendo ter sido afetada positivamente pelo sistema de criação coletivo. Em suma, o manejo empregado permitiu que os animais superassem o desafio inicial e a exposição a antimicrobianos, alcançando, ao final do período de aleitamento, um estado de eubiose característico de animais maduros e saudáveis, conforme os modelos de adaptação à dieta sólida descritos por Rey et al. (2014) e Hares et al. (2025).

3.5.1 Efeito do antibiótico na coleta de fezes

Durante o período experimental, o uso de antibióticos ocorreu de forma pontual, exclusivamente por indicação clínica individual, sem aplicação profilática ou em nível de lote. Com o objetivo de avaliar possível interferência sobre as análises do microbioma fecal, foi realizado o cruzamento entre os períodos de medicação e as datas de coleta de fezes (tabela 10). Considerando uma janela de até tres dias anteriores à coleta, observou-se que apenas 4 amostras do D15 foram potencialmente expostas ao efeito residual do antibiótico, havendo sobreposição direta com períodos críticos de coleta exclusivamente de uma amostra. Dessa forma, o uso de antibióticos foi considerado controlado e de impacto mínimo sobre os padrões globais de diversidade e composição microbiana observados no estudo.

Os antimicrobianos utilizados durante o experimento foram exclusivamente enrofloxacina (Baytril®/Enrofloxacina) e marbofloxacina (Marbox®), ambos administrados por via intramuscular (IM). Esses fármacos apresentam rápida absorção sistêmica após a aplicação IM, com pico plasmático em poucas horas. A enrofloxacina possui meia-vida de eliminação relativamente curta em bovinos (aproximadamente 3–4 horas), enquanto a marbofloxacina apresenta meia-vida um pouco mais prolongada (em torno de 8–10 horas), embora ambas sejam caracterizadas por ampla distribuição tecidual e ação bactericida dependente da concentração. Considerando essas características farmacocinéticas e o tempo necessário para que possíveis alterações no microbioma intestinal se tornem detectáveis, adotou-se uma janela de até três dias (48–72 horas) antes da coleta para a classificação do efeito residual do antimicrobiano sobre as amostras fecais, contemplando tanto o período de absorção quanto o atraso esperado entre a exposição ao antibiótico e a resposta microbiana.

Tabela 10. Caracterização dos animais quanto ao grupo experimental, datas de coleta e status de exposição a antibióticos ao longo do período experimental.

ID	Grupo	Coleta D15 (EFEITO)	Coleta D30 (EFEITO)	Coleta D60 (EFEITO)	Coleta D66 (EFEITO)
1484	Controle	29/nov (AB–)	13/dez (AB–)	14/jan (AB–)	20/jan (AB–)
1485	Trat.	01/dez (AB–)	13/dez (AB–)	14/jan (AB–)	20/jan (AB–)
1486	Controle	29/nov (AB–)	16/dez (AB–)	14/jan (AB–)	20/jan (AB–)
1487	Trat.	30/nov (AB–)	13/dez (AB–)	14/jan (AB–)	20/jan (AB–)
1488	Controle	02/dez (AB–)	17/dez (AB–)	22/jan (AB–)	27/jan (AB–)
1489	Trat.	**02/dez (AB+)**	17/dez (AB–)	21/jan (AB–)	27/jan (AB–)
1490	Trat.	**02/dez (AB+)**	17/dez (AB–)	22/jan (AB–)	27/jan (AB–)
1491	Controle	**02/dez (AB+)**	17/dez (AB–)	21/jan (AB–)	27/jan (AB–)
1492	Trat.	09/dez (AB–)	22/dez (AB–)	20/jan (AB–)	26/jan (AB–)
1493	Controle	09/dez (AB–)	22/dez (AB–)	20/jan (AB–)	26/jan (AB–)
1494	Controle	10/dez (AB–)	22/dez (AB–)	---	---
1495	Trat.	09/dez (AB–)	22/dez (AB–)	20/jan (AB–)	26/jan (AB–)
1496	Controle	11/dez (AB–)	27/dez (AB–)	28/jan (AB–)	03/fev (AB–)
1497	Trat.	11/dez (AB–)	26/dez (AB–)	28/jan (AB–)	03/fev (AB–)
1498	Trat.	11/dez (AB–)	26/dez (AB–)	28/jan (AB–)	03/fev (AB–)
1499	Controle	**11/dez (AB+)**	26/dez (AB–)	28/jan (AB–)	03/fev (AB–)

A tabela apresenta a identificação dos animais (ID), o grupo experimental (Controle ou Tratamento) e as datas de coleta nos dias D15, D30, D60 e D66, acompanhadas do status de exposição a antibióticos. A classificação AB– indica ausência de efeito de antibiótico no período próximo à coleta, enquanto AB+ indica presença de efeito de antibiótico, considerando um período mínimo de tres dias de influência anterior à coleta. Símbolos "---" indicam ausência de coleta no respectivo período.

4. CONCLUSÕES

A suplementação com o aditivo alimentar multicomponente não exerceu influência determinante sobre o crescimento, comportamento ingestivo ou na estrutura global do microbioma fecal de bezerras leiteiras durante o período avaliado. Os efeitos esperados desse tipo de intervenção nutricional tendem a ser secundários frente aos processos fisiológicos naturais de desenvolvimento do trato gastrointestinal e de maturação microbiana. Adicionalmente, a criação coletiva dos animais pode ter desempenhado papel relevante na modulação da microbiota intestinal, favorecendo processos de recolonização microbiana, especialmente após episódios de diarreia e eventuais tratamentos com antimicrobianos. Esse ambiente compartilhado pode ter contribuído para a homogeneização da microbiota entre os indivíduos, reduzindo possíveis diferenças atribuíveis à suplementação e indicando que fatores de manejo podem exercer influência mais marcante do que intervenções nutricionais isoladas nesse período.

Durante o período neonatal e pré-desmame, o tempo e o estágio de desenvolvimento fisiológico do animal constituem os principais determinantes da organização do microbioma fecal e das respostas comportamentais, sobrepondo-se aos efeitos de intervenções nutricionais pontuais. Além disso, considerando que o aditivo avaliado possui potencial de ação predominantemente ruminal, seus efeitos podem não ser plenamente expressos nessa fase, caracterizada por um processo ainda em transição de funcionalidade e estabelecimento da atividade ruminal. Assim, a eficácia de aditivos com esse perfil funcional depende do grau de maturidade do sistema digestivo, o que deve ser considerado no delineamento e na interpretação de estudos conduzidos em fases iniciais da vida.

Referências

Alves, T. C.; De-Sousa, K. T.; Gomes, P. C.; Paris, V. T.; Deniz, M. Pasture access and social housing influence the behaviour of dairy calves. **Journal of Dairy Research**, v. 91, n. 3, p. 293–297, 2024. Disponível em: https://doi.org/10.1017/S0022029924000633.

Amin, N.; Seifert, J. Dynamic progression of the calf's microbiome and its influence on host health. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, v. 19, p. 989-1001, 2021. DOI: 10.1016/j.csbj.2021.01.035

Bach, A. Associations between several aspects of heifer development and dairy cow survivability to second lactation. **Journal of Dairy Science**, v. 95, p. 1057–1065, 2012. DOI: 10.3168/jds.2010-3633.

Baldwin, R.; Mcleod, K.; Klotz, J.; Heitmann, R. Rumen Development, Intestinal Growth and Hepatic Metabolism. In: The Pre and Postweaning Ruminant. **Journal of Dairy Science**, v. 87, 2004. DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(04)70061-2.

Bartlett, K. S.; Mckeith, F. K.; Vandehaar, M. J.; Dahl, G. E.; Drackley, J. K. Growth and body composition of dairy calves fed milk replacers containing different amounts of protein at two feeding rates. **Journal Animal Science**, v. 84, n. 6, p. 1454-1467, 2006. DOI: 10.2527/2006.8461454x.

Bittar, C. M. M.; Ferreira, L. S.; Santos, F. A. P.; Zopollatto, M. Desempenho e desenvolvimento do trato digestório superior de bezerros leiteiros alimentados com concentrado de diferentes formas físicas. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 38, n. 8, p. 1561– 1567, 2009. Disponível em: https://doi.org/10.1590/S1516-35982009000800021.

Bittar, C. M.; Marques, T.; Azevedo, R.; Coelho, S. **Manual de boas práticas na criação de bezerras leiteiras - maternidade, parto, cuidados iniciais e colostragem**. 2022. DOI: 10.26626/978-65-5668-080-4.2022B0001.

Blanch, A. Application of probiotics, prebiotics, and synbiotics in ruminants. **NutriNew**s, 27 maio 2020. Disponível em: https://www.nutrinews.com/en/application-of-probiotics-prebiotics-and-synbiotics-in-ruminants/. Acesso em: 6 out. 2025.

Brasil. Ministério da Agricultura e Pecuária (MAPA). Atualização SOBRE Uso Racional DE Antimicrobianos E Boas Práticas DE Produção. Brasília: **MAPA**, [2022]. Disponível em: https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-pecuarios/resistencia-aos-antimicrobianos/publicacoes/Apostila_AtualizaosobreUsoRacionaldeAntimicrobianoseBoasP rticasdeProduo.pdf. Acesso em: 17 out. 2025.

Broom, D. M. Indicators of poor welfare. **British Veterinary Journal**, v. 142, n. 6, p. 524- 526, 1986. DOI: 10.1016/0007-1935(86)90109-0.

Cangiano, L. R.; Yohe, T. T.; Steele, M. A.; Renaud, D. L. Invited Review: Strategic use of microbial-based probiotics and prebiotics in dairy calf rearing. **Applied Animal Science**,

v. 36, n. 5, p. 630-651, 2020. DOI: 10.15232/aas.2020-02049.

Cattaneo, L.; Lopreiato, V.; Piccioli-Cappelli, F.; Trevisi, E.; Minuti, A. Effect of supplementing live Saccharomyces cerevisiae yeast on performance, rumen function, and metabolism during the transition period in Holstein dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 106, n. 6, p. 4353-4365, 2023. DOI: 10.3168/jds.2022-23046.

Claus-Walker, R. A.; Guinn, J. M. B.; Kesser, J. L.; Swartz, T. H.; Ganda, E. Characterization of the preweaned Holstein calf fecal microbiota prior to, during, and following resolution of uncomplicated gastrointestinal disease. **Frontiers in Microbiology**, v. 15, p. 1388489, 2024.

Chapman, C. E.; Erickson, P. S.; Quigley, J. D.; Hill, T. M.; Bateman, H. G. 2nd; Suarez-Mena, F. X.; Schlotterbeck, R. L. Effect of milk replacer program on calf performance and digestion of nutrients with age of the dairy calf. **Journal of Dairy Science**, v. 99, n. 4, p. 2740-2747, 2016. DOI: 10.3168/jds.2015-10372.

Chaucheyras-Durand, F.; Durand, H. Probiotics in animal nutrition and health. **Beneficial Microbes**, v. 1, p. 3–9, 2010. DOI: 10.3920/BM2008.1002.

Dado-Senn, B.; Ouellet, V.; Dahl, G. E.; Laporta, J. Methods for assessing heat stress in preweaned dairy calves exposed to chronic heat stress or continuous cooling. **Journal of Dairy Science**, v. 103, n. 9, p. 8587-8600, 2020. DOI: 10.3168/jds.2020-18381.

De Passillé, A. M.; Rabeyrin, M.; Rushen, J. Associations between milk intake and activity in the first days of a calf's life and later growth and health. Applied **Animal Behaviour Science**, v. 175, p. 2-7, 2016. DOI: 10.1016/j.applanim.2014.10.002.

Diao, q.; zhang, r.; fu, t. Review of Strategies to Promote Rumen Development in Calves. **Animals (Basel)**, v. 9, n. 8, p. 490, 2019. DOI: 10.3390/ani9080490.

Dias, J.; Marcondes, M.; Motta De Souza, S.; Silva, B.; Noronha, M.; Resende, R.; Machado, F.; Mantovani, H.; Dill-Mcfarland, K.; Suen, G. Assessing bacterial community dynamics across the gastrointestinal tract of dairy calves during pre-weaning development. **Applied and environmental microbiology**, v. 84, 2018. DOI: 10.1128/AEM.02675-17.

Dill-Mcfarland, K. A.; Weimer, P. J.; Breaker, J. D.; Suen, G. Diet Influences Early Microbiota Development in Dairy Calves without Long-Term Impacts on Milk Production. **Applied and environmental microbiology**, v. 85, n. 2, e02141-18, 2019. DOI: 10.1128/AEM.02141-18.

Donadio, J. P.; De-Sousa, K. T.; Alves, T. C.; Hötzel, M. J.; Deniz, M. The use of nipple water trough for group-housed dairy calves reduces cross-sucking. Applied **Animal Behaviour Science**, v. 289, p. 106684, 2025. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.applanim.2025.106684.

Dos Santos, G.; Silva, J. T.; Santos, F. H. R.; Bittar, C. M. M. Nutritional and microbiological quality of bovine colostrum samples in Brazil. **Revista Brasileira De Zootecnia**, v. 46, n. 1, p. 72–79, 2017. DOI: 10.1590/S1806-92902017000100011

Dos Santos, T. L.; Favaretto, J. A. R.; Brunetto, A. L. R.; Zatti, E.; Marchiori, M. S.; Pereira, W. A. B.; Bajay, M. M.; Da Silva, A. S. Dietary additive combination for dairy calves after weaning has a modulating effect on the profile of short- chain fatty acids in the rumen and fecal microbiota. **Fermentation**, v. 10, n. 10, p. 528, 2024. DOI: 10.3390/fermentation10100528.

Drackley, J. K. Calf nutrition from birth to breeding. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 24, n. 1, p. 55–86, 2008. DOI: 10.1016/j.cvfa.2008.01.001.

Du, Y.; Gao, Y.; Hu, M.; Hou, J.; Yang, L.; Wang, X.; Du, W.; Liu, J.; Xu, Q. Colonization and development of the gut microbiome in calves. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, v. 14, n. 46, 2023. DOI: 10.1186/s40104-023-00856-x.

El Hassan, S. M.; Newbold, C. J.; Edwards, I. E.; Topps, J. H.; Wallace, R. J. Effect of yeast culture on fermentation characteristics of a simulation of rumen ecosystem. **Journal of Animal Science**, v. 74, p. 1942–1949, 1996. DOI: 10.1017/S1357729800014296.

EMBRAPA. **Anuário Leite 2021**. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2021. Disponível em: http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/1132875.

FAO. FAOSTAT - **Livestock Primary**. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2022. Disponível em: https://openknowledge.fao.org/server/api/core/bitstreams/0c372c04-8b29-4093-bba6-8674b1d237c7/content.

FAO/WHO. Guidelines for the evaluation of probiotics in food. London, 2002. Disponível em: ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/wgreport2.pdf.

Gibson, G. R.; Roberfroid, M. B. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. **Journal of Nutrition** v. 125, n. 6, p. 1401-1412, 1995. DOI: 10.1093/jn/125.6.1401.

Godden, S. M.; Lombard, J. E.; Woolums, A. R. Colostrum Management for Dairy Calves. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 35, n. 3, p. 535-556, 2019. DOI: 10.1016/j.cvfa.2019.07.005.

Gulliksen, S. M.; Jor, E.; Lie, K. I.; Løken, T.; Åkerstedt, J.; Østerås, O. Enteropathogens and risk factors for diarrhea in Norwegian dairy calves. **Journal of Dairy Science**, v. 92, n. 10, p. 5057–5066, 2009.

Hares, M. F.; Coombes, N. A.; Villarroel, A.; Dapkevicius, M. L. N. E.; Hills, K.; Coldham, N. G.; Vordermeier, H. M.; Jones, M. A. Progression of the faecal microbiome in preweaning dairy calves that develop cryptosporidiosis. **Animal Microbiome**, v. 7, n. 1, p. 3, 2025.

Henderson G, Cox F, Ganesh S, Jonker A, Young W; Janssen P. H. Rumen microbial community composition varies with diet and host, but a core microbiome is found across a wide geographical range**. Scientific Reports**. 2015 Oct 9;5:14567. doi:

10.1038/srep14567.

Heinrichs, A. J.; Heinrichs, B. S. A prospective study of calf factors affecting first-lactation and lifetime milk production and age of cows when removed from the herd. **Journal of Dairy Science**, v. 94, n. 1, p. 336–341, 2011.

Heinrichs, A. J.; Jones, C. M.; Heinrichs, B. S. Effects of mannan oligosaccharide or antibiotics in neonatal diets on health and growth of dairy calves. **Journal of Dairy Science**, v. 86, n. 12, p. 4064-4069, 2003. DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(03)74018-1.

Hooper, L. V.; Macpherson, A. J. Immune adaptations that maintain homeostasis with the intestinal microbiota. **Nature Reviews Immunology**, v. 10, n. 3, p. 159-169, 2010. DOI: 10.1038/nri2710.

Huuki, H.; Tapio, M.; Mäntysaari, P.; Negussie, E.; Ahvenjärvi, S; Vilkki, J; Vanhatalo, A; Tapio, I. Long-term effects of early-life rumen microbiota modulation on dairy cow production performance and methane emissions. **Frontiers in Microbiology**, [S. l.], v. 13, art. 983823, p. 1-15, nov. 2022. DOI: https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.983823.

IBGE. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). Produção da
Pecuária Municipal 2023. Rio de Janeiro: **IBGE, 2023**. v. 51. Disponível em:https://www.gov.br/mpa/ptbr/assuntos/noticias/ppm_2023_v51_br_informativo.pdf. Acesso em: 17 out. 2025.

Işik, M.; Ekimler, F.; Özen, N.; Firat, M. Effects of using probiotics on the growth performance and health of dairy calves. **Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences**, v. 28, p. 63-69, 2004.

Jami, E.; Israel, A.; Kotser, A.; Mizrahi, I. Exploring the bovine rumen bacterial community from birth to adulthood. **The ISME Journal**, v. 7, p. 1069–1079, 2013. DOI: 10.1038/ismej.2013.2.

Jessop, E.; Li, L.; Renaud, D. L.; Verbrugghe, A.; Macnicol, J.; Gamsjäger, L.; Gomez, D. E. Neonatal calf diarrhea and gastrointestinal microbiota: etiologic agents and microbiota manipulation for treatment and prevention of diarrhea. **Veterinary Sciences**, v. 11, n. 3, art. 108, 2024. Disponível em: https://doi.org/10.3390/vetsci11030108.

Khan, M. A.; Bach, A.; Godden, S. M. Invited review: Transitioning from milk to solid feed in dairy heifers. **Journal of Dairy Science**, v. 94, n. 3, p. 1071–1081, 2011 DOI 10.3168/jds.2015-9975.

Khan, M. A.; Lee, H. J.; Lee, W. S.; Kim, H. S.; Ki, K. S.; Hur, T. Y.; Suh, G. H.; Kang, S. J.; Choi, Y. J. Structural growth, rumen development, and metabolic and immune responses o Holstein male calves fed milk through step-down and conventional methods. **Journal of Dairy Science**, v. 90, n. 7, p. 3376-3387, 2007. DOI: 10.3168/jds.2007-0104.

Kraimi N, Dawkins M, Gebhardt-Henrich Sg, Velge P, Rychlik I, Volf J, Creach P, Smith A, Colles F, Leterrier C. Influence of the microbiota-gut-brain axis on behavior and welfare in farm animals: A review. **Physiology & behavior.** 2019 Oct 15;210:112658.

doi: 10.1016/j.physbeh.2019.112658. Epub 2019 Aug 17. PMID: 31430443.

Lima J, Martínez-Álvaro M, Mattock J, Auffret Md, Duthie Ca, Cleveland Ma, Dewhurst Rj, Watson M, Roehe R. Temporal stability of the rumen microbiome and its longitudinal associations with performance traits in beef cattle. **Sci Rep**. 2024 Sep 5;14(1):20772. doi: 10.1038/s41598-024-70770-3. PMID: 39237607; PMCID: PMC11377694.

Li, C.; Niu, Z.; Zou, M.; Liu, S.; Wang, M. S.; Gu, X. X.; Lu, H.; Tian, H. T.; Jha, R. Probiotics, prebiotics, and synbiotics differentially regulate gut microbiota and restore the relative abundance of specific intestinal microorganisms. **Journal of Dairy Science**, v. 103, n. 7, p. 5816-5829, 2020. DOI: 10.3168/jds.2019-18003.

Liu, B.; Wang, C.; Huasai, S.; Han, A.; Zhang, J.; He, L.; Aorigele, C. Compound probiotics improve the diarrhea rate and intestinal microbiota of newborn calves. **Animals (Basel)**, v. 12, n. 3, art. 322, 2022. Disponível em: https://doi.org/10.3390/ani12030322.

Liu, Y. X.; Qin, Y.; Chen, T. A practical guide to amplicon and metagenomic analysis of microbiome data. **Protein Cell**, v. 12, p. 315–330, 2021. DOI: 10.1007/s13238-020-00724-3.

Madureira Ferreira, M.; Santos, B.; Skarbek, A.; Mills, C.; Thom, H.; Prentice, D.; Mcconnel, C.; Leal Yepes, F. A. Bovine respiratory disease (BRD) in post-weaning calves with different prevention strategies and the impact on performance and health status. **Animals**, v. 14, n. 19, art. 2807, 2024. Disponível em: https://doi.org/10.3390/ani14192807.

Malmuthuge, N.; Griebel, P. J.; Guan, L. L. The Gut Microbiome and Its Potential Role in the Development and Function of Newborn Calf Gastrointestinal Tract**. Frontiers in Veterinary Science**, v. 2, p. 36, 2015. DOI: 10.3389/fvets.2015.00036.

Malmuthuge, N.; Guan, L. L. Understanding the gut microbiome of dairy calves: Opportunities to improve early-life gut health. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 7, p. 5996- 6005, 2017. DOI: 10.3168/jds.2016-12239.

Martin, P.; Bateson, P. Measuring behaviour: an introductory guide. 2. ed. Cambridge: **Cambridge University Press**, 1986.

Meale, S. J.; Li, S.; Azevedo, P.; Derakhshani, H.; Plaizier, J. C.; Khafipour, E.; Steele, M. A. Development of ruminal and fecal microbiomes are affected by weaning but not weaning strategy in dairy calves. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, 2016. DOI: 10.3389/fmicb.2016.00582.

Meganck, V.; Hoflack, G.; Opsomer, G. Advances in prevention and therapy of neonatal dairy calf diarrhoea: a systematical review with emphasis on colostrum management and fluid therapy. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 56, 2014. Disponível em: https://doi.org/10.1186/s13028-014-0075-x

Melo, N. C. O.; Ferriani, M. C.; Oliveira, C. A.; Silva, T. R. Fecal Microbiota Composition as a Metagenomic Biomarker of Dietary Intake. **Nutrients**, v. 15, n. 4, p. 10003228, 2023.

NATIONAL ACADEMIES OF SCIENCES, ENGINEERING, AND MEDICINE. Nutrient Requirements of Dairy Cattle: Eighth Revised Edition. Washington (DC): **National Academies Press** (US), 2021.

Nicolao, A.; Coppa, M.; Bouchon, M.; Sturaro, E.; Pomiès, D.; Martin, B.; Koczura, M. Early-Life Dam-Calf Contact and Grazing Experience Influence Post-Weaning Behavior and Herbage Selection of Dairy Calves in the Short Term**. Frontiers in Veterinary Science**, v. 7, p. 600949, 2020. DOI: 10.3389/fvets.2020.600949.

Obregon-Gutierrez, P.; Bague-Companys, J.; Bach, A.; Aragon, V.; Correa-Fiz, F. Estudo longitudinal da microbiota fecal em bezerros com ou sem episódios de diarreia antes do desmame. **Veterinary Sciences**, v. 9, n. 9, p. 463, 2022. DOI: 10.3390/vetsci9090463.

Ockenden, E. M.; Russo, V. M.; Leury, B. J.; Giri, K.; Wales, W. J. The Preservation of the Effects of Preweaning Nutrition on Growth, Immune Competence and Metabolic Characteristics of the Developing Heifer. **Animals (Basel)**, v. 13, n. 8, p. 1309, 2023. DOI: 10.3390/ani13081309.

O'hara, E; Neeser, C; Royle, C; Mills, S; Walsh, F; Duffy, C; Murphy, K; Buckley, F; Waters, S. M.; Kenny, D. A. Development of the ruminant gut microbiome and its impact on host health and performance. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, p. 582, 2020.

Oikonomou, G.; Bicalho, M. L.; Meira, E.; Rossi, R. E.; Foditsch, C.; Machado, V. S.; Teixeira, A. G.; Santisteban, C.; Schukken, Y. H.; Bicalho, R. C. Microbiota of cow's milk; distinguishing healthy, sub-clinically and clinically diseased quarters. **PLOS ONE**, v. 9, n. 1, e85904, 2014. DOI: 10.1371/journal.pone.0085904.

Oliveira, V. Da S.; Santos, A. C. P. Dos; Valença, R. De L. Desenvolvimento e fisiologia do trato digestivo de ruminantes. **Ciência Animal**, *[S. l.]*, v. 29, n. 3, p. 114–132, 2023. Disponível em: https://revistas.uece.br/index.php/cienciaanimal/article/view/10085. Acesso em: 6 fev. 2026.

Olmos Antillón, G.; Fruscalso, V.; Hötzel, M. J. Farm and animal factors associated with morbidity, mortality, and growth of pre-weaned heifer dairy calves in Southern Brazil. **Animals (Basel),** v. 14, n. 22, p. 3327, 2024. DOI: 10.3390/ani14223327.

Pan, X.; Li, Z.; Li, B. Dynamics of rumen gene expression, microbiome colonization, and their interplay in goats. **BMC Genomics**, v. 22, p. 288, 2021. DOI: 10.1186/s12864-021-07595-1.

Papageorgiou, M.; Simitzis, P. E. Indicadores positivos de bem-estar em animais leiteiros. **Dairy**, v. 3, n. 4, p. 814-841, 2022. DOI: 10.3390/dairy3040056.

Patra, A. K. Effects of Essential Oils on Rumen Fermentation, Microbial Ecology and Ruminant Production. **Asian Journal of Animal and Veterinary Advances**, v. 6, p. 416-428, 2011. DOI: 10.3923/ajava.2011.416.428.

Patra, A. K.; Yu, Z. Essential oils affect populations of some rumen bacteria in vitro as revealed by microarray (RumenBactArray) analysis. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, p.

297, 2015. DOI: 10.3389/fmicb.2015.00297.

Pitta Dw, Kumar S, Vecchiarelli B, Shirley Dj, Bittinger K, Baker Ld, Ferguson Jd, Thomsen N. Temporal dynamics in the ruminal microbiome of dairy cows during the transition period**. Jounrnal Animal Science**. 2014 Sep;92(9):4014-22. doi: 10.2527/jas.2014-7621. Epub 2014 Jul 14. PMID: 25023800.

Pérez-Prieto, L.; Peyraud, J. L.; Delagarde, R. Pasture intake, milk production and grazing behaviour of dairy cows grazing low-mass pastures at three daily allowances in winter. **Livestock Science**, v. 137, p. 151-160, 2011. DOI: 10.1016/j.livsci.2010.10.013.

Pichlbauer, B.; Chapa Gonzalez, J. M.; Bobal, M.; Guse, C.; Iwersen, M.; Drillich, M. Evaluation of Different Sensor Systems for Classifying the Behavior of Dairy Cows on Pasture. **Sensors**, v. 24, n. 23, p. 7739, 2024. DOI: 10.3390/s24237739.

Pokhrel, B.; Jiang, H. Crescimento pós-natal e desenvolvimento do rúmen: integrando insights fisiológicos e moleculares. **Biologia (Basileia)**, v. 13, n. 4, p. 269, 2024. DOI: 10.3390/biologia13040269.

Raboisson, D.; Trillat, P.; Cahuzac, C. Failure of Passive Immune Transfer in Calves: A Meta-Analysis on the Consequences and Assessment of the Economic Impact. **PLOS ONE**, v. 11, n. 3, e0150452, 2016. DOI: 10.1371/journal.pone.0150452.

Reis, N. S.; Ferreira, I. C.; Mazocco, L. A.; Souza, A. C. B.; Pinho, G. A. S.; Da Fonseca Neto, Á. M.; Malaquias, J. V.; Macena, F. A.; Muller, A. G.; Martins, C. F.; Balbino, L. C.; Mcmanus, C. Shade modifies behavioral and physiological responses of low to medium production dairy cows at pasture in an integrated crop-livestock-forest system. **Animals (Basel),** v. 11, n. 8, p. 2411, 2021. DOI: 10.3390/ani11082411.

Rey, M.; Enjalbert, F.; Combes, S.; Cauquil, L.; Bouchez, O.; Monteils, V. Establishment of ruminal bacterial community in dairy calves from birth to weaning is sequential. **Journal of Applied Microbiology**, v. 116, n. 2, p. 245-257, 2014. DOI: 10.1111/jam.12405.

Sander, E. G.; Warner, R. G.; Harrison, H. N.; Loosli, J. K. The Stimulatory Effect of Sodium Butyrate and Sodium Propionate on the Development of Rumen Mucosa in the Young Calf. **Journal of Dairy Science**, v. 42, p. 1600-1605, 1959. DOI: 10.3168/jds.S0022- 0302(59)90772-6.

Santos, S.; Saraiva, E. P.; Neto, S.; Maia, M.; Lees, A.; Sejian, V.; Maia, A. S.; Medeiros, G.; Fonseca, V. Heat tolerance, thermal equilibrium and environmental management strategies for dairy cows living in intertropical regions**. Frontiers in Veterinary Science**, v. 9, p. 988775, 2022. DOI: 10.3389/fvets.2022.988775.

Senn, V.; Bassler, D.; Choudhury, R.; Scholkmann, F.; Righini-Grunder, F.; Vuille-Dit-Bile, R. N.; Restin, T. Microbial Colonization From the Fetus to Early Childhood-A Comprehensive Review. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 10, p. 573735, 2020. DOI: 10.3389/fcimb.2020.573735.

smits, C.H.M., Li, D., Patience, J.F. And Den Hartog, L.A.. Animal nutrition strategies and options to reduce the use of antimicrobials in animal production. **FAO Animal Production and Health** Paper No. 184, 2021. Rome, FAO.

https://doi.org/10.4060/cb5524en

Signorini, M. L.; Soto, L. P.; Zbrun, M. V.; Sequeira, G. J.; Rosmini, M. R.; Frizzo, L. S. Impact of probiotic administration on the health and fecal microbiota of young calves: a meta-analysis of randomized controlled trials of lactic acid bacteria. **Research in Veterinary Science**, v. 93, n. 1, p. 250-258, 2012. DOI: 10.1016/j.rvsc.2011.05.001.

Silper, B. F.; Lana, A. M.; Carvalho, A. U.; Ferreira, C. S.; Franzoni, A. P.; Lima, J. A.; Saturnino, H. M.; Reis, R. B.; Coelho, S. G. Effects of milk replacer feeding strategies on performance, ruminal development, and metabolism of dairy calves. **Jounal Dairy Science**, v. 97, n. 2, p. 1016-1025, 2014. DOI: 10.3168/jds.2013-7201.

Silva-Antunes, L. C. M.; Ceballos, M. C.; Negrão, J. A.; Paranhos Da Costa, M. J. R. Good Handling Practices Have Positive Impacts on Dairy Calf Welfare. **Dairy**, v. 5, n. 2, p. 295-307, 2024. DOI: 10.3390/dairy5020024.

Silva, D. F. Da; Macêdo, A. J. Da S.; Lima, A. S. De; Silva, A. A. F. Da; Gomes, M. S.; Lima, E. H. S. De; Soares, M. Das N.; Silva, T. I. De S.; Fonsêca, V. De F. C.; Saraiva, E. P. Evaluation of the behavior of dairy calves bred in tropical climate. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 3, p. e26310312965, 2021. DOI: 10.33448/rsd-v10i3.12965.

Silva, R. De O. P. e. Panorama do Mercado de Leite em 2023. **Análises e Indicadores do Agronegócio**, São Paulo, v. 18, n. 8, p. 1-7, ago. 2023. Disponível em: http://www.iea.agricultura.sp.gov.br/ftpiea/AIA/AIA-29-2023.pdf. Acesso em: 6 out 2025.

Silva, W. C. Da; Silva, É. B. R. Da; Dos Santos, M. R. P.; Camargo Junior, R. N. C.; Barbosa, A. V. C.; Da Silva, J. A. R.; Vinhote, J. A.; De Sousa, E. D. V.; Lourenço, J. B. Behavior and thermal comfort of light and dark coat dairy cows in the Eastern Amazon. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 9, p. 1006093, 2022. DOI: 10.3389/fvets.2022.1006093.

Sobrinho, A. G. S.; Pereira, R. V. G.; Mendonça, L. E. C. Desenvolvimento ponderal e desempenho futuro de bezerras leiteiras. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 40, p. 2071– 2079, 2011.

Spears, J. W.; Weiss, W. P. Role of antioxidants and trace elements in health and immunity of transition dairy cows. **Veterinary Journa**l, v. 176, n. 1, p. 70-76, 2008. DOI: 10.1016/j.tvjl.2007.12.015.

Svensson, C.; Lundström, K.; Emanuelson, U.; Olsson, S. O. Morbidity in Swedish dairy calves from birth to 90 days of age and individual calf-level risk factors for infectious diseases. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 58, n. 3–4, p. 179–197, 2003.

Teixeira, O. S.; Camargo, V. A.; Rocha, M. K.; Alforma, A. M. P.; Sartori, E. D.; Rosa, Y. M.; Pérez-Atehortúa, M.; Mcmanus, C.; Barcellos, J. O. J. Three ages at weaning in beef calves: Implications on performance and development. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 53, e20230053, 2024. DOI: 10.37496/rbz5320230053.

Van Amburgh, M. E.; Drackley, J. K. Current perspectives on the energy and protein requirements of the pre-weaned calf. In: GARNSWORTHY, P. C. (ed.). Calf and heifer

rearing: Principles of rearing the modern dairy heifer from calf to calving. **Nottingham University Press,** 2005. p. 67-82.
Van Soest, P. J. Nutritional ecology of the ruminant. 2nd ed. Ithaca: **Cornell University Press**, 1994.

Varada, V. V.; Kumar, S.; Chhotaray, S. Host-specific probiotics feeding influence growth, gut microbiota, and fecal biomarkers in buffalo calves. **AMB Express**, v. 12, p. 118, 2022. DOI: 10.1186/s13568-022-01460-4.

Von Keyserlingk, M A. G.; Weary, D M. Editorial guest: The welfare of dairy calves. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 103, n. 3-4, p. 161-163, 2007.

Wang, S.; Diao, Q. Y.; Hu, F. M.; Bi, Y. L.; Piao, M. Y.; Jiang, L. S.; Sun, F.; Li, H.; Tu, Y. Development of ruminating behavior in Holstein calves between birth and 30 days of age. **Journal of dairy science**, v. 105, n. 1, p. 572–584, 2022. DOI: 10.3168/jds.2021-20405.

Wang, Z. K.; Yang, Y. S.; Stefka, A. T.; Sun, G.; Peng, L. H. Gut microbiota, dysbiosis and management of inflammatory bowel disease. **World Journal of Gastroenterology**, v. 20, n. 40, p. 14632–14649, 2014.

Warner, R. G.; Flatt, W. P.; Loosli, J. K. Dietary Factors Influencing the Development of the Ruminant Stomach. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 4, p. 788-792, 1956. DOI: 10.1021/jf60067a003.

Whiting, T. Understanding Animal Welfare: The Science in its Cultural Context. **Canadian Veterinary Journal**, v. 52, n. 6, p. 662, 2011.

Wu, S.; Cui, Z.; Chen, X.; Zheng, L.; Ren, H.; Wang, D.; Yao, J. Diet-ruminal microbiome-host crosstalk contributes to differential effects of calf starter and alfalfa hay on rumen epithelial development and pancreatic α-amylase activity in yak calves. **Journal of Dairy Science**, v. 104, n. 4, p. 4326-4340, 2021. DOI: 10.3168/jds.2020-18736.

Wu, Y.; Wang, L.; Luo, R.; Chen, H.; Nie, C.; Niu, J.; Chen, C.; Xu, Y.; Li, X.; Zhang, W. Efeito de uma mistura probiótica multiespécies no crescimento e incidência de diarreia, função imunológica e microbiota fecal de bezerros leiteiros pré-desmame. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, p. 681014, 2021. DOI: 10.3389/fmicb.2021.681014.

Xavier, J. V. V. Aditivos alimentares alternativos para bovinos. 2020. Dissertação (Mestrado Profissional em Zootecnia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2020.

Xiao, J.; Chen, T.; Peng, R. A idade do primeiro consumo de forragem em bezerros e seu efeito no crescimento e ruminação a curto e longo prazo**. Journal of Animal Science and Biotechnology**, v. 14, n. 107, 2023. DOI: 10.1186/s40104-023-00885-6.

Yan, X.; Si, H.; Zhu, Y. Integrated multi-omics of the gastrointestinal microbiome and ruminant host reveals metabolic adaptation underlying early life development. **Microbiome**, v. 10, p. 222, 2022. DOI: 10.1186/s40168-022-01396-3.

Yáñez-Ruiz, D. R.; Abecia, L.; Newbold, C. J. Manipulating rumen microbiome and fermentation through interventions during early life: a review. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, p. 1133, 2015. DOI: 10.3389/fmicb.2015.01133.

Zanine, A. De M.; Santos, E. M.; Parente, H. N.; Ferreira, D. De J.; Cecon, P. R. Comportamento ingestivo de bezerros em pastos de Brachiaria brizantha e Brachiaria decumbens. **Ciência Rural**, v. 36, n. 5, p. 1540–1545, 2006. Disponível em: https://doi.org/10.1590/S0103-84782006000500031

Zebeli, Q.; Ghareeb, K.; Humer, E.; Metzler-Zebeli, B. U.; Besenfelder, U. Nutrição, saúde ruminal e inflamação no período de transição e seu papel na saúde geral e fertilidade de vacas leiteiras. **Pesquisa em ciência veterinária**, v. 103, p. 126-136, 2015.

Zhang, K.; Zhang, T.; Guo, M.; Cuoji, A.; Xu, Y.; Zhao, Y.; Yang, Y.; Brugger, D.; Wang, X.; Suo, L.; Wu, Y.; Chen, Y. Early-life milk replacer feeding mediates lipid metabolism disorders induced by colonic microbiota and bile acid profiles to reduce body weight in goat model **Journal of Animal Science and Biotechnology**, v. 15, p. 118, 2024. DOI: 10.1186/s40104-024-01072-x.

Zhao, L.; Li, X.; Atwill, E. R. Dynamic changes in fecal bacterial microbiota of dairy cattle across the production line. **BMC Microbiology**, v. 22, p. 132, 2022. DOI: 10.1186/s12866-022- 02549-3.

Zhu, Y.; Chen, B.; Zhang, X.; Akbar, M. T.; Wu, T.; Zhang, Y.; Zhi, L.; Shen, Q. Exploration of the Muribaculaceae family in the gut microbiota: diversity, metabolism, and function**. Nutrients**, v. 16, n. 2660, 2024. Disponível em: https://doi.org/10.3390/nu1616266

IMPLICAÇÕES

O presente estudo amplia a compreensão sobre a dinâmica do microbioma fecal de bezerras leiteiras nas fases neonatal e pós-desmame, evidenciando que esse período é marcado por intensa sucessão microbiana e elevada plasticidade ecológica. A trajetória observada, caracterizada por reorganização inicial seguida por maturação e estabilização progressiva, reforça a importância do tempo e do desenvolvimento fisiológico como eixos centrais na estruturação do ecossistema intestinal. Nesse contexto, o sistema de criação coletiva emergiu como um fator central na modulação dos desfechos observados, exercendo influência predominante sobre o desempenho, o comportamento e a dinâmica microbiana dos animais. Essa condição pode ter contribuído para a homogeneização dos grupos experimentais, limitando a expressão de efeitos específicos atribuíveis ao aditivo. Os resultados também indicam que, em sistemas de criação coletiva, os efeitos ambientais e sociais podem superar os impactos de intervenções nutricionais isoladas, ressaltando a necessidade de considerar o sistema de criação como um componente estruturante nos estudos sobre microbioma, sanidade e desempenho animal.

A associação entre eventos sanitários precoces, como episódios de diarreia, e a fase de maior instabilidade microbiana destaca o período neonatal como uma janela crítica para intervenções de manejo voltadas à saúde intestinal. Ao mesmo tempo, a capacidade de reorganização observada nas fases subsequentes evidencia a resiliência do microbioma em condições de manejo adequadas. A inclusão da avaliação comportamental permitiu uma abordagem integrada da saúde e do bem-estar animal, demonstrando que alterações no padrão de repouso e atividade podem fornecer informações complementares relevantes sobre a adaptação fisiológica dos bezerros ao ambiente e aos desafios enfrentados ao longo do desenvolvimento. Por fim, este trabalho contribui para o avanço do conhecimento ao integrar microbioma fecal, sanidade e comportamento em uma abordagem multidimensional, reforçando o potencial dessa estratégia para o monitoramento do desenvolvimento e do bem-estar de bezerras leiteiras. Esses achados fornecem subsídios para o delineamento de futuras investigações que explorem intervenções nutricionais em fases mais avançadas de desenvolvimento ou em sistemas de manejo com maior controle experimental.

MATERIAL SUPLEMENTAR

Niveis de garantia aditivo multicomponente

Componente	Nível garantido
Ômega 3	≥ 295,35 mg/kg
Ômega 6	≥ 2.013,00 mg/kg
Ômega 9	≥ 1.880,00 mg/kg
Ácido oleico	≥ 1.708,74 mg/kg
Ácido linoleico	≥ 2.013,00 mg/kg
Ácido alfa-linolênico	≥ 295,35 mg/kg
Cromo orgânico	≥ 50,00 mg/kg
Zinco orgânico	≥ 1.050,00 mg/kg
Mananoligossacarídeo (MOS)	≥ 6.000,00 mg/kg
Saccharomyces cerevisiae	≥ $1x10^{14}$ mg/Kg ou 1×10^{14} UFC/kg

Matriz núcleo comercial da ração + farelo de soja

Componente	Nível garantido
Nutrientes digestíveis totais (NDT)	≥ 610,0 g/kg
Proteína bruta (PB)	≥ 348,0 g/kg
Extrato etéreo (EE)	≥ 10,0 g/kg
Matéria mineral (MM)	≤ 230,0 g/kg
Fibra bruta (FB)	≤ 125,0 g/kg
Fibra em detergente ácido (FDA)	≤ 200,0 g/kg
Cálcio (Ca)	70,0 – 80,0 g/kg
Fósforo (P)	≥ 11,0 g/kg
Enxofre (S)	≥ 1.540,0 mg/kg
Magnésio (Mg)	≥ 1.540,0 mg/kg
Potássio (K)	≥ 2.200,0 mg/kg
Sódio (Na)	≥ 8.800,0 mg/kg
Cobalto (Co)	≥ 5,5 mg/kg
Cobre (Cu)	176,0 mg/kg
Ferro (Fe)	≥ 308,0 mg/kg
Iodo (I)	≥ 8,8 mg/kg
Manganês (Mn)	≥ 352,0 mg/kg
Selênio (Se)	≥ 3,96 mg/kg
Zinco (Zn)	≥ 704,0 mg/kg

Certificado CEUA EMBRAPA

Embrapa
Pecuária Sudeste

CERTIFICADO

CEUA PRT Nº 09/2024

Certificamos que o projeto de Pesquisa intitulado: “Impacto de um blend de aminoácidos e ácidos graxos essenciais na modulação da microbiota ruminal e na emissão de metano de bezerras leiteiras”, sob responsabilidade da pesquisadora científica Dra. Teresa Cristina Alves, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica encontra-se de acordo com os preceitos da lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009 e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Embrapa Pecuária Sudeste.

(We hereby declare that the research project titled “Impact of a blend of amino acids and essential fatty acids on the modulation of the ruminal microbiota and methane emissions of dairy calves” has been registered under the responsibility of Dr. Teresa Cristina Alves involving production, management or utilization of animals from phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except humans). The described experimental protocol is in accordance to the Brazilian Federal Law on Animal Experimentation (#11.794, enacted on 8th October 2008), to the Decree 6.899 (enacted on 15th July 2009) and the corresponding rules of National Council for Animal Experimentation Control (CONCEA), and it was approved by the Committee of Animal Experimentation of Embrapa Southeast Livestock.)

São Carlos, 08 de Novembro de 2024.

gov.br Documento assinado digitalmente
ALEXANDRE ROSSETTO GARCIA
Data: 22/11/2024 14:12:49-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Dr Alexandre Rossetto Garcia
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Embrapa Pecuária Sudeste

Finalidade	Pesquisa Científica
Vigência da Autorização	01/09/2024 a 31/08/2026
Espécie / Linhagem / Raça	Bos taurus taurus / Bovino / Jersolando
Número de Animais	20
Peso / Idade	30 a 150 kg / 0 a 180 dias
Sexo	Fêmea
Origem	Embrapa Pecuária Sudeste

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
Rod. Washington Luiz, km 234 Caixa Postal 339 13560-970 São Carlos, SP
Telefone (16) 3311-5600
E-mail: cppse.ceua@embrapa.br