

SUMÁRIO

1. Artigo 1 Original – Qualis B2 – página 2 - DOI: <https://doi.org/10.1007/s00580-024-03554-w>
2. Artigo 2 Original – Qualis A3 – página 11 - DOI: 10.1016/j.micpath.2024.106605
3. Artigo 3 Original – Qualis A3 – página 20 - DOI: 10.1007/s10695-024-01358-x.
4. Artigo 4 Original – Qualis A2 – página 36 - DOI: 10.1007/s11250-024-04064-1
5. Artigo 5 Original – Qualis A2 – página 52 - DOI: 10.1016/j.smallrumres.2024.107379
6. Artigo 6 Original – Qualis A1 – página 64 - DOI: 10.3390/ani14243555.
7. Artigo 7 Original – Qualis A3 – página 84 - DOI: 10.3390/fermentation10120630
8. Artigo 8 Original – Qualis A1 – página 103 - DOI: 10.1111/are.14902
9. Artigo 9 Original – Qualis A1 – página 111 - DOI: 10.1016/j.aquaculture.2021.737174
10. Artigo 10 Original – Qualis A1 – página 117 - DOI: 10.1016/j.aquaculture.2019.734574

11. Artigo 1 Traduzido – Qualis B2 – página 124
12. Artigo 2 Traduzido – Qualis A3 – página 133
13. Artigo 3 Traduzido – Qualis A3 – página 142
14. Artigo 4 Traduzido – Qualis A2 – página 158
15. Artigo 5 Traduzido – Qualis A2 – página 174
16. Artigo 6 Traduzido – Qualis A1 – página 186
17. Artigo 7 Traduzido – Qualis A3 – página 206
18. Artigo 8 Traduzido – Qualis A1 – página 225
19. Artigo 9 Traduzido – Qualis A1 – página 233
20. Artigo 10 Traduzido – Qualis A1 – página 238



Inclusion of essential oils in a calf milk replacer and their effects on growth performance and the immune and oxidative systems

Luisa Nora¹ · Charles Marcon Giacomelli¹ · Guilherme Luiz Deolindo¹ · Vitor Luiz Molosse¹ · Priscila M. Copetti¹ · Bianca F. Bissacotti² · Vera M. Morsch² · Aleksandro Schafer da Silva¹ 

Received: 24 October 2023 / Accepted: 23 January 2024 / Published online: 5 February 2024
© The Author(s), under exclusive licence to Springer-Verlag London Ltd., part of Springer Nature 2024

Abstract

The use of essential oils in animal feed is increasing, but it needs to be applicable. This study determined whether a reformulated milk replacer containing a blend of essential oils composed of cinnamon, oregano, and eucalyptus improves suckling calves' immune and oxidative systems, consequently improving productive performance. Sixteen Holstein calves (ten days old) suckled for 60 days. The animals were divided into a control group ($n=8$), which received the commercial milk replacer, and a treatment group ($n=8$), which received a milk replacer containing oils. The animals were fed twice daily with 0.25 kg of milk replacer diluted in two liters of water at each feeding. The milk replacer in the treatment group contained 5 g of additive per kg. The milk replacer containing essential oils had a strong aroma and odor and consequently was rejected by two calves in the treatment group. These animals were withdrawn from the experiment after five days of attempting to adapt them. The calves also received pelleted concentrate from the beginning of the experiment and chopped hay from 28 days onwards (both ad libitum). The treatment group showed more weight gain and feed efficiency than control animals. Lower lymphocyte counts were observed in calves fed milk replacers containing essential oils. Total serum protein was higher due to increased globulins in calves in the treatment group than in the control group. Serum immunoglobulin A and heavy-chain immunoglobulins were higher in the treatment group. Lower levels of lipid peroxidation and higher total antioxidants were observed in the serum of calves in the treatment group. We conclude that some animals may not adapt to the milk replacer containing essential oils due to the odor; however, the calves that consumed the milk containing the essential oils showed stimulated humoral immune responses that minimized the physiological oxidative stress of the rearing phase and consequently favored growth and weight gain.

Keywords Carvacrol · Thymol · 1,8-Cyneol · Cinnamaldehyde · Antioxidants

Introduction

Calf development is a significant challenge in dairy production due to the high fragility of these animals, which directly affects productivity. Their development is compromised when their health is challenged, primarily because the immune system begins to develop only after birth. Ruminant placentas, which include a protective layer, do not allow immunoglobulins to pass from the mother to the fetus

(Chase et al. 2008), making their immune system dependent on passive immunity, arising from the colostrum produced by the mother, which must be consumed in the first hours after birth. Colostrum is rich in immunoglobulins and other nutrients, providing the necessary components for the animal to face the microbiological challenges of the environment in the first days of life (Hill 2010) and develop active immunity.

Many infectious agents cause disease in calves. Enterobacteria and *Escherichia coli* are the most common; these organisms are responsible for lesions in the intestinal epithelium (Cho and Yoon 2014) and cause diarrhea, which leads to dehydration and loss of appetite, affecting development. The high incidence of bacterial diarrhea in the first weeks of life makes antimicrobial therapy necessary; however, these treatments lead to antibiotic resistance. For

✉ Aleksandro Schafer da Silva
aleksandro_ss@yahoo.com.br

¹ Postgraduate Program in Animal Science, State University of Santa Catarina, Chapecó, Brazil

² Graduate Program in Toxicological Biochemistry, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, Brazil

these reasons, replacing antibiotics with alternative antimicrobials, which act as growth promoters, is imperative. Such replacements include commercially available plant extracts. Many plant components inhibit pathogenic Gram-negative (e.g., *Escherichia coli* and *Campylobacter jejuni*) and Gram-positive (e.g., *Bacillus subtilis* and *Clostridium*) bacteria. Typically, Gram-negative organisms are less sensitive to essential oils due to their external lipopolysaccharide membrane that restricts the diffusion of phenolic compounds (Christaki et al. 2020).

The potential of essential oils in animal nutrition is well understood, especially regarding the role of growth promoters, immunostimulants, and antioxidants (Christaki et al. 2020). Antioxidant capacity is directly related to health, and under normal conditions, there is a balance between the generation and elimination of free radicals. Imbalance results in oxidative stress in the animal and reduces performance; however, compounds in essential oils can prevent and even inhibit this stress by eliminating free radicals (Pan et al. 2023).

Essential oils are aromatic and volatile products extracted from plant sources such as branches, seeds, bark, leaves, and flowers (Burt 2004). These compounds are characterized by strong odors that can interfere with feed ingestion. This concern is frequent among researchers, like when cinnamon, oregano, and eucalyptus essential oils were added to the replacement. These oils are compelling for researchers and industry because they contain cinnamaldehyde (cinnamon oil), carvacrol, thymol (oregano oil), 1,8-cineol, and D-limonene (eucalyptus oil), which display antimicrobial activity (Calsamiglia et al. 2007; Chapman et al. 2016; Kumar et al. 2012; Cimanga et al. 2002; Baranska et al. 2005). Oregano's essential oil reduces feed conversion and positively modulates ruminal fermentation (Wu et al. 2020). 1,8-Cineol increases gastric mucus production inhibits lesions and protects the mucosa, suggesting that these compounds have a gastroprotective function (Caldas et al. 2015). The antioxidant capacity of essential oils, especially eucalyptus, is attributed to the ability of the compound to associate with the keap1/nrf2 system, which results in increased antioxidant enzymes such as superoxide dismutase and catalase (Cai et al. 2020).

Based on all that is known about essential oils in animal diets, we hypothesized that consuming them by calves would improve their health and favor their growth performance. However, there is some concern due to the pungent odor of the essential oils transferred to the powdered milk, there would be interference with consumption. Therefore, the present study determined whether a milk replacer containing a blend of essential oils (oregano, cinnamon, and eucalyptus) would improve the immune system, antioxidants, and growth performance in suckling calves.

Materials and methods

The experiment was performed at the Experimental Farm of the Centro de Educação Superior do Oeste in Guatambu, Santa Catarina. We used 16 male Holstein calves (ten days old) divided into the control and treatment groups, with eight animals each. The animals were housed in pairs in collective pens, with four pens in the control group and four in the treatment group. The experiment lasted 60 days, which was the total period of breastfeeding. Before the experiment, the transition from cow's milk to milk replacer was carried out gradually. At the beginning of the experiment, the supply of the milk replacer with the additive was started for the animals in the treatment group; however, some calves rejected it, likely due to the strong odor of essential oils, of which cinnamon was predominant. However, six of the eight animals adapted to the phytobiotic-containing milk replacer in two or three days, unlike the other two animals that did not consume the milk even when forced. After seven days after the beginning of the treatment, we excluded these calves from the experiment because they had become dehydrated (when milk without phytobiotics was provided, both animals consumed it in total).

The additive used was liquid Enterosan® (Tecphy, Canoinhas, SC, Brazil), based on essential oils of cinnamon, oregano, and eucalyptus, and it has a purity of 10%. This liquid product was lyophilized and used in powdered form in the milk replacer during manufacture at 5 g of additive/kg of a milk replacer. The replacement was stored in sealed plastic bags to avoid odor loss or volatilization of the product. The animals in both groups received 0.25 kg of milk replacer diluted in two liters of water per feeding, with two feedings per day, at 8:00 am and 4:30 pm (a total of 0.5 kg of milk replacer/calf/day). In addition to the liquid diet, the animals received a solid diet based on pelleted concentrate. From the 28th day of the experiment onwards, the animals received chopped hay ad libitum. The composition of the feeds is described in Table 1.

The animals were weighed weekly using a digital scale. Blood samples were collected on days 1, 15, 30, 45, and 60 to analyze hematologic, biochemical, and immunological variables. Blood collections were performed through the jugular vein using needles and vacuolated tubes. We used tubes with EDTA for hematologic analysis and others with a clot activator to obtain serum for biochemical, immunological, and antioxidant analyses.

Hematologic analyses were performed using the Equipe Vet 3000® automatic equipment. To separate the serum, the tubes were centrifuged without anticoagulant (3500 RPM for 10 min), and the serum was transferred to identified microtubes and stored at −20 °C until analysis. In

Table 1 Chemical composition of feed fed to calves

Items	Quantity (DM) d1–28		Quantity (DM) d28–60
Concentrate ^a	Ad libitum		Ad libitum
Milk replacer	0.5 kg/day		0.5 kg/day
Hay	0.0		Ad libitum
Chemical composition (%)	Concentrate	Replacer	Hay
Dry matter	89.8	96.7	83.6
Crude protein	24.3	15.1	8.09
Ethereal extract	4.95	15.9	3.67
Mineral matter	7.12	9.80	6.21
Neutral detergent fiber	29.3	4.57	70.6
Acid detergent fiber	15.1	2.43	33.8

^aThe commercial concentrate (Nutrialfa Bezerra[®]) was formulated based on micronized soybean meal, ground corn, wheat bran, minerals, vitamins, and sodium monensin

the biochemical analyses, serum levels of total proteins, glucose, albumin, cholesterol, and urea were measured using the semi-automatic analyzer Bio-2000 (BioPlus[®]) and following the instructions of the Analisa[®] commercial kits for each variable. Globulins were determined using a mathematical calculation (total proteins-albumin).

According to Tomasi et al. (2018), using mini-gels (10 × 10 cm), proteins were separated using sodium dodecyl-polyacrylamide gel. The gels were stained with Coomassie Blue and photographed to identify and quantify the protein fractions using Labimage1D software (Loccus Biotechnology). A standard containing fractions with molecular weight between 10 and 250 kD (Kaleidoscope, BIO-RAD) was used as a reference for the identification of protein fractions.

Lipid peroxidation was determined as thiobarbituric acid reactive substance (TBARS) levels using the methods described by Jentzsch et al. (1996) for serum samples. Serum TBARS levels were expressed as nM malondialdehyde/mL. Antioxidant levels were measured through the ferric-reducing ability of plasma (FRAP) in serum. According to Benzie and Strain (1996), FRAP was measured and expressed as mol/L.

All data were analyzed using the SAS MIXED procedure (SAS Inst. Inc., Cary, NC, USA; version 9.4), with the Satterthwaite approximation to determine the denominator degrees of freedom for the fixed effects test. Weight gain and average daily gain were tested for fixed treatment effects using a pen (treatment) and animal (pen) as random variables. All other variables (body weight, biochemistry, blood count, protein count, and oxidants) were analyzed as repeated measures and tested for treatment fixed effects and treatment × day. All results on d1 for each variable were included as covariates; however, the command for covariates was removed from the model when $P > 0.05$. Averages were

distinguished using PDIF, and all results were expressed as LSMEANS with standard errors. Significance was defined when differences had $P \leq 0.05$.

Results

Body weights in the treatment group were higher than controls from day 28 ($P \leq 0.05$). Weight gain during the experiment was 8.7 kg higher ($P \leq 0.05$) in the treatment group than in the control group. Feed consumption did not differ between the groups; however, the treatment group had a greater feeding efficiency from 1 to day 60 (Table 2). There was no treatment effect or treatment × day interaction for red blood cell counts (erythrocytes, hematocrit, and hemoglobin). The number of white cells differed, with fewer leukocytes due to the reduction of lymphocytes in the treatment group ($P \leq 0.05$, Table 3).

There were differences in cholesterol, total protein, and globulin between groups. Calves in the treatment group had lower cholesterol levels in the treatment × day interaction ($P \leq 0.05$) and a tendency to be lower when we evaluated only the treatment ($P \geq 0.05$ and ≤ 0.10). The total protein level differed on day 45; treatment group animals were superior to the control group animals ($P \leq 0.05$). However, when the protein was fractionated, higher globulin was observed in the treatment group on days 45 and 60 ($P \leq 0.05$; Table 3). There was no effect of treatment and treatment × day interaction for glucose, albumin, or urea levels (Table 3).

The results of the proteinogram are presented in Table 4. The effect of treatment and interaction treatment × day was verified for IgA and IG-heavy chain; calves that consumed the milk replacer with essential oils had higher concentrations of these variables. Haptoglobin levels, by contrast, showed only the effect of the treatment, with higher

Table 2 Performance of growth and consumption of calves fed with milk replacer with and without the phytobiotic

	Control	Phyto	SEM	P-Treat	P-Treat x day
Body weight (kg)				0.05	0.02
d1	40.6	44.5	0.57		
d7	43.2	46.6	0.55		
d14	46.5	50.5	0.55		
d21	50.1	55.2	0.54		
d28	54.8 ^b	61.8 ^a	0.55		
d35	60.1 ^b	65.3 ^a	0.55		
d42	63 ^b	70.6 ^a	0.56		
d49	65.7 ^b	75.6 ^a	0.56		
d56	69.4 ^b	82.3 ^a	0.55		
d60	70 ^b	82.6 ^a	0.55		
Weight gain (kg)					
d1–60	29.4 ^b	38.1 ^a	0.45	0.03	–
d1–28	14.1 ^b	17.2 ^a	0.44	0.07	–
d28–60	15.2 ^b	20.8 ^a	0.44	0.05	–
Average daily weight gain (kg DM)					
d1–60	0.490 ^b	0.635 ^a	0.04	0.03	–
d1–28	0.504 ^b	0.614 ^a	0.04	0.07	–
d28–60	0.475 ^b	0.650 ^a	0.05	0.05	–
Daily concentrate consumption (kg DM)					
d1–60	0.707	0.826	0.13	0.61	–
d1–28	0.484	0.522	0.11	0.56	–
d28–60	0.907	1.141	0.16	0.17	–
Daily hay consumption (kg DM)					
d28–60	0.219	0.254	0.09	0.29	–
Daily milk consumption (kg DM)					
d1–60	0.490	0.490	0.00	–	–
Daily feed consumption (kg DM)					
d1–28	0.97	1.01	0.18	0.49	–
d28–60	1.61	1.88	0.24	0.51	–
Total feed consumed (kg/DM)					
d1–60	78.9 ^b	88.6 ^a	1.06	0.08	–
Feed efficiency					
d1–60	0.372 ^b	0.430 ^a	0.07	0.05	–
d1–28	0.517 ^b	0.607 ^a	0.07	0.04	–
d28–60	0.294 ^b	0.345 ^a	0.05	0.09	–

Phyto: animals receiving the phytobiotic

^aDemonstrates treatment effect where different letters in the same row show significant differences ($P \leq 0.05$) and trends ($P > 0.05$ and ≤ 0.1) between groups^bDemonstrates the interaction between treatment × day where different letters on the same line show a significant difference ($P \leq 0.05$) and trend ($P > 0.05$ and ≤ 0.1) between groups

concentrations in the treatment group. There was no treatment effect or treatment x day interaction for ceruloplasmin and transferrin levels ($P > 0.05$).

The results for lipid peroxidation and total antioxidants are shown in Fig. 1. On days 45 and 60, lower levels of TBARS and higher levels of FRAP were observed

in the treatment group. The treatment x day interaction showed that the primary differences occurred on days 45 and 60 of the experiment. These findings suggest that animals in the treatment group had lower lipid peroxidation and more significant antioxidant action from day 45 onwards.

Table 3 Blood count and serum biochemistry of calves fed milk replacer with and without phytobiotic

Variables	Control	Phyto	SEM	P-Treat	P-Treat x day
Leukocytes ($\times 10^3$ cel/μL)				0.01	0.01
d1	21.08	19.23	1.69		
d15	16.4 ^a	9.78b	1.65		
d30	18.3a	10.4b	1.65		
d45	6.89	6.60	1.41		
d60	8.11a	6.8b	1.41		
Lymphocytes ($\times 10^3$ cel/μL)				0.05	0.01
d1	14.33	12.14	1.25		
d15	11.89	7.31	1.24		
d30	13.85	7.47	1.06		
d45	3.87	4.72	1.06		
d60	5.32	4.69	1.05		
Granulocytes/monocytes ($\times 10^3$ cel/μL)				0.08	0.01
d1	6.75	7.08	0.74		
d15	4.38a	2.47b	0.74		
d30	4.53a	2.97b	0.74		
d45	3.01a	1.88b	0.7		
d60	2.80	2.14	0.71		
Erythrocytes ($\times 10^6$ cel/μL)				0.89	0.86
	8.06	7.94	0.05		
Hemoglobin (mg/dL)				0.93	0.88
	10.14	10.36	0.29		
Hematocrit (%)				0.91	0.76
	28.90	29.20	1.5		
Glucose (mg/dL)				0.86	0.82
	78.2	76.9	2.81		
Cholesterol (mg/dL)				0.03	0.01
d1	67.1	70.3	3.75		
d15	109	95.1	3.71		
d30	118	126	3.70		
d45	153 ^a	131 ^b	3.72		
d60	120	110	3.71		
Total protein (g/dL)				0.15	0.02
d1	6.58	6.96	0.07		
d15	5.85	5.65	0.06		
d30	5.68	5.75	0.06		
d45	8.16 ^b	8.95 ^a	0.06		
d60	7.12	7.75	0.05		
Albumin (g/dL)				0.35	0.13
	3.01	2.87	0.02		
Urea (mg/dL)				0.79	0.42
	31.7	28.8	3.71		
Globulin (g/dL)				0.05	0.01
d1	4.00	3.55	0.05		
d15	3.25	3.23	0.06		
d30	2.96	3.23	0.05		
d45	4.28 ^b	5.10 ^a	0.05		
d60	4.27 ^b	5.01 ^a	0.05		

Phyto: animals receiving the phytobiotic

^aDemonstrates treatment effect where different letters in the same row show significant differences ($P \leq 0.05$) and trends ($P > 0.05$ and ≤ 0.1) between groups^bDemonstrates the interaction between treatment $\times$ day where different letters on the same line show a significant difference ($P \leq 0.05$) and trend ($P > 0.05$ and ≤ 0.1) between groups

Table 4 Proteinogram of calves fed milk replacer with and without phytobiotic

	Control	Phyto	SEM	P-Treat	P-Treat x day
IgA (g/dL)				0.04	0.01
d1	0.84	0.81	0.04		
d15	0.87	0.86	0.04		
d30	0.76 ^b	0.87 ^a	0.04		
d45	0.77 ^b	0.95 ^a	0.05		
d60	0.72 ^b	0.92 ^a	0.05		
Heavy chain Ig (g/dL)				0.01	0.01
d1	0.99	1.04	0.05		
d15	1.08	1.10	0.05		
d30	1.01	1.34	0.07		
d45	0.97	1.47	0.07		
d60	0.99	1.29	0.06		
Ceruloplasmin (g/dL)				0.94	0.77
	0.55	0.53	0.02		
Haptoglobin (g/dL)				0.05	0.13
	0.31 ^b	0.34 ^a	0.02		
Transferrin (mg/dL)				0.86	0.90
	0.22	0.23	0.03		

Phyto: animals receiving the phytobiotic

^aDemonstrates treatment effect where different letters in the same row show significant differences ($P \leq 0.05$) and trends ($P > 0.05$ and ≤ 0.1) between groups

^bDemonstrates the interaction between treatment $\times$ day where different letters on the same line show a significant difference ($P \leq 0.05$) and trend ($P > 0.05$ and ≤ 0.1) between groups

Discussion

There are several studies of essential oils in ruminant nutrition, and they have demonstrated that they improve health and performance in several ways. In summary, we found that calves that consumed the phytogenic in replacement milk showed stimulation of humoral and antioxidant immune responses, which was probably reflected in better health and increased weight gain. Other researchers included a mixture of essential oils in milk replacer and found that essential oils contributed to ruminal manipulation in pre-weaning and carry-over effects in post-weaning, improved immunity, and decreased neonatal diarrhea in the pre-weaning phase (Palhares Campolina et al. 2021).

Similar to our study, there have been reported positive effects on zootechnical performance when phytogenics were added to the animal diet. Akbarian-Tefaghi et al. (2018) provided plant extracts to suckling calves containing eucalyptus and found a higher average daily gain and better feed efficiency in the post-weaning period. Liu et al. (2020) added a blend of essential oils containing carvacrol, thymol, and

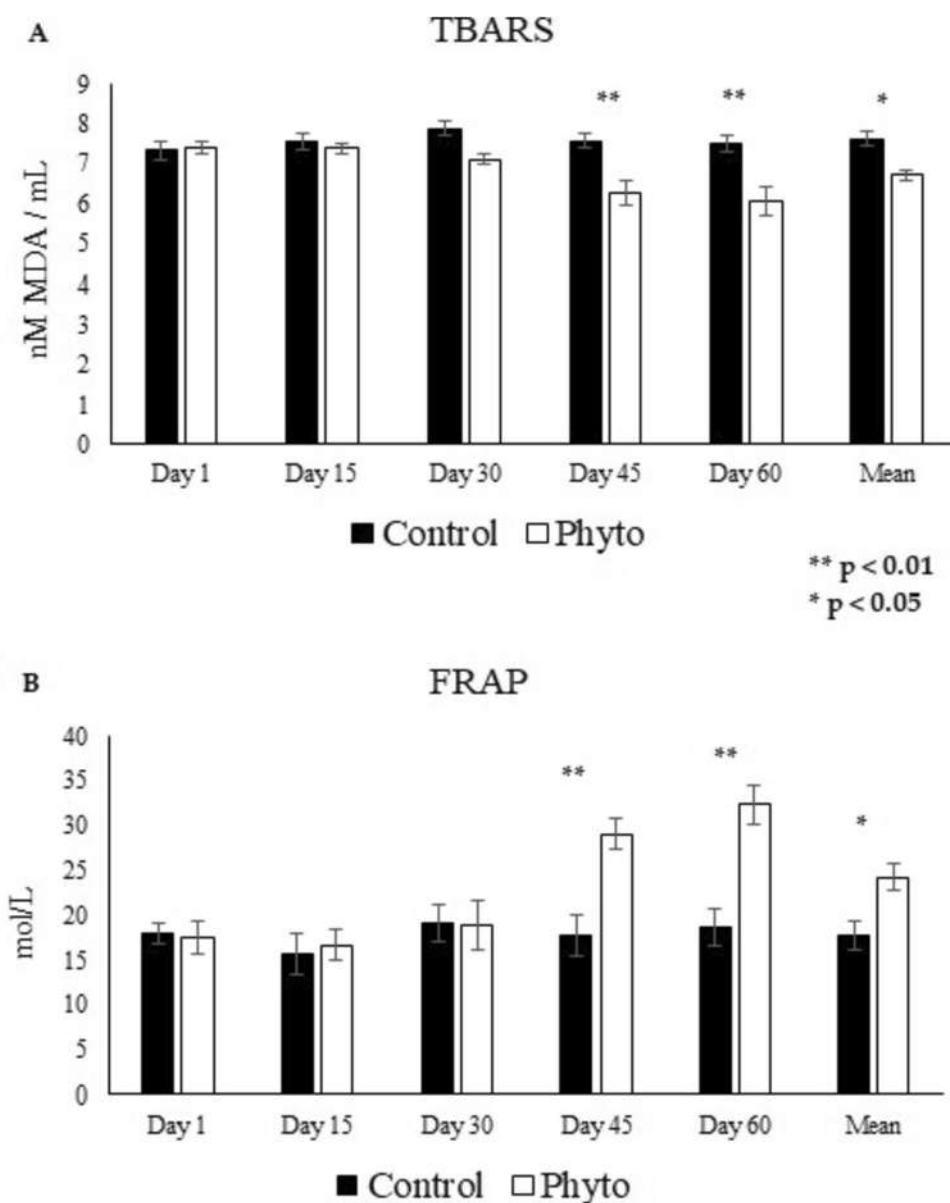
cineol to the pelleted concentrate and recorded more significant weight gain, reaching 11% higher in these calves; in addition, the authors reported that these animals had higher dry matter intake and lower feed conversion. Froehlich et al. (2017) reported similar results, using essential oils containing carvacrol, thymol, and cineol at various doses in suckling calves. The authors found a higher average daily gain in the suckling phase. When researchers provided essential oils rich in thymol, eugenol, vanillin, limonene, and guaiacol formulated with different levels of protein in the diet of suckling calves, they found that regardless of protein levels in the diet, average daily gain, weaning weight, and efficiency feed were higher in animals that received the essential oils (Kazemi-Bonchenari et al. 2018).

The primary hypothesis for these effects is the robust antimicrobial effect, suggesting that this additive is a performance enhancer (Mcintosh et al. 2003). Essential oils and active components at high doses inhibited ruminal microbial fermentation; moderate doses could modify ruminal fermentation by altering the production of volatile fatty acids, protein metabolism, or both (Calsamiglia et al. 2007), favoring nutrition and, consequently, weight gain. In biochemical parameters, we can observe that cholesterol changed only on day 45, being lower in the group of animals that received the phytobiotic. Echeverry-Munera et al. (2021) reported that cholesterol content may be related to consumption, as it increases when higher levels of fat are consumed. However, in contrast, the treated group had a higher food consumption, not confirming this hypothesis. Another point to be highlighted about cholesterol levels is that calves with deficient cholesterol levels are more susceptible to diseases that cause diarrhea (Duff et al. 2016), but even with lower cholesterol levels, we can say that animals in the “phyto” group were not deficient, as they did not present major health-related problems, as in addition, the animals’ immune system was efficient.

In the study by Asghari et al. (2021), calves that received different doses of essential oils had no change in cholesterol levels when compared to the control, similar to our study, since our difference was only on day 45. And in the case of lactating cows that received oils essential, cholesterol levels were lower than animals in the control group (Al-Suwaiegh et al. 2020), also similar to the results of our study.

Essential oil components influence health, as verified in this study, by stimulating the immune and antioxidant response. Similar to those found in the present study, Liu et al. (2020) provided a blend of essential oils to calves and found higher IgM, IgG, and IgA values, also suggesting an improvement in the immune response. Haptoglobin is known as an acute phase protein, which is produced by the liver, and the protein in question was found in higher levels in the group that received the phytobiotic, and the production of these proteins is generally triggered

Fig. 1 Antioxidant marker levels of calves fed milk replacer with and without phytobiotic. Phyto: animals receiving the phytobiotic. Note: the asterisk over the bars shows the difference between groups (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$)



by pro-inflammatory cytokines, which are stimulated by infections, stress, and inflammation (Pradeep 2014). Furthermore, haptoglobin levels can also increase in conditions of bacterial and viral infections, particularly in cases of respiratory diseases (Yilmaz et al 2017; Merhan et al. 2017). With this, we can assume that the animals in the group that received the phytobiotic, despite having better performance and immunological response, were possibly facing some challenge related to infection; however, due to the immune system being more efficient, they did not suffer losses when going through this challenge. Using cinnamaldehyde-based essential oil in suckling calves via a liquid diet resulted in a lower use of antimicrobials until the animals' sixth week of life and a lower risk of navel inflammation than the control (Pempek et al. 2018),

a substantial problem in calf rearing. Al-Suwaiegh et al. (2020) provided a blend of essential oils (clove, oregano, and juniper) to cows during early lactation and found positive effects on milk production; there were also higher total protein and globulin levels. These studies demonstrated a typical result: essential oils increased serum immunoglobulins, which positively affects calves.

The precise mechanism by which essential oils induce a humoral immune response is poorly understood; however, researchers found that the essential oil of *Pituranthos tortuosus* when consumed by mice, boosted lipopolysaccharide-induced splenocyte proliferation, suggesting improved B cell and humoral immune response activation (Krifa et al. 2015). One possibility for an increase in immunoglobulins would be an increase in lymphocytes, as described in studies

of essential oils (Palhares Campolina et al. 2021); by contrast, in the present study, we reported a lower count of this immune cell.

In a study of pigs supplemented with carvacrol and thymol, the researchers concluded that the compounds reduced the post-weaning intestinal oxidative stress of the animals and decreased the presence of *Enterococcus* and *E. coli* (Wei et al. 2017). The calves that consumed the blend of essential oils, likewise, had an effect of minimizing the serum and physiological oxidative stress; similarly, we found less lipid peroxidation and an increase in the total antioxidant capacity.

Gessner et al. (2017) report the potential of plant polyphenols to combat oxidative stress and inflammatory processes in farm animals, emphasizing the productivity benefits. Polyphenols in essential oils block NF- κ B activation by inhibiting phosphorylation and proteasomal degradation of I κ B, an effect that is due in part to the antioxidant properties of polyphenols (Vendrame and Klimis-Zacas 2015).

Another possible mechanism is that polyphenols directly eliminate reactive oxygen species and induce Nrf2 activation, which, in turn, leads to the activation of several antioxidant enzymes (Na and Surh 2008). In the present study, the direct elimination of reactive oxygen species and the activation of Nrf2 help to minimize the development of physiological oxidative stress in calves; the literature suggests that these events trigger pro-inflammatory pathways activating NF- κ B, mitogen-activated protein kinases, and activator protein 1 (Chuang and McIntosh 2011).

Conclusion

We conclude that including essential oils in the milk replacer improved calf performance, manifesting as more significant weight gain and better feed efficiency. This milk replacer provides a source of humoral immune elements and antioxidants, minimizing the physiological oxidative stress of calves in the rearing phase when health and nutritional challenges are substantial. However, we also concluded that not all animals voluntarily consume the essential oil replacer, probably due to the strong odor of this feed additive. In an attempt to solve the problem of rejecting the substitute due to the odor, perhaps an option would be to start providing it right after colostrum, adapting the animal from an early age to consuming the product, since in this experiment we began to provide it only at ten days of age.

Data availability The data analyzed in this investigation are available upon request to the corresponding author.

Compliance with ethical standards

Funding This study was supported by the UDESC and Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Estado de Santa Catarina (FAPESC) of Santa Catarina state and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Brazil.

Conflict interest The authors declare no competing interests.

Ethical approval statement The project was approved by the ethics committee on the use of animals in research of UDESC (CEUA no. 2322230522). The study followed the guidelines of the Brazilian Council for Animal Experimentation, Brazil.

Consent to participate Not applicable.

Consent for publication All authors have consented to the publication and presentation of the data in this article.

References

- Akbarian-Tefaghi M, Ghasemi E, Khorvash M (2018) Performance, rumen fermentation and blood metabolites of dairy calves fed starter mixtures supplemented with herbal plants, essential oils or monensin. *J Anim Physiol Anim Nutr* 102(3):630–638. <https://doi.org/10.1111/jpn.12842>
- Al-Suwaiegh SB, Morshehy SA, Mansour AT, Ahmed MH, Zahran SM, Alnemr TM, Sallam SMA (2020) Effect of an essential oil blend on dairy cow performance during treatment and post-treatment periods. *Sustainability* 12(21):9123. <https://doi.org/10.3390/su12219123>
- Asghari M, Abdi-Benemar H, Maheri-Sis N, Salamatdoust-Nobar R, Salem AZM, Zamanloo M, Anele UY (2021) Effects of emulsified essential oils blend on performance, blood metabolites, oxidative status and intestinal microflora of suckling calves. *Anim Feed Sci Technol* 277:114954. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2021.114954>
- Baranks M, Schulz H, Reitzenstein S, Uhlemann U, Strehle MA, Krüger H, Quilitzsch R, Foley W, Popp J. (2005) Vibrational spectroscopic studies to acquire a quality control method of Eucalyptus essential oils. *Biopolymers* 78(5):237–248. <https://doi.org/10.1002/bip.20284>
- Benzie IFF, Strain JJ (1996) The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP Assay. *Anal Biochem* 239:70–76. <https://doi.org/10.1002/bip.20284>
- Burt S (2004) Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *Int J Food Microbiol* 94(3):223–253. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022>
- Cai ZM et al (2020) 1,8-Cineole: a review of source, biological activities, and application. *J Asian Nat Prod Res* 23(10):938–954. <https://doi.org/10.1080/10286020.2020.1839432>
- Caldas RGF, Oliveira AR, Araújo AV, Lafayette SS, Albuquerque GS, Silva-Neto Jda C, Costa-Silva JH, Ferreira F, Costa JG, Wanderley AG (2015) Gastroprotective mechanisms of the monoterpene 1, 8-Cineole (Eucalyptol). *PLoS One* 10(8):e0134558. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0134558>
- Calsamiglia S et al (2007) Invited review: essential oils as modifiers of rumen microbial fermentation. *J Dairy Sci* 90(6):2580–2595. <https://doi.org/10.3168/jds.2006-644>
- Chapman CE et al (2016) Short communication: cinnamaldehyde taste preferences of weaned dairy heifers. *J Dairy Sci* 99(5):3607–361. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-10582>
- Chase CCL et al (2008) Neonatal immune development in the calf and its impact on vaccine response. *Vet Clin Food Anim* 24(1):87–104. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2007.11.001>

- Cho Y, Yoon K (2014) An overview of calf diarrhea - infectious etiology, diagnosis, and intervention. *J Vet Sci* 15(1):1–17. <https://doi.org/10.4142/jvs.2014.15.1>
- Christaki E, Giannenas L, Bonos E, Florou-Paneri P (2020) Chapter 2 - Innovative uses of aromatic plants as natural supplements in nutrition. In: Florou-Paneri P et al (Eds), *Feed Additives*, Academic Press pp 19–34. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814700-9.00002-9>
- Chuang CC, McIntosh MK (2011) Potential mechanisms by which polyphenol-rich grapes prevent obesity-mediated inflammation and metabolic diseases. *Annu Rev Nutr* 21(31):155–176. <https://doi.org/10.1146/annurev-nutr-072610-145149>
- Cimanga K et al (2002) Chemical composition and antifungal activity of essential oils of some aromatic medicinal plants growing in the democratic republic of Congo. *J Essent Oil Res* 14(5):382–387. <https://doi.org/10.1080/10412905.2002.9699894>
- Duff JP, Passant S, Wessels M, Charlier C, Hateley G, Irvine RM (2016) Cholesterol deficiency causing calf illthrift and diarrhoea. *Vet Rec* 178(17):424–5. <https://doi.org/10.1136/vr.i2265>
- Echeverry-Munera J et al (2021) Effect of partial exchange of lactose with fat in milk replacer on ad libitum feed intake and performance in dairy calves. *J Dairy Sci* 105(5):5432–5444. <https://doi.org/10.3168/jds.2020-19485>
- Froehlich KA et al (2017) Evaluation of essential oils and prebiotics for newborn dairy calves. *J An Sci* 95(8):3772–3782. <https://doi.org/10.2527/jas.2017.1601>
- Gessner DK, Ringseis R, Eder K (2017) Potential of plant polyphenols to combat oxidative stress and inflammatory processes in farm animals. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)* 101(4):605–628. <https://doi.org/10.1111/jpn.12579>
- Hill JAG (2010) Transferência de imunidade passiva colostrar em bezerras neonatas da região Metropolitana de Curitiba, Palmeira e Carambei, Estado do Paraná e suas interrelações. (2010) Tese (Doutorado em Ciência) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Universidade de São Paulo, São Paulo
- Jentzsch AM et al (1996) Improved analysis of malondialdehyde in human body fluids. *Free Radic Biol Med* 20:251–256. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(95\)02043-8](https://doi.org/10.1016/0891-5849(95)02043-8)
- Kazemi-Bonchenari M et al (2018) Essential oils improved weight gain, growth and feed efficiency of young dairy calves fed 18 or 20% crude protein starter diets. *J An Physiol An Nutr* 102(3):652–661. <https://doi.org/10.1111/jpn.12867>
- Krifa M et al (2015) Immunomodulatory and anticancer effects of *Pituranthos tortuosus* essential oil. *Tumor Biol* 36(7):5165–5170. <https://doi.org/10.1007/s13277-015-3170-3>
- Kumar P et al (2012) Compositional analysis and insecticidal activity of *Eucalyptus globulus* (family: *Myrtaceae*) essential oil against housefly (*Musca domestica*). *Acta Trop* 122(2):212–218. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2012.01.015>
- Liu T et al (2020) Calf starter containing a blend of essential oils and prebiotics affects the growth performance of Holstein calves. *J Dairy Sci* 103(3):2315–2323. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-16647>
- McIntosh FM et al (2003) Effects of essential oils on ruminal microorganisms and their protein metabolism. *Appl Environ Microbiol* 69(8):5111–5014. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.8.5011-5014.2003>
- Merhan O, Bozukluhan K, Celebi O, Ogun M, Atakisi E, Buyuk F (2017) Levels of acute phase protein and some biochemical parameter in cattle infected with mycobacterium bovis. *J Fac Vet Med Univ Erciyes* 14(2):101–105
- Na HK, Surh YJ (2008) Modulation of Nrf2-mediated antioxidant and detoxifying enzyme induction by the green tea polyphenol EGCG. *Food Chem Toxicol* 46(4):1271–1278. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.10.006>
- Palhares Campolina J, Coelho SG, Belli AL, Machado FSR, Pereira LG, Tomich T, Carvalho W, Silva RO, Voorsluys A, Jacob D, Campos M (2021) Effects of a blend of essential oils in milk replacer on performance, rumen fermentation, blood parameters, and health scores of dairy heifers. *PLOS ONE* 16(3):e0231068. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0231068>
- Pan J et al (2023) Biological properties of essential oil emphasized on the feasibility as antibiotic substitute in feedstuff. *Grain Oil Sci Technol* 6:10–23. <https://doi.org/10.1016/j.gaost.2022.11.001>
- Pempek JA et al (2018) Short communication: Investigation of antibiotic alternatives to improve health and growth of veal calves. *J Dairy Sci* 101:4473–4478. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-14055>
- Pradeep M (2014) Application of acute phase proteins as biomarkers in modern veterinary practice. *Ind J Vet Anim Sci Res* 43(1):1–13
- Tomasi T et al (2018) Metaphylactic effect of minerals on the immune response, biochemical variables and antioxidant status of newborn calves. *J Anim Physiol Anim Nutr* 102(4):819–824. <https://doi.org/10.1111/jpn.12890>
- Vendrame S, Klimis-Zacas D (2015) *Nutr Rev* 73:348–358. <https://doi.org/10.1093/nutrit/nuu066>
- Wei HK et al (2017) A carvacrol-thymol blend decreased intestinal oxidative stress and influenced select microbes without changing the messenger RNA levels of tight junction proteins in jejunal mucosa of weaning piglets. *Animal* 11(2):193–201. <https://doi.org/10.1017/S1751731116001397>
- Wu J et al (2020) Dietary supplementation with oregano essential oil and monensin in combination is antagonistic to growth performance of yearling Holstein bulls. *J Dairy Sci* 103(9):8119–8129. <https://doi.org/10.3168/jds.2020-18211>
- Yilmaz O et al (2017) Investigations on clinic, haematology, biochemistry, oxidative stress, acute phase proteins in infectious respiratory disease complex (BRDC) in cattle. *Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi* 12(1). <https://doi.org/10.17094/ataunivbd.309771>

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Springer Nature or its licensor (e.g. a society or other partner) holds exclusive rights to this article under a publishing agreement with the author(s) or other rightsholder(s); author self-archiving of the accepted manuscript version of this article is solely governed by the terms of such publishing agreement and applicable law.



Contents lists available at ScienceDirect

Microbial Pathogenesis

journal homepage: www.elsevier.com/locate/micpath

Impacts of intake of trichothecenes (*Fusarium sporotrichioides*) for dairy calves: Effects on animal growth, oxidative and inflammatory response

Marcela Machado^a, Luisa Nora^a, Tayse Burger Neto Zanin^a, Bianca F. Bissacotti^b, Vera M. Morsch^b, Marcelo Vedovatto^c, Giovana Pelisser^d, Ricardo E. Mendes^{d,k}, Alessandro C. Galvão^e, Caroline Seffrin Speroni^f, Eduardo M. Gloria^g, Murilo F. Rodrigues^h, Roger Wagnerⁱ, Lenita M. Stefani^{a,j,**}, Aleksandro S. da Silva^{a,b,h,*}

^a Graduate Program in Animal Science, Universidade Do Estado de Santa Catarina (UDESC), Chapecó, SC, Brazil

^b Graduate Program in Biology: Toxicological Biochemistry, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, Brazil

^c Louisiana State University, Dean Lee Research and Extension Center, Alexandria, LA, 71302, USA

^d Faculty of Veterinary Medicine, Instituto Federal Catarinense (IFC), Concórdia, SC, Brazil

^e Department of Food Engineering and Chemistry, UDESC, Pinhalzinho, SC, Brazil

^f Universidade Federal Do Pampa (UNIPAMPA), Uruguai, RS, Brazil

^g Biological Science Department, Luiz de Queiroz College of Agriculture, University of São Paulo, SP, Brazil

^h Department of Animal Science, UDESC, Chapecó, SC, Brazil

ⁱ Department of Food Sciences, UFSM, RS, Brazil

^j Department of Scientific and Technological Education, Centro de Educação a Distância, UDESC, Florianópolis, SC, Brazil

^k Department of Pathology, College of Veterinary Medicine, University of Georgia, 501 D.W. Brooks Drive, Athens, GA, Greece

ARTICLE INFO

Keywords:

Antioxidant
Calves
Essential oils
Immunity
Mycotoxin

ABSTRACT

The objective of the present study was to evaluate the impacts of trichothecenes (*Fusarium sporotrichioides*) for dairy calves on animal growth, oxidative and inflammatory responses in the presence or absence of essential oils. Twelve calves weaned at 70 days of age were divided into 2 groups: T-C (control) and T-EO (essential oils - oregano, thyme, basil and rosemary) in the period of 40 days consuming ration contaminated by trichothecenes (500 ppb). The animals in the T-EO group received a mixture of EOs via feed at a dosage of 0.75 mL per/kg of feed. Blood collections were performed on days 1, 20 and 40 for hematological and biochemical analyses; the fecal score was performed every 2 days on a scale of 1–5 and clinical examinations were performed 3 times during the experiment period. The animals were weighed at the beginning and at the end of the experiment; euthanasia of two calves per group for macroscopic and microscopic evaluation of several tissues (spleen, liver, duodenum, jejunum, ileum, cecum and colon) was performed at the end of the experiment. The calves in the T-EO group had a tendency ($P = 0.07$) of higher body weight when compared to the T-C. Treatment effect and treatment vs day interaction was detected for leukocytes and granulocytes variables, demonstrating a higher count of these cells in the T-EO group on both days (20 and 40), and the same behavior occurred for the distribution amplitude of erythrocytes (RDW). The enzymes alanine transferase (ALT), aspartate transferase (AST) and gamma glutamyl-transferase (GGT) showed higher serum activity in the T-C group (days 20 and 40). The levels of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) were lower in the serum of animals in the T-EO group. For calves in the T-EO group, glutathione S-transferase activity was higher in serum. Haptoglobin and C-reactive protein levels were lower on days 20 and 40 in T-EO animals when compared to the T-C group. In the macroscopic and microscopic evaluations, which were collected at the end of the experiment after slaughtering the animals, liver and intestine did not show changes for the animals in the T-EO group, unlike the animals in the T-C group, which had moderately firm diffuse consistency of the liver and edema in the mesentery, as well as oxidative stress in tissues (liver, duodenum, jejunum, ileum, cecum and colon). The results concluded that the consumption of a mixture of EOs (essential oils - oregano, thyme, basil and rosemary) minimized the negative

* Corresponding author. Graduate Program in Animal Science, Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC), Chapecó, SC, Brazil.

** Corresponding author. Graduate Program in Animal Science, Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC), Chapecó, SC, Brazil.

E-mail addresses: lenita.moura@udesc.br (L.M. Stefani), aleksandro.silva@udesc.br (A.S. da Silva).

<https://doi.org/10.1016/j.micpath.2024.106605>

Received 29 October 2023; Received in revised form 12 February 2024; Accepted 26 February 2024

Available online 28 February 2024

0882-4010/© 2024 Elsevier Ltd. All rights reserved.

effects caused by trichothecenes in dairy calves, thus being an alternative to improving the immunological and antioxidant condition, as well as a possible adsorbent alternative.

1. Introduction

Mycotoxins are secondary metabolites produced by filamentous fungi that occur naturally in foods, such as fruits and grains [1]. Some fungi have the ability to produce more than one mycotoxin, in the same way that a mycotoxin can be produced by more than one fungal species [2]. Fungi can infect crops both during plant development in the field, as well as during storage and processing [2,3]. Reported that 100% of the rations/concentrates used in animal feed had some degree of mycotoxin contamination: 65.5% classified as low, 27.6% medium and 6.9% with high contamination. In the analyzed samples, it was found that 93.3% of them had fumonisin (B1+B2), 80% fusaric acid and 66.7% trichothecenes A (T-2, H-T2, diacetoxyscirpenol and neosolaniol), and in lower amounts it was detected aflatoxin (B1+B2+G1+G2), trichothecenes B (DON, 15- acetyl DON, 3-acetyl DON, fusarenonol X, nivalenol, and DON 3-glycoside), ergot and penicillium (patulin, penicillic acid, roquefortin C, mycophenolic acid and wortmannin) [4]. Among the different existing mycotoxins, trichothecenes (TCT) are considered a highly toxic group, composed of toxins chemically related to several fungal species (*Fusarium*, *Myrothecium*, *Stachybotrys*, *Trichoderma*, *Trichothecium* and *Spicellum*), being able to grow under different environmental conditions, nutrient contents, temperature, humidity or oxygen, which results in successful colonization [5].

Belonging to trichothecenes, the T-2 and HT-2 toxins are considered a metabolite that implies hematotoxicity and immunotoxicity, produced by different *Fusarium* species, including *F. sporotrichioides*, *F. poae*, and *F. acuminatum*, which can grow on grains such as wheat, corn, barley, rice, soybeans and oats [5]. In a study carried out on cattle from 2017 to 2021 in Brazil, evaluating 1749 samples for the detection of 6 mycotoxins, 29% of the samples were contaminated with T-2, being corn silage with levels of 35.98 µg/kg, feed 24%, 11 µg/kg, products and by-products (soybeans, citrus pulp, wheat, peanuts, cottonseed, barley and sorghum, 27.12 µg/kg on average, with 2021 being the year with the highest detection of T-2 in samples, 44.8% respectively [6]. In the years between 2015 and 2020 in Poland, 88.4% of the samples containing T-2 were detected, in Slovakia in another study the mycotoxin was present in 90% of the samples, in Switzerland in another study it was found 8% T-2 in 253 barley samples [7].

Although some studies in dairy cattle have reported that these animals are resistant to T-2 when compared to non-ruminants, the exposure to T-2 has been shown to cause reduction on consumption, loss of production, gastroenteric lesions, intestinal hemorrhages, worse immune responses, and absence of estrous cycles in cows. In order to avoid problems with mycotoxins, many feed factories have been using adsorbents as a preventive way to reduce the chances of productive losses.

Research demonstrating improved immune and antioxidant status of calves that consumed essential oil (EOs) is well known [8]. Likewise, researchers have shown that EOs can minimize negative impacts of mycotoxicosis conditions, such as black pepper EO that reduced the deleterious effects of aflatoxin in chickens [9]. EOs have the ability to act on the glucose metabolism of dairy cows and suppress aflatoxin M1 synthesis. It is already known that the action of EOs on gram positive bacteria is greater compared to gram negatives, due to the lipopolysaccharide layer; however, EO stereochemistry is already reported to be able to cross the membrane of gram negative cells through transmembrane proteins. In addition, there are antioxidant and anti-inflammatory effects, which are related to the ability of EOs and its compounds to neutralize oxygen free radicals and activate the anti-inflammatory system, capable of minimizing cellular and tissue damage caused by oxidative stress and the inflammation process [10].

Oregano (*Origanum vulgare* L.), rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.)

and basil (*Ocimum basilicum* L.) essential oils have high antioxidant capacity. Rosemary oil is widely used by the cosmetics industry, as it has antibacterial, cytotoxic, antimutagenic, antioxidant, anti-inflammatory and chemo preventive properties; basil oil has its antioxidant power attributed to rosmarinic acid [4]; Oregano and thyme oils have potent antioxidant action attributed mainly due to thymol and carvacrol [11]. In this context, the objective of this experiment was to evaluate the impacts of intake of trichothecenes (*Fusarium sporotrichioides*) for dairy calves on animal growth, oxidative and inflammatory response in the presence or absence of a mixture of EOs.

2. Materials and methods

2.1. Trichothecenes: T-2 and HT-2

Toxin T-2 production was obtained from maize fermentation by *F. sporotrichioides*. The fermentation was carried out in 500 mL Erlenmeyer flasks to which 100 g of maize were added. The maize was moistened (water activity >0.97) and autoclaved at 121 °C for 1 h. Subsequently, the maize was inoculated with 2 mL of a conidial suspension (1×10^5 conidia per mL). Conidial suspensions were obtained from *F. sporotrichioides* colonies growing on potato-dextrose agar for 15 days at 25 °C. After inoculation, flasks were maintained static for 28 days at 25 °C. Subsequently, the fermented maize was dried and grounded in order to artificially contaminate the concentrate. The feed and the concentration of toxin T-2/HT-2 was verified using HPLC/MS/MS analysis. Based on this information, the inoculum was defined and added to the concentrate during its production to achieve a final contamination of 500 ppb and provided to all animals in this research. The T-2/HT-2 dose was defined based on results described in previous studies [5,12], aiming a mild intoxication of the animals.

2.2. Mixture of essential oils (EOs)

Oregano (*Origanum vulgare*), thyme (*Tymus vulgaris*), basil (*Ocimum basilicum*) and rosemary (*Salvia rosmarinus*) were purchased as dried plants for oil extraction by the steam distillation method in a conventional approach, where water was not kept at the bottom and steam was introduced through coils. The EOs mixture was formulated with oregano, thyme, basil and rosemary oil (25 mL each). In one of the group (T-EO), the mixture of EOs was added (dose of 0.75 mL/kg of feed concentrate), as recommended in the literature [13,14]. Since the amount of EOs was small, to facilitate the mixture, the EOs were first homogenized with soybean oil, one of the ingredients in the highest proportion in the diet.

2.3. EOs mixture composition by GC/FID and GC/MS

EOs mixture composition [15] was performed using the gas chromatography technique (GC/FID and GC/MS) where 10 µL was diluted in 1000 µL of chromatographic grade n-hexane (Sigma-Aldrich, Germany, ≥99% purity). For analyte quantification, 1 µL of diluted sample was injected, in triplicate, into a gas chromatograph (Varian Star 3400CX, CA, USA) using a flame ionization detector (GC-FID). The injection took place in 1:20 split mode at 250 °C. The compounds were analyzed in a nonpolar separation column (5% phenyl - dimethylpolysiloxane) (ZB-5MS; 30 m × 0.25 mm × 0.25 µm; Phenomenex, USA); the analytes were carried by hydrogen gas at 1.6 mL/min. The chromatographic conditions were in accordance with the methodology described by Adams [1]. The initial temperature of the method was 40 °C and the temperature was raised at a rate of 5 °C/min until reaching 250 °C. The

total analysis time was 43 min. The detection of compounds was performed in a flame ionization detector at 250 °C. The quantification of the compounds was performed through the normalization of the areas, expressing the concentration in percentage of area of the peaks in the chromatograms. To identify the compounds, the samples were injected into a gas chromatograph (GC-2010 Plus, Shimadzu, Tokyo, Japan) coupled to a mass spectrometer (GCMS - QP2010 Plus, Shimadzu, Tokyo, Japan). The same column and chromatographic conditions used in the quantification analysis (GC/FID) were used to separate the analytes, but using helium gas at 1.5 mL/min. Mass spectra were obtained by scanning from 35 to 350 *m/z* (mass/charge) with an ionization energy of +70 eV. The interface temperature was 230 °C, while the ion source was kept at 200 °C. The mass spectra obtained for each compound were compared to the spectra available in the NIST database (National Institute of Standards and Technology Library; <https://webbook.nist.gov>). A homologous series of alkanes were analyzed in order to obtain the retention rates of the compounds. The retention rates obtained were calculated according to Van den Dool and Kratz [16], and compared with those provided in the literature, to confirm the identity of the analyzed compounds.

2.4. Animals and facilities

The experiment was carried out at the Experimental Farm of the State University of Santa Catarina (UDESC), located in the city of Guatambú, Santa Catarina State, Brazil. Twelve male 65-day-old Holstein calves were used, recently weaned, with an average weight of 86.7 kg, submitted to an adaptation period of 10 days. The animals were housed in individual pens, with approximately 3 m² each, containing individual feeders, one for concentrate and the other for hay, with water *ad libitum*.

2.5. Experimental design

The experimental design was completely randomized with two treatments and 6 replications per treatment, where each animal was considered an experimental unit. The animals were randomly separated into two groups: Control (T-C) and Essential Oils (T-EO), considering body weight in order to obtain homogeneous groups. As already mentioned, all animals (T-C and T-EO) consumed concentrate experimentally contaminated with T-2 (500 µg/kg). In the concentrate of the T-EO group, 0.75 mL of the oil mixture was added per kilogram.

The diet provided to the animals was based on the NRC and consisted of feedstuffs concentrate and Tifton hay. The concentrate was formulated using ground corn, soybean meal, wheat bran, soybean oil (1.5%), minerals and vitamins (4%). In order to meet the nutritional needs, 2 kg of concentrate/day was provided twice a day (8:00 a.m. and 4:00 p.m.), in addition to hay and water *ad libitum* for a period of 40 days. Therefore, knowing the amount of concentrate consumed per animal, it was determined that each calf consumed about 1000 µg of T-2 and 1.5 mL of the EOs every day.

2.6. Weighing, clinical examination and food consumption

The animals were weighed at the beginning and at the end of the experiment using an electronic scale. This information allowed the calculation of weight gain and average daily gain. All the concentrate fed to the calves was consumed. Clinical examination of the calves was performed by a veterinarian specialized in large animals on days 8, 15 and 29 of the experiment when rectal temperature (RT), respiratory rate (RR), heart rate (HR), ruminal movements (RM), capillary refill time (CRT) and mucosal staining were recorded.

2.7. Sampling

Blood was collected on days 1, 20 and 40 by jugular vein puncture, using disposable needles and vacuum tubes with EDTA anticoagulant

(for hemogram) and without EDTA (biochemical and immunological analyses), and stored in a cooler with ice for immediate transport to the laboratory. Serum was obtained after centrifuging the blood (3500 g for 10 min), separated into microtubes to be frozen (-20 °C) until analysis.

Four animals were euthanized by a veterinarian on day 41 (two animals from each group). First, the animals were intravenously sedated with the following protocol: 2% xylazine hydrochloride (0.3 mg/kg BW), 1% acepromazine (0.2 mg/kg BW) and 10% ketamine (5 mg/kg BW). The overdose of saturated magnesium sulfate solution was administered intravenously until the absence of a cardiorespiratory response, as approved by the Ethics Committee for the Use of Animals at UDESC. At the necropsy, a macroscopic evaluation and sampling (liver, duodenum, jejunum, ileum, cecum and colon) was performed. Frozen parts of this material were used for analysis of oxidative status and other fragments were preserved in 10% formalin for histopathology.

2.8. Fecal score

Fecal scoring was performed at intervals of two days individually throughout the experiment according to Litherland [17] as follows: score 1 for feces with very liquid consistency; score 2 for more liquid than indicated (loose); score 3 for more solid consistency (can pile up when dropped on the floor, around 5 cm high and with several concentric rings with a small central depression); score 4 for more solid and thicker, greater than 5 cm in height; and score 5 for clearly dry.

2.9. Laboratory analyzes

2.9.1. Food chemical composition and mycotoxin quantification

The composition of the concentrate (Table 1) was analyzed according to AOAC [3], being: dry matter (DM) by the method 930.15; crude protein (CP) with method 976.05; ether extract (EE) according to method 920.39 and mineral matter (MM) according to method 942.05. Neutral detergent fiber (NDF) and acid detergent fiber (ADF) analyzes were performed according to the methodology of Van Soest et al. [18] without the addition of sodium sulfite or alpha-amylase.

The concentrations of toxin T-2 and HT-2 on ground fermented material were measured using HPLC/MS/MS. The levels observed in the concentrate fed to animals of the T-C group were T2 = 220 ppb and HT-2 = 144 ppb (total trichothecenes was 364 ppb); in the concentrate consumed by calves of the T-EO group it was T2 = 236 and HT-2 = 140 ppb (total trichothecenes was 376 ppb).

2.9.2. Hemogram

Total erythrocyte and leukocyte counts, hemoglobin concentration

Table 1

Feed and chemical composition of feed used in the diet of dairy calves.

Chemical composition	Hay (%)	Concentrate T-C	Concentrate T-EO
Dry Matter (DM)	90.28	96.13	96.46
Crude Protein (CP)	15.49	24.64	24.08
Ashes	0.87	8.64	6.98
Ether Extract (EE)	2.96	2.76	2.99
Neutral Detergent Fiber (NDF)	53.91	26.67	25.68
Acid Detergent Fiber (ADF)	29.48	6.53	6.08

Note 1. Concentrate formulation to produce 100 kg: Ground corn 45.5 kg, Soybean meal 35.5 kg, Wheat bran 14 kg, Mineral and vitamin core 4 kg, Soy oil 1 kg.

Note 2: The core used in this study was composed of the following levels: Calcium (min) 190 g/kg, Calcium (max.) 220 g/kg, Phosphorus (min.) 60 g/kg, Sulfur (min.) 20 g/kg, Magnesium (min.) 20 g/kg, Potassium (min.) 35 g/kg, Sodium (min.) 70 g/kg, Cobalt (min.) 15 mg/kg, Copper (min.) 700 mg/kg, Chromium (min.) 10 mg/kg, Iron (min.) 700 mg/kg, Iodine (min.) 40 mg/kg, Manganese (min.) 1600 mg/kg, Selenium (min.) 19 mg/kg, Zinc (min.) 2500 mg/kg, Vitamin A (min.) 400.000 UI/kg, Vitamin D3 (min.) 100.000 UI/kg, Vitamin E (min.) 2400 UI/kg, Fluorine (max.) 600 mg/kg.

and hematocrit percentage were performed using Sysmex electronic equipment (model KX-21 N). Blood smears were performed for leukocyte differential counts [19].

2.9.3. Serum biochemistry

Total protein, albumin and urea levels, as well as alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST) and gamma glutamyl transferase (GGT) activities were measured on a Bio-2000 BioPlus® semiautomatic analyzer, using commercial kits and their respective methodologies according to the manufacturer. For globulin levels, the formula (total protein – albumin) was used.

2.9.4. Oxidative status

The oxidative status was verified in several tissues (liver, duodenum, jejunum, ileum, cecum and colon). Serum lipid peroxidation was measured as the amount of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) [20]. The reaction was read in a spectrophotometer at 535 nm, and the result was expressed in moles of malondialdehyde/mL of serum. The determination of reactive oxygen species (ROS) used the technique described by Ali et al. [2]. Samples were diluted 1:10 with 10 nM Tris (pH 7.4) and 5 µL of dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) in methanol and added for 15 min at a temperature of 37 °C to form a non-fluorescent dichlorofluorescein (DCPH). The formation of dichlorofluorescein (DCF; fluorescent DCFH) was monitored by spectrophotometry at 525 nm. ROS formation was determined using a standard DCF curve in methanol (0.05–1.0 µM). Results were expressed as U DCF/mg protein.

Serum glutathione S-transferase (GST) activity was measured based on the method described by Habig et al. [21] and expressed as U GST/mg protein. Serum non-enzymatic antioxidant levels (non-protein thiols) were evaluated following the methodology described by Sedlak and Lindsay [22] recently described by Maltez et al. [23], and the results were expressed in mmol NPSH/mL.

2.9.5. Acute phase proteins

C-reactive protein and haptoglobin levels were determined using commercial kits (Lab Test®) through an automatic biochemical analyzer. Results were expressed in mg/dL.

2.9.6. Histopathology

Spleen, liver, duodenum, jejunum, ileum, cecum and colon samples preserved in 10% buffered formalin were processed; Tissue slides were prepared and stained using the hematoxylin-eosin (HE) technique. Analysis was performed under an optical microscope (40 and 100x).

2.9.7. Statistical analysis

All data were analyzed using a mixed procedure of SAS (SAS Inst. Inc., Cary, NC, USA; version 9.4), with Satterthwaite approximation to determine the denominator degrees of freedom for the test of fixed effects. The weight gain, average daily gain, and antioxidant response in organs were tested for fixed effect of treatment using animal (treatment) as a random effect. All other variables were analyzed as repeated measures and were tested for fixed effects of treatment, day, and treatment × day, using animal (treatment) as random effect. Day 1 results were included as an independent covariate. Also, for these variables, to generate the average per treatment, the day 1 results were removed from the data set but were kept as covariate. The first order autoregressive covariance structure was selected according to the lowest Akaike information criterion. Means were separated using PDIFF method and all results were reported as LSMEANS followed by SEM. Significance was defined when $P \leq 0.05$, and tendency when $P > 0.05$ and ≤ 0.10 .

3. Results

3.1. Oil mixture composition

The gas chromatography technique performed in the oil mixture identified 38 compounds, and in the highest proportion in descending order were: estragole, eucalyptol, para-cymene and thymol (Supplementary Material 1).

3.2. Growth performance

Table 2 shows the growth performance results. Trend of treatment × day interaction ($P = 0.07$) and treatment effect ($P = 0.07$) were observed for body weight and weight gain. The results indicate that the animals that consumed the ration with T-2 mycotoxin treated with the mixture of EOs showed greater weight gain at the end of the experiment. There was also a treatment effect trend ($P = 0.06$) for average daily gain (ADG), being higher in the T-EO group compared to the T-C group.

3.3. Fecal and health score

The fecal score (Table 2) showed no significant difference between groups ($P \leq 0.05$). The clinical variables investigated (Table 3) did not differ significantly between treatments ($P \leq 0.05$).

3.4. Hemogram

Hemogram results are shown in Table 4. There was no treatment effect and interaction for erythrogram variables (erythrocyte count, hemoglobin concentration, and hematocrit percentage). There was an interaction between treatment x day ($P = 0.05$) and treatment effect ($P = 0.01$) for the total number of leukocytes, being higher in the blood of the animals of the T-EO group on days 20 and 40. On these same days, interaction of treatment x day ($P = 0.01$) and treatment effect ($P = 0.01$) was observed for granulocyte counts, cells that were in greater number

Table 2
Growth performance and fecal score of calves consuming ration with experimental contamination by trichothecenes and supplementation of an essential oil mixture.

Items	Treatments ¹		SEM	P – values	
	T-C	T-EO		Treat	Treat. × Day
Body weight (kg)				–	0.07
d 1	86.8	86.7	0.63		
d 40	106 ^b	109 ^a	0.63		
Weight gain (kg)	19.5 ^b	21.8 ^a	0.87	0.07	–
Average daily gain (kg/day)	0.50 ^b	0.56 ^a	0.02	0.06	–
Fecal score (1–5)				0.22	0.72
d 6	2.97	2.36	0.36		
d 8	1.63	1.20	0.36		
d 10	1.97	2.03	0.36		
d 12	1.97	2.03	0.36		
d 14	2.13	1.86	0.36		
d 16	2.30	2.03	0.36		
d 18	1.80	1.86	0.36		
d 20	2.13	1.70	0.36		
d 22	1.63	1.86	0.36		
d 24	1.30	1.86	0.36		
d 26	1.97	2.69	0.36		
d 28	2.01	1.86	0.36		
d 32	2.30	2.03	0.36		
d 34	2.47	2.20	0.36		
d 37	2.30	2.03	0.36		

^{a-b}Within a row, differ ($P \leq 0.05$) or tend to differ ($P \leq 0.10$).
^aTreatments were: T-C and T-EO, represents control (addition of mycotoxin trichothecenes) and treatment (addition of trichothecenes with essential oil mixture).
^bThe d 1 results were removed from the data set to generate the average/treatment in the statistical analysis.

Table 3
Clinical examination of calves consuming ration with experimental contamination by trichothecenes and supplementation of an essential oil mixture.

Items	Treatments ^a		SEM	P – values	
	T-C	T-EO		Treat	Treat. × Day
Rectal Temperature (RT)				0.73	0.64
	38.8	38.8	0.09		
Heart Reat (HR)				0.68	0.47
	39.0	40.4	2.44		
Respiratory Frequency (RF)				0.69	0.98
	72.8	75.8	5.16		
Ruminal Moviments (RM)				0.26	0.47
	5.44	6.11	0.39		
Capillary Refill Time (CRT)				0.34	0.39
	1.94	2.00	0.04		

^{a-b}Within a row, differ ($P \leq 0.05$) or tend to differ ($P \leq 0.10$).
^a Treatments were: T1 and T2, represents control (addition of mycotoxin T-2) and treatment (addition of mycotoxin T-2 with essential oil mixture).

Table 4
Hemogram of calves consuming ration with experimental contamination by trichothecenes and addition an essential oil mixture.

Items	Treatments ^a		SEM	P – values	
	T-C	T-EO		Treat.	Treat. × Day
Erythrocytes (x106 μ L)				0.51	0.80
	8.07	7.91	0.17		
Hematocrit (%)				0.34	0.93
	28.5	27.7	0.54		
Hemoglobin (g/dL)				0.23	0.68
	10.6	10.2	0.22		
Leukocytes (x103 μ L)				0.01	0.05
d 1	3.61	3.07	1.01		
d 20	3.54b	6.63 ^a	1.01		
d 40	3.43b	7.59 ^a	1.01		
Granulocytes (x103 μ L)				0.01	0.01
d 1	2.66	2.22	0.21		
d 20	0.76b	2.05 ^a	0.21		
d 40	0.73b	2.06 ^a	0.21		
Lymphocytes (x103 μ L)				0.01	0.11
	2.60b	3.98 ^a	0.29		
Monocytes (x103 μ L)				0.42	0.11
	0.98	1.22	0.19		
MCV (x103 μ L)				0.78	0.86
	35.7	35.4	0.61		
MCH (x10 ³ μ L)				0.45	0.74
	13.2	13.0	0.18		
MCHC (x10 ³ μ L)				0.34	0.65
	35.1	37.0	1.32		
RDW (x10 ³ μ L)				0.05	0.006
d 1	23.3	23.2	1.10		
d 20	22.7	22.7	1.10		
d 40	28.9a	22.7b	1.10		
PLT (x10 ³ μ L)				0.98	0.76
	403	405	47.1		

^{a-b}Within a row, differ ($P \leq 0.05$) or tend to differ ($P \leq 0.10$).
^bThe d 1 results were removed from the data set to generate the average/treatment in the statistical analysis.
^a Treatments were: T-C and T-EO, represents control (addition of trichothecenes) and treatment (addition of trichothecenes with essential oil mixture).

in the T-EO group. For lymphocyte counts treatment effects were detected ($P = 0.01$). There was an interaction between treatment x day ($P = 0.006$) and treatment effect ($P = 0.08$) for the red cell distribution width (RDW), being greater in the T-EO group. There was no difference between treatments for the variables of erythrocyte size and staining, as well as for the number of platelets ($P > 0.05$).

3.5. Serum biochemistry

Serum biochemistry results are shown in Table 5. The levels of

Table 5
Serum biochemistry of calves consuming ration with experimental contamination by trichothecenes and supplementation of an essential oil mixture.

Variable	Treatments ^a		SEM	P – values	
	T-C	T-EO		Treat	Treat × Day
Albumin (g/dL)				0.76	0.73
	2.62	2.57	0.11		
Globulin (g/dL)				0.01	0.54
	3.53 ^b	4.17 ^a	0.15		
Total protein (g/dL)				0.01	0.35
	6.16 ^b	6.73 ^a	0.13		
Urea (mg/dL)				0.78	0.71
	26.4	25.3	2.57		
ALT ² (mg/dL)				0.10	0.02
d 1	14.8	14.4	1.54		
d 20	21.3	21.6	1.54		
d 40	27.6 ^a	20.0 ^b	1.54		
AST ^b (mg/dL)				0.02	0.04
d 1	60.2	60.0	4.79		
d 20	96.5 ^a	72.8 ^b	4.79		
d 40	81.4 ^a	65.8 ^b	4.79		
GGT ^b (mg/dL)				0.009	0.08
d 1	18.7	17.8	1.59		
d 20	22.5 ^a	17.1 ^b	1.59		
d 40	25.2 ^a	17.1 ^b	1.59		

^{a-b} Within a row, differ ($P \leq 0.05$) or tend to differ ($P \leq 0.10$).
^cThe d 1 results were removed from the data set to generate the average per treatment in the statistical analysis.
^a Treatments were: T-C and T-EO, represents control (addition of trichothecenes) and treatment (addition of trichothecenes with essential oil mixture).
^b Alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST) and gama glutamiltransferase (GGT).

globulin and total protein were higher in calves that received the mixture of EOs. There was no treatment effect and treatment vs day interaction for albumin and urea concentration. Liver enzymes indicated liver injury also showed treatment effect and treatment × day interaction. In general, the activity of AST, ALT and GGT was lower in the serum of calves in the T-EO group when compared to the control group.

3.6. Oxidative status

Serum oxidative variables are shown in Table 6. There was a

Table 6
Serum antioxidant response of calves consuming ration with experimental contamination by trichothecenes and supplementation of an essential oil mixture.

Items	Treatments ^a		SEM	P – values	
	T-C	T-EO		Treat	Treat × Day
TBARS (nmol MDA/mL)				0.39	0.01
d 1	20.0	19.6	1.23		
d 20	25.5	28.0	1.23		
d 40	24.2 ^a	19.1 ^b	1.23		
GST ^b (μmolCDNB/min/mg protein)				0.05	0.41
	328 ^a	260 ^b	17.3		
Thiols (mmol NPSH/mL)				0.58	0.75
	0.23	0.21	0.02		
ROS (U DCFH/mg protein))				0.10	0.001
d 1	0.33	0.32	0.02		
d 20	0.38	0.42	0.02		
d 40	0.47 ^a	0.31 ^b	0.02		

^{a-b}Within a row, differ ($P \leq 0.05$) or tend to differ ($P \leq 0.10$).
^c1 d results were removed from the data set to generate the average/treatment in the statistical analysis.
^a Treatments were: T-C and T-EO, represents control (addition of trichothecenes) and treatment (addition of trichothecenes with essential oil mixture).
^b Glutathione transferase (GST).

treatment $\times$ day interaction ($P = 0.01$) for serum TBARS concentration on day 40, being lower in T-EO. The concentration of ROS in the serum was also lower in the animals of the T-EO group. Treatment effect ($P = 0.05$) was observed for GST, being smaller in the serum of animals treated with EOs. Thiol levels did not differ between treatments. The results of oxidative variables in liver, duodenum, jejunum, ileum, cecum and colon are presented in Table 7. Among the results, the following findings stand out: 1) liver, lower values of TBARS, GST, thiols and ROS in the group T-EO; 2) in the duodenum, higher values of GST and thiols in the animals of the T-EO group; 3) jejunum, higher concentrations for thiols and lower ROS in the T-EO group; 4) cecum and colon, higher values of GST and ROS were observed in the T-EO group.

3.7. Acute-phase protein

C-reactive protein and haptoglobin levels are shown in Fig. 1. The levels of these two acute phase proteins were lower in the serum of calves that consumed the EO mixture compared to the control group (T-C).

3.8. Necropsy and histopathology

During the necropsy, the liver of two calves of the control group (T-

C) showed firm consistency moderately diffuse; and slight edema in the mesentery. These pathological changes were not identified in the two calves of the T-EO group. Overall, there were no microscopic lesions or alterations in the spleens, livers, kidneys and gastrointestinal tracts of the four necropsied calves (Fig. 2).

4. Discussion

Calves that consumed the EOs mixture (oregano, thyme, basil and rosemary) showed higher weight gain in the evaluated period of 40 days. Liu et al. [8] observed positive and similar results in the highest mean daily gain of pre and post-weaning Holstein calves supplemented with a combination of EOs (oregano, rosemary and thyme) and prebiotic (44.1 ppm/day). In the literature, there are several studies with EOs and the performance of calves [14,24]. Jeshari et al. [25] in their evaluations found that the use of EOs (300 mg/kg) before and after weaning gradually increases feed consumption and, consequently, the ADG of calves. Likewise, Froehlich et al. [14] showed that the addition of EOs to the diet of calves at a dose of 1.25 g/day favors the growth of the animals; a dose similar to that used in this study. Fugita et al. [26] evaluated steers without the addition of EOs in the diet and with supplementation of 4 g/animal/day of castor and cashew EOs or with the addition of 4 g/animal/day of a mixture of castor and cashew EOs plus oregano. The treatments did not show a significant difference in dry matter intake and feed efficiency, however the treatment containing the inclusion of oregano EOs increased weight gain by 14.07%, the final weight by 5.54% and the carcass weight by 5.37% when compared to animals not fed with EOs. These results demonstrate that the addition of EOs in the diet can be an alternative for greater weight gain in animals.

There were no differences between treatments, regarding our clinical evaluations, suggesting subclinical disease, capable of interfering with animal production. Fecal score oscillation in pre- and post-weaning calves is a multifactorial condition resulting from the interaction of several infectious and non-infectious factors related to different conditions of environment, nutrition and management. Façanha et al. [27] described that the evaluation of the RT together with the HR helps to determine the level of animal stress. In the present study, the RT remained at 38.8 °C and the RR between 39.0 and 40.4 mov/min for both groups, characterizing a normal condition for the Brazilian summer. The other clinical variables did not differ between treatments, as they were in agreement with the literature; which reinforces the silent problem condition caused by T-2 in calves. Regarding the variables of liver function and injury, the animals in the T-C group showed greater enzymatic activity (AST and ALT) when compared to the T-EO group, suggesting liver injury. These findings were already expected since the liver is the main target of toxicity and metabolites of mycotoxins T-2 and HT-2, and its exposure, in addition to causing a significant reduction in total serum protein, increases AST and ALT activities [28]. Yang et al. [28] in a study carried out with corn contaminated with T-2 in broilers, also observed greater activity of AST and ALT. Although these studies are focused on poultry, it is clear that T-2 mycotoxin impacts AST and ALT, combined with increased GGT activity (which occurs in conditions of hepatobiliary cells with cholestasis, whether or not associated with biliary hyperplasia). This condition can lead to changes in hepatic metabolism, resulting in lower protein anabolism, which can directly impact the health and development of the calf [4]. The negative impact on total protein and globulin levels was verified in this study, but with the administration of the mixture this negative effect was minimized.

Oxidative stress is present in cases of T-2 intoxication [29], but in this study it was found that the consumption of the EOs mixture minimized the oxidative reactions of lipid peroxidation, as well as the production of oxygen free radicals. These variables when evaluated in conjunction with increased GST activity, indicate a response to detoxification of endogenously formed electrophilic compounds, including lipid peroxidation products measured in this study. The most likely explanation for these results is the immunomodulatory properties of the

Table 7

Descriptive results of oxidative status in organs of calves that consumed feed contaminated by trichothecenes and supplementation of an essential oil mixture.

Items	Treatments ^a		SEM	Treated vs Control
	T-C	T-EO		
<i>Liver</i>				
TBARS (nmol MDA/mL)	33.8	23.1	2.03	↓ 31.6 %
GST (μmol CDNB/min/mg protein)	937	561	102	↓ 40.1 %
Thiols (μmol SH/mg protein)	0.82	0.40	0.11	↓ 51.2 %
ROS (U DCFH/mg protein)	6.83	3.67	0.56	↓ 46.2 %
<i>Duodenum</i>				
TBARS (nmol MDA/mL)	5.43	5.30	0.13	↓ 2.39 %
GST (μmol CDNB/min/mg protein)	445	666	66.6	↑ 49.6 %
Thiols (μmol SH/mg protein)	0.57	0.76	0.05	↑ 33.3 %
ROS (U DCFH/mg protein)	4.96	4.33	0.41	↓ 12.7 %
<i>Jejunum</i>				
TBARS (nmol MDA/mL)	6.76	6.75	0.39	↓ 0.14 %
GST (μmol CDNB/min/mg protein)	558	565	66.6	↑ 1.25 %
Thiols (μmol SH/mg protein)	0.35	0.53	0.05	↑ 51.4 %
ROS (U DCFH/mg protein)	10.6	6.40	0.29	↓ 39.2 %
<i>Ileum</i>				
TBARS (nmol MDA/mL)	5.76	5.83	0.35	↑ 1.73 %
GST (μmol CDNB/min/mg protein)	549	705	42.3	↑ 28.4 %
Thiols (μmol SH/mg protein)	0.61	0.79	0.08	↑ 29.1 %
ROS (U DCFH/mg protein)	5.76	5.79	0.33	↑ 0.52 %
<i>Cecum</i>				
TBARS (nmol MDA/mL)	5.75	5.35	0.11	↓ 6.95 %
GST (μmol CDNB/min/mg protein)	425	579	38.4	↑ 36.2 %
Thiols (μmol SH/mg protein)	0.56	0.56	0.07	0.0%
ROS (U DCFH/mg protein)	5.18	6.50	0.57	↑ 25.4 %
<i>Colón</i>				
TBARS (nmol MDA/mL)	4.78	4.86	0.18	↑ 1.67 %
GST (μmol CDNB/min/mg protein)	558	563	22.5	↑ 0.89 %
Thiols (μmol SH/mg protein)	0.73	1.03	0.17	↑ 41.0 %
ROS (U DCFH/mg protein)	1.97b	3.20a	0.23	↑ 62.4 %

^bMean and standard deviation.

^cA descriptive and representative difference between groups was considered when the percentage of increase or decrease was greater than 30%.

^a Treatments were: T-C and T-EO, represents control (addition of trichothecenes) and treatment (addition of trichothecenes with essential oil mixture).

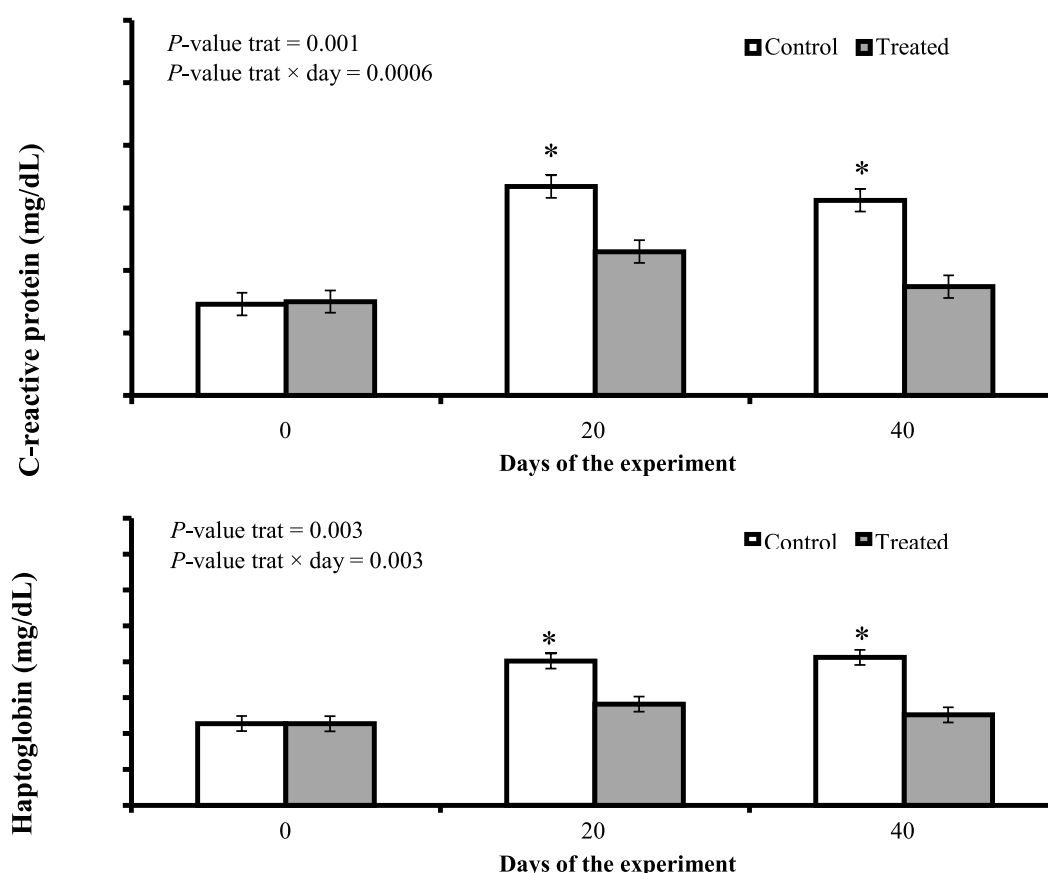


Fig. 1. Inflammatory response of calves consuming trichothecenes: group control (T-C with the addition of trichothecenes, without the mixture of essential oils) and group treated (T-EO: with the addition of trichothecenes and essential oil mixture).

*Differ ($P \leq 0.05$) or tend to differ ($P \leq 0.10$).

EOs from oregano and thyme, which although having an antibacterial activity, also contributes to the antioxidant system. It is believed that the antioxidant benefits are related to the presence of phenolic groups in the composition of the oil, such as oregano, which has flavonoids and terpenoids. In general, EOs are an excellent feed additive for cellular and tissue protection purposes, as they are able to minimize oxidative stress and injuries. Despite being descriptive, the results of tissue oxidative status of animals submitted to euthanasia contributed to understanding the results of EO consumption by calves, capable of minimizing the deleterious effects of mycotoxicosis.

A higher number of leukocytes, combined with a greater distribution range of erythrocytes, appears to be a consequence of mycotoxicosis in calves. In a study evaluating the hematological profile, found a significant increase in leukocytes, lymphocytes and monocytes in Jersey heifers supplemented with 1g/day of the EOs mixture; on the other hand, in the case of ruminants. Nayakwadi et al. [30] detected a reduction in hemoglobin and total leukocyte counts in juvenile goats at 10 and 20 ppm T-2 mycotoxin dosages. It is clear that white cells remained lower in the T-EO group, compatible with effects characterized by T-2 intoxication, since at the cellular level, the greatest effect of T-2 is on protein synthesis, which leads to a secondary interruption of DNA and RNA synthesis. This T-2 inhibitory effect is more visible in actively proliferating cells, such as in the bone marrow, where these cells are produced [5].

Animals in the T-EO group that consumed the concentrate with EOs had higher levels of total protein and globulin, reflecting adequate protein catabolism [31]. Likewise, in studies with thyme's EO, higher concentrations of albumin were observed [31]. The greater weight gain of calves (T-EO group) is related to the ability of the oils to modulate protein synthesis, as according to Zhou et al. [32] EO consumption

improves the digestion of total dietary protein. The daily consumption of T-2 by calves is capable of raising the serum levels of acute phase proteins, in this case haptoglobin and C-reactive protein. Studies focused on the anti-inflammatory action of EOs are well elucidated, as it is an effect of molecules present in the oil capable of preventing intense and harmful inflammatory processes [11].

5. Conclusion

T-2 and HT-2 in diets of calves are silent problems as the animals showed no clinical signs when they consume around 750 ppb both mycotoxins. However, the consumption of the EOs in the diet of dairy calves favored body growth, as it was able to prevent intense liver damage and also showed anti-inflammatory effect, thus reducing the deviation of ATP for oxidative and inflammatory reactions.

Funding

None.

Ethics committee

This study was approved by the Ethics Committee on the Use of Animals in Research of the Universidade do Estado de Santa Catarina (CEUA/UDESC), under protocol number 9502210721.

Consent to participate

All names in the author list were involved in various stages of experimentation or writing.

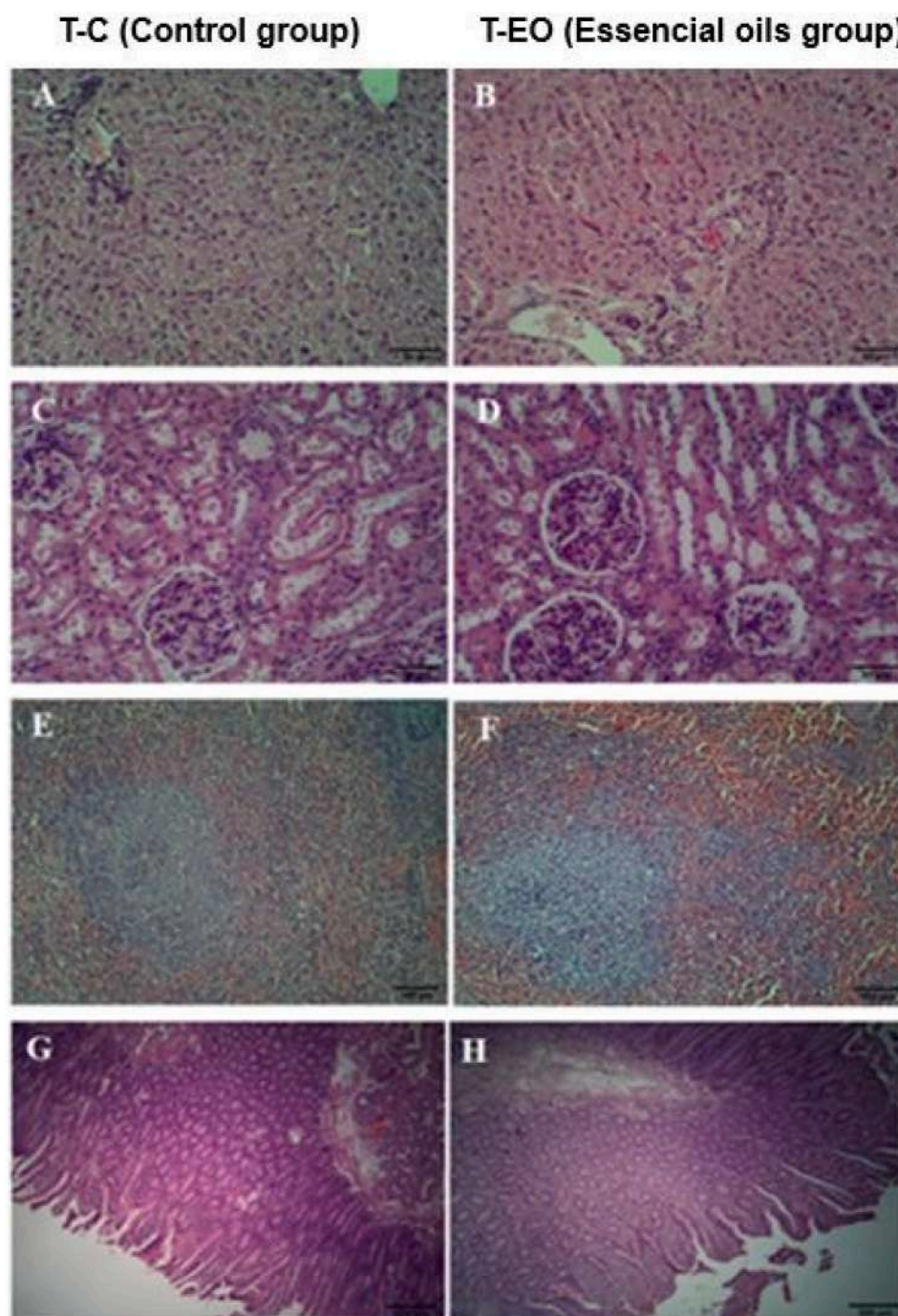


Fig. 2. Histopathology of liver (control – A; treated – B), kidney (control – C; treated – D), spleen (control – E; treated – F) and intestine (control – G; treated – H) without microscopic findings indicative of tissue damage.

Consent for publication

All authors agree to submit the paper for publication in the Veterinary Research Communications.

CRedit authorship contribution statement

Marcela Machado: Writing – original draft, Supervision, Project administration, Formal analysis, Data curation, Conceptualization. **Luisa Nora:** Writing – original draft, Methodology, Formal analysis. **Tayse Burger Neto Zanin:** Writing – original draft, Methodology. **Bianca F. Bissacotti:** Writing – original draft, Methodology, Formal

analysis, Data curation. **Vera M. Morsch:** Writing – review & editing, Supervision, Resources, Conceptualization. **Marcelo Vedovatto:** Writing – review & editing, Software, Conceptualization. **Giovana Pelisser:** Writing – original draft, Methodology, Formal analysis. **Ricardo E. Mendes:** Writing – review & editing, Supervision, Methodology, Formal analysis. **Alessandro C. Galvão:** Writing – original draft, Validation, Supervision, Methodology, Data curation. **Caroline Sefrin Speroni:** Writing – original draft, Supervision, Methodology, Data curation, Conceptualization. **Eduardo M. Gloria:** Writing – review & editing, Supervision, Resources, Methodology, Conceptualization. **Murilo F. Rodrigues:** Writing – original draft, Project administration, Methodology, Data curation. **Roger Wagner:** Writing – original draft,

Supervision, Resources, Methodology. **Lenita M. Stefani:** Writing – original draft, Validation, Supervision, Methodology, Data curation. **Aleksandro S. da Silva:** Writing – original draft, Supervision, Project administration, Methodology, Investigation, Formal analysis, Data curation, Conceptualization.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

Data availability

No data was used for the research described in the article.

Acknowledgments

The authors thank the Foundation for Research Support of Santa Catarina (FAPESC/Brazil) and the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq/Brazil), as well as the Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC, Santa Catarina, Brazil).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2024.106605>.

References

- [1] R.P. Adams, Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry, 4.1 ed., Texensis Publishing, 2017. ISBN 978-1-932633-21-4.
- [2] S.F. Ali, C.P. Lebel, S.C. Bondy, Oxygen species formation as A biomarker of methylmercury and trimethyltin neurotoxicity, *Neurotoxicology* (Little Rock) 113 (1992) 637–648.
- [3] AOAC. Official, Methods Analysis off AOAC International, Association of Official Analytical Chemists Associação de Químicos Analíticos Oficiais, Washington, 2000.
- [4] E.S.M. Cutrim, A.M. Teles, A.N. Mouchrek, V.E. Mouchrek Filho, G.O. Everton, Evaluation of antimicrobial and antioxidant activity of essential oils and hydroalcoholic extracts of zingiber officinale (Ginger) and rosmarinus officinalis (rosemary), *Revista Virtual Química* 11 (11) (2019) 60–81.
- [5] G.M. Buening, D.D. Mann, B. Hook, G.D. Osweiler, The effect of T-2 toxin on the bovine immune system: cellular factors, *Vet. Immunol. Immunopathol.* 3 (1982) 411–417.
- [6] L. Custódio, L.F. Prados, A. Yiannikouris, V. Holder, J. Pettigrew, L. Kuritz, F. D. Resende, G.R. Siqueira, Mycotoxin contamination of diets for beef cattle finishing in feedlot, *Rev. Bras. Zootec.* 48 (2019) e20190079.
- [7] B. Gabriela Lago, Micotoxinas na alimentação de bovinos no Brasil: um estudo de 2017 a 2021. Tese Doutorado, Programa de Pós Graduação em Ciência Animal, Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG, Belo Horizonte, 2022.
- [8] Q. Liu, W. Wang, J. Qi, Q. Huang, Oregano essential oil loaded soybean polysaccharide films: effect of pickering type immobilization on physical and antimicrobial properties, *Food Hydrocolloids* 87 (2019) 165–172, <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.08.011>.
- [9] V.S. Cardoso, I.S. Castro, C.A.R. Lima, M.E.F. Lima, L.E.G. Dorneles, G.M. Direito, M.G.M. Danelli, Efficacy of piperine in reducing the effects of aflatoxin intoxication in broiler chickens: a preliminary report, *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 63 (2) (2011) 495–498.
- [10] Z.D. Stevanović, J. Bošnjak-Neumüller, I. Pajić-Lijaković, J. Raj, M. Vasiljević, Essential oils as feed additives future perspectives, *Molecules*. Belgrade 23 (7) (2018), <https://doi.org/10.3390/molecules23071717>.
- [11] J.C.A. Oliveira, R.S. Veiga, Impacto do Uso de Alecrim (*Rosmarinus Officinalis* L.) para a Saúde Humana, *Brazilian Journal of Natural Sciences* 1 (2019). Ed. 2.
- [12] D.D. Mann, G.M. Buening, B.S. Hook, G.D. Osweiler, Effect of T-2 toxin on the bovine immune system: humoral factors, *Infect. Immun.* (1982) 1249–1252, <https://doi.org/10.1128/iai.36.3.1249-1252.1982>.
- [13] J.P. Campolina, S.G. Coelho, A.L. Belli, F.S. Machado, L.G.R. Pereira, T.R. Tomic, W.A. Carvalho, R.O.S. Silva, A.L. Voorsluys, D.V. Jacob, M.M. Campos, Effects of a mixture of essential oils in milk replacer on performance, rumen fermentation, blood parameters and health scores of dairy heifers, *PLoS One* 16 (3) (2021) e0231068.
- [14] K.A. Froehlich, K.W. Abdelsalam, C. Chase, J. Koppien-Fox, D.P. Casper, Evaluation of essential oils and prebiotics for newborn dairy calves, *J. Anim. Sci.* 95 (2017) 3772–3782.
- [15] R.O. Petre, R.A. Serafim, D.F.M. Souza, L.S. Sakanaka, M.M. Yamaguchi, Characterization and application of oregano oil as a natural antioxidant in fresh sausage, *Brazilian Journal of Development*, Curitiba 6 (7) (2020) 44109–44118, <https://doi.org/10.34117/bjdv6n7-144>.
- [16] H. Van Den Dool, P.D.A. Kratz, Generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas–liquid partition chromatography, *J. Chromatogr.* (1963) 463–471, [https://doi.org/10.1016/s0021-9673\(01\)80947-x](https://doi.org/10.1016/s0021-9673(01)80947-x).
- [17] N. Litherland, Oklahoma Dairy Report – A Dairy Nutrition Newsletter, 1, Oklahoma State University, 2007. Issue 2.
- [18] P.J. Van Soest, J.B. Robertson, B.A. Lewis, Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition, *J. Dairy Sci.* 74 (10) (1991) 3583–3597, [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(91\)78551-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(91)78551-2).
- [19] B.F. Feldman, J.G. Zinkl, N.C. Jain, *Veterinary Hematology*, Williams & Wilkins, Philadelphia, 2000, p. 1344.
- [20] A.M. Jentsch, H. Bachmann, P. Fürst, H.K. Biesalski, Improved analysis of malondialdehyde in human body fluids, *Free Radic. Biol. Med.* 20 (1996) 251–256, [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(95\)02043-8](https://doi.org/10.1016/0891-5849(95)02043-8).
- [21] W.H. Habig, M.J. Pabst, W.B. Jakoby, Glutathione S-Transferases: the first enzymatic in mercapturic acid formation, *J. Biol. Chem.* 249 (22) (1974) 7130–7139, [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)42083-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)42083-8). Baltimore.
- [22] J. Sedlak, R.H. Lindsay, Estimation of total, protein bound and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellmann's reagent, *Anal. Biochem.* 25 (1968) 192–205.
- [23] L.C. Maltez, L.A.L. Barbas, L.F. Nitz, L. Pellegrin, M.H. Okamoto, L.A. Sampaio, J. M. Monserrat, L. Garcia, Oxidative stress and antioxidant responses in juvenile Brazilian flounder *Paralichthys orbignyanus* exposed to sublethal levels of nitrite, *Fish Physiol. Biochem.* (2018) 1–14, <https://doi.org/10.1007/s10695-018-0526-9>.
- [24] K.A. Hammer, C.F. Carson, T.V. Riley, Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts, *J. Appl. Microbiol.* 86 (1999) 985–990, <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1999.00780.x>.
- [25] M.A. Jeshari, A. Riasi, A.H. Mahdavi, M. Khorvashi, Effect of essential oils and distillation residues mixtures on growth performance and blood metabolites of Holstein calves weaned gradually or abruptly, *Livest. Sci.* (2015) 117–122, <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2015.12.011>.
- [26] C.A. Fugita, R.M. Prado, M.V. Valero, E.G. Bonafé, C.B. Carvalho, A. Guerrero, C. Sañudo, I.N. Prado, Effect of the inclusion of natural additives on animal performance and meat quality of crossbred bulls (Angus vs. Nellore) finished in feedlot, *Anim. Prod. Sci.* 58 (11) (2018) 2076–2083, <https://doi.org/10.1071/AN16242>.
- [27] D.A.E. Façanha, A.M. Vasconcelos, W.S.T. Silva, D. F. Chaves, J.H.G. Moraes, C. J. Olivo, Respostas Comportamentais e Fisiológicas de Bezerros Leiteiros Criados em Diferentes Tipos de Instalações e Dietas Líquidas, *Acta Veterinária Brasileira* 5 (3) (2011) 250–257.
- [28] L. Yang, D. Tu, Z. Zhao, J. Cui, Cytotoxicity and apoptosis induced by mixed mycotoxins (T-2 and HT-2 toxin) on primary hepatocytes of broilers in vitro, *Toxicol* 17 (2017), <https://doi.org/10.1016/j.toxicol.2017.01.001>.
- [29] A. Mavrommatis, E. Giamouri, S. Tavrizelou, M. Zacharioudaki, G. Danezis, P. E. Simitzis, E. Zoidis, E. Tziplakou, A.C. Pappas, C.A. Georgiou, K. Feggeros, Impact of mycotoxins on animals' oxidative status, *Antioxidants* 10 (2) (2021) 214, <https://doi.org/10.3390/antiox10020214>.
- [30] S. Nayakwadi, R. Ramu, A.K. Sharma, V.K. Gupta, K. Rajukumar, V. Kumar, P. S. Shirahatti, L. Rashmi, K.M. Basalingappa, Toxicopathological studies on the effects of T-2 mycotoxin and their interaction in juvenile goats, *PLoS One* 15 (3) (2020), <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0229463>.
- [31] J. Wu, Y. Bai, X. Lang, C. Wang, X. Shi, D.P. Casper, L. Zhang, H. Liu, T. Liu, X. Gong, T. Liang, R. Zhang, Dietary supplementation with oregano essential oil and monensin in combination is antagonistic to growth performance of yearling Holstein bulls, *J. Dairy Sci.* 103 (9) (2020), <https://doi.org/10.3168/jds.2020-18211>.
- [32] R. Zhou, J. Wu, X. Lang, L. Liu, D.P. Casper, C. Wang, L. Zhang, S. Wei, Oregano's impact on in vitro ruminal fermentation, methane production and ruminal microbial community, *J. Dairy Sci.* 103 (2019) 2303–2314, <https://doi.org/10.3168/jds.2019-16611>.



A biofloc system avoids the adverse effects of diets with suboptimal protein levels on zootechnical performance, intestinal histomorphometry, and protein metabolism of Nile tilapia juvenile fed *Spirulina* biomass (*Arthrospira platensis*) as an alternative protein source

Fernanda Picoli · Alana D. de Oliveira · Suelyn O. Marques · Deise C. Terhorst · Suélen Serafini · Luísa Nora · Fabio F. Neves · Maurício G. C. Emerenciano · Diogo L. A. Lopes · Aleksandro S. da Silva · Thiago E. H. P. Fabregat

Received: 13 December 2023 / Accepted: 7 May 2024 / Published online: 13 May 2024

© The Author(s), under exclusive licence to Springer Nature B.V. 2024

Abstract This study aimed to evaluate the effect of the biofloc technology (BFT) system and the replacement of fish meal with *Spirulina* biomass on productive performance, intestinal histomorphometry, plasma biochemistry, and oxidative stress of Nile tilapia juveniles (*Oreochromis niloticus*) fed suboptimal levels of protein. Two factors were evaluated: production systems (clear water×BFT) and replacement of fish meal with *Spirulina* (0, 33, 66 e 100%). The

design was in a 2×4 randomized factorial scheme with four replications, and the fish were evaluated for 48 days. Four isoproteic (28% crude protein) diets were formulated with gross energy values close to 4300 kcal kg⁻¹. Nile tilapia juveniles (0.23±0.01 g) were distributed in 16 circular tanks (70 L) at seven fish/tank. The diets were formulated with protein levels approximately 20% below that required for the species and life stage. No interaction was observed between the factors evaluated (production systems×*Spirulina* inclusion). Rearing the fish in the BFT system avoided the adverse effects of diets with suboptimal protein levels on performance, intestinal histomorphometry, and protein metabolism. Lower values lower lipid peroxidation and higher antioxidant capacity were observed in fish reared in the BFT system, showing evidence of improvements in antioxidant responses and lower levels of physiological oxidative stress. *Spirulina* completely replaced fish meal in the diets of Nile tilapia juveniles without adverse effects on intestinal morphometry, protein metabolism, and antioxidant response. Replacing 66% of fish meal with *Spirulina* improved the productive performance, regardless of the rearing system.

F. Picoli · T. E. H. P. Fabregat (✉)
UDESC – Santa Catarina State University, Agroveterinary Science Center (CAV), Lages, Santa Catarina, Brazil
e-mail: thiagofabregat@hotmail.com

F. Picoli · A. D. de Oliveira · S. O. Marques ·
D. C. Terhorst · S. Serafini · L. Nora · D. L. A. Lopes ·
A. S. da Silva (✉)
UDESC – Santa Catarina State University, West Higher Education Center (CEO), Chapecó, Santa Catarina, Brazil
e-mail: aleksandro_ss@yahoo.com.br

F. F. Neves
UDESC – Santa Catarina State University, South Higher Education Center (CERES), Laguna, Santa Catarina, Brazil

M. G. C. Emerenciano
CSIRO Agriculture and Food, Aquaculture Program, Bribie Island Research Center, Bribie Island, QLD, Australia

Keywords Animal nutrition · *Arthrospira platensis* · Biofloc system · Intestinal histomorphometry · *Spirulina*

Introduction

The world aquaculture sector produced 88 million tons in 2020, most of which were fish (FAO 2022). This significant growth in activity is explained by the increase in the world population and per capita consumption (Food and Agriculture Organization of the United Nations - FAO 2022). The growth in fish consumption is associated with increasing demand for healthier animal proteins (Henchion et al. 2017; Boer et al. 2020). To meet this demand, fish farming adopts intensive systems with a greater demand for processed feed (Subashinge 2013; Oddsson 2020). In this context, the demand for quality feed and high food costs create bottlenecks for the continued expansion of fish production. The ingredients that constitute the protein fraction of fish diets are expensive and contribute significantly to the total expenses (Barbosa et al. 2020). In addition, diets containing protein levels exceeding nutritional requirements and pellets with low stability and high solubility can increase nitrogen compounds in effluents (Herath and Satoh 2015). Therefore, using feeds with lower protein levels and searching for alternative protein ingredients are strategies to reduce feed costs and increase the sustainability of the activity.

Rearing in a biofloc technology (BFT) system is an alternative to reduce protein content in diets and feed costs in intensive fish production (Avnimelech 2007; Azim and Little 2008). BFT system is a closed-intensive production system with low water renewal. Water quality is maintained with intensive aeration and managing heterotrophic and autotrophic bacterial populations (Monroy-Dosta et al. 2013). An organic carbon source is added to the water to balance the relationship between carbon and nitrogen (Pérez-Fuentes et al. 2016; Silva et al. 2017). Therefore, nitrogenous compounds are recycled, and bioflocs, which serve as a food supplement for fish, are formed (Avnimelech 2007; Avnimelech and Kochba 2009; Ekasari 2014). The microbial biomass produced in this system can supply up to 50% of the protein requirement of fish produced (Avnimelech 2007; Azim and Little 2008; Da Silva et al. 2018; Durigon et al. 2020). Lower feed conversion rates can also be achieved (Luo et al. 2014). In general, the focus of protein reduction experiments in the BFT system is performance (Azim and Little 2008; Luo et al. 2014; Durigon et al. 2020). More studies are still needed

to understand better the metabolism and physiology of fish receiving suboptimal protein levels in a BFT system.

Fish meal is one of fish feed's most commonly used protein ingredients. It is characterized by its high protein value, polyunsaturated fatty acids, considerable mineral and vitamin fractions, and antioxidant properties (Masumoto et al. 1996; Pike 1999; Cho and Kim 2011). Fish meal exclusion from diets may decrease zootechnical indices in fish (Gomes et al. 1995; Glencross et al. 2011; Turchini et al. 2019). In addition, its high cost and reduced availability (World Bank - World Bank Commodities Price Data (The Pink Sheet) 2020) have driven the search for cheaper protein alternatives. The microalgae *Spirulina* (*Arthrospira platensis*) is an alternative source of protein with the potential to replace fish meal (Hussein et al. 2013; Raji et al. 2018, 2020; Erdogan 2019; Mansour et al. 2021). It is considered a rich source of highly digestible protein and essential amino acids (Andrade et al. 2005) and contains various substances (fibrous carbohydrates, vitamins, minerals, carotenoid pigments, and polyunsaturated fatty acids) with antioxidant properties (Promya and Chitmanat 2011; Gutiérrez-Salmeán et al. 2015). Some studies demonstrate that *Spirulina* can also enhance zootechnical performance in comparison to fish meal (Hussein et al. 2013; El-Sheekh et al. 2014; Velasquez et al. 2015; Roohani et al. 2019; Raji et al. 2020). Improvements in biochemical (Belal et al. 2012; Mansour et al. 2021), histological (Abu-Elala et al. 2016), and oxidative stress parameters (Cao et al. 2018; Salah El-Din et al. 2021) have also been reported.

Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) is a prominent species in global fish farming (Prabu et al. 2019; Food and Agriculture Organization of the United Nations - FAO 2022). It is a rustic species that quickly adapts to intensive cultivation. The rearing of Nile tilapia in a BFT system has been previously reported with positive results (Lima et al. 2018; Martins et al. 2020; Picoli et al. 2022). Nile tilapia ingests bioflocs, enabling a reduction in the demand for protein (Avnimelech 2007; Avnimelech and Kochba 2009; Ekasari 2014.). *Spirulina* has also been evaluated in Nile tilapia feeding with good results (Belal et al. 2012; Hussein et al. 2013; Velasquez et al. 2015; Abdelkhalek et al. 2017). However, its use in a BFT system with suboptimal protein levels in the diet has not been evaluated. Therefore, the objective of this study was

to determine the effect of the culture system and the replacement of fish meal by *Spirulina* biomass (*A. platensis*) on performance, intestinal histomorphometry, plasma biochemistry, and oxidative stress in Nile tilapia juveniles fed suboptimal levels of protein.

Materials and methods

Experimental design

The experiment was conducted at the Aquaculture Laboratory of the State University of Santa Catarina, Campus Chapecó, Santa Catarina, Brazil, for 48 days. The Committee for Ethics in the Use of Animals approved the study under protocol number 6983180521. Two factors were evaluated: the production systems (clear water×BFT) and the replacement of fish meal with *Spirulina* biomass (0, 33, 66 e 100%). The design was in a 2×4 randomized factorial scheme with four replications, and the fish were evaluated for 48 days (Table 1).

Arthrospira platensis biomass

The cultivation of *Arthrospira platensis* was carried out in raceway tanks arranged inside a greenhouse

in a semi-continuous system at the Laboratory of Algae Cultivation and Biotechnology – LCBA UDESC, Laguna, Brazil, and the cultivation period extended from March to June. After inoculating the culture, it waited for 15 days to reach the stationary phase of the growth curve, and then harvesting began every three days per week (Monday, Wednesday, and Friday). Approximately 400 L were filtered at each harvest, corresponding to about 25% of the total cultivation volume, with dry biomass productivity varying between 0.7 and 1.3 g L⁻¹. The culture medium contained fresh water and was composed of 10 g L⁻¹ of NaHCO₃, 1 g L⁻¹ of commercial soluble fertilizer with a nitrogen: phosphate: potassium ratio of 18: 6: 18, and a high amount of NaCl (30 g L⁻¹). The cultivation was carried out under natural temperature and lighting conditions (not controlled), and the *Spirulina* biomass was collected three times a week by filtration with a 20-µm mesh. The collected biomass was immediately dried in a laboratory oven at 50 °C for 24 h and then ground in a cryogenic spray mill (MA775, Marconi) before use in the experimental diets (Table 2).

Table 1 Composition of experimental diets (% kg⁻¹) based on dry matter

Composition analyzed (AOAC 2000). Premix— folic acid – 2400 mg; nicotinic acid – 48 g; pantothenic acid – 24 g; biotin – 96 mg; vit. A – 2,400,000 IU; vit. D3 – 400,000 IU; vit. E – 24,000 IU; vit. B1 – 9600 mg; vit. B2 – 9600 mg; vit. B6 – 9600 mg; vit. B12 – 9600 mg; vit K3 – 4800 mg; vit. C – 96 g; iron – 100 g; manganese – 40 g; zinc – 6000 mg; cobalt – 20 mg; iodine – 200 mg; selenium – 200 mg; antioxidant (ethoxyquin) – 19.6 g
DM, dry matter; MM, mineral matter; EE, ether extract; CP, crude protein; GE, gross energy

Ingredients	Replacement percentage of fish meal			
	0%	33%	66%	100%
Fish meal	36.45	23.26	10.08	-
<i>Spirulina</i> biomass	-	26.25	52.50	72.57
Soybean meal	10.00	10.00	10.00	10.00
Corn	41.59	27.86	14.02	3.43
Soy oil	10.73	9.00	7.29	5.98
Premix	0.40	0.40	0.40	0.40
Limestone	0.64	1.65	2.53	3.20
Dicalcium phosphate	-	1.15	2.53	3.58
Table salt	0.06	0.30	0.53	0.72
Antioxidant	0.10	0.10	0.10	0.10
Total (%)	100	100	100	100
Analyzed composition (%)				
DM	84.33	83.78	84.56	83.10
MM	8.07	8.55	8.80	8.89
EE	10.32	7.09	6.67	6.74
CP	27.64	28.76	27.65	28.26
GE (kcal kg ⁻¹)	4596	4380	4395	4425

Table 2 Proximal composition of fish meal and *Spirulina* biomass used in experimental diets

Proximal composition	Fish meal	<i>Spirulina</i> biomass
DM (%)	93.33	84.74
MM (%)	25.79	16.56
EE (%)	7.52	2.60
CP (%)	55.02	32.01

Composition analyzed (AOAC 2000)

DM, dry matter; MM, mineral matter; EE, ether extract; CP, crude protein

Experimental diets

The experimental diets were isoproteic (28% crude protein [CP]). The gross energy levels of the diets followed values close to 4300 GE kcal kg⁻¹, according to Hafedh (1999). They were formulated using Super-Crac® software to meet protein levels approximately 20% below the required for the species and life stage (35% CP [FAO 2017]). The proximal composition of the diets (Table 1) was analyzed according to methods described in the Association of Official Analytical Chemists (Association of Official Analytical Chemists (AOAC) 2000). The dry matter was determined by drying at atmospheric pressure in an oven at 105 °C, up to constant weight, according to method No. 920.151. The mineral matter content was determined in a muffle furnace at 550 ± 5 °C until complete incineration of the organic matter of the sample, according to method No. 940.26. The lipid content was obtained by extraction in a Soxhlet apparatus, using ethyl ether solvent for 8 h under reflux, according to method No. 920.39. The micro Kjeldahl method determined the protein content using a conversion factor equal to 6.25. Gross energy, in turn, was performed using the colorimetric pump method (Calorimeter – IKA® C200), according to Silva and Queiroz (2009). To this end, the sample was placed in a metal cylinder pressurized with O₂ (25 to 30 atm) and immersed in distilled water, and as it was oxidized (burned), its energy loss in heat was measured.

In addition to this ingredient, the formulated diets contained fish and soybean meal as protein sources and soybean and corn oil as energy sources (Table 1). All ingredients were ground in an industrial processor and sieved through a 0.71-mm mesh. Subsequently, they were mixed with the addition of water

(50%), pelleted in sizes 0.1 (mesh), 0.5 and 1-mm in “spaghetti” mixer (Malta®, Model 1036, nozzle no. 8), and placed in an oven (Cienlab®, Model CE-220/150) at 55 °C for 48 h. Diets were stored in plastic packages and placed in refrigerators (4 °C) until use.

Animals and facilities

Nile tilapia juveniles (GIFT lineage) were weighed individually (0.01 g precision scale, Marte model ML 600, São Paulo, Brazil) at the beginning of the experimental period, obtaining an average weight of 0.23 ± 0.01 g. These animals were acquired from commercial fish farming and remained in an acclimatization period for 15 days. During this period, they were fed a maintenance diet (Supra® Tilapia 32% CP) in a proportion of 10% biomass, divided into three meals (08:00, 13:00, and 17:00).

The animals were distributed at seven fish per tank in circular polyethylene tanks (useful volume of 70 L), divided into two independent water recirculation systems (CW × BFT). Each system consisted of 16 circular boxes interconnected with circular tanks (usable volume: 850 L) called “macrocosms.” The tanks were individually aerated through porous stone (1 × 2 cm) connected to a radial air compressor. Each macrocosm contained a peripheral water pump (Intech® model BP500), responsible for the distribution and recirculation of water in its respective system. Each macrocosm was equipped with a heater resistance (Nobre Brasil®, 3000 W) and connected to a digital temperature controller with a sensor (XH-W3001®, 12V, China), aiming to maintain the appropriate temperature for the species (El-Sayed 2006). A biomass of 2.25 kg m⁻³ of tilapia was also maintained in the BFT macrocosm, fed with commercial feed (Supra® Tilapia 32% CP) once a day (1:00 pm; 32% CP). The macrocosm of the clear water system (CW) was composed of a filtering system combined with a mechanical filter (60-µm perlon mesh) and biological particulate material (0.2 m³ of analog of low-density polyethylene bio-balls and 0.05 m³ of expanded clay stone). These materials served as a substrate for the nitrifying bacteria to carry out nitrification of the culture water.

The animals were fed throughout the experimental period at 10% of the biomass per day (Workagegn et al. 2014), divided into three feedings (08:00 am,

1:00 pm, and 5:00 pm). The biomass monitoring was performed every 16 days using biometrics of all experimental units.

At the beginning of the experiment, all tanks in the BFT system received a previously matured bio-floc inoculum (10 L) to prevent unwanted variations in water quality (Krummenauer et al. 2014; Martins et al. 2020). Subsequently, dechlorinated water was added to complete the useful volume of 70 L. The same proportion (1:6) was used in the macrocosm. For the formation and maintenance of the microbial community and the adequate conditions of the culture medium, a C:N ratio of 10–15:1 was maintained (Pérez-Fuentes et al. 2016). Sugarcane molasses was used as an external source of carbon.

The water quality parameters of both cultivation systems were measured daily, including temperature, dissolved oxygen (ALFAKIT® oximeter, model AT170), and pH (pHmeter ALFAKIT®, model AT315). Total ammoniacal nitrogen (TAN) was measured three times a week for both systems. TAN was measured with a commercial kit (Spectro Indotest Ammonia Kit – Alfakit®), and the result was obtained using a photocolormeter (ALFAKIT®, model AT100P). Three times a week, total settleable solids (TSS) were also measured in the BFT system using an Imhoff cone. According to the results obtained in these measurements ($\text{TAN} > 1 \text{ mg L}^{-1}$), molasses was or was not added to the BFT system. Weekly analyses of nitrite, nitrate, orthophosphate, and alkalinity of the culture medium were performed using a photocolormeter (ALFAKIT®, model AT100P). The parameters remained within the recommended range for tilapia (El-Sayed 2006; Azim and Little 2008; Luo et al. 2014; Lima et al. 2015; 2018) (Table 3).

Zootechnical performance and hepatosomatic index

After the experimental period, the animals remained fasting for 24 h and were individually weighed (0.01 g precision scale, Marte model ML 600, São Paulo, Brazil) and measured for the evaluation of zootechnical parameters: final weight; average weight gain = final weight (g) – initial weight (g); specific growth rate = $\ln$ final weight (g) – $\ln$ initial weight (g)/experimental period $\times 100$ (% day^{-1}); apparent feed conversion = feed intake/weight gain; feed intake = feed consumed during the experimental

Table 3 Water quality parameters (mean $\pm$ standard deviation) of juvenile Nile tilapia grown in two culture systems (CW $\times$ BFT) after 48 days of feeding with *Spirulina* biomass

Parameters	Macrocosm	
	CW	BFT
T ^a (°C)	25.40 $\pm$ 1.28	25.90 $\pm$ 1.26
OD (mg L ⁻¹)	7.97 $\pm$ 1.10	7.72 $\pm$ 1.05
pH	7.53 $\pm$ 0.59	7.36 $\pm$ 0.30
N-NH ₃ (mg L ⁻¹)	0.24 $\pm$ 0.64	0.60 $\pm$ 0.67
NO ₂ ⁻ (mg L ⁻¹)	0.14 $\pm$ 0.15	0.31 $\pm$ 0.08
NO ₃ ⁻ (mg L ⁻¹)	1.82 $\pm$ 0.09	1.32 $\pm$ 0.14
ALK (mg L ⁻¹ CaCO ₃)	25.8 $\pm$ 20.62	41.83 $\pm$ 20.18
ORT (PO ₄)	0.64 $\pm$ 0.03	3.41 $\pm$ 1.67
TSS (mg L ⁻¹)	-	13.35 $\pm$ 13.82

T^a, temperature; °C, degrees celsius; pH, hydrogenionic potential; N-NH₃, ammonia nitrogen; mg L⁻¹, milligram per liter; NO₂⁻, nitrite; NO₃⁻, nitrate; ALK, alkalinity; mg L⁻¹ CaCO₃, milligram per liter of calcium carbonate; ORT, orthophosphate; PO₄, phosphate; TSS, total sedimentable solids; CW, clear water culture system; BFT, biofloc culture system

period (g) and survival (S) = number of dead animals/total fish $\times 100$ (%). Subsequently, 12 fish per treatment (3 animals per experimental unit – replication) were sedated with eugenol (phenylpropene derivative – 0.5 ml per liter (L⁻¹) of water) and euthanized by medullary section to collect the liver to measure the hepatosomatic index (HSI = liver weight/total weight $\times 100$) and the gastrointestinal tract for further analysis.

Intestinal and liver histomorphometry

We collected fractions of the proximal intestine and liver for the histomorphometric analysis. The histological processing of the samples was performed at the UDESC Histology Laboratory, Campus Lages (Santa Catarina, Brazil), according to routine methods for preparing histological slides (Nunes and Cinsa 2016). The intestinal and liver fragments were placed in sterile plastic containers with a 10% formalin solution, identified, and fixed for 12–16 h in 70% alcohol until the evaluation of the morpho-histological characteristics. The fractions were sectioned at 0.3 cm using the histology technique, diaphanization, and embedding in histological paraffin. Fractionation into 3- μm sections was performed using a semiautomatic microtome (Mello et al. 2013). Longitudinal sections

were semi-serialized and stained using periodic acid-Schiff (Tolosa et al. 2003).

The samples were observed using light microscopy (Bioval L-2000^a microscope, São Paulo, Brazil). Using a camera attached to the microscope, the intestinal (10×) and liver (40×) images were digitized using “TCapture” software (Brand Laborana®, São Paulo, Brazil). After the scans were completed, ten villi per animal were selected by integrity criteria (Picoli et al. 2019), as follows: (i) VH – villus height (i.e., distance from the apex of the villi to the beginning of the muscle layer); (ii) TVH – total height of the villi (i.e., height from the apex of the villi to the end of the serosa); (iii) VW – villi width; (iv) VT – villus epithelium thickness, according to Mello et al. (2013). All measurements were performed using Image J software (National Institute of Health, Bethesda, Maryland, United States of America). An area including 100 hepatocytes per animal was measured. The mean area of hepatocytes (MAH) per treatment was estimated using the same software, according to Picoli et al. (2019).

Plasma biochemical and antioxidant analyses

After the anesthesia of 12 animals per treatment, blood was collected by puncturing the caudal vein into syringes containing 10% EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid). Due to the size of the fish in the CW system, a “pool” of the animals’ blood was analyzed. The collected blood was centrifuged for 10 min at 3500 rpm, and supernatants (plasma) were stored in microtubes at –20 °C until analysis. Total proteins (PTNA) and albumin (ALBU) were evaluated in a biochemical analyzer (Bio Plus® BIO-2000) using commercial kits (Gold Analisa®). Globulin levels (GLOBU) were calculated using the formula:

$$GLOBU = PTNA - ALBU$$

Liver samples were collected in cryovials and stored in a freezer at –20 °C until processing; 0.5 g of liver sample was ground/homogenized (Turratec®) with saline solution (0.9%) and centrifuged at 7000 rpm for 10 min. The supernatants were stored in microtubes at –20 °C until analysis of the following parameters: thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), glutathione S-transferase (GST), and protein thiol (PSH). Lipid peroxidation was estimated in samples by measuring malondialdehyde (MDA).

Tissue samples were incubated at 95 °C for 60 min in an acid medium containing 8.1% sodium dodecyl sulfate, 0.5 ml acetic acid buffer (500 mM, pH 3.4), and 0.6% TBA (Ohkawa et al. 1978). Absorbances were measured at 532 nm and compared to the malondialdehyde standard curve. The results were expressed in nmol MDA/ml (Jentzsch et al. 1996).

The glutathione S-transferase activity was measured kinetically using 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) as a substrate. The reaction mixture contained 0.1 M potassium phosphate buffer (PPB), GSH (1 mM), CDNB (1 mM), 2.5 mM EDTA, and distilled water. The absorbance was determined at 340 nm at 37 °C, and enzymatic activity was expressed as $\mu\text{mol CDNB}/\text{min}/\text{mg}$ of protein (Habig et al. 1974).

Protein thiols (PSH) were measured using a method based on the use of DTNB (5,5-dithiobis-2-nitrobenzoic acid) (Ellman 1959; Sedlak and Lindsay 1968), measured after deproteinization of the homogenates with trichloroacetic acid. The sediment formed by the precipitated protein was resuspended with a homogenization buffer to determine the PSH content. Results were expressed as nanomoles (μmol) SH g^{-1} of tissue.

Statistical analysis

Normality (Shapiro–Wilk Test) and homogeneity of variances (Bartlett Test) were verified, and the data were subjected to analysis of variance for a factorial scheme. When not significant, means were compared using Tukey’s test at a 5% probability level. Regarding interaction, factorial splitting and means were compared using Tukey’s test (5%). The analyses were performed using the R® 4.1.1 statistical analysis program.

Results

Zootechnical parameters and organosomatic indexes

No interaction ($P > 0.05$) was observed between culture systems and levels of replacement of fish meal by *Spirulina* biomass for tilapia performance variables (Table 4). In the BFT system, the performance of the fish was better than those reared in the CW system ($P < 0.05$; Table 5). *Spirulina* biomass completely replaced fish meal without compromising

Table 4 Analysis of variance of performance variables of Nile tilapia juveniles reared in two culture systems (CW×BFT) after 48 days of feeding on *Spirulina* biomass

Variables	Systems (S)	<i>P</i> value Fish meal replacement level (T)	Interaction (S×T)
FW (g)	<0.0010*	0.0029*	0.0853 NS
AWG (g)	<0.0001*	0.0029*	0.0851 NS
SGR (% day ⁻¹)	<0.0001*	0.0028*	0.0849 NS
FC	0.0002*	0.0023*	0.0970 NS
FI (g)	<0.0001*	0.8360 NS	0.5850 NS
S (%)	0.3640 NS	0.2590 NS	0.2590 NS
HSI (%)	0.1603 NS	0.5107 NS	0.4379 NS

S, systems (BFT and CW); T, treatments (0, 33, 66, and 100%) replacement of fish meal by *Spirulina*; S×T, interaction between systems and treatments; FW, final weight; AWG, average weight gain; SGR, specific growth rate; FC, feed conversion; FI, feed intake; S, survival; HSI, hepatosomatic index; g, grams; % day⁻¹, % weight gain per day; NS, not significant

**P*<0.05

performance (*P*>0.05). Replacing 66% of fish meal with *Spirulina* biomass resulted in more significant growth and improvement in feed conversion than the control treatment (0%; *P*<0.05; Figs. 1 and 2). Treatments did not affect survival or hepatosomatic index (*P*>0.05).

Hepato-intestinal histomorphometry

No interaction was observed between the factors in the tilapia hepato-intestinal histomorphometry (*P*>0.05; Table 6). In the BFT system, the total

villus height (TVH) was higher (*P*<0.05) than in the CW system (Fig. 3). The treatments did not affect the other evaluated histomorphometric parameters (*P*>0.05; Table 7).

Plasma biochemistry and oxidative stress

For the biochemical and oxidative stress parameters, no interactions (*P*>0.05) were observed between the cultivation systems and the replacement levels of fish meal by *Spirulina* biomass (Table 8). In the BFT system, ALBU and GLOBU were higher (*P*<0.05) than CW (Table 9). Lower values for thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) were observed in the BFT system compared to the AC system (Fig. 4). The opposite was observed for the enzyme GST (Fig. 5). Plasma total protein (PTNA) and protein thiol (PSH) levels were unaffected by treatments and systems (*P*>0.05) (Table 9).

Discussion

Zootechnical parameters and organosomatic indexes

The supply of suboptimal protein levels reduced the growth of fish reared in the CW system. The juvenile-specific growth rate was much lower (0.45% day⁻¹) than observed in other studies (5.01% day⁻¹, 1.9% day⁻¹, 1.31% day⁻¹, and 4.42% day⁻¹) (Gullian-Klarian and Arámburu-Adame 2013, Luo et al. 2014, Tanjung et al. 2019 and Akter et al. 2021). This finding confirms that the protein supply in the diets was below the requirements. By contrast, the growth

Table 5 Mean values (± standard deviation; *n*=12) of zootechnical parameters of Nile tilapia juveniles reared in two culture systems (CW×BFT) after 48 days of feeding on *Spirulina* biomass

Variables	CW	BFT	0%	33%	66%	100%
FW	4.50±1.58 B	16.50±0.56 A	9.65±5.99 b	10.03±6.20 b	11.43±6.50 a	10.89±7.17 ab
SGR	0.45±0.05 B	1.65±0.15 A	0.96±0.60 b	1.00±0.62 b	1.14±0.65 a	1.08±0.71 ab
FI	4.91±0.47 B	15.75±1.60 A	10.56±6.03	10.30±5.77	10.44±6.33	10.01±5.49
S	93.84±0.17	96.93±0.13	90.75±0.20	100.0±0.00	96.93±0.13	93.84±0.18
HSI	1.94±0.66	1.62±0.23	1.75±0.24	1.80±0.78	1.77±0.69	1.80±0.11

CW, clear water culture system; BFT, biofloc culture system; T, treatments (0, 33, 66, and 100%) replacement of fish meal by *Spirulina* biomass (*Arthrospira platensis*); FW, final weight (g); SGR, specific growth rate (% day⁻¹); FI, feed intake (g); S, survival (%); HSI, hepatosomatic index (%); g, grams; % day⁻¹, % weight gain per day

Means followed by different capital letters in columns differ from each other by Tukey's test (*P*<0.05). Means followed by different lowercase letters in the columns differ using the Tukey test (*P*<0.05)

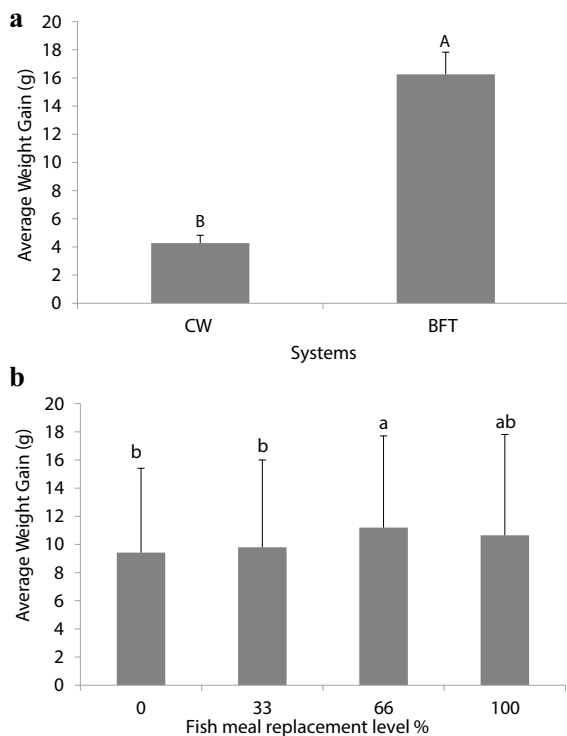


Fig. 1 Average weight gain (mean $\pm$ standard deviation) of Nile tilapia juveniles reared in two culture systems **a** with different levels of replacement of fish meal by *Spirulina* biomass **b** after 48 days of feeding. Means accompanied by distinct letters differ by Tukey's test ($P < 0.05$). CW = clear water culture system; BFT = biofloc culture system

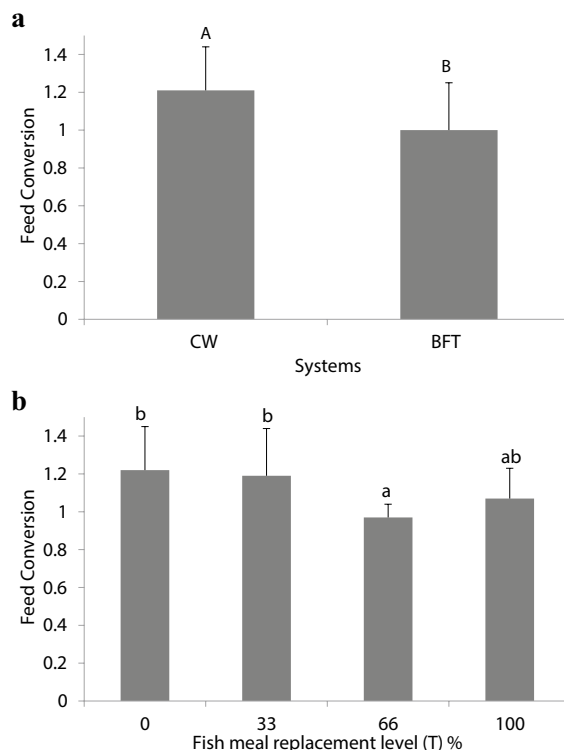


Fig. 2 Feed conversion (mean $\pm$ standard deviation) of Nile tilapia juveniles reared in two culture systems **a** with different levels of replacement of fish meal by *Spirulina* biomass **b** after 48 days of feeding. Means accompanied by distinct letters differ by Tukey's test ($P < 0.05$). CW = clear water culture system; BFT = biofloc culture system

performance was not impaired for fish reared in the BFT system. This result confirms that diets with reduced protein levels in the BFT system did not affect the Nile tilapia productive performance (Azim and Little 2008; Luo et al. 2014; Durigon et al. 2020). Nile tilapia can supplement the diet by ingesting nutrient-rich bioflocs, avoiding possible nutritional deficiency problems (Tacon et al. 2002; Hargreaves 2006; Azim and Little 2008; Crab et al. 2012). It should be noted that the fish used in the experiment were small (0.23 ± 0.01 g) compared to those used in previous studies, demonstrating that the protein reduction in the BFT system can be applied to Nile tilapia in the first stages of development.

The performance results suggest that it is possible to replace fish meal completely with *Spirulina* biomass in Nile tilapia juvenile diets. Previous studies have demonstrated the viability of replacing fish meal with *Spirulina* biomass for tilapia and other species

Table 6 Analysis of variance of hepato-intestinal histomorphometry of Nile tilapia juveniles grown in two culture systems (CW $\times$ BFT) after 48 days of feeding with *Spirulina* biomass

Variables	P value		
	Systems (S)	Fish meal replacement level (T)	Interaction (S $\times$ T)
TVH (μ m)	0.048*	0.871 NS	0.623 NS
VH (μ m)	0.105 NS	0.728 NS	0.549 NS
VW (μ m)	0.219 NS	0.950 NS	0.630 NS
VT (μ m)	0.217 NS	0.868 NS	0.614 NS
MAH (μ m ²)	0.700 NS	0.211 NS	0.667 NS

S, systems (BFT and CW); T, treatments (0, 33, 66, and 100%) replacement of fish meal by *Spirulina* biomass; S $\times$ T, interaction between systems and treatments; TVH, total villi height; VH, villi height; VW, villi width; VT, villi epithelium thickness; MHA, mean area of hepatocytes; NS, not significant

* $P < 0.05$

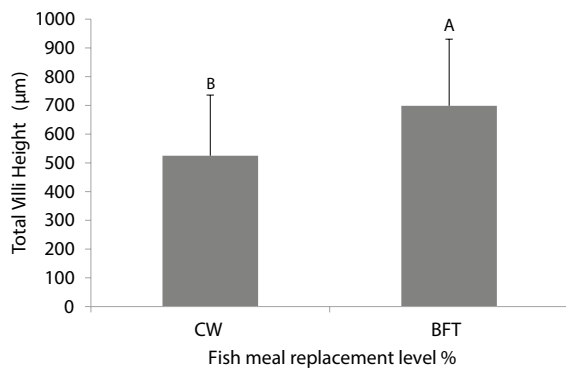


Fig. 3 Total villi height (mean $\pm$ standard deviation) of Nile tilapia juveniles reared in two culture systems (CW $\times$ BFT) with different levels of replacement of fish meal by *Spirulina* biomass after 48 days of feeding. Means accompanied by distinct letters differ by Tukey's test ($P < 0.05$). CW = clear water culture system; BFT = biofloc culture system

Table 7 Mean values ($\pm$ standard deviation; $n = 12$) of hepato-intestinal histomorphometry of Nile tilapia juveniles cultivated in two culture systems (CW $\times$ BFT) after 48 days of feeding with *Spirulina* biomass

Variables	CW	BFT	0%	33%	66%	100%
VH (μm)	454.79 $\pm$ 208.32	592.35 $\pm$ 220.98	459.25 $\pm$ 171.29	515.92 $\pm$ 217.42	542.45 $\pm$ 239.84	584.67 $\pm$ 272.83
VW (μm)	158.07 $\pm$ 55.39	184.17 $\pm$ 53.72	172.67 $\pm$ 59.32	161.73 $\pm$ 46.91	171.38 $\pm$ 65.20	178.70 $\pm$ 58.30
VET (μm)	77.77 $\pm$ 30.62	95.43 $\pm$ 42.57	95.41 $\pm$ 58.69	79.83 $\pm$ 24.17	82.92 $\pm$ 32.79	88.23 $\pm$ 31.40
MAH (μm^2)	502.51 $\pm$ 36.50	515.08 $\pm$ 91.79	470.34 $\pm$ 33.85	492.81 $\pm$ 35.69	529.81 $\pm$ 88.27	536.22 $\pm$ 86.40

CW, clear water culture system; BFT, biofloc culture system; S, systems (AC $\times$ BFT); T, treatments (0, 33, 66, and 100%) replacement of fish meal by *Spirulina* biomass; VH, villi height; VW, villi width; VET, villi epithelium thickness; MHA, mean area of hepatocytes; NS, not significant

* $P < 0.05$

Means followed by different capital letters in the columns differ by Tukey's test ($P < 0.05$)

Table 8 Analysis of variance of biochemical parameters and oxidative stress of Nile tilapia juveniles cultivated in two culture systems (CW $\times$ BFT) after 48 days of feeding with *Spirulina* biomass

P value			
Variables	Systems (S)	Fish meal replacement level (T)	Interaction (S $\times$ T)
PTN (g dL ⁻¹)	0.189 NS	0.870 NS	0.150 NS
ALBU (g dL ⁻¹)	< 0.000***	0.826 NS	0.987 NS
GLOBU (g dL ⁻¹)	0.0475**	0.067 NS	0.129 NS
TBARS	< 0.0001	0.987 NS	0.830 NS
GST	< 0.0001	0.983 NS	0.600 NS
PSH	0.326 NS	0.676 NS	0.247 NS

S, systems (BFT and CW); T, treatments (0, 33, 66, and 100%) replacement of fish meal by *Spirulina* biomass; S $\times$ T, interaction between systems and treatments; PTN, total proteins; ALBU, albumin; GLOBU, Globulins; g/dL, gram per deciliter; TBARS, thiobarbituric acid reactive substances (nmol MDA/mL); GST, glutathione S-transferase ($\mu\text{molCDNB/min/mg}$ protein); PSH, protein thiols ($\mu\text{mol SH/mg}$ protein); NS, not significant

* $P < 0.05$

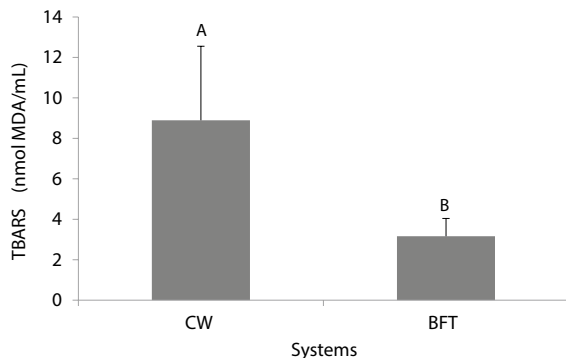
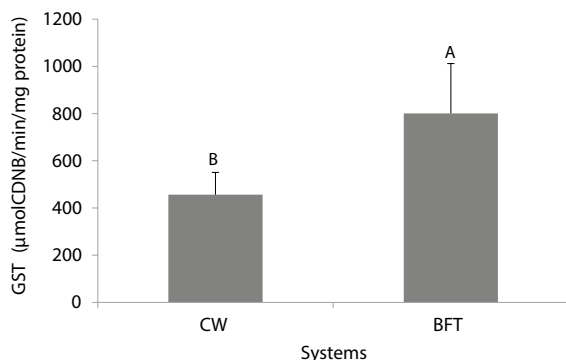
(Nandeesh et al. 1998; 2001; El-Sheekh et al. 2014; Velasquez et al. 2015; Cao et al. 2018; Raji et al. 2020), but this is the first work where replacement was evaluated in different production systems. This microalga's protein content, amino acid profile, and polyunsaturated fatty acid contents are excellent (Albuquerque 2014; Zhang et al. 2020; Rutar et al. 2022), which can explain the positive results. In the present study, replacing fish meal with *Spirulina* biomass did not affect consumption. Generally, diets without animal-based proteins reduce feed intake by tilapia (Fontainhas-Fernandes et al. 1999; Zhou and Yue 2010; Hernández et al. 2013). *Spirulina* has attraction-palatability properties (Jaime-Ceballos et al. 2005; 2007; Silva-Neto et al. 2011; Ali 2014), and it has already been demonstrated that its inclusion

Table 9 Mean values (mean $\pm$ standard deviation; $n=12$) of biochemical parameters and oxidative stress of Nile tilapia juveniles grown in two culture systems (CW $\times$ BFT) after 48 days of feeding with *Spirulina* biomass

Variables	CW	BFT	0%	33%	66%	100%
PTN	3.53 $\pm$ 0.57	4.37 $\pm$ 1.33	4.31 $\pm$ 0.78	3.86 $\pm$ 0.97	3.60 $\pm$ 0.42	4.07 $\pm$ 1.35
ALBU	0.88 $\pm$ 0.25 B	1.42 $\pm$ 0.47 A	1.27 $\pm$ 0.50	1.13 $\pm$ 0.59	1.09 $\pm$ 0.39	1.12 $\pm$ 0.40
GLOBU	2.65 $\pm$ 0.44 B	2.95 $\pm$ 0.47 A	3.04 $\pm$ 0.28	2.73 $\pm$ 0.48	2.51 $\pm$ 0.46	2.95 $\pm$ 0.52
PSH	1.33 $\pm$ 0.18	1.40 $\pm$ 0.21	1.36 $\pm$ 0.18	1.42 $\pm$ 0.22	1.30 $\pm$ 0.18	1.38 $\pm$ 0.24

S, systems (BFT and CW); T, treatments (0, 33, 66, and 100%) replacement of fish meal by *Spirulina* biomass; S $\times$ T, interaction between systems and treatments; PTN, total proteins (g dL⁻¹); ALBU, albumin (g dL⁻¹); GLOBU, globulins (g dL⁻¹); g/dL, gram per deciliter; PSH, protein thiols (μ mol SH/mg protein)

Systems: Means followed by different capital letters in the columns differ from each other by Tukey's test ($P < 0.05$)

**Fig. 4** Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) (mean $\pm$ standard deviation) of Nile tilapia juveniles reared in two culture systems (CW $\times$ BFT) with different levels of replacement of fish meal by *Spirulina* biomass after 48 days of feeding. Means accompanied by distinct letters differ by Tukey's test ($P < 0.05$). CW=Clear water culture system; BFT=biofloc culture system**Fig. 5** Glutathione S-transferase (GST) (mean $\pm$ standard deviation) of Nile tilapia juveniles grown in two culture systems (CW $\times$ BFT) with different levels of replacement of fish meal by *Spirulina* biomass after 48 days of feeding. Means accompanied by distinct letters differ by Tukey's test ($P < 0.05$). CW = clear water culture system; BFT = biofloc culture system

in replacement of fish meal may positively affect feed ingestion (Abdel-Tawwab and Ahmad 2009).

The 66% level of fish meal replacement by *Spirulina* biomass (52.50% inclusion) improved growth and feed efficiency compared to the fish meal diet. *Spirulina* biomass can be a growth promoter in fish diets (Abdel-Tawwab and Ahmad 2009; Elsayed et al. 2012; Hernández et al. 2012; Jana et al. 2014). Previous studies demonstrated that the supplementation with *Spirulina* biomass in the diets improved the growth and feed conversion of Nile tilapia and its hybrids (*Oreochromis niloticus* $\times$ *Oreochromis mossambicus*) (Elsayed et al. 2012; El-Sheekh et al. 2014; El-Ward et al. 2016). It was impossible to relate the inclusion level with the results obtained. The effects are possibly linked to *Spirulina*'s composition. *Spirulina* is rich in various substances with bioactive properties, including fibrous carbohydrates, vitamins, minerals, carotenoid pigments, and polyunsaturated fatty acids (Promya and Chitmanat 2011; Gutiérrez-Salmeán et al. 2015). In the present study, the characterization of these compounds in *Spirulina* was not carried out. Further studies are still needed to explain how one or more of these compounds may positively impact performance.

Hepato-intestinal histomorphometry

The animals cultivated in the BFT system presented larger villi than those in the CW system. The BFT system may improve gut health (Ahmad et al. 2017; Pilotto et al. 2018; Deng et al. 2022). The rich microbial community in bioflocs competes directly with pathogenic microorganisms in the environment and can mitigate possible health challenges (Monroy-Dosta et al. 2013; Ferreira et al. 2015). Furthermore,

beneficial microorganisms can colonize the digestive tract and provide a possible probiotic effect, which may help explain the improvement in villus height (Aguilera-Rivera et al. 2014; Pilotto et al. 2018). Studies on the microbiology of the digestive tract of fish cultured in a BFT system demonstrated the multiplication of beneficial bacteria and colonization of the digestive tract (Pilotto et al. 2018; Deng et al. 2022). In addition to the benefits of the BFT system, it should be mentioned that in the CW system, there was a deficit of nutrients, which may have affected the integrity of the intestinal epithelium of the animals (Dawood 2020; Zarkasi et al. 2016; Zhu et al. 2020).

The replacement of fish meal with *Spirulina* biomass did not compromise the intestinal histomorphometry of Nile tilapia. This result corroborates the performance results and reinforces the viability of *Spirulina* as a substitute for fish meal in tilapia diets. Other authors have demonstrated the feasibility of the replacement concerning intestinal morphometry and observed larger intestinal villi in Nile tilapia supplemented with *Spirulina* in the diet (Abu-Elala et al. 2016). In the present study, *Spirulina*'s lack of positive effects on the villi may be related to the suboptimal levels of protein used. Nutrient deficiency can affect intestinal histomorphometry (Dawood 2020; Zarkasi et al. 2016; Zhu et al. 2020), masking the benefits of supplementation. On the other hand, this result was also observed in the BFT system, where the bioflocs provided an extra supply of nutrients. More studies are needed to confirm these results.

Plasma biochemistry

Albumin and globulin in the plasma were lower in fish cultivated in the CW system compared to the BFT system. The levels of albumin and globulins were also above (0.88 ± 0.25 g dL⁻¹ and 2.65 ± 0.44 g dL⁻¹, respectively) than those normally observed for tilapia (1.20 g dL⁻¹ and 4.0 g dL⁻¹, respectively; Pereira et al. 2016). Albumin and globulins are plasma proteins directly linked to protein metabolism. In addition, they are essential markers of the nutritional status of animals (Sampaio et al. 2012). The supply of suboptimal protein levels explains the decrease in these markers and confirms the results obtained in the productive performance. Likewise, the highest values of albumin and globulin obtained in the BFT system confirm that the bioflocs served as

a complementary supply of nutrients and maintained the nutritional status.

The fish meal substitution for *Spirulina* did not affect the albumin and globulin plasma levels for Nile tilapia. In all treatments, the values were similar (1.15 ± 0.47 g dL⁻¹ and 2.80 ± 0.43 g dL⁻¹, respectively) to those already observed for tilapia (1.20 ± 0.60 g dL⁻¹ and 2.67 ± 0.33 g dL⁻¹ – Pereira et al. 2016 and Tanekhy et al. 2016, respectively). Previous studies showed the beneficial effects of *Spirulina* on biochemical parameters in Nile tilapia (Belal et al. 2012; Abdelkhalek et al. 2017; Abdel-Daim et al. 2020; Mansour et al. 2021; Soliman et al. 2021). However, as previously reported, the supply of suboptimal protein levels may have altered some of these biomarkers, such as total protein and albumin (Ayat et al. 2011), and avoided the detection of the effects of the protein source. Further studies using *Spirulina* in conventional diets are needed to confirm the possible effects of the protein source on markers of protein metabolism in tilapia grown in a BFT system.

Oxidative stress

Lower values of lipid peroxidation and higher values of GST were observed in the BFT system compared to the CW system. These results indicate less cell damage and improved antioxidant capacity (Bacou et al. 2021). The BFT system avoided the adverse effects of physiological oxidative stress and improved the antioxidant responses of the animals. These results might be explained by bioactive compounds (essential fatty acids, carotenoids, free amino acids, and chlorophylls, among others), minerals, and vitamins in microbial aggregates (Tacon et al. 2002; Ju et al. 2008; Crab et al. 2012). Collaborating with this hypothesis, in the CW system, the lower efficiency in the antioxidant defense mechanism was insufficient to prevent the increase in lipid peroxidation. Further evaluations of the composition of bioflocs are necessary to correlate the presence of bioactive compounds with the antioxidant response of animals.

Replacing fish meal with *Spirulina* did not change Nile tilapia juveniles' lipid peroxidation levels or antioxidant capacity. Several authors observed an increase in the antioxidant response of Nile tilapia supplemented with *Spirulina* biomass (Abdelkhalek et al. 2017; Awed et al. 2020; Elabd et al. 2020; Abdel-Daim et al. 2020; Salah El-Din et al. 2021;

Soliman et al. 2021). In the present study, the lack of positive results may be explained by the nutritional composition and functional properties of fish meal and *Spirulina* biomass (Henrikson 1994; Masumoto et al. 1996; Wang et al. 2007; Kumar and Sibi 2020). The flour from marine fish is rich in polyunsaturated fatty acids, vitamins, and minerals with antioxidant properties (Pike 1999; Cho and Kim 2011; Daniel 2017). Similarly, *Spirulina* has phycocyanin and gallic acid, which may explain the results of antioxidant response similar between these ingredients (Albuquerque 2014; Zhang et al. 2020; Rutar et al. 2022). Furthermore, both ingredients have good attraction-palatability and bioavailability, facilitating the ingestion and enjoyment of the diets by tilapia, which may have contributed to maintaining similar values for oxidative parameters in both cultivation systems (Jaime-Ceballos et al. 2005, 2007; Silva-Neto et al. 2011; Ali 2014; Daniel 2017; Rutar et al. 2022). More studies are needed to confirm these results.

Conclusion

A biofloc-based system in the study avoided the adverse effects of diets with suboptimal protein levels on zootechnical performance, intestinal histomorphometry, and protein metabolism of Nile tilapia juveniles. Lower values of lipid peroxidation and higher antioxidant capacity were observed in fish reared in the BFT system, showing evidence of improvements in antioxidant responses and lower levels of physiological oxidative stress. *Spirulina* biomass can completely replace fish meal in the diets of Nile tilapia juveniles without adverse effects on intestinal morphometry, protein metabolism, and antioxidant response. Replacing 66% of fish meal with *Spirulina* biomass (52.50% inclusion) improved fish performance regardless of the CW or biofloc systems.

Acknowledgements We thank the members of the UDESC laboratories in Chapecó (GT-AQUA) and Lages (LAPIS) and other partnerships.

Author contribution Fernanda Picoli: conceived and designed the analysis, collected the data, contributed data of analysis tools, performed the analysis, and wrote the paper; Alana D. de Oliveira, Suelyn O. Marques and Deise C. Terhorst: collected the data; Suélen Serafini and Luísa Nora: contributed to the writing of the paper; Aleksandro S. da Silva, Fabio F. Neves and Maurício G. C. Emerenciano: conceived

and designed the analysis and contributed data of analysis tools; Diogo Luiz de Alcantara Lopes and Thiago El Hadi Perez Fabregat: conceived and designed the analysis, collected the data, contributed data of analysis tools, performed the analysis, and wrote the paper.

Funding The University Scholarship Program of Santa Catarina (UNIEDU/FUMDES) financed this work.

Data availability Upon request to the corresponding author, data supporting this work are available.

Declarations

Ethical approval The authors observed the ethical policies in the journal's author guidelines and confirmed the approval of the Committee for Ethics in the Use of Animals (CEUA – UDESC) (CEUA protocol number 6983180521).

Competing interests The authors declare no competing interests.

References

- Abdel-Daim MM, Dawood MAO, Elbadawy M, Aleya L, Alkahtani S (2020) *Spirulina platensis* reduced oxidative damage induced by chlorpyrifos toxicity in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Animals* 10:473. <https://doi.org/10.3390/ani10030473>
- Abdelkhalek NKM, Eissa IAM, Ahmed E, Kilany OE, El-Adl M, Dawood MAO, Hassan AM, Abdel-Daim MM (2017) Protective role of dietary *Spirulina platensis* against diazinon-induced oxidative damage in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Environ Toxicol Pharmacol* 54:99–104. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2017.07.002>
- Abdel-Tawwab M, Ahmad MH (2009) Live *Spirulina* (*Arthrospira platensis*) as a growth and immunity promoter for Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), challenged with pathogenic *Aeromonas hydrophila*. *Aquac Res* 40(9):1037–1046. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2009.02195.x>
- Abu-Elala NM, Galal MK, Abd-Elsalam RM, Mohey-Elsaeed O, Ragaa NM (2016) Effects of dietary supplementation of *Spirulina platensis* and garlic on the growth performance and expression levels of immune-related genes in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *J Aquac Res Dev* 7:7. <https://doi.org/10.4172/2155-9546.1000433>
- Aguilera-Rivera D, Prieto-Davó A, Escalante K, Chávez C, Cuzon G, Gaxiola G (2014) Probiotic effect of FLOC on *Vibrios* in the pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture* 424–425:215–219. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.01.008>
- Ahmad I, Rani AMB, Verma AK, Maqsood M (2017) Biofloc technology: an emerging avenue in aquatic animal healthcare and nutrition. *Aquac Int* 25:1215–1226. <https://doi.org/10.1007/s10499-016-0108-8>

- Akter T, Hossain A, Islam MR, Hossain MA, Das M, Rahman MM, Aye AT, Abdel-Tawwab M (2021) Effects of *Spirulina* (*Arthrospira platensis*) as a fishmeal replacer in practical diets on growth performance, proximate composition, and amino acids profile of pabda catfish (*Ompok pabda*). J Appl Aquac 1–14. <https://doi.org/10.1080/10454438.2021.1936740>
- Albuquerque LFG (2014) Parâmetros hematológicos e bromatológicos na alevinagem de tilápias-do-Nilo, alimentadas com ração suplementada com *Spirulina* (*Arthrospira platensis*). Universidade Federal do Ceará, Dissertação
- Ali S (2014) Evaluation of the effects of feed attractants (*Spirulina* and ekangi) on growth performance, feed utilization and body composition of fingerlings of stinging catfish, *Heteropneustes fossilis* (Bloch, 1792). Dissertation, University of Dhaka
- Andrade RL, Barrera TC, Mejía JC, Mejía GC, Sánchez AM, Castillo VG (2005) La importancia de *Spirulina* en la alimentación acuícola. Contacto S 57:13–16
- Association of Official Analytical Chemists (AOAC) (2000) Official methods of analysis of the Association of the Analytical Chemists, Virginia
- Avnimelech Y (2007) Feeding with microbial flocs by tilapia in minimal discharge bio-flocs technology ponds. Aquaculture 264(1–4):140–147. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.11.025>
- Avnimelech Y, Kochba M (2009) Evaluation of nitrogen uptake and excretion by tilapia in bio floc tanks, using N tracing. Aquaculture 287(1–2):163–168. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.10.009>
- Awed EM, Sadek KM, Soliman MK, Khalil RH, Younis EM, Abdel-Warith A-WA, Doan HV, Dawood MAO, Abdel-Latif HMR (2020) *Spirulina platensis* alleviated the oxidative damage in the gills, liver, and kidney organs of Nile tilapia intoxicated with sodium sulphate. Animals 10(12):2423. <https://doi.org/10.3390/ani10122423>
- Ayat MS, El-Marakby HI, Sharaf SM (2011) Effect of dietary protein level, stocking density, and dietary pantothenic acid supplementation rate on performance and blood components of Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. J Appl Aquac 23(2):122–135. <https://doi.org/10.1080/10454438.2011.581572>
- Azim ME, Little DC (2008) The biofloc technology (BFT) in indoor tanks: water quality, biofloc composition, and growth and welfare of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Aquaculture 283(1–4):29–35. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.06.036>
- Bacou E, Walk C, Rider S, Litta G, Perez-Calvo E (2021) Dietary oxidative distress: a review of nutritional challenges as models for poultry, swine and fish. Antioxidants 10(4):525. <https://doi.org/10.3390/antiox10040525>
- Barbosa AS, Pereira RG, Rodrigues LA, Casaca JM, Valenti WC, Fabregat TEHP (2020) Economic analysis of family trout farming in Southern Brazil. Aquac Int 28:2111–2120. <https://doi.org/10.1007/s10499-020-00580-7>
- Belal EB, Khalafalla MME, El-Hais AMA (2012) Use of spirulina (*Arthrospira fusiformis*) for promoting growth of Nile tilapia fingerlings. Afr J Microbiol Res 6(35):6423–6431. <https://doi.org/10.5897/AJMR12.288>
- Boer J, Schösler H, Aiking H (2020) Fish as an alternative protein a consumer-oriented perspective on its role in a transition towards more healthy and sustainable diets. Appetite 152:104721. <https://doi.org/10.1016/j.appet.2020.104721>
- Cao S-P, Zou T, Zhang P-Y, Han D, Jin J-Y, Liu H-K, Yang Y-X, Zhu X-M, Xie S-Q (2018) Effects of dietary fishmeal replacement with *Spirulina platensis* on the growth, feed utilization, digestion and physiological parameters in juvenile gibel carp (*Carassius auratus gibelio* var. CAS III). Aquac Res 49(3):1320–1328. <https://doi.org/10.1111/are.13590>
- Cho JH, Kim IH (2011) Fish meal – nutritive value. J Anim Physiol Anim Nutr 95(6):685–692. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0396.2010.01109.x>
- Crab R, Defoirdt T, Bossier P, Verstraete W (2012) Biofloc technology in aquaculture: beneficial effects and future challenges. Aquaculture 356–357:351–356. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.04.046>
- Da Silva MA, Alvarenga ER, Alves GFO, Manduca LG, Turra EM, Brito TS, Sales SCM, Silva Junior AF, Borges WJM, Teixeira EA (2018) Crude protein levels in diets for two growth stages of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) in a biofloc system. Aquac Res 49(8):2693–2703. <https://doi.org/10.1111/are.13730>
- Daniel N (2017) Status of aquaculture with respect to nutrition and feed. Int J Fish Aquat Stud 5(1):333–345
- Dawood MAO (2020) Nutritional immunity of fish intestines: important insights for sustainable aquaculture. Rev Aquac 13(1):642–663. <https://doi.org/10.1111/raq.12492>
- Deng Y, Borewicz K, Jvan L, Olabarrieta MZ, Kokou F, Sipkema D, Verdegem MCJ (2022) In-situ biofloc affects the core prokaryotes community composition in gut and enhances growth of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Microb Ecol 84:879–892. <https://doi.org/10.1007/s00248-021-01880-y>
- Durigon EG, Lazzari R, Uczay J, Lopes DLA, Jerônimo GT, Sgnaulin T, Emerenciano MGC (2020) Biofloc technology (BFT): adjusting the levels of digestible protein and digestible energy in diets of Nile tilapia juveniles raised in brackish water. Aquac Fish 5(1):42–51. <https://doi.org/10.1016/j.aaf.2019.07.001>
- Ekasari J (2014) Biofloc technology as an integral approach to enhance production and ecological performance of aquaculture. Dissertation, Ghent University
- Elabd H, Wang H-P, Shaheen A, Matter A (2020) Nano *Spirulina* dietary supplementation augments growth, anti-oxidative and immunological reactions, digestion, and protection of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, against *Aeromonas veronii* and some physical stressors. Fish Physiol Biochem 46:2143–2155. <https://doi.org/10.1007/s10695-020-00864-y>
- Ellman GL (1959) Tissue sulfhydryl groups. Arch Biochem Biophys 82(1):70–77. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(59\)90090-6](https://doi.org/10.1016/0003-9861(59)90090-6)
- El-Sayed AFM (2006) Tilapia culture. CABI, London
- Elsayed BB, Khalafalla MME, El-Hais AMA (2012) Use of *Spirulina* (*Arthrospira fusiformis*) for promoting growth of Nile tilapia fingerlings. Afr J Microbiol Res 6(35):6423–6431. <https://doi.org/10.5897/AJMR12.288>
- El-Sheekh MI, El-Shourbagy I, Shalaby S, Hosny S (2014) Effect of Feeding *Arthrospira platensis* (*Spirulina*) on growth and carcass composition of hybrid red tilapia

- (*Oreochromis niloticus* x *Oreochromis mossambicus*). Turkish J Fish Aquat Sci 14:471–478. https://doi.org/10.4194/1303-2712-v14_2_18
- El-Ward AA, Eid AE, Mohamed KA, Abd-elfattah B, Hasan MA (2016) Growth performance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fingerlings fed diet supplemented with different of *Spirulina platensis* levels. Egyptian J Anim Prod 53(3):181–190
- Erdogan F (2019) Effects of *Spirulina platensis* as a feed additive on growth and coloration of blue dolphin cichlids (*Cyrtocara moorii* Boulenger, 1902). Aquac Res 50(9):2326–2332. <https://doi.org/10.1111/are.14112>
- FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations (2017) Nile tilapia - *Oreochromis niloticus*. <http://www.fao.org/fishery/affris/species-profiles/nile-tilapia/nile-tilapiahome/en/>. Accessed 26 Jun 2022
- FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations (2022) The state of world fisheries and aquaculture 2022. Towards Blue Transformation. <https://doi.org/10.4060/cc0461en>. Accessed 20 Nov 2022
- Ferreira GS, Bolívar NC, Pereira SA, Guertler C, Vieira FN, Mourão JLP, Seiffert WQ (2015) Microbial biofloc as source of probiotic bacteria for the culture of *Litopenaeus vannamei*. Aquaculture 448:273–327. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.06.006>
- Fontainhas-Fernandes A, Gomes E, Reis-Henriques MA, Coimbra J (1999) Replacement of fish meal by plant proteins in the diet of Nile tilapia: digestibility and growth performance. Aquac Int 7:57–67. <https://doi.org/10.1023/A:1009296818443>
- Glencross B, Rutherford N, Jones B (2011) Evaluating options for fishmeal replacement in diets for juvenile barramundi (*Lates calcarifer*). Aquac Nutr 17(3):722–732. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2010.00834.x>
- Gomes EF, Rema P, Kaushik SJ (1995) Replacement of fish meal by plant proteins in the diet of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): digestibility and growth performance. Aquaculture 130(2–3):177–186. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(94\)00211-6](https://doi.org/10.1016/0044-8486(94)00211-6)
- Gullian-Klanian M, Arámburu-Adame C (2013) Performance of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* fingerlings in a hyper-intensive recirculating aquaculture system with low water exchange. Lat Am J Aquat Res 41(1):150–162
- Gutiérrez-Salmeán G, Fabila-Castillo L, Chamorro-Cevallos G (2015) Nutritional and toxicological aspects of *Spirulina* (*Arthrospira*). Nutr Hosp 32(1):34–40. <https://doi.org/10.3305/nh.2015.32.1.9001>
- Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB (1974) Glutathione S-transferases: the first enzymatic step in mercapturic acid formation. J Biol Chem 249(22):7130–7139. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)42083-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)42083-8)
- Hafedh YSA (1999) Effects of dietary protein on growth and body composition of Nile tilapia. *Oreochromis Niloticus* 1 Aquac Res 30(5):385–393. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2109.1999.00343.x>
- Hargreaves JA (2006) Photosynthetic suspended-growth systems in aquaculture. Aquac Eng 34(3):344–363. <https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2005.08.009>
- Henchion M, Hayes M, Mullen AM, Fenelon M, Tiwari B (2017) Future protein supply and demand: strategies and factors influencing a sustainable equilibrium. Foods 6(7):53–74. <https://doi.org/10.3390/foods6070053>
- Henrikson R (1994) Microalga *Spirulina*: Superalimento del futuro. Ediciones S.A. Urano, Barcelona
- Herath SS, Satoh S (2015) Environmental impact of phosphorus and nitrogen from aquaculture. Feed Feed Pract Aquac 15:369–386
- Hernández LHH, Flores GH, Araiza MAF, López AO (2012) Effects of total replacement of fishmeal with *Spirulina* powder and soybean meal on juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum). Isr J Aquac 64:1–8. <https://doi.org/10.46989/001c.20612>
- Hernández C, Olvera-Novoa MA, Voltolina D, Hardy RW, González-Rodríguez B, Domínguez-Jiménez P, Valverde-Romero M, Agramon-Romero S (2013) Use of tuna industry waste in diets for Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, fingerlings: effect on digestibility and growth performance. Lat Am J Aquat Res 41(3):468–478. <https://doi.org/10.3856/vol41-issue3-fulltext-10>
- Hussein EE-S, Dabrowski K, El-Saidy DMSD, Lee B-J (2013) Enhancing the growth of Nile tilapia larvae/juveniles by replacing plant (gluten) protein with algae protein. Aquac Res 44(6):937–949. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2012.03100.x>
- Jaime-Ceballos B, Villarreal H, García T, Pérez-Jar L, Alfonso E (2005) Effect of *Spirulina platensis* meal as feed additive on growth, survival and development in *Litopenaeus schmitti* shrimp larvae. Rev Investig Mar 26(3):235–241
- Jaime-Ceballos B, Cerecedo RC, Villarreal H, López JG, Pérez-Jar L (2007) Uso de la harina de *Spirulina platensis* como atrayente en el alimento para el camarón *Litopenaeus schmitti*. Hidrobiológica 17(2):113–117
- Jana A, Saroch JD, Borana K (2014) Effect of *Spirulina* as a feed supplement on survival and growth of *Pangasius sutchi*. Int J Fish Aquat Stud 1:77–79
- Jentzsch AM, Bachmann H, Fürst P, Biesalski HK (1996) Improved analysis of malondialdehyde in human body fluids. Free Radic Biol Med 20(2):251–256. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(95\)02043-8](https://doi.org/10.1016/0891-5849(95)02043-8)
- Ju ZY, Forster I, Conquest L, Dominy W, Kuo WC, Horgen FD (2008) Determination of microbial community structures of shrimp floc cultures by biomarkers and analysis of floc amino acid profiles. Aquac Res 39(2):118–133. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2007.01856.x>
- Krummenauer D, Samocha T, Poersch L, Lara G, Wasielesky Junior W (2014) The reuse of water on the culture of pacific white Shrimp, *Litopenaeus vannamei*. BFT System J World Aquac Soc 45(1):3–14. <https://doi.org/10.1111/jwas.12093>
- Kumar PRS, Sibi G (2020) *Spirulina* as fishmeal to improve growth, immune response, antioxidant defense and pigmentation. J Fish Mar Sci 12(2):47–52. <https://doi.org/10.5829/idosi.wjfm.2020.47.52>
- Lima ECR, Souza RL, Wambach XF, Silva UL, Correia ES (2015) Cultivo da tilápia do Nilo *Oreochromis niloticus* em sistema de bioflocos com diferentes densidades de estocagem. Rev Bras Saúde Prod Anim 16(4):948–957. <https://doi.org/10.1590/S1519-99402015000400018>
- Lima ECR, Souza RL, Girao PJM, Braga ÍFM, Correia ES (2018) Culture of Nile tilapia in a biofloc system with different sources of carbono. Rev Cienc Agron

- 49(3):458–466. <https://doi.org/10.5935/1806-6690.20180052>
- Luo G, Gao Q, Wang C, Liu W, Sun D, Li L, Tan H (2014) Growth, digestive activity, welfare, and partial cost-effectiveness of genetically improved farmed tilapia (*Oreochromis niloticus*) cultured in a recirculating aquaculture system and an indoor biofloc system. *Aquaculture* 422–423:1–7. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.11.023>
- Mansour AT, Alsaqufi AS, Alkhamis YA, Al-Gazar FF, Zaki MA, Nour AAM, Ramadan KMA (2021) The evaluation of *Arthrospira platensis* bioactivity and their dietary supplementation to Nile tilapia vegetarian diet on growth performance, feed utilization, body composition and hemato-biochemical parameters. *Ann Anim Sci* 21(3):1061–1080. <https://doi.org/10.2478/aoas-2021-0003>
- Martins MA, Poli MA, Legarda EC, Pinheiro IC, Carneiro RFS, Pereira SA, Martins ML, Gonçalves P, Schleder DD, Vieira FN (2020) Heterotrophic and mature biofloc systems in the integrated culture of Pacific white shrimp and Nile tilapia. *Aquaculture* 514:734517. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734517>
- Masumoto T, Ruchimat T, Ito Y, Hosokawa H, Shimeno S (1996) Amino acid availability values for several protein sources for yellowtail (*Seriola quinqueradiata*). *Aquaculture* 146(1–2):109–119. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(96\)01364-6](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(96)01364-6)
- Mello H, Moraes JRE, Niza IG, Moraes FR, Ozório ROA, Shimada MT, Engracia Filho JR, Claudiano GS (2013) Efeitos benéficos de probióticos no intestino de juvenis de Tilápia-do-Nilo. *Pesq Vet Bras* 33(6):724–730. <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2013000600006>
- Monroy-Dosta MC, Lara-Andrade R, Castro-Mejía J, Castro-Mejía G, Emerenciano MGC (2013) Composición y abundancia de comunidades microbianas asociadas al biofloc en un cultivo de tilapia. *Rev Biol Mar Oceanogr* 48(3):511–520. <https://doi.org/10.4067/S0718-19572013000300009>
- Nandeesh MC, Gangadhar B, Varghese TJ, Keshavanath P (1998) Effect of feeding *Spirulina platensis* on the growth, proximate composition and organoleptic quality of common carp. *Cyprinus Carpio* 1 *Aquac Res* 23(5):305–312. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2109.1998.00163.x>
- Nandeesh MC, Gangadhar B, Manissery JK, Venkataraman RV (2001) Growth performance of two Indian major carps, catla (*Catla catla*) and rohu (*Labeo rohita*) fed diets containing different levels of *Spirulina platensis*. *Bioresour Technol* 80(2):117–120. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(01\)00085-2](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(01)00085-2)
- Nunes CS, Cinsa LA (2016) Princípios do processamento histológico de rotina. *Rev Int Est* 8:31–40. <https://docs.bvsalud.org/biblioref/2018/11/964830/2884-8890-1-sm.pdf>
- Oddsosn GV (2020) A definition of aquaculture intensity based on production functions—the aquaculture production intensity scale (APIS). *Water* 12(3):765. <https://doi.org/10.3390/w12030765>
- Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K (1978) Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 95(2):351–358. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(79\)90738-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(79)90738-3)
- Pereira DSP, Guerra-Santos B, Moreira ELT, Albinati RCB, Ayres MCC (2016) Hematological and histological parameters of Nile tilapia in response to the challenge of different salinity levels. *Bol Inst Pesca* 42(3):635–647. <https://doi.org/10.20950/1678-2305.2016v42n3p635>
- Pérez-Fuentes JA, Hernández-Vergara MP, Pérez-Rostro CI, Fogel I (2016) C: N ratios affect nitrogen removal and production of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* raised in a biofloc system under high density cultivation. *Aquaculture* 452:247–251. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.11.010>
- Picoli F, Lopes DLA, Zampar A, Serafini S, Freccia A, Veronezi LO, Kowalski MW, Ghizzo JB, Emerenciano MGC (2019) Dietary bee pollen affects hepatic–intestinal histomorphometry of Nile tilapia fingerlings. *Aquac Res* 50(11):3295–3304. <https://doi.org/10.1111/are.14287>
- Picoli F, Marques S, Oliveira A, Nunes C, Serafini S, Klein B, Oliveira NS, Santos NNO, Zampar A, Lopes DLA, Fabregat TEHP (2022) Mixed culture microorganisms fermented soybean meal improves productive performance and intestinal health of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) juveniles fed plant-based diets in a biofloc system. *Aquac Res* 53(12):4233–4245. <https://doi.org/10.1111/are.15859>
- Pike IH (1999) Health benefits from feeding fish oil and fish meal. IFFOMA, St. Albans, UK
- Pilotto MR, Goncalves ANA, Vieira FN, Seifert WQ, Bachère E, Rosa RD, Perazzolo LM (2018) Exploring the impact of the biofloc rearing system and an oral WSSV challenge on the intestinal bacteriome of *Litopenaeus vannamei*. *Microorganisms* 6(3):83. <https://doi.org/10.3390/microorganisms6030083>
- Prabu E, Rajagopalsamy CBT, Ahilan B, Jeevagan IJMA, Renuhadevi M (2019) Tilapia an excellent candidate species for world aquaculture: a review. *Annu Res Rev Biol* 31(3):1–14. <https://doi.org/10.9734/arrb/2019/v31i330052>
- Promya J, Chitmanat C (2011) The effects of *Spirulina platensis* and *Cladophora* Algae on the growth performance, meat quality and immunity stimulating capacity of the African sharptooth catfish (*Clarias gariepinus*). *Int J Agric Biol* 13(1):77–82
- Raji AA, Alaba PA, Yusuf H, Bakar NHA, Taufek NM, Muin H, Alias Z, Milow P, Razak SA (2018) Fishmeal replacement with *Spirulina Platensis* and *Chlorella vulgaris* in African catfish (*Clarias gariepinus*) diet: effect on antioxidant enzyme activities and haematological parameters. *Res Vet Sci* 119:67–75. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2018.05.013>
- Raji AA, Jimoh WA, Bakar NHA, Taufek NHM, Muin H, Alias Z, Milow P, Razak S (2020) Dietary use of *Spirulina* (*Arthrospira*) and *Chlorella* instead of fish meal on growth and digestibility of nutrients, amino acids and fatty acids by African catfish. *J Appl Phycol* 32(3):1763–1770. <https://doi.org/10.1007/s10811-020-02070-y>
- Roohani AM, Kenari AA, Kapoorchali MF, Borani MS, Zoriezra SJ, Smiley AH, Esmaeili M, Rombenso AN (2019) Effect of *Spirulina platensis* as a complementary ingredient to reduce dietary fish meal on the growth

- performance, whole-body composition, fatty acid and amino acid profiles, and pigmentation of Caspian brown trout (*Salmo trutta caspius*) juveniles. *Aquac Nutr* 25(3):633–645. <https://doi.org/10.1111/anu.12885>
- Rutar JM, Hudobivnik MJ, Necemer M, Mikus KV, Arčon I, Ogrinc N (2022) Nutritional quality and safety of the *Spirulina* dietary supplements sold on the Slovenian market. *Foods* 11(6):849. <https://doi.org/10.3390/foods11060849>
- Salah El-Din A, Abdullah S, Sayed AE-DH (2021) Antioxidant capacity and DNA damage in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to Ethidium bromide: a protective role for *Spirulina Platensis*. *Sci Afr* 13:e00961. <https://doi.org/10.1016/j.sciaf.2021.e00961>
- Sampaio LR, Silva MCM, Oliveira NA, Souza CLS (2012) Avaliação bioquímica do estado nutricional. In: Sampaio LR (ed) Avaliação nutricional. EDUFBA, Salvador
- Sedlak J, Lindsay RH (1968) Estimation of total, protein-bound, and non protein sulfhydryl groups in tissue by Ellman's reagent. *Anal Biochem* 25:192–208. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(68\)90092-4](https://doi.org/10.1016/0003-2697(68)90092-4)
- Silva UL, Falcon DR, Rocha D, Pessôa MNC, Correia ES (2017) Carbon sources and C: N ratios on water quality for Nile tilapia farming in biofloc system. *Caatinga* 30(4):1017–1027. <https://doi.org/10.1590/1983-21252017v30n423rc>
- Silva DJ, Queiroz AC (2009) Análise de alimentos (métodos químicos e biológicos). 3.ed. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 235 p
- Silva-Neto JF, Nunes AJP, Sabry-Neto H, Sá MVC (2011) *Spirulina* meal has acted as a strong feeding attractant for *Litopenaeus vannamei* at a very low dietary inclusion level. *Aquac Res* 43(3):430–437. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2011.02846.x>
- Soliman HAM, Hamed M, Sayed AE-DH (2021) Investigating the effects of copper sulfate and copper oxide nanoparticles in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) using multiple biomarkers: the prophylactic role of *Spirulina*. *Environ Sci Pollut Res* 28(23):30046–30057. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-12859-0>
- Subashinge R (2013) Aquaculture Sustainability Towards 2030. FAO, Rome
- Tacon AGJ, Cody JJ, Conquest LD, Divakaran S, Forster IP, Decamp OE (2002) Effect of culture system on the nutrition and growth performance of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone) fed different diets. *Aquac Nutr* 8(2):121–137. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2095.2002.00199.x>
- Tanekhy M, Khalil R, Hofi H, Hashish E (2016) The biochemical, pathological and immunological effectiveness of commercial probiotics in Nile tilapia. *Oreochromis Niloticus Pakistan J Zool* 48(5):1269–1282
- Tanjung RRM, Zidni I, Iskandar J (2019) Effect of difference filter media on recirculating aquaculture system (RAS) on tilapia (*Oreochromis niloticus*) production performance. *WSN* 118:194–208
- Tolosa EMC, Rodrigues CJ, Behmer OA, Freitas Neto AG (2003) Manual de técnicas para histologia: normal e patológica., Manole, São Paulo
- Turchini GM, Trushenski JT, Glencross BD (2019) Thoughts for the future of aquaculture nutrition: realigning perspectives to reflect contemporary issues related to judicious use of marine resources in aquafeeds. *N Am J Aquac* 81(1):13–39. <https://doi.org/10.1002/naaq.10067>
- Velasquez SF, Chan MA, Abisado RG, Traifalgar RFM, Tayamen MM, Maliwat GCF, Ragaza JA (2015) Dietary *Spirulina* (*Arthrospira platensis*) replacement enhances performance of juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Am J Appl Psychol* 28(2):1023–1030. <https://doi.org/10.1007/s10811-015-0661-y>
- Wang L, Pan B, Sheng J, Xu J, Hu Q (2007) Antioxidant activity of *Spirulina platensis* extracts by supercritical carbon dioxide extraction. *Food Chem* 105(1):36–41. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.03.054>
- Workagegn KB, Ababboa ED, Yimer GT, Amare TA (2014) Growth performance of the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) fed different types of diets formulated from varieties of feed ingredients. *J Aquac Res Dev* 5(3):235. <https://doi.org/10.4172/2155-9546.1000235>
- World Bank - World Bank Commodities Price Data (The Pink Sheet) (2020) <http://pubdocs.worldbank.org/en/895911554230066764/CMO-Pink-Sheet-April-2019.pdf>>. Accessed 11 fev. 2022
- Zarkasi KZ, Taylor RS, Abell GCJ, Tamplin ML, Glencross BD, Bowman JP (2016) Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) gastrointestinal microbial community dynamics in relation to digesta properties and diet. *Microb Ecol* 71(3):589–603. <https://doi.org/10.1007/s00248-015-0728-y>
- Zhang F, Man Y, Mo W, Wong M (2020) Application of *Spirulina* in aquaculture: a review on wastewater treatment and fish growth. *Rev Aquac* 12(2):582–599. <https://doi.org/10.1111/raq.12341>
- Zhou Q-C, Yue Y-R (2010) Effect of replacing soybean meal with canola meal on growth, feed utilization and haematological indices of juvenile hybrid tilapia, *Oreochromis niloticus* × *Oreochromis aureus*. *Aquac Res* 41(7):982–990. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2009.02381.x>
- Zhu H, Qiang J, Tao Y, Ngoepe TK, Bao J, Chen D, Xu P (2020) Physiological and gut microbiome changes associated with low dietary protein level in genetically improved farmed tilapia (GIFT, *Oreochromis niloticus*) determined by 16S rRNA sequence analysis. *Microbiol Open* 9(5):e1000. <https://doi.org/10.1002/mbo3.10>

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Springer Nature or its licensor (e.g. a society or other partner) holds exclusive rights to this article under a publishing agreement with the author(s) or other rightsholder(s); author self-archiving of the accepted manuscript version of this article is solely governed by the terms of such publishing agreement and applicable law.



Grape seed oil in the diet of primiparous Jersey cows before and after parturition: effects on performance, health, rumen environment, and milk quality

Mateus Henrique Signor¹ · Ana Luiza de Freitas dos Santos¹ · Maksuel Gatto de Vitt² · Luisa Nora² · Rafael Vinicius Pansera Lago¹ · Gabriel Jean Wolschick¹ · Natalia Gemelli Correa¹ · Bruna Klein¹ · Ana Carolina Hadlich Xavier³ · Roger Wagner³ · Bianca Fagan Bissacotti³ · Aleksandro Schafer da Silva^{1,4} 

Received: 20 November 2023 / Accepted: 25 June 2024 / Published online: 12 July 2024
© The Author(s), under exclusive licence to Springer Nature B.V. 2024

Abstract

The objective of the study was to determine whether adding grape seed oil (GSO) to the diet of primiparous Jersey breeds during the transition period would improve animal health by measuring effects on the rumen environment, serum biochemistry, oxidative response, and the composition and quality of milk. We used 14 Jersey heifers, weighing an average of 430 kg and 240 days of gestation. The animals were divided into two groups and offered a basal diet, including GSO in the concentrate for the GSO group (dose of 25 mL per animal day) and the same dose of soybean oil (SO) for the control group. The animals were allocated and maintained in a compost barn system, receiving an anionic diet (pre-partum) and a diet for postpartum lactating animals. Dry matter intake (DMI), milk production, serum biochemistry, serum and milk oxidative stability, ruminal fluid and milk fatty acid profile, milk qualitative aspects, and ruminal parameters such as pH, bacterial activity, and protozoan count were evaluated. The addition of GSO had a positive effect on the health of the cows, especially on the oxidative stability of the cows, by increasing total thiols ($P=0.03$), higher plasma ferric reducing capacity (FRAP) ($P=0.01$), and total antioxidant capacity (TAC) ($P=0.01$). In the oxidative stability of the milk produced by the treated animals, there was also an increase in TAC ($P=0.05$) and FRAP ($P=0.03$). Discreet changes were observed in the ruminal environment with a decreasing trend in pH ($P=0.04$) but an increase in bacterial activity ($P=0.05$) and protozoa counts ($P=0.07$) in cows that consumed the additive. GSO consumption affected the fatty acid profile in milk, increasing saturated fatty acids (SFA) ($P=0.05$) and reducing unsaturated fatty acids (UFA) ($P=0.03$). The oil did not affect milk production or efficiency in the postpartum period. Based on this information, it is concluded that the addition of GSO positively affects the cow's antioxidant system.

Keywords Antioxidant · Biochemistry · Dairy Cows · Grape Seed Oil · Transition

Introduction

The dairy cow's transition period occurs from three weeks before to three weeks after calving and the beginning of lactation (Mota et al., 2006); it is a critical period from an immunological point of view for these animals, who have difficulty maintaining homeostasis, with changes in metabolic and hormonal processes associated with parturition, the beginning of milk synthesis, and adaptation to new nutritional management (Ortolani 2009). The challenges of transition in cows make researchers and companies in animal nutrition look for ways to reduce the occurrence of disorders and abnormalities. Among the ways are the introduction of food alternatives, supplements, and additives

✉ Aleksandro Schafer da Silva
aleksandro_ss@yahoo.com.br

¹ Department of Animal Science, Universidade Do Estado de Santa Catarina (UDESC), Chapecó, Brazil

² Postgraduate Program in Animal Science, Universidade Do Estado de Santa Catarina (UDESC), Chapecó, Brazil

³ Department of Food Science, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Brazil

⁴ Department of Biochemistry and Molecular Biology, UFSM, Santa Maria, RS, Brazil

that have a positive effect on the cows' organism and that promote better health, reduction of disorders and diseases, which consequently favor a smaller number of medicinal interventions, and reduction of productive and reproductive losses throughout lactation.

The use of vegetable oils in cow feed is already known (Kra et al. 2021; Pi et al. 2019; Vargas-Bello-Pérez et al. 2016, 2020). Grape seed oil (GSO) is a co-product produced from residue from the wine industry. It is not yet used in pure cow feed but in grape residue fed to cows in silage or flour (Gessner et al. 2015; Santos et al., 2014).

Molosse et al. (2023) found that replacing wheat bran and soybean hulls with grape pomace silage stimulates beef cattle's immune and antioxidant system, with health benefits and possible reduction in animal feed costs. The immune and antioxidant stimulus was also ascertained in suckling lambs when they received a grape meal (Molosse et al. 2021). The demand is due to the sustainable bias of the reuse of waste, which has high biological value, phenols, flavonoids, and anthocyanins with high antioxidant potential, which can be helpful to nutraceuticals (Sirohi et al. 2020). A review by Silva et al. (2022) also highlights the antioxidant benefits in meat products from animals that received the inclusion of grape residue-based products. Recent literature affirms the potential of this co-product and its different forms of use in different categories of production animals, mainly to improve animal health, which, consequently, can increase their productive performance.

Grape seeds represent 15% of the solid residue and contain 14 to 17% oil, depending on the variety used (Göktürk and Akkurt 2001). The seed and oil are composed of linoleic and oleic acid. The omega 3 (ω 3), omega 6 (ω 6) and omega 9 (ω 9) fatty acid families, including oleic acid (ω 9), linoleic acid (ω 6) and α -linolenic acid (ω 3), are described as essential fatty acids (Rockenbach, 2010; Palmquist and Mattos 2006). The oil also contains considerable vitamin E (Freitas 2007), a vitamin that promotes reproductive rates and milk production in cows when offered during the transition period (Moghimi-Kandelousi et al. 2020). Studies in human medicine found that GSO has several pharmacological activities against the oxidation of low-density lipoproteins, preventing cardiovascular diseases and reducing cholesterol (Jabeen et al., 2021).

Omega-3 fatty acids, such as linoleic acid, have been linked to cardiovascular health benefits. Studies show that adequate consumption can help reduce the incidence of cardiovascular disorders in cattle (Glasser et al. 2008). There is involvement in hormonal regulation that contributes to reproductive success. They have anti-inflammatory and immune system-modulating properties, helping to reduce inflammation and promoting a healthy immune response (Bobe et al. 2009; Benjamin et al. 2016). Increasing the intake of unsaturated fats may result in an increase in

unsaturated fats and a reduction in saturated fats in milk, which may benefit human health. Traditionally, milk and dairy products are among the main contributors to human diets, and in these products, linoleic acid and α -linolenic acid compose the milk fat. The ω 3 can reduce excess fat in the liver and improve liver function (Glasser et al. 2008; Benjamin et al. 2016).

Primiparous cows in the transition phase are more susceptible to oxidative stress than multiparous cows because of their lower total antioxidant capacity (TAC) (Moretti et al. 2017). According to Santos et al. (2014), the use of grape residues in the diet of dairy cows improves the antioxidant response. The development of dietary strategies using grape by-products was effective in the production of milk and dairy products characterized by implemented nutritional properties and better oxidative stability, with health benefits for consumers due to the presence of compounds credited with high biological value. Furthermore, it has environmental and sustainable benefits with reusing waste (Ianni, 2020). In other animal categories, GSO, when used to control dyslipidemia and hyperglycemia in diabetic rats, effectively controls metabolic disorders (Shiri-Shahsavari et al., 2023). Dietary inclusion of GSO improved the productivity of growing rabbits compared to control and antibiotic-treated groups (Nasr et al. 2022).

The chemical composition of the oil leads us to believe that it has potential for use in dairy production, and it would also be a possibility of adding value to grape residue as a feed in dairy cattle farming (Olegário, 2015). Therefore, the objective of the study was to verify whether the addition of GSO to the diet of primiparous Jersey breeds during the transition period had a positive effect on animal health and investigate the effects on the rumen environment, serum metabolism, oxidative response, and the composition and quality of milk.

Materials and methods

Location and facilities

The experiment was carried out in the dairy cattle sector of the Experimental Farm of the Center for Higher Education of the West – FECEO of the State University of Santa Catarina – UDESC, located in Guatambu – SC / Brazil. The animals were housed for the experimental period in a compost barn system, with bedding made up of sawmill waste (sawdust) turned over daily and with an area of 20 m² per animal. The shed consists of a rest area (bed), waiting room, milking room, feeding lane equipped with individual feeders and drinkers separated by metal canziles, feed room, cooler room, and office.

The rest area had a tilting collective drinking fountain MX300 (MX do Brasil®) with 300 L of water capacity and a retractable system to facilitate daily cleaning, ensuring animal ad libitum consumption. Furthermore, the area had five Eco Fan MX 160 fans (MX do Brasil®) to control the warehouse's internal microclimate and dry the litter. The milking parlor was in a herringbone format with a capacity for three animals simultaneously and a single milking side. The system had three AMI 5550 automatic extractors with total production, milk flow, and temperature indicators, coupled to three Flo-Star MAX anterior–posterior collectors and Guardian JW automatic washing station, all BOU-MATIC® equipment. Combined with a plumbing, filtration, milk transfer, and containment system from ORDEMILK®.

The feeding lane had two fans, 20 individual feeders with automatic closing, and plastic drinkers distributed along the feeder line (one for every two animals) with the possibility of depriving/releasing access to water according to demand; the installation of these drinking fountains was due to the experimental need to control access to food for a restricted time and in a guided manner, requiring the availability of water during the period in which the animals remain deprived of access to the resting area.

The floor of the facilities (except for the rest area) is concrete, with friezes to increase the animals' grip and ensure safety. Animal waste and cleaning residues from these areas flow through channels to waste lagoons, where they remain for a stabilization period before distribution to agricultural areas as organic fertilizer.

Characterization of the animals

We used 14 nulliparous Jersey breed animals with an average body weight of 430 kg, 26 months old, and pregnant for 240 days, coming from a Fixed Time Artificial Insemination protocol with Angus breed semen. These animals were arranged until the experimental period in a field pasture area composed of annual winter grasses, oats, and ryegrass, overseeded in Jiggs. They received commercial mineral supplementation for pregnant heifers until transfer to the compost barn and the beginning of the breeding period.

Experimental design

The design used was a randomized block design; the animals ($n = 14$) were divided into two groups with seven replications each; the SO group received 25 mL/day of SO in the diet, while the GSO group received 25 mL/day of GSO. Both diets provided were isoproteic and isoenergetic. The experimental period lasted 60 days, given the necessary variations, as it began with 240 days of pregnancy (approximately

30 days before the expected date of birth) and continued until the first 30 days of lactation.

GSO

GSO was added to the diet of animals in the treatment group throughout the experimental period at a 25 mL/cow/day dose. In the absence of similar studies in the literature, the dose used is based on levels that suggest economic viability of production and use, as it is a product with high added value. The levels do not impact the diet's nutritional value and, therefore, do not pose a risk of poisoning and productive losses through treatment. The quantity of oil was measured individually and mixed with the concentrate when providing the total diet in the animals' morning treatment. The animals in the control group received the same dose of commercial SO to make the diets isoenergetic. The Vitis vinifera vegetable oil is a commercial product from the HARMONIE® Aromaterapia brand, purchased in 1-L bottles. The oil is extracted through cold pressing and subsequent deodorization in Chile. The product is mainly composed of linoleic acid (68.57%), oleic acid (15.86%), palmitic acid (8.7%), stearic acid (5.48%), as well as other minority or unidentified compounds. The report obtained in chromatography agrees with the results obtained by Rockenbach et al. (2010). The chromatography results for GSO and SO are displayed in Table 1.

Diet

The animals received a diet formulated following the nutritional requirements for Jersey heifers of the NRC 2001. The diet was formulated based on Tifton 85 hay, corn silage, and concentrate. The prepartum concentrate had soybean bran, cornmeal (ground through a 2-mm sieve), wheat bran, and soybean hulls in its composition. Also, in this concentrate, the BOVIGOLD® Pre-Partum OVN nucleus (DSM Tortuga®) was included to reduce the diet's dietary cation–anion difference (DCAD). During this phase, the concentrate was previously supplied to the other ingredients in

Table 1 Chromatographic composition of grape seed oil (Treatment) and soybean oil (Control)

Identification	% in grape oil	% in soybean oil
C14:0 – myristic acid	0.18	0.14
C16:1 – palmitoleic acid	0.10	0.09
C16:0 – palmitic acid	8.70	12.6
C18:2 – linoleic acid	68.5	50.4
C18:1 – oleic acid	15.8	25.4
C18:0 – stearic acid	5.48	4.20

Individual fatty acids are calculated as % of total fatty acids

the diet to maximize the consumption of anionic salts, which have less palatability but are essential for good performance in the transition period. In the postpartum diet, animals aged 26 months were considered empty, with 20 days in milk (DEL = 20) and an expected 18 kg milk/day production. This includes hay, corn silage and cornmeal-based concentrate (2-mm sieve), soybean bran, wheat bran, soybean hulls, live-stock urea (YARA®), and BOVIGOLD® Plus core (DSM Tortuga). All ingredients were supplied by COOPERALFA (Chapecó – SC). Table 2 shows the ingredients and basic chemical composition of the total pre-partum and postpartum diets analyzed in the laboratory after sampling when the diet was fed.

Milking management

The herd was milked twice daily during the experimental period, at 7:00 AM and 4:30 PM. Upon entering the milking parlor, the teats were disinfected (pre-dipping) with a 0.5% Chlorhexidine-based product. After disinfection, the first three jets of milk were removed, and pre-dipping was applied again. Then, the milk was dried using paper towels. The teat cups were attached manually and extracted automatically. After milking, post-dipping was carried out before the animal was released. Due to delays in installing the milking system, one animal in the experimental group had to be milked manually during the initial week of lactation. During the period, pre- and post-dipping were done in the same way.

Data and sample collection

Different data and samples were collected to achieve the proposed objectives: weighing the animals and collecting blood, ruminal fluid, and milk. DMI was quantified by weighing the diet provided and leftovers. Figure 1 describes the timeline of the experimental period, pointing out the period in which the respective collections were made. Milk production was also measured daily.

The animals were weighed using a bar scale (DIGITRON®) before the animals entered the experiment. Blood collections were performed by puncturing the jugular vein of the animals, collecting blood in vacuolated tubes without anticoagulant (VACUOPLAST®) to obtain blood serum and vacuolated tubes (VACUOPLAST®) with anticoagulant (EDTA) to perform a blood count. After collection, the samples were stored below five °C for transport to the laboratory. The samples collected in tubes without anticoagulant were centrifuged to obtain blood serum for ten minutes at 8000 revolutions per minute. Subsequently, the serum was stored in microtubes (EPPENDORF®) at –20 °C until analysis.

Ruminal fluid was collected four hours after the animals' first day of treatment, using an esophageal probe to

Table 2 Ingredients and elemental chemical composition of total pre-partum and post-partum diets analyzed in the laboratory after sampling at the time of diet feeding

Ingredients (Kg DM/day)		
	Pre-delivery Diet	Postpartum Diet
Corn silage	4.69	5.21
Tifton 85 hay	1.23	1.3
Ground corn (2 mm)	0.24	1.98
Soybean meal (45% CP)	1.61	2.67
Soy Hull	0.12	0.63
Wheat bran	0.12	0.63
Pre-delivery nucleus ¹	0.28	-
Postpartum nucleus ²	-	0.21
Urea	-	0.04
Total	8.3	12.7
Inclusion of Grape oil/Soybean oil		
mL/day	0.025	0.025
Chemical composition of diets		
	Diet SO	Diet GSO
Pre-delivery		
Dry matter (%)	67.2	67.9
Crude protein (%/DM)	14.8	14.7
Ethereal extract (%/DM)	2.23	2.13
Ash (%/DM)	7.66	7.50
NDF (%/DM)	48.6	46.8
DCAD ³	-115	-115
Postpartum		
Dry matter (%)	47.1	47.0
Crude protein (%/DM)	18.1	18.0
Ethereal extract (%/DM)	2.72	2.72
Ash (%/DM)	6.93	7.39
NDF (%/DM)	34.4	34.9
ADF (%/DM)	17.9	17.3
NEL ³ (Mcal/Kg DM)	1.58	1.58
RDP ³ (g/day)	1355	1355
RUP ³ (g/day)	714	714
DCAD ³	197	197
Fatty acid (%)		
C10:0 (Capric)	0.05	0.06
C12:0 (Lauric)	0.13	0.16
C14:0 (Myristic)	0.37	0.50
C16:0 (Palmitic)	20.1	19.0
C16:1 (Palmitoleic)	0.20	0.20
C17:0 (Heptadecanoic)	0.20	0.21
C18:0 (Stearic)	4.25	4.67
C18:1n9c (Oleic)	24.5	22.6
C18:2n6c (Linoleic)	42.5	46.2
C20:0 (Arachidic)	0.66	0.60
C20:1n9 (cis-11-Eicosenoic)	0.26	0.24
C18:3n3 (α-Linolenic)	4.99	3.88
C21:0 (Henicosanoic)	0.06	0.08

Table 2 (continued)

Ingredients (Kg DM/day)	Pre-delivery Diet	Postpartum Diet
C20:2 (cis-11,14-Eicosadienoic)	0.09	0.10
C22:0 (Behenic)	0.63	0.57
C20:4n6 (Arachidonic)	0.16	0.14
C24:0 (Lignoceric)	0.66	0.61
Σ Saturated fatty acids (SFA)	27.1	26.5
Σ Unsaturated fatty acids (UFA)	72.8	73.4

Note 1. Pre-calving core guarantee levels: Calcium (min): 106 g/Kg – (max): 130 g/Kg; Phosphorus (min): 30 g/Kg; Sulfur (min): 90 g/Kg; Magnesium (min): 20 g/Kg; Sodium (min): 31 g/Kg; Chlorine (min): 130 g/kg; Cobalt (min): 12 mg/Kg; Copper (min): 600 mg/Kg; Chromium (min): 30 mg/Kg; Iron (min): 600 mg/Kg; Iodine (min): 60 g/Kg; Manganese (min): 1600 mg/Kg; Selenium (min): 16 mg/Kg; Zinc (min): 2400 mg/Kg; Biotin (min): 80 mg/Kg; Vitamin A (min): 480000 IU/Kg; Vitamin D3 (min): 200000 IU/Kg; Vitamin E (min): 12000 IU/Kg; *Saccharomyces cerevisiae*: 1.5×10^9 CFU/Kg; Monensin: 500 mg/kg; Fluoride (max): 300 mg/Kg

Note 2. Postpartum core guarantee levels: Calcium (min): 230 g/Kg – (max): 249 g/Kg; Phosphorus (min): 40 g/Kg; Sulfur (min): 20 g/Kg; Magnesium (min): 25 g/Kg; Sodium (min): 70 g/Kg; Cobalt (min): 15 mg/Kg; Copper (min): 750 mg/Kg; Chromium (min): 20 mg/Kg; Iron (min): 600 mg/Kg; Iodine (min): 40 g/Kg; Manganese (min): 2000 mg/Kg; Selenium (min): 22 mg/Kg; Zinc (min): 2850 mg/Kg; Biotin (min): 80 mg/Kg; Vitamin A (min): 350000 IU/Kg; Vitamin D3 (min): 100000 IU/Kg; Vitamin E (min): 2000 IU/Kg; Monensin: 1000 mg/kg

Note 3. NRC 2001 estimated the net lactation energy (NEL), dietary cation–anion difference (DCAD), rumen degradable protein (RDP), and rumen non-degradable protein (RUP) of the two diets

access and suction the rumen. After obtaining the fluid, its pH was measured. A portion was filtered to reduce methylene blue and stored to determine the rumen fatty acid profile. At the same time, the remainder was stored below 5 °C until arrival at the laboratory for storage and further analysis.

Milk was collected with individual samplers from the milking system, and a homogeneous sample of the entire milking was collected. The milk was inserted into tubes sterilized with Azidol for standard plate counts (SPC) and

with Bronopol for somatic cell counts (SCC) and chemical composition, then sent to the laboratory for analysis.

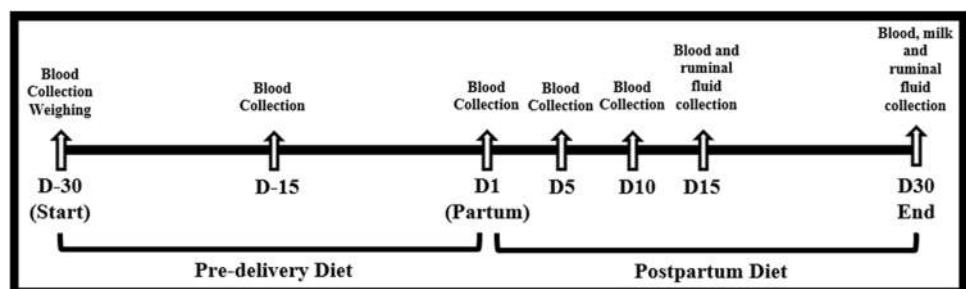
Feed composition analysis

To analyze the bromatological composition of the feeds used, homogeneous samples were collected from both experimental groups' total pre- and postpartum diet. These samples were pre-dried in a forced air oven at 55 °C for 72 h, removed from the oven, and weighed to determine the partial dry matter content (DM), followed by grinding in a Wiley mill (Marconi, model: MA340), using a 1 mm mesh sieve. The pre-dried and ground samples were heated at 105 °C to obtain the DM and the mineral material in a muffle furnace at 600 °C (Silva and Queiroz 2002). Crude protein was determined by the micro-Kjeldahl method (Method 984.13; AOAC, 1977). To determine the neutral detergent fiber (NDF) content, the samples were placed in polyester bags (Komarek, 1993) and treated with a neutral detergent solution in an ANKOM 200® fiber analyzer at 100° C for 1 h. The concentrations of acid detergent fiber (ADF) were determined using the same equipment using the ANKOM methodology, following the methods proposed by Van Soest et al. (1994). The portion of ether extract in the samples was quantified using an automatic fat extractor SER158 (VELP® Scientifica) according to the AOAC (1975).

Hemogram

Hematologic variables were obtained using EDTA blood tubes collected using the VET3000 automatic hematologic analyzer (EQUIP®), which determines the following variables: leukocytes, lymphocytes, granulocytes, monocytes, erythrocytes and platelet count in cells $\times 10^3/\mu\text{l}$. It also determines hemoglobin concentration (g/dL), hematocrit (%), mean corpuscular volume (MCV), mean corpuscular hemoglobin (MCH), mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC), and red blood cell distribution width (RDW-SD).

Fig. 1 Flowchart of sample collections carried out throughout the experimental period



Serum biochemistries

The samples collected in tubes without anticoagulant were centrifuged in a QUIMIS® tube centrifuge to obtain blood serum for ten minutes at 8000 revolutions per minute. Subsequently, the serum was stored in microtubes at -20°C until analysis. The levels of total protein, albumin, glucose, urea, triglycerides, and total cholesterol were evaluated in blood serum. The ANALISA® kits were used in semi-automatic equipment (Bio Plus 2000®). Globulin concentration was calculated using the PT-AL equation.

Serum oxidative status

Lipid peroxidation was measured through the amount of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), according to Jentzsch et al. (1996). The reaction is read in a spectrophotometer at 535 nm, and the result is expressed in nmoles of malondialdehyde/ml of serum. Total thiols were quantified in nmol SH/mg of protein using the methodology of Ellman (1959). Serum glutathione S-transferase (GST) activity was measured based on the method described by Habig et al. (1974) and expressed as U GST/mg protein. According to Erel (2004), the colorimetric method measured the serum antioxidant levels as TAC. Plasma ferric reducing capacity (FRAP) levels were measured using the technique described by Benzie and Strain (1996). TAC and FRAP results were expressed as nmol/g of protein.

Ruminal environment

Ruminal fluid collected four hours after the morning feeding on days 15 and 30 postpartum using a 1.5-m, 11-mm diameter ororuminal tube (PROVAR®), was allocated to 100-mL universal collectors. Then, the pH was measured using a portable digital pH meter, model AK103 (TESTO®). Part of the remaining ruminal fluid was filtered through three layers of gauze, stored in 3 mL microtubes (EPPENDORF®), and frozen at -20°C for subsequent analysis of volatile fatty acids (VFA). Another portion of the rumen fluid was used in the methylene blue reduction test to quantify bacterial activity in the fluid; for this methodology by Dirksen and Vannevel (1969), the fluid was filtered immediately after collection, then 10 mL were placed in two tubes of test, 500 μL of methylene blue was added to one of them. From there, the time it takes for the substance to be consumed until it returns to its original color when compared to the second aliquot is measured. The remaining unfiltered fluid was used to count protozoa, which was carried out by adapting methodology (Dehority 1993).

To determine short-chain fatty acids (SCFAs), fluid samples were thawed at 5°C and manually shaken for homogenization. Aliquots of 1 mL of ruminal fluid supernatant

were collected in polypropylene microtubes (2 mL) and centrifuged for 5 min ($12,300\times g$). Then, 250 μL of the supernatant was transferred to a new microtube containing 250 μL of formic acid. The mixture was manually shaken and centrifuged for 3 min. After centrifugation, 250 μL of the supernatant of the mixture was collected in another polypropylene tube previously containing 500 μL of 3-octanol solution ($665\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ in methanol), used as an internal standard, homogenized, and centrifuged again; 600 μL of the sample was inserted into an injection vial and injected into a gas chromatograph equipped with a flame ionization detector (GC-FID; Varian Star 3400, Palo Alto, USA) and an autosampler (Varian 8200CX, Palo Alto, USA); 1 μL of the extract was injected in split mode at 1:10. The carrier gas used was hydrogen at a constant pressure of 20 psi. The analytes (acetic, propionic, butyric, valeric, and isovaleric acids) were separated on a CP-Wax 52CB capillary column ($60\text{ m}\times 0.25\text{ mm}$; $0.25\text{ }\mu\text{m}$ stationary phase thickness). The initial column temperature was set at 80°C for 1 min and increased to 120°C at a rate of $8^{\circ}\text{C min}^{-1}$, then to 230°C for $20^{\circ}\text{C min}^{-1}$, where it remained for 1 min. The injector and detector temperatures were set at 250°C . Method validation comprised the following parameters: selectivity, linearity, linear range, repeatability, precision, limit of detection (LOD), and limit of quantification (LOQ) for acetic, propionic, butyric, and isovaleric acids. Linearity was assessed by calculating a regression equation using the least squares method. LOD and LOQ values were obtained by sequential dilutions to signal-to-noise ratios of 3:1 and 6:1, respectively. Accuracy was assessed by analyzing the repeatability of six replicate samples. Accuracy was determined by recovering known amounts of standard substances added to a diluted sample. The results were expressed as mol 100 mol⁻¹ of each SCFA in the rumen fluid.

Milk analysis

Protein oxidation was measured by the advanced oxidation protein products (AOPP) technique described by Witko-Sarsat et al. (1998), with results presented in $\mu\text{mol/g}$ protein (AOPP). Antioxidant levels were measured by the ferric reducing capacity of plasma (FRAP) according to Benzie and Strain (1996), and the TAC measurement was described according to Erel (2004). These methodologies were standardized for milk, as Radavelli et al. (2016) described. FRAP results were expressed in mmol/g of protein and TAC in nmol Trolox equivalent/L.

The chemical composition, SPC, and SCC analyses were conducted at the State Milk Quality Laboratory – LABLEITE of Concórdia -SC accredited to the Ministry of Agriculture, Livestock and Supply by ordinance MAPA: N° 212 of July 31, 2014. Fat quantification, protein,

lactose, total solids, and defatted dry extract were carried out using the Mid-Infrared Spectrometry Method, according to ISO 9622—IDF Standart 141:2013. The Total Bacterial Count was carried out using the Flow Cytometry Method, according to ISO 21187—IDF Standart 196 (2021), and the somatic cell count using the flow cytometry method, according to ISO 13366—2—IDF Standart 148–2 (2006).

To determine the fatty acid profile in milk, lipid extraction was performed using the method of Bligh and Dyer (1959) with adaptations. 1.5 g of samples, 0.8 mL of water, 5 mL of methanol, and 2.5 mL of chloroform were added to a 15 mL polypropylene tube, and mechanical stirring was carried out for 30 min. Next, 2.5 mL of chloroform solution and 1.5% NaSO₄ were added to promote a two-phase system. This mixture was stirred for 2 min and then centrifuged for 15 min at 2000 rpm. The lipids obtained from the chloroform phase were subjected to fatty acid analysis.

FA methylation was performed using a transesterification method proposed by Hartman and Lago (1973). 1 mL of 0.4 M KOH methanolic solution was added to the extracted lipids in a test tube and vortexed for 1 min. The samples were kept in a water bath for 10 min at boiling temperature. Subsequently, they were cooled to room temperature, and 3 mL of 1 M methanolic H₂SO₄ solution were added, vortexed, and kept in a water bath for 10 min. After cooling, 2 mL of hexane was added and centrifuged at 2000 rpm for 10 min. Finally, hexane with fatty acid methyl esters (FAME) was subjected to chromatographic analysis.

A gas chromatograph model TRACE 1310 with a flame ionization detector (Thermo Scientific) was used to determine FAME. One microliter of samples was injected into a split/splitless injector, operated in split mode with a 1:20 ratio at 250 °C. Hydrogen was used as the carrier gas at a constant flow rate of 1.5 mL/min. Separation of FAMES was performed using an RT 2560 chromatography column (100 m × 0.25 mm × 0.20 µm film thickness, Restek, USA). The initial oven temperature was programmed at 100 °C for 5 min and increased to 180 °C at an 8 °C/min rate. Then, increasing to 210 °C at a rate of 4 °C/min, and finally up to 250 °C, increasing to 20 °C/min, and maintaining for seven min in isothermal conditions. The detector temperature was kept constant at 250 °C. FAME compounds were identified by comparing the experimental retention time with those of the authentic standard (FAME Mix-37, Sigma Aldrich, St. Louis, MO). The results were presented as a percentage of each FA identified in the lipid fraction, considering the factor equivalent to the size of the FAME chain for FID and the ester conversion factor for the respective acid (Material Supplementary 1), according to Visentainer and Franco (2006).

Statistical analysis

All data were analyzed using the SAS “MIXED procedure” (SAS Inst. Inc., Cary, NC, USA; version 9.4), with the Satterthwaite approximation to determine the denominator degrees of freedom for the fixed effects test. Milk production and feed intake were tested for the fixed effect of treatment using animal (treatment) as a random effect. Milk, rumen fluid, and blood data were analyzed as repeated measures and tested for treatment and treatment × day fixed effects using animal (treatment) as a random effect. D-30 results (30 days prepartum, “start of experiment”) were included as an independent covariate. The D -30 scores were removed from the data set for these variables to generate the mean by treatment but were retained as a covariate. Means were separated using the PDIF method, and all results were reported as LSMEANS followed by SEM. Significance was defined for treatment effects and treatment × day interaction when $p \leq 0.05$ and trend when $p > 0.05$ and ≤ 0.10 .

Considering FRAP levels, we calculated the post hoc power for the groups using Proc Power by SAS. We used the mean of each group in serum and milk, and its SEM with an alpha of 0.05, and we ended up with a reasonable power of 84.2% and 87.6, respectively.

Results

Performance

The variables of milk production, DMI, and milk efficiency in the pre- and postpartum periods are displayed in Table 3. There was no effect of the GSO treatment or treatment ×

Table 3 Productive performance and feed intake of primiparous Jersey cows fed grape seed oil (GSO) or soybean oil (SO)

Variable	SO	GSO	SEM	P:treat ¹	P:treat x day ²
Average milk production (L)	18.7	18.1	0.39	0.89	0.68
Feed intake (Kg/DM)					
Average: Pre-delivery	6.58	6.81	0.11	0.86	0.81
Average: Postpartum	10.5	10.5	0.08	0.95	0.94
Dairy efficiency (Kg/Kg)	1.78	1.71	0.03	0.75	0.71

Note 1. Demonstrates the effect of treatment, where different letters in the same row show significant differences ($P \leq 0.05$) and trends ($P > 0.05$ and ≤ 0.1) between groups

Note 2. Demonstrates the interaction between treatment × day, where different letters on the same line for “mean” show a significant difference ($P \leq 0.05$) and trend ($P > 0.05$ and ≤ 0.1) between groups

Fig. 2 Dry matter intake (Kg/cow/day) of animals in the treatment and control groups throughout the experimental period (D1 = Parturition)

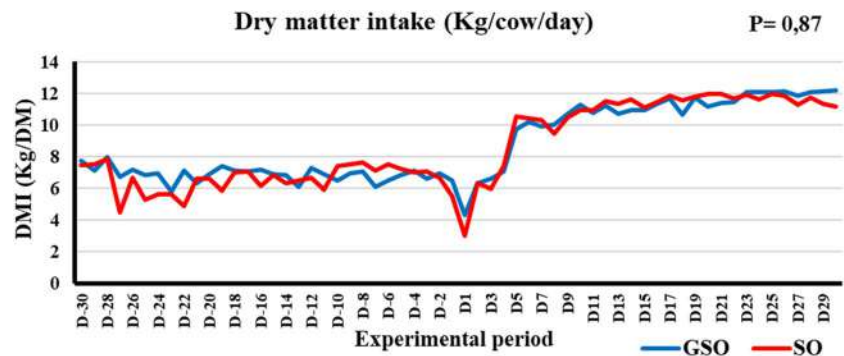
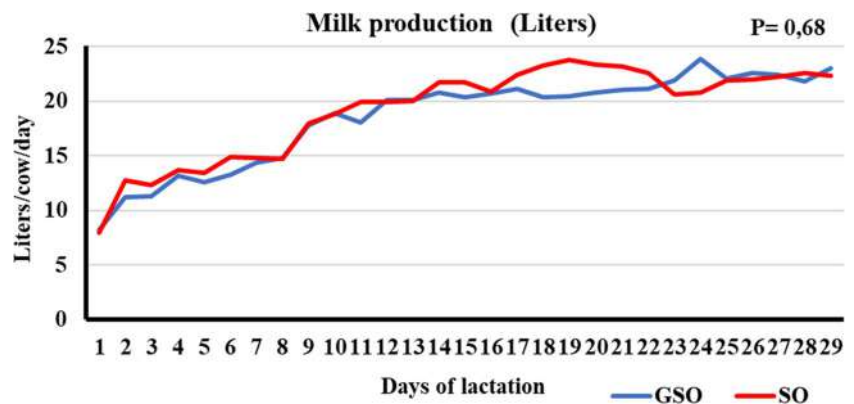


Fig. 3 Growth in average daily milk production in the GSO and SO groups during the first 30 days of lactation



day interaction between the groups on the variables of milk production and milk efficiency, as well as in IMS, in the experimental period. Figure 2 shows the ingestive behavior of the animals throughout the period. There was a lower DMI during the pre-partum period, a decrease in intake in the days leading up to and following birth, and an increasing intake after the beginning of lactation. Accumulated milk production also showed no statistical difference over the first 30 days of lactation, as seen in Fig. 3.

Hemogram

Table 4 presents the hemogram results of the animals during the experiment, with a treatment x day interaction for the lymphocyte count, which was significantly higher on D1 in the GSO group than the SO group ($P = 0.05$). The interaction was also observed on day 30, showing lower lymphocyte counts in the GSO group animals than in the SO group. There was no effect or interaction for the count of leukocytes, granulocytes, monocytes, total erythrocytes, and platelets, as well as for the percentage of hematocrit and hemoglobin concentration, MCV, MCH, MCHC, and RDW-SD between the groups.

Serum biochemistries

The treatment had an effect, with a higher total cholesterol concentration observed in the GSO group ($P = 0.05$) than in the SO. There was a treatment x day interaction in D -15 where the concentration was lower in the GSO group ($P = 0.02$), different from the treatment x day interaction observed on days 5, 15, and 30 when the cholesterol concentration was higher in the GSO group than the SO group. There was no treatment and treatment x day interaction effect on blood glucose concentration, total protein, urea, albumin, and globulins (Table 5).

Serum oxidative status

Figure 4 shows part of the oxidative status results in the cows' blood serum. TBARS levels tended to be lower in the GSO group compared to the SO ($P = 0.08$). Treatment x day interaction was observed for lower TBARS concentration on days 5 and 10 ($P = 0.01$). Total thiol levels were significantly higher in the GSO group compared to the SO group ($P = 0.03$). Treatment x day interaction on days -15, 1, 15, and 30 revealed higher levels of total thiols in the GSO group compared to the SO ($P = 0.01$).

The plasma ferric reducing capacity (FRAP) and TAC levels showed similar behavior, with the treatment effect,

Table 4 Hematological parameters of primiparous Jersey cows fed grape seed oil (GSO) or soybean oil (SO)

Variable	SO	GSO	SEM	P:treat ¹	P:treat x day ²
Total leukocytes ($\times 10^3/\mu\text{L}$)				0.88	0.64
	6.96	6.75			
Lymphocytes ($\times 10^3/\mu\text{L}$)				0.75	0.05
D-30	4.54	6.96	1.95		
D-15	2.98	3.22	0.62		
D1 (Birth)	4.32 ^b	5.53 ^a	0.35		
D5	3.28	3.84	0.27		
D10	2.8	3.14	0.27		
D15	2.95	3.04	0.28		
D30	5.37 ^a	4.06 ^b	0.31		
Granulocytes ($\times 10^3/\mu\text{L}$)				0.82	0.58
	2.18	2.13	0.12		
Monocytes ($\times 10^3/\mu\text{L}$)				0.73	0.46
	1.39	1.29	0.17		
Total erythrocytes ($\times 10^6/\mu\text{L}$)				0.94	0.86
	6.19	6.32	0.03		
Hemoglobin (g/dL)				0.88	0.74
	10.4	11.2	0.07		
Hematocrit (%)				0.45	0.36
	30.4	32.8	1.05		
MCV (fL)				0.28	0.18
	50.3	52.3	0.95		
MCH (pg)				0.9	0.85
	17.3	18.4	0.14		
MCHC (g/dL)				0.91	0.84
	34.1	35.2	0.16		
RDW-SD (fL)				0.89	0.83
	34.0	34.9	0.24		
Platelets ($\times 10^3/\mu\text{L}$)				0.18	0.11
	358	325	10.7		

Note 1. Demonstrates the effect of treatment, where different letters in the same row show significant differences ($P \leq 0.05$) and trends ($P > 0.05$ and ≤ 0.1) between groups

Note 2. Demonstrates the interaction between treatment $\times$ day where different letters (^{a, b}) on the same line for “mean” show a significant difference ($P \leq 0.05$) and trend ($P > 0.05$ and ≤ 0.1) between groups

that is, higher levels in the GSO group compared to the SO ($P=0.01$). Treatment $\times$ day interaction (days 5, 10, 15, and 30) was also observed when higher levels were detected in animals in the GSO group than in the SO group for FRAP ($P=0.01$) and TAC ($P=0.03$). Glutathione S-peroxidase (GST) activity showed a treatment $\times$ day interaction ($P=0.01$) higher on D-15 in the GSO group than the SO. The treatment group observed lower GST activity on days

Table 5 Serum biochemistry parameters of primiparous Jersey cows fed grape seed (GSO) or soybean oil (SO)

Variable	SO	GSO	SEM	P:treat	P:treat x day
Glucose (mg/dL)				0.89	0.71
	53	54.1	2.51		
Triglycerides (mg/dL)				0.62	0.46
	25.3	22.9	0.95		
Total cholesterol (mg/dL)				0.05	0.02
D-30	102	102	3.98		
D-15	95 ^a	81.3 ^b	3.65		
D1 (Birth)	74.7	85.7	3.65		
D5	76.3 ^b	106 ^a	3.59		
D10	77.3	87.3	3.62		
D15	107 ^b	126 ^a	3.58		
D30	122 ^b	147 ^a	3.42		
Total protein (g/dL)				0.79	0.65
	9.45	8.98	0.45		
Urea (mg/dL)				0.82	0.77
	41	40.2	1.23		
Albumin (g/dL)				0.21	0.13
	3.15	2.84	0.44		
Globulin (g/dL)				0.8	0.61
	6.17	6.12	0.51		

Note 1. Demonstrates the effect of treatment, where different letters in the same row show significant differences ($P \leq 0.05$) and trends ($P > 0.05$ and ≤ 0.1) between groups

Note 2. Demonstrates the interaction between treatment $\times$ day where different letters (^{a, b}) on the same line for “mean” show a significant difference ($P \leq 0.05$) and trend ($P > 0.05$ and ≤ 0.1) between groups

5, 15, and 30 ($P=0.01$). There was no treatment effect on GST enzyme activity (Table 6).

Ruminal environment

The variables for the ruminal environment are in Table 7. The methylene blue reduction test showed an effect of the treatment, smaller in the treated group than the control ($P=0.05$); a treatment $\times$ day interaction was observed on day 15, with a significant decrease in reduction time ($P=0.03$). The pH of the fluid showed a tendency toward a treatment effect, being lower in the treatment group ($P=0.06$), and, was also significantly lower on day 15 ($P=0.04$), characterizing an interaction. The protozoa count was higher in the treatment group than the control during the experiment ($P=0.10$) and higher in the treatment group on day 30 ($P=0.07$). The concentration of total SCFA showed a treatment $\times$ day interaction, which was higher on day 15 in the control group ($P=0.05$), but there was no effect of treatment. The concentration and

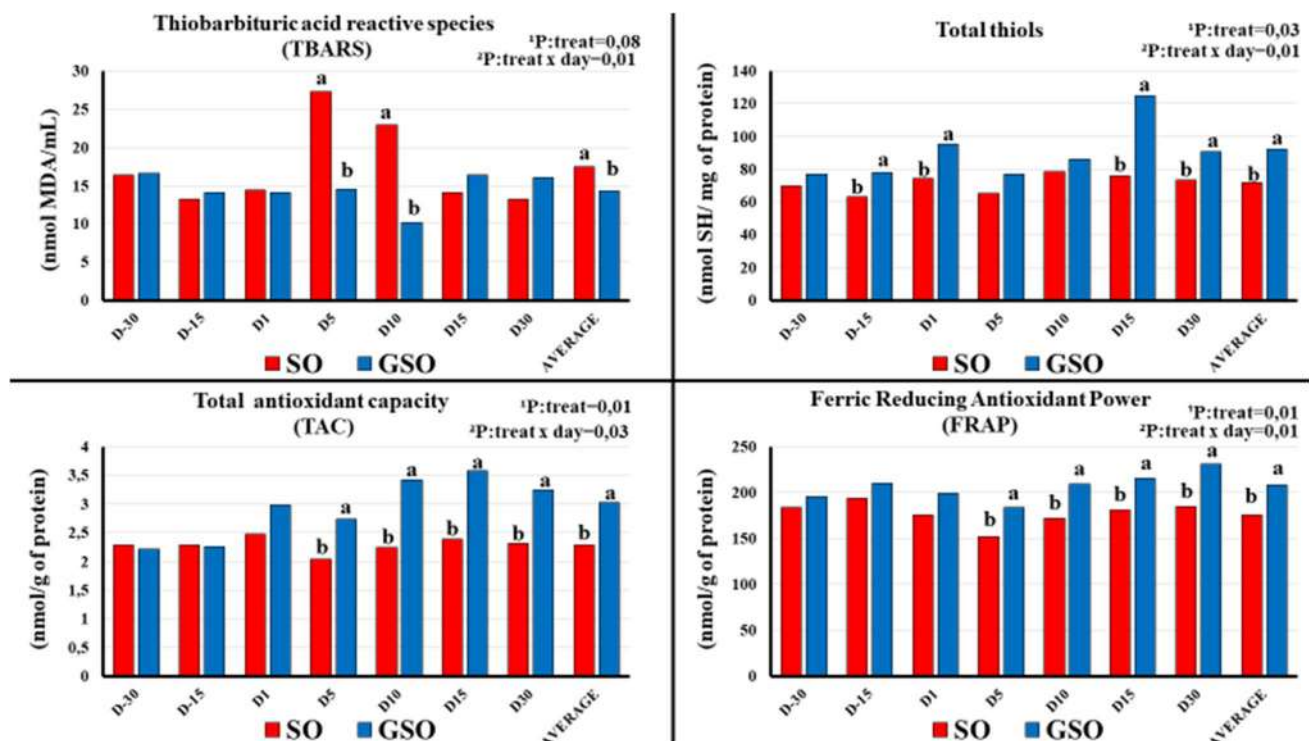


Fig. 4 Serum antioxidant activity of primiparous Jersey cows fed grape seed oil (GSO) or soybean oil (SO). Note 1. Demonstrates the effect of treatment, where different letters in the same row show significant differences ($P \leq 0.05$) and trends ($P > 0.05$ and ≤ 0.1) between

groups. Note 2. Demonstrates the interaction between treatment $\times$ day, where different letters on the same line for “mean” show a significant difference ($P \leq 0.05$) and trend ($P > 0.05$ and ≤ 0.1) between groups

percentage of propionic acid in the rumen was higher on day 15 in the treatment group, an effect that was seen in a treat $\times$ day interaction ($P = 0.05$), which corroborates the higher acetate/propionate ratio in the control group

Table 6 GST enzyme activity of primiparous Jersey cows fed grape seed oil (GSO) or soybean oil (SO)

Variable	SO	GSO	SEM	P:treat	P:treat $\times$ day
GST ($\mu\text{molCDNB}/\text{min}/\text{mg}$ of protein)				0.25	0.01
D-30	372	402	6.82		
D-15	364 ^b	412 ^a	6.72		
D1 (birth)	377	384	6.75		
D5	392 ^a	364 ^b	6.21		
D10	403	393	6.55		
D15	550 ^a	480 ^b	7.01		
D30	493 ^a	448 ^b	6.86		

Note 1. Demonstrates the effect of treatment, where different letters in the same row show significant differences ($P \leq 0.05$) and trends ($P > 0.05$ and ≤ 0.1) between groups

Note 2. Demonstrates the interaction between treatment $\times$ day, where different letters (^{a, b}) on the same line for “mean” show a significant difference ($P \leq 0.05$) and trend ($P > 0.05$ and ≤ 0.1) between groups

observed in the day 15 ($P = 0.05$). Treatment $\times$ day interaction for acetic acid concentration (day 15), being lower in the rumen fluid of cows that consumed grape seed oil; but when evaluating the proportion (%) of acetic acids, we did not observe the same difference. The concentration and percentages of butyric, valeric, and isovaleric acid did not differ between the control and treatment groups.

Composition, quality, and oxidative status of milk

The chemical and qualitative composition of the milk is presented in Table 8. There was no difference between the groups for the fat, protein, lactose, total solids, and defatted dry extract (DDE) concentration. There was a trend toward lower somatic cell counts (SCC) ($P = 0.09$) and lower standard plaque counts (SPC) ($P = 0.06$) in the treatment group compared to the control group. The oxidative status of the milk produced by the cows is shown in Fig. 5. An effect of the treatment was verified, with a higher concentration of the variables FRAP ($P = 0.03$) and TAC ($P = 0.05$) in the milk of cows in the treatment group. There was an effect of treatment for AOPP, that is, lower concentration in the milk of cows in the treatment group compared to the control ($P = 0.01$).

Table 7 Variables of the ruminal environment of primiparous Jersey cows fed grape seed oil (GSO) or soybean oil (SO)

Variable	SO	GSO	SEM	P:treat	P: treat x day
PRAM (seconds)				0.05	0.03
D15	210 ^a	169 ^b	10.6		
D30	255	213	12.8		
pH				0.06	0.04
D15	6.61 ^a	6.4 ^b	0.01		
D30	6.54	6.42	0.01		
Protozoa (n°×10 ⁴ /mL)				0.10	0.07
D15	22.3	25.3	2.6		
D30	16.3 ^b	21.5 ^a	2.14		
VFAs concentration, mmol/L					
Total VFA (mmol/L)				0.23	0.05
D15	115 ^a	96.5 ^b	4.08		
D30	122	122	4.51		
Acetic acid (mmol/L)				0.15	0.01
D15	80.3 ^a	68.0 ^b	1.74		
D30	83.9	86.6	1.72		
Propionic acid (mmol/L)				0.82	0.03
D15	19.3	23.9	0.78		
D30	21.7	18.7	0.78		
Butyric acid (mmol/L)	13.0	11.9	0.65	0.74	0.81
Isovaleric acid (mmol/L)	1.49	1.39	0.12	0.89	0.94
Valeric acid (mmol/L)	1.34	1.48	0.09	0.42	0.23
VFA results in proportion, %					
Propionic acid (%)				0.15	0.05
D15	16.3 ^b	18.5 ^a	0.15		
D30	15.3	16.7	0.15		
Acetic acid (%)	69.2	69.6	0.51	0.94	0.97
Butyric acid (%)	10.9	10.8	0.12	0.92	0.95
Isovaleric acid (%)	1.25	1.27	0.03	0.95	0.97
Valeric acid (%)	1.33	1.33	0.04	0.96	0.98
Acetic/propionic ratio				0.21	0.05
D15	4.31 ^a	3.70 ^b	0.03		
D30	4.27	4.26	0.03		

Note 1. Demonstrates the effect of treatment, where different letters in the same row show significant differences ($P \leq 0.05$) and trends ($P > 0.05$ and ≤ 0.1) between groups

Note 2. Demonstrates the interaction between treatment×day, where different letters (^a, ^b) on the same line for “mean” show a significant difference ($P \leq 0.05$) and trend ($P > 0.05$ and ≤ 0.1) between groups

In the profile of fatty acids in milk, a trend toward lower concentration of oleic acid was observed in the treatment group ($P=0.1$). The effect of the treatment was noticed in the increase in saturated fatty acids (SFA) in the treatment group ($P=0.05$). Still, there was a decrease in unsaturated fatty acids (UFA) in the treated group ($P=0.03$). The concentration of monounsaturated fatty acids (MUFA) was lower in

Table 8 Proximate composition, SPC, and SCC of primiparous Jersey cows fed grape seed oil (GSO) or soybean oil (SO)

Variable	SO	GSO	SEM	P:treat ¹
Fat (g/kg)	33.7	33.1	0.22	0.92
Protein (g/kg)	31.4	31.9	0.18	0.94
Lactose (g/kg)	46.7	46.3	0.09	0.97
Total solids (g/kg)	121	120	0.31	0.91
DDE (g/kg)	87.5	87.4	0.19	0.95
SCC (×1000/mL)	124 ^a	106 ^b	3.85	0.09
SPC (CFU×1000/mL)	49.4 ^a	34.1 ^b	2.36	0.06

Note 1. Demonstrates the effect of treatment, where different letters (^a, ^b) in the same row show significant differences ($P \leq 0.05$) and trends ($P > 0.05$ and ≤ 0.1) between groups

the treatment group compared to the control ($P=0.01$), and the UFA/SFA ratio was also significantly lower in the treatment group compared to the control ($P=0.02$). The remaining fatty acids did not differ between groups. There was also no statistical difference in the concentration of $\omega 3$ and $\omega 6$ or the relationship of these fatty acids (Table 9).

Discussion

Milk production, DMI, and, consequently, milk efficiency of treated animals were not affected by treatment during the study. In a recent study, researchers reported no difference in the production and DMI of Holstein cows that received an infusion of oleic acid (Dos Santos Neto; Prom; Lock, 2023). Likewise, another study showed no effect on milk production in the first 21 days of lactation regardless of whether or not cows consumed $\omega 3$ fatty acids from flaxseed or fish oil (Kra et al. 2021). Researchers found a trend toward improvement in milk production in cows when supplemented with vitamin E in the transition period (Moghim-Kandelousi et al. 2020). Supplementing extruded linseed to dairy cows that provide linoleic acid in the three weeks before calving increased milk production (Moallem et al. 2020), and the study used multiparous Israeli Holstein cows during lactation. As this was the first study using GSO in cows' diet, with interesting effects on the cow's health, it is essential to deepen the research, carrying out new studies that make it possible to test doses and thus define the optimal dose for cows—in a transition period, thinking about animal health.

According to the literature, the intake of $\omega 3$ fatty acids can alter the immune response because PUFA exerts changes in the activation of cells in both the innate and adaptive immune systems. $\omega 3$ fatty acids and their derivatives can act as signaling molecules (Gutierrez et al., 2019). As a result, in our study, we expected to have more significant treatment effects on immunological variables. However, only the lymphocyte count differed; that is, on the day of birth, the

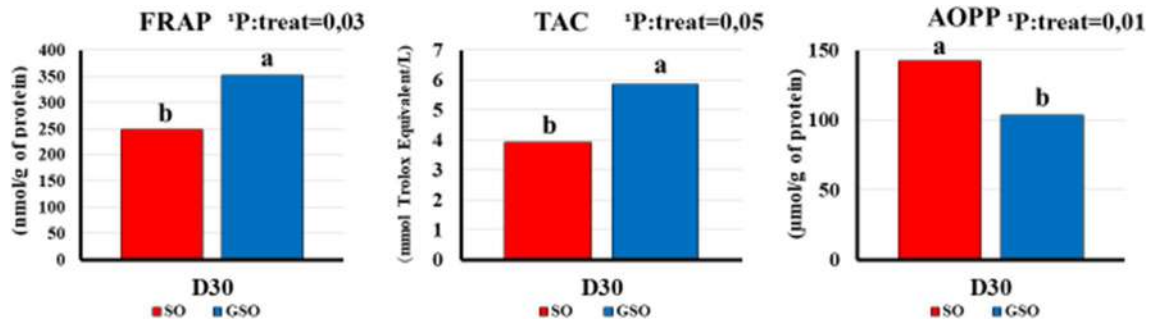


Fig. 5 Oxidative status: Ferric reducing capacity of plasma (FRAP), total antioxidant capacity (TAC), and advanced oxidation protein products (AOPP) of milk from primiparous Jersey cows fed grape

seed oil (GSO) or soybean oil (SO). Note 1. Demonstrates the effect of treatment, where different letters in the same row show significant differences ($P \leq 0.05$) and trends ($P > 0.05$ and ≤ 0.1) between groups

Table 9 Fatty acid profile of milk from primiparous Jersey cows fed grape seed oil (GSO) or soybean oil (SO)

Fatty acid	SO	GSO	SEM	P-treat ¹
C6:0 (Caproic)	0.4	0.6	0.12	0.28
C8:0 (Caprylic)	0.4	0.5	0.09	0.16
C10:0 (Capric)	1.3	1.5	0.17	0.43
C11:0 (Undecanoic)	0.0	0.1	0.03	0.82
C12:0 (Lauric)	1.8	2.1	0.11	0.25
C14:0 (Myristic)	8.2	9.5	0.24	0.46
C14:1 (Myristoleic)	0.4	0.4	0.07	0.68
C15:0 (Pentadecanoic)	0.6	0.7	0.13	0.92
C16:0 (Palmitic)	31.7	32.2	1.24	0.69
C16:1 (Palmitoleic)	1.6	1.2	0.16	0.11
C17:0 (Heptadecanoic)	0.7	0.7	0.04	0.95
C17:1 (cis-10-Heptadecenoic)	0.3	0.2	0.03	0.61
C18:0 (Stearic)	16.1	18.3	0.87	0.18
C18:1n9c (Oleic)	31.7 ^a	27.3 ^b	1.09	0.10
C18:2n6c (Linoleic)	2.7	2.7	0.03	0.93
C20:0 (Arachidic)	0.1	0.2	0.02	0.58
C20:1n9 (cis-11-Eicosanoic)	0.0	0.0	0.01	0.89
C18:3n3 (α-Linolenic)	0.2	0.2	0.01	0.92
C21:0 (Heneicosanoic)	0.4	0.5	0.02	0.86
C22:0 (Behenic)	0.0	0.1	0.00	0.77
C20:3n6 (cis-8,11,14-Eicosatrienoic)	0.0	0.0	0.00	0.96
C20:4n6 (Arachidonic)	0.0	0.0	0.00	0.80
C24:0 (Lignoceric)	0.0	0.0	0.00	0.65
C20:5n3 (cis-5,8,11,14,17-Eicosapentaenoic)	0.0	0.0	0.00	0.21
C24:1n9 (Nervonic)	0.0	0.0	0.00	0.91
Σ AG saturated (SFA)	62.5 ^b	67.5 ^a	1.63	0.05
Σ AG unsaturated (UFA)	37.4 ^a	32.4 ^b	0.87	0.03
Σ AG monounsaturated (MUFA)	34.3 ^a	29.3 ^b	0.84	0.01
Σ AG polyunsaturated (PUFA)	3.1	3.1	0.10	0.84
UFA/SFA	0.6 ^a	0.4 ^b	0.08	0.02
Σ ω6	2.8	2.8	0.01	0.95
Σ ω3	0.2	0.2	0.00	0.82
ω6/ω3	10.3	9.6	0.41	0.73

Note 1. Demonstrates the effect of treatment, where different letters (^{a, b}) in the same row show significant differences ($P \leq 0.05$) and trends ($P > 0.05$ and ≤ 0.1) between groups

number of lymphocytes was higher in cows in the treatment group, but at the end of the research (DEL 30), the count was lower; however, these changes did not alter the concentrations and total protein and globulins. In the work carried out by Veshkini et al. (2023a, b), using abomasal infusion of essential fatty acids, it was observed that the leukocyte and lymphocyte count increased until delivery and then gradually decreased, similar to those observed in the present study. We do not have an explanation for this effect on cholesterol concentration since the diets were isoenergetic. Still, it is crucial to investigate which cholesterol is higher (LDL or HDL) when considering animal health.

Oxidative markers demonstrated beneficial results for cow health with a tendency to reduce lipid peroxidation, which was also observed by Santos et al. (2022) when prepartum Holstein cows consumed açai seed oil, which has fatty acids and antioxidant properties similar to GSO. Antioxidant effects in animals supplemented with grape residue were also observed in the qualitative maintenance of lamb meat (Vieira et al. 2022). The formation of reactive oxygen species is normal and even more significant in the transition period (Basiricò et al. 2017); however, when it exceeds the neutralization capacity of antioxidants, it causes oxidative stress and tissue damage, reinforcing the importance of antioxidant levels suitable, especially in critical periods (Abuelo et al. 2015). The high antioxidant activity is confirmed by the increased serum and milk levels of FRAP and TAC and the consequent reduction in AOPP, corroborating an increase in the proportion of total thiols in the organism of treated animals. In agreement, Mu et al. (2020) concluded that grape seed proanthocyanidin supplementation in the diet of lambs had positive effects on antioxidant activity and liver function. The antioxidants in milk can benefit human health, although this is not yet a product pricing criterion. It is believed that the lower GST activity in the treatment group on days 5, 15, and 30 must be correlated with the reduction of oxidants in the blood serum, discouraging the action of the enzyme, which is essential in detoxifying, transporting, and eliminating oxidative stress products. (Dasari et al. 2018). In general, beneficial improvements to the health of the treated animals are observed.

We observed a discrete effect in the ruminal environment; considering that there was no impact on performance variables, it was expected that there would be no significant changes. Only on day 15 postpartum, cows that consumed grape seed oil had a lower concentration of total VFA due to lower levels of acetic acid; however, we do not have an explanation for the mechanism involved. The greater bacterial activity is positive, as well as the greater production of propionate, reducing the acetate/propionate ratio, as reported by Akhlaghi et al. (2022). However, there are few relationships since this supplemented lipid fraction is little used by rumen microorganisms; its structural lipid portion is around

10%, and more than 90% of environmental fatty acids are saturated (Kozloski 2019). Although the diets were isoenergetic and isoproteic, the pH was higher in the rumen fluid of the cows in the group treated with GSO, but it remained within acceptable parameters. For a more assertive conclusion that the treatment could harm the ruminal environment, collections would be necessary at more points in the post-treatment period.

In the literature, some authors cited changes in the proximate composition of milk, such as the reduction in milk fat synthesis in dairy cows (Bernard et al. 2018), with the maintenance of milk production and composition (Lock et al. 2008). There are also reports of decreased milk and lactose production after fatty acid supplementation (Bell and Kennelly 2003). In our study, the proximate composition did not differ. Still, the somatic cell count may have decreased due to the improvement in the animal's health, including considering the reduction in inflammatory cells, correlated with the reduction in TBARS, as found by Santos et al. (2022).

The administration of feed enriched with olive extract, a source of polyphenols, increased the PUFA $\omega 6$ to $\omega 3$ ratio from 3:1 to 4:1 (Di Meo et al. 2023). According to the same author, MUFA and SFA levels were maintained, resulting in a significant increase in PUFA after 15 days of administration (Di Meo et al. 2023). In our study, despite PUFA supplementation, SFA levels increased in milk compared to unsaturated milk. As the milk had a more significant amount of SFA, which means more stable lipids, this change may have influenced the stability of the milk, which had less oxidation and a more substantial amount of antioxidants. Fautex et al. (2016) also observed a challenge to the oxidative stability of milk by supplementing flaxseed oil in dairy cows, which was indicated by a marked increase in all oxidation products. These results show that GSO would not be desirable if we were looking to positively modulate milk quality to have more significant amounts of omegas in milk. It is essential to highlight that in recent years, society has been looking for increasingly healthier foods with lower amounts of saturated fat, as it is known that this type of fat, when consumed constantly, can compromise the functioning of the cardiovascular system in humans (Maki; Dicklin; Kirkpatrick, 2021).

In conclusion, grape seed oil did not affect the cows' feed intake throughout the experimental period. The consumption of GSO had beneficial effects on the cows' health in the transition period as a primary focus on the antioxidant activity, reducing oxidations in the whey and milk of the cows. The cows' intake of GSO discretely altered the ruminal environment. Still, the cows had lower pH, higher bacterial activity, and several protozoa associated with a lower concentration of VFA at 15 days in lactation. The additive did not affect the proximate composition of the milk. Still, the sum of SFA in the milk was higher in the cows of the group that received

GSO, while the sum of unsaturated fatty acids was lower in these animals. As this study used only one dose of the treatment, further studies should be carried out to define an ideal dose that is economically viable and guarantees the same benefits. Another point is to consider that the cost of extraction and purification of the oil adds value to the product, so in some situations, the use of the residue in natura in coarser forms can be considered.

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1007/s11250-024-04064-1>.

Acknowledgements The authors thank the State University of Santa Catarina – UDESC, where the study and most analyses were conducted. They also thank the Federal University of Santa Maria for their contributions.

Authors' contributions MH Signor, AL Dos Santos, and AS Da Silva contributed to the design and implementation of the research to analyze the results. MG Vitt, L Nora, NG Correa, RVP Lago, and GJ Wolschick participated in the execution of the experiment and collection of samples and data. ACH Xavier, B Bissacotti, and B Klein performed laboratory analyses. All authors discussed the results and contributed to the final manuscript.

Funding None.

Data availability All data and materials used in the experiment are available and ready to be provided.

Declarations

Ethics statement The UDESC Ethics Committee on the Use of Animals in Research approved the project (protocol number 4200270922).

Consent to participate All names on the author list were involved in various stages of experimentation or writing.

Consent for publication All authors agreed to submit the work for publication in *Tropical Animal Health and Production*.

Conflict of interest The authors declare no conflicts of interest.

References

- Abuelo A, Hernández J, Benedito JL, Castillo C (2015) The importance of the oxidative status of dairy cattle in the periparturient period: revisiting antioxidant supplementation. *J Anim Physiol Anim Nutr* 99:1003–1016. <https://doi.org/10.1111/jpn.12273>
- Akhlaghi B, Ghasemi E, Alikhani M, Ghaffari MH, Razzaghi A (2022) Effects of pomegranate peel supplementation with fatty acid sources on oxidative stress, blood metabolites and milk production of dairy cows fed diets rich in concentrate. *Anim Feed Sci Technol* 286:115228. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2022.115228>
- AOAC - Association of Official Agricultural Chemists (1975) Official methods of analysis, 12 edn. Washington, p 1094
- AOAC - Association of Official Agricultural Chemists (1977) Official methods of analysis, 16 edn. Arlington, p 127
- Basiricò L, Morera P, Dipasquale D, Tröschner A, Bernabucci U (2017) Comparison between conjugated linoleic acid and essential fatty acids in preventing oxidative stress in bovine mammary epithelial cells. *J Dairy Sci* 100:2299–2309. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-11729>
- Bell JA, Kennelly JJ (2003) Short Communication: Postprandial Infusion of Conjugated Linoleic Acids Negatively Impacts Milk Synthesis in Holstein Cows. *J Dairy Sci* 86:1321–1324. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(03\)73716-3](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(03)73716-3)
- Benjamin AL, Korkmaz FT, Elsasser TH, Kerr DE (2016) Neonatal lipopolysaccharide exposure does not diminish the innate immune response to a subsequent lipopolysaccharide challenge in Holstein bull calves. *J Dairy Sci* 99:5750–5763. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-10804>
- Benzie IF, Strain JJ (1996) Plasma ferric reduction capacity (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the frap assay. *Anal Biochem* 1:70–76. <https://doi.org/10.1006/abio.1996.0292>
- Bernard L, Bonnet M, Delavaud C, Delosiere M, Ferlay A, Fougere H, Graulet B (2018) Milk fat globule in ruminant: major and minor compounds, nutritional regulation and differences among species. *Eur J Lipid Sci Technol* 120:1700039. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201700039>
- Bligh EG, Dyer WJ (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* 37:911–917. <https://doi.org/10.1139/o59-099>
- Bobé G, Lindberg GL, Reutzel LF, Hanigan MD (2009) Effects of lipid supplementation on the yield and composition of milk from cows with different β -lactoglobulin phenotypes. *J Dairy Sci* 92:197–203. <https://doi.org/10.3168/jds.2008-1252>
- Dasari S, Ganjavi MS, Yellanurkonda P, Basha S, Meriga B (2018) Role of glutathione S-transferases in detoxification of a polycyclic aromatic hydrocarbon, methylcholanthrene. *Chem Biol Interact* 294:81–90. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2018.08.023>
- Dehority BA (1993) Laboratory manual for classification and morphology of rumen ciliated protozoa. CRC Press
- Di Meo MC, Salzano A, Zotti T, Palladino A, Giaquinto D, Maruccio L, Romanucci R, Rocco M, Zarrelli A, D'Occhio MJ, Campanile G, Varricchio E (2023) Plasma fatty acid profile in Italian Holstein-Friesian dairy cows supplemented with natural polyphenols from the olive plant *Olea Europaea* L. *Veterinary and Animal Science* 21:100298. <https://doi.org/10.1016/j.vas.2023.100298>
- Dirksen DI, Vannevel CJ (1969) Ist die methylenblau probe als schnelltest fue dir klinische pansensaftuntersuchung gelinet. *Dtsch Tierarztl Wochenschr* 76:305–309
- dos Santos Neto, J.M., Prom, C.M. and Lock, A.L., 2023. Abomasal infusion of oleic acid and exogenous emulsifier alter fatty acid digestibility and production responses of lactating dairy cows, *Journal of Dairy Science*. <https://doi.org/10.3168/jds.2022-23038>
- Ellman GL (1959) Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys* 82:70–77. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(59\)90090-6](https://doi.org/10.1016/0003-9861(59)90090-6)
- Erel O (2004) Um novo método de medição direta automatizada para a capacidade antioxidante total usando um cátion radical ABTS de nova geração e mais estável. *Bioquímica Clínica* 37(4):277–285
- Fauteux M-C, Gervais R, Rico DE, Lebeuf Y, Chouinard PY (2016) Production, composition, and oxidative stability of milk highly enriched in polyunsaturated fatty acids from dairy cows fed alfalfa protein concentrate or supplemental vitamin E. *J Dairy Sci* 99:4411–4426. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-10722>
- Freitas LS (2007) Desenvolvimento de procedimentos de extração do óleo de semente de uva e caracterização química dos compostos extraídos. Tese. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, p 227
- Gessner DK, Koch C, Romberg F-J, Winkler A, Dusel G, Herzog E, Most E, Eder K (2015) The effect of grape seed and grape marc meal extract on milk performance and the expression of genes of endoplasmic reticulum stress and inflammation in the liver of dairy cows in early lactation. *J Dairy Sci* 98:8856–8868. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-9478>

- Glasser F, Ferlay A, Chilliard Y (2008) Oilseed Lipid Supplements and Fatty Acid Composition of Cow Milk: A Meta-Analysis. *J Dairy Sci* 91:4687–4703. <https://doi.org/10.3168/jds.2008-0987>
- Göktürk NB, Akkurt M (2001) Teor de óleo e propriedades de qualidade do óleo de algumas sementes de uva. *J Turco de Agricult e Silvicultura* 25(3):163–168
- Gutiérrez S, Svahn SL, Johansson ME (2019) Effects of Omega-3 Fatty Acids on Immune Cells. *Int J Mol Sci* 20:5028. <https://doi.org/10.3390/ijms20205028>
- Habig, W.H., Pabst, M.J. and Jakoby, W.B., 1974. Glutathione S-Transferases *Journal of Biological Chemistry*, 249, 7130–7139. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)42083-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)42083-8)
- Hartman L, Lago RC (1973) Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. *Lab Pract* 22:475–6 passim
- Ianni A, Martino G (2020) Dietary Grape Pomace Supplementation in Dairy Cows: Effect on Nutritional Quality of Milk and Its Derived Dairy Products. *Foods* 9:168. <https://doi.org/10.3390/foods9020168>
- Jabeen A, Baig MT, Shaikh S, Sarosh N, Kashif SS, Shahid U, Soomro H, Mirza AS, Pirzada QA (2021) Review on Pharmacological Effects of Grape Seed Oil. *J Biol, Res Appl Sci*. 12(2):154–159. <https://doi.org/10.37962/jbas.v12i2.274>
- Jentzsch AM, Bachmann H, Fürst P, Biesalski HK (1996) Improved analysis of malondialdehyde in human body fluids. *Free Radical Biol Med* 20:251–256. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(95\)02043-8](https://doi.org/10.1016/0891-5849(95)02043-8)
- Komarek RJ, Gardner RM, Buchanan CM, Gedon S (1993) Biodegradation of radiolabeled cellulose acetate and cellulose propionate. *J Appl Polym Sci* 50:1739–1746. <https://doi.org/10.1002/app.1993.070501009>
- Kozloski GV (2019) *Bioquímica dos ruminantes*. 3 edn. Santa Maria, Rio Grande do Sul. Editora UFSM
- Kra G, Nemes-Navon N, Daddam JR, Livshits L, Jacoby S, Levin Y, Zachut M, Moallem U (2021) Proteomic analysis of peripheral blood mononuclear cells and inflammatory status in postpartum dairy cows supplemented with different sources of omega-3 fatty acids. *J Proteomics* 246:104313. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2021.104313>
- Lock AL, Rovai M, Gipson TA, De Veth MJ, Bauman DE (2008) A conjugated linoleic acid supplement containing trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid reduces milk fat synthesis in lactating goats. *J Dairy Sci* 91(9):3291–3299. <https://doi.org/10.3168/jds.2008-1071>
- Maki KC, Dicklin MR, Kirkpatrick CF (2021) Saturated fats and cardiovascular health: Current evidence and controversies. *J Clin Lipidol* 15:765–772. <https://doi.org/10.1016/j.jacl.2021.09.049>
- Moallem U, Lehrer H, Livshits L, Zachut M (2020) The effects of omega-3 α -linolenic acid from flaxseed oil supplemented to high-yielding dairy cows on production, health, and fertility. *Livest Sci* 242:104302. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2020.104302>
- Moghim-Kandelousi M, Alamouti AA, Imani M, Zebeli Q (2020) A meta-analysis and meta-regression of the effects of vitamin E supplementation on serum enrichment, udder health, milk yield, and reproductive performance of transition cows. *J Dairy Sci* 103:6157–6166. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-17556>
- Molosse VL, Deolindo GL, Cécere BG, Marcon H, da Rosa G, Vedovatto M, Zotti CA, Silva AD, Fracasso M, Morsch VM, Carvalho RA, Pereira WAB, Da Silva AS (2021) Effect of dietary supplementation with grape residue flour on weight gain, metabolic profile, leukogram, proteinogram and antioxidant response in suckling lambs. *Res Vet Sci* 139:112–120. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2021.07.004>
- Molosse VL, Deolindo GL, Lago RVP, Cécere BGO, Zotti CA, Vedovatto M, Copetti PM, Fracasso M, Morsch VM, Xavier ACH, Wagner R, da Silva AS (2023) The effects of the inclusion of ensiled and dehydrated grape pomace in beef cattle diet: Growth performance, health, and economic viability. *Anim Feed Sci Technol* 302:115671. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2023.115671>
- Moretti P, Paltrinieri S, Trevisi E, Probo M, Ferrari A, Minuti A, Giordano A (2017) Reference intervals for hematological and biochemical parameters, acute phase proteins and markers of oxidation in Holstein dairy cows around 3 and 30 days after calving. *Res Vet Sci* 114:322–331. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2017.06.012>
- Mota MF, Neto AP, Santos GT, Fonseca JF, Ciffoni EMG (2006) Período de transição na vaca leiteira. *Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR. Umuarama* v.9, n.1, pp 77–81
- Mu C, Yang W, Wang P, Zhao J, Hao X, Zhang J (2020) Effects of high-concentrate diet supplemented with grape seed proanthocyanidins on growth performance, liver function, meat quality, and antioxidant activity in finishing lambs. *Anim Feed Sci Technol* 266:114518. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2020.114518>
- Nasr AM, Aboul Ela SE-DS, Ismail IE, Aldahrani A, Soliman MM, Alotaibi SS, Bassiony SS, Abd El-Hack ME (2022) A comparative study among dietary supplementations of antibiotic, grape seed and chamomile oils on growth performance and carcass properties of growing rabbits. *Saudi Journal of Biological Sciences* 29:2483–2488. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2021.12.016>
- Olegário LS, Travália B, Santos JAB, Silva MAAP (2015) Estudo prospectivo sobre óleo de semente de uva. In: 6th International Symposium on Technological Innovation v. 3, n. 1, pp 306–316. <https://doi.org/10.7198/S2318-3403201500030037>
- Ortolani EL (2009) *Enfermidades do período de transição*. Ciência Animal Brasileira. Brazilian Animal Science 1. <https://doi.org/10.5216/cab.v1i0.7660>
- Palmquist DL, Mattos WRS (2006) *Metabolismo de lipídeos*. In: Nutrição de ruminantes. Jaboticabal: Funep, 1 ed. p 583
- Pi Y, Ma L, Pierce KM, Wang HR, Xu JC, Bu DP (2019) Rubber seed oil and flaxseed oil supplementation alter digestion, ruminal fermentation and rumen fatty acid profile of dairy cows. *Animal* 13:2811–2820. <https://doi.org/10.1017/S175173111900137X>
- Radavelli WM, Campigotto G, Machado G, Bottari NB, Bochi G, Moresco RN, Morsch VM, Schetinger MRC, Bianchi A, Baldissera MD, Ferreira R, da Silva AS (2016) Effect of lactation induction on milk production and composition, oxidative and antioxidant status, and biochemical variables. *Comp Clin Pathol* 25:639–648. <https://doi.org/10.1007/s00580-016-2243-z>
- Rockenbach II, Rodrigues E, Gonzaga LV, Fett R (2010) Composição de ácidos graxos de óleo de semente de uva (*Vitis vinifera* L. e *Vitis labrusca* L.). *Braz J Food Technol* 13:23–26. <https://doi.org/10.4260/BJFT20101304104>
- Santos, D.S. Dos, Klauck, V., Theisen, C., Bordigon, B., Farina, R., Pereira, W.A.B., Souza, C.F., Baldissera, M.D., Schogor, A.L.B., Vedovatto, M., Palmer, E.A. And Silva, A.S. Da, 2022. Addition of açai oil during the close-up dry period of Holstein cows improves colostrum quality and immune responses of their calves, *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 94. <https://doi.org/10.1590/0001-376520220201592>
- Santos NW, Santos GTD, Silva-Kazama DC, Grande PA, Pintro PM, De Marchi FE, Jobim CC, Petit HV (2014) Production, composition and antioxidants in milk of dairy cows fed diets containing soybean oil and grape residue silage. *Livest Sci* 159:37–45. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2013.11.015>
- Shiri-Shahsavari MR, Alijani S, Parsamanesh N, Nazari SS, Moazzen S, Majnoui A, Sadeghi N, Rasouli A (2023) The effect of grape-seed oil on diabetes-related hyperglycemia, dyslipidemia, and inflammation in streptozotocin-induced diabetic rats

- Obesity. *Medicine* 37:100476. <https://doi.org/10.1016/j.obmed.2022.100476>
- Silva DJ, Queiroz AC (2002) *Análise de alimentos: métodos químicos e biológicos*. Viçosa: UFV, Imprensa Universitária, p 239
- Silva, M. E. dos S., Grisi, C. V. B., Silva, S. P. da, Madruga, M. S., & Silva, F. A. P. da. 2022. The technological potential of agro-industrial residue from grape pulping (*Vitis* spp.) for application in meat products: A review. *Food Bioscience*, 49, 101877. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2022.101877>
- Sirohi R, Tarafdar A, Singh S, Negi T, Gaur VK, Gnansounou E, Bharathiraja B (2020) Green processing and biotechnological potential of grape pomace: Current trends and opportunities for sustainable biorefinery. *Biores Technol* 314:123771. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123771>
- Van Soest PJ (1994) *Nutritional Ecology of the Ruminant*, Ithaca, NY: Cornell University Press. <https://doi.org/10.7591/9781501732355>
- Vargas-Bello-Pérez E, Cancino-Padilla N, Romero J, Garnsworthy PC (2016) Quantitative analysis of ruminal bacterial populations involved in lipid metabolism in dairy cows fed different vegetable oils. *Animal* 10:1821–1828. <https://doi.org/10.1017/S1751731116000756>
- Vargas-Bello-Pérez E, Lóor JJ, Garnsworthy PC (2020) Fatty acid transport in plasma from cows treated with ruminal pulses of fish oil and partially hydrogenated vegetable oil. *Livest Sci* 236:104018. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2020.104018>
- Veshkini, Arash, Cecilian, F., Bonnet, M. and Hammon, H.M., 2023. Review: Effect of essential fatty acids and conjugated linoleic acid on the adaptive physiology of dairy cows during the transition period, *Animal*, 100757. <https://doi.org/10.1016/j.animal.2023.100757>
- Veshkini, A., Gnott, M., Vogel, L., Kröger-Koch, C., Tuchscherer, A., Tröscher, A., Bernabucci, U., Trevisi, E., Starke, A., Mielenz, M., Bachmann, L. and Hammon, H.M., 2023. Abomasal infusion of essential fatty acids and conjugated linoleic acid during late pregnancy and early lactation affects immunohematological and oxidative stress markers in dairy cows *Journal of Dairy Science*. <https://doi.org/10.3168/jds.2022-22514>
- Vieira C, Guerra-Rivas C, Martínez B, Rubio B, Manso T (2022) Effects of grape pomace supplementation on the diet of lactating ewes as compared to vitamin E on the meat shelf life of suckling lambs. *Meat Sci* 184:108666. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2021.108666>
- Visentainer JV, Franco MRB (2006) *Ácidos Graxos em Óleos e Gorduras: Identificação e Quantificação*, 1 edn. São Paulo, p 120
- Witko-Sarsat, V., Friedlander, M., Nguyen Khoa, T., Capeillère-Blandin, C., Nguyen, A.T., Canteloup, S., Dayer, J.M., Jungers, P., Drüeke, T. and Descamps-Latscha, B., 1998. Advanced oxidation protein products as novel mediators of inflammation and monocyte activation in chronic renal failure, *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950), 161, 2524–32

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Springer Nature or its licensor (e.g. a society or other partner) holds exclusive rights to this article under a publishing agreement with the author(s) or other rightsholder(s); author self-archiving of the accepted manuscript version of this article is solely governed by the terms of such publishing agreement and applicable law.



Contents lists available at ScienceDirect

Small Ruminant Research

journal homepage: www.elsevier.com/locate/smallrumres

Adding red propolis to the diet of Lacaune lambs: Effects on animal health, ruminal environment, performance, and meat quality

Guilherme L. Deolindo^{a,b}, Vitor L. Molosse^d, Bruno G.O. Cécere^a, Fernanda Picoli^d,
Luisa Nora^a, Charles Marcon^b, Bruna Klein^d, Bianca F. Bissacotti^c, Priscila M. Copetti^c,
Luiz Eduardo L. Silva^e, Roger Wagner^e, Anieli P. Kempka^f, Denise N. Araujo^{a,b},
Aleksandro S. da Silva^{a,b,*}

^a Programa Multicêntrico de Pós-graduação em Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC), Lages, Brazil

^b Programa de Pós-graduação em Zootecnia, UDESC, Chapecó, Brazil

^c Programa de Pós-graduação em Bioquímica Toxicológica, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Brazil

^d Departamento de Zootecnia, UDESC, Brazil

^e Departamento de Ciência de Alimentos, UFSM, Brazil

^f Departamento de Engenharia de Alimentos, UDESC, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Bee products
Sheep farming
Feed additive
Propolis

ABSTRACT

This study determined the influence of red propolis ethanolic extract in lambs' diets on the ruminal environment, animal health, and growth. Two experiments were carried out to achieve these objectives. Pilot study: Twenty-four female Lacaune lambs were divided into four groups, with three replicates and two animals per replicate (pen): T0 (Control), TP1.3, TP2.7, and TP5.3, representing 0, 1.3, 2.7, and 5.3 mL of propolis extract per animal/day, respectively. The highest daily weight gain was observed in lambs that consumed 2.7 mL of propolis extract per day, and they also had the lowest feed conversion rate compared to the control. Lower total leukocyte counts were observed in lambs that consumed propolis extract compared to control due to lower granulocyte and lymphocyte counts. Ceruloplasmin and C-reactive protein levels were lower in the serum of lambs that consumed propolis compared to the control. Lambs that consumed 1.3 and 2.7 mL of propolis extract had lower TBARS levels than the control. The effect of treatment was observed for ruminal pH, which was higher in lambs that consumed propolis extract than in control. A lower concentration of short-chain fatty acids was observed in lambs that consumed propolis than the control due to lower concentrations of acetic and butyric acid. In experiment II, 36 male Lacaune lambs were selected and divided into two groups: MONENSIN (23.45 ppm of monensin per kg/dry matter (DM)) and PROPOLIS (3.8 mL of propolis per animal/day). The animals that consumed propolis extract had greater body weight, weight gain, and average daily gain. These also had a shorter time to reduce methylene blue, thus demonstrating more significant bacterial activity in the rumen. Furthermore, they had lower counts of *Escherichia coli*, total coliforms, and Enterobacteria. The meat's fatty acid profile in animals fed the red propolis extract showed higher concentrations of monounsaturated fatty acids. In conclusion, adding red propolis extract to the concentrate increased weight gain, average daily gain, and oxidative balance with an antimicrobial and anti-inflammatory effect.

1. Introduction

Ionophores are growth promoters in ruminant breeding that improve energy and protein utilization and decrease methane emissions from ruminants (Russell and Strobel, 1988; Wischer et al., 2013), but are

banned in many parts of the world due to food safety concerns and the potential development of antimicrobial resistance. Not all ionophores are antibiotics, there are ionophores that are mainly used as research tools to study mechanisms of ion transport across cell membranes (Callaway et al., 2003). However, there is controversy over the use of

* Corresponding author at: Programa Multicêntrico de Pós-graduação em Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC), Lages, Brazil.

E-mail addresses: aleksandro_ss@yahoo.com.br, aleksandro.silva@udesc.br (A.S. da Silva).

<https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2024.107379>

Received 8 March 2024; Received in revised form 5 October 2024; Accepted 7 October 2024

Available online 10 October 2024

0921-4488/© 2024 Elsevier B.V. All rights are reserved, including those for text and data mining, AI training, and similar technologies.

antibiotics in animal diets due to the risk of transferring residues to meat and milk and promoting the development of resistant bacterial strains (Mathew et al., 2001). These concerns have promoted the search for alternative natural feed additives, such as propolis (Oeztuerk and Sagmanligil, 2009; Morsy et al., 2013). Propolis includes resinous, gummy, and balsamic substances collected by bees from buds, flowers, and plant exudates and mixed with their salivary secretions, wax, and pollen (Berretta et al., 2017). Its chemical composition differs considerably according to the geographic region where the resins were collected due to regional differences in flora, and different plants are resin sources (Sforcin and Bankova, 2011). Propolis is active against gram-negative and gram-positive bacteria, viruses, fungi, oxidants, inflammation, tumors, and parasites and may act as an immunomodulator (Alencar et al., 2007; Morsy et al., 2013).

According to Mirzoeva and Calder (1996), the mechanism of action of propolis on gram-positive bacteria is probably related to changes in the bioenergetic state of the bacterial membrane, which inhibits its motility; this action is similar to that of ionophores. Furthermore, propolis affects fermentation and methanogenesis in continuous microbial cultures in ruminants; it decreases the protozoa population and increases propionate levels by 10.3 % (Brodisou et al., 2000). Recent studies have mentioned a general improvement in the health and immunity of animals fed with propolis. Oral administration of ethanolic extract of Brazilian red propolis to Santa Inês sheep (3 g/sheep/day) during the flushing period increased the concentrations of total leukocytes, total proteins, and globulins while decreasing triglycerides, glutamate oxaloacetate transaminase, and glutamate pyruvate transaminase (Morsy et al., 2013).

Regardless of the type or place of collection, Brazilian red propolis and Egyptian brown propolis were incubated in vitro at different concentrations (125, 250, and 500 g per 500 mg of DM in the diet) (Morsy et al., 2015). The authors attributed an increase in total short-chain fatty acids ([SCFAs] mainly to a massive increase in acetate production (the main contributor to SCFAs) by 45 % compared to monensin (Morsy et al., 2015). Brazilian red and Egyptian brown propolis extracts seemed to combat ruminal methanogenesis, and the authors attributed this effect to their antiprotozoal properties since protozoa are known to provide hydrogen as a substrate for methanogens (Morsy et al., 2015). The color of propolis depends on the vegetation available near the hive (Koru et al., 2007). This variation directly affects its pharmacological properties (Afrouzan et al., 2018). Therefore, the influence of propolis extracts on ruminal fermentation may differ according to their origin and the extraction method (Morsy et al., 2015).

Recently, Paixão et al. (2022) conducted a study with Santa Inês lambs fed with red propolis extract (300 g/L), where they used doses of 0, 7, 14, 21, and 28 mL of propolis per animal/day. These doses can be considered high and economically unfeasible due to the high cost of red propolis in Brazil (ca. 400 dollars per kg), considering that Cécere et al. (2021) obtained positive results by feeding Lacaune lambs with 1.8 mL of green propolis per animal/day (150 µL of propolis/kg body weight/day). Therefore, a pilot study was carried out with doses similar to Cécere et al. (2021) to direct the research; then, an experiment was conducted to evaluate the efficacy of propolis extract as a potential substitute for monensin as a growth promoter. Economically, it is challenging to compete with this ionophore due to its low cost, but the prohibition it in food in several countries has opened up the market for substitutes. Therefore, the general objective of this work was to evaluate whether a low dose of ethanolic extract of red propolis in diets for confined lambs has positive effects on the rumen environment, health, animal performance, and meat quality.

2. Materials and methods

Two experiments were conducted to answer the objectives. The first was identified as a pilot study, essential to defining the dose of the second experiment.

The experiment was carried out in the sheep sector of the Experimental Farm of the *Centro de Educação Superior do Oeste* of the *Universidade do Estado de Santa Catarina* in Guatambu, SC, Brazil (27° 09' 09.2" S 52° 47' 18.8" W). The UDESC animal use research committee approved the study, protocol number 2517210622.

2.1. Propolis

The ethanolic extract of red propolis was prepared according to Wang et al. (2013). Propolis produced by *Apis mellifera* (the honey bee) was purchased from the Bee Propolis (Minas Gerais). Raw propolis was ground in a porcelain mortar under liquid nitrogen to obtain small fragments and then ground in a hammer. A propolis solution of 100 g L⁻¹ 70 % ethanol was prepared. The samples were placed in a water bath at 40 °C for 1 h, and the supernatants were collected and filtered through Whatman No. 4 paper. The residue was subjected to three such extractions. The supernatants were placed in a rotary evaporator under reduced pressure at 50 °C to eliminate ethanol.

2.2. Determination of the chemical profile of propolis via GC-MS

To determine the general chemical profile of the propolis extract, the method described by Bayram et al. (2020) was used with some modifications. 5 mg of lyophilized propolis with 75 µL of dry pyridine and 50 µL of derivatizing N, O-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide was homogenized, and kept at 80 °C for 20 min. The supernatant was analyzed using GC-MS (Shimadzu, GC-MS-QP2010 Ultra) in triplicate using pyridine and the derivatizer as the blank sample. The column oven temperature was initially held at 50 °C for one minute, then programmed to increase to 280 °C at 10 °C/min, and held for 2 min with a split ratio of 100.

2.3. Total phenolic compounds and antioxidant activity of propolis extract

Determining total phenolic compounds (TPC) and antioxidant activity by scavenging radicals by 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazylhydrate (DPPH) was performed. 0.5 g of each sample was dissolved in 50 mL of distilled water for extraction. The mixture was placed in an ultrasonic bath (70 W) for 3 h and remained in the dark for another 3 h. The supernatants were filtered with quantitative filter paper (Whatman #40) and stored in 100-mL volumetric flasks wrapped in aluminum foil. The extracts were then stored in microtubes and maintained at -80 °C until analysis (Larrauri et al., 1997; Bertoletti et al., 2018). TPC quantification was performed using the Folin-Ciocalteu colorimetric method, modified by Bonoli et al. (2004). An aliquot of each diluted sample was mixed with 0.5 mL of the Folin-Ciocalteu reagent and stirred for one min. Then, 2 mL of sodium carbonate (20 %) was added to the mixture and stirred for 30 s. After 2 h of incubation, absorbance was read at 750 nm in a digital spectrophotometer Kasuaki IL-593-S. The standard curve was prepared using various concentrations of gallic acid in methanol. The TPC concentration was calculated using an equation derived from the standard curve of gallic acid (expressed in mg of gallic acid equivalent per g of dry sample; mg GAE/g). Data were expressed as mean ± standard deviation of triplicate experiments (Supplementary material 1).

The evaluation of the free radical scavenging activity in the extracts was determined to be the antioxidant capacity of reducing the DPPH radical, according to Brand-Williams et al. (1995). Five dilutions of each extract were prepared in test tubes, and 0.3 mL of each diluted extract was added to 2.7 mL of DPPH radical (40 µg/mL). After incubation for 1 h in the dark, absorbance was read at 515 nm. Free radical scavenging activity was reported as IC₅₀ (µg/mL), the antioxidant concentration required to scavenge 50 % of the DPPH in the test solution. All tests were performed in triplicate, and IC₅₀ values were expressed as mean ± standard deviation of triplicate experiments.

2.4. Experiment 1: pilot study

Twenty-four Lacaune lambs (90 days old; 20.1 ± 3.85 kg) were acquired from Cabanha 3-Leites – Lageado Grande, SC, Brazil. The experiment lasted 75 days, 15 of which corresponded to the adaptation phase to the diet and installation. The animals were accommodated in 1.2 m x 2.5 m pens with wooden slats and equipped with feeders and drinkers. The animals were separated into pens according to body weight. The distribution of the pens in the respective treatments in the installation was sequential to avoid environmental interference.

The basal diet was a total ration formulated to meet the requirements of the animals, according to the [National Research Council \(2007\)](#). The animals received corn silage, hay, and concentrate (2 % of body weight; [Table 1](#)). The animals assigned to each treatment were given doses of 2.2, 4.4, and 8.8 mL of propolis extract (10 % concentration solution) per kg concentrate, mixed during production. These doses allowed the lambs to be given four doses of propolis/animal/day, as detailed below. The animals were divided into four groups, with three repetitions and two animals per repetition (pen): T0 (Control), TP1.3, TP2.7, and TP5.3 representing 0, 1.3, 2.7, and 5.3 mL of propolis per animal/day, respectively. These doses in the pilot study were defined based on the experiment carried out by [Cécere et al. \(2021\)](#) using green propolis. To guarantee the total consumption of propolis, the concentrate was first supplied to the lambs; after 100 % of its consumption, the roughage (hay and silage) was supplied. Corn silage, hay, and concentrate samples were collected to determine chemical composition.

The animals were weighed individually at the beginning of the experiment and then every 7 days. The average daily gain (ADG) was calculated as the regression coefficient of individual live weight on time ([Yuste et al., 2020](#)). All weighings were performed in the morning, with the animals fasting, using a digital electronic scale. Leftover feed was collected throughout the experiment to determine the dry matter intake (DMI) per pen. Based on this information, feed conversion (DMI/weight gain - kg/kg) was calculated. It is essential to clarify that the pen was used as an experimental unit for these zootechnical variables.

The animals were restrained manually for blood sample collection on the first, fifteenth, forty-fifth, and seventy-fifth day through jugular vein puncture using vacuum tubes containing ethylenediaminetetraacetic acid to perform the erythrograms and leukograms. Tubes without anticoagulants were used to obtain serum for biochemical analysis. Fecal samples were collected on days 15, 45, and 75 directly from the rectal ampulla into sterile bags, stored in a refrigerated thermal box for

transport, and analyzed within 2 h to determine total counts of coliforms, *Escherichia coli*, and Enterobacteria. Ruminal fluid (100 mL per animal) was collected 3 h after the morning feeding on days 15, 45, and 75 using an oro-ruminal silicone probe connected to a vacuum pump. The pH was measured using a portable digital pH meter (TESTO 205®). Immediately after measuring pH, the functional activity of the ruminal microbiota was measured using the methylene blue reduction test (MBRT) described by [Dirksen \(1993\)](#). A subsample of ruminal fluid was reserved for determination of SCFAs. The animal was the experimental unit for blood, ruminal fluid, and feces variables.

2.5. Experiment 2

Thirty-six male Lacaune lambs (30 days old; 18.4 ± 3.80 kg body weight) were used from a commercial farm in southern Brazil. The experiment lasted 75 days, with 15 days of adaptation to the diet and installation. The animals were housed in 1.2 m x 2.5 m pens with wooden slatted floors and equipped with feeders and drinkers. The animals were divided into two groups, with six repetitions and three per repetition (pen), totaling 18 animals for each treatment. The groups were MONENSIN and PROPOLIS, representing the dose of 23.45 ppm of monensin per kg/DM of the diet and the dose of 5 mL of red propolis extract/kg of concentrate, respectively. The groups received their treatments monensin and propolis in the concentrate, mixed during its production.

The animals received corn silage and concentrate (2.5 % of body weight; [Table 2](#)). The basal diet was a total ration formulated to meet the animals' requirements, according to [National Research Council \(2007\)](#) for an estimated gain of 300 g/day. Food leftovers were collected throughout the experiment to determine DMI. Corn silage and concentrate samples were collected to determine chemical composition.

The animals were weighed individually at the beginning of the experiment and every 15 days after that. The average daily gain (ADG) was calculated as the regression coefficient of individual live weight on time ([Yuste et al., 2020](#)). All weighings were carried out in the morning, with the animals fasting, using a digital electronic scale.

They were also manually restrained to collect blood samples on days 0, 15, 45, and 75 through jugular vein pulsing using vacuum tubes containing ethylenediaminetetraacetic acid to perform erythrogram and leukogram, and in tubes without anticoagulant to obtain serum for biochemical analysis. Fecal samples were collected on days 15, 45, and 75 directly from the rectal ampoule in sterile bags, stored in a

Table 1
Experiment 1: Pilot study - Ingredients (g/kg) and chemical composition of ingredients and experimental feeds (g/kg DM).

Ingredients	Composition					
Corn silage	418.2					
Hay: Tifton 85	63.6					
Concentrate ^a	518.2					
Chemical composition ^b		Concentrate				
	Corn silage	Hay	Control ^c	TP1.3	TP2.7	TP5.3
	DM	308.4	803.3	868.4	868.4	868.4
	MM	40.0	60.9	81.6	81.6	81.6
	CP	89.9	83.0	205.3	205.3	205.3
	NDF	334.1	694.6	170.2	170.2	170.2
	ADF	180.3	328.6	49.1	49.1	49.1
	EE	33.8	14.0	31.0	31.0	31.0

Note: Total phenolic compounds (mg/kg) of concentrates. Control: 253.9; TP1.3: 266.8; TP2.7: 276.6; TP5.3: 285.0. IC₅₀ (mg/mL - the concentration responsible for reducing cellular viability by half) of concentrates. Control: 0.033; TP1.3: 0.152; TP2.7: 0.196; TP5.3: 0.255.

Control treatment and treatments TP1.3, TP2.7, and TP5.3 represent 0, 1.3, 2.7, and 5.3 mL of propolis per animal/day, respectively.

^a Composition of the concentrate, production of 1000 kg: corn meal (540 g/kg), soybean meal (200 g/kg), wheat bran (200 g/kg), calcitic limestone (10 g/kg), sodium bicarbonate (4 g/kg) and 50 g/kg of premix (Calcium (min./max.) 175/245 g; Phosphorus (min.) 40 g; Sulfur (min.) 25 g; Magnesium (min.) 12 g; Sodium (max.) 100 g; Mineral Matter (max.) 980 g; Cobalt (min.) 40 mg; Iron (min.) 1800 mg; Iodine (min.) 80 mg; Manganese (min.) 1400 mg; Selenium (min.) 12 mg; Zinc (min.) 4000 mg; Vit. A (min.) 300,000 IU; Vit. D3 (min.) 60,000 IU; Vit. E (min.) 600 IU; Fluoride (max.) 600 mg; Monensin Sodium 600 mg).

^b DM (dry matter), MM (mineral matter), CP (crude protein), NDF (neutral detergent fiber), ADF (acid detergent fiber), and EE (ether extract).

^c Basal concentrate - used in all groups. The chemical composition of the concentrate of the four groups was identical; that is, the phytogetic curvature did not alter the chemical composition of the concentrate ingested by the lambs.

Table 2

Experiment 2 - Ingredients (g/kg) and chemical composition of ingredients and experimental feeds (g/kg DM).

Ingredients	Composition, kg		
Corn silage	315,4		
Concentrate ^a	684,6		
Chemical composition ^b	Concentrate	Control ^c	Propolis
DM	308.4	873.0	873.0
MM	40.0	82.8	82.8
CP	89.9	228.5	228.5
NDF	334.1	147.8	147.8
ADF	180.3	46.7	46.7
EE	33.8	31.1	31.1

Note: Total phenolic compounds (mg/kg) of concentrates. Control: 243.07; TP138: 269.51. IC₅₀ (mg/mL - the concentration responsible for reducing cellular viability by half) of concentrates. Control: 0.206; TP138: 0.253.

The control and propolis treatments represent animals that received 23.45 ppm/kg/DM of monensin and 3.8 mL of animal propolis/day, respectively.

^a Composition of the concentrate, production of 1000 kg: corn meal (525 g/kg), soybean meal (300 g/kg), wheat bran (117 g/kg) calcitic limestone (10 g/kg) and 50 g/kg of premix (Calcium (min./max.) 190/260 g; Phosphorus (min.) 20 g; Sulfur (min.) 40 g; Magnesium (min.) 20 g; Sodium (min.) 62 g; Mineral Matter (max.) 980 g; Cobalt (min.) 8 mg; Iron (min.) 1200 mg; Iodine (min.) 32 mg; Manganese (min.) 800 mg; Selenium (min.) 6 mg; Zinc (min.) 1.200 mg; Vit. A (min.) 200,000 IU; Vit. D3 (min.) 40,000 IU; Vit. E (min.) 400 IU.

^b DM (dry matter), MM (mineral matter), CP (crude protein), NDF (neutral detergent fiber), ADF (acid detergent fiber), and EE (ether extract).

^c Basal concentrate - used in all groups. The chemical composition of the concentrate of the four groups was identical; that is, the phytogetic curvature did not alter the chemical composition of the concentrate ingested by the lambs.

refrigerated thermal box for transport, and analyzed within 2 h to determine total coliforms/*Escherichia coli* and Enterobacteria count. Furthermore, 100 mL of rumen fluid per animal was collected after 3 h of morning feeding on days 15, 45, and 75, using an oro-ruminal probe connected to a vacuum pump. The pH was measured using a portable digital pH meter (TESTO 205®), then the functional activity of the rumen microbiota was measured using the MBRT, described by Dirksen (1993). A subsample of ruminal fluid was reserved for determination of SCFAs. These samples after collected were immediately submitted to freezing to avoid SCFAs degradation but adding an acid to allow sample deproteinizing wasn't used at this moment.

Slaughter was carried out following the end of the experiment (day 76) in a specific slaughterhouse for sheep, following current regulations and accompanied by a veterinarian from the municipal inspection. After the stunning, bleeding, skin removal, and evisceration procedures, muscle pH was measured in the longissimus dorsus muscle. Next, a gluteus medius muscle sample was taken to analyze the chemical composition and fatty acid profile. A piece of liver was also collected for antioxidant analysis.

2.6. Hematology, serum biochemistry, and proteinogram

Hemoglobin, erythrocyte, and total leukocyte counts, hematocrit, and leukocyte differentials were performed immediately upon sample arrival at the laboratory using an automatic hematologic analyzer (three parts EQUIP VET 3000®). The tubes without anticoagulant were centrifuged (7000 rpm for ten minutes) to separate the serum. The supernatants were transferred to 1.5-mL microtubes, identified, and stored at -20 °C. Total protein, albumin, triglycerides, cholesterol, glucose, aspartate aminotransferase (AST), and gamma-glutamyltranspeptidase (GGT) concentrations were evaluated in a semiautomatic analyzer (Bio-2000 BioPlus®) and commercial kits (Analisa®, Belo Horizonte, Brazil). Globin levels were calculated using the formula total protein – albumin.

For the proteinogram, electrophoresis in polyacrylamide gels

containing sodium dodecyl sulfate was performed according to Fagliari et al. (1998) using mini-gels (10 ×10 cm). Gels were stained with Coomassie blue and photographed to identify and quantify protein fractions using Labimage 1D software (Loccus Biotechnology). A standard containing fractions with molecular weight between 10 and 250 kD (Kaleidoscope – Bio-Rad) was used as the reference. The total protein content using the biuret technique was used as a reference for quantification (Layne, 1957).

2.7. Oxidant status

To determine oxidant status, serum glutathione S-transferase (GST) activity was measured based on Habig et al. (1974) and expressed as μmol 1-Chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB)/min/mg serum protein. According to Ellman (1959), protein thiols were measured, and the results were expressed as nmol thiols/mg of protein.

Serum lipid peroxidation was measured as the amount of TBARS, according to Jentzsch et al. (1996). The reaction was read in a spectrophotometer Kasuaki IL-593-S at 535 nm. The results were expressed as nmol of malondialdehyde (MDA)/mL of serum.

2.8. *E. coli*, total coliforms, and Enterobacteriaceae counts in stool

Counting was performed with 1 g of each stool sample, diluted in 9 mL of buffered peptone water in sterile test tubes, and homogenized in a vortex mixer, resulting in a dilution of 10⁻¹, until reaching a final dilution of 10⁻⁴. Then, 1 mL of the final dilution was inoculated into 3 M™ Petrifilm™ EC 6414 Plates for counting *E. coli* and total coliforms. For counting Enterobacteria, 1 mL of each sample was inoculated into 3 M™ Petrifilm™ EB 6420 Plates. Subsequently, the plates were incubated in a bacteriological oven at 37 ± 1 °C for 24 h. Then, the colony count was performed according to the corresponding 3 M™ Petrifilm™ interpretation guide for each plate type. The results were expressed as colony-forming units per gram of feces (CFU/g).

2.9. Analysis of the chemical composition of silage and concentrate

Feed samples were previously pre-dried in a forced ventilation oven at 55 °C for 72 h. Then, the samples were weighed to determine the DM content of the original sample, followed by grinding in a Wiley-type mill (Marconi, model: MA340) using a 1-mm mesh sieve. The pre-dried and ground samples were heated at 105 °C for 24 h to obtain the DM, and the ashes in a muffle at 600 °C (Silva and Queiroz, 2002).

Diets were analyzed according to Association of Official Analytical Chemists (2000): DM, method 930.15; crude protein (CP), method 976.05; ether extract, method 920.39 and ash, method 942.05. The method described by Van Soest et al. (1991) without adding sodium sulfite and alpha-amylase was chosen for neutral and acid detergent fiber analysis.

To determine TPC, 0.5 g of each concentrate (control, TP1.3, TP2.7, and TP5.3) was weighed in a Falcon tube, and 5 mL of ethanol solvent (60 %) was added. The mixture was stirred and kept for 20 min in a heated bath (96 °C). Then, they remained for 15 min in an ultrasound bath (180 W) and centrifuged for 15 min (4000 × g). The supernatants were filtered, and the extracts were analyzed.

2.10. Determination of short-chain fatty acids

Ruminal fluid samples were thawed at 5 °C and manually shaken for homogenization. Aliquots of 1 mL of the supernatant of ruminal fluid samples were collected in polypropylene microtubes (2 mL) and centrifuged for five minutes (12,300 × g). Then, 250 μL of the supernatants were removed and transferred to a new microtube containing 250 μL of formic acid. The mixture was shaken manually and centrifuged again for three min. Then, 250 μL of the supernatant was collected in an injection vial, and 500 μL of 3-octanol solution (665 μg mL⁻¹ in

methanol) was added, used as an internal standard (Zahedi et al., 2023) and homogenized. The samples were analyzed in a gas chromatograph equipped with a flame ionization detector (GC-FID; Varian Star 3600, Palo Alto, USA) and an automatic sampler (Varian 8200CX, Palo Alto, USA). One microliter of the extract was injected in split mode at 1:10 at 250 °C. The carrier gas used was hydrogen at a constant pressure of 20 psi. The analytes (acetic, propionic, butyric, valeric, and isovaleric acids) were separated by a CP-WAX 52CB capillary column (60 m x 0.25 mm; 0.25 µm stationary phase thickness) (Supplementary material 2). The initial column temperature was set at 80 °C for one min and increased to 120 °C at a rate of 8 °C min⁻¹, then to 230 °C for 15 °C min⁻¹, where it remained for one min. The flame ionization detector temperature was set at 250 °C. The results were expressed in mmol L⁻¹ of each short-chain fatty acids (SCFAs) in the ruminal fluid.

2.11. Fatty acid profile and chemical composition of meat

Extraction was carried out using the method of Bligh and Dyer (1959) with some modifications. Fractions of 1.5 g of samples, 0.8 mL of water, 5 mL of methanol, and 2.5 mL of chloroform were added to a 15 mL polypropylene tube, and mechanical stirring was carried out for 30 min. Next, 2.5 mL of chloroform and 1.5 % Na₂SO₄ solution were added to promote a two-phase system. This mixture was stirred for 2 min and then centrifuged for 15 min at 2000 rpm. The lipids obtained from the chloroform phase were subjected to fatty acid analysis.

Fatty acid (FA) profile methylation was performed using a transesterification method proposed by Hartman and Lago (1973). 1 mL of 0.4 M KOH methanolic solution was added to the extracted lipids in a test tube and vortexed for one min. The samples were kept in a water bath for ten minutes at boiling temperature. Subsequently, they were cooled to room temperature, and 3 mL of 1 M methanolic H₂SO₄ solution were added, vortexed, and kept in a water bath for ten min. After cooling, 2 mL of hexane was added and centrifuged at 2000 rpm for ten min. Finally, hexane with fatty acid methyl esters (FAME) was subjected to chromatographic analysis. A gas chromatograph model TRACE 1310 with a flame ionization detector (Thermo Scientific) was used to determine FAME. One microliter of samples was injected into a split/splitless injector, operated in split mode with a 1:20 ratio at 250 °C. Hydrogen was used as the carrier gas at a constant flow rate of 1.5 mL/min. Separation of FAMES was performed using an RT 2560 chromatography column (100 m x 0.25 mm x 0.20 µm film thickness, Restek, USA). The initial oven temperature was programmed at 100 °C for five min and increased to 180 °C at an 8 °C/min rate. Then, it increases to 210 °C at a rate of 4 °C/min, and finally up to 250 °C, increases to 20 °C/min, and maintains it for 7 min in isothermal. The detector temperature was kept constant at 250 °C. FAME compounds were identified by comparing the experimental retention time with those of the authentic standard (FAME Mix-37, Sigma Aldrich, St. Louis, MO). The results were presented as a percentage of each FA identified in the lipid fraction, considering the factor equivalent to the size of the FAME chain for FID and the ester conversion factor for the respective acid, according to Visentainer and e Franco (2006). For the chemical composition of the meat (DM, ether extract, CP and organic matter), the values were obtained using a near-infrared reflection spectrometer, model Spectra Star 2600 XT series of near-infrared analyzers (Unity Scientific®).

2.12. Statistical analysis

Data were tested for normality and homogeneity of variance using Shapiro-Wilk and Levene tests, respectively. Blood counts, stool bacterial counts, and GST activity results required transformation to achieve normality and homogeneity and then were retransformed to the original units for description.

All data were analyzed using the SAS 'MIXED procedure' (SAS Inst. Inc., Cary, NC, USA; version 9.4), with the Satterthwaite approximation

to determine the denominator degrees of freedom for the fixed effects tested. In both experiments (pilot and experiment 1), in the experimental model we used treatment, sampling day, and the interaction between treatment and sampling day as fixed effects. The random effect was the "pen" per treatment (for data without repeated measurements over time, e.g.: growth performance data and postmortem meat data; exception for body weight), and the "animal" per treatment (for all repeated measurements over time, example: hematology, biochemistry, fatty acids and immunity).

In experiment 1, the means were compared using orthogonal contrasts at 5 % of significance. The first contrast (C1) represented the effect of propolis addition [control versus treatments (TP1.3 + TP2.7 + TP5.3)]; second contrast (C2): [Control versus TP1.3]; third contrast (C3): [(Control versus TP2.7), and four contrast (C4): [control versus TP5.3]. Regression analysis considering daily weight gain was performed to determine the ideal dose of propolis (mL/animal/day). In experiment 1 and 2, all data obtained on day 1 for each variable were included as covariates in each analysis, and the initial weight was included as a variable in the model. The first-order autoregressive covariance structure was selected according to the lowest Akaike information criterion. Means were separated using the PDIFF method, the t-test was selected, and all results were reported as means with standard errors. Significance was defined when $P \leq 0.05$.

3. Results

3.1. Chemical composition of red propolis extract

In red propolis extract used in the pilot study, the total phenolic compound content of the extract was 93.07 ± 0.780 mg gallic acid equivalent/g, and the antioxidant activity (IC₅₀) was 0.735 ± 0.170 mg/mL. The chemical profiles of the extract compounds using GC/MS are displayed in Supplementary material 1.

In red propolis used in experiment 2, the content of TPC in the propolis extract was 90.50 ± 3.8 mg gallic acid equivalent/g, and the antioxidant activity (IC₅₀) was 0.735 mg/mL.

3.2. Experiment 1: pilot study

Results of the growth performance of the lambs were presented in Table 3. No effect of propolis treatment on body weight and feed consumption was observed. Greater daily weight gain was observed in lambs that consumed 2.7 mL of propolis extract per day compared to the control; as well as the animals in this group had the lowest feed conversion compared to the control. Regression analysis considered the ADG showed a trend ($p = 0.07$) toward an ideal dose of 3.81 mL/animal/day ($y = -0.001x^2 + 0.276x + 183.3$; $R^2 = 0.562$).

Results of the blood count of the lambs were presented in Table 4. There was no effect of treatment with propolis extract on red blood cells (erythrocytes, hematocrit and hemoglobin). However, lower total leukocyte counts were observed in lambs that consumed propolis extract compared to controls, due to lower granulocyte and lymphocyte counts. There was no difference between groups for monocyte count. No effect of day and interaction between treatment x day ($P \geq 0.05$) for the variable's erythrocytes, hematocrit, hemoglobin, leukocyte, monocytes and granulocyte. However, the lymphocyte count variable showed a significant day effect for all groups ($P = 0.05$) and treatment x day interaction ($P = 0.01$); the animals in the control treatment had higher counts on days 45 and 75 than the animals in the TP2.7 and TP5.3 groups (Supplementary material 3).

Serum biochemistry results are shown in Table 4. Lower triglyceride concentrations were observed in the serum of lambs in the TP5.3 group compared to control. Higher concentration of total cholesterol was found in the serum of TP2.7 and TP5.3 animals when compared to the control. There was no effect of treatment with propolis extract for the variables of AST, GGT, total protein, albumin, globulin and glucose.

Table 3

Experiment 1: Pilot study - Zootechnical performance of lambs fed red propolis extract mixed with the concentrate.

Items	Treatments ^a				SEM	P-value ^b			
	CONT	TP1.3	TP2.7	TP5.3		C1	C2	C3	C4
Average daily gain (ADG), kg/day	0.178	0.182	0.194	0.184	0.01	0.18	0.80	0.03	0.36
Dry matter intake (DMI), kg/day	0.95	0.91	0.96	0.92	0.08	0.86	0.92	0.94	0.89
Feed conversion (DMI/ADG), kg/kg	5.33	5.00	4.94	5.00	0.05	0.05	0.21	0.03	0.18

^a Control treatment and treatments TP1.3, TP2.7, and TP5.3 represent 0, 1.3, 2.7, and 5.3 mL of propolis per animal/day, respectively.^b Probabilities for contrast effect: C1 = [CONT vs (TP1.3+TP2.7+TP5.3)]; C2 = CONT vs TP1.3; C3 = CONT vs TP2.7; C4 = CONT vs TP5.3.**Table 4**

Experiment 1: Pilot study – Hemogram, seric biochemistry, proteinogram and oxidative status of lambs fed red propolis extract mixed with the concentrate.

Variables	Treatments ¹				SEM	P-value ²			
	CONT	TP1.3	TP2.7	TP5.3		C1	C2	C3	C4
Hematology									
Erythrocytes (x10 ⁶ µL)	9.65	9.52	9.63	8.76	0.14	0.89	0.85	0.87	0.72
Hematocrit (%)	28.7	29.1	28.5	27.4	1.35	0.92	0.90	0.89	0.91
Hemoglobin (g/dL)	10.9	10.9	10.8	10.3	0.27	0.94	0.91	0.92	0.90
Leukocytes (x10 ³ µL)	8.10	7.27	6.47	6.72	0.81	0.02	0.26	0.01	0.01
Granulocytes (x10 ³ µL)	1.39	0.95	0.95	1.02	0.19	0.05	0.04	0.04	0.091
Lymphocytes (x10 ⁶ µL)	6.45	5.73	5.19	5.34	0.36	0.02	0.28	0.03	0.05
Monocytes (x10 ³ µL)	0.48	0.42	0.28	0.31	0.09	0.16	0.84	0.13	0.23
Serum biochemistry³									
AST (U/L)	94.2	99.8	94.5	101	3.74	0.92	0.89	0.80	0.87
GGT (U/L)	87.0	89.6	86.3	80.0	2.95	0.86	0.93	0.91	0.29
Total protein (g/dL)	7.72	7.21	7.52	7.30	0.36	0.21	0.87	0.79	0.61
Albumin (g/dL)	2.31	2.50	2.35	2.48	0.14	0.56	0.45	0.82	0.80
Globulin (g/dL)	5.41	4.71	5.17	4.81	0.20	0.12	0.08	0.67	0.35
Triglycerides (mg/dL)	35.1	34.8	31.3	27.3	1.87	0.65	0.94	0.75	0.04
Cholesterol (mg/dL)	73.7	75.5	79.7	78.1	2.08	0.58	0.92	0.04	0.05
Glucose (mg/dL)	68.7	69.7	66.7	66.1	3.01	0.85	0.96	0.89	0.90
Proteinogram									
IgA (g/dL)	0.74	0.69	0.72	0.73	0.04	0.95	0.90	0.95	0.96
IgG heavy chain (g/gL)	0.89	0.95	0.96	0.94	0.04	0.20	0.29	0.32	0.27
Ceruloplasmin (g/dL)	0.54	0.47	0.44	0.39	0.02	0.03	0.25	0.05	0.03
Transferrin (g/dL)	0.36	0.34	0.33	0.30	0.02	0.80	0.86	0.83	0.09
C-reactive protein (g/dL)	0.19	0.20	0.13	0.11	0.01	0.42	0.95	0.05	0.03
Haptoglobin (g/dL)	0.28	0.27	0.27	0.25	0.02	0.88	0.94	0.92	0.59
Oxidative status									
TBARS (nmol MDA/mL)	17.8	13.9	13.6	16.8	0.41	0.25	0.05	0.05	0.91
Total thiols	79.1	82.3	83.5	82.1	2.14	0.76	0.81	0.85	0.81
GST (µmol CDNB/min/mg protein)	430 ^a	394 ^b	395 ^b	423 ^a	6.87	0.35	0.02	0.02	0.92

1Control treatment and treatments TP1.3, TP2.7, and TP5.3 represent 0, 1.3, 2.7, and 5.3 mL of propolis per animal/day, respectively. 2Probabilities for contrast effect: C1 = [CONT vs (TP1.3+TP2.7+TP5.3)]; C2 = CONT vs TP1.3; C3 = CONT vs TP2.7; C4 = CONT vs TP5.3. 3Aspartate aminotransferase (AST), gamma-glutamyl transferase (GGT), immunoglobulin A (IgA) and G (IgG), thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) and glutathione s-transferase (GST).

Table 5

Experiment 1: Pilot study - Ruminal indicators and feces microbiology of lambs fed with red propolis extract mixed with the concentrate.

Variables	Treatments ^b				SEM	P-value ⁵			
	CONT	TP1.3	TP2.7	TP5.3		C1	C2	C3	C4
<i>Ruminal liquid^c</i>									
Rumen pH	6.44	6.61	6.64	6.65	0.01	0.05	0.16	0.09	0.12
MBRT ^a (s)	232	160	235	191	28.9	0.21	0.07	0.92	0.59
Total short-chain fatty acids mmol/L	79.3	74.8	73.0	72.8	0.31	0.01	0.10	0.08	0.05
Acetic acid, mmol/L	52.9	50.5	48.8	49.0	0.85	0.05	0.25	0.12	0.18
Propionic acid, mmol/L	16.5	15.4	15.7	15.06	0.452	0.36	0.43	0.52	0.39
Butyric acid, mmol/L	7.85	7.08	6.65	6.66	0.212	0.01	0.26	0.03	0.09
Isovaleric acid, mmol/L	1.21	1.05	1.11	1.34	0.17	0.38	0.45	0.66	0.78
Valeric acid, mmol/L	0.76	0.72	0.73	0.67	0.03	0.74	0.82	0.80	0.41
<i>Feces^d</i>									
<i>Escherichia coli</i> (x 10 ⁴)	49.2	40.6	39.5	42.4	3.12	0.08	0.10	0.23	0.28
Total coliforms (x 10 ⁴)	78.8	52.8	61.7	94.7	5.75	0.62	0.05	0.35	0.22
<i>Enterobacteria</i> (x 10 ⁴)	83.0	59.6	67.5	74.8	8.23	0.40	0.12	0.66	0.75

⁵ Probabilities for contrast effect: C1 = [CONT vs (TP1.3+TP2.7+TP5.3)]; C2 = CONT vs TP1.3; C3 = CONT vs TP2.7; C4 = CONT vs TP5.3.^a MBRT (methylene blue reduction test).^b Control treatment and treatments TP1.3, TP2.7, and TP5.3 represent 0, 1.3, 2.7, and 5.3 mL of propolis per animal/day, respectively.^c Values expressed in mmol L⁻¹ of each short-chain fatty acid (SCFA) in the ruminal fluid.^d Values expressed in log CFU/g of feces.

There is also no day effect and treatment x day interaction ($P \geq 0.05$) for triglycerides, cholesterol, AST, GGT, total protein, albumin, globulin, or glucose.

Protein profile results by electrophoresis are in Table 4. Effect of treatment with propolis extract was observed on ceruloplasmin levels, being lower in the serum of lambs that consumed propolis compared to the control. Lower concentration of C-reactive protein in the serum of lambs that consumed 2.7 and 5.3 mL of propolis extract compared to the control. No treatment effect was observed between groups for immunoglobulins, transferrin and haptoglobin. Also, there was no treatment x day interaction and day effect for concentrations of IgA, IgG heavy chain, transferrin, ceruloplasmin and C-reactive protein. But haptoglobin levels were influenced by the interaction between treatment x day ($P = 0.05$); no effect on the day ($P = 0.67$).

Oxidative status data are in Table 4. Lambs that consumed 1.3 and 2.7 mL of propolis extract had lower TBARS levels compared to the control. These same animals (TP1.3 and TP2.7) showed lower GST activity compared to the control. There was no effect of treatment on the concentration of total thiols. Also, there was no treatment x day interaction and day effect for concentrations of TBARS and total thiols, as well as GST activity differed between groups.

Results of biomarkers in ruminal fluid were presented in Table 5. Effect of treatment was observed for ruminal pH, being higher in lambs that consumed propolis extract compared to control. There was no difference between groups for bacterial activity (MBRT). Lower concentration of SCFAs was observed in lambs that consumed propolis compared to the control due to lower concentrations of acetic and butyric acid. There was no treatment effect for propionic, isovaleric and valeric acid. Acetic acid showed a significant interaction between treatment x day interaction ($P = 0.01$), and the animals in the TP2.7 and TP5.3 treatments showed a higher concentration on day 15. On day 75, the animals in the control group showed concentrations of acetic acid higher than those in the TP1.3 and TP2.7 groups. The concentrations of propionic acid showed a difference only on day 15 for the control group, which was higher than the TP5.3 group ($P = 0.01$ for the interaction between treatment x day). Butyric acid showed concentrations a treatment x day interaction ($P = 0.001$) i.e., on day 15, the TP2.7 and TP5.3 groups had lower concentrations than the control group; however, on day 75, the animals in the control group only outperformed the TP2.7 group. The concentration of valeric acid was higher in the control, TP1.3, and TP2.7 treatments compared to the TP5.3 treatment on day 15 ($P = 0.01$), and when only the differences between treatments were evaluated, there was a trend ($P = 0.10$) of the control animals presented values higher than TP5.3. There was an effect of day for acetic, butyric and valeric in TP5.3 lambs, which increased over time. Effect of day (increased over time) for propionic acid in all treatments. There was no treatment x day interaction or day effect for the sum of SCFA, pH and MBRT (Supplementary material 3).

There was no effect of treatment on *E. coli* and *Enterobacteria* counts in lamb feces (Table 5). However, lower total coliform counts were found in the feces of TP1.3 lambs when compared to the control. *E. coli* counts between treatment x day ($P = 0.05$). The TP5.3 animals had a higher count than the TP1.3 animals on day 15. The total coliform count of the TP5.3 was higher than the TP1.3 group on the fifteenth day; however, the animals from the control and TP1.3 treatments had higher counts than the TP2.7 and TP5.3 treatments on day 45 ($P = 0.01$). Enterobacteriaceae counts did not differ treatment x day and day ($P \geq 0.05$). There was an effect of day for *E. coli* and total coliform counts in all treatments, reducing over time (Supplementary material 3).

3.3. Experiment 2

The results of growth performance are described in Table 6. Animals that received propolis had greater body weight than animals in the MONENSIN group on days 60 and 75 (interaction; $P = 0.05$); however, treatment did not affect body weight ($P = 0.17$). The weight gain of

Table 6

Experiment 2 - Zootechnical performance of lambs fed with red propolis extract mixed with concentrate.

Variables	Treatments ¹		SEM	P-Value	
	MONENSIN	PROPOLIS		Treat	Treat x day
Body weight (kg)				0.17	0.05
Day 1	18.3	18.4	0.54		
Initial weight (d15)	21.0	21.4	0.69		
Final weight (d75)	36.5 ^b	38.1 ^a	0.66		
Average daily gain (ADG)	0.240 ^b	0.261 ^a	0.02	0.03	-
Dry matter intake (kg/day)	0.910	0.950	0.42	0.79	-
Feed conversion (kg/kg)	3.79	3.63	0.17	0.32	-

¹The monensin and propolis treatments represent animals that received 23.45 ppm/kg/DM of monensin and 3.8 mL of animal propolis/day, respectively. ^{a-b} Within a row means without a common superscript differ ($P \leq 0.05$) or tend to differ ($P \leq 0.10$).

animals that received propolis was higher than those that received MONENSIN ($P = 0.05$), as was the ADG of animals treated with propolis ($P = 0.05$). No effect was found between treatments or treatment x day interaction ($P \geq 0.11$) for weight gain from day 1–15, DMI, and feed conversion.

The results of the hematologic analysis are described in Table 7. Animals fed with propolis had higher counts of lymphocytes than animals of the MONENSIN group on day 15 ($P = 0.01$). No treatment or treatment x day effects were detected for ($P > 0.11$) were detected for hematocrit, hemoglobin, erythrocytes, leukocytes, granulocytes, or monocytes. There was an effect of day ($P = 0.01$), for both treatments (MONENSIN and PROPOLIS), for the variable's total leukocytes, lymphocytes and granulocytes. The sampling day had no effect on the other hematologic variables.

The serum biochemistry results are described in Table 7. Animals fed with propolis showed greater AST activity than the MONENSIN group on days 45 and 75, as well as the treatment effect ($P = 0.01$). No effects of treatment and treatment x day ($P > 0.11$) were identified for glucose, triglycerides, cholesterol, total protein, albumin, globulin, and GGT. There was an effect of day ($p = 0.03$), for both treatments (MONENSIN and PROPOLIS), for AST activity. The sampling day had no effect on the other clinical biochemical variables.

The results of ruminal indicators are presented in Table 8. Animals fed with propolis showed higher pH values on days 45 and 75, with a significant treatment effect ($P = 0.01$). The PROPOLIS group had a shorter time to MBRT than the MONENSIN animals on days 45 and 75 ($P = 0.01$). A lower concentration of short-chain fatty acids was found in the rumen fluid of lambs that consumed propolis (Table 8). Treatment or treatment x day interaction did not affect the proportion of acetic, propionic, butyric, isovaleric and valeric acids ($P > 0.05$). The acetic/propionic ratio was higher in the rumen of lambs that consumed propolis compared to monensin. In ruminal fluid, there was an effect of day ($p = 0.01$) for both treatments (MONENSIN and PROPOLIS), for MBRT time, SCFA concentration and proportion of acetic acid. The sampling day had no effect on the other variables related with ruminal fluid.

The results of the microbiological analysis in feces are described in Table 8. The animals in the PROPOLIS group showed lower *Escherichia coli* counts on days 45 and 75 ($P = 0.03$), with a significant treatment effect ($P = 0.05$). The same occurred for the variable total coliforms on days 45 and 75 ($P = 0.01$), with lower counts in animals in the PROPOLIS group compared to the MONENSIN group. However, there was a significant effect of treatment and a treatment x day interaction for Enterobacteria counts, with lower bacteria counts observed on day 45 (P

Table 7

Experiment 2 - Hemogram of lambs fed with red propolis extract mixed with concentrate compared to monensin.

Variables	Treatments ¹		SEM	P-value	
	MONENSIN	PROPOLIS		Treat	Treat × day
Hemogram					
Hematocrit (%)	30.4	29.1	1.25	0.89	0.91
Hemoglobin (g/ dL)	11.8	11.8	0.41	0.92	0.95
Erythrocytes (x 10 ⁶ /μL)	10.0	10.1	0.26	0.95	0.96
Leukocytes (x10 ³ /μL) ²	7.04	7.24	1.01	0.82	0.32
Lymphocytes (x10 ³ /μL) ²				0.68	0.01
Day 1	10.8	11.0	0.96		
Day 15	7.43 ^b	8.93 ^a	0.57		
Day 45	4.37	4.59	0.56		
Day 75	3.13	3.03	0.55		
Granulocytes (x10 ³ /μL) ²	1.49	1.19	0.75	0.20	0.13
Monocytes (x10 ³ /μL)	0.56	0.54	0.38	0.90	0.81
Seric					
biochemistry					
Glucose (mg/dL)	74.7	74.2	2.85	0.94	0.92
Triglycerides (mg/dL)	27.3	22.7	3.14	0.73	0.65
Cholesterol (mg/dL)	65.3	65.1	2.46	0.96	0.91
Total protein (g/ dL)	6.11	6.06	0.26	0.93	0.92
Albumin (g/dL)	2.55	2.54	0.11	0.95	0.96
Globulin (g/dL)	3.56	3.51	0.24	0.93	0.92
GGT (U/L)	95.9	96.8	6.41	0.85	0.72
AST (U/L) ²				0.08	0.01
Day 1	94.3	93.6	3.21		
Day 15	90.6	92.5	3.04		
Day 45	80.3 ^a	108.2 ^b	3.94		
Day 75	93.0 ^a	103.5 ^b	3.82		

¹The monensin and propolis treatments represent animals that received 23.45 ppm/kg/DM of monensin and 3.8 mL of animal propolis/day, respectively. ²Aspartate aminotransferase (AST) and gamma-glutamyl transferase (GGT). ²There was an effect of day (P < 0.05). ^{a-b}Within a row means without a common superscript differ (P ≤ 0.05) or tend to differ (P ≤ 0.10).

Note: To analyze the treatment effect, results on days 15, 45, and 75, which correspond to the experimental period, were used; the results were presented as an average.

= 0.01) in lambs in the PROPOLIS group. There was an effect of day (p = 0.01) for both treatments (MONENSIN and PROPOLIS), regarding the count of *E. coli*, total coliforms and Enterobacteria.

The results of carcass characteristics and the chemical composition of the meat are described in Table 9. There was no treatment effect (P > 0.11) for carcass weight, yield, hot carcass pH, DM, fat, protein, and organic matter.

The results of the FA profile in meat are described in Table 9. Meat from animals fed with red propolis showed a lower concentration of palmitic acid, while there was an increase in palmitoleic acid (P = 0.01). Furthermore, an effect of the treatment (P = 0.05) was detected for the total concentration of monounsaturated fatty acids (MUFA), being higher in animals fed with red propolis when compared to lambs in the MONENSIN group. There was no treatment effect for the other variables related to the FA profile in meat.

4. Discussion

Adding red propolis extract to the diet of lambs decreased the oxidative state, improved inflammatory responses and animal growth; these improvements do not always occur in propolis experiments.

Table 8

Experiment 2 - Ruminal indicators and feces microbiology of lambs fed with red propolis extract mixed with concentrate.

Variables ²	Treatments ¹		SEM	P-value	
	MONENSIN	PROPOLIS		Treat	Treat × day
Ruminal liquid					
pH ruminal				0.01	0.01
Day 15	6.21	6.34	0.03		
Day 45	6.13 ^b	6.35 ^a	0.03		
Day 75	6.11 ^b	6.38 ^a	0.03		
MBRT (s) ³				0.26	0.01
Day 15	41.4	56.2	3.05		
Day 45	67.8 ^a	33.0 ^b	3.65		
Day 75	78.3 ^a	57.8 ^b	3.41		
Σ SCFA (mmol/L) ³				0.05	0.01
Day 15	121 ^a	98.4 ^b	2.85		
Day 45	104	101	2.87		
Day 75	119	113	2.86		
Acetic acid (%) ³	59.7	61.3	1.97	0.56	0.23
Propionic acid (%)	26.3	25.4	0.95	0.89	0.61
Butyric acid (%)	10.6	10.2	0.64	0.93	0.86
Isovaleric acid (%)	1.40	1.27	0.06	0.15	0.34
Valeric acid (%)	1.90	1.76	0.07	0.23	0.11
Acetic/propionic	2.43 ^b	2.57 ^a	0.02	0.02	0.12
Feces microbiology²					
<i>Escherichia coli</i> (x10 ⁴) ³				0.05	0.03
Day 15	134	120	5.10		
Day 45	310 ^a	186 ^b	6.16		
Day 75	82.7 ^a	42.6 ^b	3.94		
Total coliforms (x10 ⁴) ³				0.02	0.01
Day 15	235	195	5.96		
Day 45	610 ^a	357 ^b	8.41		
Day 75	209 ^a	137 ^b	7.36		
Enterobacteria (x10 ⁴) ³				0.05	0.01
Day 15	175	159	7.28		
Day 45	594 ^a	338 ^b	10.7		
Day 75	129	113	9.32		

¹The monensin and propolis treatments represent animals that received 23.45 ppm/kg/DM of monensin and 3.8 mL of animal propolis/day, respectively. ²MBRT (methylene blue reduction test); SCFA (short-chain fatty acids); Values expressed as log CFU/g of feces. ³There was an effect of day (P < 0.05). ^{a-b}Within a row means without a common superscript differ (P ≤ 0.05) or tend to differ (P ≤ 0.10).

Note: To analyze the treatment effect, results on days 15, 45, and 75, which correspond to the experimental period, were used; the results were presented as averages.

According to the literature, the chemical composition of propolis depends on the biodiversity in the area where the hives collect their material and their phytogeographic location, and this variation directly affects its pharmacological properties (Afrouzan et al., 2018). Vestitol and medicarpine exist only in the thirteenth type of propolis and have never been mentioned in the other 12 types of Brazilian propolis (Park et al., 2000). Red propolis is rare due to its robust antioxidant, antimicrobial, antiprotozoal and antifungal properties (Freires et al., 2016; Rufatto et al., 2018), as it is produced from resins collected from specific plants that are found in limited geographic regions. Brazilian red propolis is derived primarily from the plant *Dalbergia ecastaphyllum*, which grows in specific coastal areas of the northeastern region of Brazil. Compared to other types of propolis, the production of red propolis is naturally lower due to the limited availability of source plants and the dependence on bee activities in specific environments. It has unique chemical compounds that are not commonly found in other types of

Table 9

Experiment 2 - Chemical composition and fatty acid of meat and carcass characteristics of lambs fed with red propolis extract mixed with concentrate.

Variables	Treatments ¹		SEM	P-value Treat
	MONENSIN	PROPOLIS		
Hot carcass weight (kg)	19.5	18.0	0.62	0.87
Carcass yield (%)	47.7	47.7	0.60	0.96
pH hot carcass	6.61	6.60	0.04	0.97
Chemical composition (g/kg)				
Dry matter	27.5	27.2	0.25	0.96
Total lipids	2.64	2.22	0.08	0.74
Crude protein	23.3	23.5	0.55	0.95
Organic matter	1.58	1.49	0.12	0.88
Fatty acid (%)				
C8:0 (Caprylic)	0.048	0.046	0.002	0.87
C10:0 (Capric)	0.050	0.061	0.003	0.58
C12:0 (Lauric)	0.046	0.060	0.002	0.44
C14:0 (Myristic)	1.301	1.565	0.361	0.51
C14:1 (Myristoleic)	0.068	0.089	0.025	0.19
C15:0 (Pentadecanoic)	0.229	0.285	0.012	0.65
C16:0 (Palmitic)	25.00 ^a	22.78 ^b	0.851	0.01
C16:1 (Palmitoleic)	1.626 ^b	2.842 ^a	0.201	0.01
C17:0 (Heptadecanoic)	0.963	0.978	0.157	0.96
C17:1 (cis-10-heptadecenoic)	0.744	0.758	0.143	0.95
C18:0 (Stearic)	15.87	15.81	0.358	0.94
C18:1n9t (Elaidic)	1.646	1.705	0.092	0.89
C18:1n9c (Oleic)	40.31	41.07	0.386	0.74
C18:2n6c (Linoleic)	7.921	7.758	0.654	0.94
C20:0 (Arachidic)	0.119	0.122	0.040	0.91
C18:3n6 (α-linolenic)	0.104	0.108	0.015	0.97
C18:3n3 (α-linolenic)	0.249	0.250	0.139	0.99
C21:0 (Heneicosanoic)	0.230	0.262	0.097	0.95
C20:2 (cis-11,14-Eicosadienoic)	0.094	0.085	0.008	0.88
C22:0 (Behenic)	0.062	0.061	0.006	0.96
C20:3n6 (cis-8,11,14-Eicosatrienoic)	0.215	0.214	0.023	0.98
C20:4n6 (Arachidonic)	2.913	2.884	0.113	0.90
C20:5n3 (cis-5,8,11,14,17-Eicosapentaenoic)	0.075	0.079	0.011	0.92
C24:1n9 (nervous)	0.041	0.038	0.008	0.87
C22:6n3 (cis-4,7,10,13,16,19-docosahexaenoic)	0.057	0.077	0.011	0.65
SFA	18.92	19.25	0.241	0.81
MUFA	44.44 ^b	46.50 ^a	0.468	0.05
PUFA	11.62	11.45	0.197	0.96

¹The monensin and propolis treatments represent animals that received 23.45 ppm/kg/DM of monensin and 3.8 mL of animal propolis/day, respectively. ²SFA (saturated fatty acids); MUFA (monounsaturated fatty acids); PUFA (polyunsaturated fatty acids).

^{a-b} Within a line, means without a common superscript differ ($P \leq 0.05$).

propolis. These compounds include isoflavones, for example. However, in the propolis of this study, no rare compounds were found to classify it as the thirteenth type. This finding occurs because the propolis of each study originates from different places, and their respective compositions are also different. Therefore, the values of phenols and flavonoids are unique to this study and are challenging to compare with the literature. Nevertheless, it is possible that red propolis directly and indirectly influences our results, as discussed below.

TP2.7 animals have more ADG. However, the lambs in the PROPOLIS treatment in experiment 2 achieved greater body weight due to greater weight gain and daily gain during the experimental period. Suckling lambs that were supplemented with green propolis at a dose of 150 µL/kg of body weight showed significant weight gain (Cécere et al., 2021), while Ítavo et al. (2011) found a more significant daily gain in confined lambs fed green propolis at a dose of 15 mL/day (67.0 mg of flavonoid). Propolis has high bioactivity and synergism between its compounds; for this reason, it is called a feed additive. Like monensin, propolis acts against gram-positive bacteria, which benefits rumen fermentation in terms of nutrient utilization, improving animal performance (Zawadzki

et al., 2011).

The leukogram must be interpreted with caution, as an increase in cells may indicate an increase in the inflammatory response (negative effect on animal productivity) or stimulation of the immune system (positive effect for the animal). An increase in the inflammatory response in animals can lead to a series of adverse effects that negatively impact productivity, such as reduced growth, as the energy that animals would use for growth and production can be diverted to combat inflammation, and inflammation can affect digestion and nutrient absorption, resulting in lower feed efficiency; a reduction in these defense cells may indicate a negative interference in the immune response or simply a desirable anti-inflammatory effect due to the consumption of the additive. In the pilot study, there was a lower number of leukocytes in animals fed propolis extract, although the value was within the normal range for the species (González and Silva, 2022), suggesting a beneficial effect on lamb performance. Morsy et al. (2016) found a higher number of leukocytes in sheep fed red propolis extract; Slazon et al. (2019) found no difference in the leukogram of calves.

Propolis acts as an immunostimulant due to the presence of its flavonoids (Nassar et al., 2012) and an anti-inflammatory action resulting from compounds present in propolis (Ramos and Miranda, 2007). The immunomodulatory effect is probably due to the components of propolis that increase and inhibit biomarkers of the immune system. These contradictory effects described in the literature are probably due to the complex chemical variations, the presence in different geographic regions and the forms of extraction (Berretta et al., 2017). The contradictory effects refer to the different ways in which propolis may influence the immune system, as described in the scientific literature. In other words, some studies report that propolis may increase certain biomarkers of the immune system, while others indicate that it may inhibit these same biomarkers. These contradictory observations suggest that the effects of propolis on the immune system are not consistent.

The lower lymphocyte count is responsible for the lower number of leukocytes in lambs that fed red propolis extract. This decrease did not interfere with the concentration of globulins; however, it affected the levels of acute phase proteins, that is, levels of ceruloplasmin, and C-reactive protein were in lower concentrations in animals fed with propolis, suggesting an anti-inflammatory effect. Flavonoids are potent anti-inflammatories, which explains our results. The elevation of these proteins (ceruloplasmin, and C-reactive protein) may suggest an overload response due to tissue injuries and local infections (Gabay and Kushner, 1999), leading to a greater ATP consumption by the animal organisms, reflecting less energy to produce muscle mass and provide weight gain for the animals. Therefore, indirectly, due to the anti-inflammatory action, the ingestion of propolis by the lambs favored their growth. According to the literature, flavonoids can also regulate arachidonic acid proteins (Hou et al., 2007), decrease reactive oxygen species with consequent inhibition of the inflammatory pathway (Salzano et al., 2014), inhibit the path of NF-κB through activation of PPAR-gamma (Martinez-Micaelo et al., 2015), and regulate mitogen-activated protein kinases (Wadsworth et al., 2001; Cho et al., 2003). Cécere et al. (2021) evaluated acute phase proteins such as ceruloplasmin in lambs fed green propolis and found no differences, even at a higher dose (250 µL/kg body weight).

The reduction of TBARS levels capable of reacting to thiobarbituric acid and the induction of activation of antioxidant enzymes are associated with compounds found in propolis (Jasprica et al., 2007). In the present study, there were flavonoids and phenols, antioxidant agents capable of eliminating free radicals and protecting the action of lipid peroxidation (Paulino et al., 2018; Yousef and Salama, 2009). As a result, we can attribute an indirect hepatoprotective effect, as GST reduced its activity, a critical enzyme in liver detoxification; this effect is probably related to the reduction of oxidations and, consequently, free radicals.

There was an unexpected result because the animals that consumed propolis in the pilot study (TP2.7) had more weight gain and the lowest

levels of SCFAs in the ruminal environment. At the same time, in experiment 2, we observed no difference in levels at the end of the experiment. Morsy et al. (2021) found an increase in acetate, propionate, valerate, and total SCFA when red propolis was fed to sheep. We need to understand better how the flavonoids present in red propolis (vestitol, medicarpin, isoliquiritigenin, and formononetin) can affect the profile of SCFAs, which we will do in a future study investigating the ruminal microbiota.

The microorganisms in the rumen are indispensable for the efficient digestion of the nutrients present in the diet (Vázquez-Anón and Jenkins, 2007; Freires et al., 2016); however, in this study, an antimicrobial effect may have occurred in the rumen and feces, consequently interfering with SCFA synthesis. We hypothesize that ingesting red propolis extract by lambs would increase ruminal nutrient degradation and produce individual proportions and total SCFA while mitigating methane formation based on information from other researchers (Morsy et al., 2015; Soltan and Patra, 2020). We attribute the lowest levels of SCFA to the extract not having vestitol, medicarpin, isoliquiritigenin, or formononetin, present in the study by Morsy et al. (2021); according to the authors, these compounds helped increase SCFA production. However, the decrease in SCFA concentrations did not interfere with the performance results, which we believe is related to the indirect effects, such as anti-inflammatory and antioxidant action, which improve the lambs' health.

Lower counts of total coliforms in the feces of TP1.3 lambs had already been described in another study by our research group when we used green propolis at a dose of 150 µL/kg of body weight (Cécere et al., 2021). In experiment 2, we obtained a decrease in the total coliforms, *E. coli*, and Enterobacteria count for animals fed with red propolis extract at a 3.8 mL animal/day dose. We attribute this effect to flavonoids and terpenes with antibacterial characteristics. According to researchers (Krol et al. 1993), these agents present synergism and enhance the antibacterial mechanism when combined. In vitro, 30 % green propolis has been shown to inhibit cell division in gram-negative bacteria, including *E. coli*, and to cause bacteriolysis (Krol et al., 1993). Notably, the extract in the present study had a concentration of 10 %, suggesting a more significant antibacterial action than other chemical compositions found in the literature at lower doses but efficiently reducing the count of gram-negative bacteria.

The results obtained for fatty acids in meat show that red propolis extract influenced the acid profile. Propolis increased the concentration of palmitoleic acid, a monounsaturated acid. Palmitic acid, a saturated acid, was reduced. This finding corroborates Aguiar et al. (2014), where the authors also found an increase in the concentration of palmitoleic acid when feeding propolis to confined cattle. Furthermore, Ítavo et al. (2019), when supplementing lambs with brown propolis, observed a reduction in the levels of saturated fatty acids and an increase in monounsaturated fatty acids (oleic acid (C18:1n-9) and polyunsaturated fatty acids (linoleic acid, C18:2n-6). Although we did not find an increase in other monounsaturated fatty acids alone in this study, we did observe an increase in their total. Therefore, as serum cholesterol is affected by the composition of fatty acids and monounsaturated fatty acids play an essential role in reducing blood cholesterol (Madruga et al., 2005), it can be stated that the addition of red propolis improved the profile of fatty acids in lamb meat, which is essential from the consumer's point of view. Aguiar et al. (2014) evaluated the effect of propolis on the FA profile of the milk of mid-lactation dairy cows. They observed that the FA profile of the milk was altered by the addition of propolis, which shows that it plays an essential role in microorganisms. The rumen is involved in the biohydrogenation process. However, in the literature, it is unclear which compounds in red propolis can modulate these effects on meat quality and FA profile, making it difficult to interpret the results; therefore, more studies are needed. However, in another recent study, researchers found that the red propolis extract improved the lipid profile of lamb meat, i.e., the treatment with propolis had a more significant antioxidant effect and lower content of saturated

fatty acids in meat (Silva et al., 2024). Furthermore, an increase in the content of monounsaturated acids and, consequently, an improvement in nutritional quality, atherogenicity, and thrombogenicity indexes of desirable fatty acids was verified (Silva et al., 2024).

The "n" sample was one of the limitations of our pilot study, especially for the zootechnical performance evaluation; however, we highlight that performance analysis is only complementary data, and the main objective of the study was to understand the effects of propolis on the antioxidant response, inflammation, and the SCFA profile in the rumen. However, experiment 2 was carried out to complement these performance data and add more information about the action of red propolis in confined lambs.

5. Conclusion

The addition of red propolis extract to the concentrate provided a positive oxidative balance, which means there is an excess of antioxidants compared to free radicals. In terms of oxidative balance, this may indicate a condition in which the organism is well protected against oxidative stress, potentially promoting cellular health and preventing related diseases. The feed additive had anti-inflammatory and antimicrobial action, a diet containing propolis reduced SCFAs in the rumen. In addition, propolis extract at the tested dose of 3.8 mL of propolis extract/day was more efficient in the growth performance of lambs compared to the control group without propolis.

CRedit authorship contribution statement

Charles M. Giacomelli: Methodology, Investigation, Formal analysis. **Luisa Nora:** Writing – original draft, Methodology, Investigation. **Fernanda Picoli:** Writing – original draft, Methodology, Investigation. **Aleksandro S. da Silva:** Writing – review & editing, Validation, Supervision, Software, Resources, Project administration, Investigation, Formal analysis, Conceptualization. **Luiz Eduardo L. Silva:** Writing – original draft, Methodology, Investigation, Formal analysis. **Priscila M. Copetti:** Validation, Methodology, Formal analysis, Data curation. **Bianca F. Bissacotti:** Validation, Methodology, Formal analysis, Data curation. **Bruna Klein:** Writing – original draft, Validation, Methodology, Formal analysis, Data curation. **Bruno G.O. Cécere:** Writing – original draft, Methodology, Investigation, Formal analysis, Data curation. **Denise N. Araujo:** Writing – original draft, Supervision, Resources, Project administration, Conceptualization. **Vitor L. Molosse:** Writing – original draft, Methodology, Formal analysis, Data curation. **Aniela P. Kempka:** Writing – review & editing, Supervision, Methodology, Conceptualization. **Guilherme L. Deolindo:** Writing – original draft, Methodology, Formal analysis, Data curation, Conceptualization. **Roger Wagner:** Writing – original draft, Supervision, Resources, Formal analysis.

Declaration of Competing Interest

The authors declare no conflict of interest.

Appendix A. Supporting information

Supplementary data associated with this article can be found in the online version at doi:10.1016/j.smallrumres.2024.107379.

References

- Afrouzan, H., Tahghighi, A., Zakeri, S., And, Es-Haghi, A., 2018. Chemical composition and antimicrobial activities of Iranian propolis. Iran. Biomed. J. 22, 50–65. <https://doi.org/10.22034/Ibj.22.1.50>.
- Aguiar, S.C.D., De Paula, E.M., Yoshimura, E.H., Dos Santos, W.B.R., Machado, E., Valero, M.V., Dos Santos, G.T., Zeoula, L.M., 2014. Effects of phenolic compounds in propolis on digestive and ruminal parameters in dairy cows. Rev. Bras. Zootec. 43 (197–206), 2014. <https://doi.org/10.1590/S1516-35982014000400006>.

- Alencar, S.M., Oldoni, T.L.C., Castro, M.L., Cabral, I.S.R., Costa-Neto, C.M., Cury, J., Rosalen, P.L., Ikegaki, M., 2007. Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: red propolis. *J. Ethnopharmacol.* 113, 278–283. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2007.06.005>.
- Association of Official Analytical Chemists (AOAC), 2000. Official Methods of Analysis (17th ed.). AOAC International.
- Bayram, N.E., Gerçek, Y.C., Bayram, S., Togar, B., 2020. Effects of processing methods and extraction solvents on the chemical content and bioactive properties of propolis. *J. Food Meas. Charact.* 14, 905–916. <https://doi.org/10.1007/s11694-019-00340-z>.
- Berretta, A.A., Arruda, C., Miguel, F.G., Baptista, N., Nascimento, A.P., Marquede-Oliveira, F., Bastos, J.K., 2017. Functional properties of Brazilian propolis: from chemical composition until the market. In: *Superfood and Functional Food: An Overview of Their Processing and Utilization*, 15, pp. 55–98.
- Bertoletti, L.L., Skoronski, E., Schittler, L., Kempka, A.P., 2018. Extracts of leaves of *Ficus auriculata* Lour.: antioxidant, antimicrobial and phytotoxic activity. *Agric. Conspec. Sci.* 83, 321–328. (<https://hrcak.srce.hr/207932>).
- Bligh, E.G., Dyer, W.J., 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37, 911–917.
- Bonoli, M., Verardo, V., Marconi, E., Caboni, M.F., 2004. Antioxidant phenols in barley (*Hordeum vulgare* L.) flour: comparative spectrophotometric study among extraction methods of free and bound phenolic compounds. *J. Agric. Food Chem.* 52, 5195–5200. <https://doi.org/10.1021/jf040075c>.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., Berset, C.L.T., 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT Food Sci. Technol.* 28, 25–30. [https://doi.org/10.1016/s0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/s0023-6438(95)80008-5).
- Brodiscou, L.P., Papon, Y., Brodiscou, A.F., 2000. Effects of dry plant extracts on fermentation and methanogenesis in continuous culture of rumen microbes. *Anim. Feed Sci. Technol.* 87, 263–277. [https://doi.org/10.1016/s0377-8401\(00\)00193-0](https://doi.org/10.1016/s0377-8401(00)00193-0).
- Callaway, T.R., Edrington, T.S., Rychlik, J.L., Genovese, K.J., Poole, T.L., Jung, Y.S., Nisbet, D.J., 2003. Ionophores: their use as ruminant growth promotants and impact on food safety. *Curr. Issues Intest. Microbiol.* 4, 43–51.
- Cécere, B.G., da Silva, A.S., Molosse, V.L., Alba, D.F., Leal, K.W., da Rosa, G., Vedovatto, M., 2021. Addition of propolis to milk improves lactating lamb's growth: effect on antimicrobial, antioxidant and immune responses in animals. *Small Rumin. Res.* 194, 106265. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2020.106265>.
- Cho, S.Y., Park, S.J., Kwon, M.J., Jeong, T.S., Bok, S.H., Choi, W.Y., Jeong, K.S., 2003. Siericin suppresses proinflammatory cytokines production through MAP kinases and NF- κ B pathway in lipopolysaccharide-stimulated macrophage. *Mol. Cell. Biochem.* 243, 153–160. <https://doi.org/10.1023/a:1021624520740>.
- Dirksen, G., 1993. Sistema digestivo. In: Rosenberger, G. (Ed.), *Exame clínico dos bovinos*, 3. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, pp. 166–175.
- Ellman, G.L., 1959. Tissue sulfhydryl groups. *Arch. Biochem. Biophys.* 82, 70–77. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(59\)90090-6](https://doi.org/10.1016/0003-9861(59)90090-6).
- Faghiari, J.J., Santana, A.E., Lucas, F.A., Campos, E., Curi, P.R., 1998. Constituintes sanguíneos de bovinos recém-nascidos das raças Nelore (*Bos indicus*) e holandesa (*Bos taurus*) e de bubalinos (*Bubalis bubalis*) raça Murrah. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 50, 253–262.
- Freires, I.A., Alencar, S.M., Rosalen, P.L., 2016. A pharmacological perspective on the use of Brazilian red propolis and its isolated compounds against human diseases. *Eur. J. Med. Chem.* 110, 267–279. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.01.033>.
- Gabay, C., Kushner, I., 1999. Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *N. Engl. J. Med.* 340, 448–454. <https://doi.org/10.1056/Nejm199902113400607>.
- González, F.H.D., Silva, S.C., 2022. Introdução à bioquímica clínica veterinária. ePub revista, Porto Alegre: [S.N.].
- Habig, W.H., Pabst, M.J., Jakoby, W.B., 1974. Glutathione s-transferases: the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* 249, 7130–7139. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(19\)42083-8](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(19)42083-8).
- Hartman, L., Lago, R.C., 1973. Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. *Lab. Pract.* 22, 475–476.
- Hou, D.X., Luo, D., Tanigawa, S., Hashimoto, F., Uto, T., Masuzaki, S., Sakata, Y., 2007. Prodelphinidin B-4 3'-O-gallate, a tea polyphenol, is involved in the inhibition of COX-2 and iNOS via the downregulation of TAK1-NF- κ B pathway. *Biochem. Pharmacol.* 74, 742–751. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2007.06.006>.
- Ítavo, C.C.B.F., Ítavo, L.C.V., Esteves, C.A.T., Sapaterro, G.A., Silva, J.A., Ferelli, K.L.S.M., Souza Arco, T.F.F., 2019. Influence of solid residue from alcoholic extraction of brown propolis on intake, digestibility, performance, carcass and meat characteristics of lambs in feedlot. *J. Anim. Feed Sci.* 28, 149–158. <https://doi.org/10.22358/jafs/109284/2019>.
- Ítavo, C.C.B.F., Morais, M.G., Costa, C., Ítavo, L.C.V., Franco, G.L., Da Silva, J.A., Reis, F.A., 2011. Addition of propolis or monensin in the diet: behavior and productivity of lambs in feedlot. *Anim. Feed Sci. Technol.* 165, 161–166. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2011.02.020>.
- Jasprica, I., Mornar, A., Debeljak, Z., Smolčić-Bubalo, A., Medić Sarić, M., Mayer, L., Romić, Z., Bučan, K., Balog, T., Sobocanec, S., Sverko, V., 2007. In vivo study of propolis supplementation effects on antioxidative status and red blood cells. *J. Ethnopharmacol.* 110, 548–554. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2006.10.023>.
- Jentzsch, A.M., Bachmann, H., Fürst, P., Biesalski, H.K., 1996. Improved analysis of malondialdehyde in human body fluids. *Free Radic. Biol. Med.* 20, 251–256. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(95\)02043-8](https://doi.org/10.1016/0891-5849(95)02043-8).
- Koru, O., Toksoy, F., Acikel, C.H., Tunca, Y.M., Baysallar, M., Guclu, A.U., Akca, E., Tuylu, A.O., Sorkun, K., Tanyuksel, M., Ali, B., 2007. In vitro antimicrobial activity of propolis samples from different geographical origins against certain oral pathogens. *Anaerobe* 13, 140–145. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2007.02.001>.
- Krol, W., Scheller, S., Shani, J., Pietsch, G., Czuba, Z., 1993. Synergistic effect of ethanolic extract of propolis and antibiotics on the growth of *Staphylococcus aureus*. *Arzneim. Forsch.* 43, 607–609.
- Larrauri, J.A., Rupérez, P., Saura-Calixto, F., 1997. Effect of drying temperature on the stability of polyphenols and antioxidant activity of red grape pomace peels. *J. Agric. Food Chem.* 45, 1390–1393. <https://doi.org/10.1021/jf960282f>.
- Layne, E., 1957. Spectrophotometric and turbidimetric methods for measuring proteins. *Methods Enzymol.* 3, 447–454.
- Madruça, M.S., Sousa, W.H., Rosales, M.D., Cunha, M.G.G., Ramos, J.L.F., 2005. Quality of Santa Inês lamb meat terminated with different diets. *Rev. Bras. Zootec.* 34, 309–315. <https://doi.org/10.1590/S1516-35982005000100035>.
- Martinez-Micaelo, N., González-Abuín, N., Mulero, M., Pinet, M., Ardévol, A., Blay, M., 2015. Procyanidins and docosahexaenoic acid suppress inflammation and boost immune system in cafeteria diet-fed rats. *J. Funct. Foods* 15, 61–71. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.02.017>.
- Mathew, A.G., Beckmann, M.A., Saxton, A.M., 2001. A comparison of antibiotic resistance in bacteria isolated from swine herds in which antibiotics were used or excluded. *J. Swine Health Prod.* 9, 125–129. (<https://www.aasv.org/shap/issues/v9n3/v9n3p125.pdf>).
- Mirzoeva, O.K., Calder, P.C., 1996. The effect of propolis and its components on eicosanoid production during the inflammatory response. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fat. Acids* 55, 441–449. [https://doi.org/10.1016/s0952-3278\(96\)90129-5](https://doi.org/10.1016/s0952-3278(96)90129-5).
- Morsy, A.S., Abdalla, A.L., Soltan, Y.A., Sallam, S.M.A., El-Azrak, K.M., Louvandini, H., Alencar, S.M., 2013. Effect of Brazilian red propolis administration on hematological, biochemical variables and parasitic response of Santa Inês ewes during and after flushing period. *Trop. Anim. Health Prod.* 45, 1609–1618. <https://doi.org/10.1007/S11250-013-0406-3>.
- Morsy, A.S.Y.A., Soltan, Y.A., Sallam, S.M.A., 2016. Impact of Brazilian red propolis extract on blood metabolites, milk production, and lamb performance of Santa Inês ewes. *Trop. Anim. Health Prod.* 48, 1043–1050. <https://doi.org/10.1007/S11250-016-1054-1>.
- Morsy, A.S., Soltan, Y.A., El-Zaiat, H.M., Alencar, S.M., Abdalla, A.L., 2021. Bee propolis extract as a phyto-genic feed additive to enhance diet digestibility, rumen microbial biosynthesis, mitigating methane formation and health status of late pregnant ewes. *Anim. Feed Sci. Technol.* 273, 114834. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2021.114834>.
- Morsy, A.S., Soltan, Y.A., Sallam, S.M.A., Kreuzer, M., Alencar, S.M., Abdalla, A.L., 2015. Comparison of the in vitro efficiency of supplementary bee propolis extracts of different origins in enhancing the ruminal degradability of organic matter and mitigating methane formation. *Anim. Feed Sci. Technol.* 199, 51–60. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2014.11.004>.
- Nassar, S.A., Mohamed, A.H., Soufy, H., Nasr, S.M., Mahrán, K.M., 2012. Immunostimulant effect of Egyptian propolis in rabbits. *Sci. World J.* <https://doi.org/10.1100/2012/901516>.
- National Research Council, 2007. Nutrients Requirements of Sheep. National Academy Press, Washington, D.C., USA.
- Oeztuerk, H., Sagmanligil, V., 2009. Role of live yeasts on rumen ecosystem. *Dtsch. Tierärztl. Wochenschr.* 116, 244–248. <https://doi.org/10.2376/0341-6593-116-244>.
- Paixão, T.R., De Almeida, V.V.S., Oliveira, A.C., Da Silva, A.P.G., Silva, J.W.D., Santos, L.V., Silva, R.R., 2022. Intake, digestibility, ruminal parameters, and performance in lamb fed with increasing levels of red propolis extract. *Trop. Anim. Health Prod.* 54, 364. <https://doi.org/10.1007/s11250-022-03376-4>.
- Park, Y.K., Ikegaki, M., Alencar, S.M., Moura, F.F., 2000. Evaluation of Brazilian propolis by both physicochemical methods and biological activity. *Honeybee Sci.* 21, 85–90.
- Paulino, N., Abreu, S.R., Uto, Y., Koyama, D., Nagasawa, H., Hori, H., Dirsch, V.M., Vollmar, A.M., Scremin, A., Bretz, W.A., 2018. Anti-inflammatory effects of a bioavailable compound, artemisin in Brazilian propolis. *Eur. J. Pharmacol.* 587, 296–301. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2008.02.067>.
- Ramos, A.F.N., Miranda, J.L., 2007. Propolis: a review of its anti-inflammatory and healing actions. *J. Venom. Anim. Toxins Incl. Trop. Dis.* 13, 702. <https://doi.org/10.1590/s1678-91992007000400002>.
- Rufatto, L.C., Luchtenberg, P., Garcia, C., Thomassigny, C., Bouttier, S., Henriques, J.A.P., Moura, S., 2018. Brazilian red propolis: chemical composition and antibacterial activity determined using bioguided fractionation. *Microbiol. Res.* 214, 74–82. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2018.05.003>.
- Russell, J.B., Strobel, H.J., 1988. Effects of additives on in vitro ruminal fermentation: a comparison of monensin and bacitracin, another gram-positive antibiotic. *J. Anim. Sci.* 66, 552–558. <https://doi.org/10.2527/jas1988.662552x>.
- Salzano, S., Checconi, P., Hanschmann, E.M., Lillig, C.H., Bowler, L.D., Chan, P., Ghezzi, P., 2014. Linkage of inflammation and oxidative stress via release of glutathionylated peroxiredoxin-2, which acts as a danger signal. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 111, 12157–12162. <https://doi.org/10.1073/pnas.1401712111>.
- Sforzin, J.M., Bankova, V., 2011. Propolis: is there a potential for the development of new drugs? *J. Ethnopharmacol.* 133, 253–260. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2010.10.032>.
- Silva, J.W.D., Almeida, V.V.S., Oliveira, A.C., Santos, L.S., Lima Junior, D.M., 2024. Red propolis extract reduces the lipid oxidation of lamb meat. *Anim. Prod. Sci.* 64, AN23013. <https://doi.org/10.1071/AN23013>.
- Silva, D.J., Queiroz, A.C., 2002. Análises de alimentos (métodos químicos e biológicos), 3 edição, Viçosa, MG: Editora UFV.
- Slazon, G.S., Toledo, A.F., Silva, A.P., Coelho, M.G., Da Silva, M.D., Cezar, A.M., Bittar, C.M.M., 2019. Red propolis as an additive for preweaned dairy calves: effect on growth performance, health, and selected blood parameters. *J. Dairy Sci.* 102, 8952–8962. <https://doi.org/10.3168/Jds.2019-16646>.

- Soltan, Y.A., Patra, A.K., 2020. Bee propolis as a natural feed additive: bioactive compounds and effects on ruminal fermentation pattern as well as productivity of ruminants. *Indian J. Anim. Health* 59, 50–61. <https://doi.org/10.36062/Ijah.59.2spl.2020.50-61>.
- Van Soest, P.J., Robertson, J.B., Lewis, B.A., 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J. Dairy Sci.* 74, 3583–3597. [https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302\(91\)78551-2](https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302(91)78551-2).
- Vázquez-Anón, M., Jenkins, T., 2007. Effects of feeding oxidized fat with or without dietary antioxidants on nutrient digestibility, microbial nitrogen, and fatty acid metabolism. *J. Dairy Sci.* 90, 4361–4367. <https://doi.org/10.3168/jds.2006-858>.
- Visentainer, J.V., e Franco, M.R.B., 2006. *Química de Alimentos: Teoria e Prática de Análise de Alimentos*, 3ª edição. Editora da Universidade Estadual de Maringá (Eduem), Maringá-PR.
- Wadsworth, T.L., McDonald, T.L., Koop, D.R., 2001. Effects of Ginkgo biloba extract (egb 761) and quercetin on lipopolysaccharide-induced signaling pathways involved in the release of tumor necrosis factor- α . *Biochem. Pharmacol.* 62, 963–974. [https://doi.org/10.1016/s0006-2952\(01\)00734-1](https://doi.org/10.1016/s0006-2952(01)00734-1).
- Wang, K., Ping, S., Huang, S., Hu, L., Xuan, H., Zhang, C., Hu, F., 2013. Molecular mechanisms underlying the in vitro anti-inflammatory effects of a flavonoid-rich ethanol extract from chinese propolis (poplar type). *Evid. Based Complement. Altern. Med.* <https://doi.org/10.1155/2013/127672>.
- Wischer, J., Boguhn, H., Steingab, M., Schollenberger, K., Hartung, M., Rodehutschord, 2013. Effect of monensin on in vitro fermentation of silages and microbial protein synthesis. *Arch. Anim. Nutr.* 67, 219–234. <https://doi.org/10.1080/1745039x.2013.793050>.
- Yousef, M.I., Salama, A.F., 2009. Propolis protection from reproductive toxicity caused by aluminium chloride in male rats. *Food Chem. Toxicol.* 47, 1168–1175. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2009.02.006>.
- Yuste, S., Amanzougarene, Z., de la Fuente, G., Fondevila, M., de Vega, A., 2020. Effects of partial substitution of barley with maize and sugar beet pulp on growth performance, rumen fermentation and microbial diversity shift of beef calves during transition from a milk and pasture regimen to a high concentrate diet. *Livest. Sci.* 238, 104071.
- Zahedi, E., Sadr, S.S., Sanaeierad, A., Roghani, M., 2023. Chronic acetyl-L-carnitine treatment alleviates behavioral deficits and neuroinflammation through enhancing microbiota derived-SCFA in valproate model of autism. *Biomed. Pharmacother.* 163, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2023.114848>.
- Zawadzki, F., Prado, I.N., Marques, J.A., 2011. Sodium monensin or propolis extract in the diets of feedlot-finished bulls: effects on animal performance and carcass characteristic. *J. Anim. Feed Sci.* 20, 16–25. <https://doi.org/10.22358/Jafs/66153/2011>.



Article

The Effects of a Blend of Essential Oils in the Milk of Suckling Calves on Performance, Immune and Antioxidant Systems, and Intestinal Microbiota

Luisa Nora ¹, Charles Marcon ¹, Guilherme Luiz Deolindo ¹, Mateus Henrique Signor ², Ana Luiza Muniz ², Miklos Maximiliano Bajay ¹, Priscila Marquezan Copetti ³, Bianca Fagan Bissacotti ³, Vera M. Morsch ³ and Aleksandro Schafer da Silva ^{2,*}

¹ Graduate Program in Animal Science, Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC), Chapecó 89815-630, SC, Brazil; luisa.nora22@gmail.com (L.N.); charlesmarcon3@gmail.com (C.M.); guilhermeluizd@outlook.com (G.L.D.); miklos.bajay@udesc.br (M.M.B.)

² Department of Animal Science, Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC), Chapecó 89815-630, SC, Brazil; mateushenriquesignor@gmail.com (M.H.S.); analuizamousoza@gmail.com (A.L.M.)

³ Graduate Program in Toxicological Biochemistry, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria 97105-900, RS, Brazil; priscilaa_marquezan@hotmail.com (P.M.C.); bianca_fbissacotti@hotmail.com (B.F.B.); veramorsch@gmail.com (V.M.M.)

* Correspondence: aleksandro.silva@udesc.br

Simple Summary: The results indicated that the supply of a blend of essential oils with cinnamon, oregano, and eucalyptus provided the calves with humoral and antioxidant immune system stimulation, minimizing physiological oxidative stress and leading to better efficiency. The health improvement did not enhance the growth of calves that consumed essential oils. The assessments of the abundance and biodiversity of microbiota did not differ between animals that consumed the blend of essential oils and those that did not; however, it allowed the identification of the main genera in the feces of calves in the first weeks of age.



Citation: Nora, L.; Marcon, C.; Deolindo, G.L.; Signor, M.H.; Muniz, A.L.; Bajay, M.M.; Copetti, P.M.; Bissacotti, B.F.; Morsch, V.M.; da Silva, A.S. The Effects of a Blend of Essential Oils in the Milk of Suckling Calves on Performance, Immune and Antioxidant Systems, and Intestinal Microbiota. *Animals* **2024**, *14*, 3555. <https://doi.org/10.3390/ani14243555>

Academic Editor: Gabriella Holló

Received: 31 October 2024

Revised: 5 December 2024

Accepted: 8 December 2024

Published: 10 December 2024



Copyright: © 2024 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: The objective of the present study was to determine whether the addition of a blend based on the essential oils of cinnamon, oregano, and eucalyptus to the liquid diets of calves would stimulate the immune system combined with anti-inflammatory action, minimize oxidative responses, and alter the intestinal microbiota, consequently enhancing animal growth. Twenty-four male Holstein calves (approximately five days old) were suckled for 60 days, underwent a weaning process, and were followed up until day 75 of the experiment. The calves were divided into control ($n = 12$) and phytobiotic ($n = 12$) groups, receiving commercial milk replacer and pelleted concentrate ad libitum. For the phytobiotic group, we added the blend to the liquid diet twice daily at 5 mL/feeding in the first 15 days and 10 mL/feeding until day 60. We detected no differences in weight gain, but animals in the phytobiotic group tended to consume less feed. Calves treated with phytobiotics showed better conversion and feed efficiency than the animals in the control group. Lower leukocyte and lymphocyte counts were observed, as was a higher cholesterol concentration. Immunoglobulin A, ceruloplasmin, and transferrin also differed between groups, with higher IgA and lower levels of acute-phase proteins (ceruloplasmin and transferrin) in calves that consumed the phytobiotic. Higher glutathione S-transferase activity was found in the serum of calves in the treatment group. The intestinal microbiota did not differ between the groups; however, the genera *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, and *Psychrobacter* were the most abundant regardless of treatment. We concluded that the blend of oils based on cinnamon, oregano, and eucalyptus improved the calves' immune and antioxidant systems, improving feed efficiency without affecting the intestinal microbiota.

Keywords: cinnamaldehyde; 1,8-cineole; carvacrol; thymol; intestinal microorganisms

1. Introduction

Dairy production is improving internationally and Brazil is one of the largest milk producers worldwide [1]. These advances have been taking place to minimize problems and enhance production. In dairy production, several phases of animal husbandry, including calf production, are considered the most critical because calves have extremely immature and fragile immune systems [2]. Calves face several problems during the first weeks of life; however, the primary problem affecting this animal class is diarrhea, a clinical sign associated with infections caused by some pathogenic microorganisms. The diarrhea problem can be more significant when accompanied by the loss of appetite and dehydration, further weakening an animal [3]. It can die quickly, depending on the degree of infection and lack of response from the animal.

Low ambient temperatures, a high number of calves housed in the same facility, a lack of heating, inadequate ventilation, and an inadequate method of supplying a liquid diet (milk and its substitutes) increase the incidence of diarrhea and promote a higher mortality rate [4]. Understanding the intestinal microbiota is essential for understanding diarrhea; however, this microbiota is also responsible for digestion, the absorption of some nutrients, and helping establish the animal's immune system regarding protection against pathogenic microorganisms [5,6].

The intestinal microbiota in calves begins to be established from birth quickly and is affected by several factors, including the microbiota of the mother's vaginal canal at the time of delivery, the environment in which the animal is housed, the origin of the feed provided to the animal, whether the feed is consumable or discarded milk, and the ingestion of solid feed [7,8]. Several non-pathogenic bacteria form this microbiota and can often act as barriers to other pathogenic bacteria [9]. Some bacteria in the gastrointestinal tract are harmless while the animal is healthy; however, they can cause illness when the calf is immunosuppressed. The gastrointestinal microbiota can be modulated to establish specific microorganisms, and this modulation can be accomplished in several ways, including using essential oils [10]; they are more effective when performed at the beginning of the animal's life. A calf at this stage has a fluctuating microbiota that depends on environmental conditions [11].

Essential oils are products extracted from several plant sources [12], which, because of their antimicrobial action [13,14], have been used as alternatives to reduce the use of antibiotics in animal nutrition [14,15]. Cinnamon, eucalyptus, and (mainly) oregano oils have been frequently studied due to their biological properties, which allow effects such as antimicrobial, antioxidant, and anti-inflammatory [16–18] effects, and these compounds are used for additives in animal feed. Cinnamon essential oil is extracted from *Cinnamomum* spp. [19] as a source of cinnamaldehyde, the primary bioactive component [13]. Another component extracted from essential oil is carvacrol, which derives primarily from oregano (*Origanum vulgare*) and thyme (*Thymus vulgaris*) [14]. Oregano oil also acts as a performance enhancer in ruminants as it improves feed conversion and health by modulating ruminal fermentation [20]. The essential oil of eucalyptus is extracted from the leaves, and 1,8-cineole is the primary component of interest [21,22] due to its gastroprotective and antioxidant activities; it regenerates gastric cells and increases gastric mucus [23].

Essential oils, natural antimicrobials in calf production, are increasingly promising, especially in blend form. The powerful aroma of essential oils can be a problem in feeding calves because, when added to milk, they can lead to a lack of interest in consumption; in concentrate, these oils can reduce consumption. The benefits of isolated oregano [20], cinnamon [15], and eucalyptus [24] oil for young ruminants are known; the authors of [25] shows us in their work that when oregano oil is provided to unsaided calves from 70 days of life, there is a hand weight gain and a stimulus of the immune system, with an increase in IgA and IgM levels. However, the effect of these three essential oils when combined and given to calves during the suckling phase is not known. But research tells us that the combination of essential oils can have their effects enhanced by having synergistic actions, improving antioxidant functions for example [26]. Thus, the objective of the present study

was to determine whether the addition of a blend based on the essential oils of cinnamon, oregano, and eucalyptus to the liquid diets of calves would stimulate the immune system combined with anti-inflammatory action, minimize oxidative responses, and alter the intestinal microbiota, consequently enhancing animal growth.

2. Materials and Methods

The study was carried out at the Experimental Farm of the Centro de Educação Superior do Oeste of the State University of Santa Catarina, in the municipality of Guatambu, South of Brazil. It lasted 75 days: 60 days of suckling, 6 days of gradual weaning, and 9 days post weaning. The Committee on Ethics in the Use of Animals of the State University of Santa Catarina approved all experiments (protocol number 2322230522).

2.1. Experimental Design and Feeding

Twenty-four male Holstein calves with a maximum of five days of life were used and acquired through donations from regional producers. All calves had received adequate amounts of colostrum. When they arrived at the experiment site, they were housed in individual suspended cages measuring 100 cm × 120 cm × 107 cm, lined with rubber matting and wood shavings. The cages had support for water buckets and starters and support for individual nipple feeders. The calves were divided into control and phytobiotic groups, with 12 calves in each group, where each animal was considered an experimental unit. The animals were given a commercial milk substitute as a liquid diet, at a dose of 0.48 kg/day (in dry matter) diluted in two liters of water twice a day, at 08:00 and 16:30. For the animals in the phytobiotic group, a commercial mixture (Bezerroz[®], Tecphy, Chapecó, Brazil) of essential oils (cinnamon, oregano, and eucalyptus) was added, with a total purity of 6% of essential oils—that is, 60 mL/L in an emulsifying vehicle (glyceryl polyethylene glycol ricinoleate). The proportions of the three oils within the blend were the same (2%).

In the first 15 days of the experiment, a dose of 5 mL/feeding was given to each animal, and after that, the dose was increased to 10 mL/feeding. It was only given during lactation (60 days); the lowest initial dose was to adapt the animal's taste to the product since it has a strong cinnamon smell. Both groups of animals received starter limited to a maximum intake of 2.5 kg/calf/day (natural matter) and water ad libitum. At the beginning of weaning (day 61), the amount of milk was proportionally reduced for 6 days, and the calves began to receive hay ad libitum in addition to the starter limited to 2.5 kg/day to avoid metabolic disturbances. The composition of the feed provided is displayed in Table 1.

Table 1. Ingredients and chemical composition of feed fed to calves.

Ingredients	Quantity (Dry Matter) Days 1–60	Quantity (Dry Matter) Days 61–75	
STEP 1			
Starter ¹	Ad libitum	Ad libitum	
Milk replacer	484 g/day	363 g/day (days 61–62), 242 g/day (days 63–64); and 121 g/day (days 65–66)	
Hay	0	Ad libitum	
Chemical composition in dry matter (g/kg)			
	Starter	Replacer	Hay
Dry matter	893	973	850
Crude protein	261	279	72.3
Ether extract	34.4	92.5	8.00
Ash	64.4	78.5	72.3

Table 1. Cont.

Ingredients		Quantity (Dry Matter) Days 1–60	Quantity (Dry Matter) Days 61–75
STEP 1			
Chemical composition in dry matter (g/kg)			
	Starter	Replacer	Hay
Crude fiber	-	14.0	-
NDF	260	-	602
ADF	94.8	-	242
Lactose	-	536	-

¹ The starter was based on wheat bran, micronized soy bran, ground corn, whey powder, and mineral and vitamin supplement. The starter had the following minimum guaranteed levels: Calcium (9–11.00 g/kg), phosphorus (6800 mg/kg), sodium (1900 mg/kg), magnesium (1500 mg/kg), sulfur (2800 mg/kg), cobalt (5 mg/kg), copper (40 mg/kg), iron (68 mg/kg), iodine (4.40 mg/kg), manganese (80 mg/kg), selenium (1 mg/kg), zinc (96 mg/kg), vitamin A (7500 IU/kg), vitamin D3 (1500 IU/kg), vitamin E (7.5 IU/kg), vitamin K3 (1.2 mg/kg), vitamin B1 (0.60 mg/kg), vitamin B2 (2 mg/kg), vitamin B6 (1.50 mg/kg), vitamin B12 (11 mcg/kg), vitamin B3 (15 mg/kg), vitamin B9 (0.30 mg/kg), vitamin C (0.35 mg/kg), choline (210 mg/kg), sodium monensin (36 mg/kg), and flavomycin (0.72 mg/kg).

2.2. Body Weight, Feed Efficiency and Stool Score

The feed was provided based on daily consumption, and the leftovers were weighed the following day to obtain the dry matter intake (DMI) per day. The animals were weighed on a digital scale weekly to monitor weight gain (WG: final weight—initial weight) and average daily gain (ADG: WG/number of days). Information feed efficiency (ADG/DMI—kg/kg) was obtained using mathematical calculations based on the animals' weight and daily consumption. The stool score was evaluated daily using the visual analysis methodology proposed by the authors [27], in which the score varies from 1 to 5, where 1 is normal stool and 5 is entirely liquid stool due to the incidence of diarrhea. From score 3 onwards, diarrhea was considered, but with less severity.

2.3. Blood Analysis

Blood samples were collected for hematologic, biochemical, and immunological analyses on days 1, 15, 30, 45, 60, and 75. All the samples were collected in the morning, with the animals fasting from food and water. Collections were made through the jugular vein with needles and evacuated tubes. Tubes with EDTA were used to prevent clotting and enable hematologic analysis, and another contained a clot activator to obtain serum. For serum separation, the tubes with clot activator were centrifuged at 3500 RPM for 10 min, and the serum was transferred to identified microtubes and stored at −20 °C until further analyses were performed.

Hematologic analyses were performed using fresh blood on automatic equipment (Equipe Vet 3000®, Itatiba, Brazil). The equipment made it possible to quantify the total number of leukocytes and the differential (lymphocytes, granulocytes, and monocytes), total erythrocyte count, hemoglobin concentration, and hematocrit.

The biochemical analyses measured total protein, glucose, albumin, cholesterol, and urea serum levels on a semi-automatic analyzer (Bio-2000 BioPlus®, Barueri, Brazil) and commercial kits (Analisa®, Belo Horizonte, Brazil). The levels of globulins were obtained using a mathematical calculation (total proteins—albumin).

For protein fractionation, sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis was performed, according to literature [28], adapted by other researchers [29] using a mini gel (10 × 10 cm). The gel was stained with Coomassie Blue and photographed to identify and quantify the protein fractions using Labimage1D software (<https://www.kapelanbio.com/products/labimage/>, accessed on 2 December 2024) Loccus Biotechnology, Morrisville, NC, USA). A standard containing fractions with molecular weight between 10 and 250 KD (Kaleidoscope—BIORAD, Hercules, CA, USA) was used as a reference.

Lipid peroxidation was determined through thiobarbituric-acid-reactive species (TBARS) levels using the methods described in literature [30] for sera samples. Serum TBARS were expressed as nM malondialdehyde (MDA)/mL. The measurement of total thiol levels was according to the methodology described by Ellman [31]. Glutathione S-transferase (GST) activity was determined according to the methodology described by Habig et al. [32].

2.4. Intestinal Microbiota Analysis

On days 1, 35, and 60, feces were collected directly from the rectal ampulla and stored in 3M™ Quick Swabs for qualitative and quantitative detection of microorganisms using metagenomics by sequencing the 16S rRNA gene, which was performed by the laboratory BPI—Biotechnology Research and Innovation®. It should be noted that animals undergoing antibiotic treatment due to diarrhea or other problems did not have their feces collected, as this would directly interfere with the analysis results.

Total DNA was extracted from 200 mg (wet weight) of samples with the ZR Fungal/Bacterial DNA MiniPrep kit (Zymo Research, Tustin, CA, USA). Primers 341F (5'-CCTAYGGGRBGCASCAG-3') and 806R (5'-GGACTACNNGGGTATCTAAT-3') were selected to amplify the V3–V4 region of bacterial 16S rRNA gene by polymerase chain reaction (PCR) [33].

Libraries were quantified by q-PCR using the Kapa Library Quantification Kit (Illumina, San Diego, CA, USA) following the manufacturer's recommendations. Samples were normalized to a final concentration of 2 nM and sequenced with an Illumina MiSeq for from each end.

2.5. Statistical Analysis

A completely randomized design was used in this study. To analyze the data, they were first analyzed in a descriptive form. The data were then subjected to the normality test (Shapiro–Wilk test), which showed that all data had a normal distribution. We also evaluated the residual (including the command/influence residual after the fixed effects in the mixed model), which also showed normal distribution. Because of that, the data were analyzed using the SAS MIXED procedure (SAS Inst. Inc., Cary, NC, USA; version 9.4), with the Satterthwaite approximation being used to determine the denominator degrees of freedom for the fixed-effects test. Weight gain, average daily gain, feed conversion, and feed efficiency were tested for fixed treatment effects, and using the animal, as random variables. All other variables (body weight, biochemistry, blood count, protein count, and oxidants) were analyzed as repeated measures and tested for fixed effects of treatment, day, and treatment $\times$ day. All results obtained on d1 for each variable were also included as covariates; however, the command for covariates was removed from the model when $p > 0.05$. The Toeplitz covariance structure was selected for body weight (BW), and the first-order autoregressive covariance structure was selected for all other variables. The covariance structures were selected according to the lowest Akaike information criterion. Averages were determined using PDIFF, and all results were reported as LSMEANS followed by the standard error. The chi-square test was used for stool score analysis. Significant differences were defined when $p \leq 0.05$ and trends when $p > 0.05$ and > 0.10 . We calculated the post-hoc power for the groups, considering feed efficiency. We used the mean of each group and its SEM with an alpha of 0.05, and we ended up with a reasonable power of 88.3%.

The sequence data were processed with Mothur v.1.39.5 [34], in line with the Mothur MiSeq SOP [35]. Taxonomy was then assigned by querying the representative sequence of each oligotype against the SILVA database (release 132) [36].

Closed-reference clustered OTU data were exported for analysis with Phyloseq v1.41 [37] in R 4.3.1 (R Core Team, 2023). The inverse Simpson and Shannon diversity index obtained alpha diversity values for bacterial communities. The inverse Simpson calculator is preferred to other alpha diversity measures since it indicates the richness of a community with uniform evenness that has the same level of diversity and thus has some biological interpretation [38]. According to literature, the inverse Simpson diversity combines richness

with evenness [39], places more emphasis on common species [40], and is less sensitive to sampling efforts than the others alpha diversity indices [41]. PERMANOVA was applied to the differential test of distances among treatment groups [42]. The `tax_glom` function of Phyloseq was used to aggregate abundance data by genera to generate relative abundance plots of the 10 most abundant genera across all samples, plotted by averaging abundances by study and animal. Relative abundance of well-known potentially pathogenic *Clostridium* and *Escherichia* [43] was performed. All figures were generated with the `ggplot2` package v3.2.1 in R [44].

3. Results

3.1. Clinical Changes

Some clinical interventions were necessary during the experiment, as described in Table S1. This happened due to problems such as diarrhea, pneumonia, and, in one case, a hoof injury. Diarrhea was the most observed clinical sign, and the use of antibiotics was only carried out following a protocol in which the animals presented a diarrhea score of 4 or 5 for more than 24 h, fever, apathy, and signs of dehydration. During this period, there was an infestation of flies (*Musca domestica*), which are very common in our region during hot periods (Guatambu/SC, Brazil, 27°09'07.0" S 52°47'17.7" W) as they can be vectors of various diseases. Stool score results are detailed in Figure S1.

3.2. Consumption, Weight Gain, and Feed Efficiency

Dry matter intake (DMI) tended to be lower in the phytobiotic group ($p \leq 0.1$) than in the control group when we evaluated the total dry matter consumed throughout the experiment. The average initial weights of the calves were 40.7 kg and 41 kg, and the final weights were 78.1 kg and 79.6 kg, in the control and phytobiotic groups, respectively. The weight gains did not differ between groups in any of the measurements; however, animals in the phytobiotic group had better feed efficiency ($p \leq 0.05$). The data are expressed in Table 2. A body weight curve for the animals was drawn up (Figure S2)

Table 2. Growth performance and consumption of calves in the phytobiotic group fed with a commercial blend of essential oils, and also in the control group.

Variable	Control	Phytobiotic	SEM	p —Treat ¹	p —Treat $\times$ Day ²
Body weight, kg				0.86	0.87
d1	40.7	41.0	0.34		
d60	61.2	62.4	0.34		
d75	78.1	79.6	0.35		
WG, kg					
d1–60	16.6	16.0	0.21	0.84	–
d1–75	34.4	36.0	0.22	0.39	–
d60–75	17.6	20.0	0.20	0.42	–
ADG, kg					
d1–60	0.27	0.26	0.03	0.88	–
d60–75	1.24	1.33	0.04	0.80	–
DMI of starter, kg DM					
d1–60	0.52	0.41	0.05	0.11	–
d60–75	1.74	1.52	0.16	0.11	–
DMI of milk replacer, kg DM					
d1–60	0.484	0.484	0.00	–	–
DMI: starter + milk replacer, kg DM					
d1–60	1.00 ^a	0.90 ^b	0.04	0.08	–
Feed efficiency, kg/kg					
d1–60	0.27 ^b	0.29 ^a	0.03	0.05	–

Phytobiotic: treatment group, which received the blend of essential oils. ¹ The table shows treatment effect, where different letters on the same line show significant differences ($p \leq 0.05$) and trends ($p > 0.05$ and ≤ 0.1) between groups. ² It also shows treatment $\times$ day interaction, where different letters on the same line show significant differences ($p \leq 0.05$) and trends ($p > 0.05$ and ≤ 0.1) between groups. Abbreviations: dry matter (DM), weight gain (WG), average daily gain (ADG), and dry matter intake (DMI).

Stool Score

The treatment did not affect the stool score ($p > 0.05$ —Figure S1). During the experiment, the score was 1.80 in the control group and 1.87 in the phytobiotic group. According to the methodology, scores of 1 and 2 were considered normal; however, it is worth noting that these values are averages of the entire experimental period, so we cannot say that the animals did not have diarrhea at any time.

3.3. Blood Tests

In the hematologic analysis, the animals in the phytobiotic group had lower leukocyte counts on days 45 and 60 because lymphocyte counts were also lower ($p < 0.05$). On day 30, the granulocyte count was also lower in the phytobiotic group ($p < 0.05$). Regarding the other hematologic parameters, no difference was observed during the experiment. The results are displayed in Table 3.

Table 3. Blood count of calves in the phytobiotic group fed with a commercial essential oil blend, and also in the control group.

Variable	Control	Phytobiotic	SEM	p —Treat ¹	p —Treat $\times$ Day ²
Leukocytes ($\times 10^3$ cel/ μ L)				0.25	0.01
d1	14.8	16.6	0.69		
d15	16.6	15.8	0.66		
d30	21.2	17.3	0.77		
d45	12.4 ^a	9.91 ^b	0.65		
d60	8.00 ^a	5.17 ^b	0.66		
d75	8.24	7.53	0.66		
Lymphocytes ($\times 10^3$ cel/ μ L)				0.07	0.01
d1	8.22	7.87	0.54		
d15	10.8	8.58	0.54		
d30	10.9	10.5	0.54		
d45	8.53 ^a	5.60 ^b	0.52		
d60	6.70 ^a	3.74 ^b	0.52		
d75	4.62	3.96	0.52		
Monocytes ($\times 10^3$ cel/ μ L)	1.78	1.38	0.61	0.52	0.21
Granulocytes ($\times 10^3$ cel/ μ L)				0.75	0.05
d1	3.78	4.91	0.35		
d15	3.32	4.37	0.35		
d30	6.57 ^a	4.72 ^b	0.35		
d45	2.02	2.66	0.34		
d60	2.07	2.35	0.29		
d75	2.38	2.32	0.28		
Erythrocytes ($\times 10^6$ cel/ μ L)	8.05	8.31	0.03	0.95	0.96
Hemoglobin (mg/dL)	10.4	10.4	0.18	0.98	0.95
Hematocrit (%)	28.4	28.3	0.71	0.96	0.94

Phytobiotic: treatment group, which received the blend of essential oils. ¹ The table shows treatment effect, where different letters on the same line show significant differences ($p \leq 0.05$) and trends ($p > 0.05$ and ≤ 0.1) between groups. ² The table also shows treatment $\times$ day interaction, where different letters on the same line show significant differences ($p \leq 0.05$) and trends ($p > 0.05$ and ≤ 0.1) between groups.

Glucose, total protein, albumin, urea, and globulin showed no difference throughout the experimental period. However, on days 30, 45, and 60, cholesterol levels were higher in the phytobiotic group (Table 4).

Table 4. Clinical biochemistry of calves fed with commercial mixture of essential oils.

Variables	Control	Phytobiotic	SEM	<i>p</i> —Treat ¹	<i>p</i> —Treat × Day ²
Glucose (mg/dL)	83.5	83.1	2.12	0.95	0.98
Cholesterol (mg/dL)				0.05	0.01
d1	59.5	59.8	4.52		
d15	75.8	82.4	4.61		
d30	144 ^b	161 ^a	4.27		
d45	109 ^b	150 ^a	5.81		
d60	112 ^b	147 ^a	5.92		
d75	120	131	4.48		
Total protein (g/dL)	6.52	6.34	0.25	0.56	0.30
Albumin (g/dL)	2.64	2.65	0.09	0.95	0.92
Urea (mg/dL)	17.2	16.8	0.55	0.91	0.88
Globulin (g/dL)	3.87	3.68	0.18	0.81	0.76

Phytobiotic: treatment group, which received the blend of essential oils. ¹ The table shows treatment effect, where different letters on the same line show significant differences ($p \leq 0.05$) and trends ($p > 0.05$ and ≤ 0.1) between groups. ² The table also shows treatment × day interaction, where different letters on the same line show significant differences ($p \leq 0.05$) and trends ($p > 0.05$ and ≤ 0.1) between groups.

The results of the oxidative stress biomarkers are in Table 5. GST showed an effect of treatment and treatment × day interaction on days 15, 30, 45, and 60, higher in the serum of animals in the phytobiotic group. There was no treatment effect or treatment × day interaction for TBARS or total thiols.

Table 5. Oxidative status of calves fed with commercial mixture of essential oils.

Variables	Control	Phytobiotic	SEM	<i>p</i> —Treat ¹	<i>p</i> —Treat × Day ²
TBARS (g/dL)	17.3	16.3	1.02	0.81	0.86
GST (g/dL)				0.01	0.01
d1	432	414	5.84		
d15	420 ^b	457 ^a	5.85		
d30	411 ^b	525 ^a	5.74		
d45	410 ^b	492 ^a	5.79		
d60	420 ^b	539 ^a	5.78		
Total Thiols (g/dL)	62.2	65.7	1.03	0.76	0.62

Phytobiotic: treatment group, which received the blend of essential oils. TBARS: thiobarbituric-acid-reactive substances; GST: glutathione S-transferase enzyme. ¹ The table shows treatment effect, where different letters on the same line show significant differences ($p \leq 0.05$) and trends ($p > 0.05$ and ≤ 0.1) between groups. ² The table also shows treatment × day interaction, where different letters on the same line show significant differences ($p \leq 0.05$) and trends ($p > 0.05$ and ≤ 0.1) between groups.

The results of the proteinogram are displayed in Table 6, where we can observe an effect of treatment and treatment × day interaction for levels of IgA, ceruloplasmin, and transferrin. Serum IgA was higher in the phytobiotic group on day 60, ceruloplasmin was lower on days 30 and 60, and transferrin was lower on day 45. As an effect of treatment, this led to higher IgA and lower ceruloplasmin and serum transferrin in calves that consumed the blend of essential oils. There was no effect of treatment and treatment × day interaction for the concentration of heavy chain immunoglobulins, haptoglobin, C-reactive protein, and ferritin.

Table 6. Proteinogram of calves fed or not with commercial mixture of essential oils.

Variables	Control	Phytobiotic	SEM	<i>p</i> —Treat ¹	<i>p</i> —Treat × Day ²
IgA (g/dL)				0.05	0.03
d1	0.69	0.65	0.02		
d15	0.67	0.64	0.02		
d30	0.70	0.71	0.02		
d45	0.65	0.70	0.03		
d60	0.62 ^b	0.75 ^a	0.02		
Heavy chain Ig (g/dL)	0.96	1.01	0.04	0.38	0.17
Ceruloplasmin (g/dL)				0.05	0.02
d1	0.52	0.54	0.02		
d15	0.53	0.50	0.02		
d30	0.58 ^a	0.51 ^b	0.01		
d45	0.52	0.48	0.01		
d60	0.50 ^a	0.39 ^b	0.02		
Haptoglobin (g/dL)	0.29	0.30	0.01	0.89	0.60
C-reactive protein (g/dL)	0.18	0.16	0.01	0.45	0.23
Ferritin (g/dL)	0.23	0.20	0.02	0.54	0.42
Transferrin (mg/dL)				0.01	0.01
d1	0.20	0.20	0.02		
d15	0.21	0.20	0.02		
d30	0.20	0.17	0.02		
d45	0.21 ^a	0.16 ^b	0.01		
d60	0.22	0.17	0.02		

Phytobiotic: treatment group, which received the blend of essential oils. ¹ The table shows treatment effect, where different letters on the same line show significant differences ($p \leq 0.05$) and trends ($p > 0.05$ and ≤ 0.1) between groups. ² The table also shows treatment × day interaction, where different letters on the same line show significant differences ($p \leq 0.05$) and trends ($p > 0.05$ and ≤ 0.1) between groups.

3.4. Intestinal Microbiota

From calf feces, nine genera of the most abundant microorganisms are shown in Figures 1 and 2, detailed by treatments and experimental periods, respectively. There was a decrease in the relative abundances of the genera *Psychrobacter*, *Acinetobacter*, and *Escherichia* in phytobiotic group, compared with the control, but without statistical differences ($p > 0.05$). *Psychrobacter* is primarily a commensal that decomposes several dissolved organic carbon compounds, except for sugars, and its abundance increased along the experimental period [45]. *Acinetobacter* is considered an important human and veterinary pathogen, mostly due to intrinsic and acquired resistance to antimicrobials [46]. The designation “other” refers to genera that appeared in small amounts and genera that could not be identified against the SILVA database.

The relative abundances of phyla by groups in the feces of calves fed essential oils (phytobiotic) and control group (without essential oils) are presented in Figure S3. We highlight the phylum Proteobacteria, more abundant in the feces of calves, here.

A more significant number of taxa were observed in the samples of animals from the phytobiotic group, demonstrating a greater alpha diversity than the control. Observing this alpha diversity, it is also possible to observe that the greatest diversity occurred later at the end of the experiment but without significant differences in treatment ($p > 0.05$) as shown in Figures 3 and 4.

Alpha diversity considering the groups and the times of collection (d35 and d60) is presented in Figure S4. The difference within the phytobiotic group when comparing d35 with d60 when using the Shannon index (which was not observed in InvSimpson) stands out—that is, there was an increase in alpha diversity on day 60.

Beta diversity considering the groups and the collection times (d35 and d60) of calves that consumed essential oils is presented in Figure S5. PERMANOVA results were not significant ($p > 0.05$) for the treatments and no distinct clusters were found in the beta-diversity PCoA.

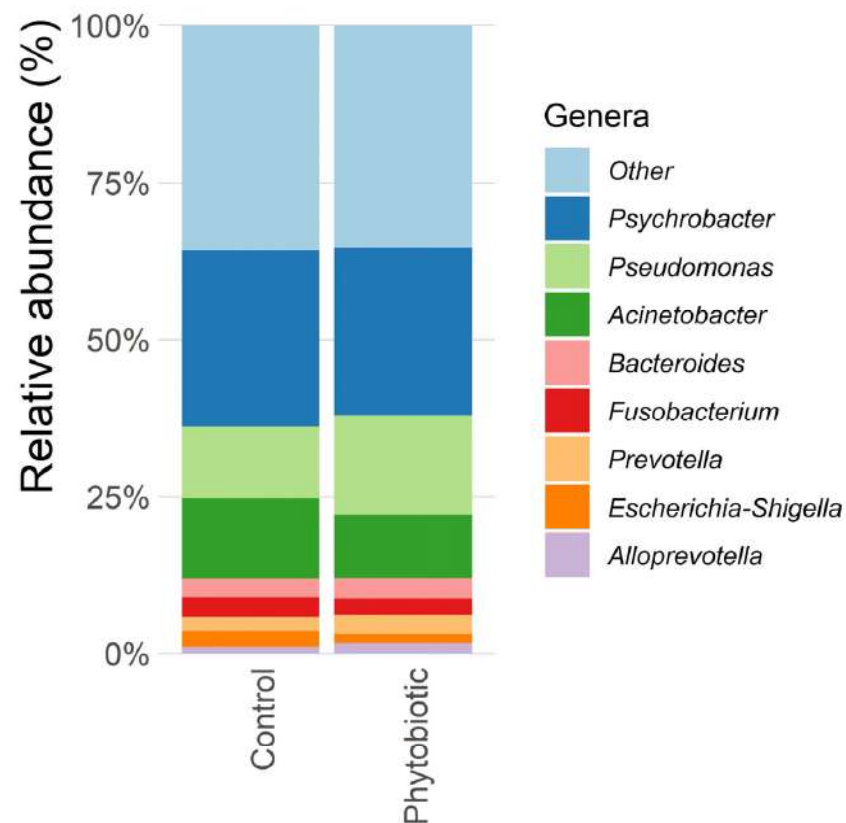


Figure 1. Ten most abundant bacterial genera found in the feces of calves supplemented with commercial mixture of essential oils. Abbreviations—Control: group of animals that did not receive the blend of essential oils; Phytobiotic: group of animals that received the blend. Data from the first collection (time 0) were excluded from this analysis.

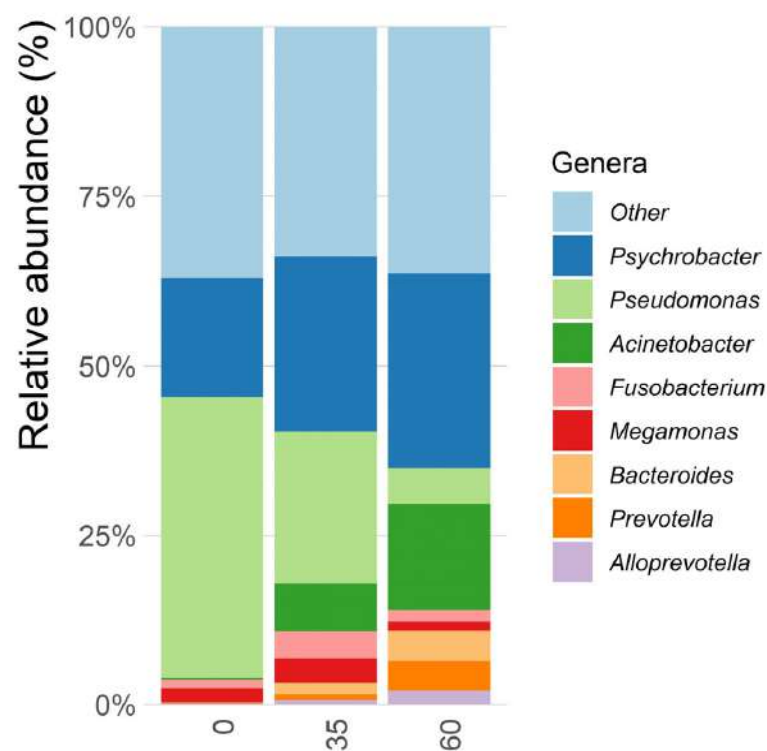


Figure 2. Ten most abundant bacterial genera found in calf feces on days 0, 35, and 60, dates that represent the days of the experiment.

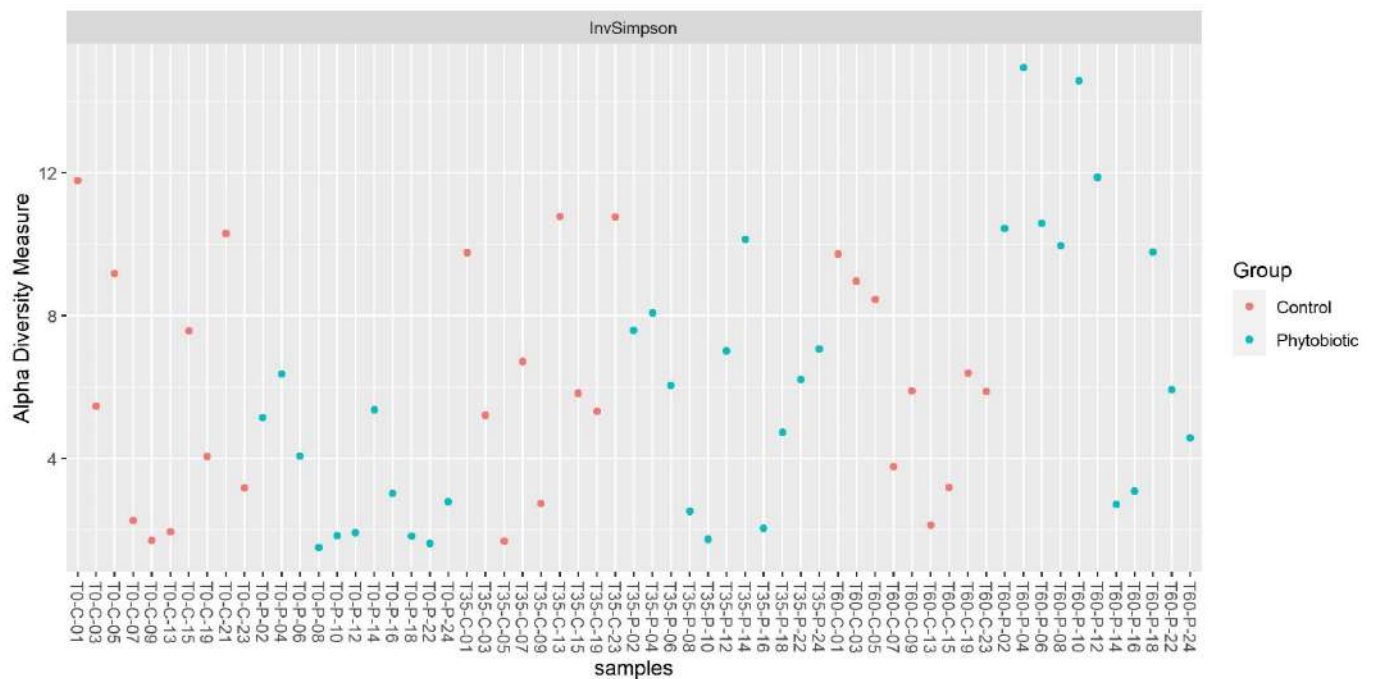


Figure 3. Alpha diversity of each sample. ‘Phytobiotic’ refers to the group that received the commercial mixture of essential oils.

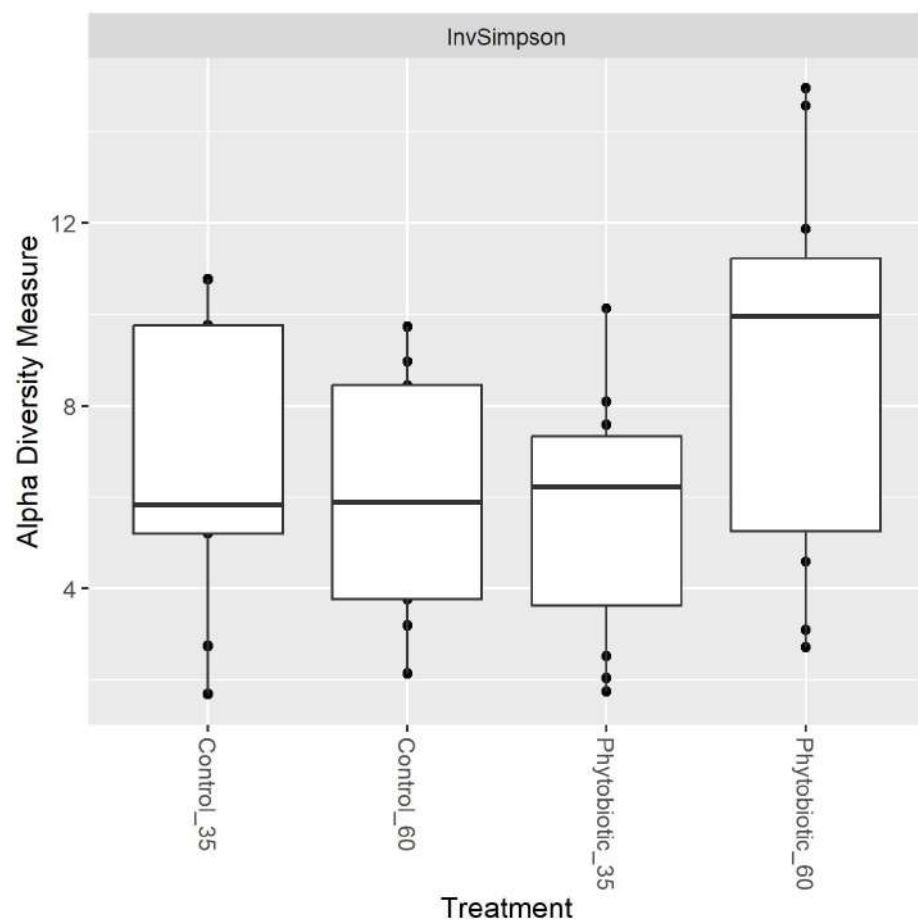


Figure 4. Alpha diversity based on treatment and days 35 and 60 of the experiment. ‘Phytobiotic’ refers to the group that received the blend of essential oils. Data from the first collection (time 0) were excluded from this analysis.

The abundance of *Clostridium* and *Escherichia* was assessed in isolation, as shown in Figures 5 and 6. *Salmonella* was rarely identified. When comparing the treatments, there was no significant difference between the abundances of *Clostridium* and *Escherichia*.

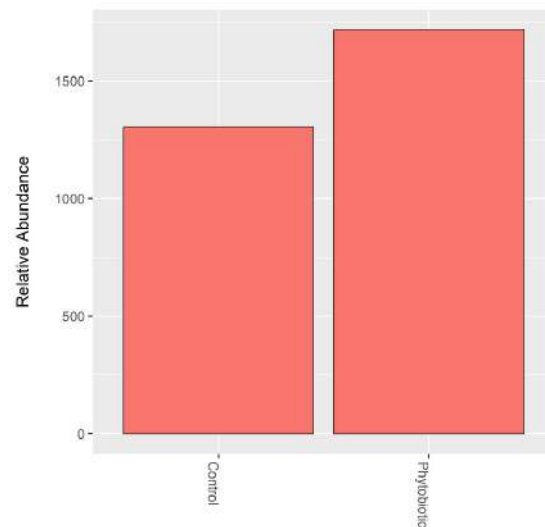


Figure 5. Abundance of *Clostridium* detected in calf feces. 'Phytobiotic' refers to the group that received the commercial essential oil blend.

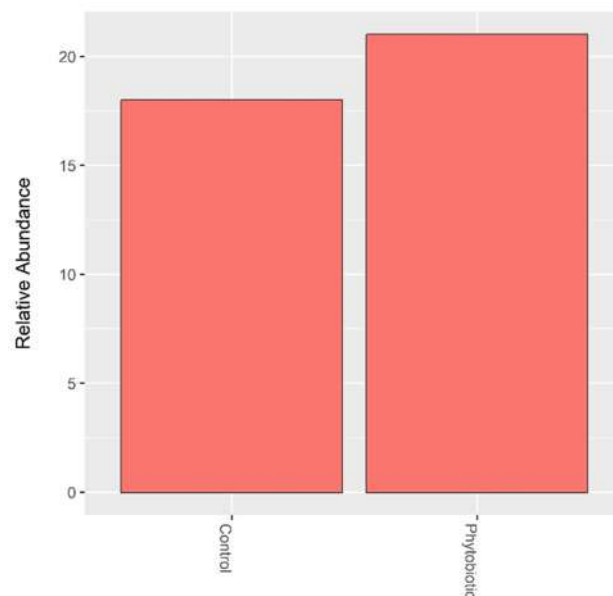


Figure 6. The abundance of *Escherichia* was detected in calf feces. 'Phytobiotic' refers to the group that received the commercial essential oil blend.

4. Discussion

In general, the weight gain of the calves was lower than that found in most studies similar to ours described in this discussion. During the experimental period, some animals had an incidence of infectious diarrhea, and even pneumonia, which directly affected the performance of the calves, as there would be a loss of appetite resulting in a decrease in weight gain. Another critical point to be taken into consideration is the low amount of crude protein in the milk replacer. The recommendation is that it should be 20 to 22%, whether of dairy origin or not [47], and the milk replacer utilized contained 15%. However, despite this, consuming the blend of essential oils provided better feed efficiency for the calves because feed intake was lower, as researchers [48] had described when providing oregano oil to

calves. Likewise, Silva et al. [49] obtained greater feed efficiency in lactating cows when supplied with a commercial additive composed of capsaicin, carvacrol, cinnamaldehyde, and eugenol, with carvacrol and cinnamaldehyde being two of the components present as bioactives in the product used in the experiment in question.

Furthermore, Farshid et al. [50] found greater feed efficiency for calves supplemented with cinnamon essential oil than those supplemented with oil from other plants and a probiotic. The more significant weight gain with lower DMI can be explained by a slight modulation of ruminal microorganisms, allowing greater efficiency in using available nutrients. Essential oils can alter rumen fermentation, altering the ratio of volatile fatty acids from food degradation and even protein metabolism, becoming a performance improver precisely for this reason [13,51], favoring the animal nutritionally. Therefore, our results corroborate the literature, showing that this tested essential oil blend is a way to save money on feed costs for raising calves without losing productivity.

Although there was no statistical difference in weight gain and average daily gain, numerically, the phytobiotic group had lower rates, which was different from what was expected in studies with essential oils, where there was a higher performance rate. It is believed that this occurred due to sanitary conditions; in Table S1, it is possible to observe the incidence of diseases, mainly infectious diarrhea, which is known to affect the calf's consumption and weight gain directly, and the incidence of diarrhea occurred more in animals in the phytobiotic group than the control group. Nevertheless, it was still not harmful in any significant way.

Another point that drew attention was that cholesterol was higher in the phytobiotic group despite the lower consumption of starters. Serum cholesterol is the balance of cholesterol that enters the bloodstream, endogenous or exogenous, with the output of the same metabolism [52]. Furthermore, years ago, as in the work of the authors of [53], it was proven that the fat quality in the diet affects cholesterol concentrations more than the quantity of fat ingested.

The cholesterol level in some studies was shown to be inverse to the consumption of a starter, regardless of the composition of the substitute or the addition of essential oils, as shown in our study. In one study by researchers [54], calves were fed with the same essential oils as in the present study, oregano, eucalyptus, and cinnamon, with higher cholesterol levels in the group where starter consumption was lower. Furthermore, in the survey by Wilms [55], where substitutes with different fat sources were provided, the highest cholesterol levels were in calves fed with the substitute containing fat of vegetable origin, the most similar to that used in our study, and this group was also the one with the lowest starter consumption. As previously mentioned, the presence of high or low cholesterol indicates that metabolism is out of balance, being affected by the quality of the fat [52,53]. With this in mind, we believe that the substitute supplied had fat of a lower quality than the fat in the concentrate, reducing this metabolism and increasing serum cholesterol since the consumption of higher-quality fat was reduced.

The components of the essential oils in this work are considered to be antimicrobials and intestinal flora modulators, and one of the possible responses to this antimicrobial action is a decrease in the incidence of diarrhea. Previous researchers [48,56] gave oregano oil to calves and obtained a lower incidence of diarrhea; there was less use of antibiotics in a group of animals that were consuming essential oil [56]. Ritt et al. [57] concluded that an oregano extract with 80% carvacrol positively affected the intestinal and ruminal bacterial population, decreasing the abundance of the pathogenic bacteria *Streptococcus*, *Clostridium*, and *Escherichia*, unlike in the present study, where no difference was obtained for *Clostridium* and *Escherichia* between treatments. The difference between the doses offered may explain this since, in the present study, the amount used was low compared with the literature values. The proportion of the three essential oils was the same, which could also have been a problem since oregano essential oil is the most cited antimicrobial, and a higher proportion of it would make a significant difference to the antimicrobial effects of the primary pathogens that cause diarrhea.

Cinnamon, oregano, and eucalyptus oils also improve immune and antioxidant systems. Like in our study, the authors of [58] obtained a better immune response, with higher values of IgM, IgG, and IgA, when feeding calves with an essential oil also containing probiotics (carvacrol, caryophyllene, p-cymide, cineol, terpinene, and thymol). Al-Suwaiegh et al. [59] achieved higher levels of total protein and globulin, in addition to positive results in cows' milk production with the supply of a mixture of clove, oregano, and juniper oils. IgA is an antibody predominantly produced on mucosal surfaces and indicates intestinal immunity [60] because it coats pathogenic microorganisms, protecting the host against infection [61]. However, the function of IgA is to act on the integrity of the intestinal barrier, enhancing pro-inflammatory immune responses and effectively contributing to intestinal homeostasis [60]. This fact demonstrates that the animals in the phytobiotic group had greater intestinal protection, probably due to the blend of oils, avoiding the incidence of diarrhea and diseases caused by pathogens and enhancing the immune responses.

Acute-phase proteins such as ceruloplasmin, haptoglobin, and transferrin are produced by the liver [62,63]; they were detected in lower concentrations in the phytobiotic group at some times during the experimental period. The response of these proteins is a nonspecific reaction that occurs shortly after the damage caused by the pathogen [63]. Furthermore, their concentrations indicate the intensity of the inflammatory response in the body [63], which may have been lower in the phytobiotic group in the present study due to the known anti-inflammatory effects of essential oils. Erkiliç et al. [64] showed that neonatal calves that show clinical signs of diarrhea, the absence of a sucking reflex, dehydration, cold extremities, lateral recumbency, and an inability to stand have higher serum levels of ceruloplasmin, showing that high levels indicate that the animal is not in good health. Saleh et al. [65] showed that calves with diarrhea had increased levels of ceruloplasmin (which was expected) as it is an inflammatory response. For the present study, we believe in an anti-inflammatory effect caused by the blend of essential oils since transferrin and ceruloplasmin are markers of inflammatory intensity. Higher levels of IgA [66] lower levels of leukocytes [67], and lower acute-phase proteins [68] in the phytobiotic group indicated that the calves had improved immune systems and overall health; however, we cannot rule out other mechanisms involved and related to the changes.

Lower levels of leukocytes and lymphocytes have been detected in lambs supplemented with essential oil containing carvacrol, thymol, and cinnamaldehyde [69], as in the present experiment. This finding can be explained by the antimicrobial action of oils [69] because oils change the permeability of the bacteria membrane [70]. The action of oils minimizes energy expenditure during inflammatory responses and directs this energy toward growth [71], associated with better feed efficiency. The blend of essential oils provided the animals with antioxidant mechanisms since the lipid peroxidation in the phytobiotic group was lower than that of the control group. This finding was due to a higher activity of GST, which inhibits oxidative reactions [72].

The nine bacterial genera detected in the feces of calves in our experiment, both control and treatment, were *Acinetobacter*, *Alloprevotella*, *Bacteroides*, *Collinsella*, *Fusobacterium*, *Megasphaera*, *Prevotella*, *Pseudomonas*, and *Psychrobacter*; among them, *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, and *Psychrobacter* were the most abundant. *Acinetobacter* has animals as one of its natural habitats as it has high resistance to antimicrobials and the environment, with the species of *A. baumannii* being the most significant of its kind in animals [73]. This bacterium can cause infections of different types, including in soft tissues such as the intestine, also causing symptoms of pneumonia [74], a common disease in calves. In the distribution of calves by experimental period, *Acinetobacter* levels increased significantly on days 35 and 60, which can be explained by the fact that it belongs to the normal intestinal microbiota in calves, and its growth occurs as the microbiota is established.

Pseudomonas, by contrast, lives in different environments using animal tissues as a substrate, also having substantial resistance to antimicrobials [75–78]. It is a bacterium associated with meat deterioration and rarely associated with animal health [77,78]. *P. aeruginosa* is the most important in animals because it is not a constituent of the normal

intestinal microbiota [76,77], and the lower abundance of this genus throughout the day can be considered beneficial for the health of our calves. *Psychrobacter* is also an opportunistic pathogen [79]. Rama et al. [80] identified *Psychrobacter* as one of the most abundant genera in the intestinal microbiota of healthy broilers, whether in conventional systems or systems without antibiotics. As they are opportunistic, the presence of these three genera, as already mentioned, will only cause damage to the animal's health when immunosuppressed.

When we analyze the distribution of the nine genera within each experimental period (days 0, 35, and 60), we notice a fluctuation in the bacterial population as the animal aged and the microorganisms became established. In addition to *Acinetobacter*, the genus *Bacteroides* was practically non-existent on day zero but was evident throughout the experimental period. However, more emphasis was needed when evaluating only the treatment. This genus is also part of the normal intestinal microbiota. However, *B. fragilis* is clinically significant [77,81] as it produces an enterotoxin that causes diarrhea in calves [82]. The pathogenic potential of *B. fragilis* is similar to that of *E. coli* [83], which is one of the main microorganisms that causes diarrhea in calves and is related to a high mortality rate [81]. However, many *Bacteroides* sp. produce enzymes such as superoxide dismutase, which acts directly on the antioxidant system [82], beneficial to the animal's body when it is not immunosuppressed.

Another genus found was *Fusobacterium*, which remained regular during the experimental period and without difference between groups. *F. necrophorum* is one of the most prevalent Fusobacteria, a typical gastrointestinal microorganism [84]. The genus *Megamonas* can be associated with healthy individuals [85] and is related to producing beneficial substances and reducing pathogenic bacteria abundance [20,86].

The genus *Alloprevotella* became evident only after 60 days of the experiment, being a group of beneficial bacteria since they can produce short-chain fatty acids [87], allowing them to be associated with improved performance of the animal [88]. The literature suggests that the *Alloprevotella* genus acts as an intestinal barrier stimulator, reducing the numbers of pathogenic organisms through competition and the need for antibiotics [89,90]. According to the literature, the genera *Prevotella*, *Bacteroides*, and *Fusobacterium* can be found in greater abundance from the 15th day of life in calves, when solid intake is increasing [91], which explains the greater presence of these genera in feces collected on days 35 and 60.

No difference was observed between treatments in the population abundances of *E. coli* and *Clostridium* spp. *E. coli* is the primary bacterium causing calf diarrhea [92,93], but its presence does not mean that the animal will be sick since its pathogenicity depends on two virulence factors that need to be present [92]; therefore, the bacteria is a constituent of the normal microbiota. *Clostridium* is another bacteria responsible for causing diarrhea in calves, primarily *C. perfringens*; however, it is less common and is found in the microbiota in healthy animals [93]. The presence of these two bacteria throughout the experiment did not significantly harm health as they were immunologically protected, as observed in the results of immunological biomarkers such as the number of leukocytes and immunoglobulin concentration. Furthermore, the mean fecal scores were 1.80 and 1.87 in the control and phytobiotic groups, respectively, and Figure S2 shows the distribution of the fecal score every two weeks. Even with incidences of diarrhea that required clinical interventions, the fecal score values were low since 1 and 2 indicate normal feces, which shows that, in general, the animals demonstrated adequate intestinal conditions most of the time.

Diarrhea in calves is very economically damaging to the dairy industry as calves will require treatment with antimicrobials and other drugs. These animals will be sensitive throughout their lives, which can lead to reproductive problems and low milk production depending on the degree and frequency of diarrhea [94]. In addition, diseases associated with diarrhea in calves are responsible for causing more than 50% mortality due to the other clinical signs that occur together [95]. Although the essential oils studied in this study have proven antimicrobial properties, this was not observed in our study. It is believed that this occurred because the animals were in a controlled environment, with proper and routine handling and sanitization, which may have had an impact on these results, since

one hypothesis is that if the animals were in a sanitary challenge, the antimicrobial effects of the essential oils could have been observed as possible modulators of the intestinal microbiota, reducing the bacterial load of the microorganisms that cause diarrhea.

5. Conclusions

The conclusion of this study must be made with caution because the results indicated that the supply of a blend of essential oils with cinnamon, oregano, and eucalyptus provided the calves with humoral and antioxidant immune system stimulation, minimizing physiological oxidative stress and better efficiency. However, this health improvement did not enhance the growth of calves that consumed essential oils. The assessments of the abundance and biodiversity of the microbiota did not differ between animals that consumed the blend of essential oils and those that did not; however, it allowed the identification of the main genera in the feces of calves in the first weeks of age. Despite this, in this study, the essential oils did not play an antimicrobial role, in line with the reports already found in the literature.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/ani14243555/s1>, Table S1: Clinical interventions during the experiment; Figure S1: Fecal score of calves fed essential oils blend diluted in milk (d1–60) and follow-up after weaning (d61–75); Figure S2: Illustration of the evolution of calves' body weight; Figure S3: Relative abundance of phyla by groups in the feces of calves fed essential oils (phytobiotic) and control group (without essential oils); Figure S4: Alpha diversity considering the groups and the collection time (d35 and d60) of calves that consumed essential oils (phytobiotic group) compared to the control (without additive). Statistical difference ($p < 0.05$) was illustrated by different letters (a,b) in the graph, above the bar; Figure S5: Beta-diversity considering the groups and the collection time (d35 and d60) of calves that consumed essential oils (phytobiotic group) compared to the control (without additive).

Author Contributions: L.N. and A.S.d.S. contributed to the design and implementation of the research and to the analysis of the results. M.M.B. and V.M.M. helped in the elaboration of the project and its execution and financing. C.M., L.N., G.L.D., M.H.S. and A.L.M. participated in the execution of the experiment and collection of samples and data. B.F.B. and P.M.C. performed the laboratory analysis. All authors discussed the results and contributed to the final manuscript. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Institutional Review Board Statement: According to the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), the research project was approved by the Ethics Committee on Animal Use of the University of Santa Catarina State (CEUA/UDESC) with protocol number 2322230522.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Data remain with the authors but may be made available upon request.

Acknowledgments: We would like to thank UDESC, FAPESC, CNPq, CAPES, and TECPHY for their technical support.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest.

References

1. Food and Agriculture Organization (FAO). Crop and Livestock Products. Rome, Italy. 2023. Available online: <https://www.fao.org/family-farming/detail/en/c/289563/> (accessed on 2 December 2024).
2. Chase, C.C.L.; Hurley, D.J.; Reber, A.J. Neonatal immune development in the calf and its impact on vaccine response. *Vet. Clin. N. Am. Food Anim. Pract.* **2008**, *24*, 87–104. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Cho, Y.; Yoon, K. An overview of calf diarrhea—Infectious etiology, diagnosis, and intervention. *J. Vet. Sci.* **2014**, *15*, 1–17. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Zhao, W.; Choi, C.Y.; Li, G.; Li, H.; Shi, Z. Pre-weaned dairy calf management practices, morbidity and mortality of bovine respiratory disease and diarrhea in China. *Livest. Sci.* **2020**, *251*, 104608. [[CrossRef](#)]

5. Maynard, C.L.; Elson, C.O.; Hatton, R.D.; Weaver, A.T. Reciprocal interactions of the intestinal microbiota and immune system. *Nature* **2012**, *489*, 231–241. [CrossRef] [PubMed]
6. Maele, S.J.; Chaucheyras-Durand, F.; Berends, H.; Guan, L.L.; Steele, M.A. From pre-to postweaning: Transformation of the young calf's gastrointestinal tract. *J. Dairy Sci.* **2017**, *100*, 5984–5995. [CrossRef] [PubMed]
7. Alipour, M.J.; Jalanka, J.; Pessa-Morikawa, T.; Kokkonen, T.; Satokari, R.; Hynonen, U.; Iivanainen, A.; Niku, M. The composition of the perinatal intestinal microbiota in cattle. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 10437. [CrossRef]
8. Kodithuwakku, K.A.H.T.; Owada, H.; Miura, H.; Maruyama, D.; Hirano, K.; Suzuki, Y.; Kobayashi, Y.; Koike, S. Effects of oral administration of timothy hay and psyllium on the growth performance and fecal microbiota of preweaning calves. *J. Dairy Sci.* **2021**, *104*, 12472–12485. [CrossRef]
9. Bischoff, S.C. Gut health: A new objective in medicine? *BMC Med.* **2011**, *9*, 24. [CrossRef]
10. Bento, M.H.L.; Ouwehand, A.C.; Tiihonen, K.; Lahtinen, S.; Nurminen, P.; Saarinen, M.T.; Schulze, H.; Mygind, T.; Fischer, J. Essential oils and their use in animal feeds for monogastric animals—Effects on feed quality, gut microbiota, growth performance and food safety: A review. *Vet. Med.* **2013**, *58*, 449–458. [CrossRef]
11. 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. *Appl. Environ. Microbiol.* **2018**, *85*, e02141–18. [CrossRef]
12. Cui, H.; Zhang, C.; Li, C.; Lin, L. Antibacterial mechanism of oregano essential oil. *Ind. Crops Prod.* **2019**, *139*, 111498. [CrossRef]
13. Calsamiglia, S.; Busquet, M.; Cardozo, P.W.; Castillejos, L.; Farret, A. Invited Review: Essential oils as modifiers of rumen microbial fermentation. *J. Dairy Sci.* **2007**, *90*, 2580–2595. [CrossRef] [PubMed]
14. Chapman, C.; Cabral, R.G.; Aragona, K.M.; Erickson, P.S. Short communication: Cinnamaldehyde taste preferences of weaned dairy heifers. *J. Dairy Sci.* **2016**, *99*, 3607–3611. [CrossRef] [PubMed]
15. Vakili, A.R.; Khorrami, B.; Mesgaran, M.D.; Parand, E. The Effects of Thyme and Cinnamon Essential Oils on Performance, Rumen Fermentation and Blood Metabolites in Holstein Calves Consuming High Concentrate Diet. *J. Anim. Sci.* **2013**, *26*, 935–944. [CrossRef] [PubMed]
16. Haddi, K.; Faroni, L.R.A.; Oliveira, E. Cinnamon Oil. In *Green Pesticides Handbook: Essential Oils for Pest Control*; Nollet, L.M.L., Rathore, H.S., Eds.; CRC Press: Boca Raton, FL, USA, 2017; pp. 117–150.
17. Leyva-López, N.; Gutiérrez-Grijalva, E.P.; Vazquez-Olivo, G.; Heredia, J.B. Essential oils of oregano: Biological activity beyond their antimicrobial properties. *Molecules* **2017**, *22*, 989. [CrossRef]
18. Dhakad, A.K.; Pandey, V.V.; Beg, S.; Rawat, J.M.; Singh, A. Biological, medicinal and toxicological significance of *Eucalyptus* leaf essential oil: A review. *J. Sci. Food Agric.* **2017**, *98*, 833–848. [CrossRef]
19. Shreaz, S.; Wani, W.A.; Behbehani, J.M.; Raja, V.; Irshad, M.; Karched, M.; Ali, I.; Siddiqi, W.A.; Hun, L.T. Cinnamaldehyde and its derivatives, a novel class of antifungal agents. *Fitoterapia* **2016**, *112*, 116–131. [CrossRef]
20. Wu, J.; Bai, Y.; Lang, X.; Wang, C.; Shi, X.; Casper, D.P.; Zhang, L.; Liu, H.; Liu, T.; Gong, X.; et al. Dietary supplementation with oregano essential oil and monensin in combination is antagonistic to growth performance of yearling Holstein bulls. *J. Dairy Sci.* **2020**, *103*, 8119–8129. [CrossRef]
21. Kumar, P.; Mishra, S.; Malik, A.; Satya, S. Compositional analysis and insecticidal activity of *Eucalyptus globulus* (family: Myrtaceae) essential oil against housefly (*Musca domestica*). *Acta Trop.* **2012**, *122*, 212–218. [CrossRef]
22. Baptista-Silva, S.; Borges, S.; Ramos, O.L.; Pintado, M.; Sarmiento, B. The progress of essential oils as potential therapeutic agents: A review. *J. Essent. Oil Res.* **2020**, *32*, 279–295. [CrossRef]
23. Caldas, G.F.R.; Oliveira, A.R.S.; Araújo, A.V.; Lafayette, S.S.L.; Albuquerque, G.S.; Silva-Neto, J.C.; Costa-Silva, J.H.; Ferreira, F.; Da Costa, J.G.M.; Wanderley, A.G. Gastroprotective Mechanisms of the Monoterpene 1,8-Cineole (eucalyptol). *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0134558. [CrossRef]
24. Abo-Donia, F.M.; Mahgoub, A.; Deraz, T.; Nayel, U.A. The effect of using eucalyptus oil, leaves, and seed Capsules as supplement in diets on lactating Egyptian Buffalo productivity and methane production. *Egypt. J. Nutr. Feed.* **2021**, *24*, 223–235. [CrossRef]
25. Luo, Z.; Liu, T.; Cairang, D.; Cheng, S.; Hu, J.; Shi, B.; Zhu, H.; Chen, H.; Zhang, T.; Yi, X. Oregano essential oil as a natural plant additive affects growth performance and serum antibody levels by regulation the rumen microbiota of calves. *Animals* **2024**, *14*, 820. [CrossRef] [PubMed]
26. Nehme, R.; Andrés, S.; Pereira, R.B.; Ben Jemaa, M.; Bouhallab, S.; Ceciliani, F.; López, S.; Rahali, F.Z.; Ksouri, R.; Pereira, D.M.; et al. Essential Oils in Livestock: From Health to Food Quality. *Antioxidants* **2021**, *10*, 330. [CrossRef] [PubMed]
27. Bednar, G.E.; Murray, S.M.; Patil, A.R.; Flickinger, E.A.; Merchen, N.R.; Fahey, G.C. Selected animal and plant protein sources affect nutrient digestibility and fecal characteristics of ileally cannulated dogs. *Arch. Für Tierernährung* **2020**, *53*, 127–140. [CrossRef]
28. Fagliari, J.J.; Santana, A.E.; Lucas, F.A.; Campos, E.; Curi, P.R. Constituintes sanguíneos de bovinos recém-nascidos das raças Nelore (*Bos indicus*) e Holandesa (*Bos taurus*) e de bubalinos (*Bubalus bubalis*) da raça Murrah. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* **1998**, *50*, 253–262. Available online: <http://hdl.handle.net/11449/36109> (accessed on 25 January 2018).
29. Tomasi, T.; Volpato, A.; Pereira, W.A.B.; Debastiani, L.H.; Bottari, N.B.; Morsch, V.M.; Schetinger, M.R.C.; Leal, M.L.R.; Machado, G.; Da Silva, A.S. Metaphylactic effect of minerals on the immune response, biochemical variables and antioxidant status of newborn calves. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* **2018**, *102*, 819–824. [CrossRef]
30. Jentsch, A.M.; Bachmann, H.; Fürst, P.; Biesalski, H.K. Improved analysis of malondialdehyde in human body fluids. *Free Radic. Biol. Med.* **1996**, *20*, 251–256. [CrossRef]

31. Ellman, G.L. Tissue sulfhydryl groups. *Arch. Biochem. Biophys.* **1959**, *82*, 70–77. [\[CrossRef\]](#)
32. Habig, W.H.; Pabst, M.J.; Jakoby, W.B. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* **1974**, *249*, 7130–7139. [\[CrossRef\]](#)
33. Hjelmsø, M.H.; Hansen, L.H.; Balum, J.; Feld, L.; Holben, W.E.; Jacobsen, C.S. High-resolution melt analysis for rapid comparison of bacterial community compositions. *Appl. Environ. Microbiol.* **2014**, *80*, 3568–3575. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
34. Schloss, P.D.; Westcott, S.L.; Ryabin, T.; Hall, J.R.; Hartmann, M.; Hollister, E.B.; Lesniewski, R.A.; Oakley, B.B.; Parks, D.H.; Robinson, C.J.; et al. Introducing mothur: Open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol.* **2009**, *75*, 7537–7541. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
35. Kozich, J.J.; Westcott, S.L.; Baxter, N.T.; Highlander, S.K.; Schloss, P.D. Development of a dual-index sequencing strategy and curation pipeline for analyzing amplicon sequence data on the MiSeq Illumina sequencing platform. *Appl. Environ. Microbiol.* **2013**, *79*, 5112–5120. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
36. Quast, C.; Pruesse, E.; Yilmaz, P.; Gerken, J.; Schweer, T.; Yarza, P.; Peplies, J.; Glöckner, F.O. The SILVA ribosomal RNA gene database project: Improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res.* **2013**, *41*, 590–596. [\[CrossRef\]](#)
37. McMurdie, P.J.; Holmes, S. Phyloseq: An R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e61217. [\[CrossRef\]](#)
38. Morris, E.K.; Caruso, T.; Buscot, F.; Fischer, M.; Hancock, C.; Maier, T.S.; Meiners, T.; Müller, C.; Obermaier, E.; Prati, D.; et al. Choosing and using diversity indices: Insights for ecological applications from the German Biodiversity Exploratories. *Ecol. Evol.* **2014**, *4*, 3514–3524. [\[CrossRef\]](#)
39. Xia, Y.; Sun, J.; Chen, D. Community diversity measures and calculations. In *Statistical Analysis of Microbiome Data with R*; Springer: Singapore, 2018; pp. 167–190.
40. Qian, X.B.; Chen, T.; Xu, Y.P.; Chen, L.; Sun, F.X.; Lu, M.P.; Liu, Y.X. A guide to human microbiome research: Study design, sample collection, and bioinformatics analysis. *Chin. Med. J. (Engl.)* **2020**, *133*, 1844–1855. [\[CrossRef\]](#)
41. Schloss, P.D. Rarefaction is currently the best approach to control for uneven sequencing effort in amplicon sequence analyses. *mSphere* **2024**, *9*, e00354-23. [\[CrossRef\]](#)
42. Anderson, M.J. A new method for non-parametric multivariate analysis of variance. *Austral Ecol.* **2001**, *26*, 32–46. [\[CrossRef\]](#)
43. Songer, J.G.; Anderson, M.A. *Clostridium difficile*: An important pathogen of food animals. *Anaerobe* **2006**, *12*, 1–4. [\[CrossRef\]](#)
44. Wickham, H. *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*; Springer: New York, NY, USA, 2016.
45. Bowman, J.P. The genus *Psychrobacter*. In *The Prokaryotes: A Handbook on the Biology of Bacteria. Proteobacteria: Gamma Subclass*; Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.H., Stackebrandt, E., Eds.; Springer: New York, NY, USA, 2006; Volume 6, pp. 920–930.
46. Van der Kolk, J.H.; Endimiani, A.; Graubner, C.; Gerber, V.; Perreten, V. *Acinetobacter* in veterinary medicine, with an emphasis on *Acinetobacter baumannii*. *J. Glob. Antimicrob. Resist.* **2019**, *16*, 59–71. [\[CrossRef\]](#)
47. National Research Council (NRC). *Nutrients Requirements of Dairy Cattle*, 7th ed.; National Academy of Science: Washington, DC, USA, 2001; 408p.
48. Tapiki, I.; Ozalpaydin, H.B.; Tapiki, N.; Aslan, M.; Selvi, M.H. Effects of oregano essential oil on reduction of weaning age and increasing economic efficiency in holstein friesian calves. *Pak. J. Zool.* **2020**, *52*, 745–752. [\[CrossRef\]](#)
49. Silva, R.B.; Pereira, M.N.; De Araujo, R.C.; Silva, W.R.; Pereira, R.A.N. A blend essential oils improved feed efficiency and affected ruminal and systemic variables of dairy cows. *Transl. Anim. Sci.* **2020**, *4*, 182–193. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
50. Farshid, S.; Alireza, V.; Mohsen, D.M. Effects of dome plant essential oils and probiotic (protexin) on performance, nutrient digestibility and blood metabolites of Holstein dairy calves. *Iran. J. Anim. Sci. Res.* **2021**, *13*, 161–173. [\[CrossRef\]](#)
51. McIntosh, F.M.; Williams, P.; Losa, R.; Wallace, R.J.; Beever, D.A.; Newbold, C.J. Effects of Essential Oils on Ruminal Microorganisms and Their Protein Metabolism. *Appl. Environ. Microbiol.* **2003**, *69*, 5011–5014. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
52. Stellard, F. From Dietary Cholesterol to Blood Cholesterol, Physiological Lipid Fluxes, and Cholesterol Homeostasis. *Nutrients* **2022**, *14*, 1643. [\[CrossRef\]](#)
53. Mcnamara, D.J.; Kolb, R.; Parker, T.S.; Batwin, H.; Samuel, P.; Brown, C.D.; Ahrens, E.H., Jr. Heterogeneity of cholesterol homeostasis in man. Response to changes in dietary fat quality and cholesterol quantity. *J. Clin. Investig.* **1987**, *79*, 1729–1739. [\[CrossRef\]](#)
54. Nora, L.; Giacomelli, C.M.; Deolindo, G.L.; Molosse, V.L.; Copetti, P.M.; Bissacotti, B.F.; Morsch, V.M.; Da Silva, A.S. Inclusion of essential oils in a calf milk replacer and their effects on growth performance and the immune and oxidative systems. *Comp. Clin. Pathol.* **2024**, *33*, 327–335. [\[CrossRef\]](#)
55. Wilms, J.N.; Van Der Nat, V.; Ghaffari, M.H.; Steele, M.A.; Sauerwein, H.; Martín-Tereso, J.; Leal, L.N. Fat composition of milk replacer influences growth performance, feeding behavior, and plasma fatty acid profile in ad libitum-fed calves. *J. Dairy Sci.* **2024**, *107*, 2797–2817. [\[CrossRef\]](#)
56. Katsoulos, P.D.; Karatzia, M.A.; Dovas, C.I.; Filioussis, G.; Papadopoulos, E.; Kiossis, E.; Arsenopoulos, K.; Papadopoulos, T.; Boscios, C.; Karatzias, H. Evaluation of the in-field efficacy of oregano essential oil administration on the control of neonatal diarrhea syndrome in calves. *Res. Vet. Sci.* **2017**, *115*, 478–483. [\[CrossRef\]](#)
57. Ritt, L.A.; Orso, C.; Silveira, A.K.; Frazzon, J.; de Vargas, D.P.; Wagner, R.; de Oliveira, F.C.; Nornberg, J.L.; Fischer, V. Oregano extract fed to pre-weaned dairy calves. Part 1: Effects on intake, digestibility, body weight, and rumen and intestinal bacteria microbiota. *Livest. Sci.* **2023**, *269*, 105165. [\[CrossRef\]](#)

58. Liu, T.; Chen, H.; Bai, Y.; Wu, J.; Cheng, S.; He, B.; Casper, D.P. Calf starter containing a blend of essential oils and prebiotics affects the growth performance of Holstein calves. *J. Dairy Sci.* **2020**, *103*, 2315–2323. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
59. Al-Suwaiegh, S.B.; Morshedy, S.A.; Mansour, A.T.; Ahmed, M.H.; Zahran, S.M.; Alnemr, T.M.; Sallam, S.M.A. Effect of an Essential Oil Blend on Dairy Cow Performance during Treatment and Post-Treatment Periods. *Sustainability* **2020**, *12*, 9123. [\[CrossRef\]](#)
60. Pabst, O. New concepts in the generation and functions of IgA. *Nat. Rev. Immunol.* **2012**, *12*, 821–832. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
61. Palm, N.W.; Zoete, M.R.; Cullen, T.W.; Barry, N.A.; Stefanowski, J.; Hao, L.; Degman, P.H.; Hu, J.; Peter, I.; Zhang, W.; et al. Immunoglobulin A coating identifies colitogenic bacteria in inflammatory bowel disease. *Cell* **2014**, *158*, 1000–1010. [\[CrossRef\]](#)
62. Rocha, T.G.; Silva, F.D.F.; Bortoletto, C.; Silva, D.G.; Buzinaro, M.G.; Zafalon, L.F.; Fabliari, J.J. Serum concentrations of acute phase proteins and immunoglobulins of calves with rotavirus diarrhea. *Vet. Med.* **2016**, *68*, 865–872. [\[CrossRef\]](#)
63. Bozuklunah, K.; Merhan, O.; Ogun, M.; Kut, B.; Cihan, M.; Erkilic, E.E.; Gokce, G.; Aydin, U.; Ozcan, A. Investigation of haptoglobin, serum amyloid A, and some biochemical parameters in calves with omphalitis. *Vet. World* **2018**, *11*, 1055–1058. [\[CrossRef\]](#)
64. Erkilic, E.; Merhan, O.; Kirmizigul, A.H.; Ogun, M.; Akyuz, E.; Çitil, M. Salivary and serum levels of serum amyloid A, haptoglobin, ceruloplasmin and albumins in neonatal calves with diarrhea. *Kafkas Univ. Vet. Fak. Derg.* **2019**, *25*, 583–586.
65. Saleh, N.; Allam, T.; Nayel, M.; Ahmed, R. Molecular investigation of calf diarrhea in relation to changes in some immunological profiles. *J. Curr. Vet. Res.* **2022**, *4*, 69–79. [\[CrossRef\]](#)
66. de Sousa-Pereira, P.; Woof, J.M. IgA: Structure, Function, and Developability. *Antibodies* **2019**, *8*, 57. [\[CrossRef\]](#)
67. Campolina, J.P.; Coelho, S.G.; Belli, A.L.; Neves, L.F.M.; Machado, F.S.; Pereira, L.G.R.; Tomich, T.R.; Carvalho, W.A.; Daibert, R.M.P.; Reis, D.R.L.; et al. Potential benefits of a blend of essential oils on metabolism, digestibility, organ development and gene expression of dairy calves. *Sci. Rep.* **2023**, *13*, 3378. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
68. Jain, S.; Gautam, V.; Naseem, S. Acute-phase proteins: As diagnostic tool. *J. Pharm. Bioallied Sci.* **2011**, *3*, 118–127. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
69. Favaretto, J.A.; Alba, D.F.; Marchiori, M.S.; Marcon, H.J.; Souza, C.F.; Badissera, M.D.; Bianchi, A.E.; Zanluchi, M.; Klein, B.; Wagner, R.; et al. Supplementation with a blend based on micro-encapsulated carvacrol, thymol, and cinnamaldehyde in lambs feed inhibits immune cells and improves growth performance. *Livest. Sci.* **2020**, *240*, 104144. [\[CrossRef\]](#)
70. Dorman, H.J.; Deans, S.G. Antimicrobial agents from plants: Antibacterial activity of plant volatile oils. *J. Appl. Microbiol.* **2000**, *88*, 308–314. [\[CrossRef\]](#)
71. Molosse, V.L.; Deolindo, G.L.; Glombosky, P.; Pereira, W.A.B.; Carvalho, R.A.; Zotti, C.A.; Solivo, G.; Vedovto, M.; Fracasso, M.; Silva, A.D.; et al. Curcumin or microencapsulated phytogetic blend to replace ionophore and non-ionophore antibiotics in weaned calves: Effects on growth performance and health. *Livest. Sci.* **2022**, *263*, 105029. [\[CrossRef\]](#)
72. Brunetto, A.L.R.; Giacomelli, C.M.; Favero, J.F.; Bissacotti, B.F.; Copeti, P.M.; Morsch, V.M.; Oliveira, F.C.; Wagner, R.; Alves, R.; Pereira, W.A.B.; et al. Phytogetic blend in the diet of growing Holstein steers: Effects on performance, digestibility, rumen volatile fatty acid profile, and immune and antioxidant responses. *Anim. Feed Sci. Technol.* **2023**, *297*, 115595. [\[CrossRef\]](#)
73. Doughari, H.J.; Ndakidemi, P.A.; Human, I.S.; Benade, S. The ecology, biology and pathogenesis of *Acinetobacter* spp.: An Overview. *Microbes Environ.* **2011**, *26*, 101–112. [\[CrossRef\]](#)
74. Hou, S.; Wu, H.; Chen, S.; Li, X.; Zhang, Z.; Cheng, Y.; Chen, Y.; He, M.; An, Q.; Man, C.; et al. Bovine skin fibroblast mediated immune responses to defend against bovine *Acinetobacter baumannii* infection. *Microb. Pathog.* **2022**, *173*, 105806. [\[CrossRef\]](#)
75. Rojo, F. Carbon catabolite repression in *Pseudomonas*: Optimizing metabolic versatility and interactions with the environment. *FEMS Microbiol. Rev.* **2010**, *34*, 658–684. [\[CrossRef\]](#)
76. Winsor, G.L.; Griffiths, E.J.; Lo, R.; Dhillon, B.K.; Shay, J.A.; Brinkman, F.S.L. Enhanced annotations and features for comparing thousands of *Pseudomonas* genomes in the *Pseudomonas* genome database. *Nucleic Acid Res.* **2016**, *44*, 646–653. [\[CrossRef\]](#)
77. Mcvey, S.; Kennedy, M.; Chengappa, M.M. *Microbiologia Veterinária*, 3rd ed.; Editora Guanabara Koogan Ltda.: Rio de Janeiro, Brazil, 2016; ISBN 9788527728263.
78. Zarei, M.; Rahimi, S.; Fazlara, A.; Anvari, S.E. High biofilm-forming *Pseudomonas* strains isolated from poultry slaughterhouse surfaces: Their importance in the persistence of *Salmonella enteritidis* in slaughterhouses. *Int. J. Food Microbiol.* **2023**, *390*, 110126. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
79. García-López, M.L.; Maradona, M.P. *Psychrobacter*. In *Encyclopedia of Food Microbiology*; Elsevier: Oxford, UK, 1999; pp. 1875–1882.
80. Rama, E.N.; Bailey, M.; Kumar, S.; Leone, C.; Den Bakker, H.C.; Thippareddi, H.; Singh, M. Characterizing the gut microbiome of broilers raised under conventional and no antibiotics ever practices. *Poult. Sci.* **2023**, *102*, 102832. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
81. Cao, H.; Liu, M.C.J.; Tong, M.K.; Jiang, S.; Lau, A.; Chow, K.H.; Tse, C.W.S.; Ho, P.L. Diversity of genomic clusters and CfiA/cfiA alleles in *Bacteroides fragilis* isolates from human and animals. *Anaerobe* **2022**, *75*, 102567. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
82. Knoop, F.C. *Bacteroides* Infections. In *Reference Module in Biomedical Sciences*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2014. [\[CrossRef\]](#)
83. Sears, C.L. The toxins of *Bacteroides fragilis*. *Toxicon* **2001**, *39*, 1737–1749. [\[CrossRef\]](#)
84. Nagajara, T.G.; Narayanan, S.K.; Stewart, G.C.; Chengappa, M.M. *Fusobacterium necrophorum* infections in animals: Pathogenesis and pathogenic mechanisms. *Anaerobe* **2005**, *11*, 239–246. [\[CrossRef\]](#)
85. Suchodolski, J.S.; Foster, M.L.; Sohail, M.U.; Leutenegger, C.; Queen, E.V.; Steiner, J.M.; Maki, S.L. The fecal microbiome in cats with diarrhea. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0127378. [\[CrossRef\]](#)

86. Chevrot, R.; Carlotti, A.; Sopena, V.; Marchand, P.; Rosendeld, R. *Megamonas rupellensis* sp. Nov., an anaerobe isolated from the caecum of a duck. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2008**, *58*, 2921–2924. [[CrossRef](#)]
87. Cao, Z.; Liu, Z.; Zhang, N.; Bao, C.; Li, X.; Liu, M.; Yuan, W.; Wu, H.; Shang, H. Effects of dietary dandelion (*Taraxacum mongolicum* Hand.-Mazz.) polysaccharides on the performance and gut microbiota of laying hens. *Int. J. Biol. Macromol.* **2023**, *240*, 124422. [[CrossRef](#)]
88. Virginio Junior, G.F.; Reais, M.E.; Da Silva, A.P.; De Toletto, A.F.; Cezar, A.M.; Mendes, L.W.; Freco, L.; Montenegro, H.; Coutinho, L.L.; Bittar, C.M.M. Does algae β -glucan affect the fecal bacteriome in dairy calves? *PLoS ONE* **2021**, *16*, e0258069. [[CrossRef](#)]
89. Fan, Y.; Chen, Q.; Zhang, B.; Chen, Z.; Huang, Q.; Xu, H.; Ren, J.; Zhang, X. Effect of multidonor intensive fecal microbiota transplantation by capsules for active uncreative colitis: A prospective trial. *Gut* **2019**, *68*, 109–110. [[CrossRef](#)]
90. Rolinec, M.; Medo, J.; Gábor, M.; Miluchová, M.; Bíro, D.; Simko, M.; Juráček, M.; Hanusovsky, O.; Schubertová, Z.; Gálik, B. The effect of coconut oil addition to feed of pigs on rectal microbial diversity and bacterial abundance. *Animals* **2020**, *10*, 1764. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
91. Enjalbert, M.R.; Combes, S.; Cauquil, L.; Bouchez, O.; Monteil, C. Establishment of ruminal bacterial community in dairy calves from birth to weaning is sequential. *J. Appl. Microbiol.* **2014**, *116*, 245–257. [[CrossRef](#)]
92. Foster, D.M.; Smith, G.W. Pathophysiology of diarrhea in calves. *Vet. Clin. N. Am. Food Anim. Pract.* **2009**, *25*, 13–36. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
93. Gull, T. Bacterial causes of intestinal disease in dairy calves: Acceptable control measures. *Vet. Clin. N. Am. Food Anim. Pract.* **2022**, *38*, 107–119. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
94. Shi, Z.; Wang, Y.; Yan, X.; Ma, X.; Duan, A.; Hassan, F.; Wang, W.; Deng, T. Metagenomic and metabolomic analyses reveal the role of gut microbiome-associated metabolites in diarrhea calves. *Vet. Microbiol.* **2023**, *8*, e00582-23. [[CrossRef](#)]
95. Fu, Z.L.; Yang, Y.; Ma, M.; Malmuthuge, N.; Guan, L.L.; Bu, D.P. Dynamics of oxidative stress and immune responses in neonatal calves during diarrhea. *J. Dairy Sci.* **2024**, *107*, 1286–1298. [[CrossRef](#)]

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.



Article

Intake of Condensed Tannins (*Acacia mearnsii*) by Lambs in Confinement and Its Impact on Growth Performance, Rumen Environment, and Meat

Andrei L. R. Brunetto ¹, Ana Luiza F. dos Santos ¹, Isadora Zago ¹, Guilherme L. Deolino ², Luisa Nora ², Vitor L. Molosse ¹, Rafael V. P. Lago ¹, Aline de C. Machado ³, Roger Wagner ³, Jelson N. Nauderer ⁴, Bianca F. Bissacotti ⁴, Aniela P. Kempka ², Bruna Klein ⁵ and Aleksandro S. Da Silva ^{1,2,4,5,*}

¹ Graduate Program in Animal Science, Universidade Estadual de Santa Catarina (UDESC), Chapecó 89815-630, Brazil; andreibrunetto03@gmail.com (A.L.R.B.); ana.santos1@edu.udesc.br (A.L.F.d.S.); i.zago@edu.udesc.br (I.Z.); vitor.molosse@gmail.com (V.L.M.); rafael.lago@edu.udesc.br (R.V.P.L.)

² Graduate Program in Biochemistry and Molecular Biology, Universidade Estadual de Santa Catarina (UDESC), Lages 88520-000, Brazil; guilhermeluizd@outlook.com (G.L.D.); luisa.nora22@gmail.com (L.N.); aniela.kempka@udesc.br (A.P.K.)

³ Graduate Program in Food Science, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria 97105-900, Brazil; alinecassiamachado@edu.ufsm.br (A.d.C.M.); rogerwag@gmail.com (R.W.)

⁴ Graduate Program in Toxicological Biochemistry, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria 97105-900, Brazil; jelsonnauderer@gmail.com (J.N.N.); bianca_fbissacotti@hotmail.com (B.F.B.)

⁵ Department of Animal Science, Universidade Estadual de Santa Catarina (UDESC), Chapecó 89815-630, Brazil; brunaklein06@yahoo.com.br

* Correspondence: aleksandro.silva@udesc.br



Citation: Brunetto, A.L.R.; dos Santos, A.L.F.; Zago, I.; Deolino, G.L.; Nora, L.; Molosse, V.L.; Lago, R.V.P.; de C. Machado, A.; Wagner, R.; Nauderer, J.N.; et al. Intake of Condensed Tannins (*Acacia mearnsii*) by Lambs in Confinement and Its Impact on Growth Performance, Rumen Environment, and Meat. *Fermentation* **2024**, *10*, 630. <https://doi.org/10.3390/fermentation10120630>

Academic Editor: Jianxin Xiao

Received: 25 November 2024

Revised: 5 December 2024

Accepted: 8 December 2024

Published: 10 December 2024



Copyright: © 2024 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: This study determined whether adding condensed tannins to the diet of confined lamb improves performance, metabolism, health, and meat composition and quality. We used 24 Lacaune lambs with an average initial weight of 24.5 ± 0.24 kg. The animals were divided into 12 pens with two animals each. In the treatment group, a black wattle extract was added to the lamb concentrate (2.5 g/kg dry matter), while the control group received only the basal diet (without extract). Black wattle contained 98.6 g/kg of condensed tannin. There was no difference between the performance variables, which included weight gain, feed intake, and feed efficiency. However, the group fed on condensed tannins showed higher carcass yield and a higher percentage of linked intramuscular fat. In meat, a lower proportion of saturated fatty acids combined with higher concentrations of unsaturated fatty acids was observed in lambs of the condensed tannin group. The polyunsaturated fatty acids (PUFA) were no different; however, a higher PUFA/SFA ratio was observed in animals with condensed tannin intake, and a higher proportion of $\omega 6$ and $\omega 3$ was observed in the meat of these animals. The meat's protein and ash content did not differ between treatments, as did the meat's water retention capacity, color, and luminosity. Furthermore, animals that fed on condensed tannins had lower cholesterol levels and higher globulin content. The values of erythrogram variables were lower in lambs that consumed condensed tannins. More significant ruminal bacterial activity was also observed in the group receiving condensed tannins. The antioxidant effect was verified with lower thiobarbituric acid reactive species (TBARS) levels and more significant antioxidant enzyme activity. We conclude that adding condensed tannins improves carcass yield and increases the percentage of fat in the carcass, improving the fatty acid profile, which may be linked to the antioxidant effect, in addition to the health benefits of the consumer of this product.

Keywords: natural extracts; ruminants; antioxidant; fatty acids

1. Introduction

The black wattle (*Acacia mearnsii*) is native to southeastern Australia and Tasmania and has been introduced to various regions, including the Americas. Its extract has shown

great potential as a feed additive in ruminant nutrition due to polyflavonoids, phenolic compounds, amino acids, carbohydrates, and other sugars [1].

Polyphenols are phenolic components of the natural organic compounds family [2]. Tannins (condensed and hydrolysable) are secondary plant metabolites composed of phenolic substances. When added in concentrations above 5% of condensed tannins in animal total diets, these compounds can negatively impact consumption [3,4]; however, in low concentrations, they have beneficial effects such as parasite control, reduced enteric methane production, and increased flow and absorption of protein in the intestine [4–6]. These compounds also have antioxidant action on animal fluids and tissues. Among the main compounds involved, we can mention phenolic acids, flavonoids, and tannins, which act to eliminate free radicals [7,8].

Polyphenols generally act on the rumen microbiota and can affect carbohydrate fermentation, protein degradation, and lipid metabolism [9]. Among them are tannins, which include condensed tannins with a lower risk of toxicity [10], but may be more toxic to ruminants than hydrolyzable tannins [11]. These compounds form complexes with dietary protein and are less degraded in the rumen [12], resulting in greater intestinal absorption, improved utilization, and reduced nitrogen excretion. Condensed tannins (CT) can limit the ruminal biohydrogenation of unsaturated fats in the diet during digestion, promoting changes in fermentative processes and acting on groups of bacteria, causing changes in the flow of fatty acids to tissues [13]. With all these properties and the benefits that condensed tannins can offer, they are seen as potential substitutes for commonly used additives, such as antibiotics and performance enhancers, which are being questioned due to their mode of action.

We tested the hypothesis that lower doses of CT in the diet of confined lambs promote changes in the ruminal biohydrogenation process, increasing the concentrations of unsaturated fatty acids deposited in the meat, reducing oxidative stress in tissues, and maintaining animal performance without impacting feed intake. The objective was to evaluate whether the addition of CT (black wattle extract) in the diet of confined lambs would have a positive effect on weight gain performance, feed intake, and fatty acid profile changes in ruminal fluid and meat, in addition to enhancing the antioxidant system and reducing oxidative stress.

2. Materials and Methods

2.1. Additive

We used the commercial product (735 g/kg minimum guarantee of CT; NutreSet PNT, SETA S.A., Estancia Velha, RS, Brazil), a natural antioxidant based on CT, as well as other polyflavonoids, together with other phenolic components and complex mixtures of carbohydrate gums, sugars and amino acids extracted and purified from the bark of black wattle extract (*Acacia mearnsii*). The product is obtained from the secondary metabolism of plants and added to the lambs' diet at a dose of 2.5 g/kg dry matter, with an active ingredient of 111.13 g/kg DM of gallic acid equivalent. Following the manufacturer's recommendation, the concentration of condensed tannin in the diet is similar to that of another recently published study with tannin for lambs [14].

2.2. Animals, Experiment Site, and Diets

The study was conducted in the ruminants sector of the UDESC Experimental Farm (FECEO), located in Guatambu/SC. Twenty-four Lacaune lambs were used with an average age of 70 ± 2.5 days and an average initial weight of 24.5 ± 0.24 kg. They were accommodated in stalls (1.2 cm $\times$ 2.5 m) equipped with feeders and drinkers with a float for controlling water flow.

2.3. Experimental Diets and Feed Intake

The experiment lasted 89 days (82 days experimental period + seven adaptation days), during which the animals were divided into two groups, with six repetitions per group

and a total of two animals per repetition/pen, being considered an adaptation period of for environment and feed [15] due to the animals already receiving a similar diet, adapting only to the additive. Animals in the control group received a basal diet. In contrast, animals in the treated group and the basal diet received the polyphenol-based additive at 2.5 g/kg of dry matter. Powder concentrate was used, and additives were added during its production, carried out at 15-day intervals.

The diet was formulated according to the nutritional requirements of the animals [16], considering the feeds of concentrate and corn silage, provided at different times in the feeders; that is, first, the concentrate was provided, and after consumption was finished (30 min), silage was supplied. It is important to note that the animals consumed all the concentrate provided throughout the experiment, meaning that the additive was consumed in full. Feed was divided into two daily meals, at 8:00 a.m. and 4:00 p.m., while water was provided ad libitum.

The amount of feed (dry matter) provided was 4.5% of live weight, with a diet in the concentrate:silage ratio of 55:45, respectively. The volume of feed provided was adjusted at 15-day intervals based on the body weight of the animals; however, the feeder was monitored in order to have a 2–3% surplus of silage. The chemical composition of the feedstuffs used in the diet was measured according to the technique described below, and the results are shown in Table 1.

Table 1. Chemical composition of corn silage and basal concentrate used.

Items ¹	Corn Silage	Control Concentrate ²	Treatment Concentrate ²
Dry matter (DM), %	28.8	89.4	89.5
Crude protein (CP), % DM	9.59	18.0	19.2
EE, % DM	3.06	3.90	3.88
NDF, % DM	34.8	18.3	19.5
ADF, % DM	16.7	6.18	6.33
Ash, % DM	4.42	10.6	9.75
Fatty acid (%)			
C12:0 (Lauric)	0.25	0.008	0.008
C14:0 (Myristic)	0.24	0.05	0.05
C14:1 (Myristoleic)	0.01	-	-
C15:0 (Pentadecanoic)	0.05	0.02	0.02
C16:0 (Palmitic)	11.1	8.79	8.81
C16:1 (Palmitoleic)	0.38	0.10	0.10
C17:0 (Heptadecanoic)	0.28	0.05	0.06
C18:0 (Stearic)	3.47	2.16	2.15
C18:1n9c (Oleic)	13.3	14.5	14.6
C18:2n6c (Linoleic)	17.1	22.8	22.2
C20:0 (Arachidic)	0.43	0.24	0.23
C20:1n9 (cis-11-Eicosenoic)	-	0.18	0.17
C18:3n3 (α-Linolenic)	5.00	1.03	1.01
C20:2 (cis-11,14-Eicosadienoic)	-	0.02	0.02
C22:0 (Behenic)	0.50	0.15	0.16
C22:1n9 (Erucic)	0.04	0.03	0.04
C20:4n6 (Arachidonic)	0.07	0.06	0.07
C24:0 (Lignoceric)	0.63	0.16	0.15
Σ SFA	17.0	11.6	11.6
Σ MUFA	13.8	14.8	14.7
Σ PUFA	22.2	23.6	23.7

¹ DM (dry matter), CP (crude protein), EE (ether extract), NDF (neutral detergent fiber), ADF (acid detergent fiber), and Ash. ² Ingredients present in 100 kg of concentrate: ground corn (550 g/kg), soybean bran (255 g/kg), wheat bran (155 g/kg), calcite limestone (10 g/kg) and mineral and vitamin premix (30 g/kg). Concentration of mineral and vitamin premix (concentration/kg): Ca min. 175 max. 245 g; P min. 40 g; S min. 25 g; Mg min. 12 g; At max. 100 g; Ash max. 980 g; with min. 40 mg; Fe min. 1800 mg; I min. 80 mg; Mn me. 1400 mg; If min. 12 mg; Zn min. 4000 mg; Vit A min. 300,000 IU; Vit D3 min 60,000 IU. Vit E min. 600 IU; F max. 600 mg; Monensin sodium 600 mg.

2.4. Body Weight and Sample Collection

Lambs were weighed individually every 15 days. All weighings were carried out in the morning, with the lambs fasting for 12 h, using a digital electronic bar scale (DIGITRON®, UL-300, Nunawading, Australia). Fasting was only carried out 12 h prior to the day of data and sample collection (nighttime); on the other days, the animals remained with the silage. Daily mean intake (DMI) was measured daily in the morning, and leftovers were removed and weighed per stall. The average daily gain (ADG) was calculated as the regression coefficient of individual live weight on time [17]. Feed efficiency (ADG/DMI) was calculated.

Blood collections were carried out on days 0, 30, 65, and 81 (before feeding). The tubes containing an anticoagulant (EDTA 10%) were used for the complete blood count, and tubes without an anticoagulant were used for serum preparation. After collection, all these samples were transported to the laboratory (styrofoam box with ice), and tubes without an anticoagulant were centrifuged at 7000 rpm for ten minutes to separate the serum. Then, a serum fraction was stored in 1.8-mL microtubes (Eppendorf, Hamburg, Germany) at -15°C .

On days 30, 65, and 81 of the experiment, 100 mL of ruminal fluid per animal was collected two hours after morning feeding (the first 50 mL were discarded, and the rest of the collected material was used for analysis) with an esophageal probe coupled to a suction motor. The collected content was placed in tubes to measure pH and the time of functional activity of the rumen microbiota was measured using the Methylene blue reduction test (MBRT), described by [18]. A subsample of ruminal fluid was reserved for the determination of SCFAs. These samples after collected were immediately filtered and submitted to freezing to avoid SCFAs degradation.

All animals were slaughtered one day after the trial period ended (day 82) at a slaughterhouse specific for small ruminants (Guatapar in Guatambu—SC), following current regulations and supervised by a veterinarian. Muscle pH was measured after the stunning, bleeding, skin removal, and evisceration procedures. The hot carcasses were weighed, and after 24 h, the weighing was carried out again to obtain the cold carcass weight and a new pH measurement. The carcasses were cooled in the slaughterhouse's cold chambers (between -2 and 0°C). After 24 h of slaughter, the quadriceps femoris muscle (left limb) was removed and used for meat analyses.

2.5. Laboratory Analysis

2.5.1. Determination of Total Phenolic Compounds (TPC), Antioxidant Activity and Tannins in the Additive

For extraction, 0.5 g of the sample was used, and 50 mL of distilled water was added. The mixture was placed in an ultrasound bath (70 W) for three hours and left to rest in the dark for another three hours. The supernatant was filtered with quantitative filter paper (Whatman n° 40) and stored in a 100 mL volumetric flask wrapped in aluminum foil. Immediately after extraction, the extracts were stored in Eppendorf tubes and kept frozen at -83°C , if necessary, and not for more than 24 h, until use [19].

Total phenolic compound quantification was performed using the Folin–Ciocalteu colorimetric method [20]. An aliquot of each diluted sample was mixed with 0.5 mL of Folin–Ciocalteu and stirred for one minute; 2 mL of sodium carbonate (20%) was added to the mixture and stirred for 30 s. After incubation for two hours in the dark, the absorbance at 750 nm was read relative to the prepared blank. The standard curve was prepared by solutions of gallic acid in methanol. The concentration of TPC in the extracts was determined in gallic acid equivalents using an equation obtained from the standard gallic acid graph and expressed in mg of gallic acid equivalent per 100 g of dry sample ($\text{mg EGA}\cdot\text{g}^{-1}$). Data were presented as the mean of analyses $\pm$ SD of triplicates [21].

The antioxidant activity was determined by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging, by the scavenging of the 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) radical (ABTS) with measurements in triplicate. The assay of DPPH radical scavenging

was performed according to the literature [22], with modifications. In methanol, 0.1 mL of the sample was mixed with 3.9 mL of 0.06 mM DPPH solution. In the control solution, methanol was used in place of the sample. The mixtures were incubated at 25 °C for one hour in the dark. The absorbance reading was performed at 515 nm, with methanol to calibrate the equipment. Quantitation was performed based on a standard curve of DPPH in methanol (at concentrations of 0 µM, 10 µM, 20 µM, 30 µM, 40 µM, 50 µM, and 60 µM) using the linear equation $y = 0.0104x + 0.0248$ ($R^2 = 0.9919$), where the y -axis is absorbance and x -axis is DPPH concentration.

The ABTS radical scavenging assay was performed according to the literature [23]. A stock solution of 7 mM ABTS was prepared. The ABTS working solution was prepared by mixing the ABTS stock solution with the 2.45 mM $K_2S_2O_8$ solution in a ratio of 1:1 (v/v). 20 µL of the sample was mixed with 980 µL of ABTS working solution. The absorbance of the mixture was measured in a spectrophotometer at 734 nm after six min of incubation in the absence of light. Quantitation was performed using a standard curve of Trolox in ethanol (at concentrations of 100 µM, 500 µM, 750 µM, 1000 µM, 1500 µM, and 2000 µM), using the linear equation $y = -0.000289x + 0.53447$ ($R^2 = 0.9176$), where the y -axis is absorbance and x -axis is Trolox concentration.

Total tannins were quantified by the Folin–Ciocalteu method. The tannin extract was carried out with aqueous acetone (70%, v/v). Five replicates of tannin extract were analyzed. For total tannins, standard analysis was used, whereas CT concentration was calculated as a leucocyanidin equivalent through the equation: $[\text{Abs } 550 \text{ nm} \times 78.26 \times \text{dilution factor}]/\% \text{ DM}$ [24].

2.5.2. Chemical Composition Analysis

In the laboratory, the feed samples were pre-dried in a forced ventilation oven at 55 °C for 72 h, then removed from the oven and weighed again to determine the partial dry matter content, followed by grinding in a Wiley mill (Marconi, model: MA340), using a 1 mm mesh sieve. The pre-dried and ground samples were heated at 105 °C for 24 h to determine dry matter (DM) and ashed in a muffle furnace at 600 °C [25]. The micro-Kjeldahl method determined the N content (Method 984.13 [26]), which allowed predicting the crude protein (CP, method 976.05) content through mathematical calculation ($N \times 6.25 = \text{CP}$). To determine the neutral detergent fiber (NDF) content, the samples were placed in polyester bags [27] and treated with a neutral detergent solution in an autoclave at 110 °C for 40 min [28]. For concentrate samples, we included α -amylase [29]. Acid detergent fiber (ADF) concentrations were determined according to AOAC [26], method 973.18). The values of starch, carbohydrates, and ether extract were obtained using a Near Infrared Reflectance Spectrometer, model Spectra Star 2600 XT series of Near Infrared Analyzers (Unity Scientific®, Brookfield, WI, USA). The results are presented in Table 1.

Fatty acids from feed samples (silage and concentrate) were extracted by the method of [30] using a quantity of 1.5 g of sample, which had been pre-dried (oven 60 °C, 72 h), for stabilization and the possibility of grinding. The amount of water in the extraction method for food samples was 1.5 mL. Other procedures for feed analysis were similar to those performed on meat, as will be described below (Section 2.6).

2.5.3. Hemogram and Serum Biochemistry

Erythrocyte and total leukocyte counts, hemoglobin concentration, hematocrit percentage, and leukocyte differentials were performed immediately upon sample arrival at the laboratory using an automatic hematologic analyzer (three parts EQUIP VET 3000®, Pleasanton, CA, USA).

Serum levels of total protein, albumin, cholesterol, triglyceride, glucose, and urea were evaluated in serum using commercial kits (Analisa, Belo Horizonte, MG, Brazil) and semi-automatic equipment (BIO PLUS 2000®, Barueri, SP, Brazil), following manufacturers' recommendations. Globulin levels were obtained using $\text{globulin} = \text{total proteins} - \text{albumin}$ [31,32].

2.5.4. Oxidant Status

The meat (0.5 g) was weighed and allocated into test tubes. The tissue was homogenized separately in 10 mmol Tris–HCl buffer, pH 7.2 to verify the oxidative status variables. The samples were stored in tubes and frozen at -20°C until analyzed. All the procedures described above were performed with refrigerated temperature (4°C).

Lipid peroxidation was measured as the amount of TBARS, according to literature for serum [33] and for meat [34]. The reaction was read in a spectrophotometer Kasuaki IL-593-S at 535 nm (serum) and 532 nm (meat). The results were expressed as nmol of malondialdehyde (MDA)/mL of serum or homogenate [35].

Serum and meat glutathione S-transferase (GST) activity was measured based on researchers [36] and expressed as μmol 1-Chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB)/min/mg protein. According to the literature [37], protein thiols were measured, and the results were expressed as nmol thiols/mg of protein.

Superoxide dismutase activity measurement in meat homogenate was based on the inhibition of O_2 reaction with adrenalin as described by researchers [38]. A unit of SOD is defined as the amount of enzyme that inhibits by 50% the speed of adrenalin oxidation. It leads to the formation of the red-colored product, adrenochrome, which is detected by a spectrophotometer. SOD activity is determined by measuring the speed of adrenochrome formation, observed at 480 nm, in a reaction medium containing 50 mM glycine–NaOH, pH 10, and 1 mM adrenalin. The results were expressed as UI SOD per milligram protein.

2.5.5. Ruminant Volatile Fatty Acids

Immediately after collecting the rumen fluid, the pH was measured using a digital pH meter (KASVI[®], K39-1420, Pinhais, Brazil) while still on site. Immediately after collection, the functional activity of the rumen microbiota was analyzed using the methylene blue reduction test (MBRT), described by researchers [18]. For the determination of short-chain fatty acids, the rumen fluid samples were thawed to 5°C and manually agitated to homogenize them. One milliliter of aliquots of the supernatant from rumen fluid samples were collected in polypropylene microtubes (2 mL) and centrifuged for five min ($12,300\times g$). After that, 250 μL of the supernatant was removed and transferred to a new microtube containing 250 μL of formic acid. The mixture was manually shaken and centrifuged again for three minutes. Then, 250 μL of the supernatant of the mixture was collected into an injection vial, and 500 μL of 3-octanol solution ($665\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ in methanol) was used as an internal standard and homogenized. The samples were analyzed in a gas chromatograph equipped with a flame ionization detector (GC-FID; Varian Star 3600, Palo Alto, CA, USA) and an autosampler (Varian 8200CX, Palo Alto, CA, USA); 1 μL of the extract was injected in split mode at 1:10. The carrier gas used was hydrogen at a constant pressure of 20 psi. The analytes (acetic, propionic, butyric, valeric, and isovaleric acids) were separated by a CP-WAX 52CB capillary column (60 m $\times$ 0.25 mm; 0.25 μm stationary phase thickness). The initial column temperature was set at 80°C for one minute and increased to 120°C at $8^{\circ}\text{C min}^{-1}$, then up to 230°C by $15^{\circ}\text{C min}^{-1}$, where it remained for one min. Injector and detector temperatures were set at 250°C . The validation of the method included the following parameters: selectivity, linearity, linear range, repeatability, precision, limit of detection (LOD), and limit of quantification (LOQ) for acetic, propionic, butyric, valeric, and isovaleric acids. Analytical parameters are shown in Table S1. Linearity was evaluated by calculating a regression equation using the least squares method. LOD and LOQ values were achieved by sequential dilutions up to signal-to-noise ratios of 3:1 and 6:1, respectively. Precision was assessed by analyzing the repeatability of six replicate samples. Accuracy was determined by recovering known amounts of standard substances added to a diluted sample. The results were expressed as mmol L^{-1} of each SCFA in rumen fluid.

2.6. Meat

The meat was cooled at 6°C for 24 h, after which a cut in half (separating into two 2 cm steaks each) was made to measure pH using a portable penetration electrode (HANNA, HI

99163, Smithfield, RI, USA). In this cut of meat, the color of the meat on the surface was also evaluated in four different locations (the average was determined for data analysis), using a CR-400 chromometer (Minolka, Osaka, Japan); CIE1976 $L^* a^* b^*$, with a D65 standard illuminant, compared to a CIE 1931 standard observer ($x_2\lambda, y\lambda, z\lambda$), to a calibration plate (number 1849-701). They are defined as lightness (L^*), redness (a^*) and yellowness (b^*), measured at three random sample points. In another portion of meat, we evaluated the water holding capacity (WHC) using compression according to the Hamm methodology, adapted by the researchers [39]. A total of 5 g of meat was used, a sample without ribs, connective tissue and fat. This meat was placed between two sheets of filter paper, then compressed for 5 min with a weight of 2.5 kg. This meat sample was then weighed to assess how much water was lost. The WHC was then calculated, and the results were presented as a percentage.

The extraction of fatty methyl esters was performed using Bligh and Dyer [30] method with some modifications: 1.5 g of meat samples, 0.5 mL of water, 5 mL of methanol, and 2.5 mL of chloroform were added to a 15-mL polypropylene tube, and mechanical shaking was performed for 60 min. After that, 2.5 mL of chloroform and Na_2SO_4 1.5% solution were added to promote a biphasic system. This mixture was shaken for two minutes and then centrifuged for 15 min at 2000 rpm. Lipids obtained from the chloroform phase were subjected to fatty acid analysis.

Fatty acid methylation was performed using a transesterification method proposed by [40]. The extracted lipids were added to one milliliter of 0.4 M KOH methanolic solution in a test tube and shaken in a vortex for one minute. Samples were kept in a water bath for ten minutes at boiling point. Subsequently, they were cooled at room temperature, and 3 mL of 1 M H_2SO_4 methanolic solution was added, shaken in a vortex, and maintained in a water bath for ten minutes. After cooling, 2 mL of hexane was added and centrifuged at 2000 rpm for ten min. Lastly, hexane with the fatty acid methyl esters (FAME) was subjected to chromatography analysis.

For the FAME determination, a gas chromatograph model TRACE 1310 was equipped with a flame ionization detector (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). One microliter of samples was injected in a splitless injector, operated in 1:10 ratio split mode at 250 °C. Hydrogen was used as carrier gas at a constant flow rate of 1.5 mL/min. FAME separation was performed using an RT 2560 (100 m $\times$ 0.25 mm $\times$ 0.20 μm of thickness film, Restek, Bellefonte, PA, USA) chromatography column. The initial oven temperature was programmed at 100 °C for five min and increased to 180 °C at an 8 °C/min rate. Then, it increases to 210 °C at 4 °C/min, and finally, until 240 °C, it increases to 20 °C/min, and it is maintained for 20 min in isothermal. The detector temperature was kept constant at 250 °C. The FAME compounds were identified by comparison of experimental retention time with those from authentic standards (FAME Mix-37, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA). The results were presented as a percentage of each fatty acid identified in the lipid fraction, considering the chain size equivalent factor of FAME for FID and conversion factor of ester to the respective acid, according to the literature [41].

2.7. Statistical Analysis

The experimental data were first analyzed descriptively, and measures of central tendency (median) and data dispersion (range that stands for the interval between the minimum and maximum values in the data) were computed. Further, all variables were subjected to the Shapiro–Wilk W-test, which revealed a normal data distribution. Skewness, kurtosis, and homogeneity were evaluated using the Levene test, and linearity was used using linear regression. All data were analyzed immediately using the PROC MIXED procedure (SAS Inst. Inc., Cary, NC, USA; version 9.4), with the Satterthwaite approximation to determine the denominator degrees of freedom for the fixed effects test. Weight gain, ADG, feed efficiency, and feed conversion were tested for treatment fixed effects using a pen (treatment) and animal (pen) as random variables (i.e., pen within treatment and animal within pen). Body weight and intake feed were tested for fixed effects of treatment,

day, and treatment $\times$ day; and pen (treatment) as random variables. All other variables (blood and ruminal liquid) were analyzed as repeated measurements and tested for fixed effects of treatment, day, and treatment $\times$ day, and pen (treatment) and animal (pen) as random variables. Post-mortem variables analysis (meat, carcass, and fatty acid profile) was tested using animal (treatment) as random variables for treatment fixed effects. All results obtained on the first day for each variable were also included as covariates; however, the covariate was removed from the model when $p > 0.05$. Means were separated using PDIF (student test), and all results were reported as LSMEANS followed by standard error. Significance was defined when $p \leq 0.05$ and tendency when $p > 0.05$ and $p \leq 0.10$.

We calculated the post hoc power for the groups, considering body weight as output since it is one of the main variables of importance in adding performance-enhancing additives. We use the mean of each group and its SD with an alpha of 0.05, and we finish with a reasonable power of 86.4%.

3. Results

3.1. Additive

This methodology verified that the TPC concentration is 2534.7 ± 111.13 mg GAE/g DM. The activity was 0.27 ± 0.02 EC50, $\mu\text{g/mL}$, i.e., the result was expressed as EC50, which is the sample concentration required for DPPH radical scavenging by 50%. The concentration was 10514.02 ± 1099.53 μM Trolox/g of the sample, with $87.8 \pm 10.5\%$ inhibition. We detected 986 ± 2.4 g tannin per kg additive (fresh material) used in the experiment.

3.2. Growth Performance and Feed Intake

The growth performance results are presented in Table 2 and Figure S1. We observed no treatment effect on ADG, average weight gain, average daily weight gain, total feed intake, and feed efficiency. There was also no treatment effect on concentrate and silage intake, when evaluated separately.

Table 2. Growth performance of lambs fed or not with condensed tannins added to the concentrate.

Variables	Control ¹	Condensed Tannins ¹	SEM	<i>p</i> -Value: Treat
Initial body weight, kg	24.8	24.3	0.247	0.89
Final body weight, kg	46.3	44.9	0.240	0.65
Average daily gain, g/d (d 1 to 81)	265	256	1.68	0.53
Silage intake (kg DM/day)	0.50	0.50	0.08	0.90
Concentrate intake (kg DM/day)	0.61	0.62	0.00	0.98
² Daily mean intake (DMI) (kg DM)	1.12	1.13	0.12	0.96
Feed efficiency	0.23	0.22	0.03	0.90

¹ The treatments: Lambs that received a diet with added condensed tannins in the concentrate (treatment); Lambs that did not receive the addition of condensed tannins in the concentrate (control). ² Concentrate + silage per day (DM).

As there was 100% consumption of the concentrate (with CT) and knowing the daily feed intake of the lambs per pen, the concentration of the additive per animal/daily was calculated, i.e., it was 2.82 g.

3.3. Hemogram, Serum Biochemistry and Metabolites

Results of serum biochemistry and metabolism are presented in Tables 3 and S2. The treatment affected cholesterol levels, which were lower in the serum of the animals in the treated group. Globulin levels were higher than the control in the entire experimental period, which was linked to a trend toward higher levels of total proteins. The variables albumin, triglycerides, glucose, and urea did not affect treatment ($p > 0.05$). Effect of treatment for TBARS and thiols, treatment $\times$ day interaction was verified with lower concentrations of TBARS and higher concentrations of thiols in the treated group (d 29, 65, and 81) ($p < 0.05$). There was no treatment effect for GST ($p > 0.05$).

Table 3. Serum biochemistry and oxidation biomarkers in the serum of lambs fed or not with condensed tannins added to the concentrate.

Variable	Treatments ¹		SEM	p-Value ⁴		
	Control	Condensed Tannins		Treat	Treat × Day ⁵	Day ⁶
Albumin (g/dL)	3.01	3.10	0.08	0.85	0.59	0.64
Globulin (g/dL)	3.56 ^b	3.84 ^a	0.09	0.05	0.01	0.01
Total protein (g/dL)	6.45 ^b	6.95 ^a	0.25	0.07	0.16	0.22
Urea (mg/dL)	42.0	42.8	2.06	0.92	0.90	0.91
Cholesterol (mg/dL)	72.9 ^a	65.9 ^b	2.32	0.05	0.02	0.01
Tryglicerides (mg/dL)	33.6	31.7	4.57	0.85	0.89	0.78
Glucose (mg/dL)	79.8	83.9	3.90	0.51	0.65	0.45
TBARS (nmol MDA/mL)	25.3 ^a	21.4 ^b	1.62	0.04	0.03	0.05
Thiols (nmol SH/mg protein)	115 ^b	140 ^a	8.05	0.01	0.01	0.01
GST ² (μmol CDNB ³ /min/mg protein)	367	365	18.2	0.94	0.86	0.82

¹ The treatments: Lambs that received a diet with added condensed tannins in the concentrate (treatment); Lambs that did not receive the addition of condensed tannins in the concentrate (control). ² Glutathione S-Transferase (GST). ³ 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB). ⁴ Means differ between groups ($p \leq 0.05$), illustrated by different letters (a, b) on the same line to demonstrate the treatment effect. ⁵ when there was interaction between treatment and day, results are shown in Table S2. ⁶ when there was day effect, results are shown in Table S2.

Blood count results are presented in Tables 4 and S2. There was a treatment effect for hematocrit percentage, hemoglobin concentration, erythrocytes, and granulocytes, which was lower in the treated group ($p < 0.05$). Treatment × day interaction on total leukocyte concentration, being highest on day 29 in the treated group and lowest on day 65. The trend of treatment effect and treatment × day interaction for lymphocyte count is highest in the treated group and at certain moments (d 29 and 81). There was a tendency for treatment effect and treatment × day interaction for the number of monocytes lower in the treated group, especially on day 81.

Table 4. Blood parameters of lambs fed on with the control and condensed tannin diets.

Variable	Treatment ¹		SEM	p-Value ²		
	Control	Condensed Tannins		Treat	Treat × Day ³	Day ⁴
Hematocrit (%)	33.5 ^a	31.1 ^b	0.27	0.02	0.05	0.38
Hemoglobin (g/dL)	13.0 ^a	11.8 ^b	0.14	0.04	0.05	0.21
Erythrocytes ($\times 10^6$ μ L)	11.1 ^a	10.4 ^b	0.15	0.05	0.11	0.44
Leukocytes ($\times 10^3$ μ L)	11.3	11.4	1.08	0.83	0.03	0.01
Granulocytes ($\times 10^3$ μ L)	2.13 ^a	1.76 ^b	0.06	0.01	0.01	0.45
Lymphocytes ($\times 10^3$ μ L)	8.20 ^b	8.97 ^a	0.31	0.07	0.01	0.01
Monocytes ($\times 10^3$ μ L)	0.93 ^a	0.63 ^b	0.05	0.06	0.01	0.02

¹ Treatments: Lambs that received a diet with added condensed tannins in the concentrate (treatment); Lambs that did not receive the addition of condensed tannins in the concentrate (control). ² Means differ between groups ($p \leq 0.05$), illustrated by different letters (a, b) on the same line to demonstrate treatment effect. ³ when there was interaction between treatment and day, results were shown in Table S2. ⁴ When there was a day effect, results were shown in Table S2. Note: In addition to the variables described in the table, we measured the number of platelets and MCV, MCH, MCHC, and RDW-CV, which did not differ between treatments.

Results of the day effect were presented in Table S2. The day effect for globulin levels was observed only in the lambs of the control group, which decreased over time. On the other hand, TBARS levels decreased, and thiols increased over time in the lambs of the condensed tannin group. The day effect for cholesterol was also observed, with the levels of this biomarker increasing compared to the beginning of the experiment in both groups. Likewise, the total leukocyte and lymphocyte counts increased in the blood of both groups of animals. The monocyte count fluctuated, with a higher count at the end of the experiment in the control group lambs; on the other hand, in the lambs fed condensed

tannins, the count was lower at the end of the research. No day effect was observed for hemoglobin and hematocrit.

3.4. Ruminal Fermentation Activity

Rumen fluid results are presented in Table 5 and Figure 1. There was a tendency toward a shorter time of bacterial activity in the treated group and treatment $\times$ day interaction at the end of the experiment (d 81). The pH variable of the rumen fluid showed no effect of treatments ($p > 0.05$). There was a tendency for interaction between treatment $\times$ day at time 81 for the total short-chain fatty acids concentration, which was lower in the rumen fluid of the animals in the treatment group. This result occurred due to the lower concentration of acetic and propionic acids on day 81 in lambs in the treatment group. In rumen fluid, treatment effect and treatment $\times$ day interaction were observed for butyric, isovaleric, and valeric acids. These three volatile acids were in higher concentrations in lambs from the treatment group compared to the control. There was no treatment effect or treatment $\times$ day interaction for the acetic/propionic ratio.

Table 5. pH and bacterial activity (MBRT), total volatile fatty acids (VFA), in the rumen fluid of lambs with or without added non-concentrated condensed tannins.

Variable	Treatment ¹		SEM	p-Value ³		
	Control	Condensed Tannins		Treat	Day ⁵	Treat $\times$ Day ⁴
pH	6.42	6.38	0.12	0.77	0.25	0.32
MBRT ² (seconds)	86.8 ^a	73.2 ^b	4.21	0.08	0.01	0.01
VFA (mmol/L)	101	99.3	2.58	0.40	0.03	0.10
Acetic (mmol/L)	70.1	66.6	2.40	0.24	0.01	0.05
Propionic (mmol/L)	18.3	17.1	0.88	0.56	0.04	0.03
Butyric (mmol/L)	9.65 ^b	11.7 ^a	0.66	0.05	0.01	0.01
Isovaleric (mmol/L)	2.05 ^b	2.73 ^a	0.16	0.01	0.01	0.01
Valeric (mmol/L)	1.02 ^b	1.28 ^a	0.11	0.10	0.19	0.01
Acetic/propionic	3.83	3.88	0.15	0.86	0.66	0.74

¹ The treatments: Lambs that received a diet with added condensed tannins in the concentrate (treatment); Lambs that did not receive the addition of condensed tannins in the concentrate (control). ² Methylene blue reduction test (MBRT)—microbial activity indicator; the shorter the time, the greater the action of bacteria. That is, the less time is needed to consume methylene blue. ³ Means differ between groups ($p \leq 0.05$), illustrated by different letters (a, b) on the same line to demonstrate the treatment effect. ⁴ When there is interaction between the treatment and day, results are shown in Figure 1. ⁵ When there is a day effect, the results are shown in Figure 1.

Results of ruminal fluid biomarkers were presented in Figure 1. Bacterial activity was affected by the day, being lower in both groups in the middle of the experiment; we also highlighted the higher bacterial activity at the end of the experiment when lambs consumed condensed tannin. VFA concentration was affected by the day, being significantly lower in the ruminal fluid of lambs that consumed condensed tannin compared to d 81 to d 29. In both groups, an effect of the day was observed on the percentage of acetic, propionic, butyric and isovaleric acid, but no effect on valeric acid. In general, these VFA reduced when the animals consumed condensed tannin as detailed in Figure 1. The other biomarkers had no day effect in this sample.

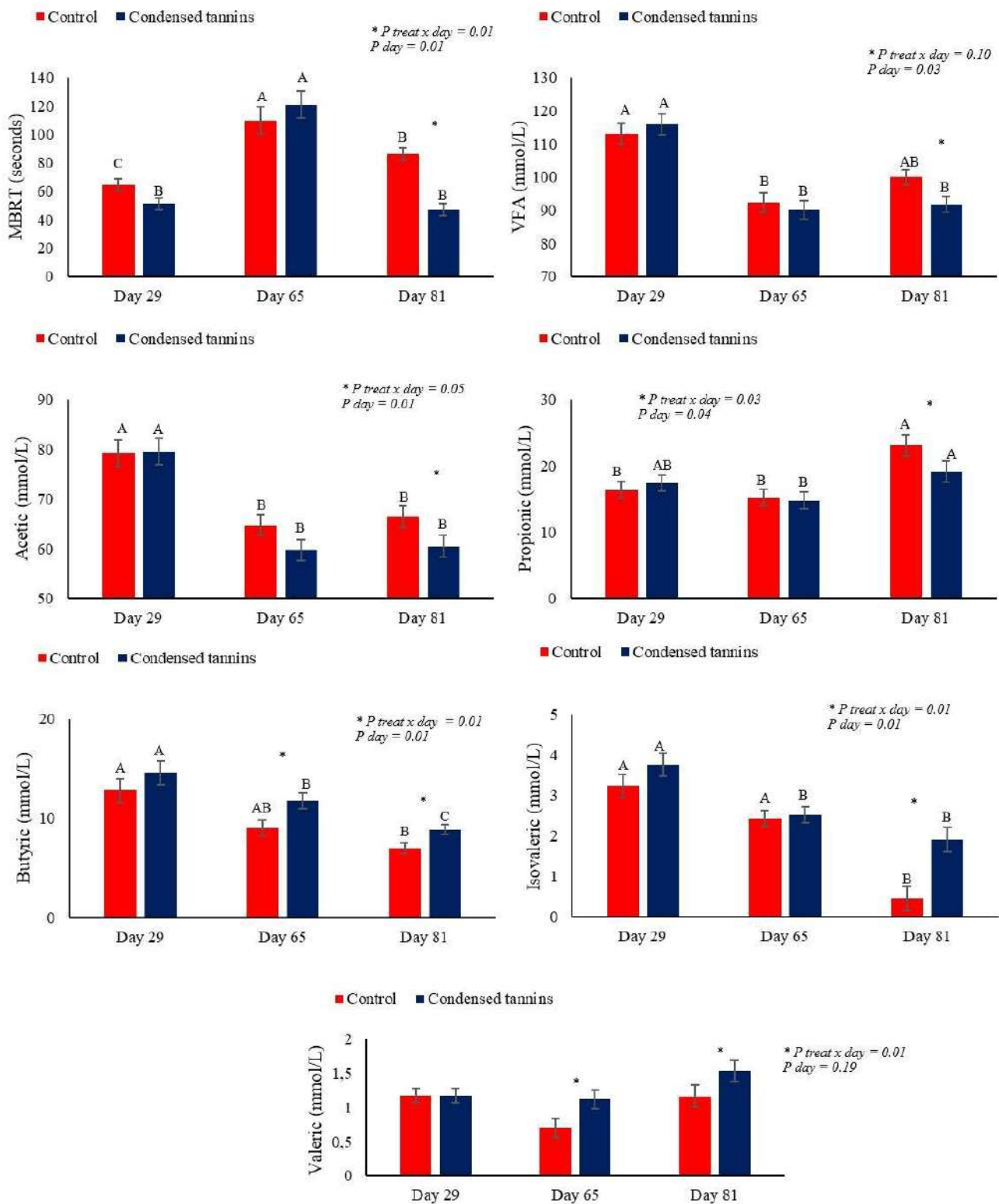


Figure 1. Treatment vs. day interaction and day effect for bacterial activity (MBRT), total volatile fatty acids (VFA), in the rumen fluid of lambs with or without added non-concentrated condensed tannins. Note: 2 Methylene blue reduction test (MBRT)—microbial activity indicator; the shorter the time, the greater the action of bacteria; that is, the less time is needed to consume methylene blue. Means differ between groups ($p \leq 0.05$), illustrated by an asterisk (*) on the bars to demonstrate the interaction between treatment and day. The day effect ($p \leq 0.05$) was illustrated by different capital letters (A, B, C) on the bars.

3.5. Carcass Characteristics

Table 6 presents the meat quality results. We verified a treatment effect for cold carcass yield and percentage of fat in the meat, which was more significant in the treated group ($p < 0.05$). The other variables, such as hot carcass weight, cold carcass weight, hot carcass pH, cold carcass pH, luminosity color, and water retention capacity, had no treatment effect ($p > 0.05$).

Table 6. Analysis of carcass and meat of lambs fed or not with condensed tannins added to the concentrate.

Variable	Control ¹	Condensed Tannins ¹	SEM	<i>p</i> -Value: Treat ²
Hot carcass weight (kg)	21.4	21.3	1.21	0.96
Cold carcass weight (kg)	20.4	20.3	1.20	0.95
Cold carcass yield (%)	44.1 ^b	45.2 ^a	0.07	0.05
Hot carcass pH	6.45	6.35	0.09	0.70
Cold carcass pH	5.81	5.81	0.03	0.97
Lightness	45.3	45.3	1.06	0.98
Redness	12.2	11.8	0.14	0.90
Yellowness	6.54	6.38	0.29	0.82
Water holding capacity (%)	82.2	80.9	1.51	0.86
Chemical composition of meat				
Dry matter (g/kg)	262	273	2.61	0.24
Protein (g/kg)	217	213	2.03	0.69
Intramuscular fat (g/kg)	20.7 ^b	34.7 ^a	1.12	0.01
Ashes (g/kg)	24.9	25.8	0.87	0.16

¹ Treatments: Lambs that received a diet with added condensed tannins in the concentrate (treatment); Lambs that did not receive the addition of condensed tannins in the concentrate (control). ² Means differ between groups ($p \leq 0.05$), illustrated by different letters (a, b) on the same line to demonstrate the treatment effect.

There was a treatment effect for lower TBARS concentrations in the treated group ($p < 0.05$ —Figure 2). Higher concentrations of thiols ($p < 0.05$) and a tendency toward higher concentrations of SOD (Figure 2). Fatty acid profiles are displayed in Table 7 and Figure 3. There was a treatment effect in the concentrations of C17:1(cis-10-Heptadecenoic), C18:0 (Stearic), and C20:4n6 (arachidonic) with lower concentrations in the treated group ($p < 0.05$). Higher amounts of C18:1n9c (oleic), C18:2n6c (linoleic), and C20:3n3 (cis-11,14,17-eicosatrienoic) in the treatment ($p < 0.05$). A significant effect for saturated fatty acids (SFAs) in lower amounts in the treatment and higher concentrations of monosaturated fatty acids (MUFAs) ($p < 0.05$). The polyunsaturated fatty acids (PUFA) were no different, but a higher PUFA/SFA ratio was observed in animals with CT intake, and a higher proportion of $\omega 6$ and $\omega 3$ was observed in the meat of these animals (Figure 3).

Table 7. Profile of fatty acids in lamb meat fed or not with condensed tannins added to the concentrate.

Fatty Acids (%)	Control ¹	Condensed Tannins ¹	SEM	<i>p</i> -Value: Treat ²
C12:0 (Lauric)	0.056	0.063	0.009	0.12
C14:0 (Myristic)	1.300	1.385	0.135	0.54
C14:1 (Myristoleic)	0.081	0.078	0.004	0.82
C15:0 (Pentadecanoic)	0.215	0.226	0.028	0.70
C16:0 (Palmitic)	24.24	22.80	0.975	0.16
C16:1 (Palmitoleic)	1.457	1.539	0.198	0.72
C17:0 (Heptadecanoic)	0.897	0.913	0.117	0.85
C17:1 (cis-10-Heptadecenoic)	0.581 ^a	0.000 ^b	0.060	0.01
C18:0 (Stearic)	16.69 ^a	13.70 ^b	0.999	0.01
C18:1n9c (Oleic)	40.70 ^b	43.99 ^a	0.526	0.01
C18:2n6c (Linoleic)	9.292 ^b	12.11 ^a	0.178	0.01

Table 7. Cont.

Fatty Acids (%)	Control ¹	Condensed Tannins ¹	SEM	p-Value: Treat ²
C20:0 (Arachidic)	0.120	0.154	0.010	0.23
C18:3n6 (Linolenic)	0.126	0.107	0.011	0.18
C20:1n9 (cis-11-Eicosenoic)	0.081	0.103	0.002	0.21
C18:3n3 (α-Linolenic)	0.370	0.517	0.125	0.32
C20:2 (cis-11.14-Eicosadienoic)	0.071	0.087	0.001	0.42
C22:0 (Behenic)	0.064	0.083	0.011	0.11
C20:3n6 (cis-8.11.14-Eicosatrienoic)	0.193	0.183	0.013	0.95
C22:1n9 (Erucic)	0.040	0.037	0.005	0.63
C20:3n3 (cis-11.14.17-Eicosatrienoic)	0.000 ^b	0.026 ^a	0.002	0.01
C20:4n6 (Arachidonic)	3.117 ^a	1.611 ^b	0.202	0.01
C24:0 (Lignoceric)	0.050	0.073	0.019	0.28
C20:5n3 (cis-5.8.11.14.17-Eicosapentaenoic)	0.091	0.075	0.009	0.15
C24:1n9 (Nervonic)	0.032	0.032	0.001	0.97
C22:6n3 (cis-4.7.10.13.16.19-Docosahexaenoic)	0.107	0.104	0.056	0.98

¹ Treatments: Lambs that received a diet with added condensed tannins in the concentrate (treatment); Lambs that did not receive the addition of condensed tannins in the concentrate (control). ² Means differ between groups ($p \leq 0.05$), illustrated by different letters (a, b) on the same line to demonstrate the treatment effect.

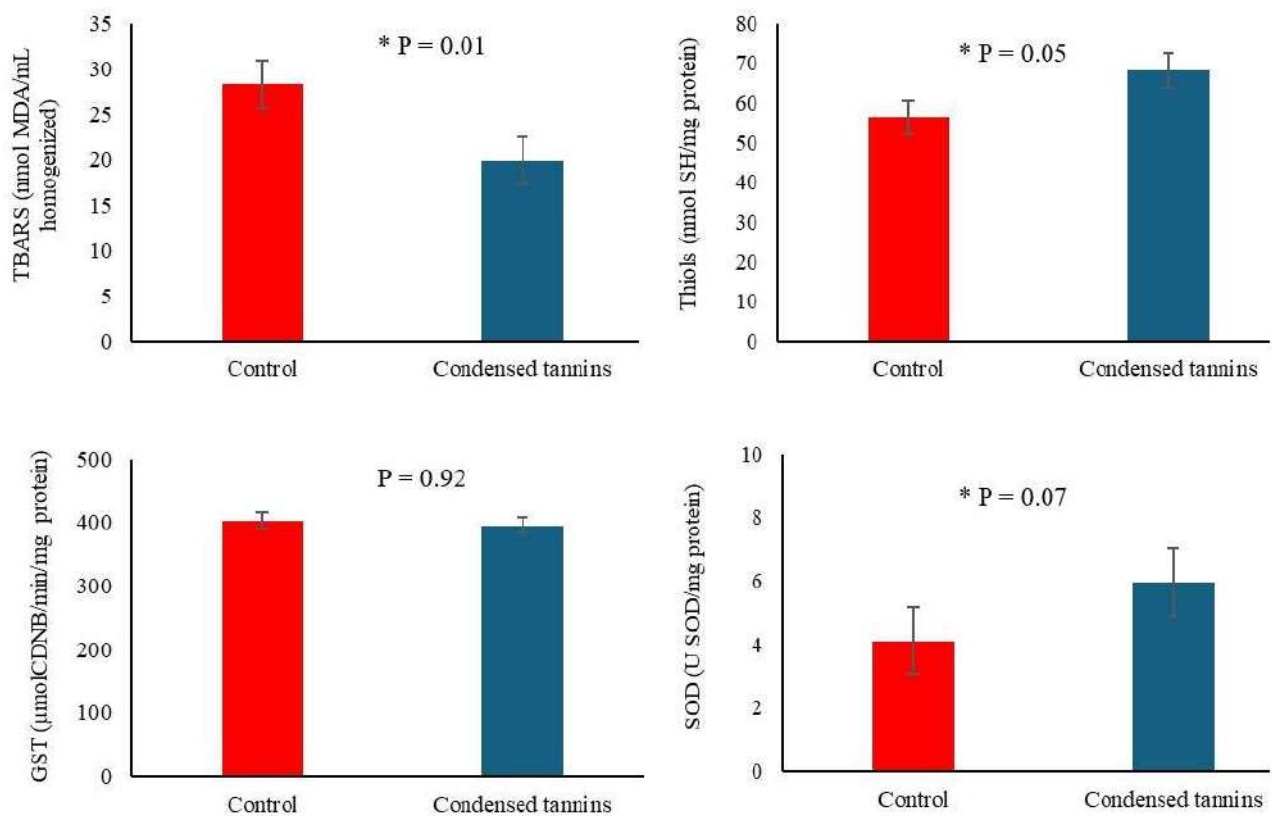


Figure 2. Oxidative in meat of lambs fed or not with condensed tannins added to the concentrate (* treatment effect when $p \leq 0.05$ and tendency when $p \leq 0.05$ and $p > 0.10$).

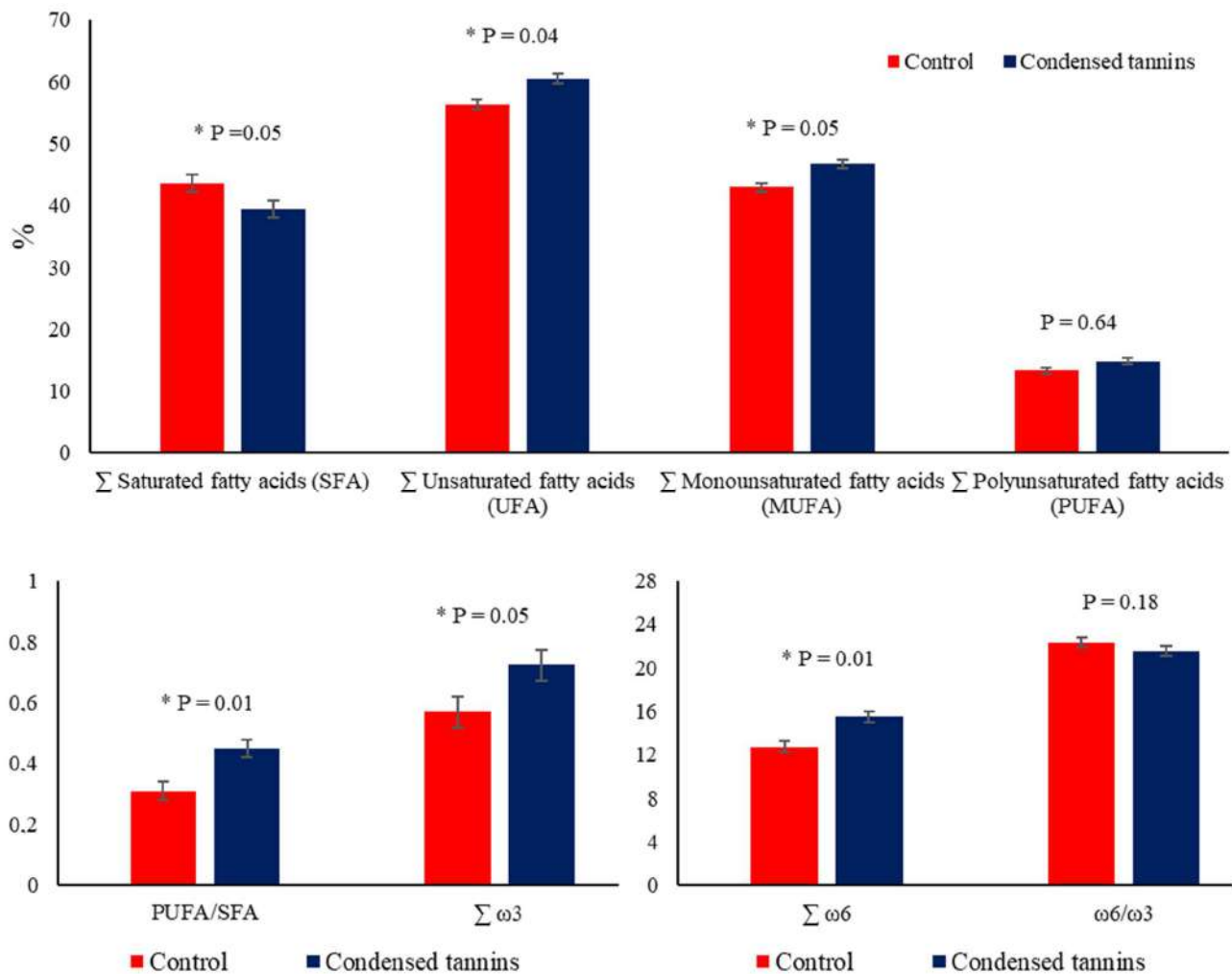


Figure 3. Effect of treatment on the sum of saturated and unsaturated fatty acids in the meat of lamb fed condensed tannins, as well as omega 3 and 6. * Difference between groups was demonstrated when $p \leq 0.05$.

4. Discussion

Condensed tannins derived from black acacia (*A. mearnsii*) extract has the characteristic of inducing a reduction in dry matter intake (DMI). When consumed in doses higher than 5% of the total diet DM, due to anti-nutritional factors that confer an astringent taste, they can impact intake and performance [4]. Tannins can complex with dietary proteins and carbohydrates, reducing their degradation at the ruminal level. After passing through the more acidic environment of the abomasum, they are decomplexed, allowing for a greater supply of nutrients at the intestinal level, including essential amino acids [42], thus promoting weight gain. In our study, when using 2.5 g/kg of DM, no changes in feed intake or animal performance were observed, indicating that this lower dose does not affect DMI or weight gain in animals. The researchers [10], when adding increasing doses of CT to lamb diets, found that amounts above 40 g/kg DM reduced intake and weight gain. This is because they negatively affect the activity of the microbiota and ruminal digestive efficiency [43], inhibiting the activity of enzymes that digest fibers and carbohydrates, altering permeability and the capacity for nutrient absorption.

Tannins act primarily on groups of bacteria that digest fibers and carbohydrates, which can lead to changes in these populations within the ruminal environment, causing shifts in the profile of short-chain fatty acids produced by these bacteria through the fermentation of substrates provided by the diet. The reduction in acetate and propionate concentrations and the increase in butyrate concentration observed here can be caused by tannin ingestion.

There was a treatment $\times$ day interaction for the short-chain fatty acid profile in the rumen, with the difference between groups for all these acids being observed on day 81, and only for butyric and valeric acid on day 65. This clearly demonstrates that a long adaptation period to tannin in the diet was necessary. The ruminal fermentation profile of dairy cows supplemented with increasing doses of CT showed a higher proportion of butyrate and a lower proportion of propionate and acetate in the ruminal fluid [44]. Changes in the ruminal microbiome may have mediated this change in the ruminal fermentation profile. Tannins can alter the ruminal environment due to the formation of ammonia ions, which promote changes in the pH of the environment. This pH alteration favors the multiplication of certain bacteria, especially gram-negative bacteria, leading to reduced fermentation of fibers and carbohydrates, as most bacteria that degrade these substrates are gram-positive. Consequently, there is a reduction in the production of acetate and propionate, resulting from the lower fermentation of these compounds. The addition of tannins to the diet of ruminants can interfere with the production of branched-chain fatty acids, which are produced from the breakdown of amino acid carbon skeletons [45], as seen in the increase in isovaleric acid in our study.

There were effects of tannin consumption on lamb meat, and it is important to emphasize that the ingestion of this additive does not affect food safety, since tannins are commonly consumed by ruminants. The alterations in the fatty acid profile were also observed in the meat composition, where a higher percentage of fat was found in animals from the group that consumed condensed tannins. Upon analysis, it was found that the fatty acid profile was modified, reducing SFA due to the lower biohydrogenation of unsaturated fatty acids at the ruminal level. This is caused by the reduced activity of gram-positive bacteria, resulting in greater metabolization of unsaturated fatty acids, which are then directed to the tissues, promoting changes in the fatty acid profile found in the meat [46]. It is worth highlighting the increase in concentrations of omega C18:1n9c (oleic) and C18:2n6c (linoleic) acids [47,48], which are directly linked to cardiovascular health benefits both in the animals and in consumers of the products derived from them, in this case, the meat [49]. The enzyme Δ^9 -desaturase is involved in the metabolism of SFA. It is responsible for introducing a double bond between the ninth and tenth carbon of the saturated fatty acid chain, converting SFA, such as stearic acid (C18:0), into monounsaturated fatty acids, such as oleic acid [50]. The activity of this enzyme is crucial for the regulation of membrane fluidity. In our study, we observed high activity of this enzyme, which reduced the concentrations of C18:0 and increased the concentration of monounsaturated fatty acids. With this improvement in the lipid profile, we suggest that the reduction in serum cholesterol levels can be attributed to this alteration, facilitating the flow of lipids in the bloodstream, preventing adhesion to artery walls, and reducing the risk of cardiovascular diseases typically associated with animal-derived products.

The values found for the polyunsaturated:saturated fatty acid ratio (PUFA:SFA) in animals that intake CT (0.45) achieved the values recommended for a healthy diet, as reported by the Ministry of Health of the United Kingdom, that should be greater than 0.4 [51], which is also recommended by the literature [52], which is 0.45 in foods. These data are significant because typically, according to the literature, this ratio in meat is generally low, around 0.1 [53], characterizing the products derived from ruminant animals, which have a ratio of PUFA:SFA fatty acids lower due to the biohydrogenation of dietary unsaturated fatty acids by rumen bacteria [54]. However, these results demonstrate that although lamb meat has higher levels of SFA and lower ratio of polyunsaturated:SFA, supplementation with CT improved this health attribute. The n6:n3 ratio did not change as a function of the supplementation with CT. On average, it was 22.7. Higher amounts of unsaturated fatty acids and this relationship is positive, since this the consumption of SFA can be considered harmful to consumers because this presentation of fatty acid is associated with coronary disease, while many UFAs are linked to reductions in inflammation, stroke, oxidative stress and liver disorders.

Condensed tannins have a positive effect on stimulating the immune, anti-inflammatory, and antioxidant response [55]. In addition, the intake of flavonols and procyanidins favors the production of anti-inflammatory molecules [56], which can interfere with the proliferation of B and T lymphocytes, cells involved in immunological function with antibody production [57]. We observed an increase in the number of lymphocytes in the treatment group, which can be attributed to the action of the additive with flavonoids and gallic acid in its composition. They can interfere with the number of cells in the blood count [58]. The increase in B lymphocytes can stimulate the increase in globulins, which include immunoglobulins, which are responsible for the immune response.

Numerous factors can contribute to oxidative stress and increased levels of oxidizing compounds in the body. This imbalance in the oxidant/antioxidant relationship increases levels of oxidizing compounds that can potentiate some pathologies [59]. Oxidation processes typically occur due to the action of oxygen on the cell membrane, which contains lipids in its composition and is more prone to oxidation and the action of free radicals. We found that the provision of black wattle tannin extract in the lambs' diet improved the antioxidant response, increasing the activity of enzymes responsible for neutralizing free radicals and helping to minimize the impacts of lipid peroxidation on the cell membrane and its integrity. The CT in the extract helps reduce the production of reactive oxygen species, which reduces the production of free radicals and preserves cellular integrity, enhancing animal performance. This can be verified by the decrease in lipid peroxidation levels both in serum levels and in the meat of lambs from the group that received the extract, indicating that the oxidation of lipid compounds is occurring at a lower intensity. This is because polyphenols such as gallic acid and catechins, which belong to the flavonoid family and are typically found in the extract of black wattle, have an antioxidant function [60], allowing the antioxidant system to be stimulated by providing these compounds through the diet. The increase in antioxidant enzymes was seen (GSH at the serum level and in meat) measured indirectly through total thiols and Superoxide Dismutase (SOD) in meat. Other studies verified the antioxidant action of these compounds [61–63], reporting the ability of polyphenols to neutralize free radicals, increasing the activity of antioxidant enzymes and promoting relief from oxidative stress. Similar results were found by researchers [64], who reported an increase in the levels of antioxidant enzymes when providing grape residue containing flavonoids, including catechins, anthocyanins, and procyanidins.

5. Conclusions

The inclusion of black acacia CT in the lambs' diet showed benefits in modulating the antioxidant response and in the fatty acid profile of the meat, as well as improving carcass yield and meat fat percentage. However, there was no significant impact on growth performance and feed intake. These results highlight the effectiveness of CT in improving meat quality and overall animal health without compromising productive performance.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/fermentation10120630/s1>, Table S1: Standardization of the methodology used to quantify the levels of short-chain fatty acids in rumen liquid; Table S2: Treatment vs. day interaction and day effect in serum biochemistry, oxidation biomarkers, and hematological variables of lambs fed or not with condensed tannins added to the concentrate; Figure S1: Growth curve (mean and standard error of body weight) during the experimental period: control vs. condensed tannins. Day effect was observed ($p < 0.001$).

Author Contributions: A.L.R.B. and A.S.D.S. contributed to the design and implementation of the research, to the analysis of the results. R.W. and A.P.K. helped in the elaboration of the project and its execution and financing. A.L.R.B., A.L.F.d.S., I.Z., G.L.D., L.N., V.L.M. and R.V.P.L. participated in the execution of the experiment and collection of samples and data. A.d.C.M., J.N.N., B.F.B. and B.K. did the laboratory analysis. All authors discussed the results and contributed to the final manuscript. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Institutional Review Board Statement: The UDESC Animal Use Ethics Committee submitted and approved this work under protocol number 3704240422.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Data such as the authors may be made available if the reader is interested and requests it.

Acknowledgments: We would like to thank UDESC, CAPES, CNPq, FAPESC and SETA for their technical and scientific support.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest.

References

1. Avila, A.S.; Zambom, M.A.; Faccenda, A.; Fischer, M.L.; Anschau, F.A.; Venturini, T.; Tinini, R.C.R.; Dessbesell, J.G.; Faciola, A.P. Effects of black wattle (*Acacia mearnsii*) condensed tannins on intake, protozoa population, ruminal fermentation, and nutrient digestibility in jersey steers. *Animals* **2020**, *10*, 1011. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
2. Guerra, C.C. *Polyphenols of Grapes and Wine*; Embrapa Grape and Wine: Bento Gonçalves, Brazil, 2012.
3. De Jesus, N.Z.T.; de Souza Falcão, H.; Gomes, I.F.; de Almeida Leite, T.J.; de Moraes Lima, G.R.; Barbosa-Filho, J.M.; Tavares, J.F.; da Silva, M.S.; de Athayde-Filho, P.F.; Batista, L.M. Tannins, peptic ulcers and related mechanisms. *Int. J. Mol. Sci.* **2012**, *13*, 3203–3228. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
4. Guimarães, L.J.; Zundt, M.; Tsujiguchi, M.P.; Giotto, F.M.; Barbosa, M.J.P.T.; Grandis, F.A.; Silva, I.G.; Pereira, M.C.S.; Ribeiro, E.L.A. The use of condensed tannin in lambs' diet alters the rumen protozoa population without affecting growth performance. *Small Rumin. Res.* **2023**, *229*, 107122. [\[CrossRef\]](#)
5. Adejoro, F.A.; Hassen, F.; Akanmu, A.M.; Morgavi, D.P. Replacing urea with nitrate as a non-protein nitrogen source increases lambs' growth and reduces methane production, whereas acacia tannin has no effect. *Anim. Feed Sci. Technol.* **2020**, *259*, 114360. [\[CrossRef\]](#)
6. Yanza, Y.R.; Fitri ASuwignyo, B.; Kumalasari, N.R.; Irawan, A.; Jayanegara, A. The utilization of tannin extract as a dietary additive in ruminant nutrition: A meta-analysis. *Animals* **2021**, *11*, 3317. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
7. Luciano, G.; Vasta, V.; Monahan, F.J.; López-Andrés, P.; Biondi, L.; Lanza, M.; Priolo, A. Antioxidant status, colour stability and myoglobin resistance to oxidation of longissimus dorsi muscle from lambs fed a tannin-containing diet. *Food Chem.* **2011**, *124*, 1036–1042. [\[CrossRef\]](#)
8. Mu, C.; Yang, W.; Wang, P.; Zhao, J.; Hao, X.; Zhang, J. Effects of high-concentrate diet supplemented with grape seed proanthocyanidins on growth performance, liver function, meat quality, and antioxidant activity in finishing lambs. *Anim. Feed Sci. Technol.* **2020**, *266*, 114518. [\[CrossRef\]](#)
9. Vasta, V.; Daghighi, M.; Cappucci, A.; Buccioni, A.; Serra, A.; Viti, C.; Mele, M. Invited review: Plant polyphenols and rumen microbiota responsible for fatty acid biohydrogenation, fiber digestion, and methane emission: Experimental evidence and methodological approaches. *J. Dairy Sci.* **2019**, *102*, 3781–3804. [\[CrossRef\]](#)
10. Costa, E.I.d.S.; Ribeiro, C.V.D.M.; Silva, T.M.; Batista, A.S.M.; Vieira, J.F.; Barbosa, A.M.; da Silva Júnior, J.M.; Bezerra, L.R.; Pereira, E.S.; Oliveira, R.L. Effect of dietary condensed tannins inclusion from *Acacia mearnsii* extract on the growth performance, carcass traits and meat quality of lambs. *Livest. Sci.* **2021**, *253*, 104717. [\[CrossRef\]](#)
11. Frutos, P.; Hervás, G.; Giráldez, F.J.; Mantecón, A.R. Tannins and ruminant nutrition: A review. *Span. J. Agric. Res.* **2004**, *2*, 191–202. [\[CrossRef\]](#)
12. Orlandi, T.; Kozloski, G.V.; Alves, T.P.; Mesquita, F.R.; Ávila, S.C. Digestibility, ruminal fermentation and duodenal flux of amino acids in steers fed grass forage plus concentrate containing increasing levels of *Acacia mearnsii* tannin extract. *Anim. Feed Sci. Technol.* **2015**, *210*, 37–45. [\[CrossRef\]](#)
13. Dos Santos, F.M.; Bezerra, L.R.; Vieira, J.F.; Marcelino, P.D.R.; Barbosa, A.M.; Pereira Filho, J.M.; Arce-Cordero, J.A.; Ribeiro, C.V.D.M.; Silva, T.M.; Oliveira, R.L. Fatty acid profile, physicochemical composition and carcass traits of young Nellore bulls fed *Acacia mearnsii* extract. *Meat Sci.* **2024**, *216*, 109579. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
14. García Salas, A.; Bárcena-Gama, J.R.; Ventura, J.; Muñoz-García, C.; Escobar-España, J.C.; Crosby, M.M.; Hernandez, D. Bioaccessibility of condensed tannins and their effect on the physico-chemical characteristics of lamb meat. *PeerJ* **2024**, *12*, e17572. [\[CrossRef\]](#)
15. Parente, H.N.; Machado, T.M.M.; Carvalho, F.C.; Garcia, R.; Rogério, M.C.P.; Barros, N.N.N.; Zanine, A.M. Performance of confined sheep fed different diets. *Arq. Bras. Med. Veterinária Zootec.* **2009**, *61*, 460–466. [\[CrossRef\]](#)
16. National Research Council (NRC). *Nutrient Requirements of Small Ruminants: Sheep, Goats, Cervids, and New World Camelids*; The National Academies Press: Washington, DC, USA, 2007. [\[CrossRef\]](#)
17. Yuste, S.; Amanzougarene, Z.; de la Fuente, G.; Fondevila, M.; de Vega, A. Effects of partial substitution of barley with maize and sugar beet pulp on growth performance, rumen fermentation and microbial diversity shift of beef calves during transition from a milk and pasture regimen to a high concentrate diet. *Livest. Sci.* **2020**, *238*, 104071. [\[CrossRef\]](#)
18. Dirksen, G.; Gründer, H.D.; Stöber, M. Digestive system. In *Clinical Examination of Cattle*, 3rd ed.; Rosenberger, G., Ed.; Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, Brazil, 1993; pp. 166–228.

19. Dacoreggio, M.; Moroni, L.; Kempka, A. Antioxidant, antimicrobial and allelopathic activities and surface disinfection of the extract of *Psidium cattleianum* sabine leaves. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* **2019**, *21*, 101295. [\[CrossRef\]](#)
20. Folin, O.; Ciocalteu, V. A colorimetric method for the determination of phenols and phenolic compounds. *J. Biol. Chem.* **1983**, *22*, 305–308. [\[CrossRef\]](#)
21. Bonoli, M.; Bendini, A.; Cerretani, L.; Lercker, G.; Gallina Toschi, T. Qualitative and semiquantitative analysis of phenolic compounds in extra virgin olive oils as a function of the ripening degree of olive fruits by different analytical techniques. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 7026–7032. [\[CrossRef\]](#)
22. Najafian, L.; Babji, A.S. Production of bioactive peptides using enzymatic hydrolysis and identification of antioxidant peptides from the sarcoplasmic protein hydrolysate of patin (*Pangasius sutchi*). *J. Funct. Foods* **2014**, *9*, 280–289. [\[CrossRef\]](#)
23. Re, R.; Pellegrini, N.; Proteggente, A.; Pannala, A.; Yang, M.; Rice-Evans, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic. Biol. Med.* **1999**, *26*, 1231–1237. [\[CrossRef\]](#)
24. Makkar, H.P.S. *Quantification of Tannins in Tree Foliage*; Laboratory Manual; FAO/IAEA: Vienna, Austria, 2000; 26p.
25. Silva, D.J.; Queiroz, A.C. *Food Analysis: Chemical and Biological Methods*, 3rd ed.; UFV: Viçosa, Brazil, 2002.
26. AOAC. *Official Methods of Analysis*, 16th ed.; Method 973.18; Association of Official Analytical Chemists: Arlington, VA, USA, 1997.
27. Komarek, A.R. An improved method for using polyester bags to determine the fiber content in forages. *J. Anim. Sci.* **1993**, *71* (Suppl. 1), 220.
28. Senger, C.C.D.; Kozloski, G.V.; Bonnacarrère Sanchez, L.M.; Mesquita, F.R.; Alves, T.P.; Castagnino, D.S. Evaluation of autoclave procedures for fibre analysis in forage and concentrate feedstuffs. *Anim. Feed Sci. Technol.* **2008**, *146*, 169–174. [\[CrossRef\]](#)
29. Mertens, D.R.; Allen, M.; Carmany, J.; Clegg, J.; Davidowicz, A.; Drouches, M.; Frank, K.; Gambin, D.; Garkie, M.; Gildemeister, B.; et al. Gravimetric Determination of Amylase-Treated Neutral Detergent Fiber in Feeds with Refluxing in Beakers or Crucibles: Collaborative Study. *J. AOAC Int.* **2002**, *85*, 1217–1240.
30. Bligh, E.G.; Dyer, W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* **1959**, *37*, 911–917. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
31. Kaneco, J.J.; Harvey, J.W.; Bruss, M.L. *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*, 5th ed.; Academic Cambridge: Davis, MA, USA, 1997.
32. Militello, L.; El-Khoury, J.M.; Durant, T.J.S. Accounting for differences between serum and plasma: An indirect approach to derive reference intervals for total protein, albumin, and globulin. *Clin. Chim. Acta* **2024**, *562*, 119851. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
33. Jentzsch, A.M.; Bachmann, H.; Fürst, P.; Biesalski, H.K. Improved analysis of malondialdehyde in human body fluids. *Free Radic. Biol. Med.* **1996**, *20*, 251–256. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
34. Ohkawa, H.; Ohishi, N.; Yagi, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* **1978**, *95*, 351–358. [\[CrossRef\]](#)
35. Halliwell, B.; Gutteridge, J.M.C. *Free Radicals in Biology and Medicine*; Oxford University Press: Oxford, UK, 2007.
36. Habig, W.H.; Pabst, M.J.; Jakoby, W.B. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* **1974**, *249*, 7130–7139. [\[CrossRef\]](#)
37. Ellman, G.L. Tissue sulfhydryl groups. *Arch. Biochem. Biophys.* **1959**, *82*, 70–77. [\[CrossRef\]](#)
38. McCord, J.M.; Fridovich, I. Superoxide dismutase: An enzymatic function for erythrocyte (hemocuprein). *J. Biol. Chem.* **1969**, *244*, 6049–6055. [\[CrossRef\]](#)
39. Yamamoto, S.M.; Barbosa, J.C.; Silva, J.F.; Santos, L.S.; Oliveira, R.A. Inclusion of sunflower seeds in the diet of lambs on carcass quantitative characteristics and meat quality. *Semina Ciênc. Agric.* **2013**, *34*, 1925–1934. [\[CrossRef\]](#)
40. Hartman, L.; Lago, R.C. Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. *Lab. Pract.* **1973**, *22*, 475–477. [\[PubMed\]](#)
41. Visentainer, J.V.; Franco, M.R.B. *Fatty Acids in Oils and Fats: Identification and Quantification*; Varela: São Paulo, Brazil, 2006.
42. Silva, T.H.; Magnani, E.; de Andrade, J.G.P.; Amâncio, B.R.; Meurer, G.W.; Reolon, H.G.; Benedeti, P.D.B.; Paula, E.M.; Branco, R.H. Evaluation of increasing levels of condensed tannin extracted from *Acacia mearnsii* on performance, carcass traits, meat quality, methane emission, and health of finishing Nellore bulls. *Anim. Feed Sci. Technol.* **2024**, *315*, 116046. [\[CrossRef\]](#)
43. Nascimento, T.V.C.; Oliveira, R.L.; Menezes, D.R.; de Lucena, A.R.F.; Queiroz, M.A.Á.; Lima, A.G.V.O.; Ribeiro, R.D.X.; Bezerra, L.R. Effects of condensed tannin-amended cassava silage blend diets on feeding behavior, digestibility, nitrogen balance, milk yield and milk composition in dairy goats. *Animal* **2021**, *15*, 100015. [\[CrossRef\]](#)
44. Oliveira, L.N.; Pereira, M.A.N.; Oliveira, C.D.S.; Oliveira, C.C.; Silva, R.B.; Pereira, R.A.N.; DeVries, T.J.; Pereira, M.N. Effect of low dietary concentrations of *Acacia mearnsii* tannin extract on chewing, ruminal fermentation, digestibility, nitrogen partition, and performance of dairy cows. *J. Dairy Sci.* **2023**, *106*, 3203–3216. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
45. Ibrahim, S.L.; Hassen, A. Effect of non-encapsulated and encapsulated mimosa (*Acacia mearnsii*) tannins on growth performance, nutrient digestibility, methane and rumen fermentation of South African mutton Merino ram lambs. *Anim. Feed Sci. Technol.* **2022**, *294*, 115502. [\[CrossRef\]](#)
46. Pimentel, P.R.S.; Pellegrini, C.B.; Lanna, D.P.D.; Brant, L.M.S.; Ribeiro, C.V.D.M.; Silva, T.M.; Barbosa, A.M.; da Silva Júnior, J.M.; Bezerra, L.R.; Oliveira, R.L. Effects of *Acacia mearnsii* extract as a condensed-tannin source on animal performance, carcass yield and meat quality in goats. *Anim. Feed Sci. Technol.* **2021**, *271*, 114733. [\[CrossRef\]](#)
47. Patel, J.R.; Patil, S.S.; Pawar, M.M.; Gami, Y.M.; Gupta, J.P.; Chauhan, H.D.; Raval, S.H.; Modi, C.P. Effect of Sunflower Oil Supplementation on Milk Production, Composition, Fatty Acid Profile and Blood Metabolites of Mehsana Buffaloes. *Asian J. Dairy Food Res.* **2023**, *43*, 31. [\[CrossRef\]](#)

48. Makmur, M.; Zain, M.; Sholikin, M.M.; Suharlina Jayanegara, A. Modulatory effects of dietary tannins on polyunsaturated fatty acid biohydrogenation in the rumen: A meta-analysis. *Heliyon* **2022**, *8*, e09828. [\[CrossRef\]](#)
49. Yang, Z.; Yang, K.; Zhang, X.; Yang, Q.; Zhang, Y.; Gao, J.; Qu, H.; Shi, J. Dietary Saturated, Monounsaturated, or Polyunsaturated Fatty Acids and Estimated 10-Year Risk of a First Hard Cardiovascular Event. *Am. J. Med.* **2023**, *136*, 796–803.e2. [\[CrossRef\]](#)
50. Jacondino, L.R.; Poli, C.H.E.C.; Tontini, J.F.; Corrêa, G.F.; Somacal, S.; Mello, R.O.; Leal, M.L.R.; Raimondo, R.F.S.; Riet-Correa, B.; Muir, J.P. *Acacia mearnsii* tannin extract and α -tocopherol supplementation in lamb diet: Effects on growth performance, serum lipid peroxidation and meat quality. *Anim. Feed Sci. Technol.* **2022**, *294*, 115483. [\[CrossRef\]](#)
51. Wood, J.D.; Richardson, R.I.; Nute, G.R.; Fisher, A.V.; Campo, M.M.; Kasapidou, E.; Sheard, P.R.; Enser, M. Effects of fatty acids on meat quality: A review. *Meat Sci.* **2021**, *66*, 21–32. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
52. Department of Health. Report on health and social subjects n° 46. In *Nutritional Aspects of Cardiovascular Disease*; H.M. Stationery Office: Richmond, UK, 1994.
53. Scollan, N.D.; Dewhurst, R.J.; Moloney, A.P. Improving the quality of products from grassland. In *Grassland: A Global Resource*; Wageningen Academic: Wageningen, The Netherlands, 2005; pp. 41–56.
54. Banskalieva, V.; Sahlu, T.; Goetsch, A.L. Fatty acid composition of goat muscles and fat depots: A review. *Small Rumin. Res.* **2000**, *37*, 255–268. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
55. Wang, S.; Li, Z.; Ma, Y.; Liu, Y.; Lin, C.C.; Li, S.; Zhan, J.; Ho, C.T. Immunomodulatory effects of green tea polyphenols. *Molecules* **2021**, *26*, 3755. [\[CrossRef\]](#)
56. Efraim, P.; Alves, A.B.; Jardim, D. Revisão: Polifenóis em cacau e derivados: Teores, fatores de variação e efeitos na saúde. *Braz. J. Food Technol.* **2011**, *14*, 181–201. [\[CrossRef\]](#)
57. Cao, J.; Xu, H.; Yu, Y.; Xu, Z. Regulatory roles of cytokines in T and B lymphocytes-mediated immunity in teleost fish. *Dev. Comp. Immunol.* **2023**, *144*, 104621. [\[CrossRef\]](#)
58. Jiang, D.X.; Zhang, M.H.; Zhang, Q.; Chen, Y.S.; Ma, W.J.; Wu, W.P.; Mu, X.; Chen, W. Influence of gallic acid on porcine neutrophils phosphodiesterase 4, IL-6, TNF- α and rat arthritis model. *J. Integr. Agric.* **2015**, *14*, 758–764. [\[CrossRef\]](#)
59. Esmaeeli, S.; Hoseinirad, S.M.; Rajabian, M.; Taheri, A.R.; Berenji, F.; Hashemy, S.I. Evaluation of the oxidant-antioxidant balance, isoprostane and quantitative CRP in patients with cutaneous leishmaniasis. *Microb. Pathog.* **2019**, *137*, 103738. [\[CrossRef\]](#)
60. Mahindrakar, K.V.; Rathod, V.K. Ultrasonic assisted aqueous extraction of catechin and gallic acid from *Syzygium cumini* seed kernel and evaluation of total phenolic, flavonoid contents and antioxidant activity. *Chem. Engin. Proc. Process Intensif.* **2020**, *149*, 107841. [\[CrossRef\]](#)
61. Kearns, M.; Ponnampalam, E.N.; Jacquier, J.C.; Grasso, S.; Boland, T.M.; Sheridan, H.; Monahan, F.J. Can botanically-diverse pastures positively impact the nutritional and antioxidant composition of ruminant meat?—Invited review. *Meat Sci.* **2023**, *197*, 109055. [\[CrossRef\]](#)
62. Huang, Q.; Liu, X.; Zhao, G.; Hu, T.; Wang, Y. Potential and challenges of tannins as an alternative to in-feed antibiotics for farm animal production. *Anim. Nutr.* **2018**, *4*, 137–150. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
63. Ogawa, S.; Yazaki, Y. Tannins from *Acacia mearnsii* De Wild. Bark: Tannin determination and biological activities. *Molecules* **2018**, *23*, 837. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
64. Molosse, V.L.; Deolindo, G.L.; Cécere, B.G.; Marcon, H.; da Rosa, G.; Vedovatto, M.; Zotti, C.A.; Silva, A.D.; Fracasso, M.; Morsch, V.M.; et al. Effect of dietary supplementation with grape residue flour on weight gain, metabolic profile, leukogram, proteinogram and antioxidant response in suckling lambs. *Res. Vet. Sci.* **2021**, *139*, 112–120. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

The effects of açai oil addition in tilapia diets on performance, hepatic energy metabolism enzymes and antioxidant responses

Tânia C. Leite¹ | Fernanda Picoli²  | Diogo de A. Lopes^{1,2} | Matheus D. Baldissera³  | Carine F. Souza³  | Bernardo Baldisserotto³  | Ana Paula O. Costa¹ | Luisa Nora¹ | Alexandre H. Marcelino¹ | Aleksandro S. Da Silva^{1,2} 

¹Department of Animal Science, State University of Santa Catarina (UDESC), Chapecó, Brazil

²Postgraduate Program in Animal Science, UDESC, Chapecó, Brazil

³Pharmacology Program, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, Brazil

Correspondence

Aleksandro S. Da Silva, Department of Animal Science, State University of Santa Catarina (UDESC), Chapecó, Brazil.
Email: aleksandro.silva@udesc.br

Abstract

The aim of the present study was to determine whether açai oil (*Euterpe oleraceae*) addition in the diets of juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) in biofloc system would stimulate hepatic energy metabolism and antioxidant responses. Treatments are as follows: T0 (6%-soybean oil), T1 (1%-AÇAI; 5%-SOY), T3 (3% AÇAI; 3%-SOY) and T6 (6%-AÇAI). In the liver, reactive oxygen species levels were significantly lower in T1, T3 and T6 than in T0, lipid peroxidation levels were significantly lower in T3 and T6, and nitric oxide levels were significantly lower in the T6 than in T0. Glutathione peroxidase activity was significantly higher in the T3 and T6 than in T0, while superoxide dismutase activity and total antioxidant capacity levels were significantly higher in the T6 than in T0. Adenylate kinase activity was significantly lower in the T6 than in T0. These results suggest that the açai oil addition in Nile tilapia diets stimulated antioxidant responses.

KEYWORDS

Açai, antioxidant power, biochemistry, performance

1 | INTRODUCTION

Antioxidants are responsible for inhibiting or reducing the damage caused by oxidative reactions, consequently reducing levels of free radicals, a desirable biological effect (Bianchi & Antunes, 1999); in elevated concentrations, they impair animal health and growth. First, antioxidants prevent free radicals from forming; subsequently, they repair damage to DNA molecules and reconstitute damaged membranes. Antioxidants such as carotenoids and flavonoids can be obtained through the diet itself, as can vitamins C, E and A (Erdogan & Arslan, 2019; Qiang et al., 2019). Also, recent evidences have suggested the improvement on adenylate kinase (AK) and pyruvate kinase (PK) as important pathways linked to enhancement on fish growth, as observed by Baldissera et al. (2019) for Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) feed with biocholine. These two enzymes develop a pivotal role in energy transfer and distribution, as well as

securing the homeostasis between cellular adenosine triphosphate (ATP) consumption and production (Dzeja & Terzic, 2003). The PK is an irreversible enzyme of glycolysis pathway that forms pyruvate and ATP, exerting an essential role to energy production in tissues with elevated energy requirements, as liver (Wang et al., 2002). Also, AK is recognized as a facilitator of energetic communication between nucleus and cytosol through the reversible transfer of the γ -phosphate group to adenosine monophosphate (AMP), and consequent release of two molecules of adenosine diphosphate (ADP) (Dzeja & Terzic, 2009).

For these reasons, additives or ingredients with antioxidant properties are recommended to prevent the negative effects of oxidative imbalance in fish (Baldissera et al., 2019). The fish liver has important physiological functions related to fish digestibility, either in terms of detoxification or in terms of biotransformation; simultaneously, it is important to mention that liver tissue adapts to environmental

conditions through continuous adjustments of its structure, assisting the nutrient metabolism process, energy storage and elimination of nitrogenous components (Segner, 1998). To reduce liver overload, plant-based products such as antioxidant supplements have been explored, including biocholine (Baldissera et al., 2019). According to Bianchi and Antunes (1999), antioxidants are responsible for inhibiting or reducing the damage caused by free radicals. First, antioxidants prevent free radicals from forming; subsequently, they repair damage to DNA molecules as well as reconstituting damaged membranes.

Açaí oil (*Euterpe oleraceae*) may be an option to improve hepatic antioxidant and metabolism systems (because the fruit and/or its by-products have rich fatty acid profiles; Do Nascimento, 2008). According to the literature, açaí possesses monounsaturated and polyunsaturated fatty acids that are desirable for consumption and are associated with reduced risk of cardiovascular diseases in humans (Do Nascimento, 2008). According to Rogez (2000), açaí oil is similar to avocado and olive oil in that it contains beneficial fatty acids. Açaí oil is also rich in anthocyanins responsible for giving the fruit its colour. It also modulates lipid metabolism, minimizing the damage caused by oxidative stress in a rat model (Cedrim et al., 2018). A recent study conducted by Dos Santos et al. (2019) demonstrated that the addition of açaí oil to the diets of dairy sheep increased milk yields as well as the levels of antioxidant compounds in milk, representing a possible positive effect for the human consumer. A study using clove basil and ginger oil as a supplement to the tilapia diet showed that 0.5% favoured growth and weight gain. Supplementation with both oils improved immune responses against pathogens present on fish farms (Fig ueiredo, 2017).

Due to feeding costs can be as high as 70% of all expenditures on a fish farm, making food the costliest part of the production system (Dossou et al., 2018, 2019). Nevertheless, high-quality balanced feeds as açaí oil provided in proper amounts contribute to high productivity rates, assisting with digestibility that helps to reduce effluents discharged into the environment. Therefore, the aim of this study was to determine whether the addition of açaí oil in the diet of Nile tilapia juveniles would stimulate hepatic energy metabolism and antioxidant responses.

2 | MATERIALS AND METHODS

2.1 | Açaí oil

Açaí and soybean oils were obtained from commercial companies (açaí oil—Óleos Gran®, São Paulo, SP, Brasil; soybean oil—Bunge Alimentos, Rondonópolis, MT, Brazil respectively). Fatty acid composition data present in açaí oil were presented by Dos Santos et al. (2019), noting the presence of palmitic acid (11.3%), stearic acid (1.81%), oleic acid (37.4%), linoleic acid (44.6%) and linolenic acid (3.45%). In soybean oil, these fatty acids were found to be present in the following proportions: palmitic acid (14.6%), stearic

acid (3.0%), oleic acid (30.3%), linoleic acid (45.5%) and linolenic acid (5.33%).

2.2 | Biofloc production and maintenance

Each experimental unit received an initial inoculum of biofloc (10 L) from previous Nile tilapia cultures in a biofloc system. Chlorine-free water was then added to a 70 L usable volume. To maintain the biofloc microbial community and appropriate cultivation conditions, a C:N ratio of 15:1 (Emerenciano et al., 2017) was maintained using molasses from sugarcane powder as an external carbon source.

2.3 | Water quality monitoring

Water quality parameters such as temperature and dissolved oxygen (oximeter ALFAKIT®, model AT170, Florianópolis-SC, Brazil) were monitored twice daily (0800 and 1700 hours). pH (pHmetro ALFAKIT®, model AT315, Florianópolis-SC, Brazil) and total ammonia (photocolorimeter ALFAKIT®, model AT100P, Florianópolis-SC, Brazil) levels in each experimental unit were used.

The pH at various time points of the experiment, and verified variation from 5.4 to 6.9 (T0 and T1), 5.4 to 7.1 (T3 and T6).

The ammonia at various time points of the experiment, and verified variation from 0.1 to 1.5 (T0), 0.1 to 1.3 (T1), 0.2 to 1.5 (T3), 0.2 to 1.2 mg/L (T6).

The water temperature parameters fluctuated throughout the day, with a mean of $24.8 \pm 6.47^\circ\text{C}$ in the morning and $27.7 \pm 4.38^\circ\text{C}$ in the afternoon. In general, the water temperature fluctuated in all treatments between 18 and 29.6°C .

The mean oxygen dissolved was 8.08 ± 2.09 mg/L in the morning and 5.98 ± 2.75 mg/L in the afternoon. In general, the water oxygen dissolved has fluctuated in all treatments between 4.2 and 9.4 mg/L.

All results of the water quality parameters of the biofloc cultivation are agreed with the appropriate values for tilapia (El-Sayed, 2006).

2.4 | Fish

Juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) were obtained from a commercial fish farm; average initial weight was 35 g. Prior to the start of the experiment, these animals were kept for 14 days in a polyethylene circular box (useful volume: 350 L) with constant aeration and temperature control (-28°C). During this period, maintenance feed (32% crude protein) was provided three times daily.

Subsequently, the juveniles were allocated to polyethylene circular boxes (usable volume: 70 L) with individual aeration using a porous stone (1×2 cm) coupled to a radial air compressor (ASTEN® model CRC-2330 11 SS, 0.80 kW, 1.10 cv, monophasic, 50/60 Hz, 4.1 A, 2.75 m³/min, São Paulo/SP, Brazil) for a trial period of 31 days. Each unit contained a thermostat-controlled heater (Roxin Ht-1300,

TABLE 1 Chemical composition of the feeds used in the experiment by treatment

Analyse	T0	T1	T3	T6
Dry matter, %	93.17	92.98	93.14	93.24
Crude protein, %	26.49	26.74	26.99	27.08
Crude fat, %	8.19	8.02	8.27	8.11
Ash, %	18.79	18.07	18.41	18.65

Note: 1: Ingredients: moisture (max.) 100.00 g/kg; crude protein (min.) 240.00 g/kg. Etheral extract (min.) 40.00 g/kg; crude fibre (max.) 100.00 g/kg. Mineral matter (max.) 140.00 g/kg; calcium (min.) 10.00 g/kg; calcium (max.) 30.00 g/kg; phosphate (min.) 10.00 g/kg; sodium (min.) 3,000.00 mg/kg; Iron (min.) 30.00 mg/kg; copper (min.) 5.00 mg/kg; manganese (min.) 30.00 mg/kg; Zinc (min.) 60.00 mg/kg; iodine (min.) 1.00 mg/kg; cobalt (min.) 0.10 mg/kg; selenium (min.) 0.30 mg/kg; vitamin A (min.) 12,000.00 UI/kg; vitamin D3 (min.) 2,400.00 UI/kg; vitamin E (min.) 50.00 IU/kg; vitamin K3 (min.) 5.00 mg/kg; vitamin B1 (min.) 10.00 mg/kg; vitamin B2 (min.) 20.00 mg/kg; niacin (min.) 100.00 mg/kg; pantothenic acid (min.) 50.00 mg/kg; vitamin B6 (min.) 10.00 mg/kg; folic acid (min.) 4.00 mg/kg; biotin (min.) 0.20 mg/kg; vitamin B12 (min.) 40.00 mcg/kg; vitamin C (min.) 150.00 mg/kg.

Note 2: Treatments: T0 (inclusion of 6% of soybean oil, without addition of açai oil); T1 (1% açai; 5% soybean); T3 (3% açai; 3% soybean); T6 (inclusion of 6% of açai oil, without added soybean oil).

100 W, 220 V) to maintain the culture medium temperature at ~28°C throughout the experiment.

2.5 | Experimental design and diets

The juveniles were maintained in four experimental tanks and housed at 10 fish per tank. Because the objective of this study was to evaluate the effect of açai oil consumption on energy metabolism and oxidative status, each fish was considered an experimental unit. The feed used was a commercial brand (Nutripiscis® Engorda; 24% CP), ground with added the açai oil and/or soybean oil (isoproteic and isoenergetic diets), as follows: treatment T0 (inclusion of 6% of soybean oil, without addition of açai oil); T1 (1% açai; 5% soybean); T3 (3% açai; 3% soybean); T6 (inclusion of 6% of açai oil, without added soybean oil). Oils used in this study had similar energy values

(108 kcal), according to the manufacturer's guaranteed analysis, reason why soy oil was chosen as an ingredient in the control group.

After addition of the oils, the feed was homogenized and distilled water was added to provide consistency and allow pelleting (2–3-mm particles). Using biometrics, we calculated the oil content to be 6% of the biomass per tank per day.

Bromatological analyses were performed following the protocols established by Brazilian Compendium of Animal Feeding (2005). The results are displayed in Table 1.

2.6 | Data and sample collection

At the beginning of the experiment, initial biometry was performed with the weighing and measuring of the total and standard length of the fish. All fish were captured and sedated with eugenol (1 ml/L). Weighing was performed using a 0.01 g precision scale (Mars model ML 600, São Paulo, Brazil). For measuring the length, a crystal polystyrene ruler was used. Zootechnical performance was not the objective of this study; nevertheless, these additional data were added to the data set.

After the end of the experiment, the fish remained fasting for 12 hr to collect final biometrics (final weight and length) and liver collection. Fish ($n = 10$ by treatment) were anaesthetized with eugenol (1 ml/L) and euthanized by medullary section using methods approved by the National Council for Animal Experimentation Control (CONCEA), with ten fish per treatment being used for liver collection.

2.7 | Hepatic oxidant and antioxidant status

Livers were homogenized (1:10 w/v) in medium containing 120 mM potassium chloride and 30 mM buffer phosphate (pH 7.4) and centrifuged (800 × g, 10 min, 4°C). The supernatant fractions were frozen at -20°C. Protein concentrations were determined by the Coomassie blue method following the methodology described by Read and Northcote (1981) using bovine serum albumin as a standard.

TABLE 2 Body weight and size of tilapia fed diets containing various levels of açai oil

Variable	Moment	T0	T1	T3	T6	p-Value
Weight (g)	Initial	35.3 ± 2.4	35.8 ± 2.5	35.6 ± 2.8	35.2 ± 2.4	.96
	Final	62.4 ± 3.1	60.5 ± 8.3	55.6 ± 7.5	59.7 ± 7.7	.35
Total length (cm)	Initial	12.9 ± 0.4	12.9 ± 0.4	12.8 ± 0.4	12.8 ± 0.5	.97
	Final	17.7 ± 0.4	17.7 ± 0.6	17.2 ± 0.8	17.4 ± 0.5	.86
Partial length (cm)	Initial	10.2 ± 0.3	10.4 ± 0.5	10.3 ± 0.5	10.3 ± 0.4	.98
	Final	15.8 ± 0.4	15.0 ± 0.6	15.5 ± 0.6	15.4 ± 0.5	.87

Note: 1: No difference between the treatments (T0, T1, T3 and T6).

Note 2: treatments—T0 (inclusion of 6% of soybean oil, without addition of açai oil); T1 (1% açai; 5% soybean); T3 (3% açai; 3% soybean); T6 (inclusion of 6% of açai oil, without added soybean oil).

Reactive oxygen species (ROS) production was measured by determining oxidation of 2',7'-dichlorofluorescein (DCFH) (LeBel et al., 1992) DCFH-DA is hydrolysed by intracellular esterases to form non-fluorescent DCF, which is then rapidly oxidized to form highly fluorescent DCF in the presence of ROS. DCF fluorescence intensity correlates to the amount of ROS formed. Fluorescence was measured using excitation and emission wavelengths of 480 and 535 nm respectively. A calibration curve was generated using DCF standards (0.1–1 μM), and data were expressed as micromoles DCF formed per mg of protein.

Lipid peroxidation (LPO) levels were measured using hepatic samples diluted in cold methanol (1:1 v/v) and centrifuged at $1,000 \times g$ for 10 min at 4 °C. This technique is based in the reaction of hydroperoxides with Fe^{2+} (FeSO_4) in an acid medium (H_2SO_4) in the presence of the dye xynol orange, as proposed by Monserrat et al. (2003) and reported in detail by da Silva et al. (2018). Hepatic LPO was measured in the supernatants using a microplate reader at 550 nm, with cumene hydroperoxide as the standard.

Levels of NO_x were measured according to the Griess method that indirectly quantifies (400 nm) the levels of nitrite/nitrate using 50 μL sample as previously described in detail by Tatsch et al. (2011). Results were expressed as U/L.

The activity of superoxide dismutase (SOD) was determined according to the auto-oxidation principle of pyrogallol, inhibited in the presence of SOD. The optical density change was determined kinetically for two minutes at 420 nm, at ten-second intervals, according to methodology described by Beutler (1984). Activity was expressed as U/mg protein.

The activity of glutathione S-transferase (GST) was measured according to Mannervik and Guthenberg (1981) with slight modifications. GST activity was measured by the rate of formation of dinitrophenyl-S-glutathione at 340 nm in a medium containing 50 mM potassium phosphate, pH 6.5, 1 mM GSH, 1 mM 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) as substrate, and tissue supernatants (approximately 0.045 mg of protein). The results were expressed as U/mg protein.

The activity of glutathione peroxidase (GPx) was measured using tert-butylhydroperoxide as substrate (Wendel, 1981). Enzyme activity was determined by monitoring the NADPH disappearance at 340 nm in a medium containing 100 mM potassium phosphate buffer/1 mM EDTA, pH 7.7, 2 mM GSH, 0.1 U/mL GR, 0.4 mM azide, 0.5 mM tert-butyl hydroperoxide, 0.1 mM NADPH and tissue supernatants. The results were expressed as U/mg protein.

Antioxidant capacity against peroxy radicals (ACAP) in hepatic samples was done. This fluorometric method is based on the thermal decomposition (37°C) of ABAP (2,2'-azobis(2-methylpropionamide) dihydrochloride that generates peroxy radicals, as established by Amado et al. (2009) and reported in detail by da Silva et al. (2018). Serum was used to detect fluorescence using wavelengths 485 nm (excitation) and 520 nm (emission) for 40 min at 37°C. The results were expressed as fluorescence U/mg protein.

2.8 | Analysis of hepatic energy metabolism enzymes

To evaluate enzymes belonging to the phosphoryl transfer network, 100 mg of liver was washed in SET buffer (0.32 M sucrose, 1 mM EGTA, 10 mM Tris-HCl, pH 7.4) and homogenized (1:10 w/v) in the same SET buffer with a Potter-Elvehjem glass homogenizer. The homogenates were centrifuged at $800 \times g$ for 10 min at 4°C. Some of these supernatants were used to evaluate AK

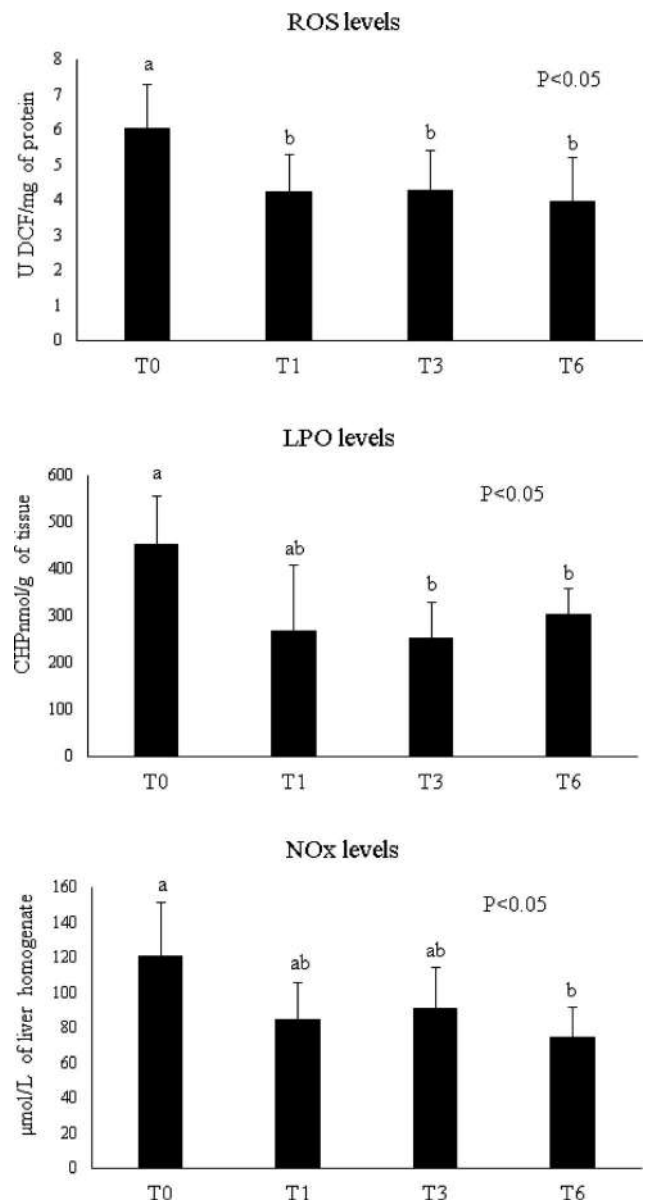


FIGURE 1 Levels of reactive oxygen species (ROS), lipoperoxidation (LPO) and nitrite/nitrate (NOx) in the liver of tilapia fed a diet containing different levels of açai oil. Note: *treatments—T0 (inclusion of 6% of soybean oil, without addition of açai oil); T1 (1% açai; 5% soybean); T3 (3% açai; 3% soybean); T6 (inclusion of 6% of açai oil, without added soybean oil); **different letters (a or b) under bar/treatment in the graph illustrates statistical difference ($p \leq .05$) between treatments (T0, T1, T3 and T6)

activity; the pellets were discarded, and the supernatants were once again centrifuged at $10,000 \times g$ for 15 min at 4°C . The supernatants containing cytosol were collected for determination of PK.

Hepatic pyruvate kinase (PK) activity was assayed according to the protocol established by Leong et al. (1981) and published in detail by Baldissera et al. (2017). The activity was expressed as pmol pyruvate formed/min/mg protein.

Hepatic adenylate kinase (AK) activity was measured with a coupled enzyme assay with hexokinase (HK) and glucose 6-phosphate dehydrogenase (G6PD), according to Dzeja et al. (1999), and published in detail by Baldissera et al. (2017). The activity was expressed in nmol ATP formed/min/mg protein.

2.9 | Statistical analysis

The data did not present normal distribution; therefore, data were transformed to logarithm for normalization. Then, the data were subjected to one-way analysis of variance and, when significant means were obtained, the Tukey test at 5% probability ($p < .05$) was applied. Results were expressed as mean and standard deviation.

3 | RESULTS

3.1 | Body weight and size

There were no significant differences with respect to all parameters at the beginning and end of the experiment (Table 2).

3.2 | Hepatic oxidant and antioxidant status

Hepatic ROS levels were significantly lower in treatments T1, T3 and T6 than in T0 (Figure 1a). Similarly, liver TPO levels in treatments T3 and T6 were significantly lower than those of T0 ($p < .05$; Figure 1b). Finally, treatment T6 NOx levels were significantly lower than those of control treatment ($p < .05$; Figure 1c).

When açai oil was added to tilapia diets, there were elevated antioxidant responses (Figure 2). GPx activity in treatments T3 and T6 treatments were significantly greater than those of control ($p < .05$; Figure 2a). GST activity levels did not significantly differ between treatments ($p > .05$; Figure 2b). SOD activity was significantly higher in treatment T6 than in control ($p < .05$; Figure 2c). Like ACAP levels, they were significantly higher in treatment T6 than in control ($p < .05$; Figure 2d).

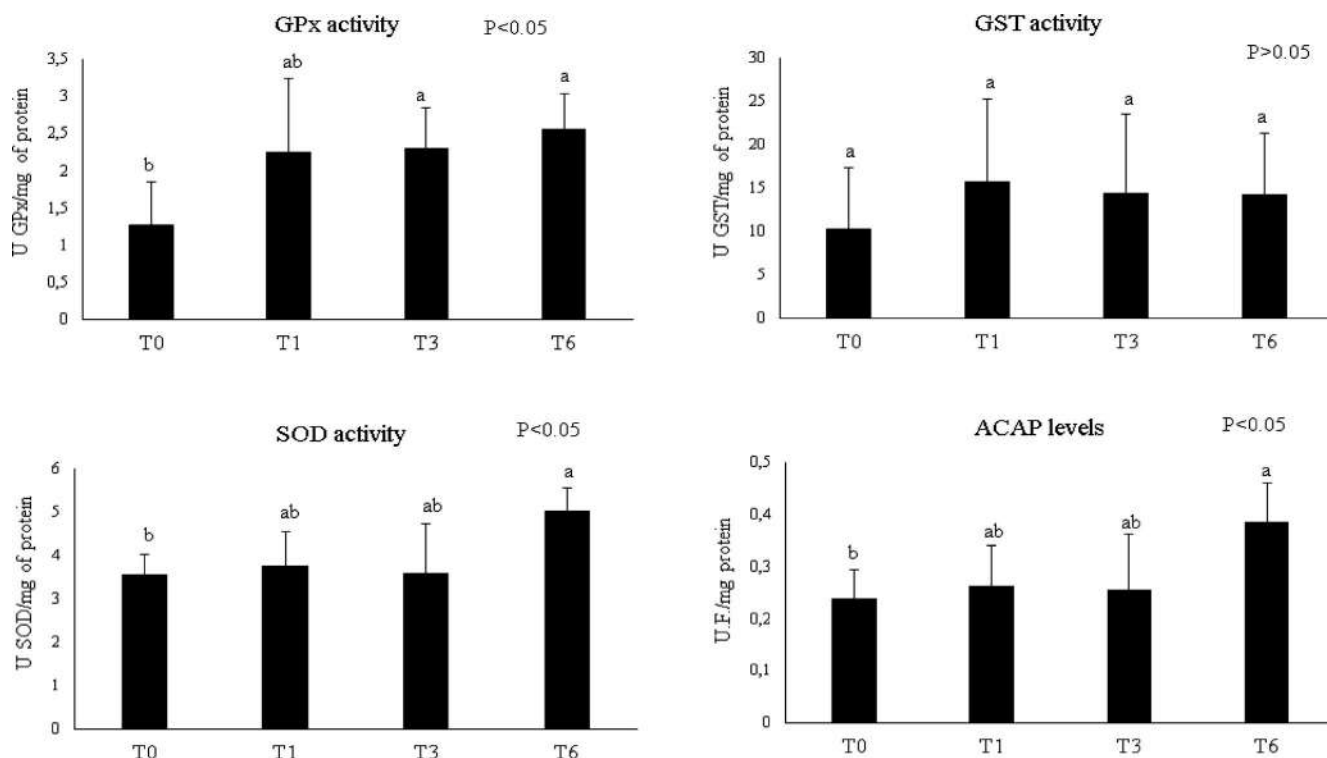


FIGURE 2 Glutathione peroxidase (GPx), glutathione S-transferase (GST), superoxide dismutase (SOD) activity and total antioxidant capacity (ACAP) in liver from diet-fed tilapias containing different levels of açai oil. Note: *treatments—T0 (inclusion of 6% of soybean oil, without addition of açai oil); T1 (1% açai; 5% soybean); T3 (3% açai; 3% soybean); T6 (inclusion of 6% of açai oil, without added soybean oil); **different letters (^a or ^b) under bar/treatment in the graph illustrate statistical difference ($p \leq .05$) between treatments (T0, T1, T3 and T6)

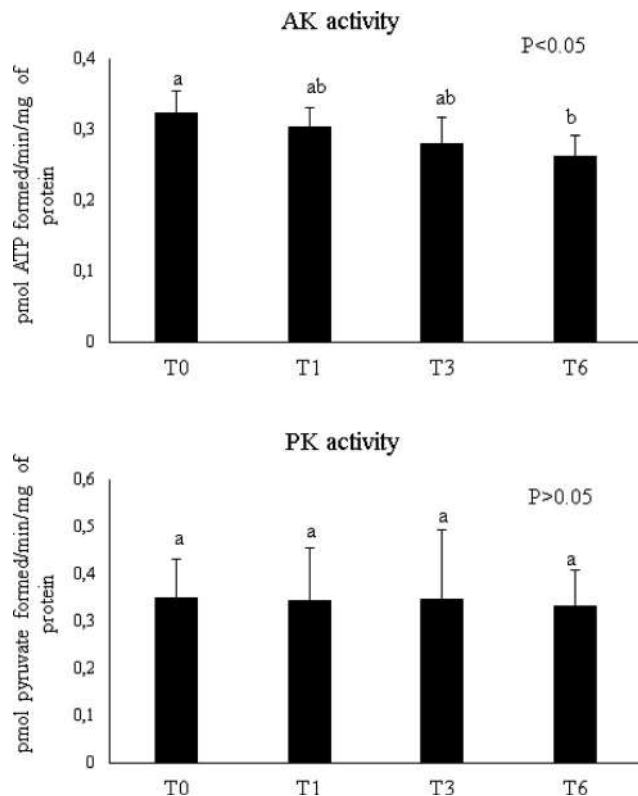


FIGURE 3 Adenylate kinase (AK) and pyruvate kinase (PK) activity in the liver of tilapias fed diet containing different levels of açai oil. Note: treatments—T0 (inclusion of 6% of soybean oil, without addition of açai oil); T1 (1% açai; 5% soybean); T3 (3% açai; 3% soybean); T6 (inclusion of 6% of açai oil, without added soybean oil); **different letters (^a or ^b) under bar/treatment in the graph illustrate statistical difference ($p \leq .05$) between treatments (T0, T1, T3 and T6)

3.3 | Hepatic enzymatic energy metabolism

The results of liver enzymatic activity related to energy metabolism in tilapia are shown in Figure 3. The activity of AK was significantly lower in the livers of tilapia that had the inclusion of 6% of açai oil in the diet (T6) compared with the control ($p < .05$; Figure 3a). For PK activity, there was no significant difference between treatments ($p > .05$; Figure 3b).

4 | DISCUSSION

Favourable environmental conditions are required for efficient and satisfactory fish production. These include temperature, oxygen and water pH, as well as a balanced and quality diet. Plant-based products may improve production and increase product acceptability in commercial fish production. In the present study, açai oil was used because of its antioxidant properties so as to reduce free radicals and lipid peroxidation, both of which adversely affect fish growth and fish health due to prejudice of the antioxidant system (Baldissera et al., 2020).

Because of the positive results we found for the hepatic antioxidant system, we will perform studies in the future aiming to evaluate performance in other animals, because such research has already reported productive efficiency when using açai by-products. For example, açai flour in the feed of laying hens improved bird health and produced higher egg production and quality (Fortuoso et al., 2019). Dos Santos et al. (2019) reported that the addition of açai oil to the diets of dairy sheep increased milk yield and production efficiency rates.

In the present study, for all treatments tested, dietary açai oil reduced ROS levels; this may be associated with increased antioxidant defences in fish mediated by antioxidants that activate enzymatic or non-enzymatic pathways (Maritim et al., 2003). A possible explanation for the low levels of ROS is the high antioxidant capacity; however, the difference was significantly observed only at T6. This reduction of free radicals also can be explained by the action of anthocyanins that in turn are responsible for causing reduction or even inhibition of these cell-damaging agents (Gallori et al., 2004). In addition to anthocyanins, açai oil also contains flavonoids that have antioxidant, anti-inflammatory and antibacterial properties. The antioxidant mechanisms of flavonoids assist in the extinction or elimination of free radicals, as well as inhibition of the formation of enzymes that generate reactive oxygen species (Kang et al., 2011; Packer & Luz, 2007). LPO levels were also lower in the treatments that contained the highest levels of açai oil (T3 and T6), as observed by Fortuoso et al. (2019) in egg yolks of laying hens supplemented with açai flour. According to Bezerra et al. (2016), polyunsaturated and monounsaturated fatty acids protect cells and improve animal health, as do the fatty acids found in açai that improve animal health via their anti-inflammatory and antioxidant properties. The highest level of açai oil (6%) reduced levels of NOx, an important free radical that has deleterious effects in excess quantities (Dusse et al., 2003). Because of its potent antioxidant effects, açai oil reduced NOx levels, possibly contributing to reduce inflammatory processes and tissue damage (Udani et al., 2011). GPx activity was elevated in treatments with higher levels of açai oil. In the present study, superoxide dismutase (SOD) activity was elevated at higher oil levels. When the diet of female rats was supplemented with açai, there was a reduction in SOD activity, similar to the standard diet. The authors therefore suggested that the components present in the açai pulp helped to prevent free radical formation (Souza, 2009).

The activity of AK was lower in the fish treated with 6% açai oil; this can be considered a negative effect of supplementation, because this enzyme doubles ATP production under energy stress conditions (Wang et al., 2002). AK exerts its role on maintenance of bioenergetic balance by reconvert two ADP molecules into one ATP and one adenosine monophosphate (AMP), effectively doubling energetic potential, a crucial step to improve intracellular energetic communication and metabolic monitoring in tissues with high and fluctuating energy demands, as is the case for liver (Dzeja & Terzic, 2009). Therefore, inhibition of AK prevents doubling of energy potential, possibly explaining the absence of weight gain; nevertheless, the

mechanism remains unknown. In this study, no significant difference was observed regarding hepatic PK activity, in agree to observed by Mathias et al. (2019) in heart of rats that received a diet supplemented with 5% acai pulp. According to these authors, the exact mechanism for absence of effects remains unknown, but appears linked to a dose-dependent effect.

5 | CONCLUSION

Açaí oil in tilapia diets stimulated antioxidant responses and consequent reduction in lipid peroxidation, as well as free radical formation in the liver. However, açaí oil had a negative impact on hepatic metabolism via inhibition of a key enzyme associated with ATP synthesis.

ACKNOWLEDGMENT

The authors would like to thank CAPES and CNPq for the financial support: scholarship and research (PQ).

CONFLICT OF INTEREST

The authors have declared no conflict of interest.

ETHICAL APPROVAL

The project was approved by the Animal Use Ethics Committee (CEUA) for research at the State University of Santa Catarina, protocol number 2894161018.

ORCID

Fernanda Picoli  <https://orcid.org/0000-0003-1631-9430>

Matheus D. Baldissera  <https://orcid.org/0000-0002-3280-8528>

Carine F. Souza  <https://orcid.org/0000-0001-9978-0454>

Bernardo Baldisserotto  <https://orcid.org/0000-0002-8770-0100>

Aleksandro S. Da Silva  <https://orcid.org/0000-0002-9860-1933>

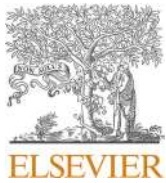
REFERENCES

- Amado, L. L., Garcia, M. L., Ramos, P. B., Freitas, R. F., Zafalon, B., Ferreira, J. L. R., Yunes, J. S., & Monserrat, J. M. (2009). A method to measure total antioxidant capacity against peroxyl radicals in aquatic organisms: Application to evaluate microcystins toxicity. *Science of the Total Environment*, 407, 2115–2123. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2008.11.038>
- Baldissera, M. D., Souza, C. F., Baldisserotto, B., Zimmer, F., Paiano, D., Petrolli, T. G., & Da Silva, A. S. (2019). Vegetable choline improves growth performance, energetic metabolism, and antioxidant capacity of fingerling Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture*, 501, 224–229. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.11.021>
- Baldissera, M. D., Souza, C. F., Santos, R. C. V., Stefani, L. M., Moreira, K. L. S., da Veiga, M. L., da Rocha, M. I. U. M., & Baldisserotto, B. (2017). *Pseudomonas aeruginosa* strain PA01 impairs enzymes of the phosphotransfer network in the gills of *Rhamdia quelen*. *Veterinary Microbiology*, 201, 121–125. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2017.01.016>
- Baldissera, M. D., Souza, C. F., Zeppenfeld, C. C., Velho, M. C., Klein, B., Abbad, L. B., Ourique, A. F., Wagner, R., Da Silva, A. S., & Baldisserotto, B. (2020). Dietary supplementation with nerolidol nanospheres improves growth, antioxidant status and fillet fatty acid profiles in Nile tilapia: Benefits of nanotechnology for fish health and meat quality. *Aquaculture*, 516, 734635. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734635>
- Beutler, E. (1984). Superoxide dismutase. In E. Beutler (Ed.), *Red cell metabolism. A manual of biochemical methods* (pp. 83–85). Grune & Stratton.
- Bezerra, V. S., Do Amaral, I. A., Damasceno, L. F. et al (2016). O açaí como fonte de ácidos graxos Ômega-9, Ômega-6 e Ômega-3. In: Embrapa Amapá-Resumo em anais de congresso (ALICE). In: Jornada Científica da Embrapa Amapá, 2, 2016, Macapá. Resumos... Macapá: Embrapa Amapá.
- Cedrim, P. C. A. S., Barros, E. M. A., & Nascimento, T. G. (2018). Antioxidant properties of açaí (*Euterpe oleracea*) in the metabolic syndrome. *Brazilian Journal of Food Technology*, 21, e2017092.
- Da Silva, B. J., Tarouco, F. M., de Godoi, F. G. A., Geihs, M. A., Abreu, F. E. L., Fillmann, G., Sandrini, J. Z., & da Rosa, C. E. (2018). Induction of oxidative stress by chlorothalonil in the estuarine polychaete *Laeonereis aurata*. *Aquatic Toxicology*, 196, 1–8.
- de Bianchi, M., & Antunes, L. M. G. (1999). Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. *Rev Nutr.*, 12, 123–130.
- de Souza, M. O. (2009). Suplementação da dieta com polpa do fruto do açaí (*Euterpe oleracea* Martius) melhora o perfil lipídico e a capacidade antioxidante-uma avaliação in vivo. 86 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto.
- Do Nascimento, R. J. (2008). Fatty acids composition of açaí pulp oil obtained by enzymatic technology and hexane. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 30, 498–502.
- dos Santos, D., Klauck, V., Campigotto, G., Alba, D. F., dos Reis, J. H., Gebert, R. R., Souza, C. F., Baldissera, M. D., Schogor, A. L. B., Santos, I. D., Wagner, R., Vedovatto, M., & Da Silva, A. S. (2019). Benefits of the inclusion of açaí oil in the diet of dairy sheep in heat stress on health and milk production and quality. *Journal of Thermal Biology*, 84, 250–258. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2019.07.007>
- Dossou, S., Koshio, S., Ishikawa, M., Yokoyama, S., Dawood, M. A. O., El Basuini, M. F., Olivier, A., & Zaineldin, A. I. (2018). Growth performance, blood health, antioxidant status and immune response in red sea bream (*Pagrus major*) fed *Aspergillus oryzae* fermented rapeseed meal (RM-Koji). *Fish & Shellfish Immunology*, 75, 253–262. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.01.032>
- Dossou, S., Koshio, S., Ishikawa, M., Yokoyama, S., El Basuini, M. F., Zaineldin, A. I., Mzengereza, K., Moss, A., Dawood, M. A. O. (2019). Effects of replacing fishmeal with fermented and non-fermented rapeseed meal on the growth, immune and antioxidant responses of red sea bream (*Pagrus major*). *Aquaculture Nutrition*, 25(2), 508–517.
- Dusse, L. M., Vieira, L. M., Carvalho, M. & Das, G. (2003). Carvalho M Das G (2003) Revisão sobre oxido nítrico. *J Bras Patol Med Lab*, 39(4), 435–450.
- Dzeja, P. P., & Terzic, A. (2003). Phosphotransfer networks and cellular energetics. *Journal of Experimental Biology*, 206(12), 2039–2047. <https://doi.org/10.1242/jeb.00426>
- Dzeja, P. P., & Terzic, A. (2009). Adenylate kinase and AMP signaling networks: Metabolic monitoring, signal communication and body energy sensing. *International Journal of Molecular Sciences*, 10, 1729–1772.
- Dzeja, P. P., Vitkevicius, K. T., Redfield, M. M., Burnett, J. C., & Terzic, A. (1999). Adenylate kinase-catalyzed phosphotransfer in the myocardium: Increased contribution in heart failure. *Circulation Research*, 84, 1137–1143. <https://doi.org/10.1161/01.RES.84.10.1137>
- El-Sayed, E. M. (2006). *Tilapia culture*. CABI Publications.
- Emerenciano, M., Martínez-Córdova, L. R., Martínez-Porchas, M., & Mirandabaeza, A. (2017). *Biofloc Technology (BFT): A tool for water quality management in aquaculture, water quality*. InTech. <https://doi.org/10.1016/j.bft.2017.01.001>

- www.intechopen.com/books/water-quality/biofloc-technology-bft-a-tool-for-water-quality-management-in-aquaculture
- Erdogan, M., & Arslan, T. (2019). Effects of vitamin E on growth and reproductive performance of pindani (*Pseudotropheus socolofi* Johnson, 1974). *Aquaculture*, 509, 59–66. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.05.019>
- Figueiredo, A. B. (2017) *Suplementação com óleos essenciais de manjeriça (Ocimum gratissimum L.) e gengibre (Zingiber officinale Rosc.) na dieta de tilápia-do-nilo (Oreochromis niloticus L.)*. Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Aquicultura, Florianópolis.
- Fortuoso, B. F., Gebert, R. R., De Oliveira, R. C., Boiago, M. M., Souza, C. F., Baldissera, M. D., Vendruscolo, R. G., Kempka, A. P., Paiano, D., Wagner, R., & Da Silva, A. S. (2019). Impacts of the supplementation of açai lump flour in the diet of laying hens on productive performance, and fatty acid profiles and antioxidant capacity in the fresh and stocked eggs. *Journal of Food Biochemistry*, 43, e13022. <https://doi.org/10.1111/jfbc.13022>
- Gallori, S., Bilia, A. R., Bergonzi, M. C., Barbosa, W. L. R., Vincieri, F. F. (2004). Polyphenolic constituents of fruit pulp of *Euterpe oleracea* Mart. (Açaí palm). *Chromatographia*, 59, 739–743.
- Kang, J., Xie, C., Li, Z., Nagarajan, S., Schauss, A. G., Wu, T., & Wu, X. (2011). Flavonoids from açai (*Euterpe oleracea* Mart.) pulp and their antioxidant and anti-inflammatory activities. *Food Chemistry*, 128, 152–157.
- Lebel, C. P., Ischiropoulos, H., & Bondy, S. C. (1992). Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. *Chemical Research in Toxicology*, 5, 227–231. <https://doi.org/10.1021/tx00026a012>
- Leong, S. F., Lai, J. C., Lim, L., & Clark, J. B. (1981). Energy-metabolizing enzymes in brain regions of adult and aging rats. *Journal of Neurochemistry*, 37, 1548–1556.
- Mannervik, B., & Guthenberg, C. (1981). Glutathione transferase (human placenta). *Methods in Enzymology*, 77, 231–235.
- Maritim, A. C., Sanders, R. A., & Watkins III, J. B. (2003). Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: A review. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 17, 24–38. <https://doi.org/10.1002/jbt.10058>
- Mathias, L. M. B. S., Alegre, P. H. C., dos Santos, I. O. F., Bachiega, T., Figueiredo, A. M., Chiuso-Minicucci, F., Fernandes, A. A., Bazan, S. G. Z., Minicucci, M. F., Azevedo, P. S., Okoshi, M. P., Zornoff, L. A. M., Paiva, S. A. R., & Polegato, B. F. (2019). *Euterpe oleracea* Mart. (Açaí) supplementation attenuates acute doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 53, 388–399.
- Monserat, J. M., Geracitano, L. A., Pinho, G. L. L., Vinagre, T. M., Faleiros, M., Alciati, J. C., & Bianchini, A. (2003). Determination of lipid peroxides in invertebrates using the Fe (III) xylenol orange complex formation. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 45, 177–183.
- Packer, J. F., Da Luz, M. M. S. (2007). Método para avaliação e pesquisa da atividade antimicrobiana de produtos de origem natural. *Revista Brasileira De Farmacognosia*, 17(1), 102–107. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2007000100019>
- Qiang, J., Wasipe, A., He, J., Tao, Y.-F., Xu, P., Bao, J.-W., Chen, D.-J., & Zhu, J.-H. (2019). Dietary vitamin E deficiency inhibits fat metabolism, antioxidant capacity, and immune regulation of inflammatory response in genetically improved farmed tilapia (GIFT, *Oreochromis niloticus*) fingerlings following *Streptococcus iniae* infection. *Fish & Shellfish Immunology*, 92, 395–404. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.06.026>
- Read, S. M., & Northcote, D. H. (1981). Minimization of variation in the response to different proteins of the Coomassie blue G dye-binding assay for protein. *Analytical Biochemistry*, 116, 53–64. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(81\)90321-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(81)90321-3)
- Rogez, H. (2000) *Açaí: preparo, composição e melhoramento da conservação*. EDUFPA, 313 p.
- Segner, H. (1998). Isolation and primary culture of teleost hepatocytes. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 120, 71–81. [https://doi.org/10.1016/S1095-6433\(98\)10012-0](https://doi.org/10.1016/S1095-6433(98)10012-0)
- Tatsch, E., Bochi, G. V., Pereira, R. S., Kober, H., Agertt, V. A., de Campos, M. M., Gomes, P., Duarte, M. M. F., & Moresco, R. N. (2011). A simple and inexpensive automated technique for measurement of serum nitrite/nitrate. *Clinical Biochemistry*, 44(4), 348–350.
- Udani, J. K., Singh, B. B., Singh, V. J., & Barrett, M. L. (2011). Effects of Açai (*Euterpe oleracea* Mart.) berry preparation on metabolic parameters in a healthy overweight population: A pilot study. *Nutrition Journal*, 10, e45. <https://doi.org/10.1186/1475-2891-10-45>
- Wang, H., Chu, W., Das, S. K., Ren, Q., Hasstedt, S. J., & Elbein, S. C. (2002). Liver pyruvate kinase polymorphisms are associated with type 2 diabetes in northern European Caucasians. *Diabetes*, 51, 2861–2865. <https://doi.org/10.2337/diabetes.51.9.2861>
- Wendel, A. (1981). Glutathione peroxidase. *Methods in enzymology* (pp. 325–333). Academic Press.

How to cite this article: Leite TC, Picoli F, Lopes DDA, et al.

The effects of açai oil addition in tilapia diets on performance, hepatic energy metabolism enzymes and antioxidant responses. *Aquac. Res.* 2021;52:395–402. <https://doi.org/10.1111/are.14902>



Vegetable choline in feed for Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) raised in a biofloc technology system (BFT): Biofloc composition, chemical composition, and fatty acid profiles in meat

Alison A. Sousa^{a,*}, Luisa Nora^b, Diogo L.A. Lopes^{a,b}, Tiago G. Petrolli^c, Valcenir J.M. Furlan^d, Roger Wagner^e, Charles M. Giacomelli^b, Matheus D. Baldissera^f, Aleksandro S. Da Silva^{a,b,*}

^a Postgraduate Program in Animal Science, Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC), Chapecó, SC, Brazil

^b Department of Animal Science, UDESC, Chapecó, SC, Brazil

^c Department of Animal Science, Universidade do Oeste de Santa Catarina, Xanxerê, SC, Brazil

^d Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA), Itaqui, RS, Brazil

^e Department of Food Technology and Science, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

^f Postgraduate Program in Pharmacology, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Fish nutrition
Meat quality
Human nutrition
Freshwater fish

ABSTRACT

The objective of this study was to determine whether supplementation with vegetable choline (VC: 0, 400, 800, and 1200 mg kg⁻¹ of feed) in feed for Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) raised in a biofloc system would promote changes in fatty acid (FA) profiles in the meat. We characterized the composition of the biofloc; that is, we evaluated the meat's chemical composition and FA profiles. Concerning proximate meat composition, moisture was significantly lower in the group fed 1200 mg kg⁻¹ of VC when compared to those of other treatments. Lipid levels were significantly higher in treatments with 800 and 1200 mg kg⁻¹ than in the control (0 mg kg⁻¹). The total saturated fatty acids (SFA) in meat were significantly lower in the 400 mg kg⁻¹ treatment than in the control treatment, while they were significantly higher in the 1200 mg kg⁻¹ treatment when compared to the control treatment. Total monounsaturated fatty acids (MUFA) in meat were significantly lower in the 1200 mg kg⁻¹ treatment than in the control treatment. Finally, total polyunsaturated fatty acids (PUFA) in meat were significantly higher in treatments with 800 and 1200 mg kg⁻¹ than in the control treatment. Taken together, the data suggest that supplementation of VC in diets for Nile tilapia in biofloc treatment improved FA profiles of the meat. Levels of 400 and 800 mg kg⁻¹ of diet led a decreased SFAs and increased PUFAs (mainly DHA) and MUFAs in the meat of tilapia, all of which desirable effects from the standpoint of the consumer.

1. Introduction

Feeds aquatic organisms are designed to meet the nutritional requirements of each species. This is accomplished by combining and processing raw materials with varying nutritional compositions (Turchini et al., 2018). Studies in aquaculture nutrition are focused on searching for alternative ingredients such as additives and supplements aiming to improve productivity, enhance the animal immune system, and reduce food costs (Roques et al., 2018; Dawood et al., 2018; Sousa et al., 2019). In the production of aquatic organisms, meat quality is particularly important because the increase in the global demand for fish is linked to the search for more nutritious and healthy foods (Béné et al.,

2016).

Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) plays a critical role in the growth of the aquaculture sector; it is commercialized mainly in the form of fillets (Souza and Maranhão, 2001; Boscolo and Feiden, 2007). Several factors influence the nutritional aspect of fish meat, including water quality, sex, natural food present in the environment, type of slaughter (Bagni et al., 2007; Tsegay et al., 2016; Jim et al., 2017) and, critically important, the nutritional composition of the fish feed (Herath et al., 2016). The lipid profile present in fish, for the most part, is related to lipid sources used in the preparation of feed (Turchini et al., 2009; Liu et al., 2019), and improving meat quality can be an excellent strategy to seek better markets and increase product value.

* Corresponding authors at: Postgraduate Program in Animal Science, Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC), Chapecó, SC, Brazil.

E-mail addresses: alisonasousa@outlook.com (A.A. Sousa), diogo.lopes@udesc.br (D.L.A. Lopes), tiago.petrolli@unoesc.edu.br (T.G. Petrolli), alejandro.silva@udesc.br (A.S. Da Silva).

<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.737174>

Received 15 March 2021; Received in revised form 15 June 2021; Accepted 11 July 2021

Available online 13 July 2021

0044-8486/© 2021 Published by Elsevier B.V.

The use of alternative additives in aquaculture feed is a compelling approach to improve the nutritional quality of meat quality because some additives can assist in several essential functions in the organisms (Baldiçsera et al., 2020). Vegetable choline (VC) is a vitamin B complex that has shown promising results in fish feed. This additive in Nile tilapia diets considerably improved energy metabolism and the oxidant/anti-oxidant status of the liver, causing a hepatoprotective effect and improving performance parameters (Baldiçsera et al., 2019; Sousa et al., 2020). A study showed that the addition of VC to the tilapia diet reduced liver damage induced by an aflatoxin-contaminated diet (Sousa et al., 2019). The performance improvement may be associated with the improvement of the synthesis of methionine, an essential amino acid that, like other amino acids, is directly related to animal development (Zhang and Li, 2010).

Another factor that led to the realization of this study is the fact that VC helps transport fat from the liver to other tissues, decreasing hepatic fat accumulation (Devlin, 2000). This specific function may influence the composition of fish meat related to the lipid profile. Nevertheless, there is little literature regarding the effects of VC on the nutritional composition of Nile tilapia meat, primarily when grown in a biofloc system, where the system has a series of microorganisms essential for maintaining water quality and that can serve as supplementary sources of food (Wasielesky et al., 2006; Ekasari et al., 2014). Microorganisms present in the biofloc system play fundamental roles in the dietary supplementation of the organisms being cultivated because they are sources of proteins, lipids, vitamins, and minerals (Martínez-Córdova et al., 2014; Martínez-Córdova et al., 2016). Therefore, the present study aimed to determine whether the addition of VC in the diet of Nile tilapia would change the chemical composition and fatty acid (FA) profiles of meat.

2. Material and methods

2.1. Vegetable choline

VC was extracted from the plants *Azadirachta indica*, *Citrullus colocynthis*, *Trachyspermum ammi*, and *Achyranthes aspera*. The commercial product is known as Biocholine Powder® (VB). Guaranteed levels of total phosphatidylcholine (natural choline conjugates) are 16 g kg⁻¹ VC - purity of 1.6%. The additive VC was added to the feed (basal feed) with “on top” in the experimental doses described below.

2.2. Biofloc technology system (BFT) and water quality parameters

The experimental setting was a macrocosm-microcosm type (Wasielesky et al., 2006; Emerenciano et al., 2013), consisting of two interconnected benches with constant aeration and water circulation using BFT. In addition, 100 juvenile Nile tilapia (~15 g) were stocked in each macrocosm, aiming to form and maintain the bioflocs. For such procedure, the methodology proposed by Emerenciano et al. (2012) was applied using a C:N (carbon: nitrogen) ratio of 20:1 with daily addition of sugar cane molasses (liquid) as an external carbon source and 28% crude protein (CP) feed (Anhambí®, Itapejara D'Oeste, PR, Brazil) as a nitrogen source.

Regarding water quality parameters, the average dissolved oxygen level was 6.52 ± 0.04 mg L⁻¹, temperature 27.6 ± 0.05 °C, and pH 7.08 ± 0.02. With regard to nitrogen compounds, ammonia showed levels of 0.21 ± 0.20 mg L⁻¹, nitrite 0.19 ± 0.16 mg L⁻¹ and nitrate 0.28 ± 0.29 mg L⁻¹. The levels of orthophosphate and alkalinity were 25.73 ± 14.65 mg L⁻¹ and 44.50 ± 33.54 mg L⁻¹ of CaCO₃, respectively. The settleable solids showed an average of 19.27 ± 14.06 mL L⁻¹. Details can be seen in the published study by Sousa et al. (2020).

To obtain a dry biomass sample from the biofloc during the experiment, 10 L of water were collected from each macrocosm; this volume was mixed to form a single sample. The sample was placed in a plastic container, where it remained for 1 h to decant the solids. Subsequently,

the excess water was removed, the sample was dried in an oven (Cienlab®, Campinas, SP, Brazil) at 55 °C for 72 h, and frozen at -20 °C for further analysis of chemical composition and FA profile in a dry biomass pool of biofloc. This procedure was carried out to determine the FA profile consumed by the fish in the experiment, in addition to the feed.

2.3. Experimental design and diets

Frozen fish samples (Nile tilapia) were derived from a previously published study (Sousa et al., 2020). The experiment was conducted in a completely randomized design with four treatments and five replicates per treatment. The treatments consisted of different levels of vegetable choline (0, 400, 800, and 1200 mg VC/kg of feed), according to Sousa et al. (2020). Knowing the levels of phosphatidylcholine in CV, the levels of this choline in the feed supplemented (mg kg⁻¹) were calculated: 0 mg (T0), 6.4 mg (T400), 12.8 mg (T800), and 19.2 mg (T1200).

The diets were elaborated from a basal feed with 48% CP (Table 1). At the beginning of the experiment, 200 Nile tilapia juveniles (mean initial weight 8.03 ± 0.03 g) were stocked, ten fish per experimental unit, in a density of 143 fish m⁻³.

Table 1

Chemical composition and fatty acid profile of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) diet with different levels of vegetable choline (VC) (0, 400, 800, and 1200 mg VC/kg of feed) used in the experiment.¹

Chemical composition ¹	Inclusion level (mg kg ⁻¹)			
	0	400	800	1200
Dry matter (DM), g kg ⁻¹	895 ± 4.5	902 ± 5.8	903 ± 7.0	897 ± 5.5
Lipids (g kg ⁻¹ , DM)	70.3 ± 10.8	81.6 ± 9.1	82.7 ± 8.6	93.8 ± 17.1
Crude protein (g kg ⁻¹ , DM)	473 ± 2.5	471 ± 5.1	476 ± 4.5	469 ± 5.9
Ash (g kg ⁻¹ , DM)	120 ± 3.3	117 ± 4.5	120 ± 2.1	118 ± 2.9
Fatty acid (g kg ⁻¹)				
C10:0 - capric acid	2.00 ± 0.31	1.90 ± 0.24	1.90 ± 0.38	2.20 ± 0.56
C12:0 - lauric acid	1.30 ± 0.19	1.10 ± 0.22	1.10 ± 0.09	1.30 ± 0.17
C14:0 - myristic acid	11.5 ± 1.36	11.2 ± 0.89	11.5 ± 0.96	11.7 ± 1.06
C15:0 - pentadecylic acid	1.90 ± 0.25	1.40 ± 0.38	1.30 ± 0.52	1.50 ± 0.30
C16:0 - palmitic acid	257 ± 2.9	258 ± 8.1	256 ± 9.9	255 ± 3.7
C16:1n7 - palmitoleic acid	16.0 ± 1.6	15.9 ± 1.8	15.6 ± 1.0	16.5 ± 1.1
C17:0 - margaric acid	7.50 ± 0.54	7.30 ± 0.39	7.20 ± 0.14	7.30 ± 0.25
C18:0 - stearic acid	104 ± 1.47	102 ± 2.96	106 ± 4.10	103 ± 1.40
C18:1n9 - oleic acid	320 ± 2.87	320 ± 1.69	318 ± 2.08	317 ± 4.74
C18:1n7 - vaccenic acid	7.20 ± 0.45	7.40 ± 0.19	7.00 ± 0.34	7.00 ± 0.68
C18:2n6 - linoleic acid	232 ± 3.41	234 ± 1.68	235 ± 2.41	236 ± 2.84
C18:3n6 - γ-linolenic acid	10.6 ± 0.18	10.9 ± 0.36	11.5 ± 0.30	10.8 ± 0.09
C18:3n3 - α-linolenic acid	12.2 ± 0.12	12.2 ± 0.32	12.2 ± 0.15	12.7 ± 0.06
C20:1n9 - gondoic acid	2.30 ± 0.06	1.90 ± 0.09	1.90 ± 0.05	2.50 ± 0.16
C20:3n6 - dihomog-γ-linolenic acid	4.40 ± 0.14	4.40 ± 0.09	4.30 ± 0.18	4.70 ± 0.24
C24:0 - lignoceric acid	6.70 ± 0.20	6.70 ± 0.02	6.00 ± 0.60	7.20 ± 0.46
C22:6n3 - docosahexaenoic acid	1.70 ± 0.08	1.60 ± 0.12	1.60 ± 0.10	1.80 ± 0.19

¹ Note: The ingredients used in the production of the feed were previously published by Sousa et al. (2020). Results presented in mean ± standard deviation.

2.4. Samples

The experiment lasted 40 days, after which the fish from each treatment were euthanized to collect muscle fragments for determination of FA profiles (two fish per repetition = 10 per treatment) and total carcass for chemical composition (three fish per repetition = 15 per treatment).

2.5. Chemistry composition

Carcasses (n = 10 per treatment) were prepared for analysis. First, the carcasses were weighed and cut into small fragments. Then they were placed in a forced-air circulation oven for 48 h at a temperature of 60 °C. With the stabilization of sample weight (after 48 h), we define humidity; in the sequence, we performed the grinding of the samples using a knife-type mill.

These meat samples were evaluated for dry matter and chemical composition (crude protein, lipids, and mineral matter) according to guidelines of the AOAC (2016). Feed (diet) and biofloc samples were prepared equally for the carcasses, and the same analyses were performed (AOAC, 2016). All parameters were performed in triplicate.

2.6. FA profiles

Samples of meat, feed, and biofloc were used for FA profile analysis. The lipid extraction was carried out according to the method of Bligh and Dyer (1959) with some modifications: 0.5 g of samples, 0.4 mL of water, 5 mL of methanol, and 2.5 mL of chloroform were added into 15 mL polypropylene tubes, and mechanical shaking was performed for 60 min. Thereafter, 2.5 mL of chloroform and 2.5 mL of Na₂SO₄ 1.5% solution were added to promote a biphasic system. This mixture was shaken for 2 min and then centrifuged for 5 min at 3000 rpm. Lipids obtained from the chloroform phase were subjected to FA analysis before solvent drying by N₂ flow.

FA methylation from the lipid fraction was performed by a transesterification/ esterification method proposed by Hartman and Lago (1973). To the extracted lipids were added 1 mL of 0.4 M KOH methanolic solution in a test tube and shaken in a vortex for 1 min. Samples were kept in a water bath for 10 min at boiling point. Subsequently, samples were cooled at room temperature, and 3 mL of 1 M H₂SO₄ methanolic solution was added and shaken in a vortex and maintained in a water bath for 10 min. After cooling, 2 mL of hexane were added and centrifuged at 5000 rpm for 5 min. Finally, hexane with the fatty acid methyl esters (FAME) was subjected to chromatography analysis.

The FAME determination was carried out in a gas chromatograph model 3600CX equipped with a flame ionization detector (Varian®, Palo Alto, CA, USA). One microliter of samples was injected in a split/splitless injector, operated in splitless mode at 250 °C (splitter cut-off for 0.8 min). Hydrogen was used as carrier gas at a constant pressure of 34 psi. FAMES separation was carried out using an HP-88 chromatography column (100 m × 0.25 mm; 0.20 µm of thickness film, (Agilent®, J & W, Folsom, CA, USA). The initial oven temperature was programmed at 50 °C for 1 min and increase to 185 °C, at a rate of 15 °C min⁻¹. Then, increasing to 195 °C, at a rate of 0.5 °C min⁻¹, and finally until 230 °C, increasing 15 °C min⁻¹, and maintained for 5 min in isothermal conditions. The detector temperature was kept constant at 250 °C. The FAME compounds were identified by comparing experimental retention times with those from authentic standards (FAME Mix-37, Sigma Aldrich®, St. Louis, MO, USA). The results were presented as a percentage of each FA identified in the lipid fraction, considering the chain size equivalent response factor and a conversion factor of ester to the respective acid for each FAME applied to FID, according to Visentainer (2012).

2.7. Statistical analyses

The data were tested for normality using the Shapiro–Wilk test.

Skewness, kurtosis, and homogeneity were determined using the Levene test. One-way ANOVA was used to analyze all parameters that showed differences, followed by post hoc test Tukey's tests. The *P*-value for significance was set at *P* < 0.05.

3. Results

3.1. Chemistry composition and FA profile in diets

Regarding the chemical composition of the diets, the average dry matter value was 899.25 g kg⁻¹, lipids 76.85 g kg⁻¹, CP 472.25 g kg⁻¹ and ashes 118.75 g kg⁻¹. Results of chemical composition parameters and FA profile of each treatment (diets) can be seen in Table 1.

3.2. Biofloc analysis

Table 2 shows the average values of chemical composition and FA profile of dry biomass of biofloc. The dry matter showed an average value of 934 g kg⁻¹, CP 387 g kg⁻¹, lipids 72.6 g kg⁻¹, and ash 118 g kg⁻¹.

3.3. Chemistry composition in Nile tilapia carcass

Regarding the analysis of the chemical composition of the carcass, the moisture was significantly lower with the dose of 1200 mg kg⁻¹ of VC in the diet compared to the other treatments. The lipid content was significantly higher in treatments with 800 and 1200 mg kg⁻¹ of VC in the feed when compared to the control group. There was no significant difference between treatments concerning CP and ash (Table 3).

3.4. FA profile in meat

The total saturated fatty acids (SFA) were significantly lower in the treatment with 400 mg kg⁻¹ when compared to the control treatment, while they were significantly higher in the treatment with 1200 mg kg⁻¹ when compared to the control treatment. The total monounsaturated

Table 2

Chemical composition and fatty acid profile in biofloc used for raising of the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*).

Chemistry composition of biofloc	
Variables	Levels (g kg ⁻¹)
Dry matter	934 ± 3.85
Crude protein	387 ± 2.02
Lipids	72.6 ± 1.69
Ash	118 ± 1.91
Fatty acid profile of biofloc (g kg ⁻¹)	
C14:0 - myristic acid	20.2 ± 0.74
C14:1n5 - myristoleic acid	82.6 ± 1.73
C15:0 - pentadecylic acid	7.50 ± 0.19
C15:1n5 - pentadecenoic acid	61.3 ± 2.70
C16:0 - palmitic acid	217 ± 8.41
C16:1 isomer	21.1 ± 1.01
C16:1n7 - palmitoleic acid	81.2 ± 2.47
C17:0 - margaric acid	11.5 ± 1.06
C17:1n7 - heptadecanoic acid	6.70 ± 0.54
C18:0 - stearic acid	126 ± 2.09
C18:1n9 - oleic acid	116 ± 3.01
C18:1n7 - vaccenic acid	44.3 ± 1.12
C18:2n6 - linoleic acid	38.0 ± 0.76
C18:3n6 - γ-linolenic acid	13.5 ± 0.13
C20:3n6 - dihomo-γ-linolenic acid	18.7 ± 0.38
C20:3n3 - dihomo-α-linolenic acid	35.4 ± 1.62
C24:0 - lignoceric acid	12.3 ± 0.63
C22:5n3 - docosapentaenoic acid	30.3 ± 1.84
C22:6n3 - docosahexaenoic acid	23.2 ± 0.89

Note: Results presented in mean ± standard deviation.

Table 3

Moisture and concentration of crude protein, lipids, and ash in the carcass of Nile tilapia supplemented with different levels of vegetable choline (VC) (0, 400, 800, and 1200 mg VC kg⁻¹ of feed) raised in a biofloc system over 40 days.*

Variables (g kg ⁻¹)	Inclusion levels (mg kg ⁻¹)*				P-value
	0	400	800	1200	
Moisture	911 ± 7.4 ^a	906 ± 7.0 ^a	913 ± 9.3 ^a	886 ± 5.1 ^b	<0.001
Crude protein	474 ± 19.6	458 ± 23.1	470 ± 11.9	468 ± 15.4	0.214
Lipids	184 ± 17.5 ^b	210 ± 20.4 ^{ab}	225 ± 13.0 ^a	239 ± 20.4 ^a	<0.001
Ash	22.0 ± 7.8	24.7 ± 10.9	24.2 ± 13.1	24.7 ± 10.3	0.697

* Different letters within a line indicates significant differences among groups using Tukey post-hoc test ($P < 0.05$). Results presented in mean ± standard deviation.

fatty acids (MUFA) were significantly lower in the treatment with 1200 mg kg⁻¹ when compared to the control treatment. Finally, total polyunsaturated fatty acids (PUFA) were significantly higher in treatments with 800 and 1200 mg kg⁻¹ than the control treatment.

The levels of myristic acid (C14:0) and palmitoleic acid (C16:1) were significantly lower in Nile tilapia supplemented with 800 and 1200 mg kg⁻¹ compared to the control group, while the levels of pentadecylic acid (C15:0), myristoleic acid (C14:1), and docosapentaenoic acid (C22:5n3; DPA) were significantly higher in Nile tilapia supplemented with 800 and 1200 mg kg⁻¹ compared to control group. The levels of nervonic acid (C24:1) and docosahexaenoic acid (C22:6n3) were significantly higher in Nile tilapia supplemented with 1200 mg kg⁻¹ compared to the control group (Table 4).

4. Discussion

Azim and Little (2008) evaluated the chemical composition and FA profiles of the biofloc and observed values of 380 g kg⁻¹ of CP, 30 g kg⁻¹ of lipids, 60 g kg⁻¹ of fibers, and 120 g kg⁻¹ of ash. According to the authors, the chemical components of the biofloc in nutritional terms were within the ideal levels for the cultivation of tilapia in BFT, except for the low levels of lipids. In the present study, the lipid content (72.6 g kg⁻¹) was higher, suggesting a more nutritionally complete biofloc because the levels of CP, ash, and FA profiles were similar. However, it is essential to note that the variation in the nutritional composition of the biofloc can be influenced by several factors, including the size of the organic particles in suspension, species being cultivated, diet, and the external carbon source used (Ekasari et al., 2014; Rajkumar et al., 2015; Wei et al., 2016). As a result, it is essential to carry out a nutritional analysis of the biofloc and correct the diet, if necessary, meeting the fish's energy requirements and allowing it to express its full zootechnical potential.

Regarding the chemical composition of meat, we observed an increase in the levels of lipids in the meat of tilapia that were supplemented with levels of 800 and 1200 mg kg⁻¹. Typically, the levels of lipids in fish increase according to the percentage of lipids in the diet (El-Kasheif et al., 2011; Ayisi et al., 2017). Sousa et al. (2019) evaluated various levels of flour from pizzeria by-products in feed for tilapia in a biofloc system. They observed that the consumption of this carbohydrate led to increased levels of lipids in the carcass, as observed by Liu et al. (2021) in the liver of juvenile yellowtail kingfish (*Seriola lalandi*) fed with a 0.59 and 6.22 g choline kg⁻¹ diet. In the present study, we also found that the addition of VC in the diet increased the levels of this parameter in the meat of tilapia.

The FA profiles present in fish meat can be influenced mainly by the FA profiles of the feed used (Luo et al., 2010). In the present study, high levels of C16:0, C18:1n9c, C18:0, and C18:2n6 were found in the meat of tilapia and feed and biofloc, a fact that reinforces this hypothesis of the

Table 4

Fatty acids profile in the meat of Nile tilapia supplemented with different levels of vegetable choline (VC) (0, 400, 800, and 1200 mg VC kg⁻¹ of feed) raised in a biofloc system over 40 days (means ± SD).

Fatty acids (g kg ⁻¹)	Inclusion levels (mg kg ⁻¹)				p-value
	0	400	800	1200	
C14:0	8.13 ± 1.0 ^a	8.85 ± 0.9 ^a	4.94 ± 0.7 ^b	5.57 ± 0.9 ^b	<0.001
C15:0	0 ± 0 ^b	0 ± 0 ^b	10.5 ± 2.7 ^a	12.3 ± 1.3 ^a	<0.001
C16:0	278 ± 41	274 ± 27	265 ± 39	275 ± 45	0.586
C17:0	5.60 ± 1.2	4.83 ± 1.7	4.62 ± 0.81	5.92 ± 1.02	0.296
C18:0	122 ± 12	114 ± 23	122 ± 18	128 ± 32	0.169
C20:0	4.41 ± 0.85	4.04 ± 1.06	3.74 ± 0.62	4.27 ± 0.47	0.016
SFA	419 ± 6.74 ^b	406 ± 4.39 ^c	412 ± 8.31 ^{bc}	431 ± 7.12 ^a	<0.001
C14:1n5	11.6 ± 2.4 ^c	10.8 ± 2.1 ^c	16.5 ± 1.8 ^b	25.4 ± 2.6 ^a	<0.001
C16:1n7	19.0 ± 2.2 ^a	18.4 ± 3.4 ^a	12.0 ± 1.7 ^b	8.97 ± 2.0 ^b	<0.001
C18:1n9	244 ± 27	266 ± 40	246 ± 63	231 ± 47	0.584
C18:1n7	32.0 ± 4.10	29.8 ± 3.7	29.0 ± 2.84	32.3 ± 4.9	0.823
C20:1n9	6.55 ± 0.89	7.19 ± 0.63	6.87 ± 0.48	6.66 ± 1.09	0.625
C22:1n9	47.0 ± 1.9	39.8 ± 3.6	47.2 ± 2.4	48.0 ± 3.1	0.070
C24:1n9	16.4 ± 0.7 ^b	16.8 ± 0.9 ^b	16.9 ± 1.5 ^{ab}	19.4 ± 2.0 ^a	0.038
MUFA	377 ± 5.56 ^{ab}	389 ± 9.63 ^a	360 ± 8.27 ^b	349 ± 6.76 ^c	<0.001
C18:2n6	117 ± 11	122 ± 24	134 ± 15	123 ± 24	0.769
C18:3n6	2.18 ± 0.96	1.92 ± 1.02	1.99 ± 0.52	2.17 ± 0.76	0.806
C20:3n6	12.3 ± 1.10	12.8 ± 0.74	12.8 ± 0.97	13.8 ± 1.34	0.879
C22:5n3	49.8 ± 2.14 ^{ab}	46.0 ± 1.87 ^b	54.8 ± 2.74 ^a	54.4 ± 3.10 ^a	<0.001
C22:6n3	13.5 ± 0.87 ^b	14.3 ± 1.24 ^{ab}	14.8 ± 0.68 ^{ab}	15.5 ± 0.95 ^a	0.042
PUFA	195 ± 4.75 ^c	197 ± 6.41 ^{bc}	218 ± 6.69 ^a	209 ± 4.79 ^{ab}	0.018

a,b,c Different letters in the same line indicate a significant difference between treatments ($P < 0.05$). Results presented in mean ± standard deviation.

Note 1: Myristic acid (C14:0), myristoleic acid (C14:1), pentadecylic acid (C15:0), palmitic acid (C16:0), palmitoleic acid (C16:1), margaric acid (C17:0), stearic acid (C18:0), oleic acid (C18:1n9), linoleic acid (C18:2n6), γ-linolenic acid (C18:3n6), arachidic acid (C20:0), gondoic acid (C20:1n9), dihomoglycolic acid (C20:3n6), vaccenic acid (C18:1n7), erucic acid (C22:1), nervonic acid (C24:1), docosapentaenoic acid (C22:5), docosahexaenoic acid (C22:6).

Note 2: saturated fatty acids (SFA); monounsaturated fatty acids (MUFA); polyunsaturated fatty acids (PUFA).

relationship between feed consumed and muscle composition. Bonafé et al. (2017) incorporated conjugated fatty acids in tilapia also found high levels of C16:0 and C18:1n9 in meat; however, in the present study, C14:0 levels were lower in treatments with higher levels of VC in the diet. Ayisi et al. (2017) evaluated palm oil in diets for Nile tilapia (0, 2, 4, 6, and 8%) and observed that the increase in the levels of inclusion of this lipid source also decreased the levels of this FA. On the other hand, different levels of lipids (herring oil) in the diet for tilapia did not change the lipid profile in meat (Luo et al., 2010). Different metabolic processes of some fatty acids can influence their incorporation into meat, also depending on the lipid source in the diets (Sargent et al., 2002). In 2011, researchers reported for the first time that choline availability affects muscle membrane lipid composition and intracellular lipid metabolism (Michel et al., 2011) because it was verified that: 1) the main choline-transporter SLC44A1 was down-regulated by choline deficiency at the mRNA level, and SLC44A1 protein was reduced in total cell lysates and

isolated mitochondria; 2) choline deficiency reduced phosphatidylcholine synthesis, but PC degradation was unaffected; 3) phosphatidylcholine from choline deficiency muscle was modified and contained more monounsaturated fatty acids at the expense of saturated fatty acids; 4) choline deficiency muscle cells also accumulated FA and triacylglycerol in the form of large lipid droplets, droplets formed from endogenous fatty acids and by slower triacylglycerol metabolism. This information contributes to understanding the mechanisms that led to changes in the FA profile in this study where choline was supplemented via diet for fish.

Docosahexaenoic acid (C22:6n3 = DHA) is an omega-3 FA that is extremely important for human health because it prevents cardiovascular and inflammatory diseases (Yates et al., 2014; Simat et al., 2015). The levels of this FA were low in the diets used here ($\sim 1.68 \text{ g kg}^{-1}$), and therefore, there was a significant nutritional contribution from biofloc to meet the nutritional requirements of tilapias. The DHA value found in the biofloc was 23.2 g kg^{-1} , which may explain the values found in the meat of tilapia ($\sim 14.5 \text{ g kg}^{-1}$). Sarker et al. (2016) replacing fish oil with marine microalgae *Schizochytrium* spp. (0, 25, 50, 75, and 100%) observed that the deposition of DHA in the meat of tilapia increased linearly until reaching 100% replacement, which was related to a large amount of DHA present in the microalgae. In our study, the levels of DHA increased only in the fish fed with the highest VC level in the diet; however, this may be related to an essential function that choline plays in the transport of fats into the fish (Devlin, 2000); this function can be decisive for the increase in the content of lipids and other fatty acids in the meat of tilapia, as already observed by Liu et al. (2021).

The levels of PUFA in meat were higher at 800 and 1200 mg kg^{-1} compared to the control, which can be considered a positive effect from the standpoint of consumers. Navarro et al. (2012) supplemented tilapia with vitamin E and reported that levels 100 and 150 mg kg^{-1} increased the levels of PUFA in the meat. These same authors observed higher levels of PUFA compared to SFA, a condition of positive interest for consumers because the consumption of SFA is associated with an increased risk of cardiovascular diseases. According to Sarker et al. (2015), there may be an inverse relationship between these two parameters. In other words, as PUFA levels increase, SFA levels may decrease. In the present study, there were increases in the levels of PUFA in the meat of tilapia, especially those of the omega-3 series such as DHA (C22:6), which represents an improvement in the nutritional composition, in addition to providing benefit to the humans that consume it. According to researchers, this can have a protective effect against various diseases (Riediger et al., 2009; Nguyen et al., 2010). Many studies sought to find strategies such as genetic improvement and the use of alternative ingredients in diets to increase the levels of PUFA n-3 in the meat of tilapia (Nguyen et al., 2010; Dos Santos et al., 2014; Sarker et al., 2016), this is because this species uses PUFA n-6 very well for its development and other physiological functions (Lim et al., 2011), explaining the high levels of C18:2n6 in the feed in the present study. Nevertheless, it is essential to note that excess fatty acids from the omega-6 series are not desirable in food because they are related to the promotion of inflammatory diseases (Calder, 2006; Simopoulos, 2008); this was not the case in the present study: instead, there were increases, remaining at adequate levels.

According to Nguyen et al. (2010), the SFA and MUFA contents may increase according to the percentage of moisture in the meat; conversely, the PUFA contents may decrease. This fact does not corroborate the levels of MUFA and PUFA found in the present study because moisture reduced the increase in the levels of inclusion of VC in the diet. Although it did not differ significantly from the control treatment, we observed a greater deposition of MUFA in tilapia meat at a dose of 400 mg kg^{-1} . From a human perspective, the consumption of MUFA is critical because it is related to the prevention of atherosclerosis and cardiovascular diseases (Petenucci et al., 2008). At the same time, the results showed a high average SFA content in the meat of tilapia at the highest level of inclusion of VC in the diet. Excessive consumption of SFA

can increase LDL cholesterol and, consequently, may trigger cardiovascular diseases (Griffin, 2017; Lenighan et al., 2019). However, VC at 400 mg kg^{-1} decreased the content of these fatty acids, suggesting an improvement in meat quality, as observed recently by Baldissera et al. (2020) in Nile tilapia given feed containing nerolidol.

The 800 mg kg^{-1} dose provided benefits for tilapia concerning zootechnical performance and improvements in metabolic processes (Baldissera et al., 2019; Souza et al., 2019; Sousa et al., 2020). In the present study, we found that VC at 400 and 800 mg kg^{-1} in the feed in biofloc systems promoted improvements in FA profiles of the meat of tilapia, which benefit the health of the final consumer.

5. Conclusion

Supplementation of VC in feed for Nile tilapia in BFT positively modulated the profile of fatty acids in meat; that is, it produced better quality meat for consumers. In summary, levels of 400 and 800 mg kg^{-1} of VC in the tilapia diet are recommended to decrease SFA and increase PUFA (mainly DHA) in fish meat.

Ethics committee

The Ethics Committee approved the project on the Use of Animals in Research at the State University of Santa Catarina, number: 9595130319.

Authors' contributions

Sousa AA, Lopes DA, Petrolli TG, and Da Silva A.S. contributed to the design and implementation of the research to the analysis of the results. Wagner R and Baldissera MD helped in the elaboration of the project and its execution and financing. Nora L and Giacomelli CM participated in the execution of the experiment and collection of samples and data. Nora L and Furlan VJM did the laboratory analysis. All authors discussed the results and contributed to the final manuscript.

Declaration of Competing Interest

The authors declare no conflicts of interest.

Acknowledgments

The authors thank the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico; CNPq, Brazil; Fundação de Amparo à Pesquisa Científica e Tecnológica do Estado de Santa Catarina; FAPESC, SC, Brazil. The first author also received a CAPES/Brazil master's fellowship.

References

- AOAC: Association of Official Analytical Chemists, 2016. Official Methods of Analysis of AOAC International, 20th ed.
- Ayisi, C.L., Zhao, J., Rupia, E.J., 2017. Growth performance, feed utilization, body and fatty acid composition of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fed diets containing elevated levels of palm oil. Aquacult. Fish. 2 (2), 67–77. <https://doi.org/10.1016/j.aaf.2017.02.001>.
- Azim, M.E., Little, D.C., 2008. The biofloc technology (BFT) in indoor tanks: Water quality, biofloc composition, and growth and welfare of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Aquaculture 283, 29–35. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.06.036>.
- Bagni, M., Civitareale, C., Priori, A., Ballerini, A., Foino, M., Brambilla, G., Marino, G., 2007. Pre-slaughter crowding stress and killing procedures affecting quality and welfare in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and sea bream (*Sparus aurata*). Aquaculture 263 (1–4), 52–60. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.07.049>.
- Baldissera, M.D., Souza, C.F., Baldissarroto, B., Zimmer, F., Paiano, D., Petrolli, T.G., Da Silva, A.S., 2019. Vegetable choline improves growth performance, energetic metabolism, and antioxidant capacity of fingerling Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Aquaculture 501, 224–229. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.11.021>.
- Baldissera, M.D., Souza, C.F., Zeppenfeld, C.C., Velho, M.C., Klein, B., Abbad, L.B., Ourique, F.A., Wagner, R., Da Silva, A.S., Baldissarroto, B., 2020. Dietary

- supplementation with nerolidol nanospheres improves growth, antioxidant status and fillet fatty acid profiles in Nile tilapia: benefits of nanotechnology for fish health and meat quality. *Aquaculture* 516, 734635. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734635>.
- Béné, C., Arthur, R., Norbury, H., Allison, E.H., Beveridge, M., Bush, S.R., Campling, L., Leschen, W., Little, D., Squires, D., Thilsted, S.H., Troell, M., Williams, M., 2016. Contribution of fisheries and aquaculture to food security and poverty reduction: assessing the current evidence. *World Dev.* 79, 177–196. <https://doi.org/10.1016/j.worlddev.2015.11.007>.
- Bligh, E.G., Dyer, W.J., 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37 (21), 911–917.
- Bonafé, E.G., de Figueiredo, L.C., Martins, A.F., Monteiro, J.P., Junior, O.O., Canesin, E. A., Maruyama, S.A., Visentainer, J.V., 2017. Incorporation of conjugated fatty acids into Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *J. Sci. Food Agric.* 97 (10), 3469–3475. <https://doi.org/10.1002/jsfa.8149>.
- Boscolo, W.R., Feiden, A., 2007. Industrialização de tilápias. GFM Gráfica & Editora, BR, Toledo.
- Calder, P.C., 2006. n-3 polyunsaturated fatty acids, inflammation, and inflammatory diseases. *Am. J. Clin. Nutr.* 83, 1505–1519. <https://doi.org/10.1093/ajcn/83.6.1505S>.
- Dawood, M.A.O., Koshio, S., Esteban, M.Á., 2018. Beneficial roles of feed additives as immunostimulants in aquaculture: a review. *Rev. Aquac.* 10, 950–974. <https://doi.org/10.1111/raq.12209>.
- Devlin, T.M., 2000. *Manual de bioquímica com correlações químicas*. Edgard Blucher. São Paulo.
- Dos Santos, H.M.C., Nishiyama, M.F., Bonafé, E.G., de Oliveira, C.A.L., Matsushita, M., Visentainer, J.V., Ribeiro, R.P., 2014. Influence of a diet enriched with perilla seed bran on the composition of omega-3 fatty acid in Nile Tilapia. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 91 (11), 1939–1948. <https://doi.org/10.1007/s11746-014-2545-8>.
- Ekasari, J., Angela, D., Waluvo, S.H., Bachtiar, T., Surawibjaja, E.H., Bossier, P., Schryver, P., 2014. The size of biofloc determines the nutritional composition and the nitrogen recovery by aquaculture animals. *Aquaculture* 426–427, 102–111. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.01.023>.
- El-Kashef, M.A., Amal, S.S., Seham, A., 2011. Effects of varying levels of fish oil on growth performance, body composition and haematological characteristics of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L). *Egypt. J. Aquatic Biol. Fish.* 15, 125–141. <https://doi.org/10.21608/ejaf.2011.2082>.
- Emerenciano, M., Ballester, E.L.C., Cavalli, R.O., Wasielesky, W., 2012. Biofloc technology application as a food source in a limited water exchange nursery system for pink shrimp *Farfantepenaeus brasiliensis* (Latreille, 1817). *Aquac. Res.* 43, 447–457. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2011.02848.x>.
- Emerenciano, M., Gaxiola, G., Cuzon, G., 2013. Biofloc Technology (BFT): a review for aquaculture application and animal food industry. *J. World Aquacult. Soc.* <https://doi.org/10.5772/53902>. Baton Rouge, Louisiana, United States. <https://www.intechopen.com/books/biomass-now-cultivation-and-utilization/biofloc-technology-b-ft-a-review-for-aquaculture-application-and-animal-food-industry>.
- Griffin, B.A., 2017. Serum low-density lipoprotein as a dietary responsive biomarker of cardiovascular disease risk: consensus and confusion. *Nutr. Bull.* 42, 266–273. <https://doi.org/10.1111/nbu.12282>.
- Hartman, L., Lago, R.C., 1973. Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. *Lab. Pract.* 22 (494), 475–477.
- Herath, S.S., Haga, Y., Satoh, S., 2016. Effects of long-term feeding of corn co-product-based diets on growth, fillet color, and fatty acid and amino acid composition of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture* 464, 205–212. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.06.032>.
- Jim, F., Garamumhango, P., Musara, C., 2017. Comparative analysis of nutritional value of *Oreochromis niloticus* (Linnaeus), Nile Tilapia, meat from three different ecosystems. *J. Food Qual.* 1–8. <https://doi.org/10.1155/2017/6714347>.
- Lenighan, Y.M., McNulty, B.A., Roche, H.M., 2019. Dietary fat composition: replacement of saturated fatty acids with PUFA as a public health strategy, with an emphasis on α -linolenic acid. *Proc. Nutr. Soc.* 1–12. <https://doi.org/10.1017/s0029665118002793>.
- Lim, C., Yildirim-Aksoy, M., Klesius, P., 2011. Lipid and fatty acid requirements of tilapias. *N. Am. J. Aquac.* 73 (2), 188–193. <https://doi.org/10.1080/15222055.2011.579032>.
- Liu, Y., Wen, J., Ning, L., Jiao, J., Qiao, F., Chen, L., Zhang, M., Du, Z., 2019. Comparison of effects of dietary-specific fatty acids on growth and lipid metabolism in Nile tilapia. *Aquac. Nutr.* 25, 1–11. <https://doi.org/10.1111/anu.12906>.
- Liu, A., Pirozzi, I., Codabaccus, B.M., Stephens, F., Francis, D.S., Sammut, J., Booth, M.A., 2021. Effects of dietary choline on liver lipid composition, liver histology and plasma biochemistry of juvenile yellowtail kingfish (*Seriola lalandi*). *Br. J. Nutr.* 125, 1344–1358.
- Luo, G., Xu, J., Teng, Y., Ding, C., Yan, B., 2010. Effects of dietary lipid levels on the growth, digestive enzyme, feed utilization and fatty acid composition of Japanese sea bass (*Lateolabrax japonicus* L.) reared in freshwater. *Aquac. Res.* 41 (2), 210–219. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2009.02319.x>.
- Martínez-Córdova, L.R., Emerenciano, M., Miranda-Baeza, A., Martínez-Porchas, M., 2014. Microbial-based systems for aquaculture of fish and shrimp: an updated review. *Rev. Aquac.* 6, 131–148. <https://doi.org/10.1111/raq.12058>.
- Martínez-Córdova, L.R., Martínez-Porchas, M., Emerenciano, M.G.C., Miranda-Baeza, A., Galva, T., 2016. From microbes to fish: the next revolution in food production. *Crit. Rev. Biotechnol.* 287–295. <https://doi.org/10.3109/07388551.2016.1144043>.
- Michel, V., Singh, R., Bakovic, M., 2011. The impact of choline availability on muscle lipid metabolism. *Food Funct.* 2, 53–62. <https://doi.org/10.1039/c0fo00069h>.
- Navarro, R.D., Navarro, F.K.S.P., Ribeiro Filho, O.P., Ferreira, W.M., Pereira, M.M., Seixas Filho, J.T., 2012. Quality of polyunsaturated fatty acids in Nile tilapias (*Oreochromis niloticus*) fed with vitamin E supplementation. *Food Chem.* 134 (1), 215–218. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.02.097>.
- Nguyen, N.H., Ponzoni, R.W., Yee, H.Y., Abu-Bakar, K.R., Hamzah, A., Khaw, H.L., 2010. Quantitative genetic basis of fatty acid composition in the GIFT strain of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) selected for high growth. *Aquaculture* 309 (1–4), 66–74. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.08.034>.
- Petenuci, M.E., Stevanato, F.B., Visentainer, J.E.L., Matsushita, M., Garcia, E.E., Souza, N.E., Visentainer, J.V., 2008. Fatty acid concentration, proximate composition, and mineral composition in fishbone flour of Nile Tilapia. *Arch. Latinoam. Nutr.* 58 (1).
- Rajkumar, M., Pandey, P.K., Aravind, R., Vennila, A., Bharti, V., Purushothaman, C.S., 2015. Effect of different biofloc system on water quality, biofloc composition and growth performance in *Liopenaeus vannamei* (Boone, 1931). *Aquac. Res.* 47 (11), 3432–3444. <https://doi.org/10.1111/are.12792>.
- Riediger, N.D., Othman, R.A., Miyoun, S., Moghadasian, M.H., 2009. A systemic review of the roles of n-3 fatty acids in health and disease. *J. Am. Diet. Assoc.* 109 (4), 668–679. <https://doi.org/10.1016/j.jada.2008.12.022>.
- Roques, S., Deborde, C., Richard, N., Skiba-Cassy, S., Moing, A., Fauconneau, B., 2018. Metabolomics and fish nutrition: a review in the context of sustainable feed development. *Rev. Aquac.* 1–22. <https://doi.org/10.1111/raq.12316>.
- Sargent, J., Tocher, D.R., Bell, J.G., 2002. The lipids. In: Halver, J.E. (Ed.), *Fish Nutrition*, 2nd edn. Academic Press, London, UK, pp. 181–257.
- Sarker, P.K., Gamble, M.M., Kelson, S., Kapuscinski, A.R., 2015. Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) shows high digestibility of lipid and fatty acids from marine *Schizochytrium* sp. and protein and essential amino acids from freshwater *Spirulina* sp. feed ingredients. *Aquac. Nutr.* 22 (1), 109–119. <https://doi.org/10.1111/anu.12230>.
- Sarker, P.K., Kapuscinski, A.R., Lanois, A.J., Livesey, E.D., Bernhard, K.P., Coley, M.L., 2016. Towards sustainable aquafeeds: complete substitution of fish oil with marine microalgae *Schizochytrium* sp. improves growth and fatty acid deposition in juvenile Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). *PLoS One* 11 (6), 0156684. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0156684>.
- Simat, V., Bogdanović, T., Poljak, V., Petricević, S., 2015. Changes in fatty acid composition, atherogenic and thrombogenic health lipid indices and lipid stability of bogue (*Boops boops* Linnaeus, 1758) during storage on ice: effect of fish farming activities. *J. Food Compos. Anal.* 40, 120–125. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2014.12.026>.
- Simopoulos, A.P., 2008. The importance of the omega-6/omega-3 fatty acid ratio in cardiovascular disease and other chronic diseases. *Exp. Biol. Med.* 233 (6), 674–688. <https://doi.org/10.3181/0711-MR-311>.
- Sousa, A.A., Pinho, S.M., Rombenso, A.N., Mello, G.L., Emerenciano, M.G.C., 2019. Pizzeria by-product: a complementary feed source for Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) raised in biofloc technology? *Aquaculture* 501, 359–367. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.11.055>.
- Sousa, A.A., Lopes, D.L.A., Emerenciano, M.G.C., Nora, L., Souza, C.F., Baldissera, M.D., Baldissero, B., Da Silva, A.S., 2020. Phosphatidylcholine in diets of juvenile Nile tilapia in a biofloc technology system: effects on performance, energy metabolism and the antioxidant system. *Aquaculture* 515, 734574. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734574>.
- Souza, M.L., Maranhão, T.C.F., 2001. Rendimento de carcaça, filé e subprodutos da filetagem da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), em função do peso corporal. *Anim. Sci.* 23, 897–9001. <https://doi.org/10.4025/actascianimsci.v23i0.2643>.
- Souza, C.F., Baldissera, M.D., Baldisserotto, B., Petrolini, T.G., da Glória, E.M., Zanette, R. A., Da Silva, A.S., 2019. Dietary vegetable choline improves hepatic health of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fed aflatoxin-contaminated diet. *Comp. Biochem. Physiol. Part C* 108614. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2019.108614>.
- Tsegay, T., Natarajan, P., Zelealem, T., 2016. Analysis of diet and biochemical composition of Nile Tilapia (*O. niloticus*) from Tekeze reservoir and Lake Hashenge, Ethiopia. *J. Fish. Livestock Prod.* 4 (2) <https://doi.org/10.4172/2332-2608.1000172>.
- Turchini, G.M., Torstensen, B.E., Wingkeong, N., 2009. Fish oil re- placement in finfish nutrition. *Rev. Aquac.* 1, 10–57. <https://doi.org/10.1111/j.1753-5131.2008.01001.x>.
- Turchini, G.M., Trushenski, J.T., Glencross, B.D., 2018. Thoughts for the future of aquaculture nutrition: realigning perspectives to reflect contemporary issues related to judicious use of marine resources in aquafeeds. *N. Am. J. Aquac.* 81, 13–39. <https://doi.org/10.1002/naaq.10067>.
- Visentainer, J.V., 2012. Aspectos analíticos da resposta do detector de ionização em chama para ésteres de ácidos graxos em biodiesel e alimentos. *Química Nova* 35 (2), 274–279.
- Wasielesky, W., Atwood, H., Stokes, A., Browdy, C.L., 2006. Effect of natural production in a zero exchange suspended microbial floc based super-intensive culture system for white shrimp *Liopenaeus vannamei*. *Aquaculture* 258, 396–403. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.04.030>.
- Wei, Y., Liao, S.-A., Wang, A., 2016. The effect of different carbon sources on the nutritional composition, microbial community and structure of bioflocs. *Aquaculture* 465, 88–93. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.08.040>.
- Yates, C.M., Calder, P.C., Ed Rainger, G., 2014. Pharmacology and therapeutics of omega-3 polyunsaturated fatty acids in chronic inflammatory disease. *Pharmacol. Ther.* 141 (3), 272–282. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2013.10.010>.
- Zhang, Y.C., Li, F.C., 2010. Effect of dietary methionine on growth performance and insulin-like growth factor-I mRNA expression of growing meat rabbits. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 94, 803–809. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0396.2009.00975>.



Contents lists available at ScienceDirect

Aquaculture

journal homepage: www.elsevier.com/locate/aquaculture

Phosphatidylcholine in diets of juvenile Nile tilapia in a biofloc technology system: Effects on performance, energy metabolism and the antioxidant system

Alison A. Sousa^{a,*}, Diogo L.A. Lopes^{a,b}, Maurício G.C. Emerenciano^{a,c}, Luisa Nora^b, Carine F. Souza^d, Matheus D. Baldissera^d, Bernardo Baldisserotto^d, Davi F. Alba^a, Aleksandro S. Da Silva^{a,b,**}

^a Postgraduate Program in Animal Science, Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC), Chapecó, SC, Brazil

^b Department of Animal Science, UDESC, Chapecó, SC, Brazil

^c Department of Fisheries Engineering, UDESC, Laguna, SC, Brazil

^d Postgraduate Program in Pharmacology, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Vegetable choline
Additives
Hepatic health
Productive efficiency

ABSTRACT

Intensification of aquaculture production systems requires more nutritionally complete diets to maximize productive performance, metabolic processes and overall fish health. In previous studies, dietary supplementation with choline (both choline chloride and phosphatidylcholine) improved productive performance of tilapia cultivated in clear water. Nevertheless, choline has not been tested in a biofloc technology system (BFT), a culture system inhabited by diverse microorganisms that serve as food sources for fish. The objective of this study was to determine whether supplementation with phosphatidylcholine, also known as vegetable choline (0, 400, 800 and 1200 mg/kg of feed), in diets of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) in a biofloc system would stimulate energy metabolism and the serum antioxidant system, with consequent improvements in productive performance. Juvenile Nile tilapia (≈ 8 g) were tested over 40 days. During this period, zootechnical performance was evaluated. Blood, gills and liver were collected at the end of the experiment for biochemical and energetic analyses. There were no significant differences between the treatments with respect to parameters of zootechnical performance (body weight, biomass gain, feed conversion, specific growth rate and hepatosomatic index) ($P > 0.05$). Alanine aminotransferase levels were significantly lower in fish fed 800 mg/kg of phosphatidylcholine than in control; total protein levels increased as a result of increased globulin levels. Activities of creatine kinase enzyme (800 and 1200 mg choline/kg treatments) and pyruvate kinase (1200 mg choline/kg) were significantly higher in choline-treated fish than in controls. Supplementation with the three doses of choline reduced hepatic lipid peroxidation and stimulated glutathione S-transferase activity. By contrast, the activities of other antioxidant enzymes (catalase, glutathione peroxidase and superoxide dismutase) were altered in the livers of fish that consumed the highest doses of phosphatidylcholine. We conclude that, in a biofloc system, supplementation with phosphatidylcholine had no effect on the zootechnical performance of tilapia; however, it stimulated energy metabolism and contributed to activation of hepatic GST and lower levels of lipid peroxidation.

1. Introduction

Biofloc technology (BFT) is a production system with minimal or zero water exchange, used widely in aquaculture. BFT is characterized by low or zero effluent discharge, high biosecurity and productivity (Crab et al., 2012; Avnimelech, 2015). The microbial community

present in the system recycles nutrients, contributing nutrition sources for the cultured organisms; the system decreases feed conversion ratios and consequently reduces feeding costs (Wasielesky et al., 2006; Ekasari et al., 2014). Furthermore, BFT positively modulates the immune system of the organisms and provides greater protection against diseases (Emerenciano et al., 2013; Kim et al., 2014).

* Corresponding author.

** Corresponding author. Postgraduate Program in Animal Science, Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC), Chapecó, SC, Brazil.

E-mail addresses: alisonasousa@outlook.com (A.A. Sousa), dasilva.aleksandro@gmail.com (A.S. Da Silva).

<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734574>

Received 13 July 2019; Received in revised form 27 August 2019; Accepted 4 October 2019

Available online 14 October 2019

0044-8486/ © 2019 Elsevier B.V. All rights reserved.

Because of the trend towards intensification of production systems, studies on dietary requirements and high performance diets have increased (Cyrino et al., 2010; Turchini et al., 2018). Improvement on fish health is crucial for production success. In this sense, dietary supplements may contribute to this success (Elkamel et al., 2012; Reda et al., 2016). In particular, vitamins that are required in small quantities are crucial to performance parameters of fish as well as for enhancing several metabolic processes (Halver and Hardy, 2002).

Choline is a B-complex vitamin that is essential for animal development. It is responsible for the synthesis of methionine, and for the transport of fat from the liver to other tissues, preventing its accumulation (Devlin, 2000). Choline is commonly found in animal feeds in the form of choline chloride. Phosphatidylcholine (vegetable choline) is a relatively new source in aquafeeds; it has been used in diets for broiler chickens with positive results in terms of parameters of zootechnical performance (Kumar, 2009). For Nile tilapia, phosphatidylcholine has been showing promising results. Baldissiera et al. (2019) observed an improvement in zootechnical performance associated with a hepatoprotective effect and improvement of hepatic energetic metabolism in Nile tilapia fed at 400, 800 and 1200 mg/kg for 60 days. That study was conducted in clear water; the effects of phosphatidylcholine on fish cultured in a biofloc system remain unknown. Because fish farming with biofloc technology offers advantages over traditional fish farming (e.g., little or no water exchange and less environmental impact), its use has increased substantially; it is important to monitor the effects of phosphatidylcholine in this culture system (De Lima et al., 2018). Therefore, the objectives of the present study were to evaluate the effect of phosphatidylcholine dietary supplementation on productive performance, energy metabolism and serum and tissue antioxidant activities in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) raised in a biofloc system.

2. Materials and methods

The experiment was carried out at the Aquaculture Laboratory of the West (LAQUA-Oeste) of UDESC, Chapecó, SC, Brazil. The fish used in the experiment (juvenile Nile tilapia, *O. niloticus*) were obtained from a local fish farm, transported to the laboratory and then acclimatized and maintained for 10 days in 1000 L polyethylene round tanks until the beginning of the experiment. During this period, the fish were fed with diets containing 28% crude protein (Anhambí, Itapejara D'Oeste, PR, Brazil), twice a day (9:00 a.m. and 5:00 p.m.) in a ratio of 4% of biomass. The mean values of water quality parameters were as follows: dissolved oxygen was 6.42 mg L^{-1} , temperature 27.21°C , pH 7.29 and ammonia 0.19 mg L^{-1} .

2.1. Experimental design

The experimental device consisted of two workbenches referred as “macrocosm-microcosms” (Wasielesky et al., 2006; Emerenciano et al., 2013). Each bench contained twenty experimental units (100 L polyethylene round tanks with useful volume of 70 L; called as microcosms) connected to a 1000 L polyethylene round tank circular tank (with useful volume of 400 L) called as macrocosm. The water was pumped from the macrocosm to the experimental units using an external pump 0.5 CV (Intech Macchine®, SP, Brazil) and returned by gravity. The macrocosms were also connected to each other to maintain equivalent water quality and qualitative-quantitative profile of microorganisms (Brol et al., 2017).

Two thermostats were placed in each macrocosm (Atman® model BT-300 W, Zhujiang Sanjiao, China) to maintain the temperature close to 28°C throughout the experiment. The water used was collected from the municipal water supply network (CASAN), remaining for 48 h with continuous aeration to complete the dechlorination process. For the suspension of bioflocs and oxygenation of the water, microperforated hose rings (70 cm) were placed in the central position of the macrocosm, and a porous stone (20 mm in diameter and 30 mm in height) was

installed in each microcosm, fed by a radial air blower (800 W). Dechlorinated water lost by evaporation was replaced in the system. Finally, two decanters (one in each macrocosm) were placed to control the solids (Ray et al., 2010; Sousa et al., 2019), maintained in the range from 20 to 50 mL L^{-1} (Avnimelech, 2007).

One week before the experiment started, a mature biofloc inoculum was added to the experimental device (300 L in each macrocosm), from a previous BFT tilapia culture from LAQUA-Oeste. The inoculum presented the following characteristics: ammonia 0.21 mg L^{-1} , nitrite 0.06 mg L^{-1} , nitrate 0.39 mg L^{-1} , orthophosphate 46 mg L^{-1} , alkalinity $30 \text{ mg L}^{-1} \text{ CaCO}_3$ and settleable solids 15 mL L^{-1} . Simultaneously, 100 juvenile Nile tilapia ($\sim 15 \text{ g}$), were stocked in each macrocosm aiming the formation and maintenance of the bioflocs. For this procedure, the methodology proposed by Emerenciano et al. (2012) was applied using a C:N (carbon: nitrogen) ratio of 20:1 with daily addition of sugar cane molasses (liquid) as an external carbon source and 28% CP feed (Anhambí, Itapejara D'Oeste, PR, Brazil) as a nitrogen source.

The experiment was conducted in a completely randomized design with four treatments and five replicates per treatment. The treatments consisted of various levels of phosphatidylcholine (0, 400, 800 and 1200 g/kg of feed) according to Baldissiera et al. (2019). The diets were elaborated from a basal diet with 48% crude protein (CP). At the beginning of the experiment two-hundred Nile tilapia juvenile (mean initial weight $8.03 \pm 0.03 \text{ g}$) were stocked, 10 fish per experimental unit, in a density of 143 fish m^{-3} . The experiment lasted 40 days.

2.2. Diets and feed management

The experimental diets (isoproteic and isoenergetic) were formulated and elaborated at the Laboratory of Animal Nutrition (LANA), Santa Catarina State University (UDESC). The ingredients were weighed (Marte® scale, model AS2000C, SP, Brazil), phosphatidylcholine added (Table 1) according to each treatment level (0, 400, 800 and 1200 g/kg of feed) and mixed. After mixing, warm water ($\sim 60^\circ\text{C}$) was added at 300 mL/kg of feed with binder (gelatin, 1% of feed dry weight) for subsequent pelletization. The pellets were dried in an oven at 55°C (Cienlab®, Campinas, SP, Brazil) for 48 h, after being ground in porcelain crucibles and sieved (Bertel® sieve, Caieiras, SP, Brazil) to obtain consistent particle size of 2.5 mm. The diets were stored in plastic flasks and identified according to each treatment.

The fish were fed three times per day (9:00, 13:30 and 17:00 h).

Table 1

Percentage and chemical composition of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) basal diet used in the experiment.

Basal Feed formulation	
Ingredient	Quantity
Soymeal 45%	30.00
Poultry viscera flour	24.35
Rice meal	18.89
Feather meal	15.00
Bone and meat meal 45%	11.15
Premix-ap ¹	0.40
Antifungal ²	0.10
Antioxidant ³	0.10
Calculated Nutritional Composition	
Nutrients	Quantity
Crude protein	48.00
Fat	7.65
Crude fiber	4.32
Amide	4.05
Calcium	2.50
Total Lysine	2.31
Total Methionine + Cysteine total	1.67
Available Phosphate	1.51
Sodium	0.28

Note: ¹ Vaccinar (Maringá, PR, Brazil); ² Moldzap alltech (São Paulo, Brazil); ³ Banox alltech (São Paulo, Brazil).

During weeks 1 and 2, the amount of feed offered was 6% of the biomass, and until the end, 4% of the biomass was offered out. The feed amount was adjusted weekly using data obtained by biometrics. In the macrocosms, a commercial diet (28% crude protein, Anhambí, Itapejara D'Oeste, PR, Brazil) was offered twice a day (9:00 a.m. and 5:00 p.m.) at 4% of the biomass.

2.3. Maintenance and monitoring of water quality

The pH (Alfakit®, model AT 315SP, Florianópolis, SC, Brazil), settleable solids (Imhoff cone), temperature and dissolved oxygen (Alfakit®, model AT 160SP) were monitored daily. Weekly, the concentrations of ammonia, nitrite, nitrate and orthophosphate were measured using a photocolormeter (Alfakit®, model AT 100P) and total alkalinity was measured by volumetric titration using a commercial kit (Alfakit® – codes 2058 and 2460). In the first week of experimental period, the probiotic Keraacqua® (Farroupilha, RS, Brazil) was added to the water to stimulate heterotrophic bacteria and bioflocs growth according to the manufacturer's protocol.

2.4. Zootechnical performance and hepatosomatic index

At the of the experimental period, all fish were weighed individually on a digital scale with an accuracy of 0.01 g (Marte®, model: ML 600, São Paulo, Brazil). The zootechnical parameters evaluated were as follows: final weight (g); feed conversion ratio (FCR: feed intake/weight gain); specific growth rate (SGR: $100 \times \{\ln \text{ final weight} - \ln \text{ initial weight}\} / \text{days of the experiment}$); survival (%; $\{\text{final number}/\text{initial}\} \times 100$). The hepatosomatic index was calculated as (liver weight (g)/final weight (g) $\times 100$).

2.5. Fish collection for hepatosomatic and biochemical analysis

After evaluation of zootechnical performance, three fish from each experimental unit (15 per treatment) were anesthetized (eugenol 60 μ /L) and after there was no movement, fish were weighed and blood (caudal portion) collected without anticoagulant to obtain serum. After blood collection, the animals were immediately euthanized using medullar section for removal of liver and gills. The branchial arch of each fish (right side, ventral part down) was collected for biochemical analysis. To determine the hepatosomatic index, we used three fish from each experimental unit. Blood, gills and liver were stored in refrigerated 2 mL microtubes until processing and analysis. The procedures adopted were carried out according to the Ethics Committee on Animal Use (CEUA/UDESC).

2.6. Serum biochemistries

Blood samples were centrifuged at $5500 \times g$ for 10 min to obtain serum; material that was collected and stored in microtubes under freezing (-20°C) until analysis. The serum levels of aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), total protein, albumin, triglycerides and cholesterol were measured using specific commercial kits (Analisa) on a semiautomatic equipment (Bio Plus, 2000). Globulin levels were calculated as total protein – albumin levels.

2.7. Energy metabolism enzymes in gills

To evaluate enzymes belonging to the phosphoryl transfer network, 100 mg of gills filaments were washed in SET buffer (0.32 M sucrose, 1 mM EGTA, 10 mM Tris-HCl, pH 7.4) and homogenized (1:10 w/v) in the same SET buffer using a Potter-Elvehjem glass homogenizer. The homogenates were centrifuged at $800 \times g$ for 10 min at 4°C . Some of these supernatants were used to evaluate adenylate kinase (AK) activity; the pellets were discarded and the supernatants were once again centrifuged at $10,000 \times g$ for 15 min at 4°C . The supernatants

containing cytosol were collected for determination of pyruvate kinase (PK) and cytosolic creatine kinase (CK) activity. The pellets, containing mitochondria, were washed twice with the same SET buffer and resuspended in 100 mM Trizma and 15 mM MgSO_4 buffer (pH 7.5) to evaluate mitochondrial CK activity. The supernatants were stored for no more than 1 week at -80°C .

Branchial CK activity was assayed based on the colorimetric method established by Hughes (1962), estimating the creatine levels at wavelength of 540 nm, as reported in detail by Baldissera et al. (2017). Results were expressed as pmol of creatine formed/min/mg of protein. Branchial PK activity was assayed according to the protocol established by Leong et al. (1981), and published in detail by Baldissera et al. (2017). Activity was expressed as nmol pyruvate formed/min/mg of protein. Branchial AK activity was measured using a coupled enzyme assay with hexokinase (HK) and glucose 6-phosphate dehydrogenase (G6PD), according to Dzeja et al. (1999), and described in detail by Baldissera et al. (2017). Activity was expressed as nmol ATP formed/min/mg of protein.

2.8. Oxidant and antioxidant status in liver

Livers were homogenized (1:10 w/v) in medium containing 120 mM potassium chloride and 30 mM buffer phosphate (pH 7.4) and centrifuged ($800 \times g$, 10 min, -4°C) and the supernatant fraction obtained was frozen at -20°C . Protein concentrations were determined using the Coomassie Blue method following the methodology described by Read and Northcote (1981) using bovine serum albumin as a standard.

Reactive oxygen species (ROS) production was assessed by determining 2',7'-dichlorofluorescein (DCF) in oxidation (Lebel et al., 1992) DCFH-DA is hydrolyzed by intracellular esterases to form non-fluorescent DCF, which is then rapidly oxidized to form highly fluorescent DCF in the presence of ROS. The DCF fluorescence intensity correlates to the amount of ROS formed. Fluorescence was measured using excitation and emission wavelengths of 480 and 535 nm, respectively. A calibration curve was generated using standard DCF (0.1–1 μM), and data were calculated as U DCF/mg of protein.

Lipid peroxidation was estimated using thiobarbituric acid-reactive substances. The essential oil from biocholine induces stress in tilapia. The TBARS assay was performed using a malondialdehyde (MDA) reaction with 2-thiobarbituric acid (TBA) that was optically measured according to Buege and Aust (1978). TBARS levels were expressed as nmol MDA/g tissue. The activity of superoxide dismutase was determined according to the auto-oxidation principle of pyrogallol, inhibited in the presence of SOD. The optical density change was determined kinetically for 2 min at 420 nm, at 10 s intervals according to methodology described by Beutler (1984). Activity was expressed as U SOD/mg protein.

In addition, the catalase (CAT) activity was measured using the method described by Nelson and Kiesow (1972). The change of H_2O_2 absorbance after 60 s was measured at 240 nm using ultraviolet spectrophotometry. CAT activity was calculated and expressed as $\mu\text{mol CAT min}^{-1}\text{mg protein}^{-1}$. GST activity was measured according to Mannervik and Guthenberg (1981) with slight modifications. GST activity was measured as the rate of formation of dinitrophenyl-S-glutathione at 340 nm in a medium containing 50 mM potassium phosphate, pH 6.5, 1 mM GSH, 1 mM 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) as substrate, and tissue supernatants (approximately 0.045 mg of protein). The results were calculated and expressed as U GST/mg protein. Moreover, the GPx activity was measured using tert-butylhydroperoxide as the substrate (Wendel, 1981). The enzyme activity was determined by monitoring the NADPH disappearance at 340 nm in a medium containing 100 mM potassium phosphate buffer/1 mM EDTA, pH 7.7, 2 mM GSH, 0.1 U/mL GR, 0.4 mM azide, 0.5 mM tert-butyl hydroperoxide, 0.1 mM NADPH and tissue supernatants. The results were calculated and expressed as U GPx/mg protein.

Table 2

Means ($\pm$ SD) of water quality parameters of Nile tilapia supplemented with different levels of phosphatidylcholine (0, 400, 800 and 1200 mg choline/kg of feed) raised in a biofloc system during 40-d.

Parameters	Inclusion level				
	0	400	800	1200	Macrocosm
Dissolved oxygen (mg L^{-1})	6.50 $\pm$ 0.29	6.52 $\pm$ 0.29	6.57 $\pm$ 0.34	6.55 $\pm$ 0.35	6.48 $\pm$ 0.30
Temperature ($^{\circ}\text{C}$)	27.53 $\pm$ 1.26	27.62 $\pm$ 1.22	27.60 $\pm$ 1.21	27.63 $\pm$ 1.22	27.66 $\pm$ 1.24
pH	7.06 $\pm$ 0.68	7.09 $\pm$ 0.68	7.09 $\pm$ 0.66	7.07 $\pm$ 0.68	7.10 $\pm$ 0.67
Settleable solids (mL L^{-1})	–	–	–	–	19.27 $\pm$ 14.06
Ammonia (mg L^{-1})	–	–	–	–	0.21 $\pm$ 0.20
Nitrite (mg L^{-1})	–	–	–	–	0.19 $\pm$ 0.16
Nitrate (mg L^{-1})	–	–	–	–	0.28 $\pm$ 0.29
Orthophosphate (mg L^{-1})	–	–	–	–	25.73 $\pm$ 14.65
Alkalinity ($\text{mg L}^{-1} \text{CaCO}_3$)	–	–	–	–	44.50 $\pm$ 33.54

2.9. Statistical analysis

Descriptive statistics (means $\pm$ SD) were used to described the water quality parameters in each treatment and macrocosms. The data were analyzed using R-language, v.2.15.1 (R Development Core Team, 2012). The normality (Shapiro-Wilk test) and homogeneity (Levene test) were assessed. Data that did not met normal distribution were log transformed. Once data met the assumptions, significant differences between the treatments were detected through the Tukey test (Sokal and Rohlf, 1995). All data were analyzed at 5% level of significance ($P < 0.05$).

3. Results

3.1. Water quality, zootechnical performance and hepatosomatic index

The results of water quality parameters are displayed in Table 2. The values were similar between treatments and macrocosms. The dissolved oxygen mean level was $6.52 \pm 0.04 \text{ mg L}^{-1}$, temperature $27.61 \pm 0.05 ^{\circ}\text{C}$ and pH 7.08 ± 0.02 . With respect to nitrogen compounds, ammonia was present at levels of $0.21 \pm 0.20 \text{ mg L}^{-1}$, nitrite $0.19 \pm 0.16 \text{ mg L}^{-1}$ and nitrate $0.28 \pm 0.29 \text{ mg L}^{-1}$. Orthophosphate and alkalinity levels were $25.73 \pm 14.65 \text{ mg L}^{-1}$ and $44.50 \pm 33.54 \text{ mg L}^{-1}$ of CaCO_3 , respectively. Settleable solids (volume of bioflocs) were present at a mean of $19.27 \pm 14.06 \text{ mL L}^{-1}$.

The survival rates of the T0, T400, T800 and T1200 treatments were 98%, 96%, 96% and 98%, respectively. There were no significant differences between treatments in terms of initial weight, final weight, weight gain, biomass gain, feed conversion, specific growth rate and hepatosomatic index ($P > 0.05$) (Table 3).

3.2. Serum biochemistry

There were no significant differences between the treatments with respect to serum levels of AST, albumin, cholesterol and triglycerides ($P > 0.05$). Serum ALT levels were significantly lower at 800 mg/kg treatment than at other treatment levels.

Table 3

Zootechnical performance of Nile tilapia supplemented with different levels of phosphatidylcholine (0, 400, 800 and 1200 mg choline/kg of feed) raised in a biofloc system during 40-d.

Variable	0	400	800	1200	P-value*
Initial weight (g)	8.03 $\pm$ 0.03	8.04 $\pm$ 0.04	8.02 $\pm$ 0.005	8.02 $\pm$ 0.01	0.986
Final weight (g)	29.5 $\pm$ 1.5	28.8 $\pm$ 1.04	29.9 $\pm$ 2.46	29.4 $\pm$ 2.33	0.537
Weight gain (g/fish)	21.5 $\pm$ 1.39	20.8 $\pm$ 0.95	21.8 $\pm$ 1.34	21.4 $\pm$ 1.98	0.495
BG (g/box)	209.1 $\pm$ 18.9	196.4 $\pm$ 12.5	206.9 $\pm$ 20.0	207.3 $\pm$ 21.8	0.384
FC	1.30 $\pm$ 0.09	1.36 $\pm$ 0.05	1.36 $\pm$ 0.28	1.32 $\pm$ 0.14	0.621
SGE (% dia^{-1})	3.34 $\pm$ 0.13	3.27 $\pm$ 0.09	3.34 $\pm$ 0.26	3.31 $\pm$ 0.28	0.453
HSI	2.86 $\pm$ 0.62	2.92 $\pm$ 0.75	2.95 $\pm$ 0.82	2.84 $\pm$ 0.87	0.620

BG = Biomass gain; FC = Feed conversion; SGE = Specific growth rate; HSI = Hepatosomatic index. *No significant difference ($P > 0.05$).

Serum globulin and total protein levels were significantly higher in the supplemented groups at 400 and 1200 mg/kg than in the control group, whereas serum glucose levels were significantly lower in the supplemented group at 800 mg/kg (Table 4).

3.3. Enzymatic activity in the gills

CK-CYT activity was significantly higher in fish gills fed with 800 and 1200 mg/kg choline than in the control (0 mg/kg), while PK activity was significantly higher in tilapia fed at 1200 mg/kg choline compared to control. There was no significant difference between the treatments with respect to activity of the enzymes CK-MYT and AK ($P > 0.05$) (Table 5).

3.4. Oxidant and antioxidant status in liver

Hepatic TBARS levels were significantly lower in fish from the three supplemented treatments with phosphatidylcholine than in control ($P < 0.05$), although ROS levels did not differ significantly between treatments ($P > 0.05$). GST activity was significantly higher in livers of fish supplemented with phosphatidylcholine (800 and 1200 mg/kg) than in the control group ($P < 0.001$), whereas SOD activity was significantly lower in the same groups. Finally, the activities of GPx and CAT were significantly lower in the 1200 mg/kg of choline group than in the control group (Table 6).

4. Discussion

The water quality parameters remained within the ideal levels for the species throughout the experiment (El-Sayed, 2006). The values were consistent with those of other BFT experiments with tilapia (Azim and Little, 2008; Brol et al., 2017; Sousa et al., 2019). The alkalinity presented an average of $44.50 \pm 33.54 \text{ mg L}^{-1}$ of CaCO_3 , below those recommended by Avnimelech (2015) with $> 100 \text{ mg L}^{-1}$ of CaCO_3 aiming to keep nitrification process and ammonia uptake by heterotrophic bacteria (Hargreaves, 2013). However, the observed level in the present study did not change the system dynamics of pH and nitrogen

Table 4

Serum biochemistry of Nile tilapia (n = 10 per treatment) supplemented with different levels of phosphatidylcholine (0, 400, 800 and 1200 mg choline/kg of feed) raised in a biofloc system during 40-d.

Variable	0	400	800	1200	P-value
AST	114.2 ± 29	118.1 ± 36.6	86.5 ± 30.2	90.1 ± 33.7	0.168
ALT	28.0 ± 1.0 ^a	26.0 ± 1.50 ^a	16.5 ± 1.91 ^b	30.20 ± 5.05 ^a	0.001*
Total protein	3.62 ± 0.6 ^b	4.46 ± 0.85 ^a	4.13 ± 0.70 ^{ab}	4.34 ± 0.65 ^a	0.050*
Albumin	0.90 ± 0.35	0.89 ± 0.37	0.96 ± 0.43	0.90 ± 0.34	0.895
Globulin	2.45 ± 0.49 ^b	3.57 ± 0.81 ^a	3.17 ± 0.51 ^{ab}	3.44 ± 0.56 ^a	0.047*
Glucose	54.8 ± 11.5 ^{ab}	59.5 ± 11.7 ^{ab}	47.4 ± 5.76 ^b	64.4 ± 13.2 ^a	0.028*
Cholesterol	86.2 ± 14.7	85.8 ± 13.2	88.4 ± 15.7	89.7 ± 10.6	0.924
Triglycerides	175.4 ± 32.5	178.8 ± 52.6	156.4 ± 64.7	167.5 ± 42.9	0.687

Note: Asterisk (*) indicates difference between groups; the difference being shown by different letters (a, b, c) on the same line (P < 0.05). Aspartate amino-transferase (AST: U/L), alanine aminotransferase (ALT: U/L), total protein (g/dL), albumin (g/dL), globulin (g/dL), glucose (mg/dL), cholesterol (mg/dL) and triglycerides (mg/dL).

compounds, and therefore, did not negatively impact the overall water quality. Orthophosphate presented an average of 25.73 ± 14.65 mg L⁻¹, a similar value to the one reported by Sousa et al. (2019) of 27.45 mg L⁻¹. The accumulation of this compound is common in the BFT system (Wasielesky et al., 2006; Emerenciano et al., 2017).

In the present study, there was no effect of phosphatidylcholine supplementation on zootechnical performance of tilapia. By contrast, Baldissiera et al. (2019) showed that the dietary inclusion of 800 mg of phosphatidylcholine/kg in Nile tilapia juveniles (~7.10 g) for 61 days in clear water improved growth performance. In addition, the authors observed in the control treatment a mean of 24.75 g of final weight, lower than 29.5 g in 40 days in the control treatment of the present experiment (~8.03 g initial weight). This may suggest that bioflocs contributed to the growth and may have supplied the demand for phosphatidylcholine. This nutrient would be naturally available in the form of microorganisms consumed by fish, including heterotrophic bacteria, rotifers, microalgae, nematodes, annelids, protozoa, heterotrophic bacteria and copepods (Ray et al., 2010; Sousa et al., 2019). In addition, bioflocs contain proteins, lipids, fatty acids and essential amino acids, as well as vitamins (Ju et al., 2008; Emerenciano et al., 2013; Ekasari et al., 2014).

Khosravi et al. (2015) suggested that fish fed choline-deficient diets may present decreased feed intake, growth retardation and low survival; this was not reported in the present study. Another explanation for the different results between biofloc and clear water might be related to the nutritional composition of the diet, and differential digestibility of feedstuff might affect the supply of micronutrients and overall fish performance (Furuya and Furuya, 2010). With respect to hepatosomatic index (HSI), there were no significant differences between the treatments (P > 0.05). The authors would expect that this index could be positively affected by phosphatidylcholine because of its hepatoprotective function (Baldissiera et al., 2019); nevertheless, this did not happen.

High levels of AST and ALT may indicate physiological or pathological conditions e.g. by an increase of protein catabolism (Luo et al., 2016) or liver damage. In the present study, AST did not differ between

treatments; however, ALT showed lower levels in the 800 mg of phosphatidylcholine/kg group, possibly may suggesting that this dose had a hepatoprotective effect during protein synthesis, corroborating protective effects of choline on the hepatic system (Baldissiera et al., 2019). Total serum protein levels increased in groups with phosphatidylcholine as a result of increased globulin, a protein fraction that includes proteins involved in the immune response. Studies showed that increased blood globulin levels imply an improvement in the immune system of fish (Elkamel and Mosaad, 2012; Dorucu et al., 2009), suggesting that phosphatidylcholine directly or indirectly stimulated the immune system. The mechanism remains unknown; nevertheless, it deserves further research. In our study, we observed lower serum glucose levels in fish fed 800 mg/kg of phosphatidylcholine, a good indicator of lower stress. In a study conducted by Baldissiera et al. (2019) tilapia liver glucose levels were higher when supplemented at 1200 mg/kg. Generally, high glucose levels may suggest metabolic and biochemical disorders that would compromise ATP production.

CK presents in the cytoplasm and mitochondria of the cell generally acts as a regulator of energy homeostasis (Wallimann et al., 1998). In the present study, higher CK-CYT activity was observed in the gills of fish fed 800 and 1200 mg/kg of phosphatidylcholine, suggesting improved ATP production in gill cells. There was also an increase on PK activity with the inclusion of phosphatidylcholine. This phenomenon may benefit the fish because these enzymes normally regulate energy metabolism and could positively affect fish health (Baldissiera et al., 2017). According to Wang et al. (2002) PK is the major route of energy supply to tissue cells, in other words, increased PK activity may have stimulated the generation of ATP in the gills. Corroborating our observations, Baldissiera et al. (2019) reported a significant increase in hepatic PK activity of Nile tilapia fed with diets containing 800 and 1200 mg choline/kg of feed, suggesting an increase in pyruvate and ATP production in liver tissue, boosting the energy transfer and distribution, as well as contributing on the balance between cellular adenosine triphosphate (ATP) consumption and production. Therefore, increased branchial PK activity can contribute to improvement of energy transfer and distribution in tissues with higher energy requirements, including gill tissue (Baldissiera et al., 2019).

Table 5

Enzymes involved in energetic metabolism in the gills of Nile tilapia (n = 10 per treatment) supplemented with different levels of phosphatidylcholine (0, 400, 800 and 1200 mg choline/kg of feed) raised in a biofloc system during 40-d.

Variable	0	400	800	1200	P-value
CK-MIT	0.65 ± 0.11	0.65 ± 0.11	0.60 ± 0.10	0.61 ± 0.09	0.512
CK-CYT	0.27 ± 0.05 ^b	0.31 ± 0.09 ^{ab}	0.41 ± 0.05 ^a	0.40 ± 0.06 ^a	0.011*
PK	0.11 ± 0.03 ^b	0.15 ± 0.03 ^{ab}	0.17 ± 0.05 ^{ab}	1.20 ± 0.05 ^a	0.001*
AK	0.25 ± 0.04	0.29 ± 0.11	0.31 ± 0.04	0.29 ± 0.04	0.056

Note: Asterisk (*) indicates difference between groups; the difference being shown by different letters (a, b, c) on the same line (P < 0.05). Mitochondrial creatine kinase (CK-MIT: pmol of creatine formed/min/mg of protein), cytosolic creatine kinase (CK-CYT: pmol of creatine formed/min/mg of protein), pyruvate kinase (PK: nmol pyruvate formed/min/mg of protein) and adenylate kinase (AK: nmol ATP formed/min/mg of protein).

Table 6

Oxidant and antioxidant variables in the liver of Nile tilapia of Nile tilapia (n = 10 per treatment) supplemented with different levels of phosphatidylcholine (0, 400, 800 and 1200 mg choline/kg of feed) raised in a biofloc system during 40-d.

Variable	0	400	800	1200	P-value
TBARS	7.62 ± 1.81 ^a	5.85 ± 1.36 ^b	5.75 ± 0.98 ^b	5.68 ± 0.96 ^b	0.001*
ROS	1.96 ± 0.38	1.86 ± 0.64	1.76 ± 0.60	1.83 ± 0.51	0.725
GPx	1.1 ± 0.23 ^a	0.99 ± 0.34 ^{ab}	0.75 ± 0.33 ^{ab}	0.60 ± 0.18 ^b	0.050*
GST	4.41 ± 1.47 ^b	8.65 ± 3.14 ^{ab}	12.7 ± 4.67 ^a	12.2 ± 2.76 ^a	0.001*
SOD	3.20 ± 0.50 ^a	3.49 ± 0.98 ^{ab}	2.59 ± 0.31 ^{bc}	2.12 ± 0.22 ^c	0.001*
CAT	0.94 ± 0.25 ^a	0.84 ± 0.28 ^{ab}	0.69 ± 0.15 ^{ab}	0.62 ± 0.14 ^b	0.020*

Note: Asterisk (*) indicates difference between groups; the difference being shown by different letters (a, b, c) on the same line (P < 0.05). Lipid peroxidation (TBARS: nmol MDA/g of tissue), reactive oxygen species (ROS: U DCF/mg of protein), glutathione peroxidase (GPx: U GPx/mg of protein), glutathione S-transferase (GST: U GST/mg of protein), superoxide dismutase (SOD: U SOD/mg of protein) and catalase (CAT: μmol/mg of protein/min).

Choline doses of 400, 800 and 1200 mg/kg decreased lipid peroxidation in the liver, as observed by Baldissiera et al. (2019). Cells have enzymatic and non-enzymatic antioxidant systems responsible for maintaining oxidant/antioxidant balance, thereby avoiding harmful biochemical reactions. In the first study with phosphatidylcholine in tilapia, researchers found that, in the livers of supplemented fish, the total antioxidant capacity was higher (Baldissiera et al., 2019). In the present study, we measured the activity of GPx, GST, SOD and CAT, because these enzymes constitute defenses against free radicals at exacerbated levels; nevertheless, it is important to mention that the fish defense system can also produce free radicals to eliminate pathogens; therefore, the balance between oxidants and antioxidants is important for fish health. These antioxidants enzymes are important in the liver, performing several functions including detoxification. These enzymes are also the first line of defense of the cells against free radicals (Hegazi et al., 2010) that, if not blocked, cause oxidative stress. Hoseinifar et al. (2016) evaluated palm extract in diets of common carp (~4.06 g) and observed an increase in antioxidant defenses; GPx was the main enzyme stimulated by palm extract. We did not observe this effect in the present study. We observed lower activity of CAT, SOD and GPx antioxidant enzymes in the livers of fish supplemented with phosphatidylcholine. These enzymes are stimulated by various factors, particularly when the fish comes in contact with pathogenic microorganisms present in the culture system (Yilmaz, 2019). In the biofloc system as mentioned, the amounts of microorganisms are substantial, possibly causing stimulation of the antioxidant system. Therefore, our hypothesis is that choline protected livers in the 800 and 1200 mg/kg groups. The mechanism was not a reduction in the activity of the antioxidant enzymes in these groups; rather, there was increased liver enzymatic activity in the control group (0 mg/kg).

GST is one of the most important antioxidant enzymes in the liver. Its main function is the sequestration of free radicals. The activity of this enzyme increases in the presence of some dietary additives (Metwally et al., 2009). This notion was confirmed when phosphatidylcholine directly influenced liver GST activity in the present study. There was an increase in GST activity at higher levels of inclusion of phosphatidylcholine, causing a hepatoprotective effect, and consequently reducing the need for the activity of the other antioxidant enzymes. The mechanism of how phosphatidylcholine stimulates GST is unknown; nevertheless, choline has already been associated with regulation of the antioxidant response in organs involved in the immune response of fish (Wu et al., 2014). Wu et al. (2014) found that vegetable choline (310, 607, 896, 1167 and 1820 mg/kg) for 65 days improved the antioxidant defense system in immune organs (head kidney and spleen) of common carp (*Cyprinus carpio*), concluding that improvement of antioxidant defense system may contribute to enhancement of fish immune system, optimizing the immune response to pathogens. Shiu et al. (2017) reported that choline (1 g/kg) altered plasma protein profile and modulated expression of related immune-enhancing proteins of *Epinephelus coioides*, proteins that play important roles in immune responses against pathogens, suggesting the potential use of

choline to boost the immune system. It is evident here that the phosphatidylcholine directly and indirectly influenced in metabolism of serum carbohydrates, the energetic metabolism of the gills and the antioxidant status of the liver in Nile tilapia raised in BFT system; nevertheless, these effects were not sufficient to be reflected in productive performance during the first 42 days of supplementation. Therefore, longer-term studies are important to verify the impact on the productive performance these fish.

5. Conclusion

Our results suggest that dietary supplementation of phosphatidylcholine in Nile tilapia raised in BFT system did not improve zootechnical performance. Nevertheless, phosphatidylcholine supplementation stimulated energy metabolism (important in the regulation of cellular homeostasis), as well as GST activity contributing to lower rates of lipid peroxidation.

Ethics committee

The project was approved by the Ethics Committee on the Use of Animals in Research at the State University of Santa Catarina, number: 9595130319.

Declaration of competing interest

The authors declare no conflicts of interest.

Acknowledgements

The authors thank the Brazilian National Council for Scientific and Technological Development - CNPq (Brazil) and the Scientific and Technological Research Support Foundation of Santa Catarina State - FAPESC. M Emerenciano and A. S. Da Silva are CNPq research fellow. In addition, the first author received CAPES (Brazil) master's fellowship. Authors thank to all the staff of LAQUA-Oeste for technical support.

References

- Avnimelech, Y., 2007. Feeding with microbial flocs by tilapia in minimal discharge bio-flocs technology ponds. *Aquaculture* 264, 140–147. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.11.025>.
- Avnimelech, Y., 2015. *Biofloc Technology - a Practical Guide Book*, 3rd ed. J. World Aquacult. Soc., Baton Rouge, Louisiana, EUA.
- Azim, M.E., Little, D.C., 2008. The biofloc technology (BFT) in indoor tanks: water quality, biofloc coposition, and growth and welfare of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture* 283, 29–35. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.06.036>.
- Baldissiera, M.D., Souza, C.F., Baldissierotto, B., Zimmer, F., Paiano, D., Petrolli, T.G., da Silva, A.S., 2019. Vegetable choline improves growth performance, energetic metabolism, and antioxidant capacity of fingerling Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture* 501, 224–229. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.11.021>.
- Baldissiera, M.D., Souza, C.F., Santos, R.C.V., Stefani, L.M., Moreira, K.L.S., da Veiga, M.L., Rocha, M.I.U.M., Baldissierotto, B., 2017. *Pseudomonas aeruginosa* strain PA01 impairs enzymes of the phosphotransfer network in the gills of *Rhamdia quelen*. *Vet.*

- Microbiol. 201, 121–125. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2017.01.016>.
- Beutler, E., 1984. Superoxide dismutase. In: Beutler, E. (Ed.), Red Cell Metabolism. A Manual of Biochemical Methods. Grune & Stratton, Philadelphia, PA.
- Brol, J., Pinho, S.M., Sgnaulin, T., Pereira, K.R., Thomas, M.C., de Mello, G.L., Miranda-Baeza, A., Emerenciano, M.G.C., 2017. Tecnologia de bioflocos (BFT) no desempenho zootécnico de tilápias: efeito da linhagem e densidades de estocagem. Arch. Zootec. 66, 229–235. <https://doi.org/10.21071/az.v66i254.2326>.
- Buege, J.A., Aust, S.D., 1978. Microsomal lipid peroxidation. Methods Enzymol. 52, 302–310. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(78\)52032-6](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(78)52032-6).
- Crab, R., Defoirdt, T., Bossier, P., Verstraete, W., 2012. Biofloc technology in aquaculture: beneficial effects and future challenges. Aquaculture 356–357, 351–356. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.04.046>.
- Cyrino, J.E.P., Bicuado, A.J.A., Sado, R.Y., Borghesi, R., Dairiki, J.K., 2010. A piscicultura e o ambiente – o uso de alimentos ambientalmente corretos em piscicultura. Rev. Bras. Zootec. 39, 68–87.
- De Lima, E.C.R., Souza, R.L., Girao, L.J.M., Braga, I.F.M., Correia, E.S., 2018. Culture of Nile tilapia in a biofloc system with different sources of carbon. Rev. Cien. Agranon. 49, 458–466.
- Devlin, T.M., 2000. Manual de bioquímica com correlações químicas. Edgard Blucher, São Paulo.
- Dorucu, M., Colak, S.O., Inspir, U., Altinterim, B., Celayir, Y., 2009. The effect of black cumin seeds, *Nigella sativa*, on the immune response of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Mediter. Aquaculture J. 02, 27–33.
- Dzeja, P.P., Vitkevicius, K.T., Redfield, M.M., Burnett, J.C., Terzic, A., 1999. Adenylate kinase-catalyzed phosphotransfer in the myocardium: increased contribution in heart failure. Circ. Res. 84, 1137–1143. <https://doi.org/10.1161/01.RES.84.10.1137>.
- Ekasari, J., Angela, D., Waluvo, S.H., Bachtar, T., Surawibajaja, E.H., Bossier, P., de Schryver, P., 2014. The size of biofloc determines the nutritional composition and the nitrogen recovery by aquaculture animals. Aquaculture 426–427, 102–111. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.01.023>.
- Elkamel, A.A., Mosaad, G.M., 2012. Immunomodulation of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, by *Nigella sativa* and *Bacillus subtilis*. J. Aquac. Res. Dev. 3. <https://doi.org/10.4172/2155-9546.1000147>.
- El-Sayed, A.M., 2006. Tilapia Culture. CABI Publishing Series, Egypt 2006.
- Emerenciano, M., Ballester, E.L.C., Cavalli, R.O., Wasielesky, W., 2012. Biofloc technology application as a food source in a limited water exchange nursery system for pink shrimp *Farfantepenaeus brasiliensis* (Latreille, 1817). Aquacult. Res. 43, 447–457. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2011.02848.x>.
- Emerenciano, M., Gaxiola, G., Cuzon, G., 2013. Biofloc Technology (BFT): a Review for 347 Aquaculture Application and Animal Food Industry. J. World Aquacult. Soc., Baton Rouge, Louisiana, United States.
- Emerenciano, M.G.C., Martínez-Córdova, L.R., Martínez-Porchas, M., Miranda-Baeza, A., 2017. Biofloc Technology (BFT): A Tool for Water Quality Management in Aquaculture. InTech, pp. 91–109 2017.
- Furuya, W.M., Furuya, V.R.B., 2010. Nutritional innovations on amino acids supplementation in Nile tilapia diets. Rev. Bras. Zootec. 39, 88–94. <https://doi.org/10.1590/S1516-35982010001300010>.
- Halver, J.E., Hardy, R.W., 2002. Fish Nutrition. Elsevier, San Diego.
- Hargreaves, J.A., 2013. Biofloc Production Systems for Aquaculture. Southern Regional Aquaculture Center.
- Hegazi, M.M., Attia, Z.I., Ashour, O.A., 2010. Oxidative stress and antioxidant enzymes in liver and white muscle of Nile tilapia juveniles in chronic ammonia exposure. Aquat. Toxicol. (N. Y.) 99, 118–125. <https://doi.org/10.1016/j.aquat.2010.04.007>.
- Hoseinfar, S.H., Ringo, E., Masouleh, A.S., Esteban, M.A., 2016. Probiotic, prebiotic and synbiotic supplements in sturgeon aquaculture: a review. Rev. Aquac. 8, 89–102. <https://doi.org/10.1111/raq.12082>.
- Hughes, B.P., 1962. A method for estimation of serum creatine kinase and its use in comparing creatine kinase and aldolase activity in normal and pathological sera. Clin. Chim. Acta 7, 597–603. [https://doi.org/10.1016/0009-8981\(62\)90137-7](https://doi.org/10.1016/0009-8981(62)90137-7).
- Ju, Z.Y., Forster, I., Conquest, L., Dominy, W., 2008. Enhanced growth effects on shrimp (*Litopenaeus vannamei*) from inclusion of whole shrimp floc fractions to a formulated diet. Aquacult. Nutr. 14, 533–543. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2007.00559.x>.
- Khosravi, S., Jang, J.W., Rahimnejad, S., Song, J.W., Lee, K.J., 2015. Choline essentiality AND its requirement IN diets FOR juvenil parrot fish (*Oplehnatus fasciatus*). Asian-Australas. J. Anim. Sci. 28, 647–653. <https://doi.org/10.5713/ajas.14.0532>.
- Kim, S.K., Pang, Z., Seo, H.C., Cho, Y.R., Samocha, T., Jang, I.K., 2014. Effect of bioflocs on growth and immune activity of Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* postlarvae. Aquacult. Res. 45, 362–371. <https://doi.org/10.1111/are.12319>.
- Kumar, A., 2009. Comparative efficacy of herbal biocholine and synthetic choline chloride (60%) in commercial broilers. Poult. Technol. 3, 38–40.
- Lebel, C.P., Ischiropoulos, H., Bondy, S.C., 1992. Evaluation of the probe 2', 7' - dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. Chem. Res. Toxicol. 5, 227–231. <https://doi.org/10.1021/tx00026a012>.
- Leong, S.F., Lai, J.C.K., Lim, L., Clark, J.B., 1981. Energy-metabolising enzymes in brain regions of adult and aging rats. J. Neurochem. 37, 1548–1556. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1981.tb06326.x>.
- Luo, Z., Wei, C.-C., Ye, H.-M., Zhao, H.-P., Song, Y.-F., Wu, K., 2016. Effect of dietary choline levels on growth performance, lipid deposition and metabolism in juvenile yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco*. Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol. 202, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2016.07.005>.
- Mannervik, B., Guthenberg, C., 1981. Glutathione transferase (human placenta). Methods Enzymol. 77, 231–235. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(81\)77030-7](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(81)77030-7).
- Metwally, M.A.A., 2009. Effects of garlic (*Allium sativum*) on some antioxidant activities in tilapia nilotica (*Oreochromis niloticus*). World J. Fish Mar. Sci. 1, 56–64.
- Nelson, D.P., Kiesow, L.A., 1972. Enthalpy of decomposition of hydrogen peroxide by catalase at 25°C (with molar extinction coefficients of H₂O₂ solutions in the UV). Anal. Biochem. 49, 474–478. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(72\)90451-4](https://doi.org/10.1016/0003-2697(72)90451-4).
- Ray, A.J., Lewis, B.L., Browdy, C.L., Leffler, J.W., 2010. Suspended solids removal to improve shrimp (*Litopenaeus vannamei*) production and an evaluation of a plant-based feed in minimal-exchange, superintensive culture systems. Aquaculture 299, 89–98. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2009.11.021>.
- Read, S.M., Northcote, D.H., 1981. Minimization of variation in the response to different proteins of the Coomassie blue G dye-binding assay for protein. Anal. Biochem. 116, 53–64. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(81\)90321-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(81)90321-3).
- Reda, R.M., Mahmoud, R., Selim, K.M., El-Araby, I.E., 2016. Effects of dietary acidifiers on growth, hematology, immune response and disease resistance of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. Fish Shellfish Immunol. 50, 255–262. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2016.01.040>.
- Shiu, Y.L., Chiu, K.H., Huynh, T.G., Liu, P.C., Liu, C.H., 2017. Plasma immune protein analysis in the orange-spotted grouper *Epinephelus coioides*: evidence for altered expressions of immune factors associated with a choline-supplemented diet. Fish Shellfish Immunol. 65, 235–243.
- Sokal, R., Rohlf, J., 1995. Biometry, the Principles and Practice of Statistics in Biological Research. W H Freeman, New York.
- Sousa, A.A., Pinho, S.M., Rombenso, A.N., Mello, G.L., Emerenciano, M.G.C., 2019. Pizzeria by-product: a complementary feed source for Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) raised in biofloc technology? Aquaculture 501, 359–367. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.11.055>.
- Turchini, G.M., Trushenski, J.T., Glencross, B.D., 2018. Thoughts for the future of aquaculture nutrition: realigning perspectives to reflect contemporary issues related to judicious use of marine resources in aquafeeds. N. Am. J. Aquacult. 81, 13–39. <https://doi.org/10.1002/naaq.10067>.
- Wallimann, T., Dolder, M., Schlattner, U., Eder, M., Hornemann, T., O'Gorman, E., Ruck, A., Brdiczka, D., 1998. Some new aspects of creatine kinase (ck): compartmentation, structure, function and regulation for cellular and mitochondrial bioenergetics and physiology. Biofactors 08, 229–234.
- Wang, H., Chu, W., Das, S.K., Ren, Q., Hasstedt, S.J., Elbein, S.C., 2002. Liver pyruvate kinase polymorphisms are associated with type 2 diabetes in northern european caucasians. Diabetes 51, 2861–2865. <https://doi.org/10.2337/diabetes.51.9.2861>.
- Wasielesky, W., Atwood, H., Stokes, A., Browdy, C.L., 2006. Effect of natural production in a zero exchange suspended microbial floc based super-intensive culture system for white shrimp *Litopenaeus vannamei*. Aquaculture 258, 396–403. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.04.030>.
- Wendel, A., 1981. Glutathione peroxidase. Methods Enzymol. 77, 325–333. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(81\)77046-0](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(81)77046-0).
- Wu, P., Jiang, W.-D., Liu, Y., Chen, G.-F., Jiang, J., Li, S.-H., Feng, L., Zhou, X.-Q., 2014. Effect of choline on antioxidant defenses and gene expressions of Nrf2 signaling molecule in the spleen and head kidney of juvenile Jian carp (*Cyprinus carpio* var. Jian). Fish Shellfish Immunol. 38, 374–382. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2014.03.032>.
- Yilmaz, S., 2019. Effects of dietary caffeic acid supplement on antioxidant, immunological and liver gene expression responses, and resistance of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* to *Aeromonas veronii*. Fish Shellfish Immunol. 86, 384–392. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.11.068>.



Inclusão de óleos essenciais em um substituto do leite de bezerro e seus efeitos no desempenho do crescimento e nos sistemas imunológico e oxidativo

Luisa Nora¹ · Charles Marcon Giacomelli¹ · Guilherme Luiz Deolindo¹ · Vitor Luiz Molosse¹ · Priscila M. Copetti¹ · Bianca F. Bissacotti² · Vera M. Morsch² · Aleksandro Schafer da Silva¹



Recebido: 24 de outubro de 2023 / Aceito: 23 de janeiro de 2024 / Publicado online: 5 de fevereiro de 2024

© O(s) autor(es), sob licença exclusiva da Springer-Verlag London Ltd., parte da Springer Nature 2024

Resumo

O uso de óleos essenciais na alimentação animal está aumentando, mas precisa ser aplicável. Este estudo determinou se um substituto do leite reformulado contendo uma mistura de óleos essenciais compostos de canela, orégano e eucalipto melhora os sistemas imunológico e oxidativo de bezerros lactentes, consequentemente melhorando o desempenho produtivo. Dezesesseis bezerros holandeses (dez dias de idade) mamaram por 60 dias. Os animais foram divididos em um grupo controle ($n = 8$), que recebeu o substituto do leite comercial, e um grupo de tratamento ($n = 8$), que recebeu um substituto do leite contendo óleos. Os animais foram alimentados duas vezes ao dia com 0,25 kg de substituto do leite diluído em dois litros de água em cada alimentação. O substituto do leite no grupo de tratamento continha 5 g de aditivo por kg. O substituto do leite contendo óleos essenciais tinha um aroma e odor fortes e, consequentemente, foi rejeitado por dois bezerros no grupo de tratamento. Esses animais foram retirados do experimento após cinco dias de tentativas de adaptação. Os bezerros também receberam concentrado peletizado desde o início do experimento e feno picado a partir de 28 dias (ambos ad libitum). O grupo de tratamento apresentou maior ganho de peso e eficiência alimentar do que os animais controle. Menores contagens de linfócitos foram observadas em bezerros alimentados com substitutos do leite contendo óleos essenciais. A proteína sérica total foi maior devido ao aumento de globulinas em bezerros no grupo de tratamento do que no grupo controle. A imunoglobulina A sérica e as imunoglobulinas de cadeia pesada foram maiores no grupo de tratamento. Menores níveis de peroxidação lipídica e maiores níveis de antioxidantes totais foram observados no soro de bezerros no grupo de tratamento. Concluímos que alguns animais podem não se adaptar ao substituto do leite contendo óleos essenciais devido ao odor; no entanto, os bezerros que consumiram o leite contendo os óleos essenciais apresentaram respostas imunes humorais estimuladas que minimizaram o estresse oxidativo fisiológico da fase de criação e, consequentemente, favoreceram o crescimento e o ganho de peso.

Palavras-chave Carvacrol · Timol · 1,8-Cineol · Cinamaldeído · Antioxidantes

Introdução

O desenvolvimento dos bezerros representa um desafio significativo na produção leiteira devido à alta fragilidade desses animais, que afeta diretamente a produtividade. Seu desenvolvimento é comprometido quando sua saúde é comprometida, principalmente porque o sistema imunológico só começa a se desenvolver após o nascimento. As placentas dos ruminantes, que incluem uma camada protetora, não permitem que as imunoglobulinas passem da mãe para o feto

(Chase et al. 2008), tornando seu sistema imunológico dependente da imunidade passiva, proveniente do colostro produzido pela mãe, que deve ser consumido nas primeiras horas após o nascimento. O colostro é rico em imunoglobulinas e outros nutrientes, fornecendo os componentes necessários para que o animal enfrente os desafios microbiológicos do ambiente nos primeiros dias de vida (Hill 2010) e desenvolva imunidade ativa.

Muitos agentes infecciosos causam doenças em bezerros. Enterobactérias e *Escherichia coli* são os mais comuns; esses organismos são responsáveis por lesões no epitélio intestinal (Cho e Yoon 2014) e causam diarreia, que leva à desidratação e perda de apetite, afetando o desenvolvimento. A alta incidência de diarreia bacteriana nas primeiras semanas de vida torna necessária a terapia antimicrobiana; no entanto, esses tratamentos levam à resistência aos antibióticos.

* Aleksandro Schafer da Silva

aleksandro_ss@yahoo.com.br

¹ Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Universidade Estadual de Santa Catarina, Chapecó, Brasil

² Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica, Federal Universidade de Santa Maria, Santa Maria, Brasil

por essas razões, é imperativo substituir antibióticos por antimicrobianos alternativos, que atuam como promotores de crescimento. Tais substitutos incluem extratos vegetais disponíveis comercialmente. Muitos componentes vegetais inibem bactérias patogênicas Gram-negativas (p. ex., *Escherichia coli* e *Campylobacter jejuni*) e Gram-positivas (p. ex., *Bacillus subtilis* e *Clostridium*). Tipicamente, organismos Gram-negativos são menos sensíveis aos óleos essenciais devido à sua membrana externa de lipopolissacarídeos, que restringe a difusão de compostos fenólicos (Christaki et al., 2020).

O potencial dos óleos essenciais na nutrição animal é bem compreendido, especialmente no que diz respeito ao seu papel como promotores de crescimento, imunostimulantes e antioxidantes (Christaki et al. 2020). A capacidade antioxidante está diretamente relacionada à saúde e, em condições normais, há um equilíbrio entre a geração e a eliminação de radicais livres. O desequilíbrio resulta em estresse oxidativo no animal e reduz o desempenho; no entanto, compostos em óleos essenciais podem prevenir e até inibir esse estresse, eliminando os radicais livres (Pan et al. 2023).

Óleos essenciais são produtos aromáticos e voláteis extraídos de fontes vegetais, como galhos, sementes, cascas, folhas e flores (Burt 2004). Esses compostos são caracterizados por odores fortes que podem interferir na ingestão de alimentos. Essa preocupação é frequente entre pesquisadores, como quando óleos essenciais de canela, orégano e eucalipto foram adicionados à substituição. Esses óleos são atraentes para pesquisadores e para a indústria porque contêm cinamaldeído (óleo de canela), carvacrol, timol (óleo de orégano), 1,8-cineol e D-limoneno (óleo de eucalipto), que apresentam atividade antimicrobiana (Calsamiglia et al.

2007; Chapman et al. 2016; Kumar et al. 2012; Cimanga et al. 2002; Baranska et al. 2005). O óleo essencial de orégano reduz a conversão alimentar e modula positivamente a fermentação ruminal (Wu et al. 2020). O 1,8-cineol aumenta a produção de muco gástrico, inibe lesões e protege a mucosa, sugerindo que esses compostos têm uma função gastroprotetora (Caldas et al. 2015). A capacidade antioxidante dos óleos essenciais, especialmente o de eucalipto, é atribuída à capacidade do composto de se associar ao sistema *keap1/nrf2*, o que resulta no aumento de enzimas antioxidantes, como a superóxido dismutase e a catalase (Cai et al. 2020).

Com base em tudo o que se sabe sobre óleos essenciais em animais dietas, levantamos a hipótese de que consumi-las por bezerros melhoraria sua saúde e favoreceria seu desempenho de crescimento. No entanto, há alguma preocupação, pois o odor pungente dos óleos essenciais transferidos para o leite em pó pode interferir no consumo. Portanto, o presente estudo determinou se um substituto do leite contendo uma mistura de óleos essenciais (orégano, canela e eucalipto) melhoraria o sistema imunológico, os antioxidantes e o desempenho de crescimento em bezerros lactentes.

Materiais e métodos

O experimento foi realizado na Fazenda Experimental do Centro de Educação Superior do Oeste, em Guatambu, Santa Catarina. Foram utilizados 16 bezerros machos da raça Holandesa (dez dias de idade), divididos nos grupos controle e tratamento, com oito animais cada. Os animais foram alojados aos pares em baias coletivas, com quatro baias no grupo controle e quatro no grupo tratamento. O experimento teve duração de 60 dias, período total de amamentação.

Antes do experimento, a transição do leite de vaca para o sucedâneo foi realizada de forma gradual. No início do experimento, foi iniciado o fornecimento do sucedâneo com o aditivo para os animais em tratamento.

grupo; no entanto, alguns bezerros o rejeitaram, provavelmente devido ao forte odor dos óleos essenciais, dos quais a canela era predominante. No entanto, seis dos oito animais se adaptaram ao sucedâneo do leite contendo fitobióticos em dois ou três dias, ao contrário dos outros dois animais que não consumiram o leite mesmo quando forçados. Sete dias após o início do tratamento, excluímos esses bezerros do experimento por estarem desidratados (quando o leite sem fitobióticos foi fornecido, ambos os animais o consumiram integralmente).

O aditivo utilizado foi o Enterosan® líquido (Tecphy, Canoinhas, SC, Brasil), à base de óleos essenciais de canela, orégano e eucalipto, e possui pureza de 10%.

Este produto líquido foi liofilizado e utilizado na forma de pó no sucedâneo de leite durante a fabricação, na proporção de 5 g de aditivo/kg de sucedâneo de leite. O sucedâneo foi armazenado em sacos plásticos lacrados para evitar perda de odor ou volatilização do produto. Os animais de ambos os grupos receberam 0,25 kg de sucedâneo de leite diluído em dois litros de água por alimentação, com duas alimentações por dia, às 8h e às 16h30 (total de 0,5 kg de sucedâneo de leite/bezerro/dia). Além da dieta líquida, os animais receberam uma dieta sólida à base de concentrado peletizado. A partir do 28º dia do experimento, os animais receberam feno picado à vontade.

A composição dos alimentos é descrita na Tabela 1.

Os animais foram pesados semanalmente em balança digital. Amostras de sangue foram coletadas nos dias 1, 15, 30, 45 e 60 para analisar variáveis hematológicas, bioquímicas e imunológicas. As coletas de sangue foram realizadas através da veia jugular, utilizando agulhas e tubos vacuolados. Utilizamos tubos com EDTA para análise hematológica e outros com ativador de coágulo para obtenção de soro para análises bioquímicas, imunológicas e antioxidantes.

As análises hematológicas foram realizadas utilizando o equipamento automático Equipe Vet 3000®. Para a separação do soro, os tubos foram centrifugados sem anticoagulante (3500 RPM por 10 min), e o soro foi transferido para microtubos identificados e armazenado a -20 °C até o momento da análise.

Tabela 1 Composição química da ração fornecida aos bezerros

Unid	Quantidade (DM) d1–28		Quantidade (DM) d28–60
Concentratea	Ad libitum		Ad libitum
Substituto do leite	0,5 kg/dia		0,5 kg/dia
Feno	0,0		Ad libitum
Composição química (%)			
	Concentrado	Substituidor	Feno
Matéria seca	89,8	96,7	83,6
Proteína bruta	24,3	15.1	8.09
Extrato etéreo	4,95	15,9	3,67
Matéria mineral	7.12	9,80	6.21
Fibra detergente neutra	29,3	4,57	70,6
Fibra em detergente ácido	15.1	2,43	33,8

“O concentrado comercial (Nutrialfa Bezerra®) foi formulado à base de farelo de soja micronizado, milho moído, farelo de trigo, minerais, vitaminas e monensina sódica.

Para as análises bioquímicas, os níveis séricos de proteínas totais, glicose, albumina, colesterol e ureia foram medidos utilizando o analisador semiautomático Bio-2000 (BioPlus®) e seguindo as instruções dos kits comerciais Analisa® para cada variável. As globulinas foram determinadas por cálculo matemático (proteínas totais-albumina).

De acordo com Tomasi et al. (2018), utilizando minigéis (10 × 10 cm), as proteínas foram separadas em gel de dodecil-poliacrilamida de sódio. Os géis foram corados com Azul de Coomassie e fotografados para identificar e quantificar as frações proteicas utilizando o software Labimage1D (Loccus Biotechnology). Um padrão contendo frações com peso molecular entre 10 e 250 kD (Kaleidoscope, BIO-RAD) foi utilizado como referência para a identificação das frações proteicas.

A peroxidação lipídica foi determinada como níveis de substância reativa ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) usando os métodos descritos por Jentzsch et al. (1996) para amostras de soro.

Os níveis séricos de TBARS foram expressos em nM de malondialdeído/mL. Os níveis de antioxidantes foram medidos pela capacidade de redução de ferro do plasma (FRAP) no soro. De acordo com Benzie e Strain (1996), a FRAP foi medida e expressa em mol/L.

Todos os dados foram analisados usando o procedimento SAS MIXED (SAS Inst. Inc., Cary, NC, EUA; versão 9.4), com a aproximação de Satterthwaite para determinar os graus de liberdade do denominador para o teste de efeitos fixos. O ganho de peso e o ganho médio diário foram testados para efeitos fixos de tratamento usando um cercado (tratamento) e um animal (cercado) como variáveis aleatórias. Todas as outras variáveis (peso corporal, bioquímica, hemograma, contagem de proteínas e oxidantes) foram analisadas como medidas repetidas e testadas para efeitos fixos de tratamento e tratamento × dia. Todos os resultados em d1 para cada variável foram incluídos como covariáveis; no entanto, o comando para covariáveis foi removido do modelo quando P>0,05. As médias foram outro lado, demonstraram apenas o efeito do tratamento, com maiores concentrações

distinguidos usando PDIFF, e todos os resultados foram expressos como LSMEANS com erros-padrão. A significância foi definida quando as diferenças apresentaram P<0,05.

Resultados

Os pesos corporais no grupo de tratamento foram maiores do que os controles a partir do dia 28 (P<0,05). O ganho de peso durante o experimento foi 8,7 kg maior (P<0,05) no grupo de tratamento do que no grupo controle. O consumo de ração não diferiu entre os grupos; no entanto, o grupo de tratamento apresentou maior eficiência alimentar do dia 1 ao dia 60 (Tabela 2). Não houve efeito do tratamento ou interação tratamento x dia para as contagens de hemácias (eritrócitos, hematócrito e hemoglobina). O número de leucócitos diferiu, com menos leucócitos devido à redução de linfócitos no grupo de tratamento (P<0,05, Tabela 3).

Houve diferenças em colesterol, proteína total e globulina entre os grupos. Os bezerros do grupo de tratamento apresentaram níveis de colesterol mais baixos na interação tratamento x dia (P<0,05) e uma tendência a níveis mais baixos quando avaliamos apenas o tratamento (P<0,05 e >0,10). O nível de proteína total diferiu no dia 45; os animais do grupo de tratamento foram superiores aos animais do grupo controle (P<0,05). No entanto, quando a proteína foi fracionada, observou-se maior concentração de globulina no grupo de tratamento nos dias 45 e 60 (P<0,05; Tabela 3). Não houve efeito do tratamento e da interação tratamento x dia para os níveis de glicose, albumina ou ureia (Tabela 3).

Os resultados do proteinograma são apresentados na Tabela 4. O efeito do tratamento e da interação tratamento x dia foi verificado para IgA e IG de cadeia pesada; bezerros que consumiram o sucedâneo de leite com óleos essenciais apresentaram maiores concentrações dessas variáveis. Os níveis de haptoglobina, por

Tabela 2 Desempenho de crescimento e consumo de bezerras alimentados com sucedâneo de leite com e sem fitobiótico

	Controle Phyto SEM P–Tratar P–Tratar x dia				
				0,05	0,02
Peso corporal (kg)					
d1	40,6	44,5	0,57		
d7	43.2	46,6	0,55		
d14	46,5	50,5	0,55		
d21	50,1	55,2	0,54		
d28	54,8b	61.8a	0,55		
d35	60,1b	65.3a	0,55		
d42	63b	70.6a	0,56		
d49	65,7b	75.6a	0,56		
d56	69,4b	82.3a	0,55		
d60	70b	82.6a	0,55		
Ganho de peso (kg)					
d1–60	29,4b	38.1a	0,45	0,03	–
d1–28	14,1b	17.2a	0,44	0,07	–
d28–60	15,2b	20.8a	0,44	0,05	–
Ganho de peso médio diário (kg MS)					
d1–60	0,490b	0,635a	0,04	0,03	–
d1–28	0,504b	0,614a	0,04	0,07	–
d28–60	0,475b	0,650a	0,05	0,05	–
Consumo diário de concentrado (kg MS)					
d1–60	0,707	0,826	0,13	0,61	–
d1–28	0,484	0,522	0,11	0,56	–
d28–60	0,907	1,141	0,16	0,17	–
Consumo diário de feno (kg MS)					
d28–60	0,219	0,254	0,09	0,29	–
Consumo diário de leite (kg MS)					
d1–60	0,490	0,490	0,00	–	–
Consumo diário de ração (kg MS)					
d1–28	0,97	1.01	0,18	0,49	–
d28–60	1,61	1,88	0,24	0,51	–
Total de ração consumida (kg/MS)					
d1–60	78,9b	88.6a	1,06	0,08	–
Eficiência alimentar					
d1–60	0,372b	0,430a	0,07	0,05	–
d1–28	0,517b	0,607a	0,07	0,04	–
d28–60	0,294b	0,345a	0,05	0,09	–

Fito: animais que recebem o fitobiótico

^a Demonstra o efeito do tratamento onde letras diferentes na mesma linha mostram diferenças significativas (Py0,05) e tendências ($P > 0,05$ e $\leq 0,1$) entre os grupos

^b Demonstra a interação entre tratamento×dia onde letras diferentes na mesma linha mostram uma diferença significativa (Py0,05) e tendência ($P > 0,05$ e $\leq 0,1$) entre os grupos

concentrações no grupo de tratamento. Não houve efeito do tratamento ou interação tratamento x dia para os níveis de ceruloplasmina e transferrina ($P>0,05$).

Os resultados para peroxidação lipídica e antioxidantes totais são mostrados na Fig. 1. Nos dias 45 e 60, foram observados níveis mais baixos de TBARS e níveis mais altos de FRAP.

no grupo de tratamento. A interação tratamento x dia mostrou que as principais diferenças ocorreram nos dias 45 e 60 do experimento. Esses achados sugerem que os animais no grupo de tratamento apresentaram menor peroxidação lipídica e ação antioxidante mais significativa a partir do 45º dia.

Tabela 3 Hemograma e bioquímica sérica de bezerros alimentados com sucedâneo de leite com e sem fitobiótico

Variáveis	Controlar	Phyto	SEM	P-Treat	P-Treat x dia	
Leucócitos (×103 cel/μL)					0,01	0,01
d1	21.08	19.23	1,69			
d15	16.4 ^a	9.78 ^b	1,65			
d30	18.3 ^a	10.4 ^b	1,65			
d45	6,89	6,60	1,41			
d60	8.11 ^a	6.8 ^b	1,41			
Linfócitos (×103 cel/μL)					0,05	0,01
d1	14,33	12.14	1,25			
d15	11,89	7.31	1,24			
d30	13,85	7,47	1,06			
d45	3,87	4,72	1,06			
d60	5.32	4,69	1,05			
Granulócitos/monócitos (×103 cel/μL)					0,08	0,01
d1	6,75	7.08	0,74			
d15	4.38 ^a	2,47 ^b	0,74			
d30	4.53 ^a	2,97 ^b	0,74			
d45	3.01 ^a	1,88 ^b	0,7			
d60	2,80	2.14	0,71			
Eritrócitos (×106 cel/μL)					0,89	0,86
	8.06	7,94	0,05			
Hemoglobina (mg/dL)					0,93	0,88
	10.14	10.36	0,29			
Hematócrito (%)					0,91	0,76
	28,90	29.20	1,5			
Glicose (mg/dL)					0,86	0,82
	78,2	76,9	2,81			
Colesterol (mg/dL)					0,03	0,01
d1	67,1	70,3	3,75			
d15	109	95,1	3,71			
d30	118	126	3,70			
d45	153 ^a	131 ^b	3,72			
d60	120	110	3,71			
Proteína total (g/dL)					0,15	0,02
d1	6,58	6,96	0,07			
d15	5,85	5,65	0,06			
d30	5,68	5,75	0,06			
d45	8.16 ^b	8.95 ^a	0,06			
d60	7.12	7,75	0,05			
Albumina (g/dL)					0,35	0,13
	3.01	2,87	0,02			
Ureia (mg/dL)					0,79	0,42
	31,7	28,8	3,71			
Globulina (g/dL)					0,05	0,01
d1	4,00	3,55	0,05			
d15	3,25	3.23	0,06			
d30	2,96	3.23	0,05			
d45	4.28 ^b	5.10 ^a	0,05			
d60	4.27 ^b	5.01 ^a	0,05			

Fito: animais que recebem o fitobiótico

^a Demonstra o efeito do tratamento onde letras diferentes na mesma linha mostram diferenças significativas (P<0,05) e tendências (P > 0,05 e <0,1) entre os grupos

^b Demonstra a interação entre tratamento×dia onde letras diferentes na mesma linha mostram uma diferença significativa (P<0,05) e tendência (P > 0,05 e <0,1) entre os grupos

Tabela 4 Proteinograma de bezerros alimentados com sucedâneo de leite com e sem fitobiótico

Controle Phyto SEM P-Treat P-Treat x dia				
IgA (g/dL)			0,04	0,01
d1	0,84	0,81	0,04	
d15	0,87	0,86	0,04	
d30	0,76b	0,87a	0,04	
d45	0,77b	0,95a	0,05	
d60	0,72b	0,92a	0,05	
Ig de cadeia pesada (g/dL)			0,01	0,01
d1	0,99	1,04	0,05	
d15	1,08	1,10	0,05	
d30	1,01	1,34	0,07	
d45	0,97	1,47	0,07	
d60	0,99	1,29	0,06	
Ceruloplasmina (g/dL)			0,94	0,77
	0,55	0,53	0,02	
Haptoglobina (g/dL)			0,05	0,13
	0,31b	0,34a	0,02	
Transferrina (mg/dL)			0,86	0,90
	0,22	0,23	0,03	

Fito: animais que recebem o fitobiótico
“Demonstra o efeito do tratamento onde letras diferentes na mesma linha mostram diferenças significativas (Py0,05) e tendências (*P* > 0,05 eÿ0,1) entre os grupos

^b Demonstra a interação entre tratamento×dia onde letras diferentes na mesma linha mostram uma diferença significativa (Py0,05) e tendência (*P* > 0,05 eÿ0,1) entre os grupos

Discussão

Existem diversos estudos sobre óleos essenciais na nutrição de ruminantes, que demonstraram que eles melhoram a saúde e o desempenho de diversas maneiras. Em resumo, constatamos que bezerros que consumiram o fitogênico no leite de substituição apresentaram estimulação das respostas imunes humorais e antioxidantes, o que provavelmente se refletiu em melhor saúde e aumento do ganho de peso. Outros pesquisadores incluíram uma mistura de óleos essenciais no leite de substituição e constataram que os óleos essenciais contribuíram para a manipulação ruminal na fase pré-desmame e efeitos colaterais na fase pós-desmame, melhoraram a imunidade e diminuíram a diarreia neonatal na fase pré-desmame (Palhares Campolina et al. 2021).

Semelhante ao nosso estudo, foram relatados efeitos positivos no desempenho zootécnico quando fitogênicos foram adicionados à dieta animal. Akbarian-Tefaghi et al. (2018) forneceram extratos vegetais a bezerros lactentes contendo eucalipto e observaram maior ganho médio diário e melhor eficiência alimentar no período pós-desmame. Liu et al. (2020) adicionaram uma mistura de óleos essenciais contendo carvacrol, timol e

cineol ao concentrado peletizado e registraram ganho de peso mais significativo, chegando a 11% maior nesses bezerros; além disso, os autores relataram que esses animais tiveram maior ingestão de matéria seca e menor conversão alimentar. Froehlich et al. (2017) relataram resultados semelhantes, usando óleos essenciais contendo carvacrol, timol e cineol em várias doses em bezerros lactentes. Os autores encontraram um ganho médio diário maior na fase de lactação. Quando os pesquisadores forneceram óleos essenciais ricos em timol, eugenol, vanilina, limoneno e guaiacol formulados com diferentes níveis de proteína na dieta de bezerros lactentes, eles descobriram que, independentemente dos níveis de proteína na dieta, o ganho médio diário, o peso ao desmame e a eficiência alimentar foram maiores em animais que receberam os óleos essenciais (Kazemi-Bonchenari et al. 2018).

A hipótese primária para esses efeitos é o robusto efeito antimicrobiano, sugerindo que esse aditivo seja um melhorador de desempenho (Mcintosh et al. 2003). Óleos essenciais e componentes ativos em altas doses inibiram a fermentação microbiana ruminal; doses moderadas podem modificar a fermentação ruminal, alterando a produção de ácidos graxos voláteis, o metabolismo proteico ou ambos (Calsamiglia et al. 2007), favorecendo a nutrição e, consequentemente, o ganho de peso.

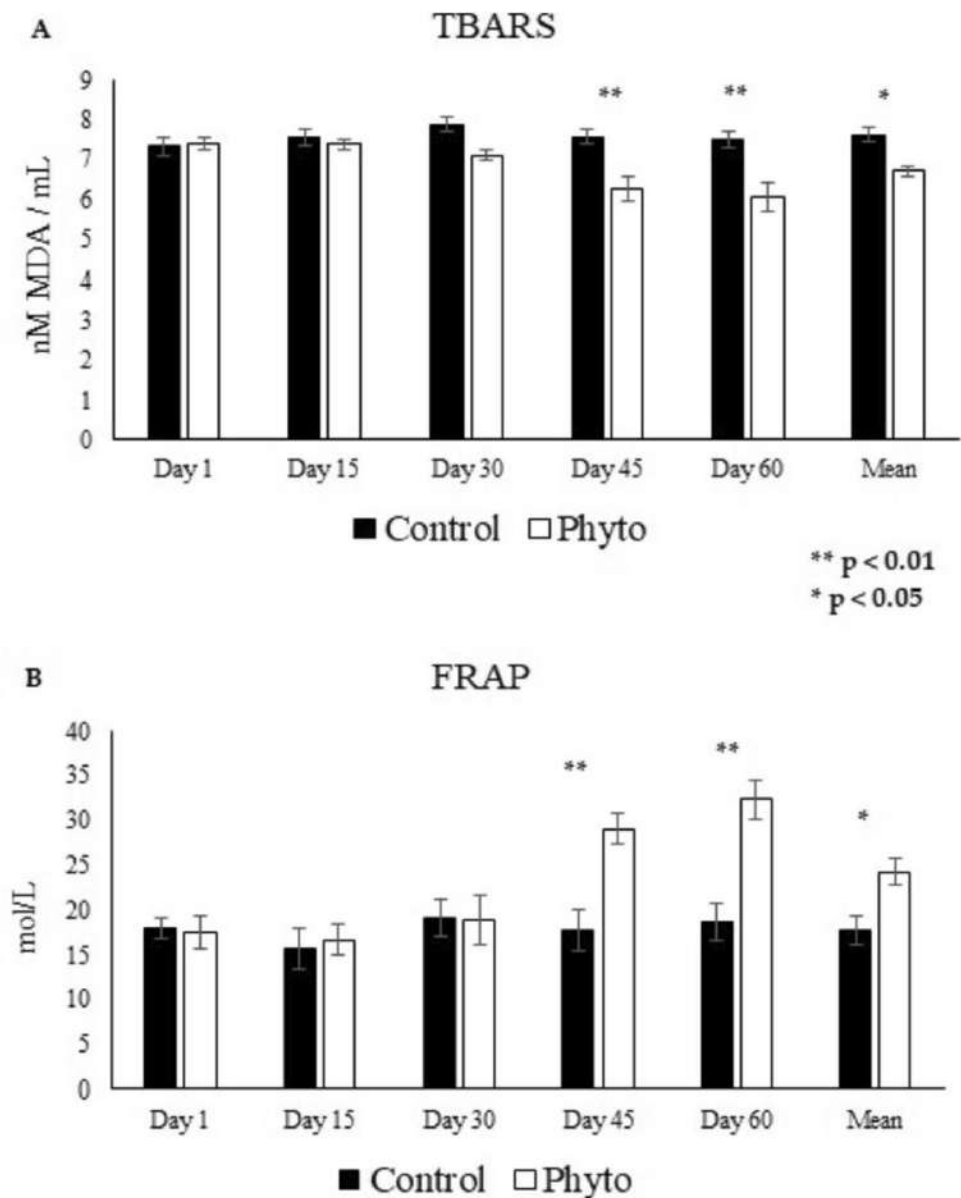
Nos parâmetros bioquímicos, observamos que o colesterol se alterou apenas no dia 45, sendo menor no grupo de animais que recebeu o fitobiótico. Echeverry-Munera et al. (2021) relataram que o teor de colesterol pode estar relacionado ao consumo, visto que aumenta quando maiores níveis de gordura são consumidos. No entanto, em contraste, o grupo tratado apresentou maior consumo alimentar, o que não confirma essa hipótese.

Outro ponto a ser destacado sobre os níveis de colesterol é que bezerros com níveis de colesterol deficientes são mais suscetíveis suscetíveis a doenças que causam diarreia (Duff et al. 2016), mas mesmo com níveis de colesterol mais baixos, podemos dizer que os animais do grupo “fito” não eram deficientes, pois não apresentavam maiores problemas de saúde, pois além disso, o sistema imunológico dos animais era eficiente.

No estudo de Asghari et al. (2021), bezerros que receberam diferentes doses de óleos essenciais não apresentaram alteração nos níveis de colesterol quando comparados ao controle, semelhante ao nosso estudo, já que nossa diferença foi apenas no dia 45. E no caso de vacas lactantes que receberam óleos essenciais, os níveis de colesterol foram menores que os animais do grupo controle (Al-Suwaiegh et al. 2020), também semelhante aos resultados do nosso estudo.

Os componentes dos óleos essenciais influenciam a saúde, como verificado neste estudo, estimulando a resposta imunológica e antioxidante. Semelhantemente aos encontrados no presente estudo, Liu et al. (2020) forneceram uma mistura de óleos essenciais a bezerros e encontraram valores mais elevados de IgM, IgG e IgA, sugerindo também uma melhora na resposta imunológica. A haptoglobina é conhecida como uma proteína de fase aguda, produzida pelo fígado, e a proteína em questão foi encontrada em níveis mais elevados no grupo que recebeu o fitobiótico, sendo a produção dessas proteínas geralmente desencadeada.

Fig. 1 Níveis de marcadores antioxidantes de bezerros alimentados com sucedâneo de leite com e sem fitobiótico. Fito: animais que receberam o fitobiótico. Nota: o asterisco sobre as barras indica a diferença entre os grupos (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$)



por citocinas pró-inflamatórias, que são estimuladas por infecções, estresse e inflamação (Pradeep 2014). Além disso, os níveis de haptoglobina também podem aumentar em condições de infecções bacterianas e virais, particularmente em casos de doenças respiratórias (Yilmaz et al 2017); Merhan et al. 2017). Com isso, podemos supor que os animais do grupo que recebeu o fitobiótico, apesar de apresentarem melhor desempenho e resposta imunológica, possivelmente enfrentavam algum desafio relacionado à infecção; no entanto, devido ao sistema imunológico estar mais eficiente, não sofreram perdas ao passar por esse desafio. O uso de óleo essencial à base de cinamaldeído em bezerros lactentes por meio de dieta líquida resultou em menor uso de antimicrobianos até a sexta semana de vida dos animais e menor risco de inflamação umbilical do que o controle (Pempek et al. 2018).

Um problema substancial na criação de bezerros. Al-Suwaiegh et al. (2020) forneceram uma mistura de óleos essenciais (cravo, orégano e zimbro) a vacas durante o início da lactação e encontraram efeitos positivos na produção de leite; também houve níveis mais elevados de proteína total e globulina. Esses estudos demonstraram um resultado típico: os óleos essenciais aumentaram as imunoglobulinas séricas, o que afeta positivamente os bezerros.

O mecanismo preciso pelo qual os óleos essenciais induzem uma resposta imune humoral é pouco compreendido; no entanto, pesquisadores descobriram que o óleo essencial de *Pituranthos tortuo-sus*, quando consumido por camundongos, aumentou a proliferação de esplenócitos induzida por lipopolissacarídeos, sugerindo melhor ativação das células B e da resposta imune humoral (Krifa et al. 2015). Uma possibilidade para o aumento das imunoglobulinas seria o aumento dos linfócitos, conforme descrito em estudos

de óleos essenciais (Palhares Campolina et al. 2021); em contraste, no presente estudo, relatamos uma contagem menor desta célula imune.

Em um estudo com suínos suplementados com carvacrol e timol, os pesquisadores concluíram que os compostos reduziram o estresse oxidativo intestinal pós-desmame dos animais e diminuíram a presença de *Enterococcus* e *E. coli* (Wei et al. 2017). Os bezerros que consumiram a mistura de óleos essenciais, da mesma forma, apresentaram um efeito de minimização do estresse oxidativo sérico e fisiológico; da mesma forma, encontramos menor peroxidação lipídica e um aumento na capacidade antioxidante total.

Gessner et al. (2017) relatam o potencial dos polifenóis vegetais no combate ao estresse oxidativo e aos processos inflamatórios em animais de produção, enfatizando os benefícios à produtividade. Os polifenóis presentes em óleos essenciais bloqueiam a ativação do NF- κ B, inibindo a fosforilação e a degradação proteossomal do I κ B, um efeito que se deve em parte às propriedades antioxidantes dos polifenóis (Vendrame e Klimis-Zacas 2015).

Outro possível mecanismo é que os polifenóis eliminam diretamente espécies reativas de oxigênio e induzem a ativação de Nrf2, que, por sua vez, leva à ativação de diversas enzimas antioxidantes (Na e Surh 2008). No presente estudo, a eliminação direta de espécies reativas de oxigênio e a ativação de Nrf2 ajudam a minimizar o desenvolvimento de estresse oxidativo fisiológico em bezerros; a literatura sugere que esses eventos desencadeiam vias pró-inflamatórias que ativam NF- κ B, proteínas quinases ativadas por mitógenos e proteína ativadora 1 (Chuang e McIntosh 2011).

Conclusão

Concluímos que a inclusão de óleos essenciais no substituto do leite melhorou o desempenho dos bezerros, manifestando-se como ganho de peso mais significativo e melhor eficiência alimentar. Este substituto do leite fornece uma fonte de elementos imunológicos humorais e antioxidantes, minimizando o estresse oxidativo fisiológico dos bezerros na fase de recria, quando os desafios de saúde e nutrição são substanciais. No entanto, também concluímos que nem todos os animais consomem voluntariamente o substituto do óleo essencial, provavelmente devido ao forte odor deste aditivo alimentar. Na tentativa de resolver o problema da rejeição do substituto devido ao odor, talvez uma opção seria começar a fornecê-lo logo após o colostro, adaptando o animal desde cedo ao consumo do produto, já que neste experimento começamos a fornecê-lo apenas aos dez dias de idade.

Disponibilidade dos dados Os dados analisados nesta investigação estão disponíveis mediante solicitação ao autor correspondente.

Conformidade com os padrões éticos

Financiamento Este estudo foi financiado pela UDESC e pela Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Estado de Santa Catarina (FAPESC) do estado de Santa Catarina e pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Brasil.

Conflito de interesses Os autores declaram não haver conflitos de interesses.

Declaração de aprovação ética O projeto foi aprovado pelo comitê de ética em uso de animais em pesquisa da UDESC (CEUA n.º. 2322230522). O estudo seguiu as diretrizes do Conselho Brasileiro de Experimentação Animal, Brasil.

Consentimento para participar Não aplicável.

Consentimento para publicação Todos os autores consentiram com a publicação e apresentação dos dados neste artigo.

Referências

- Akbarian-Tefaghi M, Ghasemi E, Khorvash M (2018) Desempenho, fermentação ruminal e metabólitos sanguíneos de bezerros leiteiros alimentados com misturas iniciais suplementadas com plantas herbáceas, óleos essenciais ou monensina. *J Anim Physiol Anim Nutr* 102(3):630–638. <https://doi.org/10.1111/jpn.12842>
- Al-Suwaiegh SB, Morshedy SA, Mansour AT, Ahmed MH, Zahran SM, Alnemr TM, Sallam SMA (2020) Efeito de uma mistura de óleos essenciais no desempenho de vacas leiteiras durante os períodos de tratamento e pós-tratamento. *Sustentabilidade* 12(21):9123. <https://doi.org/10.3390/su12219123>
- Asghari M, Abdi-Benemar H, Maheri-Sis N, Salamatdoust-Nobar R, Salem AZM, Zamanloo M, Anele UY (2021) Efeitos de uma mistura de óleos essenciais emulsificados no desempenho, metabólitos sanguíneos, estado oxidativo e microflora intestinal de bezerros lactentes. *Anim Feed Sci Tech-nol* 277:114954. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2021.114954>
- Baranks M, Schulz H, Reitzenstein S, Uhlemann U, Strehle MA, Krüger H, Quilitzsch R, Foley W, Popp J. (2005) Estudos espectroscópicos vibracionais para obter um método de controle de qualidade de óleos essenciais de eucalipto. *Biopolímeros* 78(5):237–248. <https://doi.org/10.1002/bip.20284>
- Benzie IFF, Strain JJ (1996) A capacidade de redução férrica do plasma (FRAP) como uma medida de "poder antioxidante": o ensaio FRAP. *Anal Biochem* 239:70–76. <https://doi.org/10.1002/bip.20284>
- Burt S (2004) Óleos essenciais: suas propriedades antibacterianas e potenciais aplicações em alimentos — uma revisão. *Int J Food Microbiol* 94(3):223–253. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodmicro.2004.03.022>
- Cai ZM et al (2020) 1,8-cineol: uma revisão da fonte, atividades biológicas e aplicação. *J Asian Nat Prod Res* 23(10):938–954. <https://doi.org/10.1080/10286020.2020.1839432>
- Caldas RGF, Oliveira AR, Araújo AV, Lafayette SS, Albuquerque GS, Silva-Neto Jda C, Costa-Silva JH, Ferreira F, Costa JG, Wanderley AG (2015) Mecanismos gastroprotetores do monoterpene 1, 8-Cineol (Eucaliptol). *PLoS Um* 10(8):e0134558. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0134558>
- Calsamiglia S et al (2007) Revisão convidada: óleos essenciais como modificadores da fermentação microbiana ruminal. *J Dairy Sci* 90(6):2580–2595. <https://doi.org/10.3168/jds.2006-644>
- Chapman CE et al (2016) Comunicação breve: preferências de sabor de cinamaldeído em novilhas leiteiras desmamadas. *J Dairy Sci* 99(5):3607–3611. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-10582>
- Chase CCL et al (2008) Desenvolvimento imunológico neonatal em bezerros e seu impacto na resposta vacinal. *Vet Clin Food Anim* 24(1):87–104. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2007.11.001>

- Cho Y, Yoon K (2014) Uma visão geral da diarreia em bezerras - etiologia infecciosa, diagnóstico e intervenção. *J Vet Sci* 15(1):1–17. <https://doi.org/10.1007/10.4142/jvs.2014.15.1.1>
- Christaki E, Giannenas L, Bonos E, Florou-Paneri P (2020) Capítulo 2 - Usos inovadores de plantas aromáticas como suplementos naturais na nutrição. Em: Florou-Paneri P et al (Eds), *Feed Additives*, Academic Press, pp. 19–34. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814700-9.00002-9>
- Chuang CC, McIntosh MK (2011) Mecanismos potenciais pelos quais uvas ricas em polifenóis previnem a inflamação e as doenças metabólicas mediadas pela obesidade. *Annu Rev Nutr* 21(31):155–176. <https://doi.org/10.1146/annurev-nutr-072610-145149>
- Cimanga K et al. (2002) Composição química e atividade antifúngica de óleos essenciais de algumas plantas medicinais aromáticas cultivadas na República Democrática do Congo. *J Essent Oil Res* 14(5):382–387. <https://doi.org/10.1080/10412905.2002.9699894>
- Duff JP, Passant S, Wessels M, Charlier C, Hateley G, Irvine RM (2016) Deficiência de colesterol causando doença e diarreia em bezerras. *Vet Rec* 178(17):424–5. <https://doi.org/10.1136/vr.i2265>
- Echeverry-Munera J et al (2021) Efeito da troca parcial de lactose por gordura em sucedâneo de leite na ingestão de ração à vontade e no desempenho de bezerras leiteiras. *J Dairy Sci* 105(5):5432–5444. <https://doi.org/10.1016/j.jdarsci.105.10166>
- Froehlich KA et al (2017) Avaliação de óleos essenciais e prebióticos para bezerras leiteiros recém-nascidos. *J An Sci* 95(8):3772–3782. <https://doi.org/10.2527/jas.2017.1601>
- Gessner DK, Ringseis R, Eder K (2017) Potencial de polifenóis vegetais para combater o estresse oxidativo e processos inflamatórios em animais de fazenda. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)* 101(4):605–628. <https://doi.org/10.1111/jpn.12579>
- Hill JAG (2010) Transferência de imunidade passiva colostral em bezerras neonatas da região Metropolitana de Curitiba, Palmeira e Carambeí, Estado do Paraná e suas inter-relações. (2010) Tese (Doutorado em Ciência) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Universidade de São Paulo, São Paulo
- Jentszsch AM et al (1996) Análise aprimorada de malondialdeído em fluidos corporais humanos. *Free Radic Biol Med* 20:251–256. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(95\)02043-8](https://doi.org/10.1016/0891-5849(95)02043-8)
- Kazemi-Bonchenari M et al (2018) Óleos essenciais melhoraram o ganho de peso, o crescimento e a eficiência alimentar de bezerras leiteiras jovens alimentados com dietas iniciais com 18 ou 20% de proteína bruta. *J An Physiol An Nutr* 102(3):652–661. <https://doi.org/10.1111/jpn.12867>
- Krifa M et al (2015) Efeitos imunomoduladores e anticancerígenos do óleo essencial de *Pituranthos tortuosus*. *Tumor Biol* 36(7):5165–5170. <https://doi.org/10.1007/s13277-015-3170-3>
- Kumar P et al (2012) Análise composicional e atividade inseticida do óleo essencial de *Eucalyptus globulus* (família: *Myrtaceae*) contra mosca doméstica (*Musca domestica*). *Acta Trop* 122(2):212–218. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2012.01.015>
- Liu T et al (2020) Alimentação inicial para bezerras contendo uma mistura de óleos essenciais e prebióticos afeta o desempenho de crescimento de bezerras holandeses. *J Dairy Sci* 103(3):2315–2323. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-16647>
- McIntosh FM et al (2003) Efeitos de óleos essenciais em microrganismos ruminais e seu metabolismo proteico. *Appl Environ Microbiol* 69(8):5511–5014. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.8.5011-5014.2003>
- Merhan O, Bozukluhan K, Celebi O, Ogun M, Atakisi E, Buyuk F (2017) Níveis de proteína de fase aguda e alguns parâmetros bioquímicos em bovinos infectados com *Mycobacterium bovis*. *J Fac Vet Med Univ Erciyes* 14(2):101–105
- Na HK, Surh YJ (2008) Modulação da indução de enzimas antioxidantes e desintoxicantes mediada por Nrf2 pelo polifenol EGCG do chá verde. *Food Chem Toxicol* 46(4):1271–1278. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.10.006>
- Palhares Campolina J, Coelho SG, Belli AL, Machado FSR, Pereira LG, Tomich T, Carvalho W, Silva RO, Voorsluys A, Jacob D, Campos M (2021) Efeitos de uma mistura de óleos essenciais em substitutos do leite no desempenho, fermentação ruminal, parâmetros sanguíneos e escores de saúde de novilhas leiteiras. *PLOS UM* 16(3):e0231068. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0231068>
- Pan J et al (2023) Propriedades biológicas do óleo essencial enfatizadas na viabilidade como substituto de antibióticos em rações. *Grain Oil Sci Technol* 6:10–23. <https://doi.org/10.1016/j.gaost.2022.11.001>
- Pempek JA et al (2018) Comunicação breve: Investigação de alternativas antibióticas para melhorar a saúde e o crescimento de bezerras. *J Dairy Sci* 101:4473–4478. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-14055>
- Pradeep M (2014) Aplicação de proteínas de fase aguda como biomarcadores na prática veterinária moderna. *Ind J Vet Anim Sci Res* 43(1):1–13
- Tomasi T et al (2018) Efeito metafilático de minerais na resposta imune, variáveis bioquímicas e estado antioxidante de bezerras recém-nascidos. *J Anim Physiol Anim Nutr* 102(4):819–824. <https://doi.org/10.1016/j.animphysiol.102.0.000>
- Vendrame S, Klimis-Zacas D (2015) *Nutr Rev* 73:348–358. <https://doi.org/10.1093/nutrit/nuu066>
- Wei HK et al (2017) Uma mistura de carvacrol-timol diminuiu o estresse oxidativo intestinal e influenciou microrganismos selecionados sem alterar os níveis de RNA mensageiro de proteínas de junção estreita na mucosa jejunal de leitões desmamados. *Animal* 11(2):193–201. <https://doi.org/10.1017/S1751731116001397>
- Wu J et al (2020) A suplementação dietética com óleo essencial de orégano e monensina em combinação é antagonista ao desempenho de crescimento de touros holandeses de um ano. *J Dairy Sci* 103(9):8119–8129. <https://doi.org/10.3168/jds.2020-18211>
- Yilmaz O et al (2017) Investigações sobre clínica, hematologia, bioquímica, estresse oxidativo, proteínas de fase aguda no complexo de doenças respiratórias infecciosas (BRDC) em bovinos. *Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi* 12(1). <https://doi.org/10.17094/ataunivbd.309771>

Nota do editor A Springer Nature permanece neutra em relação a reivindicações jurisdicionais em mapas publicados e afiliações institucionais.

A Springer Nature ou seu licenciante (por exemplo, uma sociedade ou outro parceiro) detém direitos exclusivos sobre este artigo sob um contrato de publicação com o(s) autor(es) ou outro(s) detentor(es) de direitos; o autoarquivamento da versão manuscrita aceita deste artigo pelo autor é regido exclusivamente pelos termos desse contrato de publicação e pela lei aplicável.



Listas de conteúdo disponíveis no [ScienceDirect](#)

Patogênese Microbiana

página inicial do periódico: www.elsevier.com/locate/micpath



Impactos da ingestão de tricotecenos (*Fusarium sporotrichioides*) em bezerros leiteiros: efeitos no crescimento animal, resposta oxidativa e inflamatória

Marcela Machado^{um}, Luísa Nora^{um}, Tayse Burger Neto Zanin Bianca F. Bissacotti Ricardo E.^b, Vera Sr. Morsch^b, Marcelo Vedovatto^c, Giovana Pelisser^d, Mendes d,k, Alexandre C. Galvão^e, Caroline Sefrin Speroni^f, Eduardo M. Gloria^g, Murilo F. Rodrigues^h, Roger Wagneri, Lenita M. Stefani a,j,**, Aleksandro S. da Silva a,b,h,*

^{um} Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC), Chapecó, SC, Brasil
^b Programa de Pós-Graduação em Biologia: Bioquímica Toxicológica, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, Brasil
^c Universidade Estadual da Louisiana, Centro de Pesquisa e Extensão Dean Lee, Alexandria, LA, 71302, EUA
^d Faculdade de Medicina Veterinária, Instituto Federal Catarinense (IFC), Concórdia, SC, Brasil
^e Departamento de Engenharia de Alimentos e Química, UDESC, Pinhalzinho, SC, Brasil
^f Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA), Uruguaiana, RS, Brasil
^g Departamento de Ciências Biológicas, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo
^h Departamento de Zootecnia, UDESC, Chapecó, SC, Brasil
ⁱ Departamento de Ciências dos Alimentos, UFSM, RS, Brasil
^j Departamento de Educação Científica e Tecnológica, Centro de Educação à Distância, UDESC, Florianópolis, SC, Brasil
^k Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade da Geórgia, 501 DW Brooks Drive, Atenas, GA, Grécia

INFORMAÇÕES DO ARTIGO

Palavras-chave:
Antioxidante
Bezerros
Óleos essenciais
Imunidade
Micotoxina

RESUMO

O objetivo do presente estudo foi avaliar os impactos dos tricotecenos (*Fusarium sporotrichioides*) para bezerros leiteiros no crescimento animal, respostas oxidativas e inflamatórias na presença ou ausência de óleos essenciais. Doze bezerros desmamados aos 70 dias de idade foram divididos em 2 grupos: TC (controle) e T-EO (óleos essenciais - orégano, tomilho, manjerição e alecrim) no período de 40 dias consumindo ração contaminada por tricotecenos (500 ppb). Os animais do grupo T-EO receberam uma mistura de OEs via ração na dosagem de 0,75 mL por/kg de ração. Coletas de sangue foram realizadas nos dias 1, 20 e 40 para análises hematológicas e bioquímicas; o escore fecal foi realizado a cada 2 dias em uma escala de 1 a 5 e exames clínicos foram realizados 3 vezes durante o período do experimento. Os animais foram pesados no início e no final do experimento; a eutanásia de dois bezerros por grupo para avaliação macroscópica e microscópica de vários tecidos (baço, fígado, duodeno, jejuno, ílio, ceco e cólon) foi realizada no final do experimento. Os bezerros do grupo T-EO apresentaram tendência (P = 0,07) de maior peso corporal quando comparados ao TC. O efeito do tratamento e a interação tratamento vs. dia foram detectados para as variáveis leucócitos e granulócitos, demonstrando maior contagem dessas células no grupo T-EO em ambos os dias (20 e 40), e o mesmo comportamento ocorreu para a amplitude de distribuição de eritrócitos (RDW). As enzimas alanina transferase (ALT), aspartato transferase (AST) e gama glutamil-transferase (GGT) apresentaram maior atividade sérica no grupo TC (dias 20 e 40). Os níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) foram menores no soro dos animais do grupo T-EO.

Para os bezerros do grupo T-EO, a atividade da glutatona S-transferase foi maior no soro. Os níveis de haptoglobulina e proteína C-reativa foram menores nos dias 20 e 40 nos animais T-EO quando comparados ao grupo TC. Nas avaliações macroscópicas e microscópicas, coletadas ao final do experimento após o abate dos animais, o fígado e o intestino não apresentaram alterações para os animais do grupo T-EO, diferentemente dos animais do grupo TC, que apresentaram consistência difusa moderadamente firme do fígado e edema no mesentério, além de estresse oxidativo nos tecidos (fígado, duodeno, jejuno, íleo, ceco e cólon). Os resultados concluíram que o consumo de uma mistura de OEs (óleos essenciais - orégano, tomilho, manjerição e alecrim) minimizou os efeitos negativos

*Autor correspondente. Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC), Chapecó, SC, Brasil.
**Autor correspondente. Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC), Chapecó, SC, Brasil.
Endereços de e-mail: lenita.moura@udesc.br (LM Stefani), aleksandro.silva@udesc.br (AS da Silva).

efeitos causados pelos tricotecenos em bezerros leiteiros, sendo assim uma alternativa para melhorar a condição imunológica e antioxidante, bem como uma possível alternativa adsorvente.

1. Introdução

Micotoxinas são metabólitos secundários produzidos por fungos filamentosos que ocorrem naturalmente em alimentos, como frutas e grãos [1]. Alguns fungos têm a capacidade de produzir mais de uma micotoxina, da mesma forma que uma micotoxina pode ser produzida por mais de uma espécie de fungo [2]. Os fungos podem infectar culturas tanto durante o desenvolvimento da planta no campo, quanto durante o armazenamento e o processamento [2,3]. Relataram que 100% das rações/concentrados usados na alimentação animal apresentaram algum grau de contaminação por micotoxinas: 65,5% classificados como baixo, 27,6% médio e 6,9% com alta contaminação. Nas amostras analisadas, verificou-se que 93,3% delas apresentaram fumonisina (B1+B2), 80% ácido fusárico e 66,7% tricotecenos A (T-2, H-T2, diacetoxicipenol e neosolaniol), e em menor quantidade foram detectados aflatoxina (B1+B2+G1+G2), tricotecenos B (DON, 15-acetil DON, 3-acetil DON, fusarenol X, nivalenol e DON 3-glicosídeo), ergot e penicillium (patulina, ácido penicílico, roquefortina C, ácido micofenólico e wortmanina) [4]. Dentre as diferentes micotoxinas existentes, os tricotecenos (TCT) são considerados um grupo altamente tóxico, composto por toxinas quimicamente relacionadas a diversas espécies de fungos (*Fusarium*, *Myrothecium*, *Stachybotrys*, *Trichoderma*, *Trichothecium* e *Spicellum*), sendo capazes de crescer em diferentes condições ambientais, teores de nutrientes, temperatura, umidade ou oxigênio, o que resulta em colonização bem-sucedida [5].

Pertencentes aos tricotecenos, as toxinas T-2 e HT-2 são consideradas um metabólito que implica hematotoxicidade e imunotoxicidade, produzido por diferentes espécies de *Fusarium*, incluindo *F. sporotrichioides*, *F. poae* e *F. acuminatum*, que podem crescer em grãos como trigo, milho, cevada, arroz, soja e aveia [5]. Em um estudo realizado em bovinos de 2017 a 2021 no Brasil, avaliando 1749 amostras para a detecção de 6 micotoxinas, 29% das amostras estavam contaminadas com T-2, sendo silagem de milho com níveis de 35,98 $\mu\text{g/kg}$, ração 24%, 11 $\mu\text{g/kg}$, produtos e subprodutos (soja, polpa cítrica, trigo, amendoim, caroço de algodão, cevada e sorgo, 27,12 $\mu\text{g/kg}$ em média, sendo 2021 o ano com maior detecção de T-2 nas amostras, 44,8% respectivamente [6]. Nos anos entre 2015 e 2020 na Polônia, 88,4% das amostras contendo T-2 foram detectadas, na Eslováquia em outro estudo a micotoxina estava presente em 90% das amostras, na Suíça em outro estudo foi encontrado 8% T-2 em 253 amostras de cevada [7].

Embora alguns estudos em gado leiteiro tenham relatado que esses animais são resistentes ao T-2 em comparação com não ruminantes, a exposição ao T-2 demonstrou causar redução no consumo, perda de produção, lesões gastroentéricas, hemorragias intestinais, piora da resposta imunológica e ausência de ciclos estrais em vacas. Para evitar problemas com micotoxinas, muitas fábricas de ração têm utilizado absorventes como forma preventiva para reduzir as chances de perdas produtivas.

Pesquisas demonstrando melhora no estado imunológico e antioxidante de bezerros que consumiram óleo essencial (OE) são bem conhecidas [8]. Da mesma forma, pesquisadores demonstraram que os OE podem minimizar os impactos negativos das condições de micotoxicose, como o OE de pimenta-do-reino que reduziu os efeitos deletérios da aflatoxina em galinhas [9]. Os OE têm a capacidade de atuar no metabolismo da glicose de vacas leiteiras e suprimir a síntese de aflatoxina M1. Já se sabe que a ação dos OE em bactérias gram positivas é maior em comparação às gram negativas, devido à camada de lipopolissacarídeo; no entanto, a estereoquímica do OE já foi relatada como capaz de atravessar a membrana de células gram negativas por meio de proteínas transmembrana. Além disso, há efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios, que estão relacionados à capacidade dos OE e seus compostos de neutralizar os radicais livres de oxigênio e ativar o sistema anti-inflamatório, capaz de minimizar os danos celulares e teciduais causados pelo estresse oxidativo e pelo processo de inflamação [10].

Orégano (*Origanum vulgare* L.), alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.)

e os óleos essenciais de manjerição (*Ocimum basilicum* L.) apresentam alta capacidade antioxidante. O óleo de alecrim é amplamente utilizado pela indústria cosmética, pois possui propriedades antibacterianas, citotóxicas, antimutagênicas, antioxidantes, anti-inflamatórias e quimiopreventivas; o óleo de manjerição tem seu poder antioxidante atribuído ao ácido rosmarínico [4]; os óleos de orégano e tomilho apresentam potente ação antioxidante atribuída principalmente ao timol e ao carvacrol [11]. Neste contexto, o objetivo deste experimento foi avaliar os impactos da ingestão de tricotecenos (*Fusarium sporotrichioides*) por bezerros leiteiros sobre o crescimento animal, resposta oxidativa e inflamatória na presença ou ausência de uma mistura de OEs.

2. Materiais e métodos

2.1. Tricotecenos: T-2 e HT-2

A produção da toxina T-2 foi obtida a partir da fermentação do milho por *F. sporotrichioides*. A fermentação foi realizada em frascos Erlen-Meyer de 500 mL, aos quais foram adicionados 100 g de milho. O milho foi umedecido (atividade de água > 0,97) e autoclavado a 121 °C por 1 h. Subsequentemente, o milho foi inoculado com 2 mL de uma suspensão de conídios (1×10^5 conídios por mL). Suspensões de conídios foram obtidas de colônias de *F. sporotrichioides* crescendo em ágar batata-dextrose por 15 dias a 25 °C. Após a inoculação, os frascos foram mantidos estáticos por 28 dias a 25 °C. Subsequentemente, o milho fermentado foi seco e moído para contaminar artificialmente o concentrado. A alimentação e a concentração de toxina T-2/HT-2 foram verificadas usando análise de HPLC/MS/MS. Com base nessas informações, o inóculo foi definido e adicionado ao concentrado durante sua produção para atingir uma contaminação final de 500 ppb e fornecido a todos os animais desta pesquisa.

A dose de T-2/HT-2 foi definida com base em resultados descritos em estudos anteriores [5,12], visando uma intoxicação leve dos animais.

2.2. Mistura de óleos essenciais (OE)

Orégano (*Origanum vulgare*), tomilho (*Tymus vulgaris*), manjerição (*Ocimum basilicum*) e alecrim (*Salvia rosmarinus*) foram adquiridos como plantas secas para extração de óleo pelo método de destilação a vapor em uma abordagem convencional, onde a água não foi mantida no fundo e o vapor foi introduzido através de serpentinas. A mistura de OEs foi formulada com óleo de orégano, tomilho, manjerição e alecrim (25 mL cada). Em um dos grupos (T-OE), a mistura de OEs foi adicionada (dose de 0,75 mL/kg de concentrado de ração), conforme recomendado na literatura [13,14]. Como a quantidade de OEs era pequena, para facilitar a mistura, os OEs foram primeiramente homogeneizados com óleo de soja, um dos ingredientes em maior proporção na dieta.

2.3. Composição da mistura de OEs por GC/FID e GC/MS

A composição da mistura de OEs [15] foi realizada utilizando a técnica de cromatografia gasosa (GC/FID e GC/MS), onde 10 μL foram diluídos em 1000 μL de n-hexano de grau cromatográfico (Sigma-Aldrich, Alemanha, pureza >99%). Para a quantificação do analito, 1 μL da amostra diluída foi injetado, em triplicata, em um cromatógrafo gasoso (Varian Star 3400CX, CA, EUA) utilizando um detector de ionização de chama (GC-FID). A injeção ocorreu em modo split 1:20 a 250 °C. Os compostos foram analisados em coluna de separação apolar (5% fenil-dimetilpolisilioxano). (ZB-5MS; 30 m $\times$ 0,25 mm $\times$ 0,25 μm ; Phenomenex, EUA); os analitos foram transportados por gás hidrogênio a 1,6 mL/min. As condições cromatográficas estavam de acordo com a metodologia descrita por Adams [1]. A temperatura inicial do método foi de 40 °C e a temperatura foi elevada a uma taxa de 5 °C/min até atingir 250 °C.

O tempo total de análise foi de 43 min. A detecção dos compostos foi realizada em um detector de ionização de chama a 250 °C. A quantificação dos compostos foi realizada por meio da normalização das áreas, expressando a concentração em porcentagem da área dos picos nos cromatogramas. Para a identificação dos compostos, as amostras foram injetadas em um cromatógrafo gasoso (GC-2010 Plus, Shimadzu, Tóquio, Japão) acoplado a um espectrômetro de massas (GCMS - QP2010 Plus, Shimadzu, Tóquio, Japão). A mesma coluna e as mesmas condições cromatográficas utilizadas na análise de quantificação (GC/FID) foram utilizadas para separar os analitos, porém utilizando gás hélio a 1,5 mL/min. Os espectros de massas foram obtidos por varredura de 35 a 350 *m/z* (massa/carga) com energia de ionização de +70 eV. A temperatura da interface foi de 230 °C, enquanto a fonte de íons foi mantida a 200 °C. Os espectros de massa obtidos para cada composto foram comparados aos espectros disponíveis no banco de dados do NIST (Biblioteca do Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia; <https://webbook.nist.gov>). Uma série homóloga de alcanos foi analisada para obter as taxas de retenção dos compostos. As taxas de retenção obtidas foram calculadas de acordo com Van den Dool e Kratz [16] e comparadas com as fornecidas na literatura, para confirmar a identidade dos compostos analisados.

2.4. Animais e instalações

O experimento foi conduzido na Fazenda Experimental da Universidade Estadual de Santa Catarina (UDESC), localizada no município de Guatambú, Santa Catarina, Brasil. Foram utilizados 12 bezerros machos, da raça Holandesa, com 65 dias de idade, recém-desmamados, com peso médio de 86,7 kg, submetidos a um período de adaptação de 10 dias. Os animais foram alojados em baias individuais, com aproximadamente 3 m² cada, contendo comedouros individuais, um para concentrado e outro para feno, com água à vontade.

2.5. Desenho experimental

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com dois tratamentos e seis repetições por tratamento, onde cada animal foi considerado uma unidade experimental. Os animais foram separados aleatoriamente em dois grupos: Controle (TC) e Óleos Essenciais (T-EO), considerando o peso corporal para obter grupos homogêneos. Como já mencionado, todos os animais (TC e T-EO) consumiram concentrado experimentalmente contaminado com T-2 (500 µg/kg). No concentrado do grupo T-EO, foram adicionados 0,75 mL da mistura de óleos por quilograma.

A dieta fornecida aos animais foi baseada no NRC e consistiu em concentrado de ração e feno de Tifton. O concentrado foi formulado com milho moído, farelo de soja, farelo de trigo, óleo de soja (1,5%), minerais e vitaminas (4%). Para atender às necessidades nutricionais, 2 kg de concentrado/dia foram fornecidos duas vezes ao dia (8h e 16h), além de feno e água *ad libitum* por um período de 40 dias. Portanto, sabendo a quantidade de concentrado consumida por animal, determinou-se que cada bezerro consumiu cerca de 1000 µg de T-2 e 1,5 mL dos OEs todos os dias.

2.6. Pesagem, exame clínico e consumo alimentar

Os animais foram pesados no início e no final do experimento em balança eletrônica. Essas informações permitiram o cálculo do ganho de peso e do ganho médio diário. Todo o concentrado fornecido aos bezerros foi consumido. O exame clínico dos bezerros foi realizado por um veterinário especialista em animais de grande porte nos dias 8, 15 e 29 do experimento, quando foram registrados a temperatura retal (TR), a frequência respiratória (FR), a frequência cardíaca (FC), os movimentos ruminais (MR), o tempo de enchimento capilar (TRC) e a coloração da mucosa.

2.7. Amostragem

O sangue foi coletado nos dias 1, 20 e 40 por punção da veia jugular, utilizando agulhas descartáveis e tubos a vácuo com anticoagulante EDTA.

(para hemograma) e sem EDTA (análises bioquímicas e imunológicas), e armazenado em caixa térmica com gelo para transporte imediato ao laboratório. O soro foi obtido após centrifugação do sangue (3500 g por 10 min), separado em microtubos para congelamento (-20 °C) até a análise.

Quatro animais foram eutanasiados por um veterinário no dia 41 (dois animais de cada grupo). Primeiramente, os animais foram sedados intravenosamente com o seguinte protocolo: cloridrato de xilazina 2% (0,3 mg/kg PC), acepromazina 1% (0,2 mg/kg PC) e cetamina 10% (5 mg/kg PC). A overdose de solução saturada de sulfato de magnésio foi administrada intravenosamente até a ausência de resposta cardiorrespiratória, conforme aprovado pelo Comitê de Ética em Uso de Animais da UDESC. Na necropsia, foi realizada avaliação macroscópica e coleta de amostras (fígado, duodeno, jejuno, íleo, ceco e cólon). Partes congeladas desse material foram utilizadas para análise do estado oxidativo e outros fragmentos foram preservados em formalina 10% para histopatologia.

2.8. Pontuação fecal

A pontuação fecal foi realizada em intervalos de dois dias individualmente ao longo do experimento de acordo com Litherland [17] da seguinte forma: pontuação 1 para fezes com consistência muito líquida; pontuação 2 para mais líquida do que o indicado (soltas); pontuação 3 para consistência mais sólida (podem acumular-se quando caídas no chão, cerca de 5 cm de altura e com vários anéis concêntricos com uma pequena depressão central); pontuação 4 para mais sólida e espessa, maior que 5 cm de altura; e pontuação 5 para claramente seca.

2.9. Análises laboratoriais

2.9.1. Composição química dos alimentos e quantificação de micotoxinas

A composição do concentrado (Tabela 1) foi analisada segundo AOAC [3], sendo: matéria seca (MS) pelo método 930.15; proteína bruta (PB) pelo método 976.05; extrato etéreo (EE) pelo método 920.39 e matéria mineral (MM) pelo método 942.05.

As análises de fibra em detergente neutro (FDN) e fibra em detergente ácido (FDA) foram realizadas de acordo com a metodologia de Van Soest et al. [18] sem adição de sulfato de sódio ou alfa-amilase.

As concentrações de toxina T-2 e HT-2 no material fermentado moído foram medidas por HPLC/MS/MS. Os níveis observados no concentrado fornecido aos animais do grupo TC foram T2 = 220 ppb e HT-2 = 144 ppb (o total de tricotecenos foi de 364 ppb); no concentrado consumido pelos bezerros do grupo T-EO, os níveis foram T2 = 236 e HT-2 = 140 ppb (o total de tricotecenos foi de 376 ppb).

2.9.2. Hemograma

Contagem total de eritrócitos e leucócitos, concentração de hemoglobina

Tabela 1

Ração e composição química da ração utilizada na dieta de bezerros leiteiros.			
Composição química	Feno (%)	Concentrado TC	Concentrado T-EO
Matéria Seca (MS)	90,28	96,13	96,46
Proteína Bruta (PB)	15,49	24,64	24,08
Extrato	0,87	8,64	6,98
de Éter de Cinzas (EE)	2,96	2,76	2,99
Fibra de detergente neutro (NDF)	53,91	26,67	25,68
detergente ácido (ADF)	29,48	6,53	6,08

Nota 1. Formulação concentrada para produzir 100 kg: Milho moído 45,5 kg, Farelo de soja 35,5 kg, Farelo de trigo 14 kg, Núcleo mineral e vitamínico 4 kg, Óleo de soja 1 kg.

Nota 2: O núcleo utilizado neste estudo foi composto pelos seguintes níveis: Cálcio (mín.) 190 g/kg, Cálcio (máx.) 220 g/kg, Fósforo (mín.) 60 g/kg, Enxofre (mín.) 20 g/kg, Magnésio (mín.) 20 g/kg, Potássio (mín.) 35 g/kg, Sódio (mín.) 70 g/kg, Cobalto (mín.) 15 mg/kg, Cobre (mín.) 700 mg/kg, Cromo (mín.) 10 mg/kg, Ferro (mín.) 700 mg/kg, Iodo (mín.) 40 mg/kg, Manganês (mín.) 1600 mg/kg, Selênio (mín.) 19 mg/kg, Zinco (mín.) 2500 mg/kg, Vitamina A (mín.) 400.000 UI/kg, Vitamina D3 (mín.) 100.000 UI/kg, Vitamina E (mín.) 2.400 UI/kg, Flúor (máx.) 600 mg/kg.

e a porcentagem de hematócrito foram realizadas utilizando equipamento eletrônico Sysmex (modelo KX-21 N). Esfregaços de sangue foram realizados para contagem diferencial de leucócitos [19].

2.9.3. Bioquímica sérica: Os níveis

de proteína total, albumina e ureia, bem como as atividades da alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST) e gama-glutamyl transferase (GGT) foram medidos em um analisador semiautomático Bio-2000 BioPlus®, utilizando kits comerciais e suas respectivas metodologias de acordo com o fabricante. Para os níveis de globulina, foi utilizada a fórmula (proteína total – albumina).

2.9.4. Estado oxidativo

O estado oxidativo foi verificado em diversos tecidos (fígado, duodeno, jejuno, íleo, ceco e cólon). A peroxidação lipídica sérica foi medida pela quantidade de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) [20]. A reação foi lida em espectrofotômetro a 535 nm, e o resultado foi expresso em mols de malondialdeído/mL de soro.

A determinação de espécies reativas de oxigênio (ROS) utilizou a técnica descrita por Ali et al. [2]. As amostras foram diluídas 1:10 com 10 nM de Tris (pH 7,4) e 5 µL de diacetato de diclorofluorescina (DCFH-DA) em metanol e adicionadas por 15 min a uma temperatura de 37 °C para formar uma diclorofluorescina não fluorescente (DCPH). A formação de diclorofluoresceína (DCF; DCFH fluorescente) foi monitorada por espectrofotometria a 525 nm. A formação de ROS foi determinada usando uma curva DCF padrão em metanol (0,05–1,0 µM). Os resultados foram expressos como U DCF/mg de proteína.

A atividade da glutatona S-transferase (GST) sérica foi medida com base no método descrito por Habig et al. [21] e expressa como U GST/mg de proteína. Os níveis séricos de antioxidantes não enzimáticos (tiois não proteicos) foram avaliados seguindo a metodologia descrita por Sedlak e Lindsay [22] e recentemente descrita por Maltez et al. [23], e os resultados foram expressos em mmol NPSH/mL.

2.9.5. Os níveis de proteínas de

fase aguda, proteína C-reativa e haptoglobina foram determinados utilizando kits comerciais (Lab Test®) por meio de um analisador bioquímico automático. Os resultados foram expressos em mg/dL.

2.9.6. Histopatologia

Amostras de baço, fígado, duodeno, jejuno, íleo, ceco e cólon preservadas em formalina tamponada a 10% foram processadas; lâminas de tecido foram preparadas e coradas pela técnica de hematoxilina-eosina (HE). A análise foi realizada em microscópio óptico (40 e 100x).

2.9.7. Análise estatística

Todos os dados foram analisados usando um procedimento misto de SAS (SAS Inst. Inc., Cary, NC, EUA; versão 9.4), com aproximação de Satterthwaite para determinar os graus de liberdade do denominador para o teste de efeitos fixos. O ganho de peso, o ganho médio diário e a resposta antioxidante em órgãos foram testados para efeito fixo de tratamento usando animal (tratamento) como efeito aleatório. Todas as outras variáveis foram analisadas como medidas repetidas e testadas para efeitos fixos de tratamento, dia e tratamento × dia, usando animal (tratamento) como efeito aleatório. Os resultados do dia 1 foram incluídos como uma covariável independente. Além disso, para essas variáveis, para gerar a média por tratamento, os resultados do dia 1 foram removidos do conjunto de dados, mas foram mantidos como covariável. A estrutura de covariância autorregressiva de primeira ordem foi selecionada de acordo com o menor critério de informação de Akaike. As médias foram separadas usando o método PDIF e todos os resultados foram relatados como LSMEANS seguido por SEM. A significância foi definida quando P ≤ 0,05 e a tendência quando P > 0,05 e y 0,10.

3. Resultados

3.1. Composição da mistura de óleo

A técnica de cromatografia gasosa realizada na mistura de óleo identificou 38 compostos, sendo que em maior proporção e em ordem decrescente foram: estragol, eucaliptol, para-cimeno e timol (Material Suplementar 1).

3.2. Desempenho de crescimento

A Tabela 2 apresenta os resultados do desempenho do crescimento. Tendência do tratamento × Foram observadas interações diárias (P = 0,07) e efeitos do tratamento (P = 0,07) para peso corporal e ganho de peso. Os resultados indicam que os animais que consumiram a ração com micotoxina T-2 tratada com a mistura de OE apresentaram maior ganho de peso ao final do experimento. Houve também uma tendência ao efeito do tratamento (P = 0,06) para o ganho médio diário (GMD), sendo maior no grupo T-OE em comparação ao grupo TC.

3.3. Pontuação fecal e de saúde

O escore fecal (Tabela 2) não apresentou diferença significativa entre os grupos (P > 0,05). As variáveis clínicas investigadas (Tabela 3) não diferiram significativamente entre os tratamentos (P > 0,05).

3.4. Hemograma

Os resultados do hemograma são apresentados na Tabela 4. Não houve efeito do tratamento e interação para as variáveis do eritrograma (contagem de eritrócitos, concentração de hemoglobina e porcentagem de hematócrito). Houve interação entre tratamento x dia (P = 0,05) e efeito do tratamento (P = 0,01) para o número total de leucócitos, sendo maior no sangue dos animais do grupo T-EO nos dias 20 e 40. Nestes mesmos dias, foi observada interação tratamento x dia (P = 0,01) e efeito do tratamento (P = 0,01) para a contagem de granulócitos, células que estavam em maior número.

Tabela 2

Desempenho de crescimento e pontuação fecal de bezerras consumindo ração com contaminação experimental por tricotecenos e suplementação de uma mistura de óleo essencial.

Unid	Tratamentos1		Valores P SEM		
	TC	T-EO		Tratar	Tratar. × Dia
Peso corporal (kg) d				–	0,07
1 d	86,8	86,7	0,63		
40	106b	109a	0,63		
Ganho de peso (kg)	19,5b	21,8a	0,87	0,07	–
Ganho médio diário (kg/dia)	0,50b	0,56a	0,02	0,06	–
Escore fecal (1–5) d				0,22	0,72
6	2,97	2,36	0,36		
d 8	1,63	1,20	0,36		
d 10	1,97	2,03	0,36		
d 12	1,97	2,03	0,36		
d 14	2,13	1,86	0,36		
d 16	2,30	2,03	0,36		
d 18	1,80	1,86	0,36		
d 20	2,13	1,70	0,36		
d 22	1,63	1,86	0,36		
d 24	1,30	1,86	0,36		
d 26	1,97	2,69	0,36		
d 28	2,01	1,86	0,36		
d 32	2,30	2,03	0,36		
d 34	2,47	2,20	0,36		
d 37	2,30	2,03	0,36		

a-bDentro de uma linha, diferem (P ≤ 0,05) ou tendem a diferir (P ≤ 0,10).
¹Os tratamentos foram: TC e T-EO, representando o controle (adição de tricotecenos de micotoxina) e o tratamento (adição de tricotecenos com mistura de óleo essencial).

²Os resultados do d 1 foram removidos do conjunto de dados para gerar a média/tratamento na análise estatística.

Tabela 3

Exame clínico de bezerros consumindo ração com contaminação experimental por tricotecenos e suplementação de mistura de óleos essenciais.

Unid	Tratamentos		Valores P SEM	
	TC	T-EO	Tratar	Tratar. × Dia
Temperatura retal (RT)	38,8	38,8	0,09	0,64
Batimento Cardíaco (FC)	39,0	40,4	2,44	0,68
Frequência Respiratória (FR)	72,8	75,8	5,16	0,69
Movimentos Ruminais (MR)	5,44	6,11	0,39	0,26
Tempo de Recarga Capilar (TRC)	1,94	2,00	0,04	0,39

a-bDentro de uma linha, diferem (P > 0,05) ou tendem a diferir (P > 0,10).
Os tratamentos foram: T1 e T2, representa o controle (adição de micotoxina T-2) e tratamento (adição de micotoxina T-2 com mistura de óleo essencial).

Tabela 4

Hemograma de bezerros consumindo ração com contaminação experimental por tricotecenos e adição de mistura de óleos essenciais.

Unid	Tratamentos		Valores P SEM	
	TC	T-EO	Tratar.	Tratar. × Dia
Eritrócitos (x106 yL)	8,07	7,91	0,17	0,51
Hematócrito (%)	28,5	27,7	0,54	0,34
Hemoglobina (g/dL)	10,6	10,2	0,22	0,23
Leucócitos (x103 yL) d 1	3,61	3,07	1,01	0,01
d 20	3,54b	6,63a	1,01	0,01
d 40	3,43b	7,59a	1,01	0,01
Granulócitos (x103 yL) d 1 d 20	2,66	2,22	0,21	0,01
d 40	0,76b	2,05a	0,21	0,01
	0,73b	2,06a	0,21	0,01
Linfócitos (x103 yL)	2,60b	3,98a	0,29	0,11
Monócitos (x103 yL)	0,98	1,22	0,19	0,42
VCM (x103 yL)	35,7	35,4	0,61	0,78
MCH (x103 yL)	13,2	13,0	0,18	0,45
CHCM (x103 yL)	35,1	37,0	1,32	0,34
RDW (x103 yL) d 1	23,3	23,2	1,10	0,05
d 20	22,7	22,7	1,10	0,06
d 40	28,9a	22,7b	1,10	0,06
PLT (x103 yL)	403	405	47,1	0,98

a-bDentro de uma linha, diferem (P > 0,05) ou tendem a diferir (P > 0,10).
Os resultados do d 1 foram removidos do conjunto de dados para gerar a média/tratamento na análise estatística.
Os tratamentos foram: TC e T-EO, representa o controle (adição de tricotecenos) e tratamento (adição de tricotecenos com mistura de óleos essenciais).

no grupo T-EO. Para a contagem de linfócitos, foram detectados efeitos do tratamento (P = 0,01). Houve interação entre tratamento x dia (P = 0,006) e efeito do tratamento (P = 0,08) para a amplitude de distribuição de hemácias (RDW), sendo maior no grupo T-EO. Não houve diferença entre os tratamentos para as variáveis tamanho e coloração dos eritrócitos, bem como para o número de plaquetas (P > 0,05).

3.5. Bioquímica sérica

Os resultados da bioquímica sérica são apresentados na Tabela 5. Os níveis de

Tabela 5

Bioquímica sérica de bezerros consumindo ração com contaminação experimental por tricotecenos e suplementação de mistura de óleos essenciais.

Variável	Tratamentos		SEM	Valores de P	
	TC	T-EO		Tratar	Tratar × Dia
Albumina (g/dL)	2,62	2,57	0,11	0,76	0,73
Globulina (g/dL)	3,53b	4,17a	0,15	0,01	0,54
Proteína total (g/dL)	6,16b	6,73a	0,13	0,01	0,35
Ureia (mg/dL)	26,4	25,3	2,57	0,78	0,71
ALT2 (mg/dL) d 1 d 20 d 40	14,8 21,3 27,6a	14,4 21,6 20,0b	1,54 1,54 1,54	0,10	0,02
ASTb (mg/dL) d 1 d 20 d 40	60,2 96,5a 81,4a	60,0 72,8b 65,8b	4,79 4,79 4,79	0,02	0,04
GGTb (mg/dL) d 1 d 20 d 40	18,7 22,5a 25,2a	17,8 17,1b 17,1b	1,59 1,59 1,59	0,009	0,08

sobre Dentro de uma linha, diferem (P > 0,05) ou tendem a diferir (P > 0,10).
Os resultados do d 1 foram removidos do conjunto de dados para gerar a média por tratamento na análise estatística.
Os tratamentos foram: TC e T-EO, representa o controle (adição de tricotecenos) e tratamento (adição de tricotecenos com mistura de óleos essenciais).
Alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST) e gama glutamiltransferase (GGT).

A globulina e a proteína total foram maiores nos bezerros que receberam a mistura de OEs. Não houve efeito do tratamento nem interação tratamento versus dia para a concentração de albumina e ureia. As enzimas hepáticas indicaram lesão hepática, bem como o efeito do tratamento e a interação tratamento x dia. Em geral, a atividade de AST, ALT e GGT foi menor no soro dos bezerros do grupo T-OE em comparação ao grupo controle.

3.6. Estado oxidativo

As variáveis oxidativas séricas são mostradas na Tabela 6. Houve uma

Tabela 6

Resposta antioxidante sérica de bezerros consumindo ração com contaminação experimental por tricotecenos e suplementação de mistura de óleos essenciais.

Unid	Tratamentos		Valores P SEM		
	TC	T-EO		Tratar	Tratar × Dia
TBARS (nmol MDA/mL) d 1 d 20 d 40	20,0 25,5 28,0	19,6 1,23 24,2a	1,23 19,1b	0,39	0,01
GSTb (ymolCDNB/min/mg de proteína)	328a	260b	17,3	0,05	0,41
Tióis (mmol NPSH/mL)	0,23	0,21	0,02	0,58	0,75
ROS (U DCFH/mg proteína)) d 1 d 20 d 40	0,33 0,38 0,42	0,32 0,02 0,47a	0,02 0,31b	0,10	0,001

a-bDentro de uma linha, diferem (P > 0,05) ou tendem a diferir (P > 0,10).
Os resultados de 1 d foram removidos do conjunto de dados para gerar a média/tratamento na análise estatística.
Os tratamentos foram: TC e T-EO, representa o controle (adição de tricotecenos) e tratamento (adição de tricotecenos com mistura de óleos essenciais).
Glutathione transferase (GST).

Interação tratamento × dia (P = 0,01) para a concentração sérica de TBARS no dia 40, sendo menor no grupo T-EO. A concentração de ROS no soro também foi menor nos animais do grupo T-EO. Efeito do tratamento (P = 0,05) foi observada para GST, sendo menor no soro dos animais tratados com OEs. Os níveis de tióis não diferiram entre os tratamentos. Os resultados das variáveis oxidativas no fígado, duodeno, jejuno, íleo, ceco e cólon são apresentados na [Tabela 7](#). Dentre os resultados, destacam-se os seguintes achados: 1) fígado, menores valores de TBARS, GST, tióis e ROS no grupo T-EO; 2) no duodeno, maiores valores de GST e tióis nos animais do grupo T-EO; 3) jejuno, maiores concentrações para tióis e menores ROS no grupo T-EO; 4) ceco e cólon, maiores valores de GST e ROS foram observados no grupo T-EO.

3.7. Proteína de fase aguda

Os níveis de proteína C-reativa e haptoglobina são mostrados na [Fig. 1](#). Os níveis dessas duas proteínas de fase aguda foram menores no soro de bezerros que consumiram a mistura de EO em comparação ao grupo controle (TC).

3.8. Necropsia e histopatologia

Durante a necropsia, o fígado de dois bezerros do grupo controle (T-

Tabela 7

Resultados descritivos do estado oxidativo em órgãos de bezerros que consumiram ração contaminada por tricotecenos e suplementação de mistura de óleos essenciais.

Unid	Tratamentos		Tratado por SEM vs. Controle	
	TC	T-EO		
<i>Fígado</i>				
TBARS (nmol MDA/mL)	33,8	23.1	2,03 y 31,6% y 40,1%	
GST (ymol CDNB/min/mg proteína)	937	561	102	
Tióis (ymol SH/mg proteína)	0,82	0,40	0,11	y 51,2% y
ROS (U DCFH/mg proteína)	6,83	3,67	0,56	46,2%
<i>Duodeno</i>				
TBARS (nmol MDA/mL)	5,43	5,30	0,13 y 2,39% 66,6 y	
GST (ymol CDNB/min/mg proteína)	445	666	49,6%	
Tióis (ymol SH/mg proteína)	0,57	0,76	0,05 y 33,3% 0,41 y	
ROS (U DCFH/mg proteína)	4,96	4.33	12,7%	
<i>Jejuno</i>				
TBARS (nmol MDA/mL)	6,76	6,75	0,39 y 0,14% 66,6 y	
GST (ymol CDNB/min/mg proteína)	558	565	1,25%	
Tióis (ymol SH/mg proteína)	0,35	0,53	0,05 y 51,4% 0,29 y	
ROS (U DCFH/mg proteína)	10.6	6,40	39,2%	
<i>Íleo</i>				
TBARS (nmol MDA/mL)	5,76	5,83	0,35 y 1,73% 42,3 y	
GST (ymol CDNB/min/mg proteína)	549	705	28,4%	
Tióis (ymol SH/mg proteína)	0,61	0,79	0,08 y 29,1% 0,33 y	
ROS (U DCFH/mg proteína)	5,76	5,79	0,52%	
<i>Ceco</i>				
TBARS (nmol MDA/mL)	5,75	5,35	0,11 y 6,95%	
GST (ymol CDNB/min/mg proteína)	425	579	38,4 y 36,2%	
Tióis (ymol SH/mg proteína)	0,56	0,56	0,07 0,0% 0,57 y	
ROS (U DCFH/mg proteína)	5.18	6,50	25,4%	
<i>C'olon</i>				
TBARS (nmol MDA/mL)	4,78	4,86	0,18 y 1,67% 22,5 y	
GST (ymol CDNB/min/mg proteína)	558	563	0,89%	
Tióis (ymol SH/mg proteína)	0,73	1,03	0,17 y 41,0% 1,97b	
ROS (U DCFH/mg proteína)	3,20a	0,23 y 62,4%		

^b Média e desvio padrão.

^c Foi considerada diferença descritiva e representativa entre os grupos quando o percentual de aumento ou diminuição foi maior que 30%.

^{***} Os tratamentos foram: TC e T-EO, representa o controle (adição de tricote-cenos) e tratamento (adição de tricotecenos com mistura de óleos essenciais).

C) apresentou consistência firme, moderadamente difusa; e discreto edema no mesentério. Essas alterações patológicas não foram identificadas nos dois bezerros do grupo T-EO. No geral, não houve lesões ou alterações microscópicas nos baços, fígados, rins e tratos gastrointestinais dos quatro bezerros necropsiados ([Fig. 2](#)).

4. Discussão

Bezerros que consumiram a mistura de OEs (orégano, tomilho, manjerição e alecrim) apresentaram maior ganho de peso no período avaliado de 40 dias. Liu et al. [\[8\]](#) observaram resultados positivos e semelhantes no maior ganho médio diário de bezerros holandeses pré e pós-desmame suplementados com uma combinação de OEs (orégano, alecrim e tomilho) e prebiótico (44,1 ppm/dia). Na literatura, existem vários estudos com OEs e o desempenho de bezerros [\[14,24\]](#). Jeshari et al. [\[25\]](#) em suas avaliações encontraram que o uso de OEs (300 mg/kg) antes e após o desmame aumenta gradativamente o consumo de ração e, consequentemente, o GMD dos bezerros.

Da mesma forma, Froehlich et al. [\[14\]](#) mostraram que a adição de OEs à dieta de bezerros na dose de 1,25 g/dia favorece o crescimento dos animais; dose semelhante à utilizada neste estudo. Fugita et al. [\[26\]](#) avaliaram novilhos sem a adição de OEs na dieta e com suplementação de 4 g/animal/dia de OEs de mamona e caju ou com a adição de 4 g/ animal/dia de uma mistura de OEs de mamona e caju mais orégano. Os tratamentos não apresentaram diferença significativa no consumo de matéria seca e na eficiência alimentar, porém o tratamento contendo a inclusão de OEs de orégano aumentou o ganho de peso em 14 0,7%, o peso final em 5,54% e o peso da carcaça em 5,37% quando comparado aos animais não alimentados com OEs. Esses resultados demonstram que a adição de OEs na dieta pode ser uma alternativa para maior ganho de peso nos animais.

Não houve diferenças entre os tratamentos, quanto às nossas avaliações clínicas, sugerindo doença subclínica, capaz de interferir na produção animal. A oscilação do escore fecal em bezerros pré e pós-desmame é uma condição multifatorial resultante da interação de vários fatores infecciosos e não infecciosos relacionados a diferentes condições de ambiente, nutrição e manejo. Façanha et al. [\[27\]](#) descreveram que a avaliação do TR juntamente com a FC auxilia na determinação do nível de estresse animal. No presente estudo, o TR permaneceu em 38,8 yC e a FR entre 39,0 e 40,4 mov/ min para ambos os grupos, caracterizando uma condição normal para o verão brasileiro. As demais variáveis clínicas não diferiram entre os tratamentos, pois estavam de acordo com a literatura; o que reforça a condição de problema silencioso causada pelo T-2 em bezerros. Em relação às variáveis de função e lesão hepática, os animais do grupo TC apresentaram maior atividade enzimática (AST e ALT) quando comparados ao grupo T-EO, sugerindo lesão hepática. Esses achados já eram esperados, uma vez que o fígado é o principal alvo da toxicidade e dos metabólitos das micotoxinas T-2 e HT-2, e sua exposição, além de causar redução significativa da proteína sérica total, aumenta as atividades de AST e ALT [\[28\]](#). Yang et al. [\[28\]](#) em estudo realizado com milho contaminado com T-2 em frangos de corte, também observaram maior atividade de AST e ALT. Embora esses estudos sejam focados em aves, fica claro que a micotoxina T-2 impacta a AST e a ALT, combinada com o aumento da atividade da GGT (que ocorre em condições de células hepatobiliares com colestase, associada ou não à hiperplasia biliar. Essa condição pode levar a alterações no metabolismo hepático, resultando em menor anabolismo proteico, o que pode impactar diretamente na saúde e no desenvolvimento do bezerro [\[4\]](#). O impacto negativo nos níveis de proteína total e globulina foi verificado neste estudo, mas com a administração da mistura esse efeito negativo foi minimizado.

O estresse oxidativo está presente em casos de intoxicação por T-2 [\[29\]](#), mas neste estudo verificou-se que o consumo da mistura de OE minimizou as reações oxidativas da peroxidação lipídica, bem como a produção de radicais livres de oxigênio. Essas variáveis, quando avaliadas em conjunto com o aumento da atividade da GST, indicam uma resposta à detoxificação de compostos eletrofílicos formados endogenamente, incluindo os produtos de peroxidação lipídica medidos neste estudo. A explicação mais provável para esses resultados são as propriedades imunomoduladoras dos

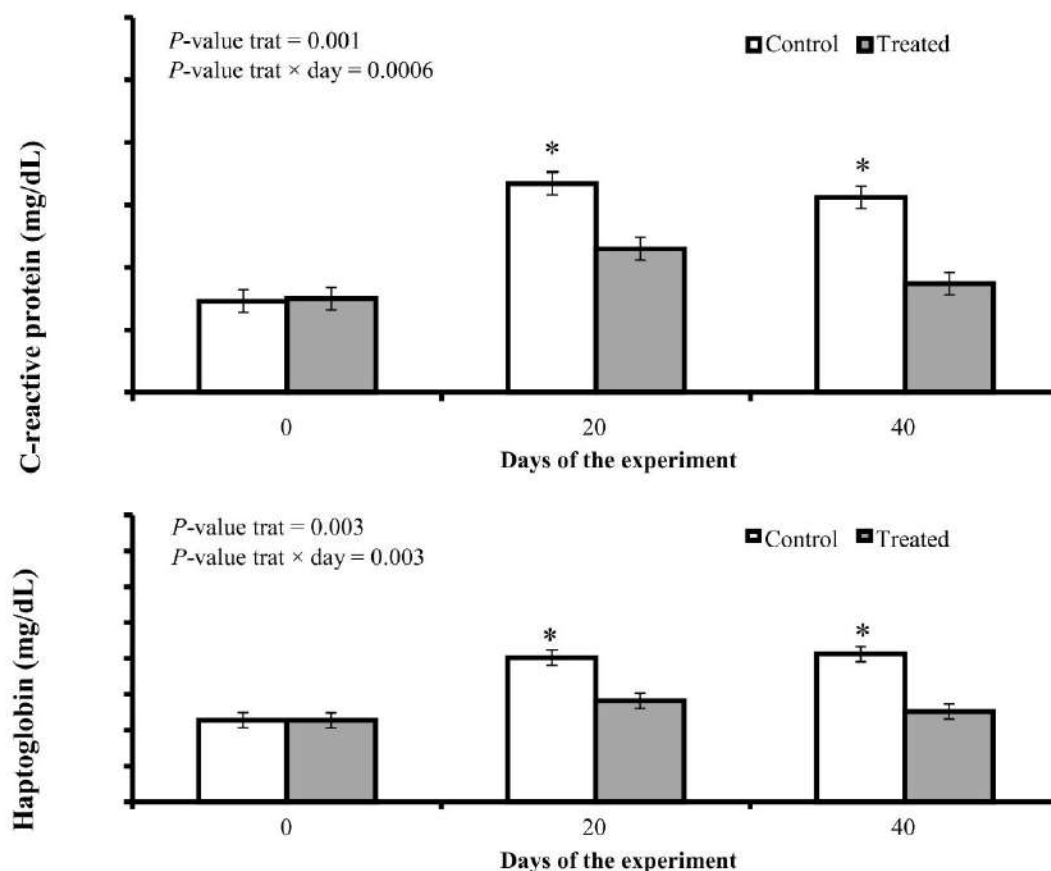


Fig. 1. Resposta inflamatória de bezerros consumindo tricotecenos: grupo controle (TC com adição de tricotecenos, sem a mistura de óleos essenciais) e grupo tratado (T-EO: com adição de tricotecenos e mistura de óleos essenciais).

*Diferem ($P \leq 0,05$) ou tendem a diferir ($P \leq 0,10$).

OEs de orégano e tomilho, que embora tenham atividade antibacteriana, também contribuem para o sistema antioxidante. Acredita-se que os benefícios antioxidantes estejam relacionados à presença de grupos fenólicos na composição do óleo, como o orégano, que possui flavonoides e terpenoides. Em geral, os OEs são um excelente aditivo alimentar para fins de proteção celular e tecidual, pois são capazes de minimizar o estresse oxidativo e as lesões. Apesar de descritivos, os resultados do estado oxidativo tecidual de animais submetidos à eutanásia contribuirão para a compreensão dos resultados do consumo de OE por bezerros, capazes de minimizar os efeitos deletérios da micotoxicose.

Um maior número de leucócitos, combinado com uma maior amplitude de distribuição de eritrócitos, parece ser consequência da micotoxicose em bezerros. Em um estudo que avaliou o perfil hematológico, encontraram um aumento significativo de leucócitos, linfócitos e monócitos em novilhas Jersey suplementadas com 1g/dia da mistura de OEs; por outro lado, no caso de ruminantes. Nayakwadi et al. [30] detectaram uma redução na hemoglobina e na contagem total de leucócitos em cabras jovens com dosagens de 10 e 20 ppm de micotoxina T-2. É evidente que os leucócitos permaneceram mais baixos no grupo T-OE, compatível com efeitos caracterizados pela intoxicação por T-2, uma vez que, no nível celular, o maior efeito do T-2 é na síntese proteica, o que leva a uma interrupção secundária da síntese de DNA e RNA. Esse efeito inibitório do T-2 é mais visível em células em proliferação ativa, como na medula óssea, onde essas células são produzidas [5].

Os animais do grupo T-EO que consumiram o concentrado com OE apresentaram maiores níveis de proteína total e globulina, refletindo catabolismo proteico adequado [31]. Da mesma forma, em estudos com OE de tomilho, maiores concentrações de albumina foram observadas [31]. O maior ganho de peso dos bezerros (grupo T-EO) está relacionado à capacidade dos óleos em modular a síntese proteica, conforme Zhou et al. [32] Consumo de OE

melhora a digestão da proteína total da dieta. O consumo diário de T-2 por bezerros é capaz de elevar os níveis séricos de proteínas de fase aguda, neste caso a haptoglobulina e a proteína C-reativa. Estudos focados na ação anti-inflamatória dos OEs são bem elucidados, pois se trata de um efeito de moléculas presentes no óleo capaz de prevenir processos inflamatórios intensos e prejudiciais [11].

5. Conclusão

T-2 e HT-2 na dieta de bezerros são problemas silenciosos, visto que os animais não apresentaram sinais clínicos ao consumir cerca de 750 ppb de ambas as micotoxinas. No entanto, o consumo de OEs na dieta de bezerros leiteiros favoreceu o crescimento corporal, pois preveniu danos hepáticos intensos e também demonstrou efeito anti-inflamatório, reduzindo assim o desvio de ATP para reações oxidativas e inflamatórias.

Financiamento

Nenhum.

Comitê de ética

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais da Universidade do Estado de Santa Catarina (CEUA/UEDESC), sob o número de protocolo 9502210721.

Consentimento para participar

Todos os nomes na lista de autores estavam envolvidos em vários estágios de experimentação ou escrita.

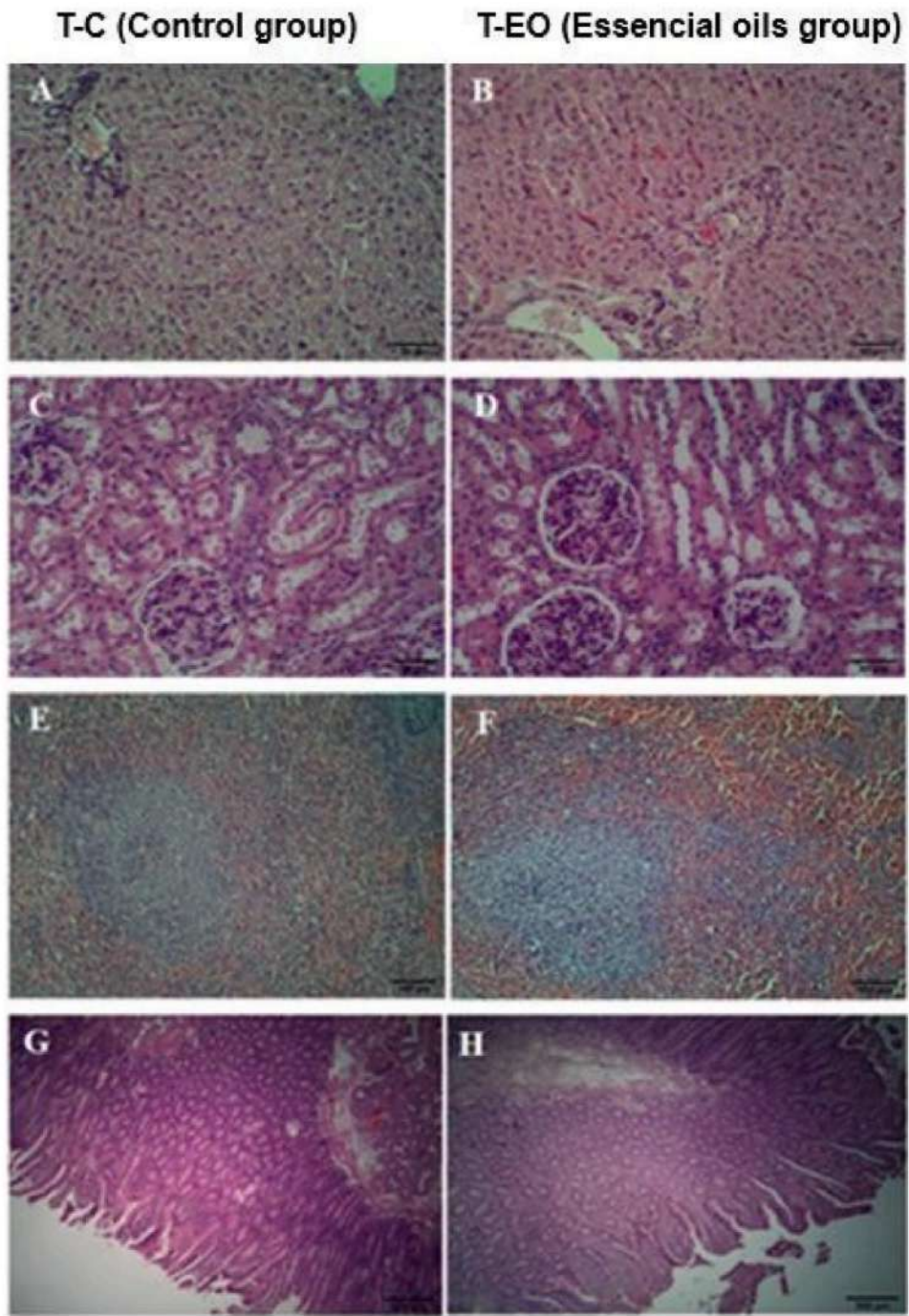


Fig. 2. Histopatologia do fígado (controle – A; tratado – B), rim (controle – C; tratado – D), baço (controle – E; tratado – F) e intestino (controle – G; tratado – H) sem achados microscópicos indicativos de dano tecidual.

Consentimento para publicação

Todos os autores concordam em submeter o artigo para publicação na Veteri-Comunicações de Pesquisa Nary.

Declaração de contribuição de autoria do CRediT

Marcela Machado: Redação – rascunho original, Supervisão, Administração do projeto, Análise formal, Curadoria de dados, Conceitualização.
Luisa Nora: Escrita – rascunho original, Metodologia, Análise formal.
Tayse Burger Neto Zanin: Redação – rascunho original, Metodologia.
Bianca F. Bissacotti: Escrita – rascunho original, Metodologia, Formal

Análise, Curadoria de dados. **Vera M. Morsch:** Redação – revisão e edição, Supervisão, Recursos, Conceitualização. **Marcelo Vedovatto:** Redação – revisão e edição, Software, Conceitualização. **Giovana Pelisser:** Redação – rascunho original, Metodologia, Análise formal.
Ricardo E. Mendes: Redação – revisão e edição, Supervisão, Metodologia, Análise formal. **Alessandro C. Galvão:** Redação – rascunho original, Validação, Supervisão, Metodologia, Curadoria de dados. **Caroline Seffrin Speroni:** Redação – rascunho original, Supervisão, Metodologia, Curadoria de dados, Conceitualização. **Eduardo M. Gloria:** Redação – revisão e edição, Supervisão, Recursos, Metodologia, Conceitualização.
Murilo F. Rodrigues: Redação – rascunho original, Administração do projeto, Metodologia, Curadoria de dados. **Roger Wagner:** Redação – rascunho original,

Supervisão, Recursos, Metodologia. **Lenita M. Stefani:** Redação – rascunho original, Validação, Supervisão, Metodologia, Curadoria de dados. **Aleksandro S. da Silva:** Redação – rascunho original, Supervisão, Administração do projeto, Metodologia, Investigação, Análise formal, Curadoria de dados, Conceitualização.

Declaração de interesses conflitantes

Os autores declaram não haver conflito de interesses.

Disponibilidade de dados

Nenhum dado foi utilizado para a pesquisa descrita no artigo.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa de Santa Catarina (FAPESC/Brasil) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq/Brasil), bem como à Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC, Santa Catarina, Brasil).

Apêndice A. Dados suplementares

Dados suplementares deste artigo podem ser encontrados on-line em <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2024.106605>.

Referências

[1] RP Adams, Identificação de componentes de óleo essencial por cromatografia gasosa/ espectrometria de massa, 4.1 ed., Texensis Publishing, 2017. ISBN 978-1-932633-21-4.

[2] SF Ali, CP Lebel, SC Bondy, Formação de espécies de oxigênio como um biomarcador de neurotoxicidade por metilmercúrio e trimetilestanho, Neurotoxicologia (Little Rock) 113 (1992) 637–648.

[3] AOAC. Official, Methods Analysis off AOAC International, Association of Official Analytical Chemists Associaç˜ao de Químicos Analíticos Oficiais, Washington, 2000.

[4] ESM Cutrim, AM Teles, AN Mouchrek, VE Mouchrek Filho, GO Everton, Avaliação da atividade antimicrobiana e antioxidante de óleos essenciais e extratos hidroalcoólicos de zingiber officinale (gingibre) e rosmarinus officinalis (alecrim), Revista Virtual Química 11 (11) (2019) 60–81.

[5] GM Buening, DD Mann, B. Hook, GD Osweiler, O efeito da toxina T-2 no sistema imunológico bovino: fatores celulares, Vet. 3 (1982) 411–417.

[6] L. Custodio, LF Prados, A. Yiannikouris, V. Holder, J. Pettigrew, L. Kuritza, F. D. Resende, GR Siqueira, Contaminação por micotoxinas em dietas para bovinos de corte terminados em confinamento, Rev. Bras. Zootec. 48 (2019) e20190079.

[7] B. Gabriela Lago, Micotoxinas na alimentação ao de bovinos no Brasil: um estudo de 2017 a 2021. Tese Doutorado, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG, Belo Horizonte, 2022.

[8] Q. Liu, W. Wang, J. Qi, Q. Huang, óleo essencial de orégano carregado de soja filmes de polissacarídeos: efeito da imobilização do tipo pickering nas propriedades físicas e antimicrobianas, Food Hydrocolloids 87 (2019) 165–172, <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.08.011>.

[9] VS Cardoso, IS Castro, CAR Lima, MEF Lima, LEG Dorneles, GM Direito, MGM Danelli, Eficácia da piperina na redução dos efeitos da intoxicação por aflatoxina em frangos de corte: relatório preliminar, Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. 63 (2) (2011) 495–498.

[10] ZD Stevanović, J. Bošnjak-Neumüller, I. Pajić-Lijaković, J. Raj, M. Vasiljević, Óleos essenciais como aditivos alimentares: perspectivas futuras, Molecules. Belgrado 23 (7) (2018), <https://doi.org/10.3390/molecules23071717>.

[11] JCA Oliveira, RS Veiga, Impacto do Uso de Alecrim (Rosmarinus Officinalis L.) para a Saúde Humana, Revista Brasileira de Ciências Naturais 1 (2019). Ed. 2.

[12] DD Mann, GM Buening, BS Hook, GD Osweiler, Efeito da toxina T-2 no sistema imunológico bovino: fatores humorais, Infect. Immun. (1982) 1249–1252, <https://doi.org/10.1128/iai.36.3.1249-1252.1982>.

[13] JP Campolina, SG Coelho, AL Belli, FS Machado, LGR Pereira, TR Tomic, WA Carvalho, ROS Silva, AL Voorsluys, DV Jacob, MM Campos, Efeitos de uma mistura de óleos essenciais em sucedâneo de leite sobre o desempenho, fermentação ruminal, parâmetros sanguíneos e escores de saúde de novilhas leiteiras, PLoS One 16 (3) (2021) e0231068.

[14] KA Froehlich, KW Abdelsalam, C. Chase, J. Koppien-Fox, DP Casper, Avaliação de óleos essenciais e prebióticos para bezerros leiteiros recém-nascidos, J. Anim. 95 (2017) 3772–3782.

[15] RO Petre, RA Serafim, DFM Sounza, LS Sakanaka, MM Yamaguchi, Caracterização e aplicação do óleo de orégano como antioxidante natural em linguiça frescal, Revista Brasileira de Desenvolvimento, Curitiba 6 (7) (2020) 44109–44118, <https://doi.org/10.34117/bjdv6n7-144>.

[16] H. Van Den Dool, PDA Kratz, Generalização do sistema de índice de retenção incluindo cromatografia de partição gás-líquido programada em temperatura linear, J. Chromatogr. (1963) 463–471, [https://doi.org/10.1016/s0021-9673\(01\)80947-x](https://doi.org/10.1016/s0021-9673(01)80947-x).

[17] N. Litherland, Oklahoma Dairy Report – A Dairy Nutrition Newsletter, 1, Oklahoma State University, 2007. Edição 2.

[18] PJ Van Soest, JB Robertson, BA Lewis, Métodos para fibra alimentar, fibra em detergente neutro e polissacarídeos não amiláceos em relação à nutrição animal, J. Dairy Sci. 74 (10) (1991) 3583–3597, [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(91\)78551-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(91)78551-2).

[19] BF Feldman, JG Zinkl, NC Jain, Hematologia Veterinária, Williams & Wilkins, Filadélfia, 2000, p. 1344.

[20] AM Jentzsch, H. Bachmann, P. Fürst, HK Biesalski, Análise melhorada de malondialdeído em fluidos corporais humanos, Free Radic. Biol. Med. 20 (1996) 251–256, [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(95\)02043-8](https://doi.org/10.1016/0891-5849(95)02043-8).

[21] WH Habig, MJ Pabst, WB Jakoby, Glutathione S-Transferases: a primeira enzima na formação do ácido mercaptúrico, J. Biol. 249 (22) (1974) 7130–7139, [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)42083-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)42083-8). Baltimore.

[22] J. Sedlak, RH Lindsay, Estimativa de proteína total, ligada e não proteica grupos sulfidríla em tecido com reagente de Ellmann, Anal. Biochem. 25 (1968) 192–205.

[23] LC Maltez, LAL Barbas, LF Nitz, L. Pellegrin, MH Okamoto, LA Sampaio, J. M. Monserrat, L. Garcia, Estresse oxidativo e respostas antioxidantes em juvenis de linguado brasileiro Paralichthys orbignyanus expostos a níveis subletais de nitrito, Fish Physiol. Biochem. (2018) 1–14, <https://doi.org/10.1007/s10695-018-0526-9>.

[24] KA Hammer, CF Carson, TV Riley, Atividade antimicrobiana de óleos essenciais e outros extratos de plantas, J. Appl. 86 (1999) 985–990, <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1999.00780.x>.

[25] MA Jeshari, A. Riassi, AH Mahdavi, M. Khorvashi, Efeito de misturas de óleos essenciais e resíduos de destilação no desempenho do crescimento e nos metabólitos sanguíneos de bezerros holandeses desmamados gradual ou abruptamente, Livest. Sci. (2015) 117–122, <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2015.12.011>.

[26] CA Fugita, RM Prado, MV Valero, EG Bonaf e, CB Carvalho, A. Guerrero, C. Sanundo, ~ IN Prado, Efeito da inclusão de aditivos naturais no desempenho animal e na qualidade da carne de touros mestiços (Angus vs. Nelore) terminados em confinamento, Anim. Prod. Sci. 58 (11) (2018) 2076–2083, <https://doi.org/10.1071/AN16242>.

[27] DAE Façanha, AM Vasconcelos, WST Silva, D. F Chaves, JHG Moraes, C. J. Olivo, Respostas Comportamentais e Fisiológicas de Bezerros Leiteiros Criados em Diferentes Tipos de Instalações ~ e Dietas Líquidas, Acta Veterinária Brasileira 5 (3) (2011) 250–257.

[28] L. Yang, D. Tu, Z. Zhao, J. Cui, Citotoxicidade e apoptose induzidas por micotoxinas mistas (toxina T-2 e HT-2) em hepatócitos primários de frangos de corte in vitro, Toxicon 17 (2017), <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2017.01.001>.

[29] A. Mavrommatis, E. Giamouri, S. Tavrizelou, M. Zacharioudaki, G. Danezis, P. E. Simitzi, E. Zoidis, E. Tziplakou, AC Pappas, CA Georgiou, K. Feggeros, Impacto das micotoxinas no estado oxidativo dos animais, Antioxidantes 10 (2) (2021) 214, <https://doi.org/10.3390/antiox10020214>.

[30] S. Nayakwadi, R. Ramu, AK Sharma, VK Gupta, K. Rajukumar, V. Kumar, P. S. Shirahatti, L. Rashmi, KM Basalingappa, Estudos toxicopatológicos sobre os efeitos da micotoxina T-2 e sua interação em cabras jovens, PLoS One 15 (3) (2020), <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0229463>.

[31] J. Wu, Y. Bai, X. Lang, C. Wang, X. Shi, DP Casper, L. Zhang, H. Liu, T. Liu, X. Gong, T. Liang, R. Zhang, A suplementação dietética com óleo essencial de orégano e monensina em combinação é antagonista ao desempenho de crescimento de touros holandeses de um ano, J. Dairy Sci. 103 (9) (2020), <https://doi.org/10.3168/jds.2020-18211>.

[32] R. Zhou, J. Wu, X. Lang, L. Liu, DP Casper, C. Wang, L. Zhang, S. Wei, Impacto do orégano na fermentação ruminal in vitro, produção de metano e comunidade microbiana ruminal, J. Dairy Sci. 103 (2019) 2303–2314, <https://doi.org/10.3168/jds.2019-16611>.

13. Artigo 3 Traduzido

Fisiol Biochem de peixes (2024) 50:1605–1620

<https://doi.org/10.1007/s10695-024-01358-x>

PESQUISAR



Um sistema de bioflocos evita os efeitos adversos de dietas com níveis de proteína abaixo do ideal no desempenho zootécnico, histomorfometria intestinal e metabolismo proteico de juvenis de tilápia do Nilo alimentados com biomassa de *Spirulina* (*Arthrospira platensis*) como fonte alternativa de proteína

Fernanda Picoli · Alana D. de Oliveira · Suelyn O. Marques · Deise C. Terhorst · Suélen Serafini · Luísa Nora · Fabio F. Neves · Maurício G. C. Emerenciano · Diogo L. A. Lopes · Aleksandro S. da Silva · Thiago E. H. P. Fabregat

Recebido: 13 de dezembro de 2023 / Aceito: 7 de maio de 2024 / Publicado online: 13 de maio de 2024

© O(s) autor(es), sob licença exclusiva da Springer Nature BV 2024

Resumo: Este estudo teve como objetivo avaliar o efeito do sistema de tecnologia de bioflocos (BFT) e da substituição da farinha de peixe por biomassa de *Spirulina* sobre o desempenho produtivo, histomorfometria intestinal, bioquímica plasmática e estresse oxidativo de juvenis de tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*) alimentados com níveis subótimos de proteína. Dois fatores foram avaliados: sistemas de produção (água limpa × BFT) e substituição da farinha de peixe por *Spirulina* (0, 33, 66 e 100%).

O delineamento experimental foi em esquema fatorial casualizado 2×4 com quatro repetições, e os peixes foram avaliados por 48 dias. Quatro dietas isoproteicas (28% de proteína bruta) foram formuladas com valores de energia bruta próximos a 4300 kcal kg⁻¹. Juvenis de tilápia do Nilo (0,23±0,01 g) foram distribuídos em 16 tanques circulares (70 L) com sete peixes/tanque. As dietas foram formuladas com níveis de proteína aproximadamente 20% abaixo do necessário para a espécie e estágio de vida. Não foi observada interação entre os fatores avaliados (sistemas de produção × inclusão de *Spirulina*). A criação dos peixes no sistema BFT evitou os efeitos adversos de dietas com níveis de proteína subótimos sobre o desempenho, histomorfometria intestinal e metabolismo de proteínas. Valores mais baixos, menor peroxidação lipídica e maior capacidade antioxidante foram observados em peixes criados no sistema BFT, mostrando evidências de melhorias nas respostas antioxidantes e menores níveis de estresse oxidativo fisiológico. A *espirulina* substituiu completamente a farinha de peixe na dieta de juvenis de tilápia-do-nilo, sem efeitos adversos na morfometria intestinal, no metabolismo proteico e na resposta antioxidante. A substituição de 66% da farinha de peixe por *espirulina* melhorou o desempenho produtivo, independentemente

F. Picoli · T. E. H. P. Fabregat (*)

UDESC – Universidade do Estado de Santa Catarina, Centro de Ciências Agroveterinárias (CAV), Lages, Santa Catarina, Brasil
e-mail: thiagofabregat@hotmail.com

F. Picoli · A. D. de Oliveira · S. O. Marques · D. C.

Terhorst · S. Serafini · L. Nora · D. L. A. Lopes · A. S. da Silva (*)

UDESC – Universidade do Estado de Santa Catarina, Centro de Ensino Superior (CEO) Oeste, Chapecó, Santa Catarina, Brasil
e-mail: aleksandro_ss@yahoo.com.br

F. F. Neves

UDESC – Universidade do Estado de Santa Catarina, Superior Sul Centro de Educação Infantil (CERES), Laguna, Santa Catarina, Brasil

M. G. C. Emerenciano

CSIRO Agricultura e Alimentos, Programa de Aquicultura, Centro de Pesquisa da Ilha Bribie, Ilha Bribie, Queensland, Austrália

Palavras-chave Nutrição animal · *Arthrospira platensis* · Sistema de bioflocos · Histomorfometria intestinal · *Espirulina*

Introdução

O setor mundial de aquicultura produziu 88 milhões de toneladas em 2020, a maioria das quais eram peixes (FAO 2022). Esse crescimento significativo da atividade é explicado pelo aumento da população mundial e do consumo per capita (Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura - FAO 2022). O crescimento do consumo de peixe está associado à crescente demanda por proteínas animais mais saudáveis (Henchion et al. 2017; Boer et al. 2020). Para atender a essa demanda, a piscicultura adota sistemas intensivos com maior demanda por ração processada (Subashinge 2013; Oddsson 2020).

Nesse contexto, a demanda por ração de qualidade e os altos custos dos alimentos criam gargalos para a expansão contínua da produção de peixes. Os ingredientes que constituem a fração proteica das dietas para peixes são caros e contribuem significativamente para os gastos totais (Barbosa et al. 2020). Além disso, dietas contendo níveis proteicos superiores às necessidades nutricionais e pellets com baixa estabilidade e alta solubilidade podem aumentar os compostos nitrogenados nos efluentes (Herath e Satoh 2015). Portanto, o uso de rações com menores níveis de proteína e a busca por ingredientes proteicos alternativos são estratégias para reduzir os custos com ração e aumentar a sustentabilidade da atividade.

A criação em um sistema de tecnologia de bioflocos (BFT) é uma alternativa para reduzir o teor de proteína em dietas e os custos de alimentação na produção intensiva de peixes (Avnimelech 2007; Azim e Little 2008). O sistema BFT é um sistema de produção intensivo fechado com baixa renovação de água. A qualidade da água é mantida com aeração intensiva e manejo de populações bacterianas heterotróficas e autotróficas (Monroy-Dosta et al. 2013). Uma fonte de carbono orgânico é adicionada à água para equilibrar a relação entre carbono e nitrogênio (Pérez-Fuentes et al. 2016; Silva et al. 2017). Dessa forma, compostos nitrogenados são reciclados e bioflocos, que servem como suplemento alimentar para peixes, são formados (Avnimelech 2007; Avnimelech e Kochba 2009; Ekasari 2014). A biomassa microbiana produzida neste sistema pode suprir até 50% da necessidade proteica dos peixes produzidos (Avnimelech 2007; Azim e Little 2008; Da Silva et al. 2018; Durigon et al. 2020). Menores taxas de conversão alimentar também podem ser alcançadas (Luo et al. 2014). Em geral, o foco dos experimentos de redução de proteína no sistema BFT é o desempenho (Azim e Little 2008; Luo et al. 2014; Durigon et al. 2020). Mais estudos ainda são necessários.

para entender melhor o metabolismo e a fisiologia de peixes que recebem níveis subótimos de proteína em um sistema BFT.

A farinha de peixe é um dos ingredientes proteicos mais utilizados na alimentação de peixes. Caracteriza-se por seu alto valor proteico, ácidos graxos poli-insaturados, frações minerais e vitamínicas consideráveis e propriedades antioxidantes (Masumoto et al. 1996; Pike 1999; Cho e Kim 2011). A exclusão da farinha de peixe das dietas pode diminuir os índices zootécnicos em peixes (Gomes et al.

1995; Glencross et al. 2011; Turchini et al. 2019). Além disso, seu alto custo e disponibilidade reduzida (Banco Mundial - Dados de Preços de Commodities do Banco Mundial (The Pink Sheet) 2020) impulsionaram a busca por alternativas proteicas mais baratas. A microalga *Spirulina*

(*Arthrospira platensis*) é uma fonte alternativa de proteína com potencial para substituir a farinha de peixe (Hussein et al. 2013; Raji et al. 2018, 2020; Erdogan 2019; Mansour et al. 2021). É considerada uma rica fonte de proteína altamente digerível e aminoácidos essenciais (Andrade et al. 2005) e contém várias substâncias (carboidratos fibrosos, vitaminas, minerais, pigmentos carotenoides e ácidos graxos poli-insaturados) com propriedades antioxidantes (Promya e Chitmanat 2011; Gutiérrez-Salmeán et al. 2015). Alguns estudos demonstram que a *Spirulina* também pode melhorar o desempenho zootécnico em comparação à farinha de peixe (Hussein et al. 2013; El-Sheekh et al. 2014; Velasquez et al.

2015; Roohani et al. 2019; Raji et al. 2020). Melhorias em parâmetros bioquímicos (Belal et al. 2012; Mansour et al. 2021), histológicos (Abu-Elala et al. 2016) e de estresse oxidativo (Cao et al. 2018; Salah El-Din et al. 2021) também foram relatadas.

A tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*) é uma espécie proeminente na piscicultura global (Prabu et al. 2019; Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura - FAO 2022). É uma espécie rústica que se adapta rapidamente ao cultivo intensivo. A criação de tilápia-do-nilo em um sistema BFT já foi relatada anteriormente com resultados positivos (Lima et al. 2018; Martins et al. 2020; Picoli et al. 2022). A tilápia-do-nilo ingere bioflocos, permitindo uma redução na demanda por proteína (Avnimelech 2007; Avnimelech e Kochba 2009; Ekasari 2014). A *espirulina* também foi avaliada na alimentação de tilápias-do-nilo com bons resultados (Belal et al. 2012; Hussein et al. 2013; Velasquez et al. 2015; Abdelkhalek et al. 2017). No entanto, seu uso em um sistema de alimentação desintoxicante (BFT) com níveis proteicos subótimos na dieta não foi avaliado. Portanto, o objetivo deste estudo foi:

determinar o efeito do sistema de cultivo e da substituição de farinha de peixe por biomassa de *Spirulina* (*A. platensis*) no desempenho, histomorfometria intestinal, bioquímica plasmática e estresse oxidativo em juvenis de tilápia do Nilo alimentados com níveis subótimos de proteína.

Materiais e métodos

Desenho experimental

O experimento foi conduzido no Laboratório de Aquicultura da Universidade Estadual de Santa Catarina, Campus Chapecó, Santa Catarina, Brasil, durante 48 dias. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Uso de Animais sob o protocolo número 6983180521. Dois fatores foram avaliados: os sistemas de produção (água limpa × BFT) e a substituição da farinha de peixe por biomassa de *Spirulina* (0, 33, 66 e 100%). O delineamento experimental foi em esquema fatorial casualizado 2 × 4 com quatro repetições, e os peixes foram avaliados por 48 dias (Tabela 1).

Biomassa de *Arthrospira platensis*

O cultivo de *Arthrospira platensis* foi realizado em tanques raceway dispostos dentro de uma estufa

em um sistema semicontínuo no Laboratório de Cultivo de Algas e Biotecnologia – LCBA UDESC, Laguna, Brasil, e o período de cultivo estendeu-se de março a junho. Após a inoculação da cultura, aguardou-se 15 dias para atingir a fase estacionária da curva de crescimento e, então, iniciou-se a colheita a cada três dias por semana (segunda-feira, quarta-feira e sexta-feira). Aproximadamente 400 L foram filtrados em cada colheita, correspondendo a cerca de 25% do volume total de cultivo, com produtividade de biomassa seca variando entre 0,7 e 1,3 g L⁻¹. O meio de cultura continha água doce e era composto por 10 g L⁻¹ de NaHCO₃, 1 g L⁻¹ de fertilizante solúvel comercial com relação nitrogênio:fosfato:potássio de 18:6:18 e alta quantidade de NaCl (30 g L⁻¹). O cultivo foi realizado em condições naturais de temperatura e iluminação (sem controle), e a biomassa de *Spirulina* foi coletada três vezes por semana por filtração com malha de 20 µm. A biomassa coletada foi imediatamente seca em estufa de laboratório a 50 °C por 24 h e, em seguida, moída em moinho de pulverização criogênico (MA775, Marconi) antes do uso nas dietas experimentais (Tabela 2).

Tabela 1 Composição das dietas experimentais (% kg⁻¹) com base na matéria seca

Composição analisada (AOAC 2000). Pré-mistura—ácido fólico – 2.400 mg; ácido nicotínico – 48 g; ácido pantotênico – 24 g; biotina – 96 mg; vit. A – 2.400.000 UI; vit. D3 – 400.000 UI; vit. E – 24.000 UI; vit. B1 – 9600 mg; vit. B2 – 9600 mg; vit. B6 – 9600 mg; vit. B12 – 9600 mg; vit. K3 – 4800 mg; vit. C – 96 g; ferro – 100 g; manganês – 40 g; zinco – 6000 mg; cobalto – 20 mg; iodo – 200 mg; selênio – 200 mg; antioxidante (etoxiquina) – 19,6 g

MS, matéria seca; MM, matéria mineral; EE, extrato etéreo; PB, proteína bruta; GE, energia bruta

Ingredientes	Porcentagem de substituição de farinha de peixe			
	0%	33%	66%	100%
Farinha de peixe	36,45	23,26	10,08	-
Biomassa de <i>espirulina</i>	-	26,25	52,50	72,57
Farelo de soja	10,00	10,00	10,00	10,00
Milho	41,59	27,86	14,02	3,43
Óleo de soja	10,73	9,00	7,29	5,98
Pré-mistura	0,40	0,40	0,40	0,40
Calcário	0,64	1,65	2,53	3,20
Fosfato bicalcico	-	1,15	2,53	3,58
Sal de mesa	0,06	0,30	0,53	0,72
Antioxidante	0,10	0,10	0,10	0,10
Total (%)	100	100	100	100
Composição analisada (%)				
Mestre	84,33	83,78	84,56	83,10
MILIMETROS	8,07	8,55	8,80	8,89
EE	10,32	7,09	6,67	6,74
PC	27,64	28,76	27,65	28,26
GE (kcal kg ⁻¹)	4596	4380	4395	4425

Tabela 2 Composição proximal da farinha de peixe e biomassa de *espirulina* utilizadas em dietas experimentais

Composição proximal	Farinha de peixe	<i>Espirulina</i> biomass
MS (%)	93,33	84,74
MM (%)	25,79	16,56
EE (%)	7,52	2,60
PC (%)	55,02	32,01

Composição analisada (AOAC 2000)

MS, matéria seca; MM, matéria mineral; EE, extrato etéreo; PB, proteína bruta

Dietas experimentais

As dietas experimentais foram isoproteicas (28% de proteína bruta [PB]). Os níveis de energia bruta das dietas seguiram valores próximos a 4300 GE kcal kg⁻¹, de acordo com Hafedh (1999). Elas foram formuladas usando o software Super-Crac® para atingir níveis de proteína aproximadamente 20% abaixo do necessário para a espécie e estágio de vida (35% PB [FAO 2017]). A composição proximal das dietas (Tabela 1) foi analisada de acordo com métodos descritos na Association of Official Analytical Chemists (Association of Official Analytical Chemists (AOAC) 2000). A matéria seca foi determinada por secagem à pressão atmosférica em estufa a 105 °C, até peso constante, de acordo com o método No.

920.151. O teor de matéria mineral foi determinado em mufla a 550 ± 5 °C até a completa incineração da matéria orgânica da amostra, conforme o método nº 940.26. O teor de lipídios foi obtido por extração em aparelho Soxhlet, utilizando solvente éter etílico por 8 h sob refluxo, conforme o método nº 920.39. O teor de proteínas foi determinado pelo método de micro Kjeldahl, utilizando um fator de conversão igual a 6,25. A energia bruta, por sua vez, foi realizada pelo método da bomba colorimétrica (Calorímetro – IKA®).

C200), segundo Silva e Queiroz (2009). Para tanto, a amostra foi colocada em um cilindro metálico pressurizado com O₂ (25 a 30 atm) e imersa em água destilada e, à medida que era oxidada (queimada), sua perda de energia em calor era medida.

Além desse ingrediente, as dietas formuladas continham peixe e farelo de soja como fontes de proteína e óleo de soja e milho como fontes de energia (Tabela 1). Todos os ingredientes foram moídos em processador industrial e peneirados em malha de 0,71 mm. Posteriormente, foram misturados com adição de água.

(50%), peletizadas nos tamanhos 0,1 (malha), 0,5 e 1 mm em misturador “spaghetti” (Malta®, Modelo 1036, bico nº 8) e colocadas em estufa (Cienlab®, Modelo CE-220/150) a 55 °C por 48 h. As dietas foram armazenadas em embalagens plásticas e mantidas em refrigeradores (4 °C) até o uso.

Animais e instalações

Juvenis de tilápia-do-nilo (linhagem GIFT) foram pesados individualmente (balança de precisão de 0,01 g, Marte modelo ML 600, São Paulo, Brasil) no início do período experimental, obtendo-se um peso médio de 0,23 ± 0,01 g. Esses animais foram adquiridos de piscicultura comercial e permaneceram em período de aclimação por 15 dias. Durante esse período, foram alimentados com dieta de manutenção (Supra® Tilapia 32% PB) na proporção de 10% de biomassa, dividida em três refeições (8h, 13h e 17h).

Os animais foram distribuídos em sete peixes por tanque, em tanques circulares de polietileno (volume útil de 70 L), divididos em dois sistemas independentes de recirculação de água (CW×BFT). Cada sistema era composto por 16 caixas circulares interligadas por caixas circulares. tanques (volume utilizável: 850 L) chamados “macrocosmos”. Os tanques foram aerados individualmente através de pedra porosa (1×2 cm) conectada a um compressor de ar radial. Cada macrocosmo continha uma bomba d’água periférica (Intech® modelo BP500), responsável pela distribuição e recirculação de água em seu respectivo sistema. Cada macrocosmo foi equipado com uma resistência de aquecimento (Nobre Brasil®, 3000 W) e conectado a um controlador digital de temperatura com sensor (XH-W3001®, 12 V, China), visando manter a temperatura adequada para a espécie (El-Sayed 2006). Uma biomassa de 2,25 kg m⁻³ de tilápia também foi mantida no macrocosmo BFT, alimentado com ração comercial (Supra® Tilapia 32% PB) uma vez ao dia (13h; 32% PB). O macrocosmo do sistema de água limpa (SLC) era composto por um sistema de filtragem combinado com um filtro mecânico (malha de Perlon de 60 μm) e material particulado biológico (0,2 m³ de análogo de biobolas de polietileno de baixa densidade e 0,05 m³ de argila expandida). Esses materiais serviram como substrato para as bactérias nitrificantes realizarem a nitrificação da água da cultura.

Os animais foram alimentados durante todo o período experimental com 10% da biomassa por dia (Workagegn et al. 2014), divididos em três alimentações (08:00,

13h00 e 17h00). O monitoramento da biomassa foi realizado a cada 16 dias utilizando biometria de todas as unidades experimentais.

No início do experimento, todos os tanques do sistema BFT receberam um inóculo de bioflocos previamente maturados (10 L) para evitar variações indesejadas na qualidade da água (Krummenauer et al. 2014; Martins et al. 2020). Posteriormente, água desclorada foi adicionada para completar o volume útil de 70 L. A mesma proporção (1:6) foi utilizada no macrocosmo.

Para a formação e manutenção da comunidade microbiana e as condições adequadas do meio de cultura, foi mantida uma relação C:N de 10–15:1 (Pérez-Fuentes et al. 2016). O melaço de cana-de-açúcar foi utilizado como fonte externa de carbono.

Os parâmetros de qualidade da água de ambos os sistemas de cultivo foram medidos diariamente, incluindo temperatura, oxigênio dissolvido (oxímetro ALFAKIT®, modelo AT170) e pH (pHmetro ALFAKIT®, modelo AT315). O nitrogênio amoniacal total (TAN) foi medido três vezes por semana em ambos os sistemas.

A TAN foi medida com um kit comercial (Spectro Indotest Ammonia Kit – Alfakit®), e o resultado foi obtido com um fotocolorímetro (ALFAKIT®, modelo AT100P). Três vezes por semana, os sólidos sedimentáveis totais (SST) também foram medidos no sistema BFT usando um cone Imhoff. De acordo com os resultados obtidos nessas medições (TAN>1 mg L⁻¹), o melaço foi ou não adicionado ao sistema BFT.

Análises semanais de nitrito, nitrato, ortofosfato e alcalinidade do meio de cultura foram realizadas utilizando um fotocolorímetro (ALFAKIT®, modelo AT100P). Os parâmetros permaneceram dentro da faixa recomendada para tilápia (El-Sayed 2006; Azim e Little 2008; Luo et al. 2014; Lima et al. 2015; 2018) (Tabela 3).

Desempenho zootécnico e índice hepatossomático

Após o período experimental, os animais permaneceram em jejum por 24 h e foram pesados individualmente (balança de precisão de 0,01 g, Marte modelo ML 600, São Paulo, Brasil) e mensurados para avaliação dos parâmetros zootécnicos: peso final; ganho de peso médio = peso final (g) – peso inicial (g); taxa de crescimento específico = peso final (g) – peso inicial (g) / período experimental x 100 (% dia⁻¹); conversão alimentar aparente = consumo de ração / ganho de peso; consumo de ração = ração consumida durante o período experimental.

Tabela 3 Parâmetros de qualidade da água (média ± desvio padrão) de tilápias juvenis do Nilo cultivadas em dois sistemas de cultivo (CW×BFT) após 48 dias de alimentação com biomassa de *Spirulina*

Parâmetros	Macrocosmo	
	CW	BFT
Tª (°C)	25,40±1,28	25,90±1,26
OD (mg L ⁻¹)	7,97±1,10	7,72±1,05
pH	7,53±0,59	7,36±0,30
N-NH3 (mg L ⁻¹)	0,24±0,64	0,60±0,67
NO2 ⁻ (mg L ⁻¹)	0,14±0,15	0,31±0,08
NO3 ⁻ (mg L ⁻¹)	1,82±0,09	1,32±0,14
ALK (mg L ⁻¹ CaCO3)	25,8±20,62	41,83±20,18
TRO (PO4)	0,64±0,03	3,41±1,67
TSS (mg L ⁻¹)	-	13,35±13,82

Tª, temperatura; °C, graus Celsius; pH, potencial hidrogeniônico; N-NH3, nitrogênio amoniacal; mg L⁻¹, miligrama por litro; NO2⁻, nitrito; NO3⁻, nitrato; ALK, alcalinidade; mg L⁻¹ CaCO3, miligrama por litro de carbonato de cálcio; ORT, ortofosfato; PO4, fosfato; TSS, sólidos sedimentáveis totais; CW, sistema de cultura em água limpa; BFT, sistema de cultura em bioflocos

período (g) e sobrevivência (S) = número de animais mortos/ Total de peixes x 100 (%). Posteriormente, 12 peixes por tratamento (3 animais por unidade experimental – replicação) foram sedados com eugenol (derivado de fenilpropeno – 0,5 ml por litro (L⁻¹) de água) e eutanasiados por secção medular para coleta do fígado para mensuração do índice hepatossomático (HSI = peso do fígado/peso total x 100) e do trato gastrointestinal para análises posteriores.

Histomorfometria intestinal e hepática

Coletamos frações do intestino proximal e do fígado para análise histomorfométrica. O processamento histológico das amostras foi realizado no Laboratório de Histologia da UDESC, Campus Lages (Santa Catarina, Brasil), de acordo com métodos de rotina para preparo de lâminas histológicas (Nunes e Cinsa, 2016). Os fragmentos intestinais e hepáticos foram colocados em recipientes plásticos estéreis com solução de formalina a 10%, identificados e fixados por 12 a 16 horas em álcool 70% até a avaliação das características morfo-histológicas. As frações foram seccionadas a 0,3 cm pela técnica de histologia, diafanização e inclusão em parafina histológica. O fracionamento em cortes de 3 μm foi realizado em micrótomo semiautomático (Mello et al., 2013). Cortes longitudinais

foram semi-serializados e corados com ácido periódico-Schiff (Tolosa et al. 2003).

As amostras foram observadas usando microscopia de luz (microscópio Bioval L-2000^a, São Paulo, Brasil). Usando uma câmera acoplada ao microscópio, as imagens intestinais (10×) e hepáticas (40×) foram digitalizadas usando o software "TCapture" (Brand Laborana®, São Paulo, Brasil). Após a conclusão das varreduras, dez vilosidades por animal foram selecionadas por critérios de integridade (Picoli et al. 2019), como segue: (i) VH – altura da vilosidade (ou seja, distância do ápice da vilosidade ao início da camada muscular); (ii) TVH – altura total da vilosidade (ou seja, altura do ápice da vilosidade ao final da serosa); (iii) VW – largura da vilosidade; (iv) VT – espessura do epitélio da vilosidade, de acordo com Mello et al. (2013). Todas as medições foram realizadas usando o software Image J (National Institute for Health, Bethesda, Maryland, Estados Unidos da América). Foi medida uma área de 100 hepatócitos por animal. A área média de hepatócitos (MAH) por tratamento foi estimada utilizando o mesmo software, de acordo com Picoli et al. (2019).

Análises bioquímicas e antioxidantes plasmáticas

Após a anestesia de 12 animais por tratamento, o sangue foi coletado por punção da veia caudal em seringas contendo 10% de EDTA (ácido etilenodiaminotetracético). Devido ao tamanho dos peixes no sistema CW, um "pool" de sangue dos animais foi analisado. O sangue coletado foi centrifugado por 10 min a 3500 rpm, e os sobrenadantes (plasma) foram armazenados em microtubos a -20 °C até a análise. As proteínas totais (PTNA) e a albumina (ALBU) foram avaliadas em um analisador bioquímico (Bio Plus® BIO-2000) utilizando kits comerciais (Gold Analisa®). Os níveis de globulina (GLOBU) foram calculados pela fórmula:

$$GLOBU = PTNA - ALBU$$

Amostras de fígado foram coletadas em criotubos e armazenadas em freezer a -20 °C até o processamento; 0,5 g da amostra de fígado foi triturada/homogeneizada (Tur-ratec®) com solução salina (0,9%) e centrifugada a 7000 rpm por 10 minutos. Os sobrenadantes foram armazenados em microtubos a -20 °C até a análise dos seguintes parâmetros: substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), glutathione S-transferase (GST) e proteína tiol (PSH). A peroxidação lipídica foi estimada nas amostras pela dosagem de malondialdeído (MDA).

Amostras de tecido foram incubadas a 95 °C por 60 min em meio ácido contendo 8,1% de dodecil sulfato de sódio, 0,5 ml de tampão de ácido acético (500 mM, pH 3,4) e 0,6% de TBA (Ohkawa et al., 1978). As absorbâncias foram medidas a 532 nm e comparadas com a curva padrão de malondialdeído. Os resultados foram expressos em nmol MDA/ml (Jentzsch et al., 1996).

A atividade da glutathione S-transferase foi medida cineticamente utilizando 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) como substrato. A mistura de reação continha tampão fosfato de potássio (PPB) 0,1 M, GSH (1 mM), CDNB (1 mM), EDTA 2,5 mM e água destilada. A absorbância foi determinada a 340 nm a 37 °C, e a atividade enzimática foi expressa em μ mol CDNB/min/mg de proteína (Habig et al., 1974).

Os tióis proteicos (PSH) foram medidos utilizando um método baseado no uso de DTNB (ácido 5,5-ditiobis-2-nitrobenzóico) (Ellman 1959; Sedlak e Lindsay 1968), medido após a desproteínização dos homogeneizados com ácido tricloroacético. O sedimento formado pela proteína precipitada foi ressuspenso com um tampão de homogeneização para determinar o teor de PSH. Os resultados foram expressos em nanomoles (μ mol). SH μ mol de tecido.

Análise estatística

A normalidade (Teste de Shapiro-Wilk) e a homogeneidade das variâncias (Teste de Bartlett) foram verificadas, e os dados foram submetidos à análise de variância para um esquema fatorial. Quando não significativos, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a um nível de 5% de probabilidade. Em relação à interação, a divisão fatorial e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey (5%). As análises foram realizadas utilizando o software de análise estatística R® 4 programa.

Resultados

Parâmetros zootécnicos e índices organossomáticos

Não foi observada interação ($P > 0,05$) entre os sistemas de cultivo e os níveis de substituição da farinha de peixe pela biomassa de *Spirulina* para as variáveis de desempenho da tilápia (Tabela 4). No sistema BFT, o desempenho dos peixes foi superior ao daqueles criados no sistema CW ($P < 0,05$; Tabela 5). A biomassa de *Spirulina* substituiu completamente a farinha de peixe sem comprometer a qualidade de vida.

Tabela 4 Análise de variância das variáveis de desempenho de juvenis de tilápia do Nilo criados em dois sistemas de cultivo (CW×BFT) após 48 dias de alimentação com biomassa de *Spirulina*

Variáveis	Valor P dos sistemas (S)	Interação (S×T)
	Farinha de peixe nível de substituição (T)	
FW (g)	<0,0010* 0,0029*	0,0853 NS
AWG (g)	<0,0001* 0,0029*	0,0851 NS
SGR (% dia ⁻¹)	<0,0001* 0,0028*	0,0849 NS
FC	0,0002* 0,0023*	0,0970 NS
Figo)	<0,0001* 0,8360 NS	0,5850 NS
S (%)	0,3640 NS 0,2590 NS	0,2590 NS
HSI (%)	0,1603 NS 0,5107 NS	0,4379 NS

S, sistemas (BFT e CW); T, tratamentos (0, 33, 66 e 100%) substituição de farinha de peixe por *Spirulina*; S×T, interação entre sistemas e tratamentos; FW, peso final; AWG, ganho de peso médio; SGR, taxa de crescimento específico; FC, conversão alimentar; FI, consumo alimentar; S, sobrevivência; HSI, índice hepatossomático; g, gramas; % dia⁻¹, % ganho de peso por dia; NS, não significativo

*P<0,05

desempenho (P>0,05). A substituição de 66% da farinha de peixe por biomassa de *espirulina* resultou em crescimento mais significativo e melhora na conversão alimentar do que o tratamento controle (0%; P<0,05; Figuras 1 e 2). Os tratamentos não afetaram a sobrevivência ou o índice hepatossomático (P>0,05).

Histomorfometria hepato-intestinal

Não foi observada interação entre os fatores na histomorfometria hepato-intestinal da tilápia (P>0,05; Tabela 6). No sistema BFT, o total

A altura das vilosidades (AVT) foi maior (P<0,05) do que no sistema CW (Fig. 3). Os tratamentos não afetaram os demais parâmetros histomorfométricos avaliados (P>0,05; Tabela 7).

Bioquímica plasmática e estresse oxidativo

Para os parâmetros bioquímicos e de estresse oxidativo, não foram observadas interações (P>0,05) entre os sistemas de cultivo e os níveis de substituição de farinha de peixe por biomassa de *Spirulina* (Tabela 8). No sistema BFT, ALBU e GLOBU foram maiores (P<0,05) do que CW (Tabela 9). Valores menores para substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) foram observados no sistema BFT em comparação ao sistema AC (Fig. 4). O oposto foi observado para a enzima GST (Fig. 5).

Os níveis de proteína plasmática total (PTNA) e tiol proteico (PSH) não foram afetados pelos tratamentos e sistemas (P>0,05) (Tabela 9).

Discussão

Parâmetros zootécnicos e índices organossomáticos

O fornecimento de níveis proteicos abaixo do ideal reduziu o crescimento dos peixes criados no sistema CW. A taxa de crescimento específica para juvenis foi muito menor (0,45% dia⁻¹) do que a observada em outros estudos (5,01% dia⁻¹, 1,9% dia⁻¹, 1,31% dia⁻¹ e 4,42% dia⁻¹) (Gullian-Klanian e Arámburu-Adame 2013, Luo et al. 2014, Tanjung et al. 2019 e Akter et al. 2021). Essa descoberta confirma que o fornecimento proteico nas dietas estava abaixo das necessidades. Em contraste, o crescimento

Tabela 5 Valores médios (±desvio padrão; n=12) dos parâmetros zootécnicos de juvenis de tilápia do Nilo criados em dois sistemas de cultivo (CW×BFT) após 48 dias de alimentação com biomassa de *Spirulina*

Variáveis CW	BFT	0%	33%	66%	100%
FW	4,50±1,58 B 16,50±0,56 A	9,65±5,99 b	10,03±6,20 b	11,43±6,50 a	10,89±7,17 ab
SGR	0,45±0,05 B 1,65±0,15 A	0,96±0,60 b	1,00±0,62 b	1,14±0,65 a	1,08±0,71 ab
FI	4,91±0,47 B 15,75±1,60 A 10,56±6,03		10,30±5,77	10,44±6,33	10,01±5,49
S	93,84±0,17 96,93±0,13	90,75±0,20	100,0±0,00	96,93±0,13	93,84±0,18
HSI	1,94±0,66 1,62±0,23	1,75±0,24	1,80±0,78	1,77±0,69	1,80±0,11

CW, sistema de cultura em água limpa; BFT, sistema de cultura em bioflocos; T, tratamentos (0, 33, 66 e 100%) substituição de farinha de peixe por biomassa de *Spirulina* (*Arthrospira platensis*); FW, peso final (g); SGR, taxa de crescimento específico (% dia⁻¹); FI, consumo de ração (g); S, sobrevivência (%); HSI, índice hepatossomático (%); g, gramas; % dia⁻¹, % ganho de peso por dia

Médias seguidas por letras maiúsculas diferentes nas colunas diferem entre si pelo teste de Tukey (P<0,05). Médias seguidas por letras minúsculas diferentes nas colunas diferem entre si pelo teste de Tukey (P<0,05).

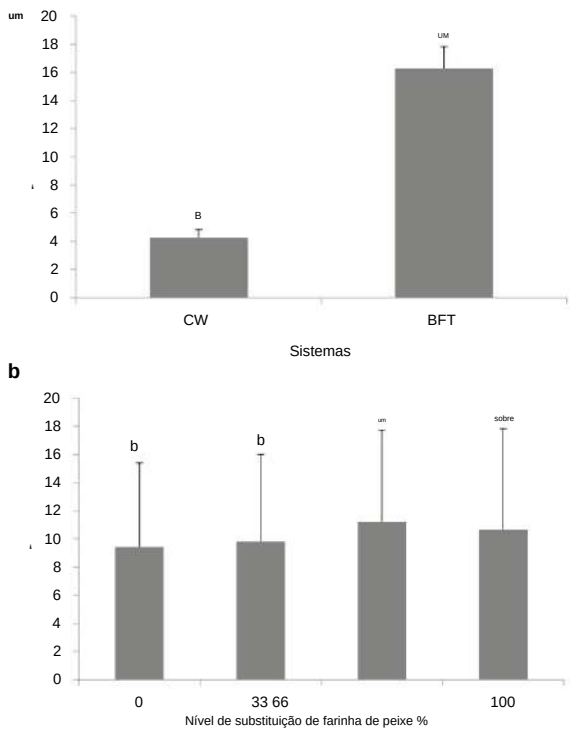


Fig. 1 Ganho de peso médio (média $\pm$ desvio padrão) de juvenis de tilápia-do-nilo criados em dois sistemas de cultivo **a** com diferentes níveis de substituição de farinha de peixe por biomassa de *Spirulina* **b** após 48 dias de alimentação. Médias acompanhadas por letras distintas diferem pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). CW = sistema de cultivo em água limpa; BFT = sistema de cultivo em bioflocos.

O desempenho não foi prejudicado para os peixes criados no sistema BFT. Este resultado confirma que dietas com níveis reduzidos de proteína no sistema BFT não afetaram o desempenho produtivo da tilápia do Nilo (Azim e Little 2008; Luo et al. 2014; Durigon et al. 2020).

A tilápia-do-nilo pode suplementar a dieta ingerindo bioflocos ricos em nutrientes, evitando possíveis problemas de deficiência nutricional (Tacon et al., 2002; Hargreaves, 2006; Azim e Little, 2008; Crab et al., 2012). Cabe ressaltar que os peixes utilizados no experimento eram pequenos ($0,23 \pm 0,01$ g) em comparação aos utilizados em estudos anteriores, demonstrando que a redução de proteína no sistema BFT pode ser aplicada à tilápia-do-nilo nos estágios iniciais de desenvolvimento.

Os resultados de desempenho sugerem que é possível substituir completamente a farinha de peixe por biomassa de *espirulina* em dietas para juvenis de tilápia-do-nilo. Estudos anteriores demonstraram a viabilidade da substituição da farinha de peixe por biomassa de *espirulina* para tilápias e outras espécies.

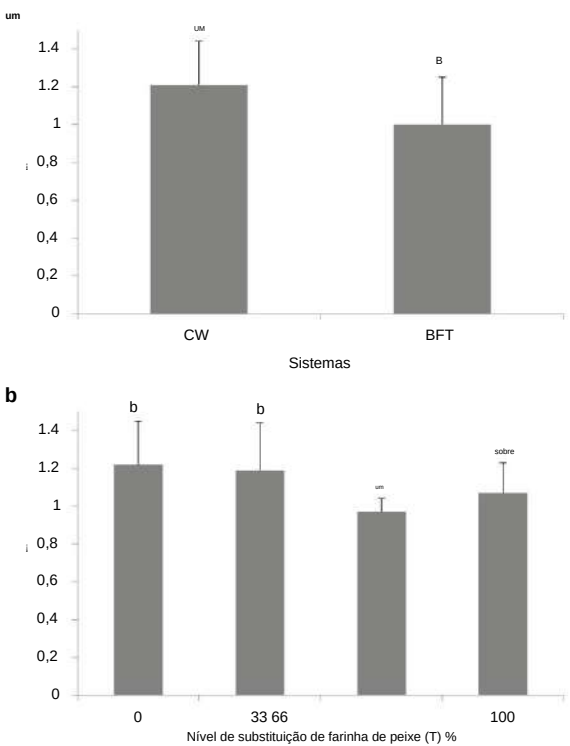


Fig. 2 Conversão alimentar (média $\pm$ desvio padrão) de juvenis de tilápia-do-nilo criados em dois sistemas de cultivo **a** com diferentes níveis de substituição de farinha de peixe por biomassa de *espirulina* **b** após 48 dias de alimentação. Médias acompanhadas por letras distintas diferem pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). CW = sistema de cultivo em água limpa; BFT = sistema de cultivo em bioflocos.

Tabela 6 Análise de variância da histomorfometria hepato-intestinal de juvenis de tilápia do Nilo cultivados em dois sistemas de cultivo (CW×BFT) após 48 dias de alimentação com *Spirulina* bio-massa

Valor de P			
Variáveis	Sistemas (S)	Nível de substituição de farinha de peixe (T)	Interação
TVH (μm)	0,048*	0,871 NS	0,623 NS
VH (μm)	0,105 NS	0,728 NS	0,549 NS
VW (μm)	0,219 NS	0,950 NS	0,630 NS
VT (μm)	0,217 NS	0,868 NS	0,614 NS
MAH (μm ²)	0,700 NS	0,211 NS	0,667 NS

S, sistemas (BFT e CW); T, tratamentos (0, 33, 66 e 100%) substituição de farinha de peixe por biomassa de *Spirulina* ; S×T, interação entre sistemas e tratamentos; TVH, altura total das vilosidades; VH, altura das vilosidades; VW, largura das vilosidades; VT, espessura do epitélio das vilosidades; MHA, área média dos hepatócitos; NS, não significativo

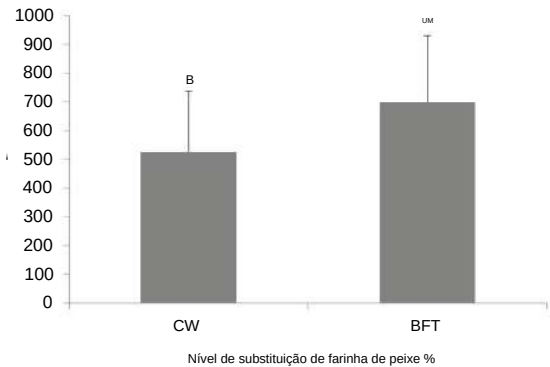


Fig. 3 Altura total das vilosidades (média±desvio padrão) de juvenis de tilápia do Nilo criados em dois sistemas de cultivo (CW×BFT) com diferentes níveis de substituição de farinha de peixe por *Spirulina* biomassa após 48 dias de alimentação. Médias acompanhadas por letras distintas diferem pelo teste de Tukey (P<0,05). CW = sistema de cultivo em água limpa; BFT = sistema de cultivo em bioflocos

(Nandeesh et al. 1998; 2001; El-Sheekh et al. 2014; Velasquez et al. 2015; Cao et al. 2018; Raji et al. 2020), mas este é o primeiro trabalho onde a substituição foi avaliada em diferentes sistemas de produção. O teor proteico, o perfil de aminoácidos e os teores de ácidos graxos poli-insaturados desta microalga são excelentes (Albuquerque 2014; Zhang et al. 2020; Rutar et al. 2022), o que pode explicar os resultados positivos. No presente estudo, a substituição da farinha de peixe por *espirulina* A biomassa não afetou o consumo. Geralmente, dietas sem proteínas de origem animal reduzem o consumo de ração pela tilápia (Fontaínhas-Fernandes et al. 1999; Zhou e Yue 2010; Hernández et al. 2013). A *espirulina* possui propriedades de atração e palatabilidade (Jaime-Ceballos et al. 2005; 2007; Silva-Neto et al. 2011; Ali 2014), e sua inclusão já foi demonstrada.

Tabela 7 Valores médios (±desvio padrão; n=12) da histomorfometria hepato-intestinal de juvenis de tilápia do Nilo cultivados em dois sistemas de cultivo (CW×BFT) após 48 dias de alimentação com biomassa de *Spirulina*

Variáveis CW	BFT	0%	33%	66%	100%	
VH (μm)	454,79±208,32	592,35±220,98	459,25±171,29	515,92±217,42	542,45±239,84	584,67±272,83
VW (μm)	158,07±55,39	184,17±53,72	172,67±59,32	161,73±46,91	171,38±65,20	178,70±58,30
VET (μm)	77,77±30,62	95,43±42,57	95,41±58,69	79,83±24,17	82,92±32,79	88,23±31,40
MAH (μm2)	502,51±36,50	515,08±91,79	470,34±33,85	492,81±35,69	529,81±88,27	536,22±86,40

CW, sistema de cultura em água limpa; BFT, sistema de cultura de bioflocos; S, sistemas (AC×BFT); T, tratamentos (0, 33, 66 e 100%) substituição de farinha de peixe por biomassa de *Spirulina*; VH, altura das vilosidades; VW, largura das vilosidades; VET, espessura do epitélio das vilosidades; MHA, área média dos hepatócitos; NS, não significativo

*P<0,05

Médias seguidas por letras maiúsculas diferentes nas colunas diferem pelo teste de Tukey (P<0,05)

Tabela 8 Análise de variância de parâmetros bioquímicos e estresse oxidativo de juvenis de tilápia do Nilo cultivados em dois sistemas de cultivo (CW×BFT) após 48 dias de alimentação com biomassa de *Spirulina*

Valor de P			
Variáveis	Sistemas (S)	Nível de substituição de farinha de peixe (T)	Interação (S×T)
PTN (g dL ⁻¹)	0,189 NS	0,870 NS	0,150 NS
ALBU (g dL ⁻¹)	<0,000***	0,826 NS	0,987 NS
GLOBU (g dL ⁻¹)	0,0475**	0,067 NS	0,129 NS
TBARS	<0,0001	0,987 NS	0,830 NS
GST	<0,0001	0,983 NS	0,600 NS
PSH	0,326 NS	0,676 NS	0,247 NS

S, sistemas (BFT e CW); T, tratamentos (0, 33, 66 e 100%) de substituição da farinha de peixe por biomassa de *Spirulina*; S×T, interação entre sistemas e tratamentos; PTN, proteínas totais; ALBU, albumina; GLOBU, Globulinas; g/dL, grama por decilitro; TBARS, substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (nmol MDA/mL); GST, glutatona S-transferase (μmolCDNB/min/mg proteína); PSH, tióis proteicos (μmol SH/mg proteína); NS, não significativo

*P<0,05

Tabela 9 Valores médios (média±desvio padrão; n=12) dos parâmetros bioquímicos e estresse oxidativo de juvenis de tilápia do Nilo cultivados em dois sistemas de cultivo (CW×BFT) após 48 dias de alimentação com biomassa de *Spirulina*

Variáveis	CW	BFT	0%	33%	66%	100%
PTN	3,53±0,57	4,37±1,33	4,31±0,78	3,86±0,97	3,60±0,42	4,07±1,35
ALBU	0,88±0,25 B	1,42±0,47 A	1,27±0,50	1,13±0,59	1,09±0,39	1,12±0,40
GLOBO	2,65±0,44 B	2,95±0,47 A	3,04±0,28	2,73±0,48	2,51±0,46	2,95±0,52
PSH	1,33±0,18	1,40±0,21	1,36±0,18	1,42±0,22	1,30±0,18	1,38±0,24

S, sistemas (BFT e CW); T, tratamentos (0, 33, 66 e 100%) substituição de farinha de peixe por biomassa de *Spirulina* ; S×T, interação entre sistemas e tratamentos; PTN, proteínas totais (g dL⁻¹); ALBU, albumina (g dL⁻¹); GLOBO, globulinas (g dL⁻¹); g/dL, grama por decilitro; PSH, tois de proteína (μmol SH/mg proteína)

Sistemas: Médias seguidas por letras maiúsculas diferentes nas colunas diferem entre si pelo teste de Tukey (P<0,05)

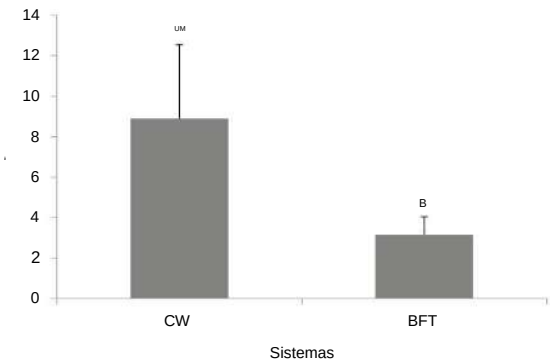


Fig. 4 Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (média ± desvio padrão) de juvenis de tilápia-do-nilo criados em dois sistemas de cultivo (CW × BFT) com diferentes níveis de substituição de farinha de peixe por biomassa de *espirulina* após 48 dias de alimentação. Médias acompanhadas por letras distintas diferem pelo teste de Tukey (P < 0,05). CW = sistema de cultivo em água limpa; BFT = sistema de cultivo em bioflocos.

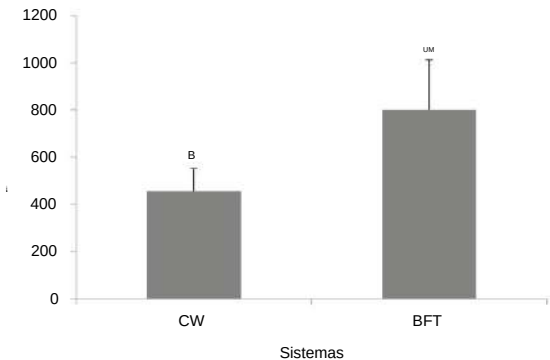


Fig. 5 Glutathione S-transferase (GST) (média ± desvio padrão) de juvenis de tilápia-do-Nilo cultivados em dois sistemas de cultivo (CW × BFT) com diferentes níveis de substituição de farinha de peixe por biomassa de *espirulina* após 48 dias de alimentação. Médias acompanhadas por letras distintas diferem pelo teste de Tukey (P < 0,05). CW = sistema de cultura em água limpa; BFT = sistema de cultura em bioflocos

em substituição à farinha de peixe pode afetar positivamente a ingestão de alimentos (Abdel-Tawwab e Ahmad 2009).

O nível de 66% de substituição de farinha de peixe pela biomassa de *Spirulina* (inclusão de 52,50%) melhorou o crescimento e a eficiência alimentar em comparação à dieta de farinha de peixe. A biomassa de *espirulina* pode ser um promotor de crescimento em dietas de peixes (Abdel-Tawwab e Ahmad 2009; Elsayed et al. 2012; Hernández et al. 2012; Jana et al. 2014).

Estudos anteriores demonstraram que a suplementação com biomassa de *Spirulina* nas dietas melhorou o crescimento e a conversão alimentar da tilápia do Nilo e seus híbridos (*Oreochromis niloticus* × *Oreochromis mos-sambicus*) (Elsayed et al. 2012; El-Sheekh et al. 2014; El-Ward et al. 2016). Foi impossível relacionar o nível de inclusão com os resultados obtidos. Os efeitos estão possivelmente ligados à composição da *Spirulina*. A *Spirulina* é rica em várias substâncias com propriedades bioativas, incluindo carboidratos fibrosos, vitaminas, minerais, pigmentos carotenoides e ácidos graxos poli-insaturados (Promya e Chitmanat 2011; Gutiérrez-Salmeán et al. 2015). No presente estudo, a caracterização desses compostos na *Spirulina* não foi realizada. Mais estudos ainda são necessários para explicar como um ou mais desses compostos podem impactar positivamente o desempenho.

Histomorfometria hepato-intestinal

Os animais cultivados no sistema BFT apresentaram vilosidades maiores do que aqueles no sistema CW. O sistema BFT pode melhorar a saúde intestinal (Ahmad et al. 2017; Pilotto et al. 2018; Deng et al. 2022). A rica comunidade microbiana presente nos bioflocos compete diretamente com microrganismos patogênicos no ambiente e pode mitigar possíveis problemas de saúde (Monroy-Dosta et al. 2013; Ferreira et al. 2015). Além disso,

microrganismos benéficos podem colonizar o trato digestivo e fornecer um possível efeito probiótico, o que pode ajudar a explicar a melhora na altura das vilosidades (Aguilera-Rivera et al. 2014; Pilotto et al. 2018).

Estudos sobre a microbiologia do trato digestivo de peixes cultivados em um sistema BFT demonstraram a multiplicação de bactérias benéficas e a colonização do trato digestivo (Pilotto et al. 2018; Deng et al. 2022). Além dos benefícios do sistema BFT, deve-se mencionar que no sistema CW, houve déficit de nutrientes, o que pode ter afetado a integridade do epitélio intestinal dos animais (Dawood 2020; Zarkasi et al. 2016; Zhu et al. 2020).

A substituição da farinha de peixe por biomassa de *espirulina* não comprometeu a histomorfometria intestinal da tilápia-do-Nilo. Este resultado corrobora os resultados de desempenho e reforça a viabilidade da *espirulina* como substituta da farinha de peixe em dietas para tilápias.

Outros autores demonstraram a viabilidade da substituição em relação à morfometria intestinal e observaram vilosidades intestinais maiores em tilápias do Nilo suplementadas com *Spirulina* na dieta (Abu-Elala et al.

2016). No presente estudo, a ausência de efeitos positivos da *espirulina* nas vilosidades pode estar relacionada aos níveis subótimos de proteína utilizados. A deficiência de nutrientes pode afetar a histomorfometria intestinal (Dawood 2020; Zarkasi et al. 2016; Zhu et al. 2020), mascarando os benefícios da suplementação. Por outro lado, esse resultado também foi observado no sistema BFT, onde os bioflocos forneceram um suprimento extra de nutrientes.

Mais estudos são necessários para confirmar esses resultados.

Bioquímica plasmática

Albumina e globulina no plasma foram menores em peixes cultivados no sistema CW em comparação ao sistema BFT. Os níveis de albumina e globulinas também foram superiores ($0,88 \pm 0,25$ g dL⁻¹ e $2,65 \pm 0,44$ g dL⁻¹, respectivamente) aos normalmente observados para tilápia ($1,20$ g dL⁻¹ e $4,0$ g dL⁻¹, respectivamente; Pereira et al. 2016). Albumina e globulinas são proteínas plasmáticas diretamente ligadas ao metabolismo proteico. Além disso, são marcadores essenciais do estado nutricional dos animais (Sampaio et al. 2012).

O fornecimento de níveis proteicos subótimos explica a diminuição desses marcadores e confirma os resultados

obtidos no desempenho produtivo. Da mesma forma, os maiores valores de albumina e globulina obtidos no sistema BFT confirmam que os bioflocos serviram como

um fornecimento complementar de nutrientes e manutenção do estado nutricional.

A substituição da farinha de peixe por *espirulina* não afetou os níveis plasmáticos de albumina e globulina na tilápia-do-Nilo. Em todos os tratamentos, os valores foram semelhantes ($1,15 \pm 0,47$ g dL⁻¹ e $2,80 \pm 0,43$ g dL⁻¹, respectivamente) aos já observados para a tilápia ($1,20 \pm 0,60$ g dL⁻¹ e $2,67 \pm 0,33$ g dL⁻¹ – Pereira et al. 2016 e Tanekhy et al. 2016, respectivamente).

Estudos anteriores mostraram os efeitos benéficos da *Spirulina* nos parâmetros bioquímicos da tilápia do Nilo (Belal et al. 2012; Abdelkhalek et al. 2017; Abdel-Daim et al. 2020; Mansour et al. 2021; Soliman et al. 2021).

No entanto, como relatado anteriormente, o fornecimento de níveis proteicos abaixo do ideal pode ter alterado alguns desses biomarcadores, como proteína total e albumina (Ayat et al. 2011), e impedido a detecção dos efeitos da fonte proteica. Estudos adicionais utilizando *Spirulina* em dietas convencionais são necessárias para confirmar os possíveis efeitos da fonte de proteína nos marcadores do metabolismo de proteínas em tilápias cultivadas em um sistema BFT.

Estresse oxidativo

Valores mais baixos de peroxidação lipídica e valores mais altos de GST foram observados no sistema BFT em comparação ao sistema CW. Esses resultados indicam menos danos celulares e melhor capacidade antioxidante (Bacou et al., 2021). O sistema BFT evitou os efeitos adversos do estresse oxidativo fisiológico e melhorou as respostas antioxidantes dos animais. Esses resultados podem ser explicados por compostos bioativos (ácidos graxos essenciais, carotenoides, aminoácidos livres e clorofilas, entre outros), minerais e vitaminas em agregados microbianos (Tacon et al., 2002; Ju et al., 2008; Crab et al., 2012). Colaborando com essa hipótese, no sistema CW, a menor eficiência no mecanismo de defesa antioxidante foi insuficiente.

para prevenir o aumento da peroxidação lipídica. Avaliações adicionais da composição dos bioflocos são necessárias para correlacionar a presença de compostos bioativos com a resposta antioxidante dos animais.

A substituição da farinha de peixe por *espirulina* não alterou os níveis de peroxidação lipídica nem a capacidade antioxidante de juvenis de tilápia-do-Nilo. Vários autores observaram um aumento na resposta antioxidante da tilápia-do-Nilo suplementada com biomassa de *espirulina* (Abdelkhalek et al., 2017; Awed et al., 2020; Elabd et al., 2020; Abdel-Daim et al., 2020; Salah El-Din et al., 2021;

Soliman et al. 2021). No presente estudo, a falta de resultados positivos pode ser explicada pela composição nutricional e propriedades funcionais da farinha de peixe e da biomassa de *Spirulina* (Henrikson 1994; Masumoto et al. 1996; Wang et al. 2007; Kumar e Sibi 2020).

A farinha de peixe marinho é rica em ácidos graxos poliinsaturados, vitaminas e minerais com propriedades antioxidantes (Pike 1999; Cho e Kim 2011; Daniel 2017). Da mesma forma, a espirulina possui ficocianina e ácido gálico, o que pode explicar os resultados de resposta antioxidante semelhantes entre esses ingredientes (Albuquerque 2014; Zhang et al. 2020; Rutar et al. 2022).

Além disso, ambos os ingredientes apresentam boa atratividade-palatabilidade e biodisponibilidade, facilitando a ingestão e o aproveitamento das dietas pelas tilápias, o que pode ter contribuído para a manutenção de valores semelhantes dos parâmetros oxidativos em ambos os sistemas de cultivo (Jaime-Ceballos et al. 2005, 2007; Silva-Neto et al. 2011; Ali 2014; Daniel 2017; Rutar et al. 2022). Mais estudos são necessários para confirmar esses resultados.

Conclusão

Um sistema baseado em bioflocos no estudo evitou os efeitos adversos de dietas com níveis proteicos abaixo do ideal sobre o desempenho zootécnico, a histomorfometria intestinal e o metabolismo proteico de juvenis de tilápia-do-Nilo. Valores mais baixos de peroxidação lipídica e maior capacidade antioxidante foram observados em peixes criados no sistema BFT, demonstrando evidências de melhorias nas respostas antioxidantes e menores níveis de estresse oxidativo fisiológico. A biomassa de *espirulina* pode substituir completamente a farinha de peixe nas dietas de juvenis de tilápia-do-Nilo sem efeitos adversos sobre a morfometria intestinal, o metabolismo proteico e a resposta antioxidante. Substituindo 66% da farinha de peixe por *espirulina* biomassa (52,50% de inclusão) melhorou o desempenho dos peixes, independentemente dos sistemas CW ou bioflocos.

Agradecimentos Agradecemos aos integrantes dos laboratórios da UDESC de Chapecó (GT-AQUA) e Lages (LAPIS) e demais parcerias.

Contribuição dos autores Fernanda Picoli: concebeu e projetou a análise, coletou os dados, contribuiu com os dados dos instrumentos de análise, realizou a análise e escreveu o artigo; Alana D. de Oliveira, Suelyn O. Marques e Deise C. Ter-horst: coletaram os dados; Suélen Serafini e Luísa Nora: contribuíram para a escrita do artigo; Aleksandro S. da Silva, Fabio F. Neves e Maurício GC Emerenciano: conceberam

e projetou a análise e contribuiu com dados de ferramentas de análise; Diogo Luiz de Alcantara Lopes e Thiago El Hadi Perez Fabregat: conceberam e projetaram a análise, coletaram os dados, contribuíram com dados de ferramentas de análise, realizaram a análise e escreveram o artigo.

Financiamento O Programa de Bolsas Universitárias de Santa Catarina (UNIEDU/FUMDES) financiou este trabalho.

Disponibilidade de dados Mediante solicitação ao autor correspondente, os dados que dão suporte a este trabalho estão disponíveis.

Declarações

Aprovação ética Os autores observaram as políticas éticas contidas nas diretrizes para autores do periódico e confirmaram a aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA – UDESC) (número de protocolo CEUA 6983180521).

Conflitos de interesse Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

Referências

- Abdel-Daim MM, Dawood MAO, Elbadawy M, Aleya L, Alkahtani S (2020) *Spirulina platensis* reduziu o dano oxidativo induzido pela toxicidade do clorpirifós em tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). Animais 10:473. <https://doi.org/10.3390/ani10030473>
- Abdelkhalek NKM, Eissa IAM, Ahmed E, Kilany OE, El-Adl M, Dawood MAO, Hassan AM, Abdel-Daim MM (2017) Papel protetor da *Spirulina platensis* na dieta contra danos oxidativos induzidos por diazinon em tilápias do Nilo, *Oreochromis niloticus*. Environ Toxicol Pharmacol 54:99–104. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2017.07.002>
- Abdel-Tawwab M, Ahmad MH (2009) *Spirulina* viva (*Arthrospira platensis*) como promotora de crescimento e imunidade para tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus* (L.), desafiada com *Aeromonas hydrophila* patogênica. Aquac Res 40(9):1037–1046. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2009.02195.x>
- Abu-Elala NM, Galal MK, Abd-El salam RM, Mohey-Elsaeed O, Ragaa NM (2016) Efeitos da suplementação dietética de *Spirulina platensis* e alho no desempenho de crescimento e nos níveis de expressão de genes relacionados ao sistema imunológico em tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). J Aquac Res Dev 7:7. <https://doi.org/10.4172/2155-9546.1000433>
- Aguilera-Rivera D, Prieto-Davó A, Escalante K, Chávez C, Cuzon G, Gaxiola G (2014) Efeito probiótico do FLOC sobre *Vibrios* no camarão branco do Pacífico *Litopenaeus van-namei*. Aquaculture 424–425:215–219. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.01.008>
- Ahmad I, Rani AMB, Verma AK, Maqsood M (2017) Tecnologia de bioflocos: uma nova via em saúde e nutrição de animais aquáticos. Aquac Int 25:1215–1226. <https://doi.org/10.1007/s10499-016-0108-8>

- Akter T, Hossain A, Islam MR, Hossain MA, Das M, Rah-man MM, Aye AT, Abdel-Tawwab M (2021) Efeitos da *espirulina* (*Arthrospira platensis*) como substituto da farinha de peixe em dietas práticas sobre o desempenho de crescimento, composição centesimal e perfil de aminoácidos do bagre pabda (*Ompok pabda*). J Appl Aquac 1–14. <https://doi.org/10.1080/10454438.2021.1936740>
- Albuquerque LFG (2014) Parâmetros hematológicos e bromatológicos na alevinagem de tilápias-do-Nilo, alimentados com ração suplementada com *Spirulina* (*Arthrospira platensis*). Universidade Federal do Ceará, Dissertação
- Ali S (2014) Avaliação dos efeitos de atrativos alimentares (*Spirulina* e ekangi) no desempenho de crescimento, utilização de ração e composição corporal de alevinos de peixe-gato, *Heteropneustes fossilis* (Bloch, 1792). Dissertação, Universidade de Dhaka
- Andrade RL, Barrera TC, Mejía JC, Mejía GC, Sánchez AM, Castillo VG (2005) A importância da *Spirulina* na alimentação aquícola. ContatoS 57:13–16
- Associação de Químicos Analíticos Oficiais (AOAC) (2000) Métodos oficiais de análise da Associação dos Químicos Analíticos da Virgínia
- Avnimelech Y (2007) Alimentação com flocos microbianos por tilápias em tanques com tecnologia de bioflocos de descarga mínima. Aquaculture 264(1–4):140–147. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.11.025>
- Avnimelech Y, Kochba M (2009) Avaliação da absorção e excreção de nitrogênio por tilápia em tanques de bioflocos, utilizando rastreamento de nitrogênio. Aquaculture 287(1–2):163–168. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.10.009>
- Awed EM, Sadek KM, Soliman MK, Khalil RH, Younis EM, Abdel-Warith A-WA, Doan HV, Dawood MAO, Abdel-Latif HMR (2020) A *Spirulina platensis* aliviou o dano oxidativo nas brânquias, fígado e rins da tilápia do Nilo intoxicada com sulfato de sódio. Animais 10(12):2423. <https://doi.org/10.3390/ani10122423>
- Ayat MS, El-Marakby HI, Sharaf SM (2011) Efeito do nível de proteína na dieta, densidade populacional e taxa de suplementação de ácido pantotênico na dieta sobre o desempenho e os componentes sanguíneos da tilápia do Nilo *Oreochromis niloticus*. J Appl Aquac 23(2):122–135. <https://doi.org/10.1080/10454438.2011.581572>
- Azim ME, Little DC (2008) Tecnologia de bioflocos (BFT) em tanques internos: qualidade da água, composição dos bioflocos e crescimento e bem-estar da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). Aquaculture 283(1–4):29–35. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.06.036>
- Bacou E, Walk C, Rider S, Litta G, Perez-Calvo E (2021) Estresse oxidativo dietético: uma revisão dos desafios nutricionais como modelos para aves, suínos e peixes. Antioxidantes 10(4):525. <https://doi.org/10.3390/antiox10040525>
- Barbosa AS, Pereira RG, Rodrigues LA, Casaca JM, Valenti WC, Fabregat TEHP (2020) Análise econômica da triticultura familiar no Sul do Brasil. Aquac Int 28:2111–2120. <https://doi.org/10.1007/s10499-020-00580-7>
- Belal EB, Khalafalla MME, El-Hais AMA (2012) Uso de *espirulina* (*Arthrospira fusiformis*) para promover o crescimento de alevinos de tilápia do Nilo. Afr J Microbiol Res 6(35):6423–6431. <https://doi.org/10.5897/AJMR12.288>
- Boer J, Schöslers H, Aiking H (2020) Peixe como proteína alternativa: uma perspectiva orientada ao consumidor sobre seu papel em um transição para dietas mais saudáveis e sustentáveis. Appetite 152:104721. <https://doi.org/10.1016/j.appet.2020.104721>
- Cao SP, Zou T, Zhang PY, Han D, Jin JY, Liu HK, Yang YX, Zhu XM, Xie SQ (2018) Efeitos da substituição dietética de farinha de peixe por *Spirulina platensis* no crescimento, utilização de alimentos, digestão e parâmetros fisiológicos em carpa gibel juvenil (*Carassius auratus gibelio* var. CAS III). Aquac Res 49(3):1320–1328. <https://doi.org/10.1111/are.13590>
- Cho JH, Kim IH (2011) Farinha de peixe – valor nutritivo. J Anim Physiol Anim Nutr 95(6):685–692. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0396.2010.01109.x>
- Crab R, Defoirdt T, Bossier P, Verstraete W (2012) Tecnologia de bioflocos na aquicultura: efeitos benéficos e desafios futuros. Aquaculture 356–357:351–356. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.04.046>
- Da Silva MA, Alvarenga ER, Alves GFO, Manduca LG, Turra EM, Brito TS, Sales SCM, Silva Junior AF, Borges WJM, Teixeira EA (2018) Níveis de proteína bruta em dietas para dois estádios de crescimento de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) em sistema de bioflocos. Aquac Res 49(8):2693–2703. <https://doi.org/10.1111/are.13730>
- Daniel N (2017) Situação da aquicultura em relação à nutrição e alimentação. Int J Fish Aquat Stud 5(1):333–345
- Dawood MAO (2020) Imunidade nutricional dos intestinos de peixes: insights importantes para a aquicultura sustentável. Rev Aquac 13(1):642–663. <https://doi.org/10.1111/raq.12492>
- Deng Y, Borewicz K, Jvan L, Olabarrieta MZ, Kokou F, Sip-kema D, Verdegem MCJ (2022) Bioflocos in situ afetam a composição da comunidade procariota central no intestino e aumentam o crescimento da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). Microb Ecol 84:879–892. <https://doi.org/10.1007/s00248-021-01880-y>
- Durigon EG, Lazzari R, Uczay J, Lopes DLA, Jerônimo GT, Sgnaulin T, Emerenciano MGC (2020) Tecnologia de bioflocos (BFT): ajustando os níveis de proteína digestível e energia digestível em dietas para juvenis de tilápia-do-nilo criados em água salobra. Aquac Fish 5(1):42–51. <https://doi.org/10.1016/j.aaf.2019.07.001>
- Ekasari J (2014) Tecnologia de bioflocos como uma abordagem integral para aprimorar a produção e o desempenho ecológico da aquicultura. Dissertação, Universidade de Ghent
- Elabd H, Wang HP, Shaheen A, Matter A (2020) A suplementação dietética com nanoespirulina *aumenta* o crescimento, as reações antioxidantes e imunológicas, a digestão e a proteção da tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus*, contra *Aeromonas veronii* e alguns estressores físicos. Fish Physiol Biochem 46:2143–2155. <https://doi.org/10.1007/s10695-020-00864-y>
- Ellman GL (1959) Grupos sulfidrilos teciduais. Arch Biochem Biophys 82(1):70–77. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(59\)90090-6](https://doi.org/10.1016/0003-9861(59)90090-6)
- El-Sayed AFM (2006) Cultura de tilápia. CABI, Londres
- Elsayed BB, Khalafalla MME, El-Hais AMA (2012) Uso de *espirulina* (*Arthrospira fusiformis*) para promover o crescimento de alevinos de tilápia do Nilo. Afr J Microbiol Res 6(35):6423–6431. <https://doi.org/10.5897/AJMR12.288>
- El-Sheekh MI, El-Shourbagy I, Shalaby S, Hosny S (2014) Efeito da alimentação com *Arthrospira platensis* (*Spirulina*) no crescimento e na composição da carcaça de tilápia vermelha híbrida

- (*Oreochromis niloticus* x *Oreochromis mossambicus*).
Turco J Fish Aquat Sci 14:471–478. https://doi.org/10.4194/1303-2712-v14_2_18
- El-Ward AA, Eid AE, Mohamed KA, Abd-elfattah B, Hasan MA (2016) Desempenho de crescimento de alevinos de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) alimentados com dieta suplementada com diferentes níveis de *Spirulina platensis*. Egyptian J Anim Prod 53(3):181–190
- Erdogan F (2019) Efeitos da *Spirulina platensis* como aditivo alimentar no crescimento e na coloração de cich-pálpebras-de-golfinho-azul (*Cyrtocara moorii* Boulenger, 1902). Aquac Res 50(9):2326–2332. <https://doi.org/10.1111/are.14112>
- FAO - Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (2017) Tilápia do Nilo - *Oreochromis niloticus*. <http://www.fao.org/fishery/affris/species-profiles/nile-tilapia/nile-tilapiahome/en/>. Acessado em 26 de junho de 2022.
- FAO - Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (2022) O estado da pesca e da aquicultura no mundo 2022. Rumo à Transformação Azul. <https://doi.org/10.4060/cc0461en>. Acessado em 20 de novembro de 2022
- Ferreira GS, Bolívar NC, Pereira SA, Guertler C, Vieira FN, Mourão JLP, Seiffert WQ (2015) Biofloc microbiano como fonte de bactérias probióticas para a cultura de *Litopenaeus vannamei*. Aquicultura 448:273–327. <https://doi.org/10.1016/j.aquacultura.2015.06.006>
- Fontainhas-Fernandes A, Gomes E, Reis-Henriques MA, Coimbra J (1999) Substituição de farinha de peixe por proteínas vegetais na dieta de tilápia do Nilo: digestibilidade e desempenho de crescimento. Aquac Int 7:57–67. <https://doi.org/10.1023/A:1009296818443>
- Glencross B, Rutherford N, Jones B (2011) Avaliação de opções para substituição de farinha de peixe em dietas para juvenis de barramundi (*Lates calcarifer*). Aquac Nutr 17(3):722–732. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2010.00834.x>
- Gomes EF, Rema P, Kaushik SJ (1995) Substituição de farinha de peixe por proteínas vegetais na dieta da truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*): digestibilidade e desempenho de crescimento. Aquaculture 130(2–3):177–186. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(94\)00211-6](https://doi.org/10.1016/0044-8486(94)00211-6)
- Gullian-Klanian M, Arámburu-Adame C (2013) Desempenho de alevinos de tilápia-do-nilo *Oreochromis niloticus* em um sistema de aquicultura de recirculação hiperintensivo com baixa troca de água. Lat Am J Aquat Res 41(1):150–162
- Gutiérrez-Salmeán G, Fabila-Castillo L, Chamorro-Cevallos G (2015) Aspectos nutricionais e toxicológicos da *Spirulina* (*Arthrospira*). Nutr Hosp 32(1):34–40. <https://doi.org/10.3305/nh.2015.32.1.9001>
- Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB (1974) Glutathione S-transferases: a primeira etapa enzimática na formação do ácido mercaptúrico. J Biol Chem 249(22):7130–7139. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)42083-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)42083-8)
- Hafedh YSA (1999) Efeitos da proteína dietética no crescimento e composição corporal da tilápia do Nilo. *Oreochromis niloticus* I. Aquac Res 30(5):385–393. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2109.1999.00343.x>
- Hargreaves JA (2006) Sistemas de crescimento suspenso fotossintético em aquicultura. Aquac Eng 34(3):344–363. <https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2005.08.009>
- Henchion M, Hayes M, Mullen AM, Fenelon M, Tiwari B (2017) Oferta e demanda futura de proteínas: estratégias e fatores que influenciam um equilíbrio sustentável. Foods 6(7):53–74. <https://doi.org/10.3390/foods6070053>
- Henrikson R (1994) Microalga *Spirulina*: Superalimento do futuro. Edições SA Urano, Barcelona
- Herath SS, Satoh S (2015) Impacto ambiental do fósforo e do nitrogênio da aquicultura. Feed Feed Pract Aquac 15:369–386
- Hernández LHH, Flores GH, Araiza MAF, López AO (2012) Efeitos da substituição total da farinha de peixe por *espirulina* pó e farelo de soja em juvenis de truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum). Isr J Aquac 64:1–8. <https://doi.org/10.46989/001c.20612>
- Hernández C, Olvera-Novoa MA, Voltolina D, Hardy RW, González-Rodríguez B, Domínguez-Jiménez P, Val-verde-Romero M, Agramon-Romero S (2013) Uso de resíduos da indústria de atum em dietas para tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus*, alevinos: efeito na digestibilidade e desempenho de crescimento. Lat Am J Aquat Res 41(3):468–478. <https://doi.org/10.3856/vol41-issue3-fulltext-10>
- Hussein EE-S, Dabrowski K, El-Saidy DMSD, Lee BJ (2013) Melhorando o crescimento de larvas/jovens de tilápia do Nilo pela substituição de proteína vegetal (glúten) por proteína de algas. Aquac Res 44(6):937–949. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2012.03100.x>
- Jaime-Ceballos B, Villarreal H, García T, Pérez-Jar L, Alfonso E (2005) Efeito da farinha de *Spirulina platensis* como aditivo alimentar no crescimento, sobrevivência e desenvolvimento de larvas de camarão *Litopenaeus schmitti*. Rev Investig 26 de março(3):235–241
- Jaime-Ceballos B, Cerecedo RC, Villarreal H, López JG, Pérez-Jar L (2007) Uso da farinha de *Spirulina platensis* como atraente no alimento para o camarão *Litopenaeus schmitti*. Hidrobiológica 17(2):113–117
- Jana A, Saroch JD, Borana K (2014) Efeito da *Spirulina* como suplemento alimentar na sobrevivência e crescimento de *Pangasius sutchi*. Int J Fish Aquat Stud 1:77–79
- Jentzsch AM, Bachmann H, Fürst P, Biesalski HK (1996) Análise aprimorada de malondialdeído em fluidos corporais humanos. Free Radic Biol Med 20(2):251–256. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(95\)02043-8](https://doi.org/10.1016/0891-5849(95)02043-8)
- Ju ZY, Forster I, Conquest L, Dominy W, Kuo WC, Horgen FD (2008) Determinação das estruturas da comunidade microbiana de culturas de flocos de camarão por biomarcadores e análise dos perfis de aminoácidos dos flocos. Aquac Res 39(2):118–133. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2007.01856.x>
- Krummenauer D, Samocha T, Poersch L, Lara G, Wasielesky Junior W (2014) Reuso de água na cultura do camarão branco do Pacífico, *Litopenaeus vannamei*. BFT Sys-tem J World Aquac Soc 45(1):3–14. <https://doi.org/10.1111/jwas.12093>
- Kumar PRS, Sibi G (2020) *Espirulina* como farinha de peixe para melhorar o crescimento, a resposta imunológica, a defesa antioxidante e a pigmentação. J Fish Mar Sci 12(2):47–52. <https://doi.org/10.5829/idosi.wjfrms.2020.47.52>
- Lima ECR, Souza RL, Wambach XF, Silva UL, Correia ES (2015) Cultivo da tilápia do Nilo *Oreochromis niloticus* em sistema de bioflocos com diferentes densidades de estocagem. Rev Bras Saúde Prod Anim 16(4):948–957. <https://doi.org/10.1590/S1519-99402015000400018>
- Lima ECR, Souza RL, Girão PJM, Braga ÍFM, Correia ES (2018) Cultivo de tilápia-do-nilo em sistema de bioflocos com diferentes fontes de carbono. Rev Cienc Agron

- 49(3):458–466. <https://doi.org/10.5935/1806-6690.20180052>
- Luo G, Gao Q, Wang C, Liu W, Sun D, Li L, Tan H (2014) Crescimento, atividade digestiva, bem-estar e custo-efetividade parcial de tilápias (*Oreochromis niloticus*) cultivadas geneticamente melhoradas em um sistema de aquicultura de recirculação e em um sistema de bioflocos interno. *Aquicultura* 422–423:1–7. <https://doi.org/10.1016/j.aquicultura.2013.11.023>
- Mansour AT, Alsaqufi AS, Alkhamis YA, Al-Gazar FF, Zaki MA, Nour AAM, Ramadan KMA (2021) A avaliação da bioatividade de *Arthrospira platensis* e sua suplementação dietética à dieta vegetariana de tilápia do Nilo no desempenho de crescimento, utilização de alimentos, composição corporal e parâmetros hemato-bioquímicos. *Ann Anim Sci* 21(3):1061–1080. <https://doi.org/10.2478/aoas-2021-0003>
- Martins MA, Poli MA, Legarda EC, Pinheiro IC, Carneiro RFS, Pereira SA, Martins ML, Gonçalves P, Schleder DD, Vieira FN (2020) Sistemas de bioflocos heterotróficos e maduros na cultura integrada de camarão branco do Pacífico e tilápia do Nilo. *Aquicultura* 514:734517. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734517>
- Masumoto T, Ruchimat T, Ito Y, Hosokawa H, Shimeno S (1996) Valores de disponibilidade de aminoácidos para diversas fontes de proteína para yellowtail (*Seriola quinqueradiata*). *Aquicultura* 146(1–2):109–119. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(96\)01364-6](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(96)01364-6)
- Mello H, Moraes JRE, Niza IG, Moraes FR, Ozório ROA, Shimada MT, Engracia Filho JR, Claudiano GS (2013) Efeitos benéficos de probióticos no intestino de juvenis de Tilápia-do-Nilo. *Pesq Vet Bras* 33(6):724–730. <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2013000600006>
- Monroy-Dosta MC, Lara-Andrade R, Castro-Mejía J, Castro-Mejía G, Emerenciano MGC (2013) Composição e abundância de comunidades microbianas associadas ao biofoco em um cultivo de tilápia. *Rev Biol Mar Oceanogr* 48(3):511–520. <https://doi.org/10.4067/S0718-19572013000300009>
- Nandeesh MC, Gangadhar B, Varghese TJ, Keshavanath P (1998) Efeito da alimentação com *Spirulina platensis* no crescimento, composição centesimal e qualidade organoléptica da carpa comum. *Cyprinus Carpio* *I Aquac Res* 23(5):305–312. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2109.1998.00163.x>
- Nandeesh MC, Gangadhar B, Maniserry JK, Venkataraman RV (2001) Desempenho de crescimento de duas grandes carpas indianas, catla (*Catla catla*) e rohu (*Labeo rohita*) alimentadas com dietas contendo diferentes níveis de *Spirulina platensis*. *Bioresour Technol* 80(2):117–120. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(01\)00085-2](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(01)00085-2)
- Nunes CS, Cinsa LA (2016) Princípios do processamento histológico de rotina. *Rev Int Est* 8:31–40. <https://docs.bvsalud.org/biblioref/2018/11/964830/2884-8890-1-sm.pdf>
- Oddsson GV (2020) Uma definição de intensidade da aquicultura com base em funções de produção — a escala de intensidade de produção da aquicultura (APIS). *Água* 12(3):765. <https://doi.org/10.3390/w12030765>
- Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K (1978) Ensaio para peróxidos lipídicos em tecidos animais por reação com ácido tiobarbitúrico. *Anal Bioquímica* 95(2):351–358. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(79\)90738-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(79)90738-3)
- Pereira DSP, Guerra-Santos B, Moreira ELT, Albinati RCB, Ayres MCC (2016) Parâmetros hematológicos e histológicos da tilápia do Nilo em resposta ao desafio de diferentes níveis de salinidade. *Bol Inst Pesca* 42(3):635–647. <https://doi.org/10.20950/1678-2305.2016v42n3p635>
- Pérez-Fuentes JA, Hernández-Vergara MP, Pérez-Rostro CI, Fogel I (2016) As relações C:N afetam a remoção de nitrogênio e a produção de tilápia do Nilo *Oreochromis niloticus* criada em sistema de bioflocos sob cultivo de alta densidade. *Aquicultura* 452:247–251. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.11.010>
- Picoli F, Lopes DLA, Zampar A, Serafini S, Freccia A, Veron-ezi LO, Kowalski MW, Ghizzo JB, Emerenciano MGC (2019) O pólen apícola da dieta afeta a histomorfometria hepato-intestinal de alevinos de tilápia do Nilo. *Aquac Res* 50(11):3295–3304. <https://doi.org/10.1111/are.14287>
- Picoli F, Marques S, Oliveira A, Nunes C, Serafini S, Klein B, Oliveira NS, Santos NNO, Zampar A, Lopes DLA, Fab-regat TEHP (2022) Farelo de soja fermentado com microrganismos de cultura mista melhora o desempenho produtivo e a saúde intestinal de juvenis de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloti-cus*) alimentados com dietas à base de plantas em um sistema de bioflocos. *Aquac Res* 53(12):4233–4245. <https://doi.org/10.1111/sao.15859>
- Pike IH (1999) Benefícios para a saúde da alimentação com óleo de peixe e peixes refeição. IFFOMA, St. Albans, Reino Unido
- Pilotto MR, Gonçalves ANA, Vieira FN, Seifert WQ, Bachère E, Rosa RD, Perazzolo LM (2018) Explorando o impacto do sistema de criação com bioflocos e de um desafio oral com WSSV no bacterioma intestinal de *Litopenaeus van-namei*. *Microorganisms* 6(3):83. <https://doi.org/10.3390/microorganisms6030083>
- Prabu E, Rajagopalsamy CBT, Ahilan B, Jeevagan IJMA, Renuhadevi M (2019) Tilápia: uma excelente espécie candidata para a aquicultura mundial: uma revisão. *Annu Res Rev Biol* 31(3):1–14. <https://doi.org/10.9734/arrb/2019/v31i330052>
- Promya J, Chitmanat C (2011) Efeitos da *Spirulina platensis* e das algas *Cladophora* no desempenho de crescimento, na qualidade da carne e na capacidade de estimular a imunidade do bagre africano de dentes afiados (*Clarias gariepinus*). *Int J Agric Biol* 13(1):77–82
- Raji AA, Alaba PA, Yusuf H, Bakar NHA, Taufek NM, Muin H, Alias Z, Milow P, Razak SA (2018) Substituição de farinha de peixe por *Spirulina Platensis* e *Chlorella vulgaris* na dieta de bagre africano (*Clarias gariepinus*) : efeito sobre a atividade de enzimas antioxidantes e parâmetros hematológicos. *Res Vet Sci* 119:67–75. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2018.05.013>
- Raji AA, Jimoh WA, Bakar NHA, Taufek NHM, Muin H, Alias Z, Milow P, Razak S (2020) Uso dietético de *Spir-ulina* (*Arthrospira*) e *Chlorella* em vez de farinha de peixe no crescimento e na digestibilidade de nutrientes, aminoácidos e ácidos graxos do bagre africano. *J Appl Phycol* 32(3):1763–1770. <https://doi.org/10.1007/s10811-020-02070-y>
- Roohani AM, Kenari AA, Kapoorchali MF, Borani MS, Zoriezahra SJ, Smiley AH, Esmaeili M, Rombenso AN (2019) Efeito da *Spirulina platensis* como ingrediente complementar para reduzir a farinha de peixe na dieta sobre o crescimento

- Desempenho, composição corporal total, perfis de ácidos graxos e aminoácidos e pigmentação de juvenis de truta marrom do Cáspio (*Salmo trutta caspius*). *Aquac Nutr* 25(3):633–645. <https://doi.org/10.1111/anu.12885>
- Rutar JM, Hudobivnik MJ, Necemer M, Mikus KV, Arjón I, Ogrinc N (2022) Qualidade nutricional e segurança dos suplementos alimentares de *espirulina* vendidos no mercado esloveno. *Foods* 11(6):849. <https://doi.org/10.3390/foods11060849>
- Salah El-Din A, Abdullah S, Sayed AE-DH (2021) Capacidade antioxidante e danos ao DNA em tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) exposta ao brometo de etídio: um papel protetor para *Spirulina Platensis*. *Sci Afr* 13:e00961. <https://doi.org/10.1016/j.sciaf.2021.e00961>
- Sampaio LR, Silva MCM, Oliveira NA, Souza CLS (2012) Avaliação bioquímica do estado nutricional. In: Sampaio LR (ed) Avaliação nutricional. EDUFBA, Salvador
- Sedlak J, Lindsay RH (1968) Estimativa de grupos sulfidril totais, ligados a proteínas e não proteicos em tecidos pelo reagente de Ellman. *Anal Biochem* 25:192–208. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(68\)90092-4](https://doi.org/10.1016/0003-2697(68)90092-4)
- Silva UL, Falcon DR, Rocha D, Pessôa MNC, Correia ES (2017) Fontes de carbono e relações C:N na qualidade da água para cultivo de tilápia do Nilo em sistema de bioflocos. *Caatinga* 30(4):1017–1027. <https://doi.org/10.1590/1983-21252017v30n423rc>
- Silva DJ, Queiroz AC (2009) Análise de alimentos (métodos químicos e biológicos). 3.ed. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 235 p.
- Silva-Neto JF, Nunes AJP, Sabry-Neto H, Sá MVC (2011) A farinha de *espirulina* atuou como um forte atrativo alimentar para *Litopenaeus vannamei* em um nível de inclusão alimentar muito baixo. *Aquac Res* 43(3):430–437. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2011.02846.x>
- Soliman HAM, Hamed M, Sayed AE-DH (2021) Investigando os efeitos de nanopartículas de sulfato de cobre e óxido de cobre em tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) usando múltiplos biomarcadores: o papel profilático da *Spirulina*. *Envi-ron Sci Pollut Res* 28(23):30046–30057. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-12859-0>
- Subashinge R (2013) Sustentabilidade da Aquicultura Rumo a 2030. FAO, Roma
- Tacon AGJ, Cody JJ, Conquest LD, Divakaran S, Forster IP, Decamp OE (2002) Efeito do sistema de cultivo na nutrição e no desempenho de crescimento do camarão branco do Pacífico, *Litopenaeus vannamei* (Boone), alimentado com diferentes dietas. *Aquac Nutr* 8(2):121–137. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2095.2002.00199.x>
- Tanekhy M, Khalil R, Hofi H, Hashish E (2016) Eficácia bioquímica, patológica e imunológica de probióticos comerciais em tilápia do Nilo. *Oreochromis Niloticus Pakistan J Zool* 48(5):1269–1282
- Tanjung RRM, Zidni I, Iskandar J (2019) Efeito de diferentes meios filtrantes em sistemas de aquicultura de recirculação (RAS) no desempenho da produção de tilápia (*Oreochromis niloticus*). *WSN* 118:194–208
- Tolosa EMC, Rodrigues CJ, Behmer OA, Freitas Neto AG (2003) Manual de técnicas para histologia: normal e patológica., Manole, São Paulo
- Turchini GM, Trushenski JT, Glencross BD (2019) Reflexões sobre o futuro da nutrição aquícola: realinhando perspectivas para refletir questões contemporâneas relacionadas ao uso criterioso de recursos marinhos em rações aquáticas. *N Am J Aquac* 81(1):13–39. <https://doi.org/10.1002/naaq.10067>
- Velasquez SF, Chan MA, Abisado RG, Traifalgar RFM, Taya-men MM, Maliwat GCF, Ragaza JA (2015) A substituição da dieta com *espirulina* (*Arthrospira platensis*) melhora o desempenho de tilápias-do-nilo juvenis (*Oreochromis niloti-cus*). *Am J Appl Psychol* 28(2):1023–1030. <https://doi.org/10.1007/s10811-015-0661-y>
- Wang L, Pan B, Sheng J, Xu J, Hu Q (2007) Atividade antioxidante de extratos de *Spirulina platensis* por extração com dióxido de carbono supercrítico. *Food Chem* 105(1):36–41. <https://doi.org/10.105.0rg/10.1016/j.foodchem.2007.03.054>
- Workagegn KB, Ababboa ED, Yimer GT, Amare TA (2014) Desempenho de crescimento da tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus* L.) alimentada com diferentes tipos de dietas formuladas a partir de diferentes ingredientes. *J Aquac Res Dev* 5(3):235. <https://doi.org/10.4172/2155-9546.1000235>
- Banco Mundial - Dados de preços de commodities do Banco Mundial (The Pink Sheet) (2020) <http://pubdocs.worldbank.org/en/895911554230066764/CMO-Pink-Sheet-Abril-2019.pdf>. Acessado em 11 fev. 2022
- Zarkasi KZ, Taylor RS, Abell GCJ, Tamplin ML, Glen-cross BD, Bowman JP (2016) Dinâmica da comunidade microbiana gastrointestinal do salmão do Atlântico (*Salmo salar* L.) em relação às propriedades da digesta e dieta. *Microb Ecol* 71(3):589–603. <https://doi.org/10.1007/s00248-015-0728-y>
- Zhang F, Man Y, Mo W, Wong M (2020) Aplicação de *Spirulina* na aquíicultura: uma revisão sobre tratamento de águas residuais e crescimento de peixes. *Rev Aquac* 12(2):582–599. <https://doi.org/10.1007/10.1111/raq.12341>
- Zhou QC, Yue YR (2010) Efeito da substituição do farelo de soja por farelo de canola no crescimento, utilização de ração e índices hematológicos de tilápia híbrida juvenil, *Oreochromis niloticus* × *Oreochromis aureus*. *Aquac Res* 41(7):982–990. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2009.02381.x>
- Zhu H, Qiang J, Tao Y, Ngoepe TK, Bao J, Chen D, Xu P (2020) Alterações fisiológicas e no microbioma intestinal associadas a baixos níveis de proteína na dieta de tilápias cultivadas geneticamente melhoradas (GIFT, *Oreochromis niloticus*), determinadas pela análise da sequência 16S rRNA. *Microbiol Open* 9(5):e1000. <https://doi.org/10.1002/mbo3.10>

Nota do editor A Springer Nature permanece neutra em relação a reivindicações jurisdicionais em mapas publicados e afiliações institucionais.

A Springer Nature ou seu licenciante (por exemplo, uma sociedade ou outro parceiro) detém direitos exclusivos sobre este artigo sob um contrato de publicação com o(s) autor(es) ou outro(s) detentor(es) de direitos; o autoarquivamento da versão manuscrita aceita deste artigo pelo autor é regido exclusivamente pelos termos desse contrato de publicação e pela lei aplicável.



Óleo de semente de uva na dieta de vacas Jersey primíparas antes e depois do parto: efeitos sobre o desempenho, saúde, ambiente ruminal e qualidade do leite

Mateus Henrique Signor¹ · Ana Luiza de Freitas dos Santos¹ · Maksuel Gatto de Vitt² · Luisa Nora² · Rafael Vinicius Pansera Lago¹ · Gabriel Jean Wolschick¹ · Natalia Gemelli Correa¹ · Bruna Klein¹ · Ana Carolina Hadlich Xavier³ · Roger Wagner³ · Bianca Fagan Bissacotti³ · Aleksandro Schafer da Silva^{1,4}



Recebido: 20 de novembro de 2023 / Aceito: 25 de junho de 2024 / Publicado online: 12 de julho de 2024
© O(s) autor(es), sob licença exclusiva da Springer Nature BV 2024

Resumo

O objetivo do estudo foi determinar se a adição de óleo de semente de uva (OSU) à dieta de raças Jersey primíparas durante o período de transição melhoraria a saúde animal, medindo os efeitos sobre o ambiente ruminal, a bioquímica sérica, a resposta oxidativa e a composição e qualidade do leite. Utilizamos 14 novilhas Jersey, com peso médio de 430 kg e 240 dias de gestação. Os animais foram divididos em dois grupos e receberam uma dieta basal, incluindo OSU no concentrado para o grupo OSU (dose de 25 mL por animal/dia) e a mesma dose de óleo de soja (OS) para o grupo controle. Os animais foram alocados e mantidos em um sistema de compostagem, recebendo uma dieta aniônica (pré-parto) e uma dieta para animais lactantes pós-parto. Foram avaliados o consumo de matéria seca (CMS), a produção de leite, a bioquímica sérica, a estabilidade oxidativa do soro e do leite, o perfil de ácidos graxos do fluido ruminal e do leite, os aspectos qualitativos do leite e parâmetros ruminais como pH, atividade bacteriana e contagem de protozoários. A adição de GSO teve um efeito positivo na saúde das vacas, especialmente na estabilidade oxidativa, aumentando os tióis totais ($P = 0,03$) e a capacidade de redução férrica plasmática (FRAP) ($P=0,01$) e capacidade antioxidante total (CAT) ($P=0,01$). Na estabilidade oxidativa do leite produzido pelos animais tratados, houve também aumento no CAT ($P=0,05$) e FRAP ($P=0,03$). Alterações discretas foram observadas no ambiente ruminal com tendência decrescente no pH ($P=0,04$), mas aumento na atividade bacteriana ($P=0,05$) e contagem de protozoários ($P=0,07$) nas vacas que consumiram o aditivo. O consumo de GSO afetou o perfil de ácidos graxos no leite, aumentando os ácidos graxos saturados (SFA) ($P=0,05$) e reduzindo os ácidos graxos insaturados (AGI) ($P=0,03$). O óleo não afetou a produção ou a eficiência do leite no período pós-parto. Com base nessas informações, conclui-se que a adição de GSO afeta positivamente o sistema antioxidante da vaca.

Palavras-chave Antioxidante · Bioquímica · Vacas leiteiras · Óleo de semente de uva · Transição

Introdução

O período de transição da vaca leiteira ocorre de três semanas antes a três semanas após o parto e o início da lactação (Mota et al., 2006); é um período crítico do ponto de vista imunológico para esses animais, que apresentam dificuldade em manter a homeostase, com alterações nos processos metabólicos e hormonais associados ao parto, ao início da síntese de leite e à adaptação a novos manejos nutricionais (Ortolani, 2009). Os desafios da transição em vacas fazem com que pesquisadores e empresas da área de nutrição animal busquem formas de reduzir a ocorrência de distúrbios e anormalidades. Entre as formas, estão a introdução de alternativas alimentares, suplementos e aditivos.

* Aleksandro Schafer da Silva
aleksandro_ss@yahoo.com.br

¹ Departamento de Ciência Animal, Universidade Do Estado de Santa Catarina (UDESC), Chapecó, Brasil
² Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Universidade Do Estado de Santa Catarina (UDESC), Chapecó, Brasil
³ Departamento de Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Brasil
⁴ Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, UFSM, Santa Maria, RS, Brasil

que têm efeito positivo no organismo das vacas e que promovem melhor saúde, redução de distúrbios e doenças, o que consequentemente favorece um menor número de intervenções medicamentosas e redução de perdas produtivas e reprodutivas ao longo da lactação.

O uso de óleos vegetais na alimentação de vacas já é conhecido (Kra et al. 2021; Pi et al. 2019; Vargas-Bello-Pérez et al. 2016, 2020). O óleo de semente de uva (OSU) é um coproduto produzido a partir de resíduos da indústria vinícola. Ainda não é utilizado na alimentação animal pura, mas sim em resíduos de uva fornecidos às vacas em silagem ou farinha (Gessner et al., 2015; Santos et al., 2014).

Molosse et al. (2023) constataram que a substituição do farelo de trigo e da casca de soja por silagem de bagaço de uva estimula o sistema imunológico e antioxidante do gado de corte, com benefícios à saúde e possível redução nos custos com alimentação animal. O estímulo imunológico e antioxidante também foi verificado em cordeiros lactentes quando receberam farelo de uva (Molosse et al. 2021). A demanda se deve ao viés sustentável do reaproveitamento de resíduos, que possuem alto valor biológico, fenóis, flavonoides e antocianinas com alto potencial antioxidante, que podem ser úteis aos nutracêuticos (Sirohi et al. 2020). Uma revisão de Silva et al. (2022) também destaca os benefícios antioxidantes em produtos cárneos de animais que receberam a inclusão de produtos à base de resíduo de uva. A literatura recente afirma o potencial desse coproduto e suas diferentes formas de utilização em diferentes categorias de animais de produção, principalmente para melhorar a saúde animal, o que, consequentemente, pode aumentar seu desempenho produtivo.

As sementes de uva representam 15% do resíduo sólido e contêm de 14 a 17% de óleo, dependendo da variedade utilizada (Göktürk e Akkurt 2001). A semente e o óleo são compostos de ácido linoleico e oleico. As famílias de ácidos graxos ômega 3 (γ 3), ômega 6 (γ 6) e ômega (γ 9), incluindo ácido oleico (γ 9), ácido linoleico (γ 6) e ácido γ -linolênico (γ 3), são descritas como ácidos graxos essenciais (Rockenbach, 2010; Palmquist e Mattos 2006). O óleo também contém considerável quantidade de vitamina E (Freitas 2007), uma vitamina que promove as taxas reprodutivas e a produção de leite em vacas quando oferecido durante o período de transição (Moghimi-Kandelousi et al. 2020). Estudos em medicina humana descobriram que o GSO tem diversas atividades farmacológicas contra a oxidação de lipoproteínas de baixa densidade, prevenindo doenças cardiovasculares e reduzindo o colesterol (Jabeen et al., 2021).

Os ácidos graxos ômega-3, como o ácido linoleico, têm sido associados a benefícios para a saúde cardiovascular. Estudos mostram que

O consumo adequado pode ajudar a reduzir a incidência de doenças cardiovasculares em bovinos (Glasser et al., 2008). Há envolvimento na regulação hormonal que contribui para o sucesso reprodutivo. Possuem propriedades anti-inflamatórias e moduladoras do sistema imunológico, ajudando a reduzir a inflamação e promovendo uma resposta imunológica saudável (Bobe et al., 2009; Benjamin et al., 2016). O aumento da ingestão de gorduras insaturadas pode resultar em um aumento na

gorduras insaturadas e uma redução nas gorduras saturadas no leite, o que pode beneficiar a saúde humana. Tradicionalmente, o leite e seus derivados estão entre os principais componentes da dieta humana e, nesses produtos, o ácido linoleico e o ácido γ -linolênico compõem a gordura do leite. O γ 3 pode reduzir o excesso de gordura no fígado e melhorar sua função (Glasser et al., 2008; Benjamin et al., 2016).

Vacas primíparas na fase de transição são mais suscetíveis ao estresse oxidativo do que vacas múltiparas devido à sua menor capacidade antioxidante total (CAT) (Moretti et al. 2017). Segundo Santos et al. (2014), o uso de resíduos de uva na dieta de vacas leiteiras melhora a resposta antioxidante. O desenvolvimento de estratégias dietéticas utilizando subprodutos de uva foi eficaz na produção de leite e derivados, caracterizados por propriedades nutricionais implementadas e melhor estabilidade oxidativa, com benefícios à saúde dos consumidores devido à presença de compostos com alto valor biológico. Além disso, apresenta benefícios ambientais e sustentáveis com o reaproveitamento de resíduos (Ianni, 2020).

Em outras categorias de animais, o GSO, quando usado para controlar a dislipidemia e a hiperglicemia em ratos diabéticos, controla efetivamente os distúrbios metabólicos (Shiri-Shahsavari et al., 2023).

A inclusão dietética de GSO melhorou a produtividade de coelhos em crescimento em comparação aos grupos controle e tratados com antibióticos (Nasr et al. 2022).

A composição química do óleo nos leva a crer que ele tem potencial para utilização na produção leiteira, sendo também uma possibilidade de agregar valor ao resíduo da uva como ração na bovinocultura leiteira (Olegário, 2015). Portanto, o objetivo do estudo foi verificar se a adição de GSO à dieta de primíparas da raça Jersey durante o período de transição teve efeito positivo na saúde animal e investigar os efeitos no ambiente ruminal, no metabolismo sérico, na resposta oxidativa e na composição e qualidade do leite.

Materiais e métodos

Localização e instalações

O experimento foi conduzido no setor de bovinocultura de leite da Fazenda Experimental do Centro de Ensino Superior do Oeste – FECEO da Universidade Estadual de Santa Catarina – UDESC, localizada em Guatambu – SC/Brasil. Os animais foram alojados durante o período experimental em um sistema de compost barn, com cama composta de resíduos de serraria (serragem) revolvidos diariamente e com área de 20 m² por animal. O galpão é composto por área de descanso (cama), sala de espera, sala de ordenha, pista de alimentação equipada com comedouros e bebedouros individuais separados por cantis metálicos, sala de ração, sala fria e escritório.

A área de descanso contava com um bebedouro coletivo basculante MX300 (MX do Brasil®) com capacidade de 300 L de água e sistema retrátil para facilitar a limpeza diária, garantindo o consumo à vontade dos animais. Além disso, a área contava com cinco ventiladores Eco Fan MX 160 (MX do Brasil®) para controlar o microclima interno do galpão e secar a cama. A sala de ordenha era em formato espinha de peixe com capacidade para três animais simultaneamente e um único lado de ordenha. O sistema contava com três extratores automáticos AMI 5550 com indicadores de produção total, vazão de leite e temperatura, acoplados a três coletores ântero-posteriores Flo-Star MAX e estação de lavagem automática Guardian JW, todos equipamentos BOU-MATIC®. Combinados com um sistema de encanamento, filtragem, transferência de leite e contenção da ORDEMILK®.

A pista de alimentação possuía dois ventiladores, 20 comedouros individuais com fechamento automático e bebedouros plásticos distribuídos ao longo da linha de comedouros (um para cada dois animais) com possibilidade de privar/liberar o acesso à água conforme a demanda; a instalação destes bebedouros se deu pela necessidade experimental de controlar o acesso ao alimento por tempo restrito e de forma guiada, sendo necessária a disponibilidade de água durante o período em que os animais permanecerem privados de acesso à área de descanso.

O piso das instalações (exceto a área de descanso) é de concreto, com frisos para aumentar a aderência dos animais e garantir a segurança. Os dejetos animais e resíduos de limpeza dessas áreas são encaminhados por canais para lagoas de resíduos, onde permanecem por um período de estabilização antes de serem distribuídos para áreas agrícolas como fertilizante orgânico.

Caracterização dos animais

Foram utilizados 14 animais núlíparos da raça Jersey, com peso corporal médio de 430 kg, 26 meses de idade e prenhes há 240 dias, provenientes de um protocolo de Inseminação Artificial em Tempo Fixo com sêmen da raça Angus. Esses animais foram alocados até o período experimental em uma área de pastagem composta de gramíneas anuais de inverno, aveia e azevém, semeadas em Jiggs. Receberam suplementação mineral comercial para novilhas prenhes até a transferência para o celeiro de compostagem e o início do período de reprodução.

Desenho experimental

O delineamento utilizado foi o de blocos casualizados; os animais (n = 14) foram divididos em dois grupos com sete repetições cada; o grupo SO recebeu 25 mL/dia de SO na dieta, enquanto o grupo GSO recebeu 25 mL/dia de GSO. Ambas as dietas fornecidas foram isoproteicas e isoenergéticas. O período experimental teve duração de 60 dias, dadas as devidas variações, pois teve início aos 240 dias de gestação (aproximadamente 12 meses).

30 dias antes da data prevista para o parto) e continuou até os primeiros 30 dias de lactação.

GSO

O GSO foi adicionado à dieta dos animais do grupo de tratamento durante todo o período experimental na dose de 25 mL/vaca/dia. Na ausência de estudos semelhantes na literatura, a dose utilizada baseia-se em níveis que sugerem viabilidade econômica de produção e utilização, por se tratar de um produto de alto valor agregado. Os níveis não impactam o valor nutricional da dieta e, portanto, não representam risco de intoxicação e perdas produtivas pelo tratamento. A quantidade de óleo foi medida individualmente e misturada ao concentrado no fornecimento da dieta total no tratamento matinal dos animais.

Os animais do grupo controle receberam a mesma dose de SO comercial para tornar as dietas isoenergéticas. O óleo vegetal de Vitis vinífera é um produto comercial da marca HAR-MONIE® Aromaterapia, adquirido em embalagens de 1 litro. O óleo é extraído por prensagem a frio e subsequente desodorização no Chile. O produto é composto principalmente por ácido linoleico (68,57%), ácido oleico (15,86%), ácido palmítico (8,7%), ácido esteárico (5,48%), além de outros compostos minoritários ou não identificados. O relatório obtido na cromatografia concorda com os resultados obtidos por Rockenbach et al. (2010). Os resultados da cromatografia para GSO e SO são apresentados na Tabela 1.

Dieta

Os animais receberam uma dieta formulada seguindo as exigências nutricionais para novilhas Jersey do NRC 2001. A dieta foi formulada à base de feno de Tifton 85, silagem de milho e concentrado. O concentrado pré-parto continha farelo de soja, fubá de milho (moído em peneira de 2 mm), farelo de trigo e casca de soja em sua composição. Além disso, neste concentrado, o núcleo BOVIGOLD® Pré-Parto OVN (DSM Tortuga®) foi incluído para reduzir a diferença cátion-ânion (DCAD) na dieta. Durante esta fase, o concentrado foi previamente fornecido aos demais ingredientes em

Tabela 1 Composição cromatográfica do óleo de semente de uva (Tratamento) e do óleo de soja (Controle)

Identificação	% em óleo de uva	% em óleo de soja
C14:0 – ácido mirístico	0,18	0,14
C16:1 – ácido palmitoleico	0,10	0,09
C16:0 – ácido palmítico	8,70	12,6
C18:2 – ácido linoleico	68,5	50,4
C18:1 – ácido oleico	15,8	25,4
C18:0 – ácido esteárico	5,48	4,20

Os ácidos graxos individuais são calculados como % do total de ácidos graxos

a dieta para maximizar o consumo de sais aniônicos, que têm menor palatabilidade, mas são essenciais para um bom desempenho no período de transição. Na dieta pós-parto, os animais com 26 meses de idade foram considerados vazios, com 20 dias em lactação (DEL = 20) e uma produção esperada de 18 kg de leite/dia. Isso inclui feno, silagem de milho e concentrado à base de fubá (peneira de 2 mm), farelo de soja, farelo de trigo, casca de soja, ureia animal (YARA®) e núcleo BOVIGOLD® Plus (DSM Tortuga). Todos os ingredientes foram fornecidos pela COOPERALFA (Chapecó - SC). A Tabela 2 mostra os ingredientes e a composição química básica das dietas pré-parto e pós-parto totais analisadas em laboratório após a amostragem quando a dieta foi fornecida.

Gestão da ordenha

O rebanho foi ordenhado duas vezes ao dia durante o período experimental, às 7h e às 16h30. Ao entrar na sala de ordenha, os tetos foram desinfetados (pré-dipping) com um produto à base de clorexidina 0,5%. Após a desinfecção, os três primeiros jatos de leite foram removidos e o pré-dipping foi aplicado novamente. Em seguida, o leite foi seco com papel-toalha. As teteiras foram fixadas manualmente e extraídas automaticamente. Após a ordenha, o pós-dipping foi realizado antes da soltura do animal. Devido a atrasos na instalação do sistema de ordenha, um animal do grupo experimental teve que ser ordenhado manualmente durante a primeira semana de lactação. Durante o período, o pré e o pós-dipping foram realizados da mesma forma.

Coleta de dados e amostras

Diferentes dados e amostras foram coletados para atingir os objetivos propostos: pesagem dos animais e coleta de sangue, fluido ruminal e leite. A IMS foi quantificada pela pesagem da dieta fornecida e das sobras. A Figura 1 descreve o cronograma do período experimental, indicando o período em que as respectivas coletas foram realizadas. A produção de leite também foi mensurada diariamente.

Os animais foram pesados em balança de barras (DIG-TRON®) antes de entrarem no experimento. As coletas de sangue foram realizadas por punção da veia jugular dos animais, coletando-se o sangue em tubos vacuolados sem anticoagulante (VACUOPLAST®) para obtenção do soro sanguíneo e em tubos vacuolados (VACUOPLAST®) com anticoagulante (EDTA) para realização do hemograma. Após a coleta, as amostras foram armazenadas abaixo de 5 °C para transporte ao laboratório.

As amostras coletadas em tubos sem anticoagulante foram centrifugadas para obtenção do soro sanguíneo por dez minutos a 8.000 rotações por minuto. Posteriormente, o soro foi armazenado em microtubos (EPPENDORF®) a –20 °C até o momento da análise.

O fluido ruminal foi coletado quatro horas após o ani-primeiro dia de tratamento dos homens, usando uma sonda esofágica para

Tabela 2 Ingredientes e composição química elementar das dietas totais pré e pós-parto analisadas em laboratório após amostragem no momento da alimentação com dieta

Ingredientes (Kg MS/dia)		
	Dieta pré-parto	Dieta pós-parto
Silagem de milho	4,69	5.21
Feno Tifton 85	1,23	1.3
Milho moído (2 mm)	0,24	1,98
Farelo de soja (45% PB)	1,61	2,67
Casca de soja	0,12	0,63
Farelo de trigo	0,12	0,63
Núcleo pré-parto 1	0,28	-
Núcleo pós-parto 2	-	0,21
Ureia	-	0,04
Total	8.3	12,7
Inclusão de óleo de uva/óleo de soja mL/dia	0,025	0,025
Composição química das dietas		
	Dieta SO	Dieta GSO
Pré-entrega		
Matéria seca (%)	67,2	67,9
Proteína bruta (%/MS)	14,8	14,7
Extrato etéreo (%/MS)	2.23	2.13
Cinzas (%/DM)	7,66	7,50
FDN (%/DM)	48,6	46,8
DCAD3	-115	-115
Pós-parto		
Matéria seca (%)	47.1	47,0
Proteína bruta (%/MS)	18.1	18.0
Extrato etéreo (%/MS)	2,72	2,72
Cinzas (%/DM)	6,93	7,39
FDN (%/MS)	34,4	34,9
ADF (%/MS)	17,9	17.3
NEL3 (Mcal/Kg MS) RDP3 (g/dia)	1,58	1,58
RUP3 (g/dia)	1355	1355
DCAD3	714	714
	197	197
Ácido graxo (%)		
C10:0 (Caprico)	0,05	0,06
C12:0 (Láurico)	0,13	0,16
C14:0 (Mirístico)	0,37	0,50
C16:0 (Palmitico)	20.1	19.0
C16:1 (Palmitoleico)	0,20	0,20
C17:0 (Heptadecanóico)	0,20	0,21
C18:0 (Esteárico)	4,25	4,67
C18:1n9c (Oleico)	24,5	22,6
C18:2n6c (Linoléico)	42,5	46.2
C20:0 (Araquídico)	0,66	0,60
C20:1n9 (cis-11-eicosenoico)	0,26	0,24
C18:3n3 (a-linolênico)	4,99	3,88
C21:0 (Henicosanóico)	0,06	0,08

Tabela 2 (continuação)

Ingredientes (Kg MS/dia)		
	Dieta pré-parto	Dieta pós-parto
C20:2 (cis-11,14-eicosadi-enólico)	0,09	0,10
C22:0 (Behênico)	0,63	0,57
C20:4n6 (Araquidônico)	0,16	0,14
C24:0 (Lignocérico) y Ácidos	0,66	0,61
graxos saturados (SFA) 27,1 y Ácidos graxos		26,5
insaturados 72,8 (UFA)		73,4

Nota 1. Níveis de garantia do núcleo pré-parto: Cálcio (mín.): 106 g/Kg – (máx.): 130 g/Kg; Fósforo (mín.): 30 g/Kg; Enxofre (mín.): 90 g/Kg; Kg; Magnésio (min): 20 g/Kg; Sódio (min): 31 g/Kg; Cloro (min): 130 g/kg; Cobalto (min): 12 mg/Kg; Cobre (min): 600 mg/Kg; Cromo (min): 30 mg/Kg; Ferro (min): 600 mg/Kg; Iodo (min): 60 g/Kg; Manganês (min): 1600 mg/Kg; Selênio (min): 16 mg/Kg; Zinco (min): 2400 mg/Kg; Biotina (min): 80 mg/Kg; Vitamina A (min): 480000 UI/Kg; Vitamina D3 (min): 200000 UI/Kg; Vitamina E (min): 12000 UI/Kg; Saccharomyces cerevisiae: 1,5× 109 UFC/Kg; Monen-sin: 500 mg/kg; Fluoreto (máx.): 300 mg/Kg

Nota 2. Níveis de garantia do núcleo pós-parto: Cálcio (mín.): 230 g/Kg – (máx.): 249 g/Kg; Fósforo (mín.): 40 g/Kg; Enxofre (mín.): 20 g/Kg; Kg; Magnésio (min):25 g/Kg; Sódio (min):70 g/Kg; Cobalto (min):15 mg/Kg; Cobre (min): 750 mg/Kg; Cromo (min): 20 mg/Kg; Ferro (min): 600 mg/Kg; Iodo (min): 40 g/Kg; Manganês (min): 2000 mg/Kg; Selênio (min): 22 mg/Kg; Zinco (min): 2850 mg/Kg; Biotina (min): 80 mg/Kg; Vitamina A (min): 350000 UI/

Kg; Vitamina D3 (min):100.000 UI/Kg; Vitamina E (min): 2.000 UI/Kg; Monensina: 1000 mg/kg

Nota 3. O NRC 2001 estimou a energia líquida de lactação (NEL), a diferença cátion-ânion na dieta (DCAD), a proteína degradável no rúmen (RDP) e a proteína não degradável no rúmen (RUP) das duas dietas.

acesso e sucção ao rúmen. Após a obtenção do fluido, seu pH foi medido. Uma porção foi filtrada para reduzir o azul de metileno e armazenada para determinar o perfil de ácidos graxos do rúmen. Ao mesmo tempo, o restante foi armazenado abaixo de 5 °C até a chegada ao laboratório para armazenamento e análises posteriores.

O leite foi coletado com amostradores individuais do sistema de ordenha, e uma amostra homogênea de toda a ordenha foi coletada. O leite foi inserido em tubos esterilizados com azidiol para contagem em placas padrão (CPP) e

com Bronopol para contagem de células somáticas (CCS) e composição química, depois enviado ao laboratório para análise.

Análise da composição da ração

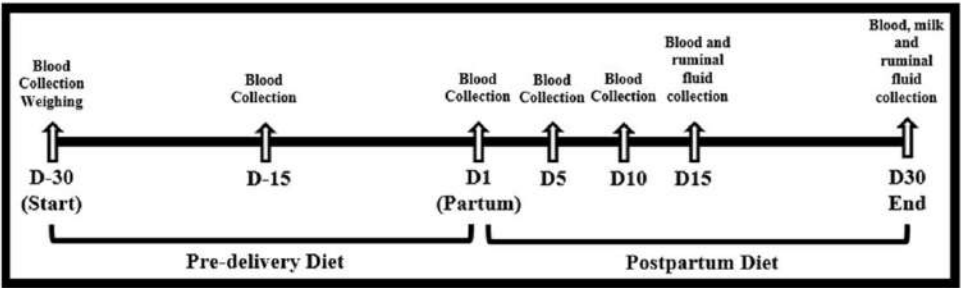
Para analisar a composição bromatológica dos alimentos utilizados, amostras homogêneas foram coletadas da dieta total pré e pós-parto de ambos os grupos experimentais. Essas amostras foram pré-secas em estufa de ventilação forçada a 55 °C por 72 h, retiradas da estufa e pesadas para determinação do teor parcial de matéria seca (MS), seguida de moagem em moinho Wiley (Marconi, modelo: MA340), utilizando peneira de malha de 1 mm. As amostras pré-secas e moídas foram aquecidas a 105 °C para obtenção da MS e do material mineral em forno mufla a 600 °C (Silva e Queiroz 2002). A proteína bruta foi determinada pelo método de micro-Kjeldahl (Método 984.13; AOAC, 1977). Para determinar o teor de fibra em detergente neutro (FDN), as amostras foram colocadas em sacos de poliéster (Komarek, 1993) e tratadas com uma solução de detergente neutro em um analisador de fibras ANKOM 200® a 100 °C por 1 h. As concentrações de fibra em detergente ácido (FDA) foram determinadas utilizando o mesmo equipamento, utilizando a metodologia ANKOM, seguindo os métodos propostos por Van Soest et al. (1994). A porção de extrato etéreo nas amostras foi quantificada utilizando um extrator automático de gordura SER158 (VELP®).

Scientífica) de acordo com a AOAC (1975).

Hemograma

As variáveis hematológicas foram obtidas por meio de tubos de sangue com EDTA coletados com o analisador hematológico automático VET3000 (EQUIP®), que determina as seguintes variáveis: leucócitos, linfócitos, granulócitos, monócitos, eritrócitos e contagem de plaquetas em células x 103 /µl. Também determina a concentração de hemoglobina (g/dL), hematócrito (%), volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) e amplitude de distribuição de hemácias (RDW-DP).

Fig. 1 Fluxograma das coletas de amostras realizadas ao longo do período experimental



Bioquímica sérica

As amostras coletadas em tubos sem anticoagulante foram centrifugadas em centrífuga de tubos QUIMIS® para obtenção do soro sanguíneo por dez minutos a 8000 rotações por minuto. Posteriormente, o soro foi armazenado em microtubos a -20°C até o momento da análise. Os níveis de proteína total, albumina, glicose, ureia, triglicerídeos e colesterol total foram avaliados no soro sanguíneo. Os kits ANALISA® foram utilizados em equipamento semiautomático (Bio Plus 2000®). A concentração de globulina foi calculada pela equação PT-AL.

Estado oxidativo sérico

A peroxidação lipídica foi medida através da quantidade de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), de acordo com Jentzsch et al. (1996). A reação é lida em um espectrofotômetro a 535 nm, e o resultado é expresso em nmoles de malondialdeído/ml de soro. Os tióis totais foram quantificados em nmol SH/mg de proteína usando a metodologia de Ellman (1959). A atividade da glutatona S-transferase (GST) sérica foi medida com base no método descrito por Habig et al. (1974) e expressa como U GST/mg de proteína. De acordo com Erel (2004), o método colorimétrico mediu os níveis séricos de antioxidantes como TAC. Os níveis de capacidade de redução férrica plasmática (FRAP) foram medidos usando a técnica descrita por Benzie e Strain (1996). Os resultados de TAC e FRAP foram expressos como nmol/g de proteína.

Ambiente ruminal

O fluido ruminal coletado quatro horas após a alimentação matinal nos dias 15 e 30 pós-parto usando um tubo ororuminal de 1,5 m e 11 mm de diâmetro (PROVAR®) foi alocado em coletores universais de 100 mL. Em seguida, o pH foi medido usando um medidor de pH digital portátil, modelo AK103 (TESTO®). Parte do fluido ruminal restante foi filtrada através de três camadas de gaze, armazenada em microtubos de 3 mL (EPPENDORF®) e congelada a -20°C para análise subsequente de ácidos graxos voláteis (AGV). Outra porção do fluido ruminal foi usada no teste de redução do azul de metileno para quantificar a atividade bacteriana no fluido; para esta metodologia por Dirksen e Vannevel (1969), o fluido foi filtrado imediatamente após a coleta, então 10 mL foram colocados em dois tubos de teste, 500 μL de azul de metileno foram adicionados a um deles. A partir daí, o tempo que a substância leva para ser consumida até retornar

A medição da cor original em comparação com a segunda alíquota é feita. O fluido não filtrado restante foi utilizado para a contagem de protozoários, realizada por meio de metodologia adaptada (Dehority 1993).

Para determinar os ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), amostras de fluido foram descongeladas a 5°C e agitadas manualmente para homogeneização. Alíquotas de 1 mL do sobrenadante do fluido ruminal

foram coletadas em microtubos de polipropileno (2 mL) e centrifugadas por 5 min ($12.300\times g$). Em seguida, 250 μL do sobrenadante foram transferidos para um novo microtubo contendo 250 μL de ácido fórmico. A mistura foi agitada manualmente e centrifugada por 3 min. Após a centrifugação, 250 μL do sobrenadante da mistura foram coletados em outro tubo de polipropileno contendo previamente 500 μL de solução de 3-octanol (665 $\mu\text{g mL}^{-1}$ em metanol), utilizada como padrão interno, homogeneizada e centrifugada novamente; 600 μL da amostra foram inseridos em um frasco de injeção e injetados em um cromatógrafo gasoso equipado com um detector de ionização de chama (GC-FID; Varian Star 3400, Palo Alto, EUA) e um amostrador automático (Varian 8200CX, Palo Alto, EUA); 1 μL do extrato foi injetado em modo split a 1:10. O gás de arraste utilizado foi hidrogênio a uma pressão constante de 20 psi. Os analitos (ácidos acético, propiônico, butírico, valérico e isovalérico) foram separados em uma coluna capilar CP-Wax 52CB (60 m $\times$ 0,25 mm; espessura da fase estacionária de 0,25 μm). A temperatura inicial da coluna foi ajustada em 80°C por 1 min e aumentada para 120°C a uma taxa de $8^{\circ}\text{C min}^{-1}$, depois para 230°C por $20^{\circ}\text{C min}^{-1}$, onde permaneceu por 1 min. As temperaturas do injetor e do detector foram ajustadas em 250°C . A validação do método compreendeu os seguintes parâmetros: seletividade, linearidade, faixa linear, repetibilidade, precisão, limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ) para ácidos acético, propiônico, butírico e isovalérico. A linearidade foi avaliada pelo cálculo de uma equação de regressão usando o método dos mínimos quadrados. Os valores de LOD e LOQ foram obtidos por diluições sequenciais para razões sinal-ruído de 3:1 e 6:1, respectivamente. A exatidão foi avaliada pela análise da repetibilidade de seis amostras replicadas. A exatidão foi determinada pela recuperação de quantidades conhecidas de substâncias padrão adicionadas a uma amostra diluída. Os resultados foram expressos como mol 100 mol⁻¹ de cada AGCC no fluido ruminal.

Análise do leite

A oxidação proteica foi medida pela técnica de produtos de oxidação proteica avançada (AOPP) descrita por Witko-Sarsat et al., (1998), com resultados apresentados em $\mu\text{mol/g}$ de proteína (AOPP). Os níveis de antioxidantes foram medidos pela capacidade de redução férrica do plasma (FRAP), de acordo com Benzie e Strain (1996), e a medição do CAT foi descrita de acordo com Erel (2004). Essas metodologias foram padronizadas para o leite, conforme descrito por Radavelli et al. (2016). Os resultados do FRAP foram expressos em mmol/g de proteína e do CAT em nmol equivalente de Trolox/L.

As análises de composição química, SPC e SCC foram conduzidas no Laboratório Estadual de Qualidade do Leite – LABLEITE de Concórdia -SC credenciada junto ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento por meio da portaria MAPA: Nº 212 de 31 de julho de 2014. Quantificação de gordura, proteína,

lactose, sólidos totais e extrato seco desengordurado foram realizados usando o Método de Espectrometria de Infravermelho Médio, de acordo com a norma ISO 9622—IDF Standard 141:2013. O Total Bacteriano A contagem foi realizada pelo método de citometria de fluxo, de acordo com a norma ISO 21187—IDF Standart 196 (2021), e a contagem de células somáticas pelo método de citometria de fluxo, de acordo com a norma ISO 13366—IDF Standart 148–2 (2006).

Para determinar o perfil de ácidos graxos no leite, a extração de lipídios foi realizada usando o método de Bligh e Dyer (1959) com adaptações. 1,5 g de amostras, 0,8 mL de água, 5 mL de metanol e 2,5 mL de clorofórmio foram adicionados a um tubo de polipropileno de 15 mL e a agitação mecânica foi realizada por 30 min. Em seguida, 2,5 mL de solução de clorofórmio e 1,5% de NaSO4 foram adicionados para promover um sistema bifásico. Essa mistura foi agitada por 2 min e então centrifugada por 15 min a 2000 rpm. Os lipídios obtidos da fase clorofórmica foram submetidos à análise de ácidos graxos.

A metilação do ácido graxo (FA) foi realizada utilizando o método de transesterificação proposto por Hartman e Lago (1973). 1 mL de solução metanólica de KOH 0,4 M foi adicionado aos lipídios extraídos em um tubo de ensaio e agitado em vórtex por 1 min. As amostras foram mantidas em banho-maria por 10 min à temperatura de ebulição. Posteriormente, foram resfriadas à temperatura ambiente e 3 mL de solução metanólica de H₂SO₄ 1 M foram adicionados, agitados em vórtex e mantidos em banho-maria por 10 min. Após o resfriamento, 2 mL de hexano foram adicionados e centrifugados a 2000 rpm por 10 min. Por fim, o hexano com ésteres metílicos de ácidos graxos (FAME) foi submetido à análise cromatográfica.

Um cromatógrafo gasoso modelo TRACE 1310 com detector de ionização de chama (Thermo Scientific) foi utilizado para determinar o FAME. Um microlitro de amostras foi injetado em um injetor split/splitless, operado em modo split com razão de 1:20 a 250 °C. Hidrogênio foi utilizado como gás de arraste a uma vazão constante de 1,5 mL/min. A separação dos FAMES foi realizada utilizando uma coluna cromatográfica RT 2560 (espessura de filme de 100 m × 0,25 mm × 0,20 μm, Restek, EUA).

A temperatura inicial do forno foi programada em 100 °C por 5 min e aumentada para 180 °C a uma taxa de 8 °C/min. Em seguida, aumentando para 210 °C a uma taxa de 4 °C/min e, finalmente, até 250 °C, aumentando para 20 °C/min e mantendo por sete minutos em condições isotérmicas. A temperatura do detector foi mantida constante em 250 °C. Os compostos FAME foram identificados comparando o tempo de retenção experimental com aqueles do padrão autêntico (FAME Mix-37, Sigma Aldrich, St. Louis, MO). Os resultados foram apresentados como uma porcentagem de cada AG identificado na fração lipídica, considerando o fator equivalente ao tamanho da cadeia FAME para FID e o fator de conversão de éster para o respectivo ácido (Material Suplementar 1), de acordo com Visentainer e Franco (2006).

Análise estatística

Todos os dados foram analisados usando o procedimento SAS “MIXED” (SAS Inst. Inc., Cary, NC, EUA; versão 9.4), com a aproximação de Sat-Terthwaite para determinar os graus de liberdade do denominador para o teste de efeitos fixos. A produção de leite e o consumo de ração foram testados para o efeito fixo do tratamento, utilizando o animal (tratamento) como efeito aleatório. Os dados de leite, fluido ruminal e sangue foram analisados como medidas repetidas e testados para os efeitos fixos do tratamento e do tratamento × dia, utilizando o animal (tratamento) como efeito aleatório. Os resultados do D-30 (30 dias antes do parto, “início do experimento”) foram incluídos como uma covariável independente. As pontuações do D-30 foram removidas do conjunto de dados para essas variáveis. para gerar a média por tratamento, mas foram mantidos como covariável. As médias foram separadas usando o método PDIFF, e todos os resultados foram relatados como LSMEANS seguido por SEM. A significância foi definida para os efeitos do tratamento e interação tratamento × dia quando p ≤ 0,05 e tendência quando p > 0,05 e p > 0,10.

Considerando os níveis de FRAP, calculamos o poder post hoc para os grupos usando o Proc Power do SAS. Utilizamos a média de cada grupo no soro e no leite, e seu erro padrão de erro padrão (EPM) com um alfa de 0,05, e chegamos a um poder razoável de 84,2% e 87,6, respectivamente.

Resultados

Desempenho

As variáveis de produção de leite, IMS e eficiência do leite nos períodos pré e pós-parto são apresentadas na Tabela 3. Não houve efeito do tratamento GSO ou tratamento x

Variável	SO	GSO	SEM	P:tratamento	1 P:tratamento x dia2	
Produção média de leite (L)	18,7	18,1	0,39	0,89	0,68	
Ingestão de ração (Kg/MS)						
Média: Pré-parto	6,58	6,81	0,11	0,86	Média: Pós-parto 10,5	0,81
10,5	0,08	0,95			Eficiência láctea (Kg/	0,94
		1,78	1,71	0,03	0,75	0,71
Kg)						

Nota 1. Demonstra o efeito do tratamento, onde letras diferentes na mesma linha mostram diferenças significativas (P<0,05) e tendências (P 0,05 e >0,1) entre os grupos

Nota 2. Demonstra a interação entre tratamento×dia, onde letras diferentes na mesma linha para “média” mostram uma diferença significativa (P<0,05) e tendência (P 0,05 e >0,1) entre os grupos

Fig. 2 Ingestão de matéria seca (Kg/vaca/dia) de animais nos grupos de tratamento e controle durante todo o período experimental (D1=Parto)

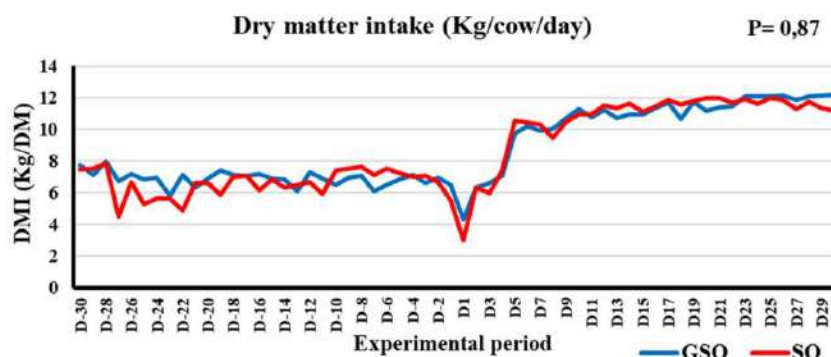
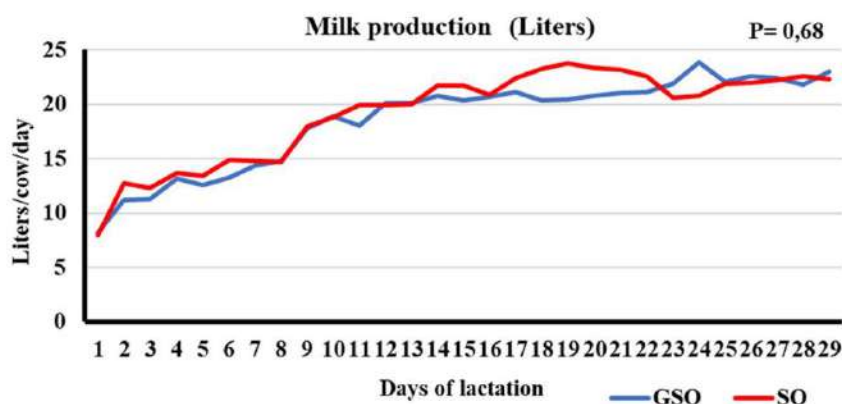


Fig. 3 Crescimento da produção média diária de leite nos grupos GSO e SO durante os primeiros 30 dias de lactação



interação diária entre os grupos nas variáveis produção e eficiência leiteira, bem como no IMS, no período experimental. A Figura 2 mostra o comportamento ingestivo dos animais ao longo do período. Houve menor IMS durante o período pré-parto, diminuição da ingestão nos dias que antecederam e seguiram o parto e aumento da ingestão após o início da lactação. A produção acumulada de leite também não apresentou diferença estatística ao longo dos primeiros 30 dias de lactação, como observado na Figura 3.

Hemograma

A Tabela 4 apresenta os resultados do hemograma dos animais durante o experimento, com interação tratamento x dia para a contagem de linfócitos, que foi significativamente maior no D1 no grupo GSO do que no grupo SO ($P = 0,05$). A interação também foi observada no dia 30, mostrando contagens de linfócitos menores nos animais do grupo GSO do que no grupo SO. Não houve efeito ou interação para a contagem de leucócitos, granulócitos, monócitos, eritrócitos totais e plaquetas, bem como para a porcentagem de hematócrito e concentração de hemoglobina, VCM, HCM, CHCM e RDW-DP entre os grupos.

Bioquímica sérica

O tratamento teve efeito, com uma concentração total de colesterol maior observada no grupo GSO ($P = 0,05$) do que no grupo SO. Houve uma interação tratamento x dia no D-15, onde a concentração foi menor no grupo GSO ($P = 0,02$), diferente da interação tratamento x dia observada nos dias 5, 15 e 30, quando a concentração de colesterol foi maior no grupo GSO do que no grupo SO.

Não houve efeito da interação tratamento x dia na concentração de glicose sanguínea, proteína total, ureia, albumina e globulinas (Tabela 5).

Estado oxidativo sérico

A Figura 4 mostra parte dos resultados do estado oxidativo no soro sanguíneo das vacas. Os níveis de TBARS tenderam a ser menores no grupo GSO em comparação ao SO ($P = 0,08$). A interação tratamento x dia foi observada para menor concentração de TBARS nos dias 5 e 10 ($P = 0,01$). Os níveis totais de tióis foram significativamente maiores no grupo GSO em comparação ao grupo SO ($P = 0,03$). A interação tratamento x dia nos dias -15, 1, 15 e 30 revelou níveis mais elevados de tióis totais no grupo GSO em comparação ao SO ($P = 0,01$).

Os níveis de capacidade de redução férrica plasmática (FRAP) e TAC apresentaram comportamento semelhante, com o efeito do tratamento,

Tabela 4 Parâmetros hematológicos de vacas Jersey primíparas alimentadas com óleo de semente de uva (GSO) ou óleo de soja (SO)

Variável	SO	GSO	SEM	P:tratamento1	P:tratamento x dia2
Leucócitos totais (× 103 / μL)	6,96	6,75		0,88	0,64
Linfócitos (× 103 / μL)				0,75	0,05
D-30	4,54	6,96	1,95		
D-15	2,98	3,22	0,62		
D1 (Nascimento)	4,32b	5,53a	0,35		
D5	3,28	3,84	0,27		
D10	2,8	3,14	0,27		
D15	2,95	3,04	0,28		
D30	5,37a	4,06b	0,31		
Granulócitos (× 103 / μL)	2,18	2,13	0,12	0,82	0,58
Monócitos (× 103 /μL)	1,39	1,29	0,17	0,73	0,46
Eritrócitos totais (× 106 /μL)	6,19	6,32	0,03	0,94	0,86
Hemoglobina (g/dL)	10,4	11,2	0,07	0,88	0,74
Hematócrito (%)	30,4	32,8	1,05	0,45	0,36
VCM (fL)	50,3	52,3	0,95	0,28	0,18
MCH (pág.)	17,3	18,4	0,14	0,9	0,85
CHCM (g/dL)	34,1	35,2	0,16	0,91	0,84
RDW-SD (fL)	34,0	34,9	0,24	0,89	0,83
Plaquetas (× 103 /μL)	358	325	10,7	0,18	0,11

Nota 1. Demonstra o efeito do tratamento, onde letras diferentes na mesma linha mostram diferenças significativas (P<0,05) e tendências (P = 0,05 e >0,1) entre os grupos

Nota 2. Demonstra a interação entre tratamento×dia onde letras diferentes (a, b) na mesma linha para "média" mostram uma diferença significativa (P<0,05) e tendência (P = 0,05 e >0,1) entre os grupos

ou seja, níveis mais elevados no grupo GSO em comparação ao grupo SO (P = 0,01). A interação tratamento x dia (dias 5, 10, 15 e 30) também foi observada quando níveis mais elevados foram detectados em animais do grupo GSO do que no grupo SO para FRAP (P = 0,01) e TAC (P = 0,03). A atividade da glutatona S-peroxidase (GST) apresentou uma interação tratamento x dia (P = 0,01) maior no D-15 no grupo GSO do que no SO. O grupo de tratamento observou menor atividade de GST nos dias

Tabela 5 Parâmetros bioquímicos séricos de vacas Jersey primíparas alimentadas com óleo de semente de uva (GSO) ou óleo de soja (SO)

Variável	SO	GSO	SEM	P:tratar	P:tratar x dia
Glicose (mg/dL)	53	54,1	2,51	0,89	0,71
Triglicerídeos (mg/dL)	25,3	22,9	0,95	0,62	0,46
Colesterol total (mg/dL)	102	102	3,98	0,05	0,02
D-30	95a	81,3b	3,65		
D-15	74,7	85,7	3,65		
D1 (Nascimento)	76,3b	106a	3,59		
D5	77,3	87,3	3,62		
D10	107b	126a	3,58		
D15	122b	147a	3,42		
D30					
Proteína total (g/dL)	9,45	8,98	0,45	0,79	0,65
Ureia (mg/dL)	41	40,2	1,23	0,82	0,77
Albumia (g/dL)	3,15	2,84	0,44	0,21	0,13
Globulina (g/dL)	6,17	6,12	0,51	0,8	0,61

Nota 1. Demonstra o efeito do tratamento, onde letras diferentes na mesma linha mostram diferenças significativas (P<0,05) e tendências (P = 0,05 e >0,1) entre os grupos

Nota 2. Demonstra a interação entre tratamento×dia onde letras diferentes (a, b) na mesma linha para "média" mostram uma diferença significativa (P<0,05) e tendência (P = 0,05 e >0,1) entre os grupos

5, 15 e 30 (P=0,01). Não houve efeito do tratamento na atividade da enzima GST (Tabela 6).

Ambiente ruminal

As variáveis para o ambiente ruminal estão na Tabela 7. O teste de redução do azul de metileno mostrou um efeito do tratamento, menor no grupo tratado do que no controle (P = 0,05); uma interação tratamento x dia foi observada no dia 15, com uma diminuição significativa no tempo de redução (P = 0,03). O pH do fluido mostrou uma tendência ao efeito do tratamento, sendo menor no grupo de tratamento (P = 0,06), e também foi significativamente menor no dia 15 (P = 0,04), caracterizando uma interação. A contagem de protozoários foi maior no grupo de tratamento do que no controle durante o experimento (P = 0,10) e maior no grupo de tratamento no dia 30 (P = 0,07). A concentração de AGCC total mostrou uma interação tratamento x dia, que foi maior no dia 15 no grupo controle (P = 0,05), mas não houve efeito do tratamento. A concentração e

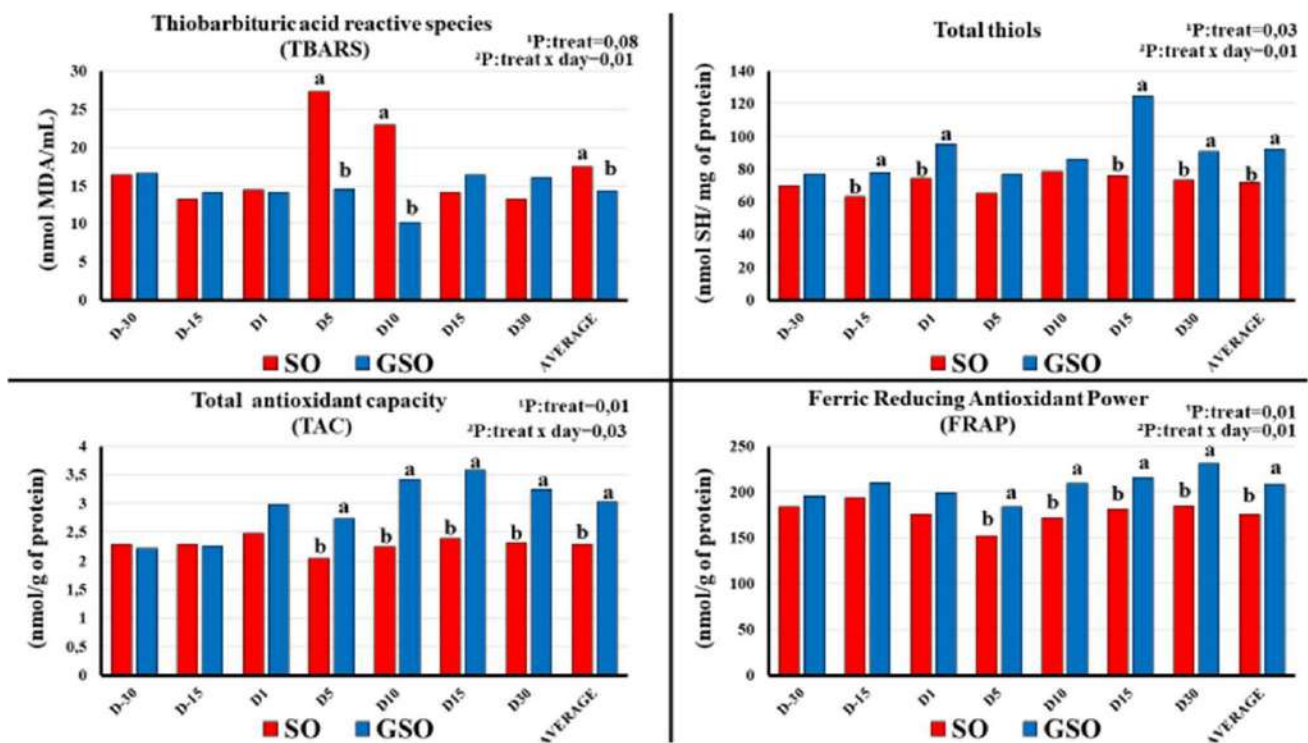


Fig. 4 Atividade antioxidante sérica de vacas Jersey primíparas alimentadas com óleo de semente de uva (GSO) ou óleo de soja (SO). Nota 1. Demonstra o efeito do tratamento, onde diferentes letras na mesma linha mostram diferenças significativas ($P \leq 0,05$) e tendências ($P \leq 0,05$ e $P \leq 0,1$) entre os grupos

grupos. Nota 2. Demonstra a interação entre tratamento $\times$ dia, onde letras diferentes na mesma linha para “média” indicam diferença significativa ($P \leq 0,05$) e tendência ($P \leq 0,05$ e $P \leq 0,1$) entre os grupos.

a porcentagem de ácido propiônico no rúmen foi maior no dia 15 no grupo de tratamento, efeito observado na interação tratamento $\times$ dia ($P = 0,05$), o que corrobora a maior relação acetato/propionato no grupo controle

observado no dia 15 ($P=0,05$). A interação tratamento $\times$ dia para a concentração de ácido acético (dia 15) foi menor no fluido ruminal das vacas que consumiram óleo de semente de uva; porém, ao avaliar a proporção (%) de ácidos acéticos, não observamos a mesma diferença. A concentração e

as porcentagens de ácido butírico, valérico e isovalérico não diferiram entre os grupos controle e tratamento.

Tabela 6 Atividade da enzima GST em vacas Jersey primíparas alimentadas com óleo de semente de uva (GSO) ou óleo de soja (SO)

Variável	SO	GSO	SEM	P:tratar	P:tratar x dia
GST ($\mu\text{molCDNB}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína)			0,25	0,01	
D-30	372	402	6,82		
D-15	364b	412a	6,72		
D1 (nascimento)	377	384	6,75		
D5	392a	364b	6,21		
D10	403	393	6,55		
D15	550a	480b	7,01		
D30	493a	448b	6,86		

Nota 1. Demonstra o efeito do tratamento, onde letras diferentes na mesma linha mostram diferenças significativas ($P \leq 0,05$) e tendências ($P \leq 0,05$ e $P \leq 0,1$) entre os grupos

Nota 2. Demonstra a interação entre tratamento $\times$ dia, onde letras diferentes (a, b) na mesma linha para “média” mostram diferença significativa ($P \leq 0,05$) e tendência ($P \leq 0,05$ e $P \leq 0,1$) entre os grupos

Composição, qualidade e estado oxidativo do leite

A composição química e qualitativa do leite é apresentada na Tabela 8. Não houve diferença entre os grupos para a concentração de gordura, proteína, lactose, sólidos totais e extrato seco desengordurado (DDE). Houve uma tendência para menores contagens de células somáticas (CCS) ($P = 0,09$) e menores contagens de placas padrão (CPP) ($P = 0,06$) no grupo de tratamento em comparação ao grupo controle. O estado oxidativo do leite produzido pelas vacas é mostrado na Fig. 5. Foi verificado um efeito do tratamento, com maior concentração das variáveis FRAP ($P = 0,03$) e CAT ($P = 0,05$) no leite das vacas do grupo de tratamento. Houve efeito do tratamento para AOPP, ou seja, menor concentração no leite das vacas do grupo de tratamento em comparação ao controle ($P = 0,01$).

Tabela 7 Variáveis do ambiente ruminal de vacas Jersey primíparas alimentadas com óleo de semente de uva (GSO) ou óleo de soja (SO)

Variável	SO	GSO	SEM	P:tratar	P:tratar x dia
PRAM (segundos)				0,05	0,03
D15	210a	169b	10,6		
D30	255	213	12,8		
pH				0,06	0,04
D15	6,61a	6,4b	0,01		
D30	6,54	6,42	0,01		
Protozoários (n°x 104 / mL)				0,10	0,07
D15	22,3	25,3	2,6		
D30	16,3b	21,5a	2,14		
Concentração de AGV, nmol/L					
AGV total (mmol/L)				0,23	0,05
D15	115a	96,5b	4,08		
D30	122	122	4,51		
Ácido acético (mmol/L)				0,15	0,01
D15	80,3a	68,0b	1,74		
D30	83,9	86,6	1,72		
Ácido propiônico (mmol/L)				0,82	0,03
D15	19,3	23,9	0,78		
D30	21,7	18,7	0,78		
Ácido butírico (mmol/L)	13,0	11,9	0,65	0,74	0,81
Ácido isovalérico (mmol/L)	1,49	1,39	0,12	0,89	0,94
Ácido valérico (mmol/L)	1,34	1,48	0,09	0,42	0,23
Resultados do VFA em proporção, %					
Ácido propiônico (%)				0,15	0,05
D15	16,3b	18,5a	0,15		
D30	15,3	16,7	0,15		
Ácido acético (%)	69,2	69,6	0,51	0,94	0,97
Ácido butírico (%)	10,9	10,8	0,12	0,92	0,95
Ácido isovalérico (%)	1,25	1,27	0,03	0,95	0,97
Ácido valérico (%)	1,33	1,33	0,04	0,96	0,98
Razão acética/propiônica				0,21	0,05
D15	4,31a	3,70b	0,03		
D30	4,27	4,26	0,03		

Nota 1. Demonstra o efeito do tratamento, onde letras diferentes na mesma linha mostram diferenças significativas (Py0,05) e tendências (P 0,05 e y0,1) entre os grupos

Nota 2. Demonstra a interação entre tratamentoxdia, onde letras diferentes (a, b) na mesma linha para "média" mostram uma diferença significativa (Py0,05) e tendência (P 0,05 e y0,1) entre os grupos

No perfil de ácidos graxos do leite, observou-se uma tendência à menor concentração de ácido oleico no grupo tratado (P = 0,1). O efeito do tratamento foi observado no aumento dos ácidos graxos saturados (AGS) no grupo tratado (P = 0,05). Ainda, houve uma diminuição dos ácidos graxos insaturados (AGI) no grupo tratado (P = 0,03). A concentração de ácidos graxos monoinsaturados (AGMI) foi menor no grupo tratado.

Tabela 8 Composição centesimal, SPC e SCC de vacas Jersey primíparas alimentadas com óleo de semente de uva (GSO) ou óleo de soja (SO)

Variável	ENTÃO	GSO	SEM	P:treat1
Gordura (g/kg)	33,7	33.1	0,22	0,92
Proteína (g/kg)	31,4	31,9	0,18	0,94
Lactose (g/kg)	46,7	46,3	0,09	0,97
Sólidos totais (g/kg)	121	120	0,31	0,91
DDE (g/kg)	87,5	87,4	0,19	0,95
CCS (x1000/mL)	124a	106b	3,85	0,09
SPC (UFCx1000/mL)	49.4a	34,1b	2,36	0,06

Nota 1. Demonstra o efeito do tratamento, onde diferentes letras (a, b) na mesma linha mostram diferenças significativas (Py0,05) e tendências (P 0,05 e y0,1) entre os grupos

grupo de tratamento em comparação com o controle (P = 0,01), e a relação AGU/AGS também foi significativamente menor no grupo de tratamento em comparação com o controle (P = 0,02). Os ácidos graxos restantes não diferiram entre os grupos. Também não houve diferença estatística na concentração de y3 e y6 ou na relação entre esses ácidos graxos (Tabela 9).

Discussão

A produção de leite, a IMS e, consequentemente, a eficiência leiteira dos animais tratados não foram afetadas pelo tratamento durante o estudo. Em um estudo recente, pesquisadores não relataram diferença na produção e na IMS de vacas holandesas que receberam infusão de ácido oleico (Dos Santos Neto; Prom; Lock, 2023). Da mesma forma, outro estudo não demonstrou efeito na produção de leite nos primeiros 21 dias de lactação, independentemente de as vacas consumirem ou não ácidos graxos y3 de linhaça ou óleo de peixe (Kra et al. 2021). Pesquisadores observaram uma tendência de melhora na produção de leite em vacas suplementadas com vitamina E no período de transição (Moghimi-Kandelousi et al. 2020). A suplementação de linhaça extrusada para vacas leiteiras que fornecem ácido linoleico nas três semanas anteriores ao parto aumentou a produção de leite (Moallem et al. 2020), e o estudo utilizou vacas holandesas israelenses múltiparas durante a lactação. Como este foi o primeiro estudo utilizando GSO na dieta de vacas, com efeitos interessantes na saúde das vacas, é essencial aprofundar a pesquisa, realizando novos estudos que possibilitem testar doses e, assim, definir a dose ideal para as vacas — em um período de transição, pensando na saúde animal.

De acordo com a literatura, a ingestão de ácidos graxos y3 pode alterar a resposta imune, pois os PUFA exercem alterações na ativação de células tanto no sistema imunológico inato quanto no adaptativo. Os ácidos graxos y3 e seus derivados podem atuar como moléculas sinalizadoras (Gutierrez et al., 2019). Como resultado, em nosso estudo, esperávamos efeitos mais significativos do tratamento sobre as variáveis imunológicas. No entanto, apenas a contagem de linfócitos diferiu; ou seja, no dia do nascimento, a

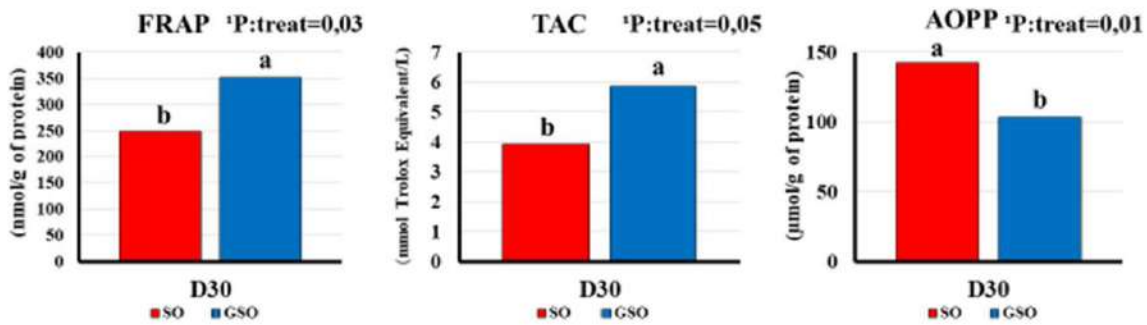


Fig. 5 Estado oxidativo: Capacidade de redução férrica do plasma (FRAP), capacidade antioxidante total (TAC) e produtos proteicos de oxidação avançada (AOPP) do leite de vacas Jersey primíparas alimentadas com uva. Óleo de semente (GSO) ou óleo de soja (SO). Nota 1. Demonstra o efeito do tratamento, onde letras diferentes na mesma linha mostram diferenças significativas (P $\leq$ 0,05) e tendências (P 0,05 e $\leq$ 0,1) entre os grupos.

Tabela 9 Perfil de ácidos graxos do leite de vacas Jersey primíparas alimentadas com óleo de semente de uva (GSO) ou óleo de soja (SO)

Ácido graxo	ENTÃO	GSO	SEM	P-tratamento ¹
C6:0 (Capróico)	0,4	0,6	0,12	0,28
C8:0 (Caprílico)	0,4	0,5	0,09	0,16
C10:0 (Capríco)	1,3	1,5	0,17	0,43
C11:0 (Undecanóico)	0,0	0,1	0,03	0,82
C12:0 (Láurico)	1,8	2,1	0,11	0,25
C14:0 (Mirístico)	8,2	9,5	0,24	0,46
C14:1 (Miristoleico)	0,4	0,4	0,07	0,68
C15:0 (Pentadecanóico)	0,6	0,7	0,13	0,92
C16:0 (Palmítico)	31,7	32,2	1,24	0,69
C16:1 (Palmitoleico)	1,6	1,2	0,16	0,11
C17:0 (Heptadecanóico)	0,7	0,7	0,04	0,95
C17:1 (cis-10-heptadecenóico)	0,3	0,2	0,03	0,61
C18:0 (Estearíco)	16,1	18,3	0,87	0,18
C18:1n3c (Oleico)	31,7a	27,3b	1,09	0,10
C18:2n6c (Linoléico)	2,7	2,7	0,03	0,93
C20:0 (Araquídico)	0,1	0,2	0,02	0,58
C20:1n9 (cis-11-eicosanóico)	0,0	0,0	0,01	0,89
C18:3n3 (a-linolênico)	0,2	0,2	0,01	0,92
C21:0 (Heneicosanóico)	0,4	0,5	0,02	0,86
C22:0 (Beenic)	0,0	0,1	0,00	0,77
C20:3n6 (cis8.11.14 eicosatrienoico)	0,0	0,0	0,00	0,96
C20:4n6 (Araquidônico)	0,0	0,0	0,00	0,80
C24:0 (Lignocérico)	0,0	0,0	0,00	0,65
C20:5n3 (cis-5.8.11.14.17- eicosapentaenóico)	0,0	0,0	0,00	0,21
C24:1n9 (Nervônico) $\bar{y}$	0,0	0,0	0,00	0,91
AG saturado (SFA) $\bar{y}$ AG	62,5b	67,5a	1,63	0,05
insaturado (UFA) $\bar{y}$ AG	37,4a	32,4b	0,87	0,03
monoinsaturado (MUFA) $\bar{y}$ AG	34,3a	29,3b	0,84	0,01
poliinsaturado (PUFA)	3,1	3,1	0,10	0,84
UFA/SFA	0,6a	0,4b	0,08	0,02
$\bar{y}$ $\bar{y}$ 6 $\bar{y}$	2,8	2,8	0,01	0,95
$\bar{y}$ 3	0,2	0,2	0,00	0,82
$\bar{y}$ 6/ $\bar{y}$ 3	10,3	9,6	0,41	0,73

Nota 1. Demonstra o efeito do tratamento, onde diferentes letras (a, b) na mesma linha mostram diferenças significativas (Py0,05) e tendências (P 0,05 e y0,1) entre os grupos

O número de linfócitos foi maior nas vacas do grupo de tratamento, mas ao final da pesquisa (DEL 30), a contagem foi menor; entretanto, essas alterações não alteraram as concentrações de proteínas totais e globulinas. No trabalho realizado por Veshkini et al. (2023a, b), utilizando infusão abomasal de ácidos graxos essenciais, observou-se que a contagem de leucócitos e linfócitos aumentou até o parto e, em seguida, diminuiu gradativamente, semelhante ao observado no presente estudo.

Não temos uma explicação para esse efeito na concentração de colesterol, visto que as dietas eram isoenergéticas. Ainda assim, é crucial investigar qual colesterol é mais alto (LDL ou HDL) ao considerar a saúde animal.

Os marcadores oxidativos demonstraram resultados benéficos para saúde da vaca com tendência à redução da peroxidação lipídica, o que também foi observado por Santos et al. (2022) quando vacas holandesas pré-parto consumiram óleo de semente de açaí, que possui ácidos graxos e propriedades antioxidantes semelhantes ao GSO. Efeitos antioxidantes em animais suplementados com resíduo de uva também foram observados na manutenção qualitativa da carne de cordeiro (Vieira et al. 2022). A formação de espécies reativas de oxigênio é normal e ainda mais significativa no período de transição (Basiricò et al. 2017); no entanto, quando excede a capacidade de neutralização dos antioxidantes, causa estresse oxidativo e danos teciduais, reforçando a importância de níveis de antioxidantes adequados, principalmente em períodos críticos (Abuelo et al. 2015). A alta atividade antioxidante é confirmada pelo aumento dos níveis séricos e lácteos de FRAP e TAC e a consequente redução de AOPP, corroborando um aumento na proporção de tióis totais no organismo dos animais tratados. Em concordância, Mu et al. (2020) concluíram que a suplementação de proantocianidina de semente de uva na dieta de cordeiros teve efeitos positivos na atividade antioxidante e na função hepática. Os antioxidantes do leite podem beneficiar a saúde humana.

saúde, embora este ainda não seja um critério de precificação do produto. Acredita-se que a menor atividade da GST no grupo de tratamento nos dias 5, 15 e 30 deva estar correlacionada com a redução de oxidantes no soro sanguíneo, desestimulando a ação da enzima, essencial na desintoxicação, transporte e eliminação de produtos do estresse oxidativo. (Dasari et al.

2018). Em geral, são observadas melhorias benéficas na saúde dos animais tratados.

Observamos um efeito discreto no ambiente ruminal; considerando que não houve impacto nas variáveis de desempenho, esperava-se que não houvesse alterações significativas. Somente no dia 15 pós-parto, as vacas que consumiram óleo de semente de uva apresentaram menor concentração de AGV totais devido aos menores níveis de ácido acético; no entanto, não temos uma explicação para o mecanismo envolvido. A maior atividade bacteriana é positiva, assim como a maior produção de propionato, reduzindo a relação acetato/propionato, conforme relatado por Akhlaghi et al. (2022). No entanto, existem poucas relações, visto que essa fração lipídica suplementada é pouco utilizada pelos microrganismos do rúmen; sua porção lipídica estrutural é em torno de

10% e mais de 90% dos ácidos graxos ambientais são saturados (Kozloski 2019). Embora as dietas fossem isoenergéticas e isoproteicas, o pH foi maior no fluido ruminal das vacas do grupo tratado com GSO, mas permaneceu dentro dos parâmetros aceitáveis. Para uma conclusão mais assertiva de que o tratamento poderia prejudicar o ambiente ruminal, seriam necessárias coletas em mais pontos no período pós-tratamento.

Na literatura, alguns autores citam mudanças na composição proximal do leite, como a redução na síntese de gordura do leite em vacas leiteiras (Bernard et al. 2018), com a manutenção da produção e composição do leite (Lock et al.

2008). Há também relatos de diminuição da produção de leite e lactose após a suplementação com ácidos graxos (Bell e Kennelly, 2003). Em nosso estudo, a composição centesimal não diferiu. Ainda assim, a contagem de células somáticas pode ter diminuído devido à melhora na saúde do animal, inclusive considerando a redução de células inflamatórias, correlacionada com a redução de TBARS, conforme observado por Santos et al. (2022).

A administração de ração enriquecida com extrato de azeitona, uma fonte de polifenóis, aumentou a proporção de PUFA $\gamma 6$ para $\gamma 3$ de 3:1 para 4:1 (Di Meo et al. 2023). De acordo com o mesmo autor, os níveis de MUFA e SFA foram mantidos, resultando em um aumento significativo de PUFA após 15 dias de administração (Di Meo et al. 2023). Em nosso estudo, apesar da suplementação de PUFA, os níveis de SFA aumentaram no leite em comparação ao leite insaturado. Como o leite tinha uma quantidade mais significativa de SFA, o que significa lipídios mais estáveis, essa mudança pode ter influenciado a estabilidade do leite, que tinha menos oxidação e uma quantidade mais substancial de antioxidantes. Fautex et al. (2016) também observaram um desafio à estabilidade oxidativa do leite pela suplementação de óleo de linhaça em vacas leiteiras, o que foi indicado por um aumento acentuado em todos os produtos de oxidação.

Esses resultados mostram que o GSO não seria desejável se buscássemos modular positivamente a qualidade do leite para obter quantidades mais significativas de ômega. É essencial destacar que, nos últimos anos, a sociedade tem buscado alimentos cada vez mais saudáveis e com menor teor de gordura saturada, pois sabe-se que esse tipo de gordura, quando consumido constantemente, pode comprometer o funcionamento do sistema cardiovascular em humanos (Maki; Dicklin; Kirkpatrick, 2021).

Em conclusão, o óleo de semente de uva não afetou o consumo de ração das vacas durante todo o período experimental. O consumo de GSO teve efeitos benéficos na saúde das vacas durante o período de transição. período de transição como foco principal na atividade antioxidante, reduzindo as oxidações no soro e no leite das vacas. A ingestão de GSO pelas vacas alterou discretamente o ambiente ruminal. Ainda assim, as vacas apresentaram pH mais baixo, maior atividade bacteriana e vários protozoários associados a uma menor concentração de AGV aos 15 dias de lactação. O aditivo não afetou a composição centesimal do leite. Ainda assim, a soma de AGS no leite foi maior nas vacas do grupo que recebeu

GSO, enquanto a soma de ácidos graxos insaturados foi menor nesses animais. Como este estudo utilizou apenas uma dose do tratamento, estudos adicionais devem ser realizados para definir uma dose ideal que seja economicamente viável e garanta os mesmos benefícios. Outro ponto é considerar que o custo de extração e purificação do óleo agrega valor ao produto, portanto, em algumas situações, o uso do resíduo in natura em formas mais grosseiras pode ser considerado.

Informações suplementares A versão online contém material suplementar disponível em <https://doi.org/10.1007/s11250-024-04064-1>.

Agradecimentos Os autores agradecem à Universidade Estadual de Santa Catarina – UDESC, onde o estudo e a maioria das análises foram realizados. Agradecem também à Universidade Federal de Santa Maria pelas contribuições.

Contribuições dos autores: MH Signor, AL Dos Santos e AS Da Silva contribuíram para o desenho e implementação da pesquisa para analisar os resultados. MG Vitt, L Nora, NG Correa, RVP Lago e GJ Wols-chick participaram da execução do experimento e da coleta de amostras e dados. ACH Xavier, B Bissacotti e B Klein realizaram as análises laboratoriais. Todos os autores discutiram os resultados e contribuíram para o manuscrito final.

Financiamento Nenhum.

Disponibilidade de dados Todos os dados e materiais usados no experimento estão disponíveis e prontos para serem fornecidos.

Declarações

Declaração de ética O Comitê de Ética para Uso de Animais em Pesquisa da UDESC aprovou o projeto (número de protocolo 4200270922).

Consentimento para participar Todos os nomes na lista de autores estavam envolvidos em vários estágios de experimentação ou escrita.

Consentimento para publicação Todos os autores concordaram em submeter o trabalho para publicação na *Tropical Animal Health and Production*.

Conflito de interesses Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

Referências

Abuelo A, Hernández J, Benedito JL, Castillo C (2015) A importância do estado oxidativo do gado leiteiro no período periparturiente: revisitando a suplementação com antioxidantes. *J Anim Physiol Anim Nutr* 99:1003–1016. <https://doi.org/10.1111/jpn.12273>

Akhlaghi B, Ghasemi E, Alikhani M, Ghaffari MH, Razzaghi A (2022) Efeitos da suplementação de casca de romã com fontes de ácidos graxos sobre o estresse oxidativo, os metabólitos sanguíneos e a produção de leite de vacas leiteiras alimentadas com dietas ricas em concentrado. *Anim Feed Sci Technol* 286:115228. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2022.115228>

AOAC - Associação de Químicos Agrícolas Oficiais (1975) Métodos oficiais de análise, 12ª ed. Washington, p. 1094

AOAC - Associação de Químicos Agrícolas Oficiais (1977) Métodos oficiais de análise, 16ª edição. Arlington, p. 127

Basiricò L, Morera P, Dipasquale D, Tröschner A, Bernabucci U (2017) Comparação entre ácido linoléico conjugado e ácidos graxos essenciais na prevenção do estresse oxidativo em células epiteliais mamárias bovinas

células. *J Dairy Sci* 100:2299–2309. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-11729>

Bell JA, Kennelly JJ (2003) Comunicação breve: Infusão pós-ruminal de ácidos linoleicos conjugados impacta negativamente a síntese de leite em vacas holandesas. *J Dairy Sci* 86:1321–1324. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(03\)73716-3](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(03)73716-3)

Benjamin AL, Korkmaz FT, Elsasser TH, Kerr DE (2016) A exposição neonatal a lipopolissacarídeos não diminui a resposta imune inata a um desafio subsequente com lipopolissacarídeos em bezerros machos holandeses. *J Dairy Sci* 99:5750–5763. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-10804>

Benzie IF, Strain JJ (1996) Capacidade de redução férrica plasmática (FRAP) como medida de “poder antioxidante”: o ensaio frap. *Anal Biochem* 1:70–76. <https://doi.org/10.1006/abio.1996.0292>

Bernard L, Bonnet M, Delavaud C, Delosiére M, Ferlay A, Fougere H, Graulet B (2018) Glóbulo de gordura do leite em ruminantes: compostos principais e secundários, regulação nutricional e diferenças entre espécies. *Eur J Lipid Sci Technol* 120:1700039. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201700039>

Bligh EG, Dyer WJ (1959) Um método rápido de extração e purificação de lípidios totais. *Can J Biochem Physiol* 37:911–917. <https://doi.org/10.1139/o59-099>

Bobé G, Lindberg GL, Reutzel LF, Hanigan MD (2009) Efeitos da suplementação lipídica na produção e composição do leite de vacas com diferentes fenótipos de γ -lactoglobulina. *J Dairy Sci* 92:197–203. <https://doi.org/10.3168/jds.2008-1252>

Dasari S, Ganjavi MS, Yellanurkonda P, Basha S, Meriga B (2018) Papel das glutatona S-transferases na desintoxicação de um hidrocarboneto aromático policíclico, o metilcolantreno. *Chem Biol Interact* 294:81–90. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2018.08.023>

Dehority BA (1993) Manual de laboratório para classificação e morfologia de protozoários ciliados do rúmen. CRC Press

Di Meo MC, Salzano A, Zotti T, Palladino A, Giaquinto D, Maruccio L, Romanucci R, Rocco M, Zarrelli A, D’Occhio MJ, Campanile G, Varricchio E (2023) Perfil de ácidos graxos plasmáticos em vacas leiteiras italianas Holstein-Friesian suplementadas com polifenóis naturais da oliveira Olea Europaea L. *Veterinary and Animal Science* 21:100298. <https://doi.org/10.1016/j.vas.2023.100298>

Dirksen DI, Vannevel CJ (1969) Ist die methylenblau probe als sch-nelltest fue dir klinische pansensafuntersuchung gelinet. *Dtsch Tierarztl Wochenschr* 76:305–309

dos Santos Neto, JM, Prom, CM e Lock, AL, 2023. Infusão abomasal de ácido oleico e emulsificante exógeno alteram a digestibilidade de ácidos graxos e as respostas de produção de vacas leiteiras em lactação, *Journal of Dairy Science*. <https://doi.org/10.3168/jds.2022-23038>

Ellman GL (1959) Grupos sulfidrila teciduais. *Arch Biochem Biophys* 82:70–77. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(59\)90090-6](https://doi.org/10.1016/0003-9861(59)90090-6)

Erel O (2004) Um novo método de medição direta automatizada para a capacidade antioxidante total usando uma cáção radical ABTS de nova geração e mais estável. *Bioquímica Clínica* 37(4):277–285

Fauteux MC, Gervais R, Rico DE, Lebeuf Y, Chouinard PY (2016) Produção, composição e estabilidade oxidativa do leite altamente enriquecido em ácidos graxos poli-insaturados de vacas leiteiras alimentadas com concentrado de proteína de alfafa ou vitamina E suplementar. *J Dairy Sci* 99:4411–4426. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-10722>

Freitas LS (2007) Desenvolvimento de procedimentos de remoção do óleo de semente de uva e caracterização química dos compostos extraídos. Tese. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, pág. 227

Gessner DK, Koch C, Romberg FJ, Winkler A, Dusel G, Herzog E, Most E, Eder K (2015) Efeito do extrato de semente de uva e de farelo de bagaço de uva no desempenho do leite e na expressão de genes de estresse e inflamação do retículo endoplasmático no fígado de vacas leiteiras no início da lactação. *J Dairy Sci* 98:8856–8868. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-9478>

- Glasser F, Ferlay A, Chilliard Y (2008) Suplementos lipídicos de oleaginosas e composição de ácidos graxos do leite de vaca: uma meta-análise. *J Dairy Sci* 91:4687–4703. <https://doi.org/10.3168/jds.2008-0987>
- Gökçtürk NB, Akkurt M (2001) Teor de óleo e propriedades de qualidade do óleo de algumas sementes de uva. *J Turco de Agricultura e Silvicultura* 25(3):163–168
- Gutiérrez S, Svahn SL, Johansson ME (2019) Efeitos dos ácidos graxos ômega-3 nas células imunológicas. *Int J Mol Sci* 20:5028. <https://doi.org/10.3390/ijms20205028>
- Habig, WH, Pabst, MJ e Jakoby, WB, 1974. Glutathione S-Transferases *Journal of Biological Chemistry*, 249, 7130–7139. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)42083-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)42083-8)
- Hartman L, Lago RC (1973) Preparação rápida de ésteres metílicos de ácidos graxos a partir de lipídios. *Lab Pract* 22:475–6 passim
- Ianni A, Martino G (2020) Suplementação dietética com bagaço de uva em vacas leiteiras: Efeito na qualidade nutricional do leite e seus derivados. *Foods* 9:168. <https://doi.org/10.3390/foods9020168>
- Jabeen A, Baig MT, Shaikh S, Sarosh N, Kashif SS, Shahid U, Soomro H, Mirza AS, Pirzada QA (2021) Revisão sobre os efeitos farmacológicos do óleo de semente de uva. *J Biol, Res Appl Sci*. 12(2):154–159. <https://doi.org/10.37962/jbas.v12i2.274>
- Jentzsch AM, Bachmann H, Fürst P, Biesalski HK (1996) Análise aprimorada de malondialdeído em fluidos corporais humanos. *Free Radical Biol Med* 20:251–256. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(95\)02043-8](https://doi.org/10.1016/0891-5849(95)02043-8)
- Komarek RJ, Gardner RM, Buchanan CM, Gedon S (1993) Biodegradação de acetato de celulose e propionato de celulose radiomarcados. *J Appl Polym Sci* 50:1739–1746. <https://doi.org/10.1002/app.1993.070501009>
- Kozłowski GV (2019) *Bioquímica dos ruminantes*. 3 ed. Santa Maria, RioGrande do Sul. EditoraUFSM
- Kra G, Nemes-Navon N, Daddam JR, Livshits L, Jacoby S, Levin Y, Zachut M, Moallem U (2021) Análise proteômica de células mononucleares do sangue periférico e estado inflamatório em vacas leiteiras pós-parto suplementadas com diferentes fontes de ácidos graxos ômega-3. *J Proteomics* 246:104313. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2021.104313>
- Lock AL, Rovai M, Gipson TA, De Veth MJ, Bauman DE (2008) Um suplemento de ácido linoleico conjugado contendo ácido linoleico conjugado trans-10, cis-12 reduz a síntese de gordura do leite em cabras lactantes. *J Dairy Sci* 91(9):3291–3299. <https://doi.org/10.3168/jds.2008-1071>
- Maki KC, Dicklin MR, Kirkpatrick CF (2021) Gorduras saturadas e saúde cardiovascular: evidências e controvérsias atuais. *J Clin Lipidol* 15:765–772. <https://doi.org/10.1016/j.jacl.2021.09.049>
- Moallem U, Lehrer H, Livshits L, Zachut M (2020) Os efeitos do ácido γ -linolênico ômega-3 do óleo de linhaça suplementado em vacas leiteiras de alta produtividade na produção, saúde e fertilidade. *Livest Sci* 242:104302. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2020.104302>
- Moghimi-Kandelousi M, Alamouti AA, Imani M, Zebeli Q (2020) Uma meta-análise e meta-regressão dos efeitos da suplementação de vitamina E no enriquecimento sérico, saúde do úbere, produção de leite e desempenho reprodutivo de vacas em transição. *J Dairy Sci* 103:6157–6166. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-17556>
- Molosse VL, Deolindo GL, Cécere BG, Marcon H, da Rosa G, Vedo-vatto M, Zotti CA, Silva AD, Fracasso M, Morsch VM, Carvalho RA, Pereira WAB, Da Silva AS (2021) Efeito da suplementação dietética com farinha de resíduo de uva no ganho de peso, perfil metabólico, leucograma, proteinograma e resposta antioxidante em cordeiros lactentes. *Res Vet Sci* 139:112–120. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2021.07.004>
- Molosse VL, Deolindo GL, Lago RVP, Cécere BGO, Zotti CA, Vedovato M, Copetti PM, Fracasso M, Morsch VM, Xavier ACH, Wagner R, da Silva AS (2023) Os efeitos da inclusão
- De bagaço de uva ensilado e desidratado na dieta de bovinos de corte: desempenho de crescimento, saúde e viabilidade econômica. *Anim Feed Sci Technol* 302:115671. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2023.115671>
- Moretti P, Paltrinieri S, Trevisi E, Probo M, Ferrari A, Minuti A, Giordano A (2017) Intervalos de referência para parâmetros hematológicos e bioquímicos, proteínas de fase aguda e marcadores de oxidação em vacas leiteiras da raça Holandesa por volta de 3 e 30 dias após o parto. *Res Vet Sci* 114:322–331. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2017.06.012>
- Mota MF, Neto AP, Santos GT, Fonseca JF, Ciffoni EMG (2006) Período de transição na vaca leiteira. *Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR. Umuarama* v.9, n.1, pp 77–81
- Mu C, Yang W, Wang P, Zhao J, Hao X, Zhang J (2020) Efeitos de uma dieta rica em concentrado suplementada com proantocianidinas de semente de uva sobre o desempenho do crescimento, função hepática, qualidade da carne e atividade antioxidante em cordeiros em fase de terminação. *Anim Feed Sci Technol* 266:114518. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2020.114518>
- Nasr AM, Aboul Ela SE-DS, Ismail IE, Aldahrani A, Soliman MM, Alotaibi SS, Bassiony SS, Abd El-Hack ME (2022) Um estudo comparativo entre suplementações dietéticas de antibióticos, óleos de semente de uva e camomila sobre o desempenho do crescimento e as propriedades da carcaça de coelhos em crescimento. *Saudi Journal of Biological Sciences* 29:2483–2488. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2021.12.016>
- Olegário LS, Travália B, Santos JAB, Silva MAA (2015) Estudo prospectivo sobre óleo de semente de uva. In: 6º Simpósio Internacional de Inovação Tecnológica v. 3, n. 1, páginas 306–316. <https://doi.org/10.7198/S2318-3403201500030037>
- Ortolani EL (2009) *Enfermidades do período de transição*. Ciência Animal Brasileira. Zootecnia Brasileira 1. <https://doi.org/10.5216/cab.v1i0.7660>
- Palmquist DL, Mattos WRS (2006) Metabolismo de lipídeos. In: *Nutrição de Ruminantes*. Jaboticabal: Funep, 1 ed. pág. 583
- Pi Y, Ma L, Pierce KM, Wang HR, Xu JC, Bu DP (2019) A suplementação de óleo de semente de borracha e óleo de linhaça altera a digestão, a fermentação ruminal e o perfil de ácidos graxos do rúmen de vacas leiteiras. *Animal* 13:2811–2820. <https://doi.org/10.1017/S175173111900137X>
- Radavelli WM, Campigotto G, Machado G, Bottari NB, Bochi G, Moresco RN, Morsch VM, Schetinger MRC, Bianchi A, Bald-issera MD, Ferreira R, da Silva AS (2016) Efeito da indução da lactação na produção e composição do leite, estado oxidativo e antioxidante e variáveis bioquímicas. *Comp Clin Pathol* 25:639–648. <https://doi.org/10.1007/s00580-016-2243-z>
- Rockenbach II, Rodrigues E, Gonzaga LV, Fett R (2010) Composição de ácidos graxos de óleo de semente de uva (*Vitis vinifera* L. e *Vitis labrusca* L.). *Braz J Food Technol* 13:23–26. <https://doi.org/10.4260/BJFT20101304104>
- Santos, DS Dos, Klauck, V., Theisen, C., Bordigon, B., Farina, R., Pereira, WAB, Souza, CF, Baldissera, MD, Schogor, ALB, Vedovatto, M., Palmer, EA e Silva, AS Da, 2022. A adição de óleo de açaí durante o período de seca de vacas holandesas melhora a qualidade do colostro e as respostas imunológicas de seus bezerras, *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 94. <https://doi.org/10.1590/0001-376520220201592>
- Santos NW, Santos GTD, Silva-Kazama DC, Grande PA, Pintro PM, De Marchi FE, Jobim CC, Petit HV (2014) Produção, composição e antioxidantes no leite de vacas leiteiras alimentadas com dietas contendo óleo de soja e silagem de resíduo de uva. *Livest Sci* 159:37–45. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2013.11.015>
- Shiri-Shahsavari MR, Alijani S, Parsamanesh N, Nazari SS, Moaz-zen S, Majnoui A, Sadeghi N, Rasouli A (2023) O efeito do óleo de semente de uva na hiperglicemia, dislipidemia e inflamação relacionadas ao diabetes em ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina

- Obesidade. *Medicina* 37:100476. <https://doi.org/10.1016/j.obmed.2022.100476>
- Silva DJ, Queiroz AC (2002) Análise de alimentos: métodos químicos e biológicos. Viçosa: UFV, Imprensa Universitária, p 239
- Silva, ME dos S., Grisi, CVB, Silva, SP da, Madruga, MS, & Silva, FAP da. 2022. Potencial tecnológico do resíduo agroindustrial da polpação de uva (*Vitis* spp.) para aplicação em produtos cárneos: Uma revisão. *Food Bioscience*, 49, 101877. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2022.101877>
- Sirohi R, Tarafdar A, Singh S, Negi T, Gaur VK, Gnansounou E, Bharathiraja B (2020) Processamento verde e potencial biotecnológico do bagaço de uva: Tendências e oportunidades atuais para uma biorrefinaria sustentável. *Biores Technol* 314:123771. <https://doi.org/pt/org/10.1016/j.biortech.2020.123771>
- Van Soest PJ (1994) Ecologia nutricional do ruminante, Ithaca, NY: Cornell University Press. <https://doi.org/10.7591/9781501732355>
- Vargas-Bello-Pérez E, Cancino-Padilla N, Romero J, Garnsworthy PC (2016) Análise quantitativa de populações bacterianas ruminais envolvidas no metabolismo lipídico em vacas leiteiras alimentadas com diferentes óleos vegetais. *Animal* 10:1821–1828. <https://doi.org/10.1017/S1751731116000756>
- Vargas-Bello-Pérez E, Looor JJ, Garnsworthy PC (2020) Transporte de ácidos graxos no plasma de vacas tratadas com pulsos ruminais de óleo de peixe e óleo vegetal parcialmente hidrogenado. *Livest Sci* 236:104018. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2020.104018>
- Veshkini, Arash, Ceciliani, F., Bonnet, M. e Hammon, HM, 2023. Revisão: Efeito de ácidos graxos essenciais e ácido linoleico conjugado na fisiologia adaptativa de vacas leiteiras durante o período de transição, *Animal*, 100757. <https://doi.org/10.1016/j.animal.2023.100757>
- Veshkini, A., Gnott, M., Vogel, L., Kröger-Koch, C., Tuchscherer, A., Tröscher, A., Bernabucci, U., Trevisi, E., Starke, A., Mielenz, M., Bachmann, L. e Hammon, HM, 2023. A infusão abomasal de ácidos graxos essenciais e ácido linoleico conjugado durante o final da gestação e o início da lactação afeta marcadores imuno-hematológicos e de estresse oxidativo em vacas leiteiras. *Journal of Dairy Science*. <https://doi.org/10.3168/jds.2022-22514>
- Vieira C, Guerra-Rivas C, Martínez B, Rubio B, Manso T (2022) Efeitos da suplementação com bagaço de uva na dieta de ovelhas lactantes, em comparação com a vitamina E na vida útil da carne de cordeiros lactantes. *Meat Sci* 184:108666. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2021.108666>
- Visentainer JV, Franco MRB (2006) Ácidos Graxos em Óleos e Gorduras: Identificação e Quantificação, 1 ed. São Paulo, pág. 120
- Witko-Sarsat, V., Friedlander, M., Nguyen Khoa, T., Capeillère-Blan-din, C., Nguyen, AT, Canteloup, S., Dayer, JM, Jungers, P., Drüeke, T. e Descamps-Latscha, B., 1998. Produtos avançados de proteínas de oxidação como novos mediadores de inflamação e ativação de monócitos na insuficiência renal crônica, *Journal de imunologia* (Baltimore, Maryland: 1950), 161, 2524–32

Nota do editor A Springer Nature permanece neutra em relação a reivindicações jurisdicionais em mapas publicados e afiliações institucionais.

A Springer Nature ou seu licenciante (por exemplo, uma sociedade ou outro parceiro) detém direitos exclusivos sobre este artigo sob um contrato de publicação com o(s) autor(es) ou outro(s) detentor(es) de direitos; o autoarquivamento da versão manuscrita aceita deste artigo pelo autor é regido exclusivamente pelos termos desse contrato de publicação e pela lei aplicável.



Listas de conteúdo disponíveis no [ScienceDirect](#)

Pesquisa com Pequenos Ruminantes

página inicial do periódico: www.elsevier.com/locate/smallrumres



Adição de própolis vermelha à dieta de cordeiros Lacaune: efeitos na saúde animal, ambiente ruminal, desempenho e qualidade da carne

Guilherme L. Deolindo ^{a,b}, Vitor L. Molosse ^d, Bruno GO C´ecere sm, Fernanda Picoli ^d,
Luísa Nora sm, Carlos Marcon ^b, Bruna Klein ^d, Bianca F. Bissacotti ^c, Priscila M. Copetti ^c,
Luiz Eduardo L. Silva ^e, Roger Wagner ^e, Anieli P. Kempka ^f, Denise N. Araujo ^{a,b},
Aleksandro S. da Silva ^{a,b,*}

^a Programa Multicêntrico de Pós-graduação em Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC), Lages, Brasil

^b Programa de Pós-graduação em Zootecnia, UDESC, Chapecó, Brasil em Bioquímica

^c Programa de Pós-graduação em Toxicológica, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Brasil

^d Departamento de Zootecnia, UDESC, Brasil

^e Departamento de Ciência de Alimentos, UFSM, Brasil

^f Departamento de Engenharia de Alimentos, UDESC, Brasil

INFORMAÇÕES DO ARTIGO

Palavras-chave:
Produtos apícolas
Criação de ovelhas
Aditivo alimentar
Própolis

RESUMO

Este estudo determinou a influência do extrato etanólico de própolis vermelha na dieta de cordeiros sobre o ambiente ruminal, a saúde animal e o crescimento. Dois experimentos foram realizados para atingir esses objetivos. Estudo piloto: Vinte e quatro cordeiros Lacaune fêmeas foram divididos em quatro grupos, com três repetições e dois animais por repetição (baía): T0 (Controle), TP1.3, TP2.7 e TP5.3, representando 0, 1.3, 2.7 e 5.3 mL de extrato de própolis por animal/dia, respectivamente. O maior ganho de peso diário foi observado em cordeiros que consumiram 2,7 mL de extrato de própolis por dia, e eles também tiveram a menor taxa de conversão alimentar em comparação ao controle. Menores contagens totais de leucócitos foram observadas em cordeiros que consumiram extrato de própolis em comparação ao controle devido às menores contagens de granulócitos e linfócitos. Os níveis de ceruloplasmina e proteína C-reativa foram menores no soro de cordeiros que consumiram própolis em comparação ao controle. Cordeiros que consumiram 1,3 e 2,7 mL de extrato de própolis apresentaram menores níveis de TBARS do que o controle. O efeito do tratamento foi observado para o pH ruminal, que foi maior nos cordeiros que consumiram extrato de própolis do que no controle. Uma menor concentração de ácidos graxos de cadeia curta foi observada em cordeiros que consumiram própolis do que o controle devido às menores concentrações de ácido acético e butírico. No experimento II, 36 cordeiros machos Lacaune foram selecionados e divididos em dois grupos: MONENSINA (23,45 ppm de monensina por kg/matéria seca (MS)) e PRÓPOLIS (3,8 mL de própolis por animal/dia). Os animais que consumiram extrato de própolis apresentaram maior peso corporal, ganho de peso e ganho médio diário. Estes também apresentaram menor tempo para reduzir o azul de metileno, demonstrando assim atividade bacteriana mais significativa no rúmen. Além disso, apresentaram menores contagens de *Escherichia coli*, coliformes totais e Enterobactérias. O perfil de ácidos graxos da carne em animais alimentados com extrato de própolis vermelha apresentou maiores concentrações de ácidos graxos monoinsaturados. Em conclusão, a adição de extrato de própolis vermelha ao concentrado aumentou o ganho de peso, o ganho médio diário e o equilíbrio oxidativo, com efeito antimicrobiano e anti-inflamatório.

1. Introdução

Os ionóforos são promotores de crescimento na criação de ruminantes que melhoram a utilização de energia e proteína e diminuem as emissões de metano dos ruminantes (Russell e Strobel, 1988; Wischer et al., 2013), mas são

Proibido em muitas partes do mundo devido a preocupações com a segurança alimentar e ao potencial desenvolvimento de resistência antimicrobiana. Nem todos os ionóforos são antibióticos; existem ionóforos que são usados principalmente como ferramentas de pesquisa para estudar mecanismos de transporte de íons através das membranas celulares (Callaway et al., 2003). No entanto, há controvérsia sobre o uso de

* Autor correspondente em: Programa Multicêntrico de Pós-graduação Lages, Brasil. ^a em Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC),

Endereços de e-mail: aleksandro_ss@yahoo.com.br, aleksandro.silva@udesc.br (AS da Silva).

<https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2024.107379>

Recebido em 8 de março de 2024; Recebido em formato revisado em 5 de outubro de 2024; Aceito em 7 de outubro de 2024
Disponível online em 10 de outubro de 2024

0921-4488/© 2024 Elsevier BV Todos os direitos reservados, incluindo aqueles para mineração de texto e dados, treinamento de IA e tecnologias semelhantes.

antibióticos em dietas animais devido ao risco de transferência de resíduos para a carne e o leite e promoção do desenvolvimento de cepas bacterianas resistentes (Mathew et al., 2001). Essas preocupações têm promovido a busca por aditivos naturais alternativos para rações, como a própolis (Oetzuerk e Sag-manligil, 2009; Morsy et al., 2013). A própolis inclui substâncias resinosas, gomosas e balsâmicas coletadas por abelhas de brotos, flores e exsudatos de plantas e misturadas com suas secreções salivares, cera e pólen (Berretta et al., 2017). Sua composição química difere consideravelmente de acordo com a região geográfica onde as resinas foram coletadas devido às diferenças regionais na flora, e diferentes plantas são fontes de resina (Sforcin e Bankova, 2011). O própolis é ativo contra bactérias gram-negativas e gram-positivas, vírus, fungos, oxidantes, inflamações, tumores e parasitas e pode atuar como um imunomodulador (Alencar et al., 2007; Morsy et al., 2013).

Segundo Mirzoeva e Calder (1996), o mecanismo de ação da própolis sobre bactérias gram-positivas está provavelmente relacionado a alterações no estado bioenergético da membrana bacteriana, o que inibe sua motilidade; essa ação é semelhante à dos ionóforos. Além disso, a própolis afeta a fermentação e a metanogênese em culturas microbianas contínuas em ruminantes; diminui a população de protozoários e aumenta os níveis de propionato em 10,3% (Brodiscou et al., 2000). Estudos recentes mencionaram uma melhora geral na saúde e na imunidade de animais alimentados com própolis. A administração oral de extrato etanólico de própolis vermelha brasileira em ovelhas Santa Inês (3 g/ovelha/dia) durante o período de lavagem aumentou as concentrações de leucócitos totais, proteínas totais e globulinas, enquanto diminuiu os triglicerídeos, glutamato oxaloacetato transaminase e glutamato piruvato transaminase (Morsy et al., 2013).

Independentemente do tipo ou local de coleta, a própolis vermelha brasileira e a própolis marrom egípcia foram incubadas in vitro em diferentes concentrações (125, 250 e 500 g por 500 mg de MS na dieta) (Morsy et al., 2015). Os autores atribuíram um aumento no total de ácidos graxos de cadeia curta ([SCFAs] principalmente a um aumento maciço na produção de acetato (o principal contribuinte para SCFAs) em 45% em comparação com a monensina (Morsy et al., 2015). Os extratos de própolis vermelha brasileira e marrom egípcia pareciam combater a metanogênese ruminal, e os autores atribuíram esse efeito às suas propriedades antiprotozoárias, uma vez que os protozoários são conhecidos por fornecer hidrogênio como substrato para metanógenos (Morsy et al., 2015). A cor da própolis depende da vegetação disponível perto da colmeia (Koru et al., 2007). Essa variação afeta diretamente suas propriedades farmacológicas (Afrouzan et al., 2018). Portanto, a influência dos extratos de própolis na fermentação ruminal pode diferir de acordo com sua origem e o método de extração (Morsy et al., 2015).

Recentemente, Paixão et al. (2022) conduziram um estudo com cordeiros Santa Inês alimentados com extrato de própolis vermelha (300 g/L), onde utilizaram doses de 0, 7, 14, 21 e 28 mL de própolis por animal/dia. Essas doses podem ser consideradas altas e economicamente inviáveis devido ao alto custo da própolis vermelha no Brasil (aproximadamente 400 dólares por kg), considerando que C'ecere et al. (2021) obtiveram resultados positivos alimentando cordeiros Lacaune com 1,8 mL de própolis verde por animal/dia (150 µL de própolis/kg de peso corporal/dia). Portanto, um estudo piloto foi realizado com doses semelhantes às de C'ecere et al. (2021) para direcionar a pesquisa; em seguida, um experimento foi conduzido para avaliar a eficácia do extrato de própolis como um potencial substituto da monensina como promotor de crescimento. Economicamente, é desafiador competir com este ionóforo devido ao seu baixo custo, mas a proibição de sua utilização em alimentos em diversos países abriu o mercado para substitutos. Portanto, o objetivo geral deste trabalho foi avaliar se uma baixa dose de extrato etanólico de própolis vermelha em dietas para cordeiros confinados tem efeitos positivos sobre o ambiente ruminal, a saúde, o desempenho animal e a qualidade da carne.

2. Materiais e métodos

Dois experimentos foram conduzidos para responder aos objetivos. O primeiro foi identificado como um estudo piloto, essencial para definir a dose do segundo experimento.

O experimento foi realizado no setor de ovinos da Fazenda Experimental do Centro de Educação Superior do Oeste da Universidade do Estado de Santa Catarina, em Guatambu, SC, Brasil (27° 09' 09,2" S 52° 47' 18,8" W). O estudo foi aprovado pelo comitê de pesquisa sobre uso de animais da UDESC, protocolo número 2517210622.

2.1. Própolis

O extrato etanólico de própolis vermelha foi preparado de acordo com Wang et al. (2013). A própolis produzida por *Apis mellifera* (abelha) foi adquirida da Bee Propolis (Minas Gerais). A própolis bruta foi moída em um almofariz de porcelana sob nitrogênio líquido para obter pequenos fragmentos e, em seguida, moída em um martelo. Uma solução de própolis de 70% de etanol foi preparada. As amostras foram colocadas em coletados ¹ um banho-maria de 100 g L⁻¹ a 40 °C por 1 h, e os sobrenadantes foram e filtrados através de papel Whatman No. 4. O resíduo foi submetido a três dessas extrações. Os sobrenadantes foram colocados em um evaporador rotativo sob pressão reduzida a 50 °C para eliminar o etanol.

2.2. Determinação do perfil químico da própolis via CG-EM

Para determinar o perfil químico geral do extrato de própolis, o método descrito por Bayram et al. (2020) foi usado com algumas modificações. 5 mg de própolis liofilizada com 75 µL de piridina seca e 50 µL de derivatizante N, O-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida foi homogeneizado e mantido a 80 °C por 20 min. O sobrenadante foi analisado usando GC-MS (Shimadzu, GC-MS-QP2010 Ultra) em triplicata usando piridina e o derivatizante como amostra em branco. A temperatura do forno da coluna foi inicialmente mantida a 50 °C por um minuto, então programada para aumentar para 280 °C a 10 °C/min, e mantida por 2 min com uma razão de divisão de 100.

2.3. Compostos fenólicos totais e atividade antioxidante da própolis extrair

Foi realizada a determinação dos compostos fenólicos totais (CFT) e da atividade antioxidante por sequestro de radicais por 2,2-difenil-1-picril-hidrazil-hidrato (DPPH). 0,5 g de cada amostra foi dissolvido em 50 mL de água destilada para extração. A mistura foi colocada em banho ultrassônico (70 W) por 3 h e permaneceu no escuro por mais 3 h. Os sobrenadantes foram filtrados com papel de filtro quantitativo (Whatman nº 40) e armazenados em balões volumétricos de 100 mL envoltos em papel alumínio. Os extratos foram então armazenados em microtubos e mantidos a -80 °C até

análise (Larrauri et al., 1997; Bertolotti et al., 2018). A quantificação de TPC foi realizada usando o método colorimétrico de Folin-Ciocalteu, modificado por Bonoli et al. (2004). Uma alíquota de cada amostra diluída foi misturada com 0,5 mL do reagente de Folin-Ciocalteu e agitada por um minuto. Em seguida, 2 mL de carbonato de sódio (20%) foram adicionados à mistura e agitados por 30 segundos. Após 2 horas de incubação, a absorbância foi lida a 750 nm em um espectrofotômetro digital Kasuaki IL-593-S. A curva padrão foi preparada usando várias concentrações de ácido gálico em metanol. A concentração de TPC foi calculada usando uma equação derivada da curva padrão de ácido gálico (expressa em mg de equivalente de ácido gálico por g de amostra seca; mg GAE/g). Os dados foram expressos como média ± desvio padrão de experimentos triplicados (Material suplementar 1).

A avaliação da atividade de sequestro de radicais livres nos extratos foi determinada como sendo a capacidade antioxidante de redução do radical DPPH, de acordo com Brand-Williams et al. (1995). Cinco diluições de cada extrato foram preparadas em tubos de ensaio, e 0,3 mL de cada extrato diluído foi adicionado a 2,7 mL de radical DPPH (40 µg/mL). Após incubação por 1 h no escuro, a absorbância foi lida a 515 nm. A atividade de sequestro de radicais livres foi relatada como IC50 (µg/mL), a concentração antioxidante necessária para sequestro de 50% do DPPH na solução de teste. Todos os testes foram realizados em triplicata, e os valores de IC50 foram expressos como média ± desvio padrão de experimentos triplicados.

2.4. Experimento 1: estudo piloto

Vinte e quatro cordeiros Lacaune (90 dias de idade; 20,1 ± 3,85 kg) foram adquiridos da Cabanha 3-Leites – Lageado Grande, SC, Brasil. O experimento teve duração de 75 dias, sendo 15 deles correspondentes à fase de adaptação à dieta e à instalação. Os animais foram alojados em baias de 1,2 m x 2,5 m, com ripas de madeira e equipadas com comedouros e bebedouros. Os animais foram separados nas baias de acordo com o peso corporal. A distribuição das baias nos respectivos tratamentos na instalação foi sequencial para evitar interferências ambientais.

A dieta basal foi uma ração completa formulada para atender às necessidades dos animais, de acordo com o [National Research Council \(2007\)](#). Os animais receberam silagem de milho, feno e concentrado (2% do peso corporal; [Tabela 1](#)). Os animais designados para cada tratamento receberam doses de 2,2, 4,4 e 8,8 mL de extrato de própolis (solução com concentração de 10%) por kg de concentrado, misturadas durante a produção. Essas doses permitiram que os cordeiros recebessem quatro doses de própolis/animal/dia, conforme detalhado a seguir. Os animais foram divididos em quatro grupos, com três repetições e dois animais por repetição (baia): T0 (Controle), TP1,3, TP2,7 e TP5,3 representando 0, 1,3, 2,7 e 5,3 mL de própolis por animal/dia, respectivamente. Essas doses no estudo piloto foram definidas com base no experimento realizado por [C'ecere et al. \(2021\)](#) utilizando própolis verde. Para garantir o consumo total de própolis, o concentrado foi primeiramente fornecido aos cordeiros; após 100% do seu consumo, o volumoso (feno e silagem) foi fornecido. Amostras de silagem de milho, feno e concentrado foram coletadas para determinar a composição química.

Os animais foram pesados individualmente no início do experimento e, posteriormente, a cada 7 dias. O ganho médio diário (GMD) foi calculado como o coeficiente de regressão do peso vivo individual ([Yuste et al., 2020](#)). Todas as pesagens foram realizadas pela manhã, com os animais em jejum, utilizando uma balança eletrônica digital. As sobras de ração foram coletadas ao longo do experimento para determinar o consumo de matéria seca (CMS) por baia. Com base nessas informações, foi calculada a conversão alimentar (CMS/ganho de peso - kg/kg). É essencial esclarecer que a baia foi utilizada como unidade experimental para essas variáveis zootécnicas.

Os animais foram contidos manualmente para coleta de amostras de sangue no primeiro, décimo quinto, quadragésimo quinto e septuagésimo quinto dia, por meio de punção da veia jugular, utilizando tubos a vácuo contendo ácido etilenodiaminotetracético para a realização dos eritogramas e leucogramas. Tubos sem anticoagulantes foram utilizados para obtenção do soro para análise bioquímica. Amostras fecais foram coletadas nos dias 15, 45 e 75, diretamente da ampola retal, em sacos estéreis, armazenados em caixa térmica refrigerada por até 10 dias.

Tabela 1

Experimento 1: Estudo piloto - Ingredientes (g/kg) e composição química dos ingredientes e rações experimentais (g/kg MS).

Ingredientes		Composição					
Silagem de milho		418,2					
Feno: Tifton 85		63,6					
Concentratea		518,2					
		Concentrado					
Composição químicab							
Mestre		Feno					
		Controllec					
		TP1.3					
		TP2.7					
		TP5.3					
Mestre		308,4	803,3	868,4	868,4	868,4	868,4
VALORES		40,0	60,9	81,6	81,6	81,6	81,6
PC		89,9	83,0	205,3	205,3	205,3	205,3
FDN		334,1	694,6	170,2	170,2	170,2	170,2
ADF		180,3	328,6	49,1	49,1	49,1	49,1
EE		33,8	14,0	31,0	31,0	31,0	31,0

Nota: Compostos fenólicos totais (mg/kg) dos concentrados. Controle: 253,9; TP1,3: 266,8; TP2,7: 276,6; TP5,3: 285,0. IC50 (mg/mL - concentração responsável por reduzir a viabilidade celular pela metade) dos concentrados. Controle: 0,033; TP1,3: 0,152; TP2,7: 0,196; TP5,3: 0,255.

O tratamento controle e os tratamentos TP1,3, TP2,7 e TP5,3 representam 0, 1,3, 2,7 e 5,3 mL de própolis por animal/dia, respectivamente.

^a Composição do concentrado, produção de 1000 kg: fubá de milho (540 g/kg), farelo de soja (200 g/kg), calcário calcítico (10 g/kg), bicarbonato de sódio (4 g/kg) e 50 g/kg de pré-mistura (Cálcio (mín./máx.) 175/245 g; Fósforo (mín.) 40 g; Enxofre (mín.) 25 g; Magnésio (mín.) 12 g; Sódio (máx.) 100 g; Matéria Mineral (máx.) 980 g; Cobalto (mín.) 40 mg; Ferro (mín.) 1800 mg; Iodo (mín.) 80 mg; Manganês (mín.) 1400 mg; Selênio (mín.) 12 mg; Zinco (mín.) 4000 mg; Vit. A (mín.) 300.000 UI; Vit. D3 (mín.) 60.000 UI; Vit. E (mín.) 600 UI; Flúor (máx.) 600 mg; Monensina Sódica 600 mg).

^b DM (matéria seca), MM (matéria mineral), CP (proteína bruta), FDN (fibra em detergente neutro), FDA (fibra em detergente ácido) e EE (extrato etéreo).

^c Concentrado basal - utilizado em todos os grupos. A composição química do concentrado dos quatro grupos foi idêntica, ou seja, a curvatura fitogênica não se alterou. a composição química do concentrado ingerido pelos cordeiros.

transporte e analisados em até 2 h para determinar a contagem total de coliformes, *Escherichia coli* e Enterobactérias. O fluido ruminal (100 mL por animal) foi coletado 3 h após a alimentação matinal nos dias 15, 45 e 75, utilizando uma sonda ororuminal de silicone conectada a uma bomba de vácuo. O pH foi medido usando um medidor de pH digital portátil (TESTO 205®). Imediatamente após a medição do pH, a atividade funcional da microbiota ruminal foi medida utilizando o teste de redução do azul de metileno (MBRT) descrito por [Dirksen \(1993\)](#). Uma subamostra do fluido ruminal foi reservada para a determinação de AGCC. O animal foi a unidade experimental para as variáveis de sangue, fluido ruminal e fezes.

2.5. Experimento 2

Foram utilizados 36 cordeiros machos da raça Lacaune (30 dias de idade; 18,4 ± 3,80 kg de peso corporal) provenientes de uma granja comercial no sul do Brasil. O experimento teve duração de 75 dias, sendo 15 dias de adaptação à dieta e instalação. Os animais foram alojados em baias de 1,2 m x 2,5 m, com piso ripado de madeira e equipadas com comedouros e bebedouros. Os animais foram divididos em dois grupos, com seis repetições e três por repetição (baia), totalizando 18 animais para cada tratamento. Os grupos foram MONENSINA e PRÓPOLIS, representando a dose de 23,45 ppm de monensina por kg/MS da dieta e a dose de 5 mL de extrato de própolis vermelha/kg de concentrado, respectivamente. Os grupos receberam seus tratamentos monensina e própolis no concentrado, misturados durante sua produção.

Os animais receberam silagem de milho e concentrado (2,5% do peso corporal; [Tabela 2](#)). A dieta basal foi uma ração total formulada para atender às necessidades dos animais, de acordo com o [National Research Council \(2007\)](#). para um ganho estimado de 300 g/dia. Restos de ração foram coletados ao longo do experimento para determinar a IMS. Amostras de silagem e concentrado de milho foram coletadas para determinar a composição química.

Os animais foram pesados individualmente no início do experimento e a cada 15 dias posteriormente. O ganho médio diário (GMD) foi calculado como o coeficiente de regressão do peso vivo individual ao longo do tempo ([Yuste et al., 2020](#)). Todas as pesagens foram realizadas pela manhã, com os animais em jejum, utilizando uma balança eletrônica digital.

Eles também foram contidos manualmente para coletar amostras de sangue nos dias 0, 15, 45 e 75 por meio de pulsação na veia jugular, utilizando tubos a vácuo contendo ácido etilenodiaminotetracético para realizar eritograma e leucograma, e em tubos sem anticoagulante para obter soro para análise bioquímica. Amostras fecais foram coletadas nos dias 15, 45 e 75 diretamente da ampola retal em sacos estéreis, armazenados em um recipiente hermeticamente fechado.

Tabela 2

Experimento 2 - Ingredientes (g/kg) e composição química dos ingredientes e rações experimentais (g/kg MS).

Ingredientes	Composição, kg		
Silagem de milho	315,4		
Concentratea	684,6		
Concentrado			
Composição químicab	Silagem de milho 308,4	Controlec	Própolis
Mestre	873,0	873,0	
ULMESTROS	40,0	82,8	82,8
PC	89,9	228,5	228,5
FDN	334,1	147,8	147,8
ADF	180,3	46,7	46,7
EE	33,8	31,1	31,1

Nota: Compostos fenólicos totais (mg/kg) dos concentrados. Controle: 243,07; TP138: 269,51. IC50 (mg/mL - concentração responsável por reduzir a viabilidade celular pela metade) dos concentrados. Controle: 0,206; TP138: 0,253.

Os tratamentos controle e própolis representam animais que receberam 23,45 ppm/kg/MS de monensina e 3,8 mL de própolis animal/dia, respectivamente.

^m Composição do concentrado, produção de 1000 kg: fubá de milho (525 g/ kg), farelo de soja (300 g/kg), farelo de trigo (117 g/kg), calcário calcítico (10 g/ kg) e 50 g/kg de pré-mistura (Cálcio (mín./máx.) 190/260 g; Fósforo (mín.) 20 g; Enxofre (mín.) 40 g; Magnésio (mín.) 20 g; Sódio (mín.) 62 g; Matéria Mineral (máx.) 980 g; Cobalto (mín.) 8 mg; Ferro (mín.) 1200 mg; Iodo (mín.) 32 mg; Manganês (mín.) 800 mg; Selênio (mín.) 6 mg; Zinco (mín.) 1.200 mg; Vit. A (mín.) 200.000 UI; Vit. D3 (mín.) 40.000 UI; Vit. E (mín.) 400 UI.

^b DM (matéria seca), MM (matéria mineral), PB (proteína bruta), NDF (matéria neutra fibra em detergente), ADF (fibra em detergente ácido) e EE (extrato etéreo).

^c Concentrado basal - utilizado em todos os grupos. A composição química do concentrado dos quatro grupos foi idêntica; ou seja, a curvatura fitogênica não alterou a composição química do concentrado ingerido pelos cordeiros.

caixa térmica refrigerada para transporte e analisada em até 2 h para determinação da contagem de *coliformes totais/Escherichia coli* e Enterobactérias.

Além disso, 100 mL de fluido ruminal por animal foram coletados após 3 horas da alimentação matinal nos dias 15, 45 e 75, utilizando uma sonda oro-ruminal conectada a uma bomba de vácuo. O pH foi medido utilizando um medidor de pH digital portátil (TESTO 205®) e, em seguida, a atividade funcional da microbiota ruminal foi medida utilizando o MBRT, descrito por [Dirksen \(1993\)](#). Uma subamostra de fluido ruminal foi reservada para a determinação de AGCCs. Essas amostras, após coletadas, foram imediatamente submetidas ao congelamento para evitar a degradação dos AGCCs, mas a adição de um ácido para permitir a desproteínização da amostra não foi utilizada neste momento.

O abate foi realizado após o término do experimento (dia 76) em um matadouro específico para ovinos, seguindo as normas vigentes e acompanhado por um veterinário da inspeção municipal. Após os procedimentos de insensibilização, sangria, remoção de pele e evisceração, o pH muscular foi medido no músculo longissimus dorsus. Em seguida, uma amostra do músculo glúteo médio foi coletada para análise da composição química e do perfil de ácidos graxos. Um pedaço de fígado também foi coletado para análise antioxidante.

2.6. Hematologia, bioquímica sérica e proteinograma

Contagens de hemoglobina, eritrócitos e leucócitos totais, hematócrito e diferenciais de leucócitos foram realizados imediatamente após a chegada da amostra ao laboratório usando um analisador hematológico automático (três peças EQUIP VET 3000®). Os tubos sem anticoagulante foram centrifugados (7000 rpm por dez minutos) para separar o soro. Os sobrenadantes foram transferidos para microtubos de 1,5 mL, identificados e armazenados a -20 °C. As concentrações de proteína total, albumina, triglicerídeos, colesterol, glicose, aspartato aminotransferase (AST) e gama-glutamiltanspeptidase (GGT) foram avaliadas em um analisador semiautomático (Bio-2000 BioPlus®) e kits comerciais (Analisa®, Belo Horizonte, Brasil). Os níveis de globina foram calculados usando a fórmula proteína total – albumina.

Para o proteinograma, eletroforese em géis de poliacrilamida

A determinação da concentração de dodecil sulfato de sódio foi realizada de acordo com [Fagliari et al. \(1998\)](#) utilizando minigéis (10 × 10 cm). Os géis foram corados com azul de Coomassie e fotografados para identificar e quantificar as frações proteicas utilizando o software Labimage 1D (Loccus Biotechnology). Um padrão contendo frações com peso molecular entre 10 e 250 kD (Kaleidoscope – Bio-Rad) foi utilizado como referência. O teor total de proteínas pela técnica do biureto foi utilizado como referência para a quantificação ([Layne, 1957](#)).

2.7. Estado oxidante

Para determinar o estado oxidante, a atividade da glutatona S-transferase (GST) sérica foi medida com base em [Habig et al. \(1974\)](#) e expressa em µmol de 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB)/min/mg de proteína sérica. De acordo com [Ellman \(1959\)](#), os tiois proteicos foram medidos, e os resultados foram expressos em nmol de tiois/mg de proteína.

A peroxidação lipídica sérica foi medida como a quantidade de TBARS, de acordo com [Jentsch et al. \(1996\)](#). A reação foi lida em um espectrofotômetro Kasuaki IL-593-S a 535 nm. Os resultados foram expressos em nmol de malondialdeído (MDA)/mL de soro.

2.8. Contagens de E. coli, coliformes totais e Enterobacteriaceae nas fezes

A contagem foi realizada com 1 g de cada amostra de fezes, diluída em 9 mL de água peptonada tamponada em tubos de ensaio estéreis e homogeneizada em agitador vórtex, resultando em uma diluição de 10¹ até atingir uma diluição final de 4

diluição de 10⁵. Em seguida, 1 mL da diluição final foi inoculado em placas 3 MTM PetrifilmTM EC 6414 para contagem de *E. coli* e coliformes totais. Para contagem de Enterobactérias, 1 mL de cada amostra foi inoculado em placas 3 MTM PetrifilmTM EB 6420. Posteriormente, as placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 37 ± 1 °C por 24 h. Em seguida, a contagem de colônias foi realizada de acordo com o guia de interpretação 3 MTM PetrifilmTM correspondente para cada tipo de placa. Os resultados foram expressos como unidades formadoras de colônias por grama de fezes (UFC/g).

2.9. Análise da composição química da silagem e do concentrado

As amostras de ração foram previamente pré-secas em estufa de ventilação forçada a 55 °C por 72 h. Em seguida, as amostras foram pesadas para determinação do teor de matéria seca da amostra original, seguidas de moagem em moinho tipo Wiley (Marconi, modelo MA340) com peneira de malha de 1 mm. As amostras pré-secas e moídas foram aquecidas a 105 °C por 24 h para obtenção da matéria seca, e as cinzas em mufia a 600 °C ([Silva e Queiroz, 2002](#)).

As dietas foram analisadas de acordo com [a Associação de Químicos Analíticos Oficiais \(2000\)](#): MS, método 930.15; proteína bruta (PB), método 976.05; extrato etéreo, método 920.39; e cinzas, método 942.05. O método descrito por [Van Soest et al. \(1991\)](#), sem adição de sulfato de sódio e alfa-amilase, foi escolhido para a análise da fibra em detergente neutro e ácido.

Para determinar a CPT, 0,5 g de cada concentrado (controle, TP1.3, TP2.7 e TP5.3) foi pesado em um tubo Falcon e 5 mL de solvente etanol (60%) foram adicionados. A mistura foi agitada e mantida por 20 minutos em banho aquecido (96 °C). Em seguida, permaneceram por 15 minutos em banho ultrassônico (180 W) e centrifugados por 15 minutos (4000 x g). Os sobrenadantes foram filtrados e os extratos analisados.

2.10. Determinação de ácidos graxos de cadeia curta

Amostras de fluido ruminal foram descongeladas a 5 °C e agitadas manualmente para homogeneização. Aliquotas de 1 mL do sobrenadante das amostras de fluido ruminal foram coletadas em microtubos de polipropileno (2 mL) e centrifugadas por cinco minutos (12.300 × g). Em seguida, 250 µL dos sobrenadantes foram removidos e transferidos para um novo microtubo contendo 250 µL de ácido fórmico. A mistura foi agitada manualmente e centrifugada novamente por três minutos. Em seguida, 250 µL do sobrenadante foram coletados em um frasco para injeção e 500 µL de solução de 3-octanol (665 µg mL⁻¹ em

metanol) foi adicionado, usado como padrão interno (Zahedi et al., 2023) e homogeneizado. As amostras foram analisadas em um cromatógrafo a gás equipado com um detector de ionização de chama (GC-FID; Varian Star 3600, Palo Alto, EUA) e um amostrador automático (Varian 8200CX, Palo Alto, EUA). Um microlitro do extrato foi injetado em modo split a 1:10 a 250 °C. O gás de arraste utilizado foi hidrogênio a uma pressão constante de 20 psi. Os analitos (ácidos acético, propiônico, butírico, valérico e isovalérico) foram separados por uma coluna capilar CP-WAX 52CB (60 m x 0,25 mm; espessura da fase estacionária de 0,25 µm) (Material suplementar 2). A temperatura inicial da coluna foi fixada em 80 °C por um minuto e aumentada para 120 °C a uma taxa de 8 °C min⁻¹, então a 230 °C por 15 min, e finalmente a 250 °C por 10 min, onde permaneceu por um minuto. A ionização da chama de-
A temperatura do detector foi fixada em 250 °C. Os resultados foram expressos em 1 mmol L⁻¹ de cada ácido graxo de cadeia curta (AGCC) no fluido ruminal.

2.11. Perfil de ácidos graxos e composição química da carne

A extração foi realizada utilizando o método de Bligh e Dyer (1959) com algumas modificações. Frações de 1,5 g de amostras, 0,8 mL de água, 5 mL de metanol e 2,5 mL de clorofórmio foram adicionadas a um tubo de polipropileno de 15 mL, sob agitação mecânica por 30 min. Em seguida, 2,5 mL de clorofórmio e uma solução de Na₂SO₄ a 1,5% foram adicionados para promover um sistema bifásico. Essa mistura foi agitada por 2 min e, em seguida, centrifugada por 15 min a 2000 rpm. Os lipídios obtidos da fase clorofórmica foram submetidos à análise de ácidos graxos.

A metilação do perfil de ácidos graxos (AG) foi realizada usando um método de transesterificação proposto por Hartman e Lago (1973). 1 mL de solução metanólica de KOH 0,4 M foi adicionado aos lipídios extraídos em um tubo de ensaio e agitado em vórtice por um minuto. As amostras foram mantidas em banho-maria por dez minutos à temperatura de ebulição. Posteriormente, foram resfriadas à temperatura ambiente e 3 mL de solução metanólica de H₂SO₄ 1 M foram adicionados, agitados em vórtice e mantidos em banho-maria por dez minutos. Após o resfriamento, 2 mL de hexano foram adicionados e centrifugados a 2000 rpm por dez minutos. Finalmente, o hexano com ésteres metílicos de ácidos graxos (FAME) foi submetido à análise cromatográfica. Um cromatógrafo a gás modelo TRACE 1310 com um detector de ionização de chama (Thermo Scientific) foi usado para determinar o FAME. Um microlitro de amostras foi injetado em um injetor split/splitless, operado em modo split com uma proporção de 1:20 a 250 °C. O hidrogênio foi usado como gás de arraste a uma vazão constante de 1,5 mL/min. A separação dos FAMES foi realizada usando uma coluna cromatográfica RT 2560 (espessura de filme de 100 m x 0,25 mm x 0,20 µm, Restek, EUA). A temperatura inicial do forno foi programada em 100 °C por cinco minutos e aumentada para 180 °C a uma taxa de 8 °C/min. Em seguida, aumentou para 210 °C a uma taxa de 4 °C/min e, finalmente, até 250 °C, aumentou para 20 °C/min e a manteve por 7 minutos em isotérmico. A temperatura do detector foi mantida constante em 250 °C. Os compostos FAME foram identificados pela comparação do tempo de retenção experimental com aqueles do padrão autêntico (FAME Mix-37, Sigma Aldrich, St. Louis, MO). Os resultados foram apresentados como uma porcentagem de cada AG identificado na fração lipídica, considerando o fator equivalente ao tamanho da cadeia FAME para FID e o fator de conversão de éster para o respectivo ácido, segundo Visentainer e Franco (2006). Para a composição química da carne (MS, extrato etéreo, PB e matéria orgânica), os valores foram obtidos utilizando um espectrômetro de reflexão no infravermelho próximo, modelo Spectra Star série 2600 XT de analisadores de infravermelho próximo (Unity Scientific®).

2.12. Análise estatística

Os dados foram testados quanto à normalidade e homogeneidade de variância usando os testes de Shapiro-Wilk e Levene, respectivamente. Os hemogramas, as contagens bacterianas nas fezes e os resultados da atividade da GST precisaram ser transformados para atingir a normalidade e a homogeneidade e, em seguida, foram retransformados para as unidades originais para descrição. Todos os dados foram analisados usando o procedimento SAS 'MIXED' (SAS Inst. Inc., Cary, NC, EUA; versão 9.4), com a aproximação de Satterthwaite

para determinar os graus de liberdade do denominador para os efeitos fixos testados. Em ambos os experimentos (piloto e experimento 1), no modelo experimental, utilizamos o tratamento, o dia da amostragem e a interação entre tratamento e dia da amostragem como efeitos fixos. O efeito aleatório foi o "curral" por tratamento (para dados sem medições repetidas ao longo do tempo, p. ex.: dados de desempenho de crescimento e dados de carne post-mortem; exceção para peso corporal) e o "animal" por tratamento (para todas as medições repetidas ao longo do tempo, p. ex.: hematologia, bioquímica, ácidos graxos e imunidade).

No experimento 1, as médias foram comparadas por meio de contrastes ortogonais a 5% de significância. O primeiro contraste (C1) representou o efeito da adição de própolis [controle versus tratamentos (TP1,3 + TP2,7 + TP5.3)]; segundo contraste (C2): [Controle versus TP1.3]; terceiro contraste (C3): [(Controle versus TP2.7) e quarto contraste (C4): [controle versus TP5.3]. A análise de regressão considerando o ganho de peso diário foi realizada para determinar a dose ideal de própolis (mL/animal/dia). Nos experimentos 1 e 2, todos os dados obtidos no dia 1 para cada variável foram incluídos como covariáveis em cada análise, e o peso inicial foi incluído como uma variável no modelo. A estrutura de covariância autorregressiva de primeira ordem foi selecionada de acordo com o menor critério de informação de Akaike. As médias foram separadas usando o método PDIFF, o teste t foi selecionado e todos os resultados foram relatados como médias com erros padrão. A significância foi definida quando P < 0,05.

3. Resultados

3.1. Composição química do extrato de própolis vermelha

No extrato de própolis vermelha utilizado no estudo piloto, o teor total de compostos fenólicos do extrato foi de 93,07 ± 0,780 mg equivalente de ácido gálico/g, e a atividade antioxidante (C150) foi de 0,735 ± 0,170 mg/mL. Os perfis químicos dos compostos do extrato por GC/MS são apresentados no Material Suplementar 1.

Na própolis vermelha utilizada no experimento 2, o teor de TPC no extrato de própolis foi de 90,50 ± 3,8 mg equivalente de ácido gálico/g, e a atividade antioxidante (C150) foi de 0,735 mg/mL.

3.2. Experimento 1: estudo piloto

Os resultados do desempenho de crescimento dos cordeiros foram apresentados na Tabela 3. Não foi observado efeito do tratamento com própolis sobre o peso corporal e o consumo de ração. Maior ganho de peso diário foi observado nos cordeiros que consumiram 2,7 mL de extrato de própolis por dia em comparação ao controle; assim como os animais deste grupo apresentaram a menor conversão alimentar em comparação ao controle. A análise de regressão considerando o GMD mostrou uma tendência (p = 0,07) em direção à dose ideal de 3,81 mL/animal/dia (y = y 0,001x² + 0,276x +183,3; R² = 0,562).

Os resultados do hemograma dos cordeiros foram apresentados na Tabela 4. Não houve efeito do tratamento com extrato de própolis sobre os glóbulos vermelhos (eritrócitos, hematócrito e hemoglobina). No entanto, contagens totais de leucócitos mais baixas foram observadas em cordeiros que consumiram extrato de própolis em comparação aos controles, devido às menores contagens de granulócitos e linfócitos. Não houve diferença entre os grupos para a contagem de monócitos. Não houve efeito do dia e da interação tratamento x dia (P > 0,05) para as variáveis eritrócitos, hematócrito, hemoglobina, leucócitos, monócitos e granulócitos. No entanto, a variável contagem de linfócitos apresentou efeito significativo do dia para todos os grupos (P = 0,05) e para a interação tratamento x dia (P = 0,01); os animais do tratamento controle apresentaram contagens mais altas nos dias 45 e 75 do que os animais dos grupos TP2.7 e TP5.3 (Material Suplementar 3).

Os resultados da bioquímica sérica são apresentados na Tabela 4. Concentrações mais baixas de triglicerídeos foram observadas no soro dos cordeiros do grupo TP5.3 em comparação ao controle. Concentrações mais altas de colesterol total foram encontradas no soro dos animais TP2.7 e TP5.3 em comparação ao controle. Não houve efeito do tratamento com extrato de própolis para as variáveis AST, GGT, proteína total, albumina, globulina e glicose.

Tabela 3

Experimento 1: Estudo piloto - Desempenho zootécnico de cordeiros alimentados com extrato de própolis vermelha misturado ao concentrado.

Unid	Tratamentos				SEM	Valor-pb			
	CONT	TP1.3	TP2.7	TP5.3		C1	C2	C3	C4
Ganho médio diário (GMD), kg/dia	0,178	0,182	0,194	0,184	0,01	0,18	0,80	0,03	0,36
Ingestão de matéria seca (CMS), kg/dia	0,95	0,91	0,96	0,92	0,08	0,86	0,92	0,94	0,89
Conversão alimentar (DMI/ADG), kg/kg	5.33	5,00	4,94	5,00	0,05	0,05	0,21	0,03	0,18

^a O tratamento controle e os tratamentos TP1.3, TP2.7 e TP5.3 representam 0, 1,3, 2,7 e 5,3 mL de própolis por animal/dia, respectivamente.
^b Probabilidades para efeito de contraste: C1 = [CONT vs (TP1,3+TP2,7+TP5,3)]; C2 = CONT vs TP1,3; C3 = CONT vs TP2,7; C4 = CONT vs TP5,3.

Tabela 4

Experimento 1: Estudo piloto – Hemograma, bioquímica sérica, proteinograma e estado oxidativo de cordeiros alimentados com extrato de própolis vermelha misturado ao concentrado.

Variáveis	Tratamentos1				SEM	Valor-p2			
	CONT	TP1.3	TP2.7	TP5.3		C1	C2	C3	C4
Hematologia									
Eritrócitos (x106 µL)	9,65	9,52	9,63	8,76	0,14	0,89	0,85	0,87	0,72
Hematócrito (%)	28,7	29,1	28,5	27,4	1,35	0,92	0,90	0,89	0,91
Hemoglobina (g/dL)	10,9	10,9	10,8	10,3	0,27	0,94	0,91	0,92	0,90
Leucócitos (x103 µL)	8.10	7,27	6,47	6,72	0,81	0,02	0,26	0,01	0,01
Granulócitos (x103 µL)	1,39	0,95	0,95	1,02	0,19	0,05	0,04	0,04	0,091
Linfócitos (x10c µL)	6,45	5,73	5,19	5,34	0,36	0,02	0,28	0,03	0,05
Monócitos (x103 µL)	0,48	0,42	0,28	0,31	0,09	0,16	0,84	0,13	0,23
Bioquímica sérica3									
AST (U/L)	94,2	99,8	94,5	101	3,74	0,92	0,89	0,80	0,87
GGT (U/L)	87,0	89,6	86,3	80,0	2,95	0,86	0,93	0,91	0,29
Proteína total (g/dL)	7,72	7.21	7,52	7h30	0,36	0,21	0,87	0,79	0,61
Albumina (g/dL)	2.31	2,50	2,35	2,48	0,14	0,56	0,45	0,82	0,80
Globulina (g/dL)	5,41	4,71	5,17	4,81	0,20	0,12	0,08	0,67	0,35
Triglicerídeos (mg/dL)	35,1	34,8	31,3	27,3	1,87	0,65	0,94	0,75	0,04
Colesterol (mg/dL)	73,7	75,5	79,7	78,1	2,08	0,58	0,92	0,04	0,05
Glicose (mg/dL)	68,7	69,7	66,7	66,1	3,01	0,85	0,96	0,89	0,90
Proteinograma									
IgA (g/dL)	0,74	0,69	0,72	0,73	0,04	0,95	0,90	0,95	0,96
Cadeia pesada de IgG (g/gL)	0,89	0,95	0,96	0,94	0,04	0,20	0,29	0,32	0,27
Ceruloplasmina (g/dL)	0,54	0,47	0,44	0,39	0,02	0,03	0,25	0,05	0,03
Transferrina (g/dL)	0,36	0,34	0,33	0,30	0,02	0,80	0,86	0,83	0,09
Proteína C-reativa (g/dL)	0,19	0,20	0,13	0,11	0,01	0,42	0,95	0,05	0,03
Haptoglobina (g/dL)	0,28	0,27	0,27	0,25	0,02	0,88	0,94	0,92	0,59
Estado oxidativo									
TBARS (nmol MDA/mL)	17,8	13,9	13,6	16,8	0,41	0,25	0,05	0,05	0,91
Tióis totais	79,1	82,3	83,5	82,1	2,14	0,76	0,81	0,85	0,81
GST (µmol CDNB/min/mg proteína)	430a	394b	395b	423a	6,87	0,35	0,02	0,02	0,92

1O tratamento controle e os tratamentos TP1.3, TP2.7 e TP5.3 representam 0, 1,3, 2,7 e 5,3 mL de própolis por animal/dia, respectivamente. 2Probabilidades de efeito de contraste: C1 = [CONT vs (TP1.3+TP2.7+TP5.3)]; C2 = CONT vs TP1,3; C3 = CONT vs TP2,7; C4 = CONT vs TP5,3. 3Aspartato aminotransferase (AST), gama-glutamil transferase (GGT), imunoglobulina A (IgA) e G (IgG), substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e glutatona s-transferase (GST).

Tabela 5

Experimento 1: Estudo piloto - Indicadores ruminais e microbiologia das fezes de cordeiros alimentados com extrato de própolis vermelha misturado ao concentrado.

Variáveis	Tratamentosb				SEM	Valor-p5			
	CONT	TP1.3	TP2.7	TP5.3		C1	C2	C3	C4
Líquido ruminal									
pH do rúmen	6,44	6,61	6,64	6,65	0,01	0,05	0,16	0,09	0,12
MBRTa (s)	232	160	235	191	28,9	0,21	0,07	0,92	0,59
Ácidos graxos de cadeia curta totais mmol/L	79,3	74,8	73,0	72,8	0,31	0,01	0,10	0,08	0,05
Ácido acético, mmol/L	52,9	50,5	48,8	49,0	0,85	0,05	0,25	0,12	0,18
Ácido propiônico, mmol/L	16,5	15,4	15,7	15,06	0,452	0,36	0,43	0,52	0,39
Ácido butírico, mmol/L	7,85	7,08	6,65	6,66	0,212	0,01	0,26	0,03	0,09
Ácido isovalérico, mmol/L	1,21	1,05	1,11	1,34	0,17	0,38	0,45	0,66	0,78
Ácido valérico, mmol/L	0,76	0,72	0,73	0,67	0,03	0,74	0,82	0,80	0,41
Fezesd									
Escherichia coli (x 104)	49,2	40,6	39,5	42,4	3,12	0,08	0,10	0,23	0,28
Coliformes totais (x 104)	78,8	52,8	61,7	94,7	5,75	0,62	0,05	0,35	0,22
Enterobactérias (x 104)	83,0	59,6	67,5	74,8	8,23	0,40	0,12	0,66	0,75

⁵ Probabilidades para efeito de contraste: C1 = [CONT vs (TP1,3+TP2,7+TP5,3)]; C2 = CONT vs TP1,3; C3 = CONT vs TP2,7; C4 = CONT vs TP5,3.
^a MBRT (teste de redução do azul de metileno).
^b O tratamento controle e os tratamentos TP1.3, TP2.7 e TP5.3 representam 0, 1,3, 2,7 e 5,3 mL de própolis por animal/dia, respectivamente.
^c Valores expressos em mmol L⁻¹ de cada ácido graxo de cadeia curta (AGCC) no fluido ruminal.
^d Valores expressos em log UFC/g de fezes.

Também não há efeito dia e interação tratamento x dia (P $\hat{y}$ 0,05) para triglicerídeos, colesterol, AST, GGT, proteína total, albumina, globulina ou glicose.

Os resultados do perfil proteico por eletroforese estão na [Tabela 4](#). O efeito do tratamento com extrato de própolis foi observado nos níveis de ceruloplasmina, sendo menor no soro de cordeiros que consumiram própolis em comparação ao controle. Menor concentração de proteína C-reativa no soro de cordeiros que consumiram 2,7 e 5,3 mL de extrato de própolis em comparação ao controle. Nenhum efeito do tratamento foi observado entre os grupos para imunoglobulinas, transferrina e haptoglobina. Também não houve interação tratamento x dia e efeito dia para concentrações de IgA, cadeia pesada de IgG, transferrina, ceruloplasmina e proteína C-reativa. Mas os níveis de haptoglobina foram influenciados pela interação entre tratamento x dia (P = 0,05); sem efeito no dia (P = 0,67).

Os dados do estado oxidativo estão na [Tabela 4](#). Os cordeiros que consumiram 1,3 e 2,7 mL de extrato de própolis apresentaram níveis mais baixos de TBARS em comparação ao controle. Esses mesmos animais (TP1,3 e TP2,7) apresentaram menor atividade de GST em comparação ao controle. Não houve efeito do tratamento sobre a concentração de tiois totais. Além disso, não houve interação tratamento x dia e efeito dia para as concentrações de TBARS e tiois totais, assim como a atividade de GST diferiu entre os grupos.

Os resultados dos biomarcadores no fluido ruminal foram apresentados na [Tabela 5](#). Efeito do tratamento foi observado para o pH ruminal, sendo maior em cordeiros que consumiram extrato de própolis em comparação ao controle. Não houve diferença entre os grupos para atividade bacteriana (MBRT). Menor concentração de AGCC foi observada em cordeiros que consumiram própolis em comparação ao controle devido às menores concentrações de ácido acético e butírico. Não houve efeito do tratamento para ácido propiônico, isovalérico e valérico. O ácido acético apresentou interação significativa entre a interação tratamento x dia (P = 0,01), e os animais nos tratamentos TP2,7 e TP5,3 apresentaram maior concentração no dia 15. No dia 75, os animais do grupo controle apresentaram concentrações de ácido acético maiores que os dos grupos TP1,3 e TP2,7. As concentrações de ácido propiônico apresentaram diferença apenas no dia 15 para o grupo controle, que foi maior que o grupo TP5,3 (P = 0,01 para a interação entre tratamento x dia). O ácido butírico apresentou concentrações de interação tratamento x dia (P = 0,001), ou seja, no dia 15, os grupos TP2,7 e TP5,3 apresentaram concentrações menores que o grupo controle; entretanto, no dia 75, os animais do grupo controle superaram apenas o grupo TP2,7. A concentração de ácido valérico foi maior nos tratamentos controle, TP1,3 e TP2,7 em comparação ao tratamento TP5,3 no dia 15 (P = 0,01), e quando avaliadas apenas as diferenças entre os tratamentos, houve uma tendência (P = 0,10) dos animais controle apresentarem valores maiores que o TP5,3. Houve efeito do dia para acético, butírico e valérico nos cordeiros TP5,3, que aumentou ao longo do tempo. Efeito do dia (aumentou ao longo do tempo) para ácido propiônico em todos os tratamentos. Não houve interação tratamento x dia ou efeito do dia para a soma de AGCC, pH e MBRT ([Material suplementar 3](#)).

Não houve efeito do tratamento sobre as contagens de *E. coli* e *Enterobacteria* nas fezes de cordeiros ([Tabela 5](#)). No entanto, contagens totais de coliformes foram encontradas nas fezes de cordeiros TP1,3 quando comparados ao controle. Contagens de *E. coli* entre tratamento x dia (P = 0,05). Os animais TP5,3 apresentaram uma contagem maior do que os animais TP1,3 no dia 15. A contagem total de coliformes do grupo TP5,3 foi maior do que a do grupo TP1,3 no décimo quinto dia; no entanto, os animais dos tratamentos controle e TP1,3 apresentaram contagens maiores do que os tratamentos TP2,7 e TP5,3 no dia 45 (P = 0,01).

As contagens de Enterobacteriaceae não diferiram entre o tratamento x dia e dia (P $\hat{y}$ 0,05). Houve efeito do dia para contagens de *E. coli* e coliformes totais em todos os tratamentos, reduzindo ao longo do tempo ([Material suplementar 3](#)).

3.3. Experimento 2

Os resultados do desempenho de crescimento estão descritos na [Tabela 6](#). Os animais que receberam própolis apresentaram maior peso corporal do que os animais do grupo MONENSIN nos dias 60 e 75 (interação; P = 0,05); no entanto, o tratamento não afetou o peso corporal (P = 0,17). O ganho de peso de

Tabela 6

Experimento 2 - Desempenho zootécnico de cordeiros alimentados com extrato de própolis vermelha misturado ao concentrado.

Variáveis	Tratamentos1		Valor P do SEM		
	MONENSINA PRÓPOLIS		Tratar		Tratar Edia
Peso corporal (kg)				0,17	0,05
Dia 1	18.3	18.4	0,54		
Peso inicial (d15)	21.0	21.4	0,69		
Peso final (d75)	36,5b	38.1a	0,66		
Ganho médio diário (GMD)	0,240b	0,261a	0,02	0,03	-
Ingestão de matéria seca	0,910	0,950	0,42	0,79	-
(kg/dia)					
Conversão alimentar	3,79	3,63	0,17	0,32	-
(kg/kg)					

¹Os tratamentos com monensina e própolis representam animais que receberam 23,45 ppm/kg/MS de monensina e 3,8 mL de própolis animal/dia, respectivamente. Dentro de uma linha significa que sem um sobrescrito comum diferem (P $\hat{y}$ 0,05) ou tendem a diferir (P $\hat{y}$ 0,10).

A proporção de animais que receberam própolis foi maior do que a daqueles que receberam MONENSIN (P = 0,05), assim como o GMD dos animais tratados com própolis (P = 0,05). Não houve efeito entre os tratamentos ou na interação tratamento x dia (P $\hat{y}$ 0,11) para ganho de peso do dia 1 ao dia 15, IMS e conversão alimentar.

Os resultados da análise hematológica estão descritos na [Tabela 7](#). Animais alimentados com própolis apresentaram contagens maiores de linfócitos do que os animais do grupo MONENSIN no dia 15 (P = 0,01). Não foram detectados efeitos de tratamento ou tratamento x dia para hematócrito, hemoglobina, eritrócitos, leucócitos, granulócitos ou monócitos (P > 0,11). Houve efeito do dia (P = 0,01), para ambos os tratamentos (MONENSIN e PRÓPOLIS), para as variáveis leucócitos totais, linfócitos e granulócitos. O dia da coleta não teve efeito sobre as demais variáveis hematológicas.

Os resultados da bioquímica sérica estão descritos na [Tabela 7](#). Os animais alimentados com própolis apresentaram maior atividade de AST do que o grupo MONENSINA nos dias 45 e 75, assim como o efeito do tratamento (P = 0,01). Não foram identificados efeitos do tratamento e do tratamento x dia (P > 0,11) para glicose, triglicerídeos, colesterol, proteína total, albumina, globulina e gama GT. Houve efeito do dia (p = 0,03), para ambos os tratamentos (MONENSINA e PRÓPOLIS), na atividade da AST. O dia da coleta não teve efeito sobre as demais variáveis bioquímicas clínicas.

Os resultados dos indicadores ruminais são apresentados na [Tabela 8](#). Os animais alimentados com própolis apresentaram valores de pH mais elevados nos dias 45 e 75, com efeito significativo do tratamento (P = 0,01). O grupo PRÓPOLIS apresentou menor tempo para MBRT do que os animais MONENSINA nos dias 45 e 75 (P = 0,01). Uma menor concentração de ácidos graxos de cadeia curta foi encontrada no fluido ruminal dos cordeiros que consumiram própolis ([Tabela 8](#)). O tratamento ou a interação tratamento x dia não afetou a proporção de ácidos acético, propiônico, butírico, isovalérico e valérico (P>0,05). A relação acético/propionico foi maior no rúmen dos cordeiros que consumiram própolis em comparação com a monensina. No fluido ruminal, houve efeito do dia (p =

0,01) para ambos os tratamentos (MONENSINA e PRÓPOLIS), para tempo de MBRT, concentração de AGCC e proporção de ácido acético. O dia da coleta não teve efeito sobre as demais variáveis relacionadas ao fluido ruminal.

Os resultados da análise microbiológica das fezes estão descritos na [Tabela 8](#). Os animais do grupo PRÓPOLIS apresentaram contagens menores de *Escherichia coli* nos dias 45 e 75 (P = 0,03), com efeito significativo do tratamento (P = 0,05). O mesmo ocorreu para a variável coliformes totais nos dias 45 e 75 (P = 0,01), com contagens menores nos animais do grupo PROP-OLIS em comparação ao grupo MONENSINA. No entanto, houve efeito significativo do tratamento e interação tratamento x dia para as contagens de Enterobactérias, com contagens bacterianas menores observadas no dia 45 (P = 0,05).

Tabela 7

Experimento 2 - Hemograma de cordeiros alimentados com extrato de própolis vermelha misturado ao concentrado comparado à monensina.

Variáveis	Tratamentos1		Valor P SEM		
	MONENSINA PRÓPOLIS			Tratar	Tratar Edia
Hemograma					
Hematócrito (%)	30.4	29.1	1,25	0,89	0,91
Hemoglobina (g/dL)	11.8	11.8	0,41	0,92	0,95
Eritrócitos (x 106 µL)	10.0	10.1	0,26	0,95	0,96
Leucócitos (x103 µL)2	7.04	7.24	1.01	0,82	0,32
Linfócitos (x103 / µL)2				0,68	0,01
Dia 1	10,8	11,0	0,96		
Dia 15	7,43b	8,93a	0,57		
Dia 45	4,37	4,59	0,56		
Dia 75	3,13	3,03	0,55		
Granulócitos (x103 /µL)2	1,49	1,19	0,75	0,20	0,13
Monócitos (x103 /µL)	0,56	0,54	0,38	0,90	0,81
Sérico					
bioquímica					
Glicose (mg/dL) 74,7		74,2	2,85	0,94	0,92
Triglicerídeos 27,3 (mg/dL)		22,7	3,14	0,73	0,65
Colesterol (mg/ dL)	65,3	65,1	2,46	0,96	0,91
Proteína total (g/dL)	6,11	6,06	0,26	0,93	0,92
Albumina (g/dL)	2,55	2,54	0,11	0,95	0,96
Globulina (g/dL)	3,56	3,51	0,24	0,93	0,92
GGT (U/L)	95,9	96,8	6,41	0,85	0,72
AST (U/L)2 Dia				0,08	0,01
1 Dia	94,3	93,6	3,21		
15 Dia	90,6	92,5	3,04		
45 Dia 75	80,3a	108,2b	3,94		
	93,0a	103,5b	3,82		

1Os tratamentos com monensina e própolis representam animais que receberam 23,45 ppm/kg/MS de monensina e 3,8 mL de própolis animal/dia, respectivamente. 2 Aspartato aminotransferase (AST) e gama-glutamil transferase (GGT). 2 Houve efeito do dia (P < 0,05). b Dentro de uma linha significa que sem um sobrescrito comum diferem (P > 0,05) ou tendem a diferir (P > 0,10).

Nota: Para analisar o efeito do tratamento, foram utilizados os resultados dos dias 15, 45 e 75, que correspondem ao período experimental; os resultados foram apresentados como uma média.

= 0,01) em cordeiros do grupo PRÓPOLIS. Houve efeito do dia (p = 0,01) para ambos os tratamentos (MONENSINA e PRÓPOLIS), quanto à contagem de *E. coli*, coliformes totais e Enterobactérias.

Os resultados das características da carcaça e da composição química da carne estão descritos na Tabela 9. Não houve efeito do tratamento (P > 0,11) para peso da carcaça, rendimento, pH da carcaça quente, MS, gordura, proteína e matéria orgânica.

Os resultados do perfil de AG na carne estão descritos na Tabela 9. A carne dos animais alimentados com própolis vermelha apresentou menor concentração de ácido palmítico, enquanto houve aumento de ácido palmitoleico (P = 0,01). Além disso, foi detectado efeito do tratamento (P = 0,05) para a concentração total de ácidos graxos monoinsaturados (AGMI), sendo maior nos animais alimentados com própolis vermelha quando comparados aos cordeiros do grupo MONENSIN. Não houve efeito do tratamento para as demais variáveis relacionadas ao perfil de AG na carne.

4. Discussão

A adição de extrato de própolis vermelha à dieta de cordeiros diminuiu o estado oxidativo, melhorou as respostas inflamatórias e o crescimento animal; essas melhorias nem sempre ocorrem em experimentos com própolis.

Tabela 8

Experimento 2 - Indicadores ruminais e microbiologia das fezes de cordeiros alimentados com extrato de própolis vermelha misturado ao concentrado.

Variáveis2	Tratamentos1		SEM	Valor de p	
	MONENSINA PRÓPOLIS			Tratar	Tratar £ dia
Líquido ruminal					
pH ruminal Dia				0,01	0,01
15 Dia	6.21	6.34	0,03		
45 Dia	6.13b	6h35	0,03		
75 MBRT	6.11b	6h38	0,03		
(s)3 Dia 15				0,26	0,01
Dia 45	41,4	56,2	3,05		
Dia 75	67,8a	33,0b	3,65		
	78,3a	57,8b	3,41		
γ SCFA (mmol/ L)3				0,05	0,01
Dia 15	121a	98,4b	2,85		
Dia 45	104	101	2,87		
Dia 75	119	113	2,86		
Ácido acético (%)3	59,7	61,3	1,97	0,56	0,23
Ácido propiônico (%)	26.3	25,4	0,95	0,89	0,61
Ácido butírico (%) 10,6		10.2	0,64	0,93	0,86
Ácido isovalérico 1,40 (%)		1,27	0,06	0,15	0,34
Ácido valérico (%) 1,90	2,43b	1,76	0,07	0,23	0,11
propiônico Acético/	2,57a		0,02	0,02	0,12
Fezes					
microbiologia2					
Escherichia coli (x104) 3				0,05	0,03
Dia 15	134	120	5.10		
Dia 45	310a	186b	6.16		
Dia 75	82,7a	42.6b	3.94		
Coliformes totais (x104) 3				0,02	0,01
Dia 15	235	195	5,96		
Dia 45	610a	357b	8.41		
Dia 75	209a	137b	7,36		
Enterobactérias (x104) 3				0,05	0,01
Dia 15	175	159	7,28		
Dia 45	594a	338b	10.7		
Dia 75	129	113	9,32		

1Os tratamentos com monensina e própolis representam animais que receberam 23,45 ppm/kg/MS de monensina e 3,8 mL de própolis animal/dia, respectivamente. 2 MBRT (teste de redução do azul de metileno); SCFA (ácidos graxos de cadeia curta); Valores expressos em log UFC/g de fezes. 3 Houve efeito do dia (P < 0,05).a-bDentro de uma linha, as médias sem um sobrescrito comum diferem (P > 0,05) ou tendem a diferir (P > 0,10).

Nota: Para analisar o efeito do tratamento, foram utilizados os resultados dos dias 15, 45 e 75, que correspondem ao período experimental; os resultados foram apresentados como médias.

De acordo com a literatura, a composição química da própolis depende da biodiversidade na área onde as colmeias coletam seu material e sua localização fitogeográfica, e essa variação afeta diretamente suas propriedades farmacológicas (Afrouzan et al., 2018). Vestitol e medicarpina existem apenas no décimo terceiro tipo de própolis e nunca foram mencionados nos outros 12 tipos de própolis brasileira (Park et al., 2000). A própolis vermelha é rara devido às suas robustas propriedades antioxidantes, antimicrobianas, antiprotzoárias e antifúngicas (Freires et al., 2016; Rufatto et al., 2018), pois é produzida a partir de resinas coletadas de plantas específicas encontradas em regiões geográficas limitadas. A própolis vermelha brasileira é derivada principalmente da planta *Dalbergia ecastaphyllum*, que cresce em áreas costeiras específicas da região nordeste do Brasil.

Em comparação com outros tipos de própolis, a produção da própolis vermelha é naturalmente menor devido à disponibilidade limitada de plantas-fonte e à dependência da atividade das abelhas em ambientes específicos. Ela possui compostos químicos únicos que não são comumente encontrados em outros tipos de própolis.

Tabela 9

Experimento 2 - Composição química e ácidos graxos da carne e características da carcaça de cordeiros alimentados com extrato de própolis vermelha misturado ao concentrado.

Variáveis	Tratamentos1		SEM	p-valor
	MONENSINA PRÓPOLIS			Tratar
Peso da carcaça quente (kg)	19,5	18,0	0,62	0,87
Rendimento de carcaça	47,7	47,7	0,60	0,96
(%) pH carcaça quente	6,61	6,60	0,04	0,97
Composição química (g/kg)				
Matéria seca	27,5	27,2	0,25	0,96
Lipídios totais	2,64	2,22	0,08	0,74
Proteína bruta	23,3	23,5	0,55	0,95
Matéria orgânica	1,58	1,49	0,12	0,88
Ácido graxo (%)				
C8:0 (Caprílico)	0,048	0,046	0,002	0,87
C10:0 (Capríco)	0,050	0,061	0,003	0,58
C12:0 (Láurico)	0,046	0,060	0,002	0,44
C14:0 (Místico)	1,301	1,565	0,361	0,51
C14:1 (Miristoleico)	0,068	0,089	0,025	0,19
C15:0 (Pentadecanoico)	0,229	0,285	0,012	0,65
C16:0 (Palmitico)	25,00a	22,78b	0,851	0,01
C16:1 (Palmitoleico)	1,626b	2,842a	0,201	0,01
C17:0 (Heptadecanoico)	0,963	0,978	0,157	0,96
C17:1 (cisy 10-heptadecenóico)	0,744	0,758	0,143	0,95
C18:0 (Estearico)	15,87	15,81	0,358	0,94
C18:1n9t (Elaidico)	1,646	1,705	0,092	0,89
C18:1n9c (Oleico)	40,31	41,07	0,386	0,74
C18:2n6c (Linoléico)	7,921	7,758	0,654	0,94
C20:0 (Araquídico)	0,119	0,122	0,040	0,91
C18:3n6 (γ- linolênico)	0,104	0,108	0,015	0,97
C18:3n3 (γ- linolênico)	0,249	0,250	0,139	0,99
C21:0 (Henicosanoico)	0,230	0,262	0,097	0,95
C20:2 (cisy 11,14-Eicosadienoico)	0,094	0,085	0,008	0,88
C22:0 (Behenico)	0,062	0,061	0,006	0,96
C20:3n6 (cisy 8,11,14-Eicosatrienoico)	0,215	0,214	0,023	0,98
C20:4n6 (Araquidônico)	2,913	2,884	0,113	0,90
C20:5n3 (cisy 5,8,11,14,17-Eicosapentaenoico)	0,075	0,079	0,011	0,92
C24:1n9 (nervoso)	0,041	0,038	0,008	0,87
C22:6n3 (cisy 4,7,10,13,16,19-docosahexaenoico)	0,057	0,077	0,011	0,65
SFA	18,92	19h25	0,241	0,81
MUFA	44,44b	46h50	0,468	0,05
PUFA	11,62	11h45	0,197	0,96

1 Os tratamentos com monensina e própolis representam animais que receberam 23,45 SFA ppm/kg/MS de monensina e 3,8 mL de própolis animal/dia, respectivamente. (ácidos graxos saturados); MUFA (ácidos graxos monoinsaturados); PUFA (ácidos graxos poli-insaturados).

2 ^{note} Dentro de uma linha, as médias sem um sobrescrito comum diferem (P > 0,05).

própolis. Esses compostos incluem isoflavonas, por exemplo. No entanto, na própolis deste estudo, não foram encontrados compostos raros que a classificassem como o décimo terceiro tipo. Essa descoberta ocorre porque a própolis de cada estudo é originária de locais diferentes e suas respectivas composições também são diferentes. Portanto, os valores de fenóis e flavonoides são exclusivos deste estudo e são difíceis de comparar com a literatura. No entanto, é possível que a própolis vermelha influencie direta e indiretamente nossos resultados, conforme discutido abaixo.

Animais TP2.7 apresentam maior GMD. No entanto, os cordeiros tratados com PRÓPOLIS no experimento 2 apresentaram maior peso corporal devido ao maior ganho de peso e ganho de peso diário durante o período experimental. Cordeiros lactentes que foram suplementados com própolis verde na dose de 150 µL/kg de peso corporal apresentaram ganho de peso significativo (C’ecere et al., 2021), enquanto Itavo et al. (2011) encontraram ganho de peso diário mais significativo em cordeiros confinados alimentados com própolis verde na dose de 15 mL/dia (67,0 mg de flavonoide). A própolis possui alta bioatividade e sinergia entre seus compostos; por isso, é chamada de aditivo alimentar. Assim como a monensina, a própolis atua contra bactérias gram-positivas, o que beneficia a fermentação ruminal em termos de utilização de nutrientes, melhorando o desempenho animal (Zawadzki

e outros, 2011).

O leucograma deve ser interpretado com cautela, pois o aumento de células pode indicar aumento da resposta inflamatória (efeito negativo na produtividade animal) ou estimulação do sistema imunológico (efeito positivo para o animal). O aumento da resposta inflamatória em animais pode levar a uma série de efeitos adversos que impactam negativamente a produtividade, como redução do crescimento, pois a energia que os animais usariam para crescimento e produção pode ser desviada para combater a inflamação, e a inflamação pode afetar a digestão e a absorção de nutrientes, resultando em menor eficiência alimentar; a redução dessas células de defesa pode indicar interferência negativa na resposta imune ou simplesmente um efeito anti-inflamatório desejável devido ao consumo do aditivo. No estudo piloto, houve menor número de leucócitos nos animais alimentados com extrato de própolis, embora o valor estivesse dentro da faixa de normalidade para a espécie (González e Silva, 2022), sugerindo efeito benéfico no desempenho dos cordeiros. Morsy et al. (2016) encontraram maior número de leucócitos em ovinos alimentados com extrato de própolis vermelha; Slazon et al. (2019) não encontraram diferença no leucograma de bezerras.

A própolis atua como um imunostimulante devido à presença de seus flavonoides (Nassar et al., 2012) e uma ação anti-inflamatória resultante de compostos presentes na própolis (Ramos e Miranda, 2007). O efeito imunomodulador é provavelmente devido aos componentes da própolis que aumentam e inibem biomarcadores do sistema imunológico. Esses efeitos contraditórios descritos na literatura são provavelmente devido às complexas variações químicas, à presença em diferentes regiões geográficas e às formas de extração (Berretta et al., 2017). Os efeitos contraditórios referem-se às diferentes maneiras pelas quais a própolis pode influenciar o sistema imunológico, conforme descrito na literatura científica. Em outras palavras, alguns estudos relatam que a própolis pode aumentar certos biomarcadores do sistema imunológico, enquanto outros indicam que ela pode inibir esses mesmos biomarcadores. Essas observações contraditórias sugerem que os efeitos da própolis no sistema imunológico não são consistentes.

A menor contagem de linfócitos é responsável pelo menor número de leucócitos em cordeiros alimentados com extrato de própolis vermelha. Essa diminuição não interferiu na concentração de globulinas; no entanto, afetou os níveis de proteínas de fase aguda, ou seja, os níveis de ceruloplasmina e proteína C-reativa estavam em menores concentrações nos animais alimentados com própolis, sugerindo um efeito anti-inflamatório. Os flavonoides são potentes anti-inflamatórios, o que explica nossos resultados. A elevação dessas proteínas (ceruloplasmina e proteína C-reativa) pode sugerir uma resposta de sobrecarga devido a lesões teciduais e infecções locais (Gabay e Kushner, 1999), levando a um maior consumo de ATP pelo organismo animal, refletindo em menos energia para produzir massa muscular e proporcionar ganho de peso para os animais. Portanto, indiretamente, devido à ação anti-inflamatória, a ingestão de própolis pelos cordeiros favoreceu seu crescimento. De acordo com a literatura, os flavonoides também podem regular proteínas do ácido araquidônico (Hou et al., 2007), diminuir espécies reativas de oxigênio com consequente inibição da via inflamatória (Salzano et al., 2014), inibir a via do NF-κB por meio da ativação do PPAR-gama (Martinez-Micaelo et al., 2015) e regular proteínas quinases ativadas por mitógeno (Wadsworth et al., 2001; Cho et al., 2003). C’ecere et al. (2021) avaliaram proteínas de fase aguda, como a ceruloplasmina, em cordeiros alimentados com própolis verde e não encontraram diferenças, mesmo em uma dose mais alta (250 µL/kg de peso corporal).

A redução dos níveis de TBARS capazes de reagir ao ácido tiobarbitúrico e a indução da ativação de enzimas antioxidantes estão associadas a compostos encontrados na própolis (Jasprica et al., 2007). No presente estudo, foram encontrados flavonoides e fenóis, agentes antioxidantes capazes de eliminar radicais livres e proteger a ação da peroxidação lipídica (Paulino et al., 2018; Yousef e Salama, 2009). Como resultado, podemos atribuir um efeito hepatoprotetor indireto, visto que a GST reduziu sua atividade, uma enzima crítica na desintoxicação hepática; esse efeito provavelmente está relacionado à redução das oxidações e, consequentemente, dos radicais livres.

Houve um resultado inesperado porque os animais que consumiram própolis no estudo piloto (TP2.7) tiveram maior ganho de peso e menor

Níveis de AGCCs no ambiente ruminal. Ao mesmo tempo, no experimento 2, não observamos diferença nos níveis ao final do experimento. Morsy et al. (2021) encontraram um aumento nos níveis de acetato, propionato, valerato e AGCCs totais quando a própolis vermelha foi fornecida a ovelhas. Precisamos entender melhor como os flavonoides presentes na própolis vermelha (vestitol, medicarpina, isoliquiritigenina e formononetina) podem afetar o perfil de AGCCs, o que faremos em um estudo futuro que investigará a microbiota ruminal.

Os microrganismos no rúmen são indispensáveis para a digestão eficiente dos nutrientes presentes na dieta (Vázquez-Anon e Jenkins, 2007; Freires et al., 2016); no entanto, neste estudo, um efeito antimicrobiano pode ter ocorrido no rúmen e nas fezes, consequentemente interferindo na síntese de AGCC. Nossa hipótese é que a ingestão de extrato de própolis vermelha por cordeiros aumentaria a degradação de nutrientes ruminais e produziria proporções individuais e AGCC totais, ao mesmo tempo em que mitigaria a formação de metano com base em informações de outros pesquisadores (Morsy et al., 2015; Soltan e Patra, 2020). Atribuímos os menores níveis de AGCC ao extrato não possuir vestitol, medicarpina, isoliquiritigenina ou formononetina, presentes no estudo de Morsy et al. (2021); de acordo com os autores, esses compostos ajudaram a aumentar a produção de AGCC. Entretanto, a diminuição nas concentrações de AGCC não interferiu nos resultados de desempenho, o que acreditamos estar relacionado aos efeitos indiretos, como ação anti-inflamatória e antioxidante, que melhoram a saúde dos cordeiros.

Contagens mais baixas de coliformes totais nas fezes de cordeiros TP1.3 já haviam sido descritas em outro estudo do nosso grupo de pesquisa quando utilizamos própolis verde na dose de 150 µL/kg de peso corporal (Cecere et al., 2021). No experimento 2, obtivemos uma diminuição na contagem de coliformes totais, *E. coli* e Enterobactéria para animais alimentados com extrato de própolis vermelha na dose de 3,8 mL animal/dia. Atribuímos esse efeito a flavonoides e terpenos com características antibacterianas. De acordo com pesquisadores (Krol et al. 1993), esses agentes apresentam sinergismo e potencializam o mecanismo antibacteriano quando combinados. In vitro, 30% de própolis verde demonstrou inibir a divisão celular em bactérias gram-negativas, incluindo *E. coli*, e causar bacteriólise (Krol et al., 1993).

Notavelmente, o extrato no presente estudo teve uma concentração de 10%, sugerindo uma ação antibacteriana mais significativa do que outras composições químicas encontradas na literatura em doses mais baixas, mas reduzindo eficientemente a contagem de bactérias gram-negativas.

Os resultados obtidos para ácidos graxos na carne mostram que o extrato de própolis vermelha influenciou o perfil ácido. A própolis aumentou a concentração de ácido palmítico, um ácido monoinsaturado. O ácido palmítico, um ácido saturado, foi reduzido. Este achado corrobora Aguiar et al. (2014), onde os autores também encontraram um aumento na concentração de ácido palmítico ao fornecer própolis a bovinos confinados. Além disso, Itavo et al. (2019), ao suplementar cordeiros com própolis marrom, observaram uma redução nos níveis de ácidos graxos saturados e um aumento nos ácidos graxos monoinsaturados (ácido oleico (C18:1n-9) e ácidos graxos poli-insaturados (ácido linoleico, C18:2n-6). Embora não tenhamos encontrado um aumento em outros ácidos graxos monoinsaturados isoladamente neste estudo, observamos um aumento em seu total. Portanto, como o colesterol sérico é afetado pela composição de ácidos graxos e os ácidos graxos monoinsaturados desempenham um papel essencial na redução do colesterol sanguíneo (Madruga et al., 2005), pode-se afirmar que a adição de própolis vermelha melhorou o perfil de ácidos graxos na carne de cordeiro, o que é essencial do ponto de vista do consumidor. Aguiar et al. (2014) avaliaram o efeito da própolis no perfil de AG do leite de vacas leiteiras em lactação média. Eles observaram que o perfil de AG do leite foi alterado pela adição de própolis, o que mostra que ele desempenha um papel essencial em microrganismos.

O rúmen está envolvido no processo de bio-hidrogenação. No entanto, na literatura, não está claro quais compostos da própolis vermelha podem modular esses efeitos na qualidade da carne e no perfil de ácidos graxos, dificultando a interpretação dos resultados; portanto, mais estudos são necessários. Contudo, em outro estudo recente, pesquisadores constataram que o extrato de própolis vermelha melhorou o perfil lipídico da carne de cordeiro, ou seja, o tratamento com própolis apresentou efeito antioxidante mais significativo e menor teor de ácidos graxos saturados.

ácidos graxos desejáveis na carne (Silva et al., 2024). Além disso, verificou-se um aumento no teor de ácidos monoinsaturados e, consequentemente, uma melhora na qualidade nutricional e nos índices de aterogenicidade e trombogenicidade dos ácidos graxos desejáveis (Silva et al., 2024).

A amostra "n" foi uma das limitações do nosso estudo piloto, especialmente para a avaliação do desempenho zootécnico; no entanto, destacamos que a análise de desempenho é apenas um dado complementar, e o principal objetivo do estudo foi compreender os efeitos da própolis na resposta antioxidante, na inflamação e no perfil de AGCC no rúmen. No entanto, o experimento 2 foi realizado para complementar esses dados de desempenho e adicionar mais informações sobre a ação da própolis vermelha em cordeiros confinados.

5. Conclusão

A adição de extrato de própolis vermelha ao concentrado proporcionou um balanço oxidativo positivo, o que significa que há um excesso de antioxidantes em comparação aos radicais livres. Em termos de balanço oxidativo, isso pode indicar uma condição na qual o organismo está bem protegido contra o estresse oxidativo, potencialmente promovendo a saúde celular e prevenindo doenças relacionadas. O aditivo alimentar apresentou ação anti-inflamatória e antimicrobiana; uma dieta contendo própolis reduziu os AGCC no rúmen. Além disso, o extrato de própolis na dose testada de 3,8 mL de extrato de própolis/dia foi mais eficiente no desempenho de crescimento dos cordeiros em comparação ao grupo controle sem própolis.

Declaração de contribuição de autoria do CRediT

Charles M. Giacomelli: Metodologia, Investigação, Análise formal. **Luisa Nora:** Redação – rascunho original, Metodologia, Investigação.

Fernanda Picoli: Redação – rascunho original, Metodologia, Investigação.

Aleksandro S. da Silva: Redação – revisão e edição, Validação, Supervisão, Software, Recursos, Administração do projeto, Investigação, Análise formal, Conceitualização. **Luiz Eduardo L. Silva:** Redação – rascunho original, Metodologia, Investigação, Análise formal. **Priscila M.**

Copetti: Validação, Metodologia, Análise formal, Curadoria de dados.

Bianca F. Bissacotti: Validação, Metodologia, Análise formal, Curadoria de dados. **Bruna Klein:** Redação – rascunho original, Validação, Metodologia, Análise formal, Curadoria de dados. **Bruno GO Cecere:** Redação – rascunho original, Metodologia, Investigação, Análise formal, Curadoria de dados. **Denise N. Araujo:** Redação – rascunho original, Supervisão, Recursos, Administração do projeto, Conceitualização. **Vitor L. Molosse:** Redação – rascunho original, Metodologia, Análise formal, Curadoria de dados. **Anieli P.**

Kempka: Redação – revisão e edição, Supervisão, Metodologia, Conceitualização.

Guilherme L. Deolindo: Redação – rascunho original, Metodologia, Análise formal, Curadoria de dados, Conceitualização. **Roger Wagner:** Redação – rascunho original, Supervisão, Recursos, Análise formal.

Declaração de Interesse Concorrente

Os autores declaram não haver conflito de interesses.

Apêndice A. Informações complementares

Dados suplementares associados a este artigo podem ser encontrados em versão online em [doi:10.1016/j.smallrumres.2024.107379](https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2024.107379).

Referências

- Afrouzan, H., Tahghighi, A., Zakeri, S. e Es-Haghi, A., 2018. Composição química e atividades antimicrobianas da própolis iraniana. *Irã. Biomed. J.* 22, 50–65. <https://doi.org/10.22034/ibj.22.1.50>.
- Aguiar, SCD, De Paula, EM, Yoshimura, EH, Dos Santos, WBR, Machado, E., Valero, MV, Dos Santos, GT, Zeoula, LM, 2014. Efeitos de compostos fenólicos da própolis sobre parâmetros digestivos e ruminais em vacas leiteiras. *Rev. Bras. Zootec.* 43 (197-206), 2014. <https://doi.org/10.1590/S1516-35982014000400006>.

Alencar, SM, Oldoni, TLC, Castro, ML, Cabral, ISR, Costa-Neto, CM, Cury, J., Rosalen, PL, Ikegaki, M., 2007. Composição química e atividade biológica de um novo tipo de própolis brasileira: a própolis vermelha. J. Ethnopharmacol. 113, 278–283. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2007.06.005>.

Associação de Químicos Analíticos Oficiais (AOAC), 2000. Métodos Oficiais de Análise (17ª ed.). AOAC Internacional.

Bayram, NE, Gerçek, YC, Bayram, S, Togar, B., 2020. Efeitos dos métodos de processamento e solventes de extração no conteúdo químico e nas propriedades bioativas da própolis. J. Food Meas. Charact. 14, 905–916. <https://doi.org/10.1007/s11694-019-00340-z>.

Berretta, AA, Arruda, C., Miguel, FG, Baptista, N., Nascimento, AP, Marquede-Oliveira, F., Bastos, JK, 2017. Propriedades funcionais da própolis brasileira: da composição química ao mercado. In: Superalimentos e Alimentos Funcionais: Uma Visão Geral de seu Processamento e Utilização, 15, pp. 55–98.

Bertoletti, LL, Skoronski, E., Schittler, L., Kempka, AP, 2018. Extratos de folhas de *Ficus auriculata* Lour.: atividade antioxidante, antimicrobiana e fitotóxica. Consec. Agr. Ciência. 83, 321–328. <https://hrcaak.srce.hr/207932y>.

Bligh, EG, Dyer, WJ, 1959. Um método rápido de extração e purificação de lipídios totais. Can. J. Biochem. Physiol. 37, 911–917.

Bonoli, M., Verardo, V., Marconi, E., Caboni, MF, 2004. Fenóis antioxidantes na farinha de cevada (*Hordeum vulgare* L.) : estudo espectrofotométrico comparativo entre métodos de extração de compostos fenólicos livres e ligados. J. Agric. Food Chem. 52, 5195–5200. <https://doi.org/10.1021/jf040075c>.

Brand-Williams, W., Cuvelier, ME, Berset, CLT, 1995. Uso de um método de radicais livres para avaliar a atividade antioxidante. LWT Food Sci. Technol. 28, 25–30. [https://doi.org/10.1016/s0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/s0023-6438(95)80008-5).

Brodiscou, LP, Papon, Y., Brodiscou, AF, 2000. Efeitos de extratos de plantas secas em fermentação e metanogênese em cultura contínua de microrganismos ruminais. Anim. Feed Sci. Tecnologia. 87, 263–277. [https://doi.org/10.1016/s0377-8401\(00\)00193-0](https://doi.org/10.1016/s0377-8401(00)00193-0).

Callaway, TR, Edrington, TS, Rychlik, JL, Genovese, KJ, Poole, TL, Jung, YS, Nisbet, DJ, 2003. Ionóforos: seu uso como promotores de crescimento de ruminantes e impacto na segurança alimentar. Edições atuais. Intest. Microbiol. 4, 43–51.

C'ecere, BG, da Silva, AS, Molosse, VL, Alba, DF, Leal, KW, da Rosa, G., Vedovatto, M., 2021. Adição de própolis ao leite melhora o crescimento de cordeiros lactantes: efeito nas respostas antimicrobiana, antioxidante e imunológica em animais. Small Rumin. Res. 194, 106265. <https://doi.org/10.1016/j.smlrumres.2020.106265>.

Cho, SY, Park, SJ, Kwon, MJ, Jeong, TS, Bok, SH, Choi, WY, Jeong, KS, 2003. A queretina suprime a produção de citocinas pró-inflamatórias por meio das MAP cinases e da via NF- κ B em macrófagos estimulados por lipopolissacarídeos. Mol. Célula. Bioquímica. 243, 153–160. <https://doi.org/10.1023/a:1021624520740>.

Dirksen, G., 1993. Sistema digestivo. In: Rosenberger, G. (Ed.), Exame clínico dos bovinos, 3. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, pp.

Ellman, GL, 1959. Grupos sulfidríla teciduais. Arch. Biochem. Biophys. 82, 70–77. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(59\)90090-6](https://doi.org/10.1016/0003-9861(59)90090-6).

Fagliari, JJ, Santana, AE, Lucas, FA, Campos, E., Curi, PR, 1998. Constituintes sanguíneos de bovinos rec' em-nascidos das raças Nelore (*Bos indicus*) e holandesa (*Bos taurus*) e de bubalinas (*Bubalis bubalis*) raça Murrah. Arq. Sutiás. Med. Veterinário. Zootec. 50, 253–262.

Freires, IA, Alencar, SM, Rosalen, PL, 2016. Uma perspectiva farmacológica sobre o uso da própolis vermelha brasileira e seus compostos isolados contra doenças humanas. Eur. J. Med. Química. 110, 267–279. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.01.033>.

Gabay, C., Kushner, I., 1999. Proteínas de fase aguda e outras respostas sistêmicas à inflamação. N. Engl. J. Med. 340, 448–454. <https://doi.org/10.1056/Nejm199902113400607>.

Gonzalez, FHD, Silva, SC, 2022. Introdução a bioquímica clínica veterinária. ePub revista, Porto Alegre: [SN].

Habig, WH, Pabst, MJ, Jakoby, WB, 1974. Glutathione s-transferases: a primeira etapa enzimática na formação do ácido mercaptúrico. J. Biol. Chem. 249, 7130–7139. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(19\)42083-8](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(19)42083-8).

Hartman, L., Lago, RC, 1973. Preparação rápida de ésteres metílicos de ácidos graxos a partir de lipídios. Laboratório. Prática. 22, 475–476.

Hou, DX, Luo, D., Tanigawa, S., Hashimoto, F., Uto, T., Masuzaki, S., Sakata, Y., 2007. Prodeffindina B-4 3'-O-galato, um polifenol do chá, está envolvido na inibição da COX-2 e da iNOS por meio da regulação negativa da via TAK1-NF- κ B. Bioquímica. Farmacol. 74, 742–751. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2007.06.006>.

Ítavo, CCBF, Ítavo, LCV, Esteves, CAT, Sapatero, GA, Silva, JA, Ferelli, KLS M., Souza Arco, TFF, 2019. Influência do resíduo sólido da extração alcoólica da própolis marrom sobre o consumo, a digestibilidade, o desempenho e as características de carcaça e carne de cordeiros confinados. J. Anim. Feed Sci. 28, 149–158. <https://doi.org/10.22358/jafs/109284/2019>.

Ítavo, CCBF, Morais, MG, Costa, C., Ítavo, LCV, Franco, GL, Da Silva, JA, Reis, F. A., 2011. Adição de própolis ou monensina na dieta: comportamento e produtividade de cordeiros em confinamento. Anim. Feed Sci. Technol. 165, 161–166. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2011.02.020>.

Jasprica, I., Mornar, A., Debeljak, Z., Smolc'c-Bubalo, A., Medf'c Sarf'c, M., Mayer, L., Romf'c, Z., Bu'can, K., Balog, T., Sobocanec, S., Sverko, V., 2007. Estudo in vivo dos efeitos da suplementação de própolis no estado antioxidante e nos glóbulos vermelhos. J. Etnofarmacologia. 110, 548–554. <https://doi.org/10.1016/J.Jep.2006.10.023>.

Jentzsch, AM, Bachmann, H., Fürst, P., Biesalski, HK, 1996. Análise aprimorada de malondialdeído em fluidos corporais humanos. Free Radic. Biol. Med. 20, 251–256. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(95\)02043-8](https://doi.org/10.1016/0891-5849(95)02043-8).

Koru, O., Toksoy, F., Aikeli, CH, Tunca, YM, Baysallar, M., Guclu, AU, Akca, E., Tuyulu, AO, Sorkun, K., Tanyuksel, M. e Salih, B., 2007. Atividade antimicrobiana *in vitro* de amostras de própolis de diferentes origens geográficas contra certos patógenos orais. Anaerobe 13, 140–145. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2007.02.001>.

Krol, W., Scheller, S., Shani, J., Pietsz, G., Czuba, Z., 1993. Efeito sinérgico do extrato etanólico de própolis e antibióticos no crescimento de *Staphylococcus aureus*. Arzneim. Pesquisa. 43, 607–609.

Larrauri, JA, Rup'erez, P., Saura-Calixto, F., 1997. Efeito da temperatura de secagem na estabilidade de polifenóis e na atividade antioxidante de cascas de bagaço de uva vermelha. J. Agric. Química de alimentos. 45, 1390–1393. <https://doi.org/10.1021/jf960282f>.

Layne, E., 1957. Métodos espectrofotométricos e turbidimétricos para medição de proteínas. Métodos Enzymol. 3, 447–454.

Madrugá, MS, Sousa, WH, Rosales, MD, Cunha, MGG, Ramos, JLF, 2005. Qualidade da carne de cordeiros Santa Inês terminados com diferentes dietas. Rev. Bras. Zootec. 34, 309–315. <https://doi.org/10.1590/S1516-35982005000100035>.

Martinez-Micaelo, N., Gonz'alez-Abuín, N., Mulero, M., Pinent, M., Ard'evol, A., Blay, M., 2015. Procinidinas e ácido docosahexaenóico suprimem a inflamação e estimulam o sistema imunológico em ratos alimentados com dieta de cafeteria. J. Função. Alimentos 15, 61–71. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.02.017>.

Mathew, AG, Beckmann, MA, Saxton, AM, 2001. Uma comparação de antibióticos Resistência em bactérias isoladas de rebanhos suínos nos quais antibióticos foram utilizados ou excluídos. J. Swine Health Prod. 9, 125–129. <https://www.aasv.org/shap/issues/v9n3/v9n3p125.pdf>.

Mirzoeva, OK, Calder, PC, 1996. O efeito da própolis e seus componentes sobre Produção de eicosanóides durante a resposta inflamatória. Prostaglandinas Leucocitárias. Ácidos graxos essenciais 55, 441–449. [https://doi.org/10.1016/s0952-3278\(96\)90129-5](https://doi.org/10.1016/s0952-3278(96)90129-5).

Morsy, AS, Abdalla, AL, Soltan, YA, Sallam, SMA, El-Azrak, KM, Louvandini, H., Alencar, SM, 2013. Efeito da administração de própolis vermelha brasileira sobre variáveis hematológicas, bioquímicas e resposta parasitária de ovelhas Santa Inês durante e após o período de lavagem. Trop. Anim. Health Prod. 45, 1609–1618. <https://doi.org/10.1007/S11250-013-0406-3>.

Morsy, ASYA, Soltan, YA, Sallam, SMA, 2016. Impacto da própolis vermelha brasileira Extrato sobre metabólitos sanguíneos, produção de leite e desempenho de cordeiros de ovelhas Santa Inês. Trop. Anim. Health Prod. 48, 1043–1050. <https://doi.org/10.1007/S11250-016-1054-1>.

Morsy, AS, Soltan, YA, El-Zaiat, HM, Alencar, SM, Abdalla, AL, 2021. Extrato de própolis de abelha como aditivo alimentar fitogênico para melhorar a digestibilidade da dieta, a biossíntese microbiana do rúmen, mitigando a formação de metano e o estado de saúde de ovelhas prenhes tardias. Anim. Feed Sci. Tecnologia. 273, 114834. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2021.114834>.

Morsy, AS, Soltan, YA, Sallam, SMA, Kreuzer, M., Alencar, SM, Abdalla, AL, 2015. Comparação da eficiência *in vitro* de extratos suplementares de própolis de abelha de diferentes origens no aumento da degradabilidade ruminal da matéria orgânica e na mitigação da formação de metano. Anim. Feed Sci. Technol. 199, 51–60. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2014.11.004>.

Nassar, SA, Mohamed, AH, Soufy, H., Nasr, SM, Mahran, KM, 2012. Efeito imunestimulante da própolis egípcia em coelhos. Sci. World J. <https://doi.org/10.1100/2012/901516>.

Conselho Nacional de Pesquisa, 2007. Exigências Nutricionais de Ovinos. Academia Nacional Imprensa, Washington, DC, EUA.

Oetzuerk, H., Sagmanligil, V., 2009. Papel das leveduras vivas no ecossistema ruminal. Dtsch. Tieraerzt. Wochenschr. 116, 244–248. <https://doi.org/10.2376/0341-6593-116-244>.

Paixão, TR, De Almeida, VVS, Oliveira, AC, Da Silva, APG, Silva, JWD, Santos, L. V., Silva, RR, 2022. Ingestão, digestibilidade, parâmetros ruminais e desempenho em cordeiros alimentados com níveis crescentes de extrato de própolis vermelha. Trop. Anim. Health Prod. 54, 364. <https://doi.org/10.1007/s11250-022-03376-4>.

Park, YK, Ikegaki, M., Alencar, SM, Moura, FF, 2000. Avaliação da própolis brasileira por métodos físico-químicos e atividade biológica. Honeybee Sci. 21, 85–90.

Paulino, N., Abreu, SR, Uto, Y., Koyama, D., Nagasawa, H., Hori, H., Dirsch, VM, Vollmar, AM, Scremin, A., Bretz, WA, 2018. Efeitos antiinflamatórios de um composto biodisponível, artepillina na própolis brasileira. EUR. J. Pharmacol. 587, 296–301. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2008.02.067>.

Ramos, AFN, Miranda, JL, 2007. Própolis: uma revisão de suas propriedades anti-inflamatórias e ações curativas. J. Veneno. Anima. Toxinas incl. Trop. Dis. 13, 702. <https://doi.org/10.1590/s1678-91992007000400002>.

Rufatto, LC, Luchtenberg, P., Garcia, C., Thomassigny, C., Bouttier, S., Henriques, JA P., Moura, S., 2018. Própolis vermelha brasileira: composição química e atividade antibacteriana determinadas por fracionamento bioquímico. Microbiol. Res. 214, 74–82. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2018.05.003>.

Russell, JB, Strobel, HJ, 1988. Efeitos de aditivos na fermentação ruminal *in vitro*: uma comparação entre monensina e bacitracina, outro antibiótico gram-positivo. J. Anim. Ciência. 66, 552–558. <https://doi.org/10.2527/jas1988.662552x>.

Salzano, S., Checconi, P., Hanschmann, EM, Lillig, CH, Bowler, LD, Chan, P., Ghezzi, P., 2014. Ligação entre inflamação e estresse oxidativo via liberação de peroxirredoxina-2 glutatilonilada, que atua como um sinal de perigo. Proc. Natl. Acad. Ciência. 111, 12157–12162. <https://doi.org/10.1073/pnas.1401712111>.

Slorcin, JM, Bankova, V., 2011. Própolis: existe potencial para o desenvolvimento de novos fármacos? J. Ethnopharmacol. 133, 253–260. <https://doi.org/10.1016/J.Jep.2010.10.032>.

Silva, JWD, Almeida, VVS, Oliveira, AC, Santos, LS, Lima Junior, DM, 2024. O extrato de própolis vermelha reduz a oxidação lipídica da carne de cordeiro. Anima. Prod. Ciência. 64, AN23013. <https://doi.org/10.1071/AN23013>.

Silva, DJ; Queiroz, AC, 2002. Análises de alimentos (métodos químicos e biológicos), 3 edição, Viçosa, MG: Editora UFV.

Slazon, GS, Toledo, AF, Silva, AP, Coelho, MG, Da Silva, MD, Cezar, AM, Bittar, C. MM, 2019. Própolis vermelha como aditivo para bezerros leiteiros pré-desmamados: efeito no desempenho do crescimento, saúde e parâmetros sanguíneos selecionados. J. Dairy Sci. 102, 8952–8962. <https://doi.org/10.3168/Jds.2019-16646>.

- Soltan, YA, Patra, AK, 2020. Própolis de abelha como aditivo alimentar natural: bioativo Compostos e efeitos no padrão de fermentação ruminal, bem como na produtividade de ruminantes. Indian J. Anim. Saúde 59, 50–61. <https://doi.org/10.36062/ljah.59.2spl.2020.50-61> .
- Van Soest, PJ, Robertson, JB, Lewis, BA, 1991. Métodos para fibra alimentar, fibra em detergente neutro e polissacarídeos não amiláceos em relação à nutrição animal. J. Dairy Sci. 74, 3583–3597. [https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302\(91\)78551-2](https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302(91)78551-2).
- Vázquez-An sobre, M., Jenkins, T., 2007. Efeitos da alimentação com gordura oxidada, com ou sem antioxidantes dietéticos, sobre a digestibilidade dos nutrientes, o nitrogênio microbiano e o metabolismo dos ácidos graxos. J. Dairy Sci. 90, 4361–4367. <https://doi.org/10.3168/jds.2006-858>.
- Visentainer, JV, e Franco, MRB, 2006. Química de Alimentos: Teoria e Prática de Análise de Alimentos, 3ª edição. Editora da Universidade Estadual de Maringá (Eduem), Maringá-PR.
- Wadsworth, TL, McDonald, TL, Koop, DR, 2001. Efeitos do extrato de Ginkgo biloba (egb 761) e da quercetina nas vias de sinalização induzidas por lipopolissacarídeos envolvidas na liberação do fator de necrose tumoral- α . Biochem. Pharmacol. 62, 963–974. [https://doi.org/10.1016/s0006-2952\(01\)00734-1](https://doi.org/10.1016/s0006-2952(01)00734-1) .
- Wang, K., Ping, S., Huang, S., Hu, L., Xuan, H., Zhang, C., Hu, F., 2013. Molecular Mecanismos subjacentes aos efeitos anti-inflamatórios in vitro de um extrato etanólico rico em flavonoides de própolis chinesa (tipo álamo). Complemento baseado em evidências. Alternativo. Med. <https://doi.org/10.1155/2013/127672>.
- Wischer, J., Boguhn, H., Steingab, M., Schollenberger, K., Hartung, M., Rodehutschord, 2013. Efeito da monensina na fermentação in vitro de silagens e na síntese de proteína microbiana. Arch. Anim. Nutr. 67, 219–234. <https://doi.org/10.1080/1745039x.2013.793050> .
- Yousef, MI, Salama, AF, 2009. Proteção do própolis contra a toxicidade reprodutiva causada por cloreto de alumínio em ratos machos. Food Chem. Toxicol. 47, 1168–1175. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2009.02.006> .
- Yuste, S., Amanzougarene, Z., de la Fuente, G., Fondevila, M., de Vega, A., 2020. Efeitos da substituição parcial de cevada por milho e polpa de beterraba no desempenho de crescimento, fermentação ruminal e mudança na diversidade microbiana de bezerros de corte durante a transição de um regime de leite e pasto para uma dieta rica em concentrado. Livest. Sci. 238, 104071.
- Zahedi, E., Sadr, SS, Sanaeierad, A., Roghani, M., 2023. Acetil-L-carnitina crônica O tratamento alivia déficits comportamentais e neuroinflamação por meio do fortalecimento da microbiota derivada de AGCC em modelo de autismo com valproato. Biomed. Pharmacother. 163, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2023.114848>.
- Zawadzki, F., Prado, IN, Marques, JA, 2011. Monensina sódica ou extrato de própolis na dieta de touros terminados em confinamento: efeitos no desempenho animal e nas características da carcaça. J. Anim. Feed Sci. 20, 16–25. <https://doi.org/10.22358/Jafs/66153/2011>.

16. Artigo 6 Traduzido



animals



Artigo

Os efeitos de uma mistura de óleos essenciais no leite materno Bezerros sobre desempenho, sistemas imunológico e antioxidante e microbiota intestinal

Luísa Nora ¹, Carlos Marcon ¹, Guilherme Luiz Deolindo ¹, Mateus Henrique Senhoz ², Ana Luiza Muniz ²,
Miklos Maximiliano Bajay e ¹, Priscila Marquezan Copetti ³, Bianca Fagan Bissacotti ³, Vera M. Morsch ³
Aleksandro Schafer da Silva ^{2,*}

¹ Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC), Chapecó 89815-630, SC, Brasil; luisa.nora22@gmail.com (LN); charlesmarcon3@gmail.com (CM); guilhermeluizd@outlook.com (GLD); miklos.bajay@udesc.br (MMB)

² Departamento de Zootecnia, Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC), Chapecó 89815-630, SC, Brasil; mateushenriquesignor@gmail.com (MHS); analuizamusouza@gmail.com (ALM)

³ Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria 97105-900, RS, Brasil; priscila_marquezan@hotmail.com (PMC); bianca_fbissacotti@hotmail.com (BFB); veramorsch@gmail.com (VMM)

* Correspondência: aleksandro.silva@udesc.br

Resumo Simples: Os resultados indicaram que o fornecimento de uma mistura de óleos essenciais com canela, orégano e eucalipto proporcionou aos bezerros estimulação humoral e antioxidante do sistema imunológico, minimizando o estresse oxidativo fisiológico e levando a uma maior eficiência. A melhora da saúde não impulsionou o crescimento dos bezerros que consumiram óleos essenciais. As avaliações da abundância e da biodiversidade da microbiota não diferiram entre os animais que consumiram a mistura de óleos essenciais e aqueles que não consumiram; no entanto, permitiram a identificação dos principais gêneros nas fezes de bezerros nas primeiras semanas de idade.

Resumo: O objetivo do presente estudo foi determinar se a adição de uma mistura à base de óleos essenciais de canela, orégano e eucalipto à dieta líquida de bezerros estimularia o sistema imunológico, aliado à ação anti-inflamatória, minimizaria as respostas oxidativas e alteraria a microbiota intestinal, consequentemente favorecendo o crescimento animal. Vinte e quatro bezerros machos da raça Holandesa (com aproximadamente cinco dias de idade) foram amamentados por 60 dias, submetidos ao processo de desmame e acompanhados até o 75º dia do experimento. Os bezerros foram divididos em grupos controle (n = 12) e fitobiótico (n = 12), recebendo sucedâneo de leite comercial e concentrado peletizado à base de leite. Para o grupo fitobiótico, adicionamos a mistura à dieta líquida duas vezes ao dia, a 5 mL/alimentação nos primeiros 15 dias e 10 mL/alimentação até o dia 60. Não detectamos diferenças no ganho de peso, mas os animais do grupo fitobiótico tenderam a consumir menos ração. Bezerros tratados com fitobióticos apresentaram melhor conversão alimentar e eficiência alimentar do que os animais do grupo controle. Menores contagens de leucócitos e linfócitos foram observadas, assim como maior concentração de colesterol. Imunoglobulina A, ceruloplasmina e transferrina também diferiram entre os grupos, com maiores níveis de IgA e menores níveis de proteínas de fase aguda (ceruloplasmina e transferrina) em bezerros que consumiram o fitobiótico. Maior atividade da glutatona S-transferase foi encontrada no soro de bezerros no grupo de tratamento. A microbiota intestinal não diferiu entre os grupos; no entanto, os gêneros *Acinetobacter*, *Pseudomonas* e *Psychrobacter* foram os mais abundantes, independentemente do tratamento. Concluímos que a mistura de óleos à base de canela, orégano e eucalipto melhorou os sistemas imunológico e antioxidante dos bezerros, melhorando a eficiência alimentar sem afetar a microbiota intestinal.

Palavras-chave: cinamaldeído; 1,8-cineol; carvacrol; timol; microrganismos intestinais



Citação: Nora, L.; Marcon, C.;

Deolindo, GL; Signor, MH; Muniz, AL; Bajay,

MM; Copetti, PM;

Bissacotti, BF; Morsch, VM; da Silva,

COMO Os efeitos de uma mistura de ingredientes essenciais

Óleos no leite de bezerros lactentes

Desempenho, Imunidade e

Sistemas antioxidantes e intestinais

Microbiota. *Animais* **2024**, *14*, 3555.

[https://doi.org/10.3390/](https://doi.org/10.3390/ani14243555)

ani14243555

Editora Acadêmica: Gabriella Holló

Recebido: 31 de outubro de 2024

Revisado: 5 de dezembro de 2024

Aceito: 8 de dezembro de 2024

Publicado: 10 de dezembro de 2024



Direitos autorais: © 2024 dos autores.

Licenciado MDPI, Basileia, Suíça.

Este artigo é um artigo de acesso aberto distribuído sob os termos e

condições do Creative Commons

Licença de atribuição (CC BY)

([https://creativecommons.org/licenses/by/](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

4.0/).

1. Introdução

A produção leiteira está melhorando internacionalmente e o Brasil é um dos maiores produtores de leite do mundo [1]. Esses avanços vêm ocorrendo para minimizar problemas e aumentar a produção. Na produção leiteira, várias fases da criação animal, incluindo a produção de bezerros, são consideradas as mais críticas porque os bezerros têm sistemas imunológicos extremamente imaturos e frágeis [2]. Os bezerros enfrentam vários problemas durante as primeiras semanas de vida; no entanto, o principal problema que afeta essa classe animal é a diarreia, um sinal clínico associado a infecções causadas por alguns microrganismos patogênicos. O problema da diarreia pode ser mais significativo quando acompanhado pela perda de apetite e desidratação, enfraquecendo ainda mais o animal [3]. Ele pode morrer rapidamente, dependendo do grau de infecção e da falta de resposta do animal.

Baixas temperaturas ambientes, alto número de bezerros alojados na mesma instalação, falta de aquecimento, ventilação inadequada e método inadequado de fornecimento de dieta líquida (leite e seus substitutos) aumentam a incidência de diarreia e promovem maior taxa de mortalidade [4]. Compreender a microbiota intestinal é essencial para a compreensão da diarreia; no entanto, essa microbiota também é responsável pela digestão, pela absorção de alguns nutrientes e por auxiliar no estabelecimento do sistema imunológico do animal em relação à proteção contra microrganismos patogênicos [5,6].

A microbiota intestinal em bezerros começa a se estabelecer rapidamente desde o nascimento e é afetada por vários fatores, incluindo a microbiota do canal vaginal da mãe no momento do parto, o ambiente em que o animal está alojado, a origem da ração fornecida ao animal, se a ração é leite consumível ou descartado e a ingestão de ração sólida [7,8]. Várias bactérias não patogênicas formam essa microbiota e podem frequentemente atuar como barreiras para outras bactérias patogênicas [9]. Algumas bactérias no trato gastrointestinal são inofensivas enquanto o animal está saudável; no entanto, podem causar doenças quando o bezerro está imunossuprimido. A microbiota gastrointestinal pode ser modulada para estabelecer microrganismos específicos, e essa modulação pode ser realizada de várias maneiras, incluindo o uso de óleos essenciais [10]; eles são mais eficazes quando realizados no início da vida do animal. Um bezerro neste estágio tem uma microbiota flutuante que depende das condições ambientais [11].

Óleos essenciais são produtos extraídos de diversas fontes vegetais [12], que, devido à sua ação antimicrobiana [13,14], têm sido utilizados como alternativas para reduzir o uso de antibióticos na nutrição animal [14,15]. Óleos de canela, eucalipto e (principalmente) orégano têm sido frequentemente estudados devido às suas propriedades biológicas, que permitem efeitos como antimicrobianos, antioxidantes e anti-inflamatórios [16–18], sendo esses compostos utilizados como aditivos na ração animal. O óleo essencial de canela é extraído de *Cinnamomum* spp. [19] como fonte de cinamaldeído, o principal componente bioativo [13]. Outro componente extraído do óleo essencial é o carvacrol, que deriva principalmente do orégano (*Origanum vulgare*) e do tomilho (*Thymus vulgaris*) [14]. O óleo de orégano também atua como um intensificador de desempenho em ruminantes, pois melhora a conversão alimentar e a saúde por meio da modulação da fermentação ruminal [20]. O óleo essencial de eucalipto é extraído das folhas, e o 1,8-cineol é o principal componente de interesse [21,22] devido às suas atividades gastroprotetoras e antioxidantes; regenera as células gástricas e aumenta o muco gástrico [23].

Os óleos essenciais, antimicrobianos naturais na produção de bezerros, são cada vez mais promissores, especialmente na forma de misturas. O aroma poderoso dos óleos essenciais pode ser um problema na alimentação de bezerros porque, quando adicionados ao leite, podem levar à falta de interesse no consumo; em concentrado, esses óleos podem reduzir o consumo. Os benefícios dos óleos isolados de orégano [20], canela [15] e eucalipto [24] para ruminantes jovens são conhecidos; os autores de [25] nos mostram em seu trabalho que quando o óleo de orégano é fornecido a bezerros não sacados a partir de 70 dias de vida, há um ganho de peso e um estímulo do sistema imunológico, com aumento nos níveis de IgA e IgM. No entanto, o efeito desses três óleos essenciais quando combinados e administrados a bezerros durante a fase de amamentação não é conhecido. Mas pesquisas nos dizem que a combinação de óleos essenciais pode ter seus efeitos potencializados por ter ações sinérgicas, melhorando as funções antioxidantes, por exemplo [26]. Assim, o objetivo do presente estudo

foi determinar se a adição de uma mistura à base de óleos essenciais de canela, orégano e eucalipto na dieta líquida dos bezerros estimularia o sistema imunológico combinado com ação anti-inflamatória, minimiza as respostas oxidativas e altera a microbiota intestinal, consequentemente melhorando o crescimento animal.

2. Materiais e Métodos

O estudo foi realizado na Fazenda Experimental do Centro de Educação Superior do Oeste da Universidade Estadual de Santa Catarina, no município de Guatambu, Sul do Brasil. Durou 75 dias: 60 dias de amamentação, 6 dias de desmame gradual e 9 dias após o desmame. O Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Santa Catarina aprovou todos os experimentos (protocolo número 2322230522).

2.1. Desenho Experimental e Alimentação

Foram utilizados vinte e quatro bezerros machos da raça Holandesa com no máximo cinco dias de vida e adquiridos por meio de doações de produtores regionais. Todos os bezerros receberam alimentação adequada quantidades de colostro. Ao chegarem ao local do experimento, foram alojados em gaiolas suspensas individuais medindo 100 cm × 120 cm × 107 cm, forradas com borracha esteiras e aparas de madeira. As gaiolas tinham suporte para baldes de água e entradas e suporte para alimentadores de mamilo individuais. Os bezerros foram divididos em controle e fitobiótico grupos, com 12 bezerros em cada grupo, onde cada animal foi considerado um animal experimental unidade. Os animais receberam um substituto comercial do leite como dieta líquida, na dose de 0,48 kg/dia (em matéria seca) diluído em dois litros de água duas vezes ao dia, às 08:00 e às 16:30. Para os animais do grupo fitobiótico, foi utilizada uma mistura comercial (Bezerrozan®, Tecphy, Chapecó, Brasil) de óleos essenciais (canela, orégano e eucalipto) foi adicionado, com um pureza total de 6% de óleos essenciais – ou seja, 60 mL/L em um veículo emulsificante (gliceril ricinoleato de polietilenoglicol). As proporções dos três óleos na mistura foram as mesmo (2%).

Nos primeiros 15 dias do experimento foi administrada uma dose de 5 mL/alimentação a cada animal, e depois disso, a dose foi aumentada para 10 mL/alimentação. Foi administrado apenas durante a lactação (60 dias); a menor dose inicial foi para adaptar o paladar do animal ao produto, já que ele já possui um forte cheiro de canela. Ambos os grupos de animais receberam ração inicial limitada a um máximo ingestão de 2,5 kg/bezerro/dia (matéria natural) e água à vontade. No início da desmame (dia 61), a quantidade de leite foi reduzida proporcionalmente durante 6 dias, e os bezerros passou a receber feno ad libitum além da ração inicial limitada a 2,5 kg/dia para evitar Distúrbios metabólicos. A composição da ração fornecida é apresentada na Tabela 1.

Tabela 1. Ingredientes e composição química da ração fornecida aos bezerros.

Ingredientes		Quantidade (matéria seca) dias 1–60	Quantidade (matéria seca) Dias 61–75
PASSO 1			
Iniciante ¹		Ad libitum	Ad libitum
Substituto do leite		484 g/dia	363 g/dia (dias 61–62), 242 g/dia (dias 63–64); e 121 g/dia (dias 65–66)
Feno		0	Ad libitum
Composição química na matéria seca (g/kg)			
	Iniciante	Substituidor	Feno
Matéria seca	893	973	850
Proteína bruta	261	279	72,3
Extrato de éter	34,4	92,5	8,00
Cinzas	64,4	78,5	72,3

Tabela 1. Cont.

Ingredientes	Quantidade (matéria seca) dias 1–60		Quantidade (matéria seca) Dias 61–75
	Iniciante	Substituidor	Feno
PASSO 1			
Composição química na matéria seca (g/kg)			
Fibra bruta	-	14.0	-
FDN	260	-	602
ADF	94,8	-	242
Lactose	-	536	-

¹ O starter foi feito à base de farelo de trigo, farelo de soja micronizado, milho moído, soro de leite em pó e minerais e vitaminas. suplemento. O starter apresentou os seguintes níveis mínimos garantidos: Cálcio (9–11,00 g/kg), fósforo (6800 mg/kg), sódio (1900 mg/kg), magnésio (1500 mg/kg), enxofre (2800 mg/kg), cobalto (5 mg/kg), cobre (40 mg/kg), ferro (68 mg/kg), iodo (4,40 mg/kg), manganês (80 mg/kg), selênio (1 mg/kg), zinco (96 mg/kg), vitamina A (7.500 UI/kg), vitamina D3 (1.500 UI/kg), vitamina E (7,5 UI/kg), vitamina K3 (1,2 mg/kg), vitamina B1 (0,60 mg/kg), vitamina B2 (2 mg/kg), vitamina B6 (1,50 mg/kg), vitamina B12 (11 mcg/kg), vitamina B3 (15 mg/kg), vitamina B9 (0,30 mg/kg), vitamina C (0,35 mg/kg), colina (210 mg/kg), monensina sódica (36 mg/kg) e flavomicina (0,72 mg/kg).

2.2. Peso corporal, eficiência alimentar e pontuação das fezes

A alimentação foi fornecida com base no consumo diário e as sobras foram pesadas no dia seguinte para obtenção da ingestão de matéria seca (CMS) diária. Os animais foram pesados semanalmente em uma balança digital para monitorar o ganho de peso (WG: peso final - inicial peso) e ganho médio diário (GMD: GP/número de dias). Eficiência de alimentação de informações (ADG/DMI—kg/kg) foi obtido através de cálculos matemáticos baseados na dieta dos animais peso e consumo diário. A pontuação das fezes foi avaliada diariamente por meio do exame visual metodologia de análise proposta pelos autores [27], em que a pontuação varia de 1 a 5, onde 1 são fezes normais e 5 são fezes totalmente líquidas devido à incidência de diarreia. a partir da pontuação 3, foi considerada diarreia, porém com menor gravidade.

2.3. Análise de sangue

Amostras de sangue foram coletadas para análises hematológicas, bioquímicas e imunológicas nos dias 1, 15, 30, 45, 60 e 75. Todas as amostras foram coletadas pela manhã, com o animais em jejum de comida e água. As coletas foram feitas através da veia jugular com agulhas e tubos evacuados. Tubos com EDTA foram usados para evitar a coagulação e permitir análise hematológica e outra continha um ativador de coágulo para obtenção de soro. Para soro separação, os tubos com ativador de coágulo foram centrifugados a 3500 RPM por 10 min, e o o soro foi transferido para microtubos identificados e armazenado a −20 °C até novas análises foram realizadas.

As análises hematológicas foram realizadas com sangue fresco em equipamento automático (Equipe Vet 3000®, Itatiba, Brasil). O equipamento permitiu quantificar o total número de leucócitos e o diferencial (linfócitos, granulócitos e monócitos), contagem total de eritrócitos, concentração de hemoglobina e hematócrito.

As análises bioquímicas mediram proteína total, glicose, albumina, colesterol e níveis séricos de ureia em analisador semiautomático (Bio-2000 BioPlus®, Barueri, Brasil) e kits comerciais (Analisa®, Belo Horizonte, Brasil). Os níveis de globulinas foram obtidos usando um cálculo matemático (proteínas totais—albumina).

Para fracionamento de proteínas, eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio foi realizada, segundo a literatura [28], adaptada por outros pesquisadores [29] utilizando um mini gel (10 × 10 cm). O gel foi corado com Azul de Coomassie e fotografado para identificar e quantificar as frações proteicas usando o software Labimage1D (<https://www.kapelanbio.com/products/labimage/>, acessado em 2 de dezembro de 2024) Loccus Biotechnology, Morrisville, NC, EUA). Um padrão contendo frações com peso molecular entre 10 e 250 KD (Kaleidoscope—BIORAD, Hercules, CA, EUA) foi usado como referência.

A peroxidação lipídica foi determinada por meio dos níveis de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) utilizando os métodos descritos na literatura [30] para amostras de soro. As TBARS séricas foram expressas como nM de malondialdeído (MDA)/mL. A dosagem dos níveis totais de tiol foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Ellman [31]. A atividade da glutatona S-transferase (GST) foi determinada de acordo com a metodologia descrita por Habig et al. [32].

2.4. Análise da Microbiota Intestinal

Nos dias 1, 35 e 60, as fezes foram coletadas diretamente da ampola retal e armazenadas em swabs 3M™ Quick Swabs para detecção qualitativa e quantitativa de microrganismos por metagenômica, por sequenciamento do gene 16S rRNA, realizada pelo laboratório BPI – Pesquisa e Inovação em Biotecnologia®. Cabe ressaltar que os animais em tratamento com antibióticos devido a diarreia ou outros problemas não tiveram suas fezes coletadas, pois isso interferiria diretamente nos resultados das análises.

O DNA total foi extraído de 200 mg (peso úmido) de amostras com o kit ZR Fun-gal/Bacterial DNA MiniPrep (Zymo Research, Tustin, CA, EUA). Os primers 341F (5' - CCTAYGGGRBGCASCAG-3') e 806R (5' - GGACTACNNGGGTATCTAAT-3') foram selecionados para amplificar a região V3–V4 do gene 16S rRNA bacteriano por reação em cadeia da polimerase (PCR) [33].

As bibliotecas foram quantificadas por q-PCR utilizando o Kit de Quantificação de Bibliotecas Kapa (Illumina, San Diego, CA, EUA), seguindo as recomendações do fabricante. As amostras foram normalizadas para uma concentração final de 2 nM e sequenciadas com um Illumina MiSeq para cada extremidade.

2.5. Análise Estatística Um

delineamento inteiramente casualizado foi usado neste estudo. Para analisar os dados, eles foram primeiramente analisados de forma descritiva. Os dados foram então submetidos ao teste de normalidade (teste de Shapiro-Wilk), que mostrou que todos os dados tinham distribuição normal. Também avaliamos o resíduo (incluindo o resíduo de comando/influência após os efeitos fixos no modelo misto), que também mostrou distribuição normal. Por isso, os dados foram analisados usando o procedimento SAS MIXED (SAS Inst. Inc., Cary, NC, EUA; versão 9.4), com a aproximação de Satterthwaite sendo usada para determinar os graus de liberdade do denominador para o teste de efeitos fixos. Ganho de peso, ganho médio diário, conversão alimentar e eficiência alimentar foram testados para efeitos de tratamento fixos e usando o animal como variáveis aleatórias. Todas as outras variáveis (peso corporal, bioquímica, hemograma, contagem de proteínas e oxidantes) foram analisadas como medidas repetidas e testadas para efeitos fixos de tratamento, dia e tratamento $\times$ dia. Todos os resultados obtidos em d1 para cada variável também foram incluídos como covariáveis; no entanto, o comando para covariáveis foi removido do modelo quando $p > 0,05$.

A estrutura de covariância de Toeplitz foi selecionada para o peso corporal (PC), e a estrutura de covariância autorregressiva de primeira ordem foi selecionada para todas as outras variáveis. As estruturas de covariância foram selecionadas de acordo com o menor critério de informação de Akaike. As médias foram determinadas usando PDIFF, e todos os resultados foram relatados como LSMEANS seguidos pelo erro padrão. O teste qui-quadrado foi usado para análise de escore de fezes. Diferenças significativas foram definidas quando $p \leq 0,05$ e tendências quando $p > 0,05$ e $< 0,10$. Calculamos o poder post-hoc para os grupos, considerando a eficiência alimentar. Usamos a média de cada grupo e seu SEM com um alfa de 0,05, e terminamos com um poder razoável de 88,3%.

Os dados da sequência foram processados com Mothur v.1.39.5 [34], de acordo com o Mothur MiSeq SOP [35]. A taxonomia foi então atribuída consultando a sequência representativa de cada oligótipo no banco de dados SILVA (versão 132) [36].

Dados de OTU agrupados por referência fechada foram exportados para análise com Phyloseq v1.41 [37] em R 4.3.1 (R Core Team, 2023). O índice de diversidade inversa de Simpson e Shannon obteve valores de diversidade alfa para comunidades bacterianas. A calculadora de Simpson inversa é preferível a outras medidas de diversidade alfa, pois indica a riqueza de uma comunidade com uniformidade uniforme que possui o mesmo nível de diversidade e, portanto, tem alguma interpretação biológica [38]. De acordo com a literatura, a diversidade inversa de Simpson combina riqueza

com uniformidade [39], dá mais ênfase às espécies comuns [40] e é menos sensível a esforços de amostragem do que os outros índices de diversidade alfa [41]. PERMANOVA foi aplicada a o teste diferencial de distâncias entre grupos de tratamento [42]. A função tax_glom de O Phyloseq foi usado para agregar dados de abundância por gênero para gerar abundância relativa gráficos dos 10 gêneros mais abundantes em todas as amostras, plotados pela média das abundâncias por estudo e animal. Abundância relativa de Clostridium potencialmente patogênico bem conhecido e Escherichia [43]. Todas as figuras foram geradas com o pacote ggplot2 v3.2.1 em R [44].

3. Resultados

3.1. Alterações Clínicas

Algumas intervenções clínicas foram necessárias durante o experimento, conforme descrito em Tabela S1. Isso ocorreu devido a problemas como diarreia, pneumonia e, em um caso, uma lesão no casco. Diarreia foi o sinal clínico mais observado, e o uso de antibióticos foi realizado somente seguindo um protocolo em que os animais apresentaram escore de diarreia de 4 ou 5 por mais de 24 h, febre, apatia e sinais de desidratação. Durante este período, foi uma infestação de moscas (Musca domestica), que são muito comuns na nossa região durante períodos quentes (Guatambu/SC, Brasil, 27°09'07,0'' S 52°47'17,7'' W), pois podem ser vetores de várias doenças. Os resultados da pontuação das fezes estão detalhados na Figura S1.

3.2. Consumo, Ganho de Peso e Eficiência Alimentar

A ingestão de matéria seca (CMS) tendeu a ser menor no grupo fitobiótico (p = 0,1) do que no grupo no grupo controle quando avaliamos a matéria seca total consumida ao longo do experimento. Os pesos iniciais médios dos bezerros foram de 40,7 kg e 41 kg, e os finais os pesos foram de 78,1 kg e 79,6 kg, nos grupos controle e fitobiótico, respectivamente. os ganhos de peso não diferiram entre os grupos em nenhuma das medidas; no entanto, os animais no grupo fitobiótico apresentaram melhor eficiência alimentar (p = 0,05). Os dados estão expressos em Tabela 2. Foi elaborada uma curva de peso corporal para os animais (Figura S2)

Tabela 2. Desempenho de crescimento e consumo de bezerros do grupo fitobiótico alimentado com ração mistura comercial de óleos essenciais e também no grupo controle.

Variável	Controlar	Fitobiótico	SEM	p—Tratar ¹	p—Tratamento × Dia ²
Peso corporal, kg d1				0,86	0,87
d60	40,7	41,0	0,34		
d75	61,2	62,4	0,34		
	78,1	79,6	0,35		
Peso, kg					
d1–60	16,6	16,0	0,21	0,84	—
d1–75	34,4	36,0	0,22	0,39	—
d60–75	17,6	20,0	0,20	0,42	—
Peso bruto, kg					
d1–60 0,27 d60–75 1,24 IMS do		0,26	0,03	0,88	—
fermento, kg MS		1,33	0,04	0,80	—
d1–60 0,52 d60–75 1,74 DMI de		0,41	0,05	0,11	—
substituto do leite,		1,52	0,16	0,11	—
kg MS					
d1–60	0,484	0,484	0,00	—	—
DMI: iniciador + substituto do leite, kg MS					
d1–60 1,00 Eficiência alimentar,	—	b 0,90	0,04	0,08	—
kg/kg					
d1–60	b 0,27	0,29 —	0,03	0,05	—

Fitobiótico: grupo de tratamento, que recebeu a mistura de óleos essenciais. ¹ A tabela mostra o efeito do tratamento, onde letras diferentes na mesma linha mostram diferenças significativas (p = 0,05) e tendências (p > 0,05 e < 0,1) entre grupos. ² Também mostra a interação tratamento × dia, onde letras diferentes na mesma linha mostram significância diferenças (p = 0,05) e tendências (p > 0,05 e < 0,1) entre os grupos. Abreviações: matéria seca (MS), peso ganho de peso (WG), ganho médio diário (GMD) e ingestão de matéria seca (CMS).

Pontuação de fezes

O tratamento não afetou a pontuação das fezes ($p > 0,05$ — Figura S1). Durante o experimento , a pontuação foi de 1,80 no grupo controle e 1,87 no grupo fitobiótico. De acordo com para a metodologia, as pontuações 1 e 2 foram consideradas normais; no entanto, vale ressaltar que esses valores são médias de todo o período experimental, portanto não podemos afirmar que os animais não tiveram diarreia em nenhum momento.

3.3. Exames de sangue

Na análise hematológica, os animais do grupo fitobiótico apresentaram menor contagem de leucócitos contagens nos dias 45 e 60 porque as contagens de linfócitos também foram menores ($p < 0,05$). No dia 30, a contagem de granulócitos também foi menor no grupo fitobiótico ($p < 0,05$). Em relação nos demais parâmetros hematológicos, não foi observada diferença durante o experimento. os resultados são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3. Hemograma de bezerros do grupo fitobiótico alimentados com mistura comercial de óleos essenciais e também no grupo de controle.

Variável	Controlar	Fitobiótico	SEM	p—Tratar ¹	p—Tratamento × Dia ²
Leucócitos (×103 cel/μL)				0,25	0,01
d1	14,8	16,6	0,69		
d15	16,6	15,8	0,66		
d30	21,2	17,3	0,77		
d45	12,4 [—]	9,91 ^b	0,65		
d60	8,00 [—]	b 5,17	0,66		
d75	8,24	7,53	0,66		
Linfócitos (×103 cel/μL) d1 d15 d30				0,07	0,01
	8,22	7,87	0,54		
d45	10,8	8,58	0,54		
d60	10,9	10,5	0,54		
d75	8,53 [—]	5,60 ^b	0,52		
	6,70 [—]	b 3,74	0,52		
	4,62	3,96	0,52		
Monócitos (×103 cel/μL)	1,78	1,38	0,61	0,52	0,21
Granulócitos (×103 cel/μL) d1 d15 d30				0,75	0,05
	3,78	4,91	0,35		
	3,32	4,37	0,35		
	6,57 [—]	4,72 ^b	0,35		
d45	2,02	2,66	0,34		
d60	2,07	2,35	0,29		
d75	2,38	2,32	0,28		
Eritrócitos (×106 cel/μL)	8,05	8,31	0,03	0,95	0,96
Hemoglobina (mg/dL)	10,4	10,4	0,18	0,98	0,95
Hematócrito (%)	28,4	28,3	0,71	0,96	0,94

Fitobiótico: grupo de tratamento, que recebeu a mistura de óleos essenciais.
¹ A tabela mostra o efeito do tratamento, onde letras diferentes na mesma linha mostram diferenças significativas ($p \leq 0,05$) e tendências ($p > 0,05$ e $\geq 0,1$) entre grupos.
² A tabela também mostra a interação tratamento × dia, onde letras diferentes na mesma linha mostram diferenças significativas ($p \leq 0,05$) e tendências ($p > 0,05$ e $\geq 0,1$) entre os grupos.

Glicose, proteína total, albumina, ureia e globulina não apresentaram diferença ao longo do estudo. o período experimental. No entanto, nos dias 30, 45 e 60, os níveis de colesterol foram maiores em o grupo fitobiótico (Tabela 4).

Tabela 4. Bioquímica clínica de bezerros alimentados com mistura comercial de óleos essenciais.

Variáveis	Controlar	Fitobiótico	SEM	p—Tratar ¹	p—Tratamento × Dia ²
Glicose (mg/dL)	83,5	83,1	2.12	0,95	0,98
Colesterol (mg/dL) d1 d15				0,05	0,01
d30	59,5	59,8	4,52		
	75,8	82,4	4,61		
	b 144	161 ^{um}	4.27		
d45	b 109	150 ^{um}	5,81		
d60	b 112	um 147	5,92		
d75	120	131	4,48		
Proteína total (g/dL)	6,52	6.34	0,25	0,56	0,30
Albumina (g/dL)	2,64	2,65	0,09	0,95	0,92
Ureia (mg/dL)	17.2	16,8	0,55	0,91	0,88
Globulina (g/dL)	3,87	3,68	0,18	0,81	0,76

Fitobiótico: grupo de tratamento, que recebeu a mistura de óleos essenciais. ¹ A tabela mostra o efeito do tratamento, onde letras diferentes na mesma linha mostram diferenças significativas (p ≤ 0,05) e tendências (p > 0,05 e ≥ 0,1) entre grupos. ² A tabela também mostra a interação tratamento × dia, onde letras diferentes na mesma linha mostram diferenças significativas (p ≤ 0,05) e tendências (p > 0,05 e ≥ 0,1) entre os grupos.

Os resultados dos biomarcadores de estresse oxidativo estão na Tabela 5. O GST mostrou um efeito de tratamento e interação tratamento × dia nos dias 15, 30, 45 e 60, maior no soro de animais no grupo fitobiótico. Não houve efeito do tratamento ou tratamento × dia interação para TBARS ou tióis totais.

Tabela 5. Estado oxidativo de bezerros alimentados com mistura comercial de óleos essenciais.

Variáveis	Controlar	Fitobiótico	SEM	p—Tratar ¹	p—Tratamento × Dia ²
TBARS (g/dL)	17.3	16.3	1.02	0,81	0,86
GST (g/dL) d1				0,01	0,01
	432	414	5,84		
d15	b 420	457 ^{um}	5,85		
d30	b 411	525 ^{um}	5,74		
d45	b 410	492 ^{um}	5,79		
d60	b 420	um 539	5,78		
Tióis totais (g/dL)	62,2	65,7	1,03	0,76	0,62

Fitobiótico: grupo de tratamento, que recebeu a mistura de óleos essenciais. TBARS: reativo ao ácido tiobarbitúrico substâncias; GST: enzima glutatona S-transferase. ¹ A tabela mostra o efeito do tratamento, onde diferentes letras na mesma linha mostram diferenças significativas (p ≤ 0,05) e tendências (p > 0,05 e ≥ 0,1) entre os grupos. ² O a tabela também mostra a interação tratamento × dia, onde letras diferentes na mesma linha mostram diferenças significativas (p ≤ 0,05) e tendências (p > 0,05 e ≥ 0,1) entre os grupos.

Os resultados do proteinograma estão expostos na Tabela 6, onde podemos observar uma efeito do tratamento e da interação tratamento × dia para os níveis de IgA, ceruloplasmina e transferrina. A IgA sérica foi maior no grupo fitobiótico no dia 60, a ceruloplasmina foi menor nos dias 30 e 60, e a transferrina foi menor no dia 45. Como efeito do tratamento, isso levou a níveis mais elevados de IgA e menores de ceruloplasmina e transferrina sérica em bezerros que consumiram a mistura de óleos essenciais. Não houve efeito do tratamento e da interação tratamento × dia para a concentração de imunoglobulinas de cadeia pesada, haptoglobina, proteína C-reativa, e ferritina.

Tabela 6. Proteinograma de bezerros alimentados ou não com mistura comercial de óleos essenciais.

Variáveis	Controlar	Fitobiótico	SEM	p—Tratar ¹	p—Tratamento × Dia ²
IgA (g/dL) d1				0,05	0,03
	0,69	0,65	0,02		
d15	0,67	0,64	0,02		
d30	0,70	0,71	0,02		
d45	0,65	0,70	0,03		
d60	0,62 ^b	0,75 ^{um}	0,02		
Ig de cadeia pesada (g/dL)	0,96	1,01	0,04	0,38	0,17
Ceruloplasmina (g/dL) d1 d15				0,05	0,02
	0,52	0,54	0,02		
	0,53	0,50	0,02		
d30	0,58 ^{um}	0,51 ^b	0,01		
d45	0,52	0,48	0,01		
d60	0,50 ^{um}	0,39 ^b	0,02		
Haptoglobina (g/dL)	0,29	0,30	0,01	0,89	0,60
Proteína C-reativa (g/dL)	0,18	0,16	0,01	0,45	0,23
Ferritina (g/dL)	0,23	0,20	0,02	0,54	0,42
Transferrina (mg/dL) d1				0,01	0,01
	0,20	0,20	0,02		
d15	0,21	0,20	0,02		
d30	0,20	0,17	0,02		
d45	0,21 ^{um}	0,16 ^b	0,01		
d60	0,22	0,17	0,02		

Fitobiótico: grupo de tratamento, que recebeu a mistura de óleos essenciais. ¹ A tabela mostra o efeito do tratamento, onde letras diferentes na mesma linha mostram diferenças significativas (p < 0,05) e tendências (p > 0,05 e > 0,1) entre grupos. ² A tabela também mostra a interação tratamento × dia, onde letras diferentes na mesma linha mostram diferenças significativas (p < 0,05) e tendências (p > 0,05 e > 0,1) entre os grupos.

3.4. Microbiota Intestinal

A partir de fezes de bezerros, nove gêneros dos microrganismos mais abundantes são mostrados em Figuras 1 e 2, detalhadas por tratamentos e períodos experimentais, respectivamente. houve uma diminuição nas abundâncias relativas dos gêneros Psychrobacter, Acinetobacter e Escherichia no grupo fitobiótico, em comparação com o controle, mas sem diferenças estatísticas (p > 0,05). Psychrobacter é principalmente um comensal que decompõe vários compostos dissolvidos compostos orgânicos de carbono, exceto açúcares, e sua abundância aumentou ao longo do período experimental [45]. Acinetobacter é considerado um importante agente etiológico humano e veterinário patógeno, principalmente devido à resistência intrínseca e adquirida aos antimicrobianos [46]. A designação “outros” refere-se aos gêneros que apareceram em pequenas quantidades e aos gêneros que não puderam ser identificado no banco de dados SILVA.

Abundâncias relativas de filos por grupos nas fezes de bezerros alimentados com óleos essenciais (fitobiótico) e grupo controle (sem óleos essenciais) são apresentados na Figura S3. destacar aqui o filo Proteobacteria, mais abundante nas fezes de bezerros.

Um número mais significativo de táxons foi observado nas amostras de animais do grupo fitobiótico, demonstrando uma maior diversidade alfa do que o controle. Observando essa diversidade alfa, também é possível observar que a maior diversidade ocorreu posteriormente no final do experimento, mas sem diferenças significativas no tratamento (p > 0,05) como mostrado nas Figuras 3 e 4.

A diversidade alfa considerando os grupos e os tempos de coleta (d35 e d60) é apresentado na Figura S4. A diferença dentro do grupo fitobiótico ao comparar d35 com d60 ao usar o índice de Shannon (que não foi observado em InvSimpson) fica fora—ou seja, houve um aumento na diversidade alfa no dia 60.

Diversidade beta considerando os grupos e os tempos de coleta (d35 e d60) dos bezerros que consumiram óleos essenciais é apresentado na Figura S5. Os resultados da PERMANOVA não foram significativo (p > 0,05) para os tratamentos e nenhum cluster distinto foi encontrado na PCoA de diversidade beta.

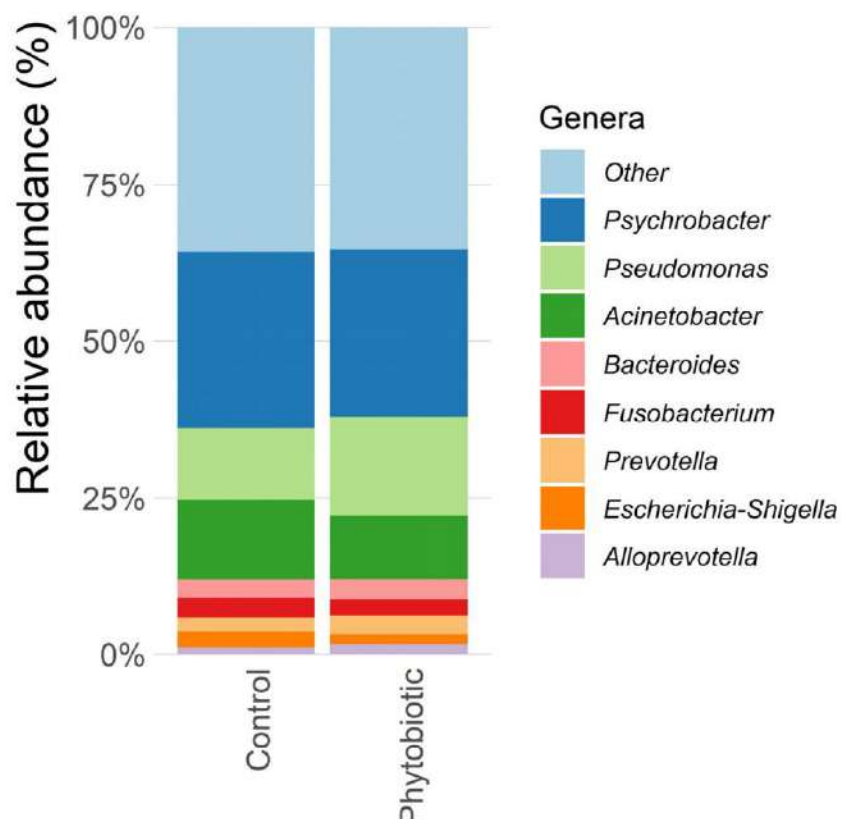


Figura 1. Dez gêneros bacterianos mais abundantes encontrados nas fezes de bezerros suplementados com mistura comercial de óleos essenciais. Abreviações: Controle: grupo de animais que não receberam a mistura comercial de óleos essenciais; Fitobiótico: grupo de animais que recebeu a mistura. Dados da primeira coleta (tempo 0) foram excluídos desta análise.

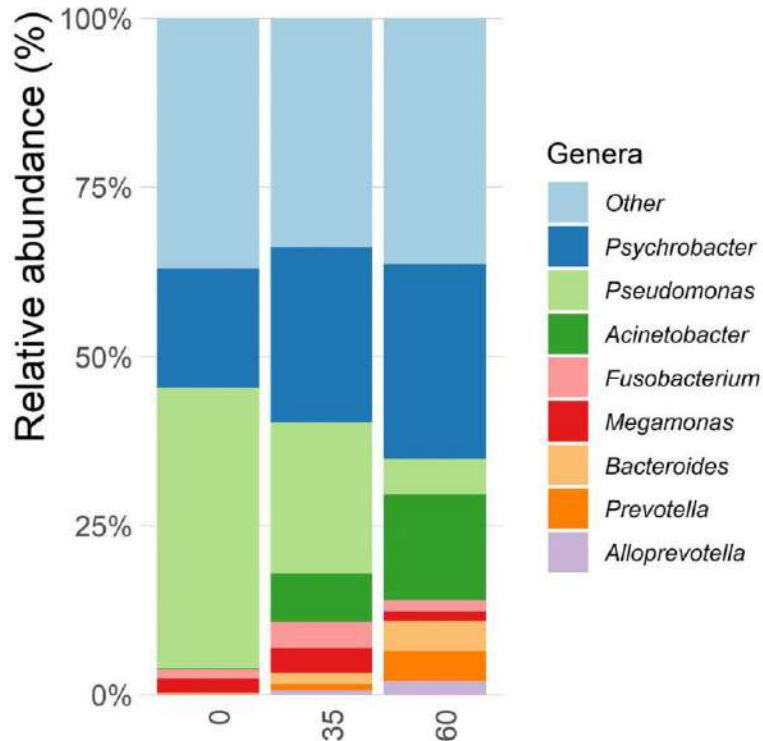
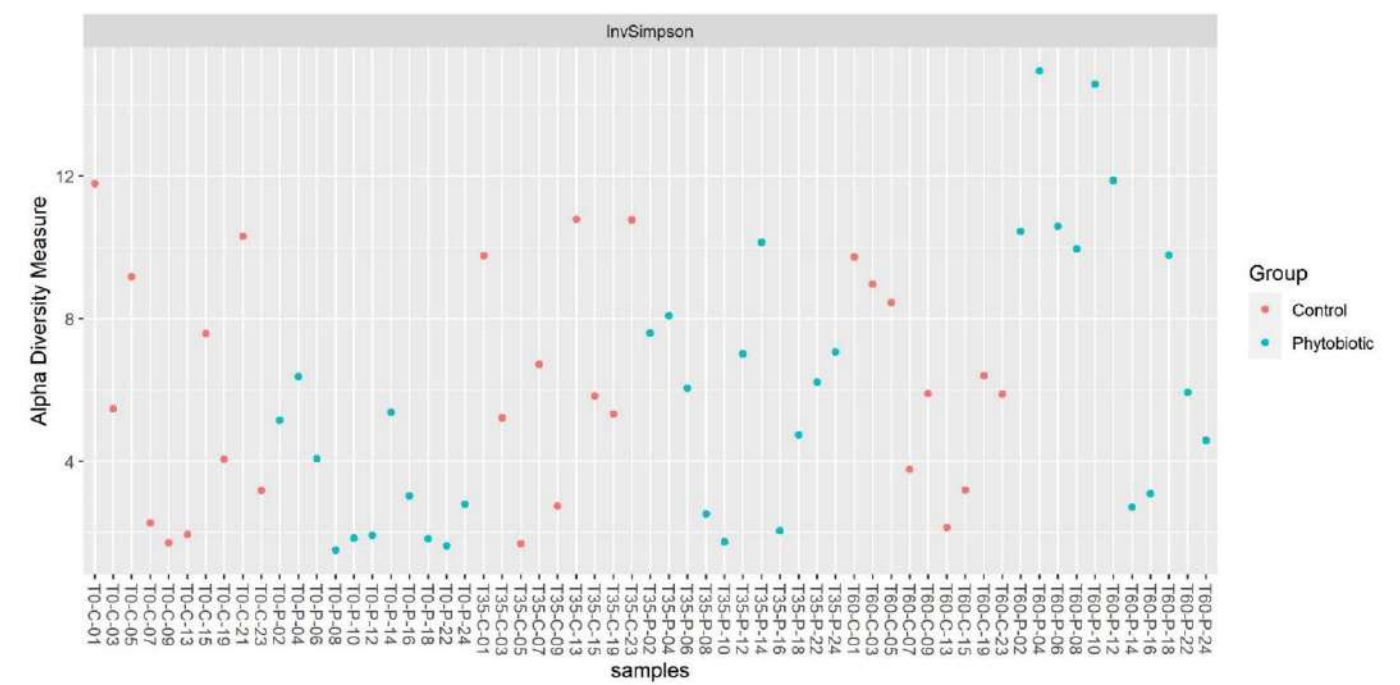


Figura 2. Dez gêneros bacterianos mais abundantes encontrados em fezes de bezerros nos dias 0, 35 e 60, datas que representam os dias do experimento.

Animais 2024, 14, 3555

A abundância de *Clostridium* e *Escherichia* foi avaliada isoladamente, como mostrado nas Figuras 5 e 6. *Salmonella* foi raramente identificada. Ao comparar os tratamentos, não houve diferença significativa entre as abundâncias de *Clostridium* e *Escherichia*.

11 de 20



Animais 2024, 14, x PARA REVISÃO POR PARES 12 de 21 **Figura 3.** Diversidade alfa de cada amostra. 'Fitobiótico' refere-se ao grupo que recebeu a mistura comercial de óleos essenciais. **Figura 3.** Diversidade alfa de cada amostra. 'Fitobiótico' refere-se ao grupo que recebeu a mistura comercial de óleos essenciais.

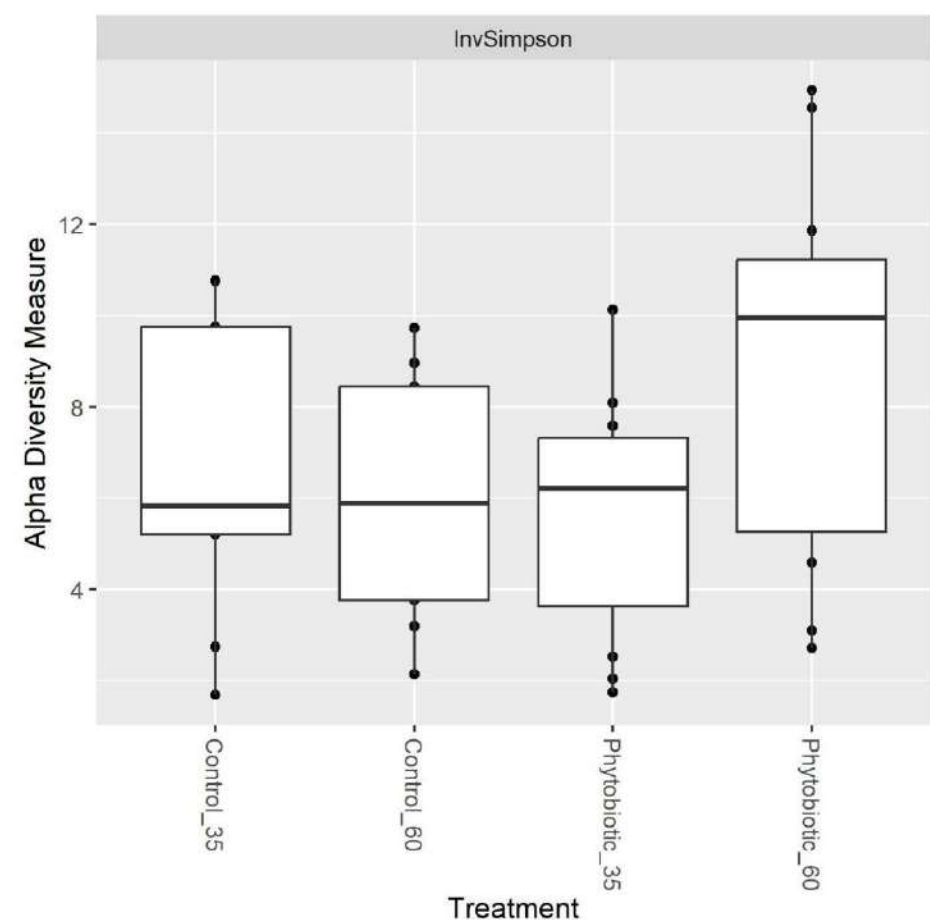


Figura 4. Diversidade alfa com base no tratamento e nos dias 35 e 60 do experimento. 'Fitobiótico' refere-se ao grupo que recebeu a mistura de óleos essenciais. Os dados da primeira coleta (tempo 0) foram excluídos desta análise.

Figura 4. A abundância de Clostridium e Escherichia foi avaliada isoladamente, conforme demonstrado na Figura 5. Diversidade alfa com base no tratamento e nos dias 35 e 60 do experimento. 'Fitobiótico' refere-se ao grupo que recebeu a mistura de óleos essenciais. Os dados da primeira coleta (tempo 0) não apresentaram diferença significativa entre as abundâncias de Clostridium e Escherichia.

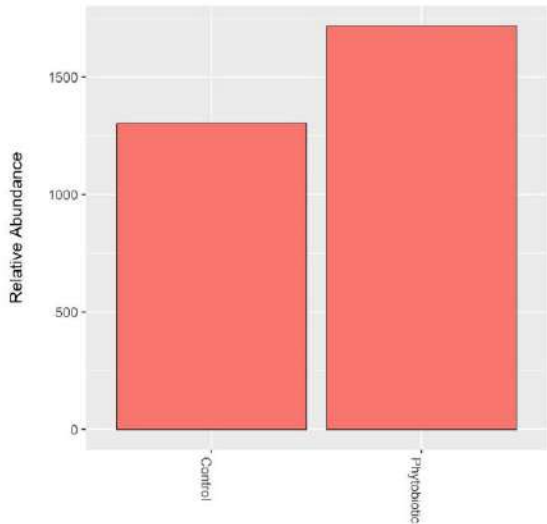


Figura 5. Abundância de Clostridium detectada em fezes de bezerros. 'Fitobiótico' refere-se ao grupo que recebeu a mistura comercial de óleos essenciais.

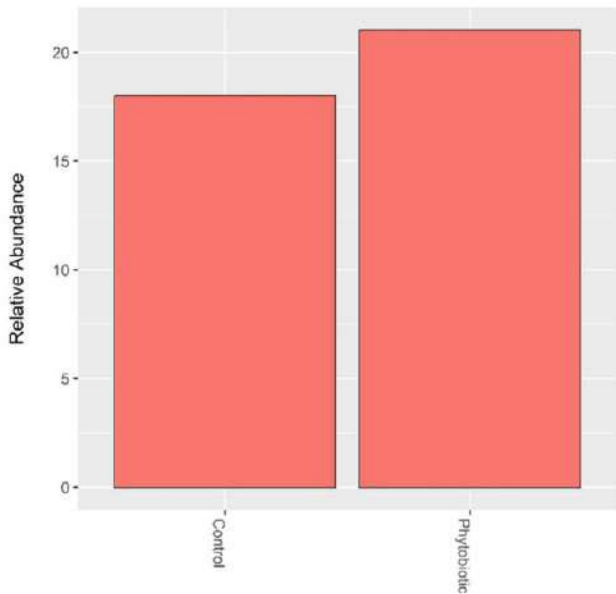


Figura 6. A abundância de Escherichia foi detectada em fezes de bezerros. 'Fitobiótico' refere-se ao grupo que receberam a mistura comercial de óleos essenciais.

4. Discussão

De modo geral, o ganho de peso dos bezerros foi menor do que o encontrado na maioria dos estudos semelhantes, o que pode ser devido ao período experimental, alguns animais, bem como a incidência de diarreias infecciosas e até mesmo pneumonias que afetaram diretamente o desempenho de diarreia infecciosa e de zoonoses, o que pode ser diretamente relacionado à diminuição da proteína no leite produzido pelos bezerros, pois a baixa quantidade de matéria-prima para a produção de leite pode ser considerada a principal causa da baixa quantidade de origem láctea produzida [47], sendo que a quantidade de leite utilizado que seja de 20 a 22%, e o restante para a mistura de óleos essenciais proporcionalmente melhor eficiência alimentar para a ingestão de ração foi observado, apesar disso, os consumidores de óleos essenciais proporcionou melhor eficiência alimentar para os bezerros, pois a ingestão de ração foi menor, conforme descrito por pesquisadores [48] ao fornecer óleo de orégano aos bezerros. Da mesma forma, Silva et al. [49] obtiveram maior eficiência alimentar em vacas lactantes quando fornecidas com um aditivo comercial composto por capsaicina, carvacrol, cinamaldeído e eugenol, sendo carvacrol e cinamaldeído dois dos componentes presentes como bioativos no produto utilizado no experimento.

bezerros. Da mesma forma, Silva et al. [49] obtiveram maior eficiência alimentar em vacas lactantes quando fornecidas com um aditivo comercial composto por capsaicina, carvacrol, cinamaldeído e eugenol, sendo o carvacrol e o cinamaldeído dois dos componentes presentes como bioativos no produto utilizado no experimento em questão.

Além disso, Farshid et al. [50] encontraram maior eficiência alimentar para bezerros suplementados com óleo essencial de canela do que aqueles suplementados com óleo de outras plantas e um probiótico. O ganho de peso mais significativo com menor IMS pode ser explicado por uma leve modulação dos microrganismos ruminais, permitindo maior eficiência no uso dos nutrientes disponíveis. Os óleos essenciais podem alterar a fermentação ruminal, alterando a proporção de ácidos graxos voláteis da degradação dos alimentos e até mesmo o metabolismo de proteínas, tornando-se um melhorador de desempenho justamente por esse motivo [13,51], favorecendo o animal nutricionalmente. Portanto, nossos resultados corroboram a literatura, mostrando que esta mistura de óleos essenciais testada é uma maneira de economizar dinheiro em custos de alimentação para criação de bezerros sem perder produtividade.

Embora não tenha havido diferença estatística no ganho de peso e no ganho médio diário, numericamente, o grupo fitobiótico apresentou taxas menores, o que foi diferente do esperado em estudos com óleos essenciais, onde houve uma taxa de desempenho maior. Acredita-se que isso ocorreu devido às condições sanitárias; na Tabela S1, é possível observar a incidência de doenças, principalmente diarreia infecciosa, que é conhecida por afetar diretamente o consumo e o ganho de peso do bezerro, e a incidência de diarreia ocorreu mais em animais do grupo fitobiótico do que no grupo controle. No entanto, ainda não foi prejudicial de forma significativa.

Outro ponto que chamou a atenção foi que o colesterol foi maior no grupo fitobiótico, apesar do menor consumo de fermentos. O colesterol sérico é o saldo de colesterol que entra na corrente sanguínea, endógeno ou exógeno, com saída do mesmo metabolismo [52]. Além disso, anos atrás, como no trabalho dos autores de [53], foi comprovado que a qualidade da gordura na dieta afeta as concentrações de colesterol mais do que a quantidade de gordura ingerida.

O nível de colesterol em alguns estudos mostrou-se inverso ao consumo de um starter, independentemente da composição do substituto ou da adição de óleos essenciais, como demonstrado em nosso estudo. Em um estudo realizado por pesquisadores [54], bezerros foram alimentados com os mesmos óleos essenciais do presente estudo, orégano, eucalipto e canela, com níveis de colesterol mais elevados no grupo em que o consumo de starter foi menor. Além disso, na pesquisa de Wilms [55], onde substitutos com diferentes fontes de gordura foram fornecidos, os maiores níveis de colesterol foram em bezerros alimentados com o substituto contendo gordura de origem vegetal, o mais semelhante ao utilizado em nosso estudo, e este grupo também foi o que apresentou o menor consumo de starter. Como mencionado anteriormente, a presença de colesterol alto ou baixo indica que o metabolismo está desequilibrado, sendo afetado pela qualidade da gordura [52,53]. Com isso em mente, acreditamos que o substituto fornecido tinha gordura de qualidade inferior à gordura do concentrado, reduzindo esse metabolismo e aumentando o colesterol sérico, uma vez que o consumo de gordura de maior qualidade foi reduzido.

Os componentes dos óleos essenciais neste trabalho são considerados antimicrobianos e moduladores da flora intestinal, e uma das possíveis respostas a essa ação antimicrobiana é a diminuição da incidência de diarreia. Pesquisadores anteriores [48,56] deram óleo de orégano a bezerros e obtiveram menor incidência de diarreia; houve menor uso de antibióticos em um grupo de animais que consumiam óleo essencial [56]. Ritt et al. [57] concluíram que um extrato de orégano com 80% de carvacrol afetou positivamente a população bacteriana intestinal e ruminal, diminuindo a abundância das bactérias patogênicas *Streptococcus*, *Clostridium* e *Escherichia*, diferentemente do presente estudo, onde não foi obtida diferença para *Clostridium* e *Escherichia* entre os tratamentos. A diferença entre as doses oferecidas pode explicar isso, já que, no presente estudo, a quantidade utilizada foi baixa em comparação com os valores da literatura. A proporção dos três óleos essenciais era a mesma, o que também pode ter sido um problema, já que o óleo essencial de orégano é o antimicrobiano mais citado, e uma proporção maior dele faria uma diferença significativa nos efeitos antimicrobianos dos principais patógenos que causam diarreia.

Os óleos de canela, orégano e eucalipto também melhoram os sistemas imunológico e antioxidante. Assim como em nosso estudo, os autores de [58] obtiveram melhor resposta imunológica, com valores mais elevados de IgM, IgG e IgA, ao alimentar bezerros com um óleo essencial contendo também probióticos (carvacrol, cariofileno, p-cimida, cineol, terpineno e timol). Al-Suwaiegh et al. [59] obtiveram níveis mais elevados de proteína total e globulina, além de resultados positivos na produção de leite de vaca com o fornecimento de uma mistura de óleos de cravo, orégano e eucalipto. A IgA é um anticorpo produzido predominantemente em superfícies mucosas e indica imunidade intestinal [60], pois reveste microrganismos patogênicos, protegendo o hospedeiro contra infecções [61]. No entanto, a função da IgA é atuar na integridade da barreira intestinal, potencializando as respostas imunes pró-inflamatórias e contribuindo efetivamente para a homeostase intestinal [60]. Esse fato demonstra que os animais do grupo fitobiótico apresentaram maior proteção intestinal, provavelmente devido à mistura de óleos, evitando a incidência de diarreias e doenças causadas por patógenos e potencializando as respostas imunes.

Proteínas de fase aguda, como ceruloplasmina, haptoglobina e transferrina, são produzidas pelo fígado [62,63] e foram detectadas em concentrações mais baixas no grupo fitobiótico em alguns momentos do período experimental. A resposta dessas proteínas é uma reação inespecífica que ocorre logo após o dano causado pelo patógeno [63].

Além disso, suas concentrações indicam a intensidade da resposta inflamatória no corpo [63], que pode ter sido menor no grupo fitobiótico no presente estudo devido aos conhecidos efeitos anti-inflamatórios dos óleos essenciais. Erkiñç et al. [64] mostraram que bezerros neonatais que apresentam sinais clínicos de diarreia, ausência de reflexo de sucção, desidratação, extremidades frias, decúbito lateral e incapacidade de ficar em pé apresentam níveis séricos mais elevados de ceruloplasmina, mostrando que níveis elevados indicam que o animal não está com boa saúde. Saleh et al. [65] demonstraram que bezerros com diarreia apresentaram níveis aumentados de ceruloplasmina (o que era esperado), visto que se trata de uma resposta inflamatória. Para o presente estudo, acreditamos em um efeito anti-inflamatório causado pela mistura de óleos essenciais, visto que a transferrina e a ceruloplasmina são marcadores de intensidade inflamatória. Níveis mais elevados de IgA [66], níveis mais baixos de leucócitos [67] e proteínas de fase aguda mais baixas [68] no grupo fitobiótico indicaram que os bezerros apresentaram melhora no sistema imunológico e na saúde geral; no entanto, não podemos descartar outros mecanismos envolvidos e relacionados às alterações.

Níveis mais baixos de leucócitos e linfócitos foram detectados em cordeiros suplementados com óleo essencial contendo carvacrol, timol e cinamaldeído [69], como no presente experimento. Esse achado pode ser explicado pela ação antimicrobiana dos óleos [69], pois os óleos alteram a permeabilidade da membrana bacteriana [70]. A ação dos óleos minimiza o gasto energético durante as respostas inflamatórias e direciona essa energia para o crescimento [71], associado a uma melhor eficiência alimentar. A mistura de óleos essenciais proporcionou aos animais mecanismos antioxidantes, uma vez que a peroxidação lipídica no grupo fitobiótico foi menor do que a do grupo controle. Esse achado foi devido a uma maior atividade da GST, que inibe as reações oxidativas [72].

Os nove gêneros bacterianos detectados nas fezes de bezerros em nosso experimento, tanto controle quanto tratamento, foram *Acinetobacter*, *Alloprevotella*, *Bacteroides*, *Collinsella*, *Fusobacterium*, *Megamonas*, *Prevotella*, *Pseudomonas* e *Psychrobacter*; entre eles, *Acinetobacter*, *Pseudomonas* e *Psychrobacter* foram os mais abundantes. *Acinetobacter* tem os animais como um de seus habitats naturais, pois apresenta alta resistência a antimicrobianos e ao meio ambiente, sendo a espécie de *A. baumannii* a mais significativa de seu gênero em animais [73]. Essa bactéria pode causar infecções de diferentes tipos, inclusive em tecidos moles como o intestino, causando também sintomas de pneumonia [74], uma doença comum em bezerros. Na distribuição dos bezerros por período experimental, os níveis de *Acinetobacter* aumentaram significativamente nos dias 35 e 60, o que pode ser explicado pelo fato de pertencer à microbiota intestinal normal em bezerros, e seu crescimento ocorre à medida que a microbiota é estabelecida.

A *Pseudomonas*, por outro lado, vive em diferentes ambientes utilizando tecidos animais como substrato, apresentando também resistência substancial a antimicrobianos [75–78]. É uma bactéria associada à deterioração da carne e raramente associada à saúde animal [77,78]. A *P. aeruginosa* é a mais importante em animais, pois não é um constituinte do organismo normal.

microbiota intestinal [76,77], e a menor abundância deste gênero ao longo do dia pode ser considerada benéfica para a saúde de nossos bezerros. *Psychrobacter* também é um patógeno oportunista [79]. Rama et al. [80] identificaram *Psychrobacter* como um dos gêneros mais abundantes na microbiota intestinal de frangos de corte saudáveis, seja em sistemas convencionais ou sistemas sem antibióticos. Por serem oportunistas, a presença desses três gêneros, como já mencionado, só causará danos à saúde do animal quando imunossuprimido.

Ao analisarmos a distribuição dos nove gêneros em cada período experimental (dias 0, 35 e 60), notamos uma flutuação na população bacteriana à medida que o animal envelheceu e os microrganismos se estabeleceram. Além de *Acinetobacter*, o gênero *Bacteroides* era praticamente inexistente no dia zero, mas esteve presente durante todo o período experimental. No entanto, foi necessária mais ênfase na avaliação apenas do tratamento. Este gênero também faz parte da microbiota intestinal normal. No entanto, *B. fragilis* é clinicamente significativo [77,81], pois produz uma enterotoxina que causa diarreia em bezerros [82]. O potencial patogênico de *B. fragilis* é semelhante ao de *E. coli* [83], que é um dos principais microrganismos causadores de diarreia em bezerros e está relacionado a uma alta taxa de mortalidade [81]. Entretanto, muitas espécies de *Bacteroides* produzem enzimas como a superóxido dismutase, que atua diretamente no sistema antioxidante [82], benéficas ao organismo do animal quando este não está imunossuprimido.

Outro gênero encontrado foi *Fusobacterium*, que se manteve regular durante o período experimental e sem diferença entre os grupos. *F. necrophorum* é uma das *Fusobacteria* mais prevalentes, um microrganismo gastrointestinal típico [84]. O gênero *Megamonas* pode ser associado a indivíduos saudáveis [85] e está relacionado à produção de substâncias benéficas e à redução da abundância de bactérias patogênicas [20,86].

O gênero *Alloprevotella* tornou-se evidente somente após 60 dias de experimento, sendo um grupo de bactérias benéficas, pois podem produzir ácidos graxos de cadeia curta [87], permitindo que sejam associados à melhora do desempenho do animal [88]. A literatura sugere que o gênero *Alloprevotella* atua como um estimulador da barreira intestinal, reduzindo o número de organismos patogênicos por meio da competição e da necessidade de antibióticos [89,90]. De acordo com a literatura, os gêneros *Prevotella*, *Bacteroides* e *Fusobacterium* podem ser encontrados em maior abundância a partir do 15º dia de vida em bezerros, quando a ingestão de sólidos está aumentando [91], o que explica a maior presença desses gêneros nas fezes coletadas nos dias 35 e 60.

Nenhuma diferença foi observada entre os tratamentos nas abundâncias populacionais de *E. coli* e *Clostridium* spp. *E. coli* é a principal bactéria causadora de diarreia em bezerros [92,93], mas sua presença não significa que o animal ficará doente, pois sua patogenicidade depende de dois fatores de virulência que precisam estar presentes [92]; portanto, a bactéria é um constituinte da microbiota normal. *Clostridium* é outra bactéria responsável por causar diarreia em bezerros, principalmente *C. perfringens*; no entanto, é menos comum e é encontrada na microbiota de animais saudáveis [93]. A presença dessas duas bactérias ao longo do experimento não prejudicou significativamente a saúde, pois estavam imunologicamente protegidas, conforme observado nos resultados de biomarcadores imunológicos, como o número de leucócitos e a concentração de imunoglobulinas. Além disso, as pontuações fecais médias foram de 1,80 e 1,87 nos grupos controle e fitobiótico, respectivamente, e a Figura S2 mostra a distribuição da pontuação fecal a cada duas semanas. Mesmo com incidências de diarreia que necessitaram de intervenções clínicas, os valores do escore fecal foram baixos, pois 1 e 2 indicam fezes normais, o que demonstra que, de modo geral, os animais apresentaram condições intestinais adequadas na maior parte do tempo.

A diarreia em bezerros é muito prejudicial economicamente para a indústria de laticínios, pois os bezerros precisarão de tratamento com antimicrobianos e outros medicamentos. Esses animais serão sensíveis ao longo de suas vidas, o que pode levar a problemas reprodutivos e baixa produção de leite, dependendo do grau e da frequência da diarreia [94]. Além disso, doenças associadas à diarreia em bezerros são responsáveis por causar mais de 50% de mortalidade devido aos outros sinais clínicos que ocorrem juntos [95]. Embora os óleos essenciais estudados neste estudo tenham propriedades antimicrobianas comprovadas, isso não foi observado em nosso estudo. Acredita-se que isso ocorreu porque os animais estavam em um ambiente controlado, com manejo e higienização adequados e rotineiros, o que pode ter impactado nesses

uma hipótese é que se os animais estivessem em um desafio sanitário, os efeitos antimicrobianos dos óleos essenciais poderiam ter sido observados como possíveis moduladores da microbiota intestinal, reduzindo a carga bacteriana dos microrganismos causadores da diarreia.

5. Conclusões

A conclusão deste estudo deve ser feita com cautela, pois os resultados indicaram que o fornecimento de uma mistura de óleos essenciais com canela, orégano e eucalipto proporcionou aos bezerros estimulação humoral e antioxidante do sistema imunológico, minimizando o estresse oxidativo fisiológico e melhor eficiência. No entanto, essa melhora na saúde não aprimorou o crescimento dos bezerros que consumiram óleos essenciais. As avaliações da abundância e biodiversidade da microbiota não diferiram entre os animais que consumiram a mistura de óleos essenciais e aqueles que não consumiram; no entanto, permitiram a identificação dos principais gêneros nas fezes de bezerros nas primeiras semanas de idade. Apesar disso, neste estudo, os óleos essenciais não desempenharam papel antimicrobiano, em consonância com os relatos já encontrados na literatura.

Materiais suplementares: As seguintes informações de apoio podem ser baixadas em: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/ani14243555/s1>, Tabela S1: Intervenções clínicas durante o experimento; Figura S1: Escore fecal de bezerros alimentados com mistura de óleos essenciais diluída em leite (d1–60) e acompanhamento após o desmame (d61–75); Figura S2: Ilustração da evolução do peso corporal dos bezerros; Figura S3: Abundância relativa dos filos por grupos nas fezes de bezerros alimentados com óleos essenciais (fitobiótico) e grupo controle (sem óleos essenciais); Figura S4: Diversidade alfa considerando os grupos e o tempo de coleta (d35 e d60) de bezerros que consumiram óleos essenciais (grupo fitobiótico) em comparação ao controle (sem aditivo). A diferença estatística ($p < 0,05$) foi ilustrada por letras diferentes (a,b) no gráfico, acima da barra; Figura S5: Diversidade beta considerando os grupos e o tempo de coleta (d35 e d60) de bezerros que consumiram óleos essenciais (grupo fitobiótico) em comparação ao controle (sem aditivo).

Contribuições dos Autores: LN e ASdS contribuíram para o desenho e implementação da pesquisa e para a análise dos resultados. MMB e VMM auxiliaram na elaboração do projeto, sua execução e financiamento. CM, LN, GLD, MHS e ALM participaram da execução do experimento e da coleta de amostras e dados. BFB e PMC realizaram as análises laboratoriais. Todos os autores discutiram os resultados e contribuíram para o manuscrito final. Todos os autores leram e concordaram com a versão publicada do manuscrito.

Financiamento: Esta pesquisa não recebeu financiamento externo.

Declaração do Comitê de Ética em Pesquisa: De acordo com as normas emitidas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), o projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Uso de Animais da Universidade do Estado de Santa Catarina (CEUA/UDESC) com o número de protocolo 2322230522.

Declaração de Consentimento Informado: Não aplicável.

Declaração de disponibilidade de dados: os dados permanecem com os autores, mas podem ser disponibilizados mediante solicitação.

Agradecimentos: Gostaríamos de agradecer à UDESC, FAPESC, CNPq, CAPES e TECPHY pelo suporte técnico.

Conflitos de interesse: Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

Referências

1. Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO). Produtos Agrícolas e Pecuários. Roma, Itália. 2023. Disponível online: <https://www.fao.org/agricultura-familiar/detalhe/pt/c/289563/> (acessado em 2 de dezembro de 2024).
2. Chase, CCL; Hurley, DJ; Reber, AJ Desenvolvimento imunológico neonatal em bezerros e seu impacto na resposta vacinal. Vet. Clin. N. Am. Food Anim. Pract. **2008**, *24*, 87–104. [Referência Cruzada] [PubMed]
3. Cho, Y.; Yoon, K. Uma visão geral da diarreia em bezerros — etiologia infecciosa, diagnóstico e intervenção. J. Vet. **2014**, *15*, 1–17. [Referência Cruzada] [PubMed]
4. Zhao, W.; Choi, CY; Li, G.; Li, H.; Shi, Z. Práticas de manejo de bezerros leiteiros pré-desmamados, morbidade e mortalidade por doenças respiratórias bovinas e diarreia na China. Livest. Sci. **2020**, *251*, 104608. [CrossRef]

5. Maynard, CL; Elson, CO; Hatton, RD; Weaver, AT Interações recíprocas da microbiota intestinal e do sistema imunológico. *Natureza* **2012**, 489, 231–241. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
6. Maele, SJ; Chaucheyras-Durand, F.; Berends, H.; Guan, LL; Steele, MA Do pré ao pós-desmame: Transformação do trato gastrointestinal do bezerro jovem. *J. Dairy Sci.* **2017**, 100, 5984–5995. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
7. Alipur, MJ; Jalanka, J.; Pessa-Morikawa, T.; Kokkonen, T.; Satokari, R.; Hynonen, U.; Iivanainen, A.; Niku, M. A composição da microbiota intestinal perinatal em bovinos. *Ciência. Rep.* **2018**, 8, 10437. [\[CrossRef\]](#)
8. Kodithuwakku, KAHT; Owada, H.; Miura, H.; Maruyama, D.; Hirano, K.; Suzuki, Y.; Kobayashi, Y.; Koike, S. Efeitos da administração oral de feno de capim-rabo-de-gato e psyllium no desempenho de crescimento e microbiota fecal de bezerros pré-desmame. *J. Laticínios Sci.* **2021**, 104, 12472–12485. [\[Referência Cruzada\]](#)
9. Bischoff, SC Saúde intestinal: um novo objetivo na medicina? *BMC Med.* **2011**, 9, 24. [\[CrossRef\]](#)
10. Bento, MHL; Ouwehand, AC; Tiihonen, K.; Lahtinen, S.; Nurminen, P.; Saarinen, MT; Schulze, H.; Mygind, T.; Fischer, J. Óleos essenciais e seu uso em rações para animais monogástricos — Efeitos na qualidade da ração, microbiota intestinal, desempenho de crescimento e segurança alimentar: uma revisão. *Vet. Med.* **2013**, 58, 449–458. [\[CrossRef\]](#)
11. Dill-McFarland, KA; Weimer, PJ; Breaker, JD; Suen, G. A dieta influencia o desenvolvimento inicial da microbiota em bezerros leiteiros sem Impactos de longo prazo na produção de leite. *Appl. Environ. Microbiol.* **2018**, 85, e02141-18. [\[CrossRef\]](#)
12. Cui, H.; Zhang, C.; Li, C.; Lin, L. Mecanismo antibacteriano do óleo essencial de orégano. *Ind. Crops Prod.* **2019**, 139, 111498. [\[CrossRef\]](#)
13. Calsamiglia, S.; Busquet, M.; Cardoso, PW; Castillejos, L.; Farret, A. Revisão Convidada: Óleos essenciais como modificadores do rúmen fermentação microbiana. *J. Dairy Sci.* **2007**, 90, 2580–2595. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
14. Chapman, C.; Cabral, RG; Aragona, KM; Erickson, PS Comunicação breve: Preferências de sabor de cinamaldeído de animais desmamados novilhas leiteiras. *J. Dairy Sci.* **2016**, 99, 3607–3611. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
15. Vakili, AR; Khorrami, B.; Mesgaran, MD; Parand, E. Efeitos dos óleos essenciais de tomilho e canela no desempenho, na fermentação ruminal e nos metabólitos sanguíneos de bezerros holandeses que consomem dieta rica em concentrado. *J. Anim. Sci.* **2013**, 26, 935–944. [\[Referência Cruzada\]](#) [\[PubMed\]](#)
16. Haddi, K.; Faroni, LRA; Oliveira, E. Óleo de Canela. Em *Manual de Pesticidas Verdes: Óleos Essenciais para Controle de Pragas*; Nollet, LML, Rathore, HS, Eds.; CRC Press: Boca Raton, FL, EUA, 2017; pp. 117–150.
17. Leyva-López, N.; Gutiérrez-Grijalva, EP; Vázquez-Olivo, G.; Heredia, JB Óleos essenciais de orégano: atividade biológica além suas propriedades antimicrobianas. *Moléculas* **2017**, 22, 989. [\[CrossRef\]](#)
18. Dhakad, AK; Pandey, VV; Beg, S.; Rawat, JM; Singh, A. Significado biológico, medicinal e toxicológico da folha de eucalipto Óleo essencial: Uma revisão. *J. Sci. Food Agric.* **2017**, 98, 833–848. [\[CrossRef\]](#)
19. Shreaz, S.; Wani, WA; Behbehani, JM; Raja, V.; Irshad, M.; Karched, M.; Ali, eu.; Siddiqi, WA; Hun, LT Cinnamaldeído e seus derivados, uma nova classe de agentes antifúngicos. *Fitoterapia* **2016**, 112, 116–131. [\[CrossRef\]](#)
20. Wu, J.; Bai, Y.; Lang, X.; Wang, C.; Shi, X.; Casper, DP; Zhang, L.; Liu, H.; Liu, T.; Gong, X.; et al. A suplementação dietética com óleo essencial de orégano e monensina em combinação é antagonista ao desempenho de crescimento de touros holandeses de um ano. *J. Dairy Sci.* **2020**, 103, 8119–8129. [\[Referência Cruzada\]](#)
21. Kumar, P.; Mishra, S.; Malik, A.; Satya, S. Análise composicional e atividade inseticida de *Eucalyptus globulus* (família: Myrtaceae) óleo essencial contra mosca doméstica (*Musca domestica*). *Acta Trop.* **2012**, 122, 212–218. [\[CrossRef\]](#)
22. Baptista-Silva, S.; Borges, S.; Ramos, OL; Pintado, M.; Sarmiento, B. O progresso dos óleos essenciais como potenciais agentes terapêuticos: uma revisão. *J. Essent. Oil Res.* **2020**, 32, 279–295. [\[CrossRef\]](#)
23. Caldas, GFR; Oliveira, ARS; Araújo, AV; Lafayette, SSL; Albuquerque, G.S.; Silva-Neto, JC; Costa-Silva, JH; Ferreira, F.; Da Costa, JGM; Wanderley, AG Mecanismos gastroprotetores do monoterpene 1,8-Cineol (eucaliptol). *PLoS ONE* **2015**, 10, e0134558. [\[RefCruz\]](#)
24. Abo-Donia, FM; Mahgoub, A.; Deraz, T.; Nayel, UA Efeito do uso de cápsulas de óleo, folhas e sementes de eucalipto como suplemento dietético na produtividade e na produção de metano de búfalos-egípcios lactantes. *Egito. J. Nutr. Feed.* **2021**, 24, 223–235. [\[CrossRef\]](#)
25. Luo, Z.; Liu, T.; Cairang, D.; Cheng, S.; Hu, J.; Shi, B.; Zhu, H.; Chen, H.; Zhang, T.; Yi, X. O óleo essencial de orégano como aditivo natural para plantas afeta o desempenho do crescimento e os níveis de anticorpos séricos por meio da regulação da microbiota ruminal de bezerros. *Animals* **2024**, 14, 820. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
26. Nehme, R.; Andrés, S.; Pereira, RB; Ben Jemaa, M.; Bouhallab, S.; Cecilian, F.; López, S.; Rahali, FZ; Ksouri, R.; Pereira, DM; et al. Óleos Essenciais na Pecuária: Da Saúde à Qualidade Alimentar. *Antioxidantes* **2021**, 10, 330. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
27. Bednar, GE; Murray, SM; Patil, AR; Flickinger, EA; Merchen, NR; Fahey, GC Fontes selecionadas de proteína animal e vegetal afetam a digestibilidade dos nutrientes e as características fecais de cães com canulação ileal. *Arch. Für Tierernaehrung* **2020**, 53, 127–140. [\[Referência Cruzada\]](#)
28. Fagliari, JJ; Santana, AE; Lucas, FA; Campos, E.; Curi, PR Constituintes sanguíneos de bovinos recém-nascidos das raças Nelore (*Bos indicus*) e Holandesa (*Bos taurus*) e de bubalinos (*Bubalus bubalis*) da raça Murrah. *Arq. Sutiãs. Med. Veterinário. Zootec.* **1998**, 50, 253–262. Disponível on-line: <http://hdl.handle.net/11449/36109> (acessado em 25 de janeiro de 2018).
29. Tomasi, T.; Volpato, A.; Pereira, WAB; Debastiani, LH; Bottari, NB; Morsch, VM; Schetinger, MRC; Leal, MLR; Machado, G.; Da Silva, AS Efeito metafilático de minerais na resposta imune, variáveis bioquímicas e estado antioxidante de bezerros recém-nascidos. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* **2018**, 102, 819–824. [\[CrossRef\]](#)
30. Jentzsch, AM; Bachmann, H.; Fürst, P.; Biesalski, HK Análise aprimorada de malondialdeído em fluidos corporais humanos. *Radicaes Livres. Biol. Med.* **1996**, 20, 251–256. [\[RefCruz\]](#)

31. Ellman, GL Grupos sulfidrilal teciduais. Arch. Biochem. Biophys. **1959**, *82*, 70–77. [\[CrossRef\]](#)
32. Habig, WH; Pabst, MJ; Jakoby, WB Glutathione S-transferases. A primeira etapa enzimática na formação do ácido mercaptúrico. J. Biol. Química. **1974**, *249*, 7130–7139. [\[CrossRef\]](#)
33. Hjelmsø, MH; Hansen, LH; Balum, J.; Feld, L.; Holben, WE; Jacobsen, CS Análise de fusão de alta resolução para comparação rápida de composições de comunidades bacterianas. Appl. Environ. Microbiol. **2014**, *80*, 3568–3575. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
34. Schloss, PD; Westcott, SL; Ryabin, T.; Hall, JR; Hartmann, M.; Hollister, EB; Lesniewski, RA; Oakley, BB; Parks, DH; Robinson, CJ; et al. Apresentando o Mothur: software de código aberto, independente de plataforma e com suporte da comunidade para descrever e comparar comunidades microbianas. Appl. Environ. Microbiol. **2009**, *75*, 7537–7541. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
35. Kozich, JJ; Westcott, SL; Baxter, NT; Highlander, SK; Schloss, PD Desenvolvimento de uma estratégia de sequenciamento de índice duplo e pipeline de curadoria para analisar dados de sequência de amplicon na plataforma de sequenciamento MiSeq Illumina. Aplicação. Meio Ambiente. Microbiol. **2013**, *79*, 5112–5120. [\[Referência Cruzada\]](#) [\[PubMed\]](#)
36. Quast, C.; Priesse, E.; Yilmaz, P.; Gerken, J.; Schweer, T.; Yarza, P.; Peplies, J.; Glöckner, FO O projeto de banco de dados de genes de RNA ribossômico SILVA: Processamento de dados aprimorado e ferramentas baseadas na web. Nucleic Acids Res. **2013**, *41*, 590–596. [\[CrossRef\]](#)
37. McMurdie, PJ; Holmes, S. Phyloseq: Um pacote R para análise interativa reprodutível e gráficos de dados de censo de microbioma. PLoS ONE **2013**, *8*, e61217. [\[CrossRef\]](#)
38. Morris, EK; Caruso, T.; Buscot, F.; Fischer, M.; Hancock, C.; Maier, TS; Meiners, T.; Muller, C.; Obermaier, E.; Prati, D.; e outros. Escolhendo e usando índices de diversidade: Insights para aplicações ecológicas dos Centros de Exploração da Biodiversidade Alemães. Ecol. Evol. **2014**, *4*, 3514–3524. [\[Referência Cruzada\]](#)
39. Xia, Y.; Sun, J.; Chen, D. Medidas e cálculos de diversidade comunitária. Em Análise Estatística de Dados de Microbioma com R; Springer: Singapura, 2018; pp. 167–190.
40. Qian, XB; Chen, T.; Xu, YP; Chen, L.; Sun, FX; Lu, MP; Liu, YX Um guia para pesquisa de microbioma humano: desenho de estudo, amostra coleta e análise bioinformática. Chin. Med. J. (Engl.) **2020**, *133*, 1844–1855. [\[CrossRef\]](#)
41. Schloss, PD A rarefaction é atualmente a melhor abordagem para controlar o esforço de sequenciamento desigual em análises de sequência de amplicon. mSphere **2024**, *9*, e00354-23. [\[CrossRef\]](#)
42. Anderson, MJ Um novo método para análise de variância multivariada não paramétrica. Austral Ecol. **2001**, *26*, 32–46. [\[CrossRef\]](#)
43. Songer, JG; Anderson, MA Clostridium difficile: Um importante patógeno de animais destinados à alimentação. Anaerobe **2006**, *12*, 1–4. [\[CrossRef\]](#)
44. Wickham, H. ggplot2: Gráficos elegantes para análise de dados; Springer: Nova York, NY, EUA, 2016.
45. Bowman, JP O gênero Psychrobacter. Em Os Procariontes: Um Manual sobre a Biologia das Bactérias. Proteobactérias: Subclasse Gama; Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, KH, Stackebrandt, E., Editores; Springer: Nova York, NY, EUA, 2006; Volume 6, pp. 920–930.
46. Van der Kolk, JH; Endimiani, A.; Graubner, C.; Gerber, V.; Perreten, V. Acinetobacter em medicina veterinária, com ênfase em Acinetobacter baumannii. J. Glob. Antimicrob. Resist. **2019**, *16*, 59–71. [\[CrossRef\]](#)
47. Conselho Nacional de Pesquisa (NRC). Requisitos de Nutrientes para Gado Leiteiro, 7ª ed.; Academia Nacional de Ciências: Washington, DC, EUA, 2001; 408p.
48. Tapiqi, I.; Ozalpaydin, HB; Tapiqi, N.; Aslan, M.; Selvi, MH Efeitos do óleo essencial de orégano na redução da idade de desmame e aumentando a eficiência econômica em bezerros holandeses frísios. Pak. J. Zool. **2020**, *52*, 745–752. [\[CrossRef\]](#)
49. Silva, RB; Pereira, MN; De Araujo, RC; Silva, WR; Pereira, RAN Uma mistura de óleos essenciais melhorou a eficiência alimentar e afetou Variáveis ruminais e sistêmicas de vacas leiteiras. **2020**, *4*, 182–193. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
50. Farshid, S.; Alireza, V.; Mohsen, DM Efeitos de óleos essenciais de plantas-domo e probiótico (protexina) no desempenho, na digestibilidade de nutrientes e nos metabólitos sanguíneos de bezerros leiteiros da raça Holandesa. Irã. J. Anim. Sci. Res. **2021**, *13*, 161–173. [\[CrossRef\]](#)
51. McIntosh, FM; Williams, P.; Losa, R.; Wallace, RJ; Beever, DA; Newbold, CJ Efeitos dos óleos essenciais nos microorganismos ruminais Isms e seu metabolismo proteico. Appl. Environ. Microbiol. **2003**, *69*, 5011–5014. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
52. Stellard, F. Do Colesterol Dietético ao Colesterol Sanguíneo, Fluxos Fisiológicos de Lipídios e Homeostase do Colesterol. Nutrientes **2022**, *14*, 1643. [\[CrossRef\]](#)
53. Mcnamara, DJ; Kolb, R.; Parker, TS; Batwin, H.; Samuel, P.; Brown, CD; Ahrens, EH, Jr. Heterogeneidade da homeostase do colesterol no homem. Resposta a mudanças na qualidade da gordura alimentar e na quantidade de colesterol. J. Clin. Investig. **1987**, *79*, 1729–1739. [\[Referência Cruzada\]](#)
54. Nora, L.; Giacomelli, CM; Deolindo, GL; Molosse, VL; Copetti, PM; Bissacotti, BF; Morsch, VM; Da Silva, AS Inclusão de óleos essenciais em um sucedâneo do leite de bezerros e seus efeitos no desempenho do crescimento e nos sistemas imunológico e oxidativo. Comp. Clin. Patol. **2024**, *33*, 327–335. [\[Referência Cruzada\]](#)
55. Wilms, JN; Van Der Nat, V.; Ghaffari, MH; Steele, MA; Sauerwein, H.; Martín-Tereso, J.; Leal, LN A composição de gordura do sucedâneo do leite influencia o desempenho do crescimento, o comportamento alimentar e o perfil de ácidos graxos plasmáticos em bezerros alimentados à vontade. J. Dairy Sci. **2024**, *107*, 2797–2817. [\[Referência Cruzada\]](#)
56. Katsoulos, PD; Karatzia, MA; Dovas, CI; Filioussis, G.; Papadopoulos, E.; Kioussis, E.; Arsenopoulos, K.; Papadopoulos, T.; Boscós, C.; Karatzias, H. Avaliação da eficácia em campo da administração de óleo essencial de orégano no controle da síndrome da diarreia neonatal em bezerros. Res. Veterinário. Ciência. **2017**, *115*, 478–483. [\[RefCruz\]](#)
57. Ritt, LA; Orso, C.; Silveira, AK; Frazzon, J.; de Vargas, DP; Wagner, R.; de Oliveira, FC; Nornberg, JL; Fischer, V. Extrato de orégano fornecido a bezerros leiteiros pré-desmamados. Parte 1: Efeitos sobre a ingestão, digestibilidade, peso corporal e microbiota bacteriana ruminal e intestinal. Livest. Sci. **2023**, *269*, 105165. [\[CrossRef\]](#)

58. Liu, T.; Chen, H.; Bai, Y.; Wu, J.; Cheng, S.; He, B.; Casper, DP. A ração inicial para bezerros contendo uma mistura de óleos essenciais e prebióticos afeta o desempenho de crescimento de bezerros holandeses. *J. Dairy Sci.* **2020**, *103*, 2315–2323. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
59. Al-Suwaiegh, SB; Morshedy, SA; Mansour, AT; Ahmed, MH; Zahran, SM; Alnemr, TM; Sallam, SMA Efeito de uma mistura de óleos essenciais no desempenho de vacas leiteiras durante os períodos de tratamento e pós-tratamento. *Sustainability* **2020**, *12*, 9123. [\[CrossRef\]](#)
60. Pabst, O. Novos conceitos na geração e funções de IgA. **2012**, *12*, 821–832. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
61. Palma, NO; Zoete, MR; Cullen, TW; Barry, NA; Stefanowski, J.; Hao, L.; Degman, PH; Hu, J.; Pedro, eu.; Zhang, W.; e outros. Revestimento de imunoglobulina A identifica bactérias colitogênicas na doença inflamatória intestinal. *Cell* **2014**, *158*, 1000–1010. [\[CrossRef\]](#)
62. Rocha, TG; Silva, FDF; Bortoletto, C.; Silva, DG; Buzinaro, MG; Zafalon, LF; Fabliari, JJ Concentrações séricas de proteínas de fase aguda e imunoglobulinas de bezerros com diarreia por rotavírus. *Vet. Med.* **2016**, *68*, 865–872. [\[CrossRef\]](#)
63. Bozuklunah, K.; Merhan, O.; Ogun, M.; Kut, B.; Cihan, M.; Erkiliç, EE; Gokce, G.; Aydin, U.; Ozcan, A. Investigação de haptoglobina, amiloide A sérico e alguns parâmetros bioquímicos em bezerros com onfalite. *Vet. World* **2018**, *11*, 1055–1058. [\[Referência Cruzada\]](#)
64. Erkiliç, E.; Merhan, O.; Kirmizigul, AH; Ogum, M.; Akyuz, E.; Çitil, M. Níveis salivares e séricos de amiloide A sérica, haptoglobina, ceruloplasmina e albuminas em bezerros neonatos com diarreia. *Universidade Kafkas. Veterinário. Falso. Derg.* **2019**, *25*, 583–586.
65. Saleh, N.; Allam, T.; Nayel, M.; Ahmed, R. Investigação molecular da diarreia em bezerros em relação a alterações em alguns sistemas imunológicos perfis. *J. Curr. Vet. Res.* **2022**, *4*, 69–79. [\[CrossRef\]](#)
66. de Sousa-Pereira, P.; Woof, JM IgA: Estrutura, Função e Capacidade de Desenvolvimento. *Anticorpos* **2019**, *8*, 57. [\[CrossRef\]](#)
67. Campolina, JP; Coelho, SG; Belli, AL; Neves, LFM; Machado, FS; Pereira, LGR; Tomich, TR; Carvalho, WA; Daibert, RMP; Reis, DRL; et al. Potenciais benefícios de uma mistura de óleos essenciais no metabolismo, digestibilidade, desenvolvimento de órgãos e expressão gênica de bezerros leiteiros. *Sci. Rep.* **2023**, *13*, 3378. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
68. Jain, S.; Gautam, V.; Naseem, S. Proteínas de fase aguda: como ferramenta diagnóstica. *J. Pharm. Bioallied Sci.* **2011**, *3*, 118–127. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
69. Favaretto, JA; Alba, DF; Marchiori, MS; Marcon, HJ; Souza, CF; Badissera, MD; Bianchi, AE; Zanluchi, M.; Klein, B.; Wagner, R.; et al. A suplementação com uma mistura à base de carvacrol microencapsulado, timol e cinamaldeído na ração de cordeiros inibe células imunes e melhora o desempenho do crescimento. *Livest.* **2020**, *240*, 104144. [\[CrossRef\]](#)
70. Dorman, HJ; Deans, SG Agentes antimicrobianos de plantas: atividade antibacteriana de óleos voláteis de plantas. *J. Appl. Microbiol.* **2000**, *88*, 308–314. [\[Referência Cruzada\]](#)
71. Molosse, VL; Deolindo, GL; Glombosky, P.; Pereira, WAB; Carvalho, RA; Zotti, CA; Solivo, G.; Vedovto, M.; Fracasso, M.; Silva, AD; et al. Curcumina ou mistura fitogênica microencapsulada para substituir antibióticos ionóforos e não ionóforos em bezerros desmamados: Efeitos no desempenho do crescimento e na saúde. *Livest.* **2022**, *263*, 105029. [\[CrossRef\]](#)
72. Brunetto, ALR; Giacomelli, CM; Favero, JF; Bissacotti, BF; Copeti, PM; Morsch, VM; Oliveira, FC; Wagner, R.; Alves, R.; Pereira, WAB; et al. Mistura fitogênica na dieta de novilhos holandeses em crescimento: efeitos sobre o desempenho, a digestibilidade, o perfil de ácidos graxos voláteis no rúmen e as respostas imune e antioxidante. **2023**, *297*, 115595. [\[CrossRef\]](#)
73. Doughari, HJ; Ndakidemi, PA; Human, IS; Benade, S. Ecologia, biologia e patogênese de *Acinetobacter* spp.: Uma Visão Geral. *Microbes Environ.* **2011**, *26*, 101–112. [\[CrossRef\]](#)
74. Hou, S.; Wu, H.; Chen, S.; Li, X.; Zhang, Z.; Cheng, Y.; Chen, Y.; He, M.; An, Q.; Man, C.; et al. Respostas imunes mediadas por fibroblastos da pele bovina para defesa contra infecção bovina por *Acinetobacter baumannii*. *Microb. Pathog.* **2022**, *173*, 105806. [\[CrossRef\]](#)
75. Rojo, F. Repressão de catabólitos de carbono em *Pseudomonas*: otimizando a versatilidade metabólica e as interações com o ambiente. *Revista FEMS Microbiol.* **2010**, *34*, 658–684. [\[Referência Cruzada\]](#)
76. Winsor, GL; Griffiths, EJ; Lo, R.; Dhillon, BK; Shay, JA; Brinkman, FSL Anotações e recursos aprimorados para comparar milhares de genomas de *Pseudomonas* no banco de dados de genomas de *Pseudomonas*. *Nucleic Acid Res.* **2016**, *44*, 646–653. [\[CrossRef\]](#)
77. Mcvey, S.; Kennedy, M.; Chengappa, MM Microbiologia Veterinária, 3ª ed.; Editora Guanabara Koogan Ltda.: Rio de Janeiro, Brasil, 2016; ISBN 9788527728263.
78. Zarei, M.; Rahimi, S.; Fazlara, A.; Anvari, SE Cepas de *Pseudomonas* com alta capacidade de formação de biofilme isoladas de superfícies de matadouros de aves: sua importância na persistência de *Salmonella enteritidis* em matadouros. *Int. J. Food Microbiol.* **2023**, *390*, 110-126. [\[Referência Cruzada\]](#) [\[PubMed\]](#)
79. García-López, ML; Maradona, MP *Psychrobacter*. Em *Enciclopédia de Microbiologia de Alimentos*; Elsevier: Oxford, Reino Unido, 1999; pp. 1875–1882.
80. Rama, EN; Bailey, M.; Kumar, S.; Leone, C.; Den Bakker, HC; Thippareddi, H.; Singh, M. Caracterização do microbioma intestinal de frangos de corte criados sob práticas convencionais e sem antibióticos. *Poult. Sci.* **2023**, *102*, 102832. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
81. Cao, H.; Liu, MCJ; Tong, MK; Jiang, S.; Lau, A.; Chow, KH; Tse, CWS; Ho, PL Diversidade de grupos genômicos e alelos CfiA/cfiA em isolados de *Bacteroides fragilis* de humanos e animais. *Anaerobe* **2022**, *75*, 102567. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
82. Knoop, FC Infecções por *Bacteroides*. Em *Módulo de Referência em Ciências Biomédicas*; Elsevier: Amsterdã, Holanda, 2014. [\[Referência Cruzada\]](#)
83. Sears, CL As toxinas de *Bacteroides fragilis*. *Toxicon* **2001**, *39*, 1737–1749. [\[CrossRef\]](#)
84. Nagajara, TG; Narayanan, SK; Stewart, GC; Chengappa, MM Infecções por *Fusobacterium necrophorum* em animais: Patogênese e mecanismos patogênicos. *Anaerobe* **2005**, *11*, 239–246. [\[CrossRef\]](#)
85. Suchodolski, JS; Foster, ML; Sohail, MU; Leutenegger, C.; Queen, EV; Steiner, JM; Maks, SL O microbioma fecal em gatos com diarreia. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0127378. [\[CrossRef\]](#)

86. Chevrot, R.; Carlotti, A.; Sopena, V.; Marchand, P.; Rosendeld, R. *Megamonas rupellensis* sp. Nov., um anaeróbio isolado do Ceco de pato. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2008**, *58*, 2921–2924. [\[CrossRef\]](#)
87. Cao, Z.; Liu, Z.; Zhang, N.; Bao, C.; Li, X.; Liu, M.; Yuan, W.; Wu, H.; Shang, H. Efeitos dos polissacarídeos do dente-de-leão (*Taraxacum mongolicum* Hand-Mazz.) na dieta sobre o desempenho e a microbiota intestinal de galinhas poedeiras. *Int. J. Biol. Macromol.* **2023**, *240*, 124422. [\[Referência Cruzada\]](#)
88. Virgínio Junior, GF; Reais, ME; Da Silva, AP; De Toledo, AF; Cezar, AM; Mendes, LW; Freco, L.; Montenegro, H.; Coutinho, L.L.; Bittar, CMM A γ -glucana das algas afeta o bacterioma fecal em bezerros leiteiros? *PLoS ONE* **2021**, *16*, e0258069. [\[RefCruz\]](#)
89. Fan, Y.; Chen, Q.; Zhang, B.; Chen, Z.; Huang, Q.; Xu, H.; Ren, J.; Zhang, X. Efeito do transplante intensivo de microbiota fecal com múltiplos doadores por cápsulas para colite não criativa ativa: um estudo prospectivo. *Gut* **2019**, *68*, 109–110. [\[CrossRef\]](#)
90. Rolínek, M.; Medo, J.; Gabor, M.; Miluchová, M.; Bíro, D.; Simko, M.; Juráček, M.; Hanusovsky, O.; Schubertová, Z.; Galík, B. Efeito da adição de óleo de coco à ração de suínos na diversidade microbiana retal e na abundância bacteriana. *Animais* **2020**, *10*, 1764. [\[Referência Cruzada\]](#) [\[PubMed\]](#)
91. Enjalbert, MR; Combes, S.; Cauquil, L.; Bouchez, O.; Monteil, C. Etablissement da comunidade bacteriana ruminal em bezerros leiteiros do nascimento ao desmame é sequencial. *J. Appl. Microbiol.* **2014**, *116*, 245–257. [\[CrossRef\]](#)
92. Foster, DM; Smith, GW Fisiopatologia da diarreia em bezerros. *Vet. Clin. N. Am. Food Anim. Pract.* **2009**, *25*, 13–36. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
93. Gull, T. Causas bacterianas de doenças intestinais em bezerros leiteiros: Medidas de controle aceitáveis. *Vet. Clin. N. Am. Food Anim. Pract.* **2022**, *38*, 107–119. [\[Referência Cruzada\]](#) [\[PubMed\]](#)
94. Shi, Z.; Wang, Y.; Yan, X.; Ma, X.; Duan, A.; Hassan, F.; Wang, W.; Deng, T. Análises metagenômicas e metabolômicas revelam o papel dos metabólitos associados ao microbioma intestinal em bezerros com diarreia. *Vet. Microbiol.* **2023**, *8*, e00582-23. [\[CrossRef\]](#)
95. Fu, ZL; Yang, Y.; Ma, M.; Malmuthuge, N.; Guan, LL; Bu, DP Dinâmica do estresse oxidativo e respostas imunes em neonatais bezerros durante a diarreia. *J. Dairy Sci.* **2024**, *107*, 1286–1298. [\[CrossRef\]](#)

Aviso Legal/Nota do Editor: As declarações, opiniões e dados contidos em todas as publicações são de responsabilidade exclusiva do (s) autor(es) e colaborador(es) individual(ais) e não da MDPI e/ou do(s) editor(es). A MDPI e/ou o(s) editor(es) isentam-se de responsabilidade por quaisquer danos a pessoas ou propriedades resultantes de quaisquer ideias, métodos, instruções ou produtos mencionados no conteúdo.



Artigo

Ingestão de Taninos Condensados (*Acacia mearnsii*) por Cordeiros em Confinamento e seu impacto no desempenho do crescimento, rúmen Meio Ambiente e Carne

Andrei LR Brunetto ¹, Ana Luiza F. dos Santos¹, Isadora Zago ¹, Guilherme L. Deolino, ², Luísa Nora ², Vitor L. Molosse¹, Rafael VP Lago ¹, Aline de C. Machado ³, Roger Wagner³, Jelson N. Nauderer ⁴, Bianca F. Bissacotti⁵, Anieli P. Kempka², Bruna Klein ⁵ e Aleksandro S. Da Silva ^{1,2,4,5,*}

¹ Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Universidade Estadual de Santa Catarina (UDESC), Chapecó 89815-630, Brasil; andreibrunetto03@gmail.com (ALRB); ana.santos1@edu.udesc.br (ALFdS); i.zago@edu.udesc.br (IZ); vitor.molosse@gmail.com (VLM); rafael.lago@edu.udesc.br (RVPL)

² Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Estadual de Santa Catarina (UDESC), Lages 88520-000, Brasil; guilhermeluizd@outlook.com (GLD); luísa.nora22@gmail.com (LN); anieli.kempka@udesc.br (APK)

³ Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria 97105-900, Brasil; alinecassiamachado@edu.ufsm.br (AdCM); rogerwag@gmail.com (RW)

⁴ Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria 97105-900, Brasil; jelsonnauderer@gmail.com (JNN); bianca_fbissacotti@hotmail.com (BFB)

⁵ Departamento de Zootecnia, Universidade Estadual de Santa Catarina (UDESC), Chapecó 89815-630, Brasil; brunaklein06@yahoo.com.br

* Correspondência: aleksandro.silva@udesc.br

Resumo: Este estudo determinou se a adição de taninos condensados à dieta de cordeiros confinados melhora o desempenho, o metabolismo, a saúde e a composição e qualidade da carne. Utilizamos 24 Lacaune cordeiros com peso inicial médio de $24,5 \pm 0,24$ kg. Os animais foram divididos em 12 baias com dois animais cada. No grupo de tratamento, um extrato de acácia negra foi adicionado ao concentrado de cordeiro (2,5 g/kg de matéria seca), enquanto o grupo controle recebeu apenas a dieta basal (sem extrato). Preto A acácia continha 98,6 g/kg de tanino condensado. Não houve diferença entre o desempenho variáveis, que incluíam ganho de peso, ingestão de ração e eficiência alimentar. No entanto, o grupo alimentado com taninos condensados apresentaram maior rendimento de carcaça e maior porcentagem de tecido intramuscular ligado gordura. Na carne, uma menor proporção de ácidos graxos saturados combinada com maiores concentrações de ácidos graxos insaturados foram observados em cordeiros do grupo dos taninos condensados. Os ácidos graxos poliinsaturados ácidos graxos (PUFA) não foram diferentes; no entanto, uma maior proporção PUFA/SFA foi observada em animais com ingestão de tanino condensado, e uma maior proporção de $\gamma 6$ e $\gamma 3$ foi observada na carne de desses animais. O teor de proteína e cinzas da carne não diferiu entre os tratamentos, assim como o teor de capacidade de retenção de água, cor e luminosidade. Além disso, os animais que se alimentaram de taninos condensados apresentaram níveis de colesterol mais baixos e maior teor de globulina. Os valores das variáveis do eritrograma foram menor em cordeiros que consumiram taninos condensados. Atividade bacteriana ruminal mais significativa também foi observada observado no grupo que recebeu taninos condensados. O efeito antioxidante foi verificado com menor níveis de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e atividade enzimática antioxidante mais significativa. Concluímos que a adição de taninos condensados melhora o rendimento da carcaça e aumenta a porcentagem de gordura na carcaça, melhorando o perfil de ácidos graxos, o que pode estar ligado ao efeito antioxidante, em além dos benefícios à saúde do consumidor deste produto.

Palavras-chave: extratos naturais; ruminantes; antioxidante; ácidos graxos



Citação: Brunetto, ALR; dos Santos,

ALF; Zago, I.; Deolino, GL; Nora,

eu.; Molosse, VL; Lago, RVP; de C.

Machado, A.; Wagner, R.; Nauderer,

JN; et al. Ingestão de condensado

Taninos (*Acacia mearnsii*) de cordeiros em

Confinamento e seu impacto na

Desempenho de crescimento, rúmen

Meio Ambiente e Carne. Fermentação

2024, 10, 630. <https://doi.org/10.3390/fermentation10120630>

Editor Acadêmico: Jianxin Xiao

Recebido: 25 de novembro de 2024

Revisado: 5 de dezembro de 2024

Aceito: 8 de dezembro de 2024

Publicado: 10 de dezembro de 2024



Direitos autorais: © 2024 dos autores.

Licenciado MDPI, Basileia, Suíça.

Este artigo é um artigo de acesso aberto distribuído sob os termos e

condições do Creative Commons

Licença de atribuição (CC BY) (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introdução

A acácia negra (*Acacia mearnsii*) é nativa do sudeste da Austrália e da Tasmânia e foi introduzido em várias regiões, incluindo as Américas. Seu extrato demonstrou

grande potencial como aditivo alimentar na nutrição de ruminantes devido aos poliflavonóides, compostos fenólicos, aminoácidos, carboidratos e outros açúcares [1].

Os polifenóis são componentes fenólicos da família dos compostos orgânicos naturais [2].

Taninos (condensados e hidrolisáveis) são metabólitos vegetais secundários compostos por substâncias fenólicas. Quando adicionados em concentrações acima de 5% de taninos condensados nas dietas totais dos animais, esses compostos podem impactar negativamente o consumo [3,4]; entretanto, em baixas concentrações, apresentam efeitos benéficos como controle de parasitas, redução da produção de metano entérico e aumento do fluxo e absorção de proteínas no intestino [4–6]. Esses compostos também apresentam ação antioxidante nos fluidos e tecidos animais. Dentre os principais compostos envolvidos, podemos citar os ácidos fenólicos, flavonoides e taninos, que atuam na eliminação de radicais livres [7,8].

Os polifenóis geralmente atuam na microbiota ruminal e podem afetar a fermentação de carboidratos, a degradação de proteínas e o metabolismo lipídico [9]. Entre eles estão os taninos, que incluem taninos condensados com menor risco de toxicidade [10], mas podem ser mais tóxicos para ruminantes do que os taninos hidrolisáveis [11]. Esses compostos formam complexos com a proteína da dieta e são menos degradados no rúmen [12], resultando em maior absorção intestinal, melhor utilização e redução da excreção de nitrogênio. Os taninos condensados (CT) podem limitar a bio-hidrogenação ruminal de gorduras insaturadas na dieta durante a digestão, promovendo alterações nos processos fermentativos e atuando em grupos de bactérias, causando alterações no fluxo de ácidos graxos para os tecidos [13]. Com todas essas propriedades e os benefícios que os taninos condensados podem oferecer, eles são vistos como potenciais substitutos para aditivos comumente usados, como antibióticos e melhoradores de desempenho, que estão sendo questionados devido ao seu modo de ação.

Testamos a hipótese de que doses menores de CT na dieta de cordeiros confinados promovem alterações no processo de bio-hidrogenação ruminal, aumentando as concentrações de ácidos graxos insaturados depositados na carne, reduzindo o estresse oxidativo nos tecidos e mantendo o desempenho animal sem impactar o consumo de ração. O objetivo foi avaliar se a adição de CT (extrato de acácia negra) na dieta de cordeiros confinados teria efeito positivo no desempenho de ganho de peso, no consumo de ração e nas alterações do perfil de ácidos graxos no fluido ruminal e na carne, além de potencializar o sistema antioxidante e reduzir o estresse oxidativo.

2. Materiais e Métodos

2.1. Aditivo

Utilizou-se o produto comercial (garantia mínima de 735 g/kg de CT; NutreSet PNT, SETA SA, Estância Velha, RS, Brasil), um antioxidante natural à base de CT, além de outros poliflavonoides, juntamente com outros componentes fenólicos e misturas complexas de gomas de carboidratos, açúcares e aminoácidos extraídos e purificados da casca do extrato de acácia-negra (*Acacia mearnsii*). O produto é obtido a partir do metabolismo secundário de plantas e adicionado à dieta de cordeiros na dose de 2,5 g/kg de matéria seca, com ingrediente ativo de 111,13 g/kg de MS de equivalente de ácido gálico. Seguindo a recomendação do fabricante, a concentração de tanino condensado na dieta é semelhante à de outro estudo recentemente publicado com tanino para cordeiros [14].

2.2. Animais, local de experimento e dietas

O estudo foi conduzido no setor de ruminantes da Fazenda Experimental da UDESC (FECEO), localizada em Guatambu/SC. Foram utilizados 24 cordeiros Lacaune, com idade média de $70 \pm 2,5$ dias e peso médio inicial de $24,5 \pm 0,24$ kg. Eles foram alojados em baias (1,2 m × 2,5 m) equipadas com comedouros e bebedouros com boia para controle do fluxo de água.

2.3. Dietas experimentais e ingestão de alimentos

O experimento teve duração de 89 dias (82 dias de período experimental + sete dias de adaptação), durante os quais os animais foram divididos em dois grupos, com seis repetições por grupo

e um total de dois animais por repetição/baia, sendo considerado um período de adaptação de ambiente e alimentação [15] devido aos animais já receberem uma dieta semelhante, adaptando-se apenas ao aditivo. Os animais do grupo controle receberam uma dieta basal. Em contraste, os animais do grupo o grupo tratado e a dieta basal receberam o aditivo à base de polifenol na dose de 2,5 g/kg de matéria seca. Foi utilizado concentrado em pó, e aditivos foram adicionados durante sua produção, realizadas em intervalos de 15 dias.

A dieta foi formulada de acordo com as necessidades nutricionais dos animais [16], considerando as alimentações de concentrado e silagem de milho, fornecidas em diferentes épocas do ano alimentadores; ou seja, primeiro era fornecido o concentrado e após o término do consumo (30 min), foi fornecida silagem. É importante ressaltar que os animais consumiram toda a concentrado fornecido durante todo o experimento, o que significa que o aditivo foi consumido integralmente. A alimentação foi dividida em duas refeições diárias, às 8h e às 16h, enquanto a água foi fornecido ad libitum.

A quantidade de ração (matéria seca) fornecida foi de 4,5% do peso vivo, com dieta no relação concentrado:silagem de 55:45, respectivamente. O volume de ração fornecido foi ajustado em intervalos de 15 dias com base no peso corporal dos animais; no entanto, o alimentador foi monitorados para obter um excedente de 2 a 3% de silagem. A composição química da os alimentos utilizados na dieta foram medidos de acordo com a técnica descrita abaixo, e os resultados são mostrados na Tabela 1.

Tabela 1. Composição química da silagem de milho e do concentrado basal utilizados.

Unid 1	Silagem de milho	Controlar Concentrado 2	Tratamento Concentrado 2
Matéria seca (MS), %	28,8	89,4	89,5
Proteína bruta (PB), % MS	9,59	18,0	19,2
EE, % MS	3,06	3,90	3,88
FDN, % MS	34,8	18,3	19,5
ADF, % DM	16,7	6,18	6,33
Cinzas, % MS	4,42	10,6	9,75
Ácido graxo (%)			
C12:0 (Láurico)	0,25	0,008	0,008
C14:0 (Mirístico)	0,24	0,05	0,05
C14:1 (Miristoleico)	0,01	-	-
C15:0 (Pentadecanóico)	0,05	0,02	0,02
C16:0 (Palmítico)	11,1	8,79	8,81
C16:1 (Palmitoleico)	0,38	0,10	0,10
C17:0 (Heptadecanóico)	0,28	0,05	0,06
C18:0 (Esteárico)	3,47	2,16	2,15
C18:1n9c (Oleico)	13,3	14,5	14,6
C18:2n6c (Linoléico)	17,1	22,8	22,2
C20:0 (Araquídico)	0,43	0,24	0,23
C20:1n9 (cis-11-eicosenoico)	-	0,18	0,17
C18:3n3 (α-linolênico)	5,00	1,03	1,01
C20:2 (cis-11,14-eicosadienoico)	-	0,02	0,02
C22:0 (Behênico)	0,50	0,15	0,16
C22:1n9 (Erúico)	0,04	0,03	0,04
C20:4n6 (Araquidônico)	0,07	0,06	0,07
C24:0 (Lignocérico) γ	0,63	0,16	0,15
SFA	17,0	11,6	11,6
γ MUFA	13,8	14,8	14,7
γ PUFA	22,2	23,6	23,7

¹ DM (matéria seca), CP (proteína bruta), EE (extrato etéreo), NDF (fibra em detergente neutro), ADF (detergente ácido fibra) e cinzas. ² Ingredientes presentes em 100 kg de concentrado: milho moído (550 g/kg), farelo de soja (255 g/kg), farelo de trigo (155 g/kg), calcário calcítico (10 g/kg) e pré-mistura mineral e vitamínica (30 g/kg). Concentração de pré-mistura de minerais e vitaminas (concentração/kg): Ca mín. 175 máx. 245 g; P mín. 40 g; S mín. 25 g; Mg mín. 12 g; No máx. 100 g; Cinzas máx. 980 g; com mín. 40 mg; Fe mín. 1800 mg; I mín. 80 mg; Mn me. 1400 mg; Se mín. 12mg; Zn mín. 4000mg; Vitamina. 300.000 UI; Vit D3 min 60.000 UI. Vit E min. 600 UI; F máx. 600mg; Monensina sódio 600 mg.

2.4. Peso Corporal e Coleta de Amostra

Os cordeiros foram pesados individualmente a cada 15 dias. Todas as pesagens foram realizadas pela manhã, com os cordeiros em jejum por 12 h, utilizando uma balança eletrônica digital (DIGITRON®, UL-300, Nunawading, Austrália). O jejum foi realizado apenas 12 h antes do dia da coleta de dados e amostras (noite); nos outros dias, os animais permaneceram com a silagem. O consumo médio diário (CMS) foi medido diariamente pela manhã, e as sobras foram removidas e pesadas por baia. O ganho médio diário (GMD) foi calculado como o coeficiente de regressão do peso vivo individual no tempo [17]. A eficiência alimentar (GMD/CMS) foi calculada.

As coletas de sangue foram realizadas nos dias 0, 30, 65 e 81 (antes da alimentação). Os tubos contendo anticoagulante (EDTA 10%) foram utilizados para o hemograma completo, e os tubos sem anticoagulante foram utilizados para a preparação do soro. Após a coleta, todas essas amostras foram transportadas para o laboratório (caixa de isopor com gelo), e os tubos sem anticoagulante foram centrifugados a 7000 rpm por dez minutos para separação do soro. Em seguida, uma fração do soro foi armazenada em microtubos de 1,8 mL (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha) a -15 °C.

Nos dias 30, 65 e 81 do experimento, 100 mL de fluido ruminal por animal foram coletados duas horas após a alimentação matinal (os primeiros 50 mL foram descartados e o restante do material coletado foi utilizado para análise) com uma sonda esofágica acoplada a um motor de sucção. O conteúdo coletado foi colocado em tubos para medição do pH e o tempo de atividade funcional da microbiota ruminal foi medido utilizando o teste de redução do azul de metileno (MBRT), descrito por [18]. Uma subamostra do fluido ruminal foi reservada para a determinação de AGCCs. Essas amostras, após coletadas, foram imediatamente filtradas e submetidas ao congelamento para evitar a degradação dos AGCCs.

Todos os animais foram abatidos um dia após o término do período experimental (dia 82) em um matadouro específico para pequenos ruminantes (Guataparã em Guatambu — SC), seguindo as normas vigentes e supervisionado por um médico veterinário. O pH muscular foi medido após os procedimentos de atordoamento, sangria, remoção de pele e evisceração. As carcaças quentes foram pesadas e, após 24 h, a pesagem foi realizada novamente para obtenção do peso da carcaça fria e nova aferição do pH. As carcaças foram resfriadas nas câmaras frias do matadouro (entre -2 e 0 °C). Após 24 h do abate, o músculo quadríceps femoral (membro esquerdo) foi removido e utilizado para análises da carne.

2.5. Análises Laboratoriais

2.5.1. Determinação de Compostos Fenólicos Totais (CFT), Atividade Antioxidante e Taninos no Aditivo

Para extração, foram utilizados 0,5 g da amostra e adicionados 50 mL de água destilada. A mistura foi colocada em banho de ultrassom (70 W) por três horas e deixada em repouso no escuro por mais três horas. O sobrenadante foi filtrado com papel de filtro quantitativo (Whatman n° 40) e armazenado em balão volumétrico de 100 mL envolto em papel alumínio. Imediatamente após a extração, os extratos foram armazenados em tubos Eppendorf e mantidos congelados a -83 °C, se necessário, e não por mais de 24 h, até o uso [19].

A quantificação total de compostos fenólicos foi realizada pelo método colorimétrico de Folin-Ciocalteu [20]. Uma alíquota de cada amostra diluída foi misturada com 0,5 mL de Folin-Ciocalteu e agitada por um minuto; 2 mL de carbonato de sódio (20%) foram adicionados à mistura e agitados por 30 s. Após incubação por duas horas no escuro, a absorbância a 750 nm foi lida em relação ao branco preparado. A curva padrão foi preparada por soluções de ácido gálico em metanol. A concentração de TPC nos extratos foi determinada em equivalentes de ácido gálico usando uma equação obtida do gráfico de ácido gálico padrão e expressa em mg de equivalente de ácido gálico por 100 g de amostra seca (mg EGA·g A atividade antioxidante foi $^{-1}$). Os dados foram apresentados como a média das análises $\pm$ DP dos triplicados [21].

determinada pela eliminação do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH), pela eliminação do radical 2,2'-azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolino-6-sulfônico) (ABTS) com medições em triplicata. O ensaio de eliminação do radical DPPH

foi realizada de acordo com a literatura [22], com modificações. Em metanol, 0,1 mL da amostra foi misturado com 3,9 mL de solução de DPPH 0,06 mM. Na solução controle, o metanol foi usado no lugar da amostra. As misturas foram incubadas a 25 °C por uma hora no escuro. A leitura da absorbância foi realizada a 515 nm, com metanol para calibrar o equipamento. A quantificação foi realizada com base em uma curva padrão de DPPH em metanol (nas concentrações de 0 µM, 10 µM, 20 µM, 30 µM, 40 µM, 50 µM e 60 µM) usando a equação linear $y = 0,0104x + 0,0248$ ($R^2 = 0,9919$), onde o eixo y é a absorbância e o eixo x é a concentração de DPPH.

O ensaio de sequestro de radicais ABTS foi realizado de acordo com a literatura [23]. Uma solução estoque de 7 mM de ABTS foi preparada. A solução de trabalho de ABTS foi preparada misturando-se a solução estoque de ABTS com a solução de K₂S₂O₈ 2,45 mM na proporção de 1:1 (v/v). 20 µL da amostra foram misturados com 980 µL da solução de trabalho de ABTS. A absorbância da mistura foi medida em um espectrofotômetro a 734 nm após seis minutos de incubação na ausência de luz. A quantificação foi realizada usando uma curva padrão de Trolox em etanol (nas concentrações de 100 µM, 500 µM, 750 µM, 1000 µM, 1500 µM e 2000 µM), usando a equação linear $y = 0,000289x + 0,53447$ ($R^2 = 0,9176$), onde o eixo y é a absorbância e o eixo x é a concentração de Trolox.

Os taninos totais foram quantificados pelo método de Folin-Ciocalteu. O extrato de tanino foi obtido com acetona aquosa (70%, v/v). Foram analisadas cinco réplicas do extrato de tanino. Para os taninos totais, foi utilizada a análise padrão, enquanto a concentração de CT foi calculada como equivalente de leucocianidina por meio da equação: $[\text{Abs } 550 \text{ nm} \times 78,26 \times \text{fator de diluição}] / \% \text{ MS}$ [24].

2.5.2. Análise da Composição Química

No laboratório, as amostras de ração foram pré-secas em estufa de ventilação forçada a 55 °C por 72 h, depois retiradas da estufa e pesadas novamente para determinação do teor de matéria seca parcial, seguida de moagem em moinho Wiley (Marconi, modelo: MA340), utilizando peneira de malha de 1 mm. As amostras pré-secas e moídas foram aquecidas a 105 °C por 24 h para determinação da matéria seca (MS) e incineradas em mufla a 600 °C [25]. O método micro-Kjeldahl determinou o teor de N (Método 984.13 [26]), o que permitiu prever o teor de proteína bruta (PB, método 976.05) por meio de cálculo matemático ($N \times 6,25 = PB$). Para determinar o teor de fibra em detergente neutro (FDN), as amostras foram colocadas em sacos de poliéster [27] e tratadas com uma solução de detergente neutro em uma autoclave a 110 °C por 40 min [28]. Para amostras concentradas, incluímos β -amilase [29]. As concentrações de fibra em detergente ácido (FDA) foram determinadas de acordo com AOAC [26], método 973.18). Os valores de amido, carboidratos e extrato etéreo foram obtidos usando um espectrômetro de reflectância no infravermelho próximo, modelo Spectra Star série 2600 XT de analisadores de infravermelho próximo (Unity Scientific®, Brookfield, WI, EUA). Os resultados são apresentados na Tabela 1.

Os ácidos graxos de amostras de ração (silagem e concentrado) foram extraídos pelo método de [30], utilizando uma quantidade de 1,5 g de amostra pré-seca (estufa a 60 °C, 72 h), para estabilização e possibilidade de moagem. A quantidade de água utilizada no método de extração para amostras de ração foi de 1,5 mL. Outros procedimentos para análise de ração foram semelhantes aos realizados com carne, como será descrito a seguir (Seção 2.6).

2.5.3. Hemograma e Bioquímica Sérica

Contagens de eritrócitos e leucócitos totais, concentração de hemoglobina, porcentagem de hematócrito e diferenciais de leucócitos foram realizadas imediatamente após a chegada da amostra ao laboratório usando um analisador hematológico automático (três partes EQUIP VET 3000®, Pleasanton, CA, EUA).

Os níveis séricos de proteína total, albumina, colesterol, triglicerídeos, glicose e ureia foram avaliados no soro utilizando kits comerciais (Analisa, Belo Horizonte, MG, Brasil) e equipamento semiautomático (BIO PLUS 2000®, Barueri, SP, Brasil), seguindo as recomendações dos fabricantes. Os níveis de globulina foram obtidos utilizando a fórmula globulina = proteínas totais β albumina [

2.5.4. Estado oxidante

A carne (0,5 g) foi pesada e alocada em tubos de ensaio. O tecido foi homogeneizado separadamente em tampão Tris-HCl 10 mmol, pH 7,2, para verificar as variáveis do estado oxidativo. As amostras foram armazenadas em tubos e congeladas a -20 °C até o momento da análise. Todos os procedimentos descritos acima foram realizados em temperatura refrigerada (4 °C).

A peroxidação lipídica foi medida como a quantidade de TBARS, de acordo com a literatura para soro [33] e para carne [34]. A reação foi lida em um espectrofotômetro Kasuaki IL-593-S a 535 nm (soro) e 532 nm (carne). Os resultados foram expressos em nmol de malondialdeído (MDA)/mL de soro ou homogeneizado [35].

A atividade da glutathione S-transferase (GST) sérica e da carne foi medida com base em pesquisadores [36] e expressa em μmol de 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB)/min/mg de proteína. De acordo com a literatura [37], os tios proteicos foram medidos e os resultados expressos em nmol de tios/mg de proteína.

A medição da atividade da superóxido dismutase em homogeneizado de carne foi baseada na inibição da reação de O₂ com adrenalina, conforme descrito por pesquisadores [38]. Uma unidade de SOD é definida como a quantidade de enzima que inibe em 50% a velocidade de oxidação da adrenalina. Isso leva à formação do produto de coloração vermelha, o adrenocromo, que é detectado por um espectrofotômetro. A atividade da SOD é determinada pela medição da velocidade de formação do adrenocromo, observada a 480 nm, em um meio de reação contendo 50 mM de glicina-NaOH, pH 10, e 1 mM de adrenalina. Os resultados foram expressos como UI de SOD por miligrama de proteína.

2.5.5. Ácidos Graxos Voláteis Ruminais

Imediatamente após a coleta do fluido ruminal, o pH foi medido usando um medidor de pH digital (KASVI®, K39-1420, Pinhais, Brasil) ainda no local. Imediatamente após a coleta, a atividade funcional da microbiota ruminal foi analisada usando o teste de redução do azul de metileno (MBRT), descrito por pesquisadores [18]. Para a determinação de ácidos graxos de cadeia curta, as amostras de fluido ruminal foram descongeladas a 5 °C e agitadas manualmente para homogeneizá-las. Um mililitro de alíquotas do sobrenadante das amostras de fluido ruminal foi coletado em microtubos de polipropileno (2 mL) e centrifugado por cinco minutos (12.300× g).

Após isso, 250 μL do sobrenadante foram removidos e transferidos para um novo microtubo contendo 250 μL de ácido fórmico. A mistura foi agitada manualmente e centrifugada novamente por três minutos. Em seguida, 250 μL do sobrenadante da mistura foram coletados em um frasco de injeção, e 500 μL de solução de 3-octanol (665 $\mu\text{g mL}^{-1}$ em metanol) foram utilizados como padrão interno e homogeneizados. As amostras foram analisadas em um cromatógrafo a gás equipado com um detector de ionização de chama (GC-FID; Varian Star 3600, Palo Alto, CA, EUA) e um amostrador automático (Varian 8200CX, Palo Alto, CA, EUA); 1 μL do extrato foi injetado em modo split a 1:10. O gás de arraste utilizado foi hidrogênio a uma pressão constante de 20. Os analitos (ácidos acético, propiônico, butírico, valérico e isovalérico) foram separados por uma coluna capilar CP-WAX 52CB (60 m × 0,25 mm; espessura da fase estacionária de 0,25 μm). A temperatura inicial da coluna foi fixada em 80 °C por um minuto e aumentada para 120 °C a 8 °C min⁻¹, então até 230 °C por 15 °C min⁻¹, onde permaneceu por um minuto. As temperaturas do injetor e do detector foram fixadas em 250 °C. A validação do método incluiu os seguintes parâmetros: seletividade, linearidade, faixa linear, repetibilidade, precisão, limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ) para ácidos acético, propiônico, butírico, valérico e isovalérico. Os parâmetros analíticos são mostrados na Tabela S1. A linearidade foi avaliada pelo cálculo de uma equação de regressão usando o método dos mínimos quadrados. Os valores de LOD e LOQ foram obtidos por diluições sequenciais até relações sinal-ruído de 3:1 e 6:1, respectivamente. A precisão foi avaliada pela análise da repetibilidade de seis amostras replicadas. A exatidão foi determinada pela recuperação de quantidades conhecidas de substâncias padrão adicionadas a uma amostra diluída. Os resultados foram expressos em mmol L⁻¹ de cada AGCC no fluido ruminal.

2.6. Carne

A carne foi resfriada a 6 °C por 24 h, após o que foi feito um corte ao meio (separando-se em dois bifes de 2 cm cada) para medir o pH usando um eletrodo de penetração portátil (HANNA, HI

99163, Smithfield, RI, EUA). Neste corte de carne, a cor da carne na superfície também foi avaliada em quatro locais diferentes (a média foi determinada para análise de dados), usando um cromômetro CR-400 (Minolka, Osaka, Japão); CIE1976 L^* a^* b^* , com um iluminante padrão D65, comparado a um observador padrão CIE 1931 (x_2y , y_2 , z_2), a uma placa de calibração (número 1849-701). Elas são definidas como luminosidade (L^*), vermelhidão (a^*) e amarelecimento (b^*), medidas em três pontos de amostra aleatórios. Em outra porção de carne, avaliamos a capacidade de retenção de água (CRA) usando compressão de acordo com a metodologia de Hamm, adaptada pelos pesquisadores [39]. Foi utilizado um total de 5 g de carne, uma amostra sem costelas, tecido conjuntivo e gordura. A carne foi colocada entre duas folhas de papel de filtro e comprimida por 5 minutos com um peso de 2,5 kg. A amostra de carne foi então pesada para avaliar a quantidade de água perdida. O CRA foi então calculado e os resultados apresentados em porcentagem.

A extração dos ésteres metílicos graxos foi realizada utilizando o método de Bligh e Dyer [30] com algumas modificações: 1,5 g de amostras de carne, 0,5 mL de água, 5 mL de metanol e 2,5 mL de clorofórmio foram adicionados a um tubo de polipropileno de 15 mL e a agitação mecânica foi realizada por 60 min. Em seguida, 2,5 mL de clorofórmio e solução de Na_2SO_4 1,5% foram adicionados para promover um sistema bifásico. Essa mistura foi agitada por dois minutos e então centrifugada por 15 min a 2000 rpm. Os lipídios obtidos da fase clorofórmica foram submetidos à análise de ácidos graxos.

A metilação de ácidos graxos foi realizada usando um método de transesterificação proposto por [40]. Os lipídios extraídos foram adicionados a um mililitro de solução metanólica de KOH 0,4 M em um tubo de ensaio e agitados em um vórtice por um minuto. As amostras foram mantidas em banho-maria por dez minutos no ponto de ebulição. Posteriormente, foram resfriadas à temperatura ambiente e 3 mL de solução metanólica de H_2SO_4 1 M foram adicionados, agitados em um vórtice e mantidos em banho-maria por dez minutos. Após o resfriamento, 2 mL de hexano foram adicionados e centrifugados a 2000 rpm por dez minutos. Por fim, o hexano com os ésteres metílicos de ácidos graxos (FAME) foi submetido à análise cromatográfica.

Para a determinação do FAME, um cromatógrafo gasoso modelo TRACE 1310 foi equipado com um detector de ionização de chama (Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA). Um microlitro de amostras foi injetado em um injetor splitless, operado em modo split na proporção 1:10 a 250 $^{\circ}\text{C}$. Hidrogênio foi usado como gás de arraste a uma vazão constante de 1,5 mL/min. A separação FAME foi realizada usando uma coluna cromatográfica RT 2560 (100 m $\times$ 0,25 mm $\times$ 0,20 μm de espessura de filme, Restek, Bellefonte, PA, EUA). A temperatura inicial do forno foi programada em 100 $^{\circ}\text{C}$ por cinco minutos e aumentada para 180 $^{\circ}\text{C}$ a uma taxa de 8 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$. Em seguida, aumentou para 210 $^{\circ}\text{C}$ a 4 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ e, finalmente, até 240 $^{\circ}\text{C}$, aumentou para 20 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ e foi mantida por 20 minutos em isotérmico. A temperatura do detector foi mantida constante em 300 $^{\circ}\text{C}$. Os compostos FAME foram identificados pela comparação do tempo de retenção experimental com aqueles de padrões autênticos (FAME Mix-37, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA). Os resultados foram apresentados como uma porcentagem de cada ácido graxo identificado na fração lipídica, considerando o fator equivalente de tamanho de cadeia do FAME para FID e o fator de conversão do éster para o respectivo ácido, de acordo com a literatura [41].

2.7. Análise Estatística

Os dados experimentais foram primeiramente analisados descritivamente, e medidas de tendência central (mediana) e dispersão dos dados (amplitude que representa o intervalo entre os valores mínimo e máximo nos dados) foram computadas. Além disso, todas as variáveis foram submetidas ao teste W de Shapiro-Wilk, que revelou uma distribuição normal dos dados. Assimetria, curtose e homogeneidade foram avaliadas usando o teste de Levene, e a linearidade foi usada usando regressão linear. Todos os dados foram analisados imediatamente usando o procedimento PROC MIXED (SAS Inst. Inc., Cary, NC, EUA; versão 9.4), com a aproximação de Satterthwaite para determinar os graus de liberdade do denominador para o teste de efeitos fixos. Ganho de peso, GMD, eficiência alimentar e conversão alimentar foram testados para efeitos fixos de tratamento usando um curral (tratamento) e animal (curral) como variáveis aleatórias (ou seja, curral dentro do tratamento e animal dentro do curral). O peso corporal e a ração ingerida foram testados para efeitos fixos de

dia e tratamento $\times$ dia; e caneta (tratamento) como variáveis aleatórias. Todas as outras variáveis (sangue e líquido ruminal) foram analisados como medições repetidas e testados para efeitos do tratamento, dia e tratamento $\times$ dia, e caneta (tratamento) e animal (caneta) como variáveis aleatórias. Análise de variáveis post-mortem (carne, carcaça e perfil de ácidos graxos) foi testado usando animais (tratamento) como variáveis aleatórias para efeitos fixos do tratamento. Todos os resultados obtidos no primeiro dia para cada variável também foram incluídos como covariáveis; no entanto, a covariável foi removida do modelo quando $p > 0,05$. As médias foram separadas usando PDIFF (teste de estudante), e todos os resultados foram relatados como LSMEANS seguidos pelo padrão erro. Significância foi definida quando $p \leq 0,05$ e tendência quando $p > 0,05$ e $p \leq 0,10$.

Calculamos a potência post hoc para os grupos, considerando o peso corporal como potência de saída visto que é uma das principais variáveis de importância na adição de melhorias de desempenho aditivos. Utilizamos a média de cada grupo e seu DP com alfa de 0,05, e finalizamos com um poder razoável de 86,4%.

3. Resultados

3.1. Aditivo

Esta metodologia verificou que a concentração de TPC é de $2534,7 \pm 111,13$ mg GAE/g DM. A atividade foi de $0,27 \pm 0,02$ EC50, $\mu\text{g/mL}$, ou seja, o resultado foi expresso como EC50, que é a concentração da amostra necessária para a eliminação do radical DPPH em 50%. A concentração foi de $10514,02 \pm 1099,53$ μM Trolox/g da amostra, com inibição de $87,8 \pm 10,5\%$. Detectamos $986 \pm 2,4$ g de tanino por kg de aditivo (material fresco) usado no experimento.

3.2. Desempenho de crescimento e consumo de ração

Os resultados do desempenho do crescimento são apresentados na Tabela 2 e na Figura S1. Observamos nenhum efeito do tratamento no GMD, ganho de peso médio, ganho de peso médio diário, alimentação total consumo e eficiência alimentar. Também não houve efeito do tratamento no concentrado e na silagem ingestão, quando avaliada separadamente.

Tabela 2. Desempenho de crescimento de cordeiros alimentados ou não com taninos condensados adicionados ao concentrado.

Variáveis	Controlar ¹	Taninos Condensados ¹	SEM	Valor p: Tratar
Peso corporal inicial, kg	24,8	24,3	0,247	0,89
Peso corporal final, kg	46,3	44,9	0,240	0,65
Ganho médio diário, g/d (d 1 a 81)	265	256	1,68	0,53
Ingestão de silagem (kg MS/dia)	0,50	0,50	0,08	0,90
Ingestão de concentrado (kg MS/dia)	0,61	0,62	0,00	0,98
² Ingestão média diária (IMD) (kg MS)	1,12	1,13	0,12	0,96
Eficiência alimentar	0,23	0,22	0,03	0,90

¹ Os tratamentos: Cordeiros que receberam dieta com taninos condensados adicionados no concentrado (tratamento); Cordeiros que não receberam adição de taninos condensados no concentrado (controle). ² Concentrado + silagem por dia (DM).

Como houve consumo de 100% do concentrado (com CT) e conhecendo a dose diária consumo de ração dos cordeiros por curral, a concentração do aditivo por animal/dia foi calculado, ou seja, era 2,82 g.

3.3. Hemograma, Bioquímica Sérica e Metabólitos

Os resultados da bioquímica e do metabolismo sérico são apresentados nas Tabelas 3 e S2. o tratamento afetou os níveis de colesterol, que eram menores no soro dos animais no grupo tratado. Os níveis de globulina foram maiores do que o controle em todo o experimento período, que foi associado a uma tendência para níveis mais elevados de proteínas totais. As variáveis albumina, triglicerídeos, glicose e ureia não afetaram o tratamento ($p > 0,05$). Efeito de tratamento para TBARS e tiois, a interação tratamento $\times$ dia foi verificada com menor concentrações de TBARS e maiores concentrações de tiois no grupo tratado (d 29, 65, e 81) ($p < 0,05$). Não houve efeito do tratamento para GST ($p > 0,05$).

Tabela 3. Bioquímica sérica e biomarcadores de oxidação no soro de cordeiros alimentados ou não com taninos condensados adicionados ao concentrado.

Variável	Tratamentos ¹		SEM	Valor p ⁴		
	Controle de Taninos Condensados			Tratar	Tratar × Dia ⁵	Dia ⁶
Albumina (g/dL)	3,01	3.10	0,08	0,85	0,59	0,64
Globulina (g/dL)	3,56 ^b	3,84 ^{um}	0,09	0,05	0,01	0,01
Proteína total (g/dL)	6,45 ^b	6,95 ^{um}	0,25	0,07	0,16	0,22
Ureia (mg/dL)	42,0	42,8	2.06	0,92	0,90	0,91
Colesterol (mg/dL)	72,9 ^{um}	65,9 ^b	2,32	0,05	0,02	0,01
Triglicerídeos (mg/dL)	33,6	31,7	4,57	0,85	0,89	0,78
Glicose (mg/dL)	79,8	83,9	3,90	0,51	0,65	0,45
TBARS (nmol MDA/mL)	25,3 ^{um}	21,4 ^b	1,62	0,04	0,03	0,05
Tióis (nmol SH/mg proteína)	b 115	um 140	8.05	0,01	0,01	0,01
GST ² (μmol CDNB 3/min/mg proteína)	367	365	18.2	0,94	0,86	0,82

¹ Os tratamentos: Cordeiros que receberam dieta com taninos condensados adicionados no concentrado (tratamento); Cordeiros que não recebeu adição de taninos condensados no concentrado (controle). ³ (GST). ² Glutathione S-Transferase 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB). ⁴ As médias diferem entre os grupos (p < 0,05), ilustradas por diferentes letras (a, b) na mesma linha para demonstrar o efeito do tratamento. ⁵ quando houve interação entre o tratamento e dia, os resultados são mostrados na Tabela S2. ⁶ quando houve efeito diurno, os resultados são mostrados na Tabela S2.

Os resultados do hemograma são apresentados nas Tabelas 4 e S2. Houve efeito do tratamento para porcentagem de hematócrito, concentração de hemoglobina, eritrócitos e granulócitos, que foi menor no grupo tratado (p < 0,05). Interação tratamento × dia no total de leucócitos concentração, sendo mais alta no dia 29 no grupo tratado e mais baixa no dia 65. A tendência do efeito do tratamento e da interação tratamento × dia para a contagem de linfócitos é mais alta no grupo tratado e em determinados momentos (d 29 e 81). Houve tendência para o tratamento efeito e interação tratamento × dia para o número de monócitos menor no grupo tratado grupo, especialmente no dia 81.

Tabela 4. Parâmetros sanguíneos de cordeiros alimentados com dietas controle e tanino condensado.

Variável	Tratamento ¹		SEM	Valor p ²		
	Controle de Taninos Condensados			Tratar	Tratar × Dia ³	Dia ⁴
Hematócrito (%)	33,5 ^{us}	b 31.1	0,27	0,02	0,05	0,38
Hemoglobina (g/dL)	13.0 ^{us}	b 11.8	0,14	0,04	0,05	0,21
Eritrócitos (×106μL)	11.1 ^{us}	b	0,15	0,05	0,11	0,44
Leucócitos (×103 μL)	11.3	10,4	1,08	0,83	0,03	0,01
Granulócitos (×103 μL)	2.13 ^{us}	11,4 b 1,76	0,06	0,01	0,01	0,45
Linfócitos (×103/μL)	b 8.20	8,97 b ^a	0,31	0,07	0,01	0,01
Monócitos (×103/μL)	0,93 ^{us}	0,63	0,05	0,06	0,01	0,02

¹ Tratamentos: Cordeiros que receberam dieta com adição de taninos condensados no concentrado (tratamento); Cordeiros que não receberam adição de taninos condensados no concentrado (controle). ² As médias diferem entre os grupos (p < 0,05), ilustrado por letras diferentes (a, b) na mesma linha para demonstrar o efeito do tratamento. ³ quando houve interação entre tratamento e dia, os resultados foram mostrados na Tabela S2. ⁴ Quando houve efeito diurno, os resultados foram mostrados na Tabela S2. Nota: Além das variáveis descritas na tabela, medimos o número de plaquetas e MCV, MCH, MCHC e RDW-CV, que não diferiram entre os tratamentos.

Os resultados do efeito do dia foram apresentados na Tabela S2. O efeito do dia para os níveis de globulina foi observada apenas nos cordeiros do grupo controle, que diminuiu ao longo do tempo. Em por outro lado, os níveis de TBARS diminuíram e os tiois aumentaram ao longo do tempo nos cordeiros de o grupo do tanino condensado. O efeito diurno para o colesterol também foi observado, com o níveis deste biomarcador aumentando em comparação ao início do experimento em ambos grupos. Da mesma forma, a contagem total de leucócitos e linfócitos aumentou no sangue de ambos os grupos de animais. A contagem de monócitos flutuou, com uma contagem mais alta no final do o experimento nos cordeiros do grupo controle; por outro lado, nos cordeiros alimentados com leite condensado

taninos, a contagem foi menor ao final da pesquisa. Não foi observado efeito diurno para hemoglobina e hematócrito.

3.4. Atividade de fermentação ruminal

Os resultados do fluido ruminal são apresentados na Tabela 5 e Figura 1. Houve uma tendência para menor tempo de atividade bacteriana no grupo tratado e interação tratamento × dia em final do experimento (d 81). A variável pH do fluido ruminal não apresentou efeito de tratamentos ($p > 0,05$). Houve tendência de interação entre tratamento × dia no momento 81 para a concentração total de ácidos graxos de cadeia curta, que foi menor no fluido ruminal de os animais do grupo de tratamento. Este resultado ocorreu devido à menor concentração de ácidos acético e propiônico no dia 81 em cordeiros do grupo de tratamento. No fluido ruminal, efeito do tratamento e interação tratamento × dia foram observados para butírico, isovalérico e ácidos valéricos. Esses três ácidos voláteis estavam em concentrações mais elevadas em cordeiros da grupo de tratamento comparado ao controle. Não houve efeito do tratamento ou tratamento × dia interação para a razão acético/propiônico.

Tabela 5. pH e atividade bacteriana (MBRT), ácidos graxos voláteis totais (AGV), no fluido ruminal de cordeiros com ou sem taninos condensados não concentrados adicionados.

Variável	Tratamento ¹		SEM	Valor p ³		
	Controle de Taninos Condensados			Tratar	Dia ⁵	Tratar × Dia ⁴
pH	6,42	6,38	0,12	0,77	0,25	0,32
MBRT ² (segundos)	86,8 ^{um}	73,2 ^b	4,21	0,08	0,01	0,01
AGV (mmol/L)	101	99,3	2,58	0,40	0,03	0,10
Acético (mmol/L)	70,1	66,6	2,40	0,24	0,01	0,05
Propiônico (mmol/L)	18,3	17,1	0,88	0,56	0,04	0,03
Butírico (mmol/L)	9,65 ^b	^{um} 11,7	0,66	0,05	0,01	0,01
Isovalérico (mmol/L)	2,05 ^b	2,73 ^{um}	0,16	0,01	0,01	0,01
Valérico (mmol/L)	^b	1,28 ^{um}	0,11	0,10	0,19	0,01
Acético/propiónico	1,02 3,83	3,88	0,15	0,86	0,66	0,74

¹ Os tratamentos: Cordeiros que receberam dieta com taninos condensados adicionados no concentrado (tratamento); Cordeiros que não receberam adição de taninos condensados no concentrado (controle).

² Teste de redução de azul de metileno (MBRT) — indicador de atividade microbiana; quanto menor o tempo, maior a ação das bactérias. Ou seja, quanto menor o tempo é necessário consumir azul de metileno.

³ As médias diferem entre os grupos ($p \leq 0,05$), ilustradas por letras diferentes (a, b) na mesma linha para demonstrar o efeito do tratamento.

⁴ Quando há interação entre o tratamento e dia, os resultados são mostrados na Figura 1.

⁵ Quando há efeito diurno, os resultados são mostrados na Figura 1.

Os resultados dos biomarcadores do fluido ruminal foram apresentados na Figura 1. Atividade bacteriana foi afetado pelo dia, sendo menor em ambos os grupos no meio do experimento; também destacou a maior atividade bacteriana no final do experimento quando os cordeiros consumiram tanino condensado. A concentração de AGV foi afetada pelo dia, sendo significativamente menor no fluido ruminal de cordeiros que consumiram tanino condensado em comparação ao d 81 até d 29. Em ambos os grupos, observou-se efeito do dia na porcentagem de ácido acético, ácido propiônico, butírico e isovalérico, mas sem efeito sobre o ácido valérico. Em geral, esses AGV reduzido quando os animais consumiram tanino condensado conforme detalhado na Figura 1. O outro biomarcadores não tiveram efeito diurno nesta amostra.

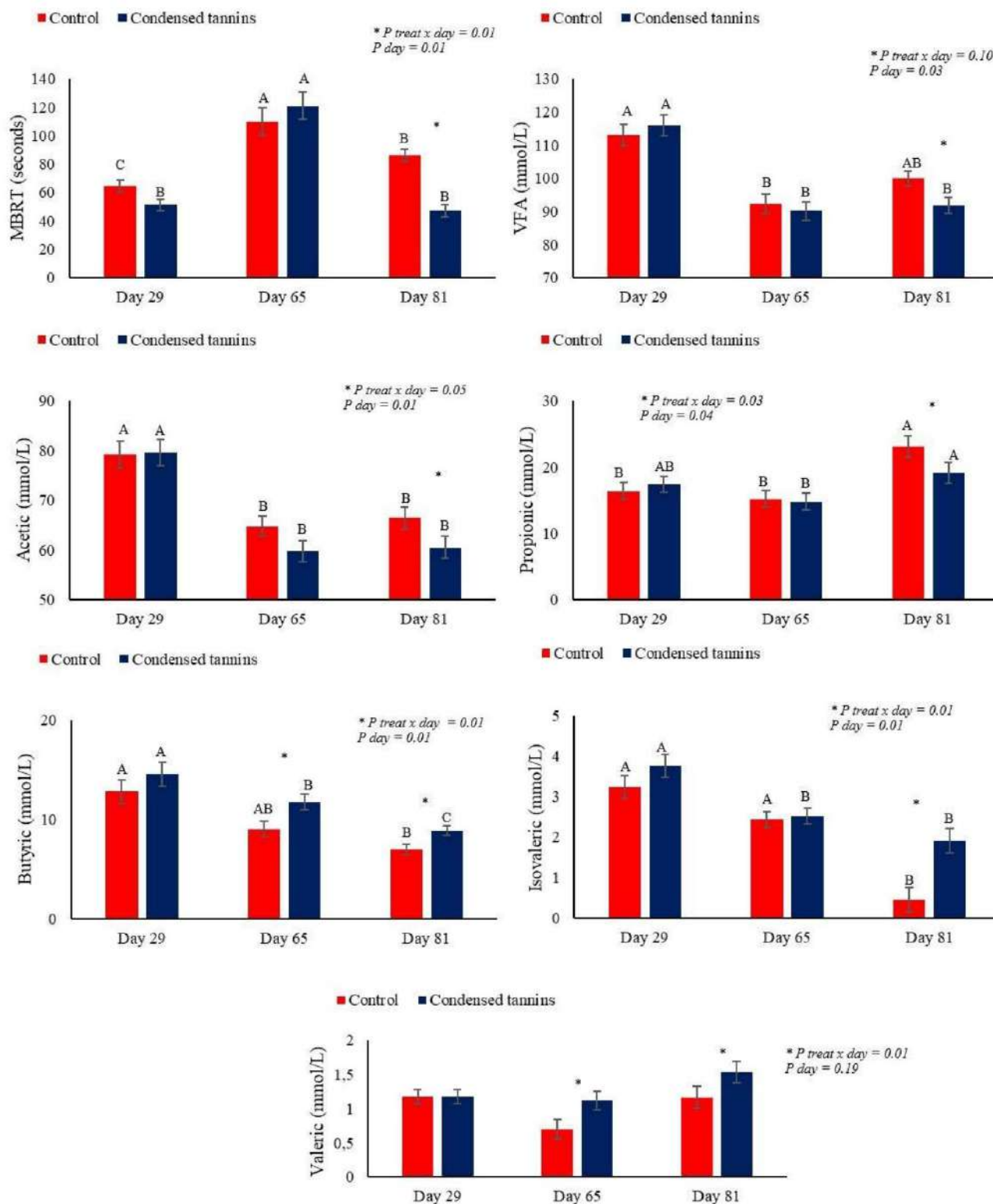


Figura 1. Efeito do tratamento vs. dia e efeito do dia para atividade bacteriana (MBRT), ácidos graxos totais (VFA) e ácidos graxos (VFA) no fluido ruminal de cordeiros com ou sem ácido dosado e ácido dosado e ácido dosado. tannins. Nota: 2 Teste de redução do azul de metileno (MBRT)—indicador de atividade microbiana);

Quanto maior o tempo, maior a ação das bactérias; ou seja, quanto menor o tempo necessário para consumir o azul de metileno, maior a ação das bactérias; ou seja, quanto menor o tempo necessário para consumir o azul de metileno. As médias diferem entre os grupos ($p < 0,05$), ilustrado por um asterisco (*) nas barras para demonstrar a interação entre os grupos ($p < 0,05$), ilustrado por um asterisco (*) nas barras para demonstrar a interação entre o tratamento e o dia. O efeito do dia ($p < 0,05$) foi ilustrado por diferentes letras maiúsculas (A, B, C) nas barras.

3.5. Características da carcaça

A Tabela 6 apresenta os resultados da qualidade da carne. Verificamos um efeito do tratamento para carcaça fria rendimento e percentual de gordura na carne, que foi mais significativo no grupo tratado ($p < 0,05$). As demais variáveis, como peso da carcaça quente, peso da carcaça fria, peso da carcaça quente pH, pH da carcaça fria, luminosidade, cor e capacidade de retenção de água não tiveram efeito do tratamento ($p > 0,05$).

Tabela 6. Análise da carcaça e da carne de cordeiros alimentados ou não com taninos condensados adicionados à dieta concentrado.

Variável	Controlar ¹	Taninos Condensados ¹	SEM	Valor p: Tratar ²
Peso da carcaça quente (kg)	21.4	21.3	1.21	0,96
Peso da carcaça fria (kg)	20,4	20.3	1,20	0,95
Rendimento de carcaça fria (%)	44,1 ^b	45,2 ^{um}	0,07	0,05
pH da carcaça quente	6,45	6,35	0,09	0,70
pH da carcaça fria	5,81	5,81	0,03	0,97
Leveza	45,3	45,3	1,06	0,98
Vermelhidão	12.2	11.8	0,14	0,90
Amarelecimento	6,54	6,38	0,29	0,82
Capacidade de retenção de água (%)	82,2	80,9	1,51	0,86
Composição química da carne				
Matéria seca (g/kg)	262	273	2,61	0,24
Proteína (g/kg)	217	213	2,03	0,69
Gordura intramuscular (g/kg)	20,7 ^b	um 34,7	1.12	0,01
Cinzas (g/kg)	24,9	25,8	0,87	0,16

¹ Tratamentos: Cordeiros que receberam dieta com adição de taninos condensados no concentrado (tratamento); Cordeiros 2 que não recebeu adição de taninos condensados no concentrado (controle). ($p \geq 0,05$), ilustrado por letras diferentes (a, b) na mesma linha para demonstrar o efeito do tratamento. As médias diferem entre os grupos

Houve efeito do tratamento para concentrações mais baixas de TBARS no grupo tratado ($p < 0,05$ —Figura 2). Maiores concentrações de tiois ($p < 0,05$) e uma tendência à concentrações mais elevadas de SOD (Figura 2). Os perfis de ácidos graxos são apresentados na Tabela 7 e Figura 3. Houve efeito do tratamento nas concentrações de C17:1(cis-10-Heptadecenóico), C18:0 (esteárico) e C20:4n6 (araquidônico) com concentrações mais baixas no grupo tratado ($p < 0,05$). Maiores quantidades de C18:1n9c (oleico), C18:2n6c (linoleico) e C20:3n3 (cis-11,14,17-eicosatrienoico) no tratamento ($p < 0,05$). Um efeito significativo para ácidos graxos saturados (AGs) em quantidades menores no tratamento e maiores concentrações de ácidos graxos monosaturados (MUFAs) ($p < 0,05$). Os ácidos graxos poliinsaturados (PUFA) não foram diferentes, mas uma maior A relação PUFA/SFA foi observada em animais com ingestão de CT, e uma maior proporção de $\gamma 6$ e $\gamma 3$ foi observado na carne desses animais (Figura 3).

Tabela 7. Perfil de ácidos graxos na carne de cordeiros alimentados ou não com taninos condensados adicionados ao concentrado.

Ácidos graxos (%)	Controlar ¹	Taninos Condensados ¹	SEM	Valor p: Tratar ²
C12:0 (Láurico)	0,056	0,063	0,009	0,12
C14:0 (Mirístico)	1.300	1.385	0,135	0,54
C14:1 (Miristoleico)	0,081	0,078	0,004	0,82
C15:0 (Pentadecanóico)	0,215	0,226	0,028	0,70
C16:0 (Palmítico)	24.24	22,80	0,975	0,16
C16:1 (Palmitoleico)	1.457	1.539	0,198	0,72
C17:0 (Heptadecanóico)	0,897	0,913	0,117	0,85
C17:1 (cis-10-heptadecenóico)	0,581 ^{um}	0,000 ^b	0,060	0,01
C18:0 (Esteárico)	16,69 ^{um}	b 13,70	0,999	0,01
C18:1n9c (Oleico)	40,70 ^b	43,99 ^{um}	0,526	0,01
C18:2n6c (Linoléico)	9,292 ^b	um 12.11	0,178	0,01

Tabela 7. Cont.

Ácidos graxos (%)	Controlar ¹	Taninos Condensados ¹	SEM	Valor p: Tratar ²
C20:0 (Araquídico)	0,120	0,154	0,010	0,23
C18:3n6 (Linolênico)	0,126	0,107	0,011	0,18
C20:1n9 (cis-11-eicosenoico)	0,081	0,103	0,002	0,21
C18:3n3 (a-linolênico)	0,370	0,517	0,125	0,32
C20:2 (cis-11,14-eicosadienoico)	0,071	0,087	0,001	0,42
C22:0 (Behênico)	0,064	0,083	0,011	0,11
Capacidade de retenção de água (%)	82,2	80,9	1,51	0,86
C20:3n6 (cis-8,11,14-eicosatrienoico)	0,193	0,183	0,013	0,95
Composição química da carne (g/kg)				
C22:1n9 (Eruúlc)	0,040	0,037	0,005	0,63
C20:3n3 (cis-11,14,17-eicosatrienoico)	0,352 b	0,278 =	0,062	0,24
Matéria seca (g/kg)	3,117	2,161	213	0,02
C20:4n6 (Araquidônico)	0,202	0,03	0,073	0,019
C24:0 (Gnócérico)	0,050	0,073	0,019	0,207
Gordura intramuscular (g/kg)	24,9	25,8	0,87	0,028
C24:1n9 (Nerúnico)	0,032	0,001	0,009	0,15
C20:5n3 (cis-5,8,11,14,17-Eicosapentaenoico)	0,091	0,075	0,009	0,01
C24:2n9	0,001	0,001	0,001	0,97
C22:6n3	0,001	0,001	0,001	0,98
(cis-4,7,10,13,16,19-Docosahexaenoico)				

de taninos condensados no concentrado (controle); 2 Cordeiros que não receberam adição

As médias diferem entre os grupos (p < 0,05), ilustrado por diferentes leituras (a, b) na mesma linha para demonstrar o efeito do tratamento; dieta com adição de taninos condensados no concentrado (tratamento); Cordeiros que não receberam adição de taninos condensados no concentrado (controle). (p < 0,05), 2 As médias diferem entre os grupos ilustrado por letras diferentes (a, b) na mesma linha para demonstrar o efeito do tratamento.

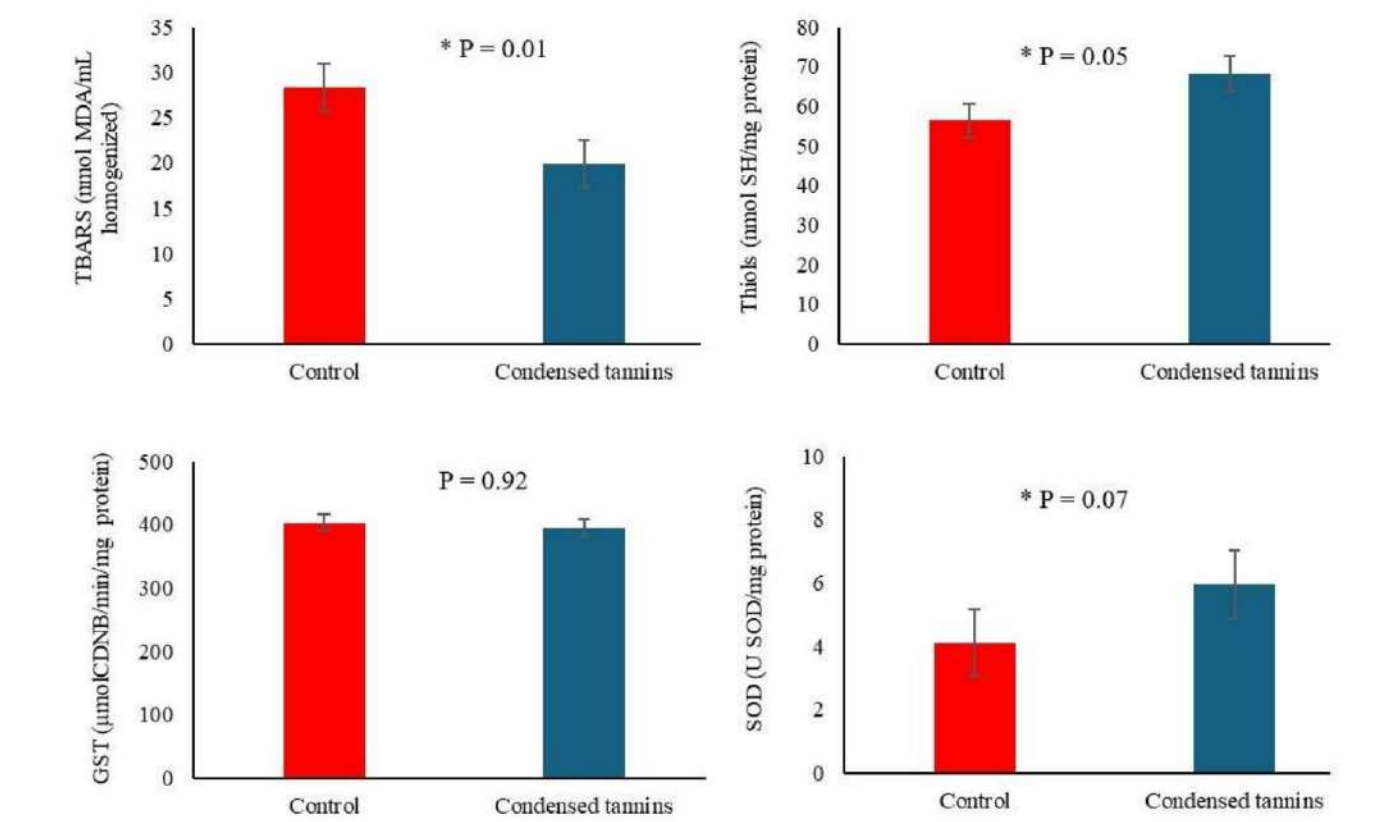


Figura 2. Oxidativo na carne de cordeiros alimentados ou não com taninos condensados adicionados ao concentrado (* efeito do tratamento quando p < 0,05 e tendência quando p < 0,05 e p < 0,10).

Tabela 7. Perfil de ácidos graxos na carne de cordeiros alimentados ou não com taninos condensados adicionados ao concentrado.

Ácidos graxos (%)	Controle 1	Taninos Condensados 1	SEM	Valor p: Tratamento 2
C12:0 (Láurico)	0,056	0,063	0,009	0,12
C14:0 (Mirístico)	1,300	1,385	0,135	0,54
C14:1 (Miristoleico)	0,081	0,078	0,004	0,82
C15:0 (Pentadecanóico)	0,215	0,226	0,028	0,70
C16:0 (Palmitico)	24,24	22,80	0,975	0,16
C16:1 (Palmitoleico)	1,457	1,539	0,198	0,72
C17:0 (Heptadecanóico)	0,897	0,913	0,117	0,85
C17:1 (cis-10-heptadecenóico)	0,581 a	0,000 b	0,060	0,01

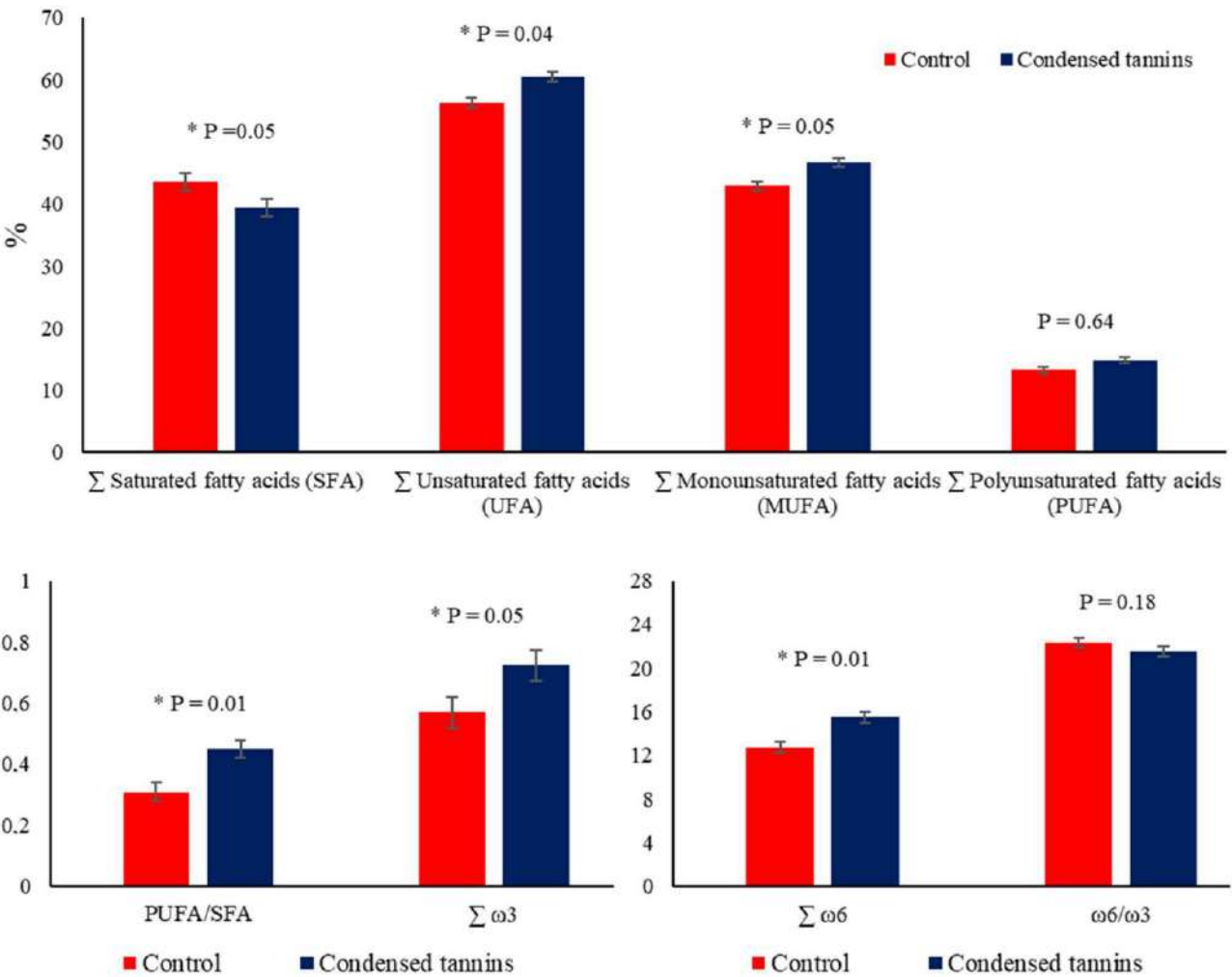


Figura 3. Efeito do tratamento na soma de ácidos graxos saturados e insaturados na carne de cordeiro alimentados com taninos condensados, além de ômega 3 e 6. * Diferença entre os grupos foi demonstrada quando p > 0,05.

4. Discussão

Os taninos condensados derivados do extrato de acácia negra (*A. mearnsii*) têm a característica de induzir uma redução na ingestão de matéria seca (CMS). Quando consumido em doses superiores a 5% da MS total da dieta, devido a fatores antinutricionais que conferem um sabor adstringente, pode impactar a ingestão e o desempenho [4]. Os taninos podem se complexar com proteínas da dieta e carboidratos, reduzindo sua degradação a nível ruminal. Após passar por o ambiente mais ácido do abomaso, eles são descomplexados, permitindo uma maior aporte de nutrientes a nível intestinal, incluindo aminoácidos essenciais [42], promovendo ganho de peso. Em nosso estudo, ao utilizar 2,5 g/kg de MS, não houve alterações na alimentação ingestão ou desempenho animal foram observados, indicando que esta dose mais baixa não afeta DMI ou ganho de peso em animais. Os pesquisadores [10], ao adicionar doses crescentes de CT para dietas de cordeiro, descobriu-se que quantidades acima de 40 g/kg MS reduziram a ingestão e o ganho de peso. Isso ocorre porque eles afetam negativamente a atividade da microbiota e do sistema digestivo ruminal. eficiência [43], inibindo a atividade de enzimas que digerem fibras e carboidratos, alterando a permeabilidade e a capacidade de absorção de nutrientes.

Os taninos atuam principalmente em grupos de bactérias que digerem fibras e carboidratos, o que pode levar a mudanças nessas populações dentro do ambiente ruminal, causando mudanças na o perfil dos ácidos graxos de cadeia curta produzidos por essas bactérias através da fermentação dos substratos fornecidos pela dieta. A redução das concentrações de acetato e propionato e o aumento na concentração de butirato observado aqui pode ser causado pela ingestão de tanino.

Houve uma interação tratamento $\times$ dia para o perfil de ácidos graxos de cadeia curta no rúmen, com a diferença entre os grupos para todos esses ácidos sendo observada no dia 81, e apenas para os ácidos butírico e valérico no dia 65. Isso demonstra claramente que um longo período de adaptação ao tanino na dieta foi necessário. O perfil de fermentação ruminal de vacas leiteiras suplementadas com doses crescentes de CT apresentou maior proporção de butirato e menor proporção de propionato e acetato no fluido ruminal [44]. Alterações no microbioma ruminal podem ter mediado essa alteração no perfil de fermentação ruminal.

Os taninos podem alterar o ambiente ruminal devido à formação de íons de amônia, que promovem alterações no pH do ambiente. Essa alteração no pH favorece a multiplicação de certas bactérias, especialmente as gram-negativas, levando à redução da fermentação de fibras e carboidratos, visto que a maioria das bactérias que degradam esses substratos são gram-positivas. Consequentemente, há uma redução na produção de acetato e propionato, resultante da menor fermentação desses compostos. A adição de taninos à dieta de ruminantes pode interferir na produção de ácidos graxos de cadeia ramificada, que são produzidos a partir da quebra de esqueletos de carbono de aminoácidos [45], como observado no aumento de ácido isovalérico em nosso estudo.

Houve efeitos do consumo de tanino na carne de cordeiro, sendo importante ressaltar que a ingestão deste aditivo não afeta a segurança alimentar, uma vez que os taninos são comumente consumidos por ruminantes. As alterações no perfil de ácidos graxos também foram observadas na composição da carne, onde maior percentual de gordura foi encontrado nos animais do grupo que consumiu taninos condensados. Após a análise, verificou-se que o perfil de ácidos graxos foi modificado, reduzindo os AGS devido à menor bio-hidrogenação de ácidos graxos insaturados no nível ruminal. Isso é causado pela atividade reduzida de bactérias gram-positivas, resultando em maior metabolização de ácidos graxos insaturados, que são então direcionados aos tecidos, promovendo alterações no perfil de ácidos graxos encontrados na carne [46]. Vale destacar o aumento nas concentrações dos ácidos ômega C18:1n9c (oleico) e C18:2n6c (linoleico) [47,48], que estão diretamente ligados aos benefícios à saúde cardiovascular tanto nos animais quanto nos consumidores dos produtos derivados deles, neste caso, a carne [49]. A enzima Δ^9 -dessaturase está envolvida no metabolismo dos AGS. Ela é responsável por introduzir uma ligação dupla entre o nono e o décimo carbono da cadeia de ácidos graxos saturados, convertendo AGS, como o ácido esteárico (C18:0), em ácidos graxos monoinsaturados, como o ácido oleico [50]. A atividade desta enzima é crucial para a regulação da fluidez da membrana. Em nosso estudo, observamos alta atividade desta enzima, o que reduziu as concentrações de C18:0 e aumentou a concentração de ácidos graxos monoinsaturados. Com essa melhora no perfil lipídico, sugerimos que a redução nos níveis séricos de colesterol pode ser atribuída a essa alteração, facilitando o fluxo de lipídios na corrente sanguínea, prevenindo a adesão às paredes das artérias e reduzindo o risco de doenças cardiovasculares tipicamente associadas a produtos de origem animal.

Os valores encontrados para a relação ácidos graxos poli-insaturados:saturados (PUFA:SFA) em animais que consumiram CT (0,45) atingiram os valores recomendados para uma dieta saudável, conforme relatado pelo Ministério da Saúde do Reino Unido, que deve ser maior que 0,4 [51], o que também é recomendado pela literatura [52], que é de 0,45 em alimentos. Esses dados são significativos porque tipicamente, de acordo com a literatura, essa relação na carne é geralmente baixa, em torno de 0,1 [53], caracterizando os produtos derivados de animais ruminantes, que têm uma relação de ácidos graxos PUFA:SFA menor devido à bio-hidrogenação de ácidos graxos insaturados da dieta por bactérias do rúmen [54]. No entanto, esses resultados demonstram que, embora a carne de cordeiro tenha níveis mais altos de SFA e menor relação de poli-insaturados:SFA, a suplementação com CT melhorou esse atributo de saúde. A relação n6:n3 não se alterou em função da suplementação com CT. Em média, foi de 22,7. Quantidades maiores de ácidos graxos insaturados e essa relação é positiva, uma vez que o consumo de SFA pode ser considerado prejudicial aos consumidores, pois essa apresentação de ácido graxo está associada à doença coronariana, enquanto muitos UFAs estão ligados à redução de inflamação, acidente vascular cerebral, estresse oxidativo e distúrbios hepáticos.

Os taninos condensados apresentam efeito positivo na estimulação da resposta imunológica, anti-inflamatória e antioxidante [55]. Além disso, a ingestão de flavonóis e procianidinas favorece a produção de moléculas anti-inflamatórias [56], que podem interferir na proliferação de linfócitos B e T, células envolvidas na função imunológica com produção de anticorpos [57]. Observamos aumento no número de linfócitos no grupo de tratamento, o que pode ser atribuído à ação do aditivo com flavonoides e ácido gálico em sua composição. Eles podem interferir no número de células no hemograma [58].

O aumento de linfócitos B pode estimular o aumento de globulinas, que incluem imunoglobulinas, que são responsáveis pela resposta imune.

Inúmeros fatores podem contribuir para o estresse oxidativo e o aumento dos níveis de compostos oxidantes no organismo. Esse desequilíbrio na relação oxidante/antioxidante aumenta os níveis de compostos oxidantes que podem potencializar algumas patologias [59]. Os processos de oxidação ocorrem tipicamente devido à ação do oxigênio na membrana celular, que contém lipídios em sua composição e é mais propensa à oxidação e à ação de radicais livres. Verificamos que o fornecimento de extrato de tanino de acácia negra na dieta dos cordeiros melhorou a resposta antioxidante, aumentando a atividade de enzimas responsáveis pela neutralização de radicais livres e ajudando a minimizar os impactos da peroxidação lipídica na membrana celular e em sua integridade. O CT no extrato auxilia na redução da produção de espécies reativas de oxigênio, o que reduz a produção de radicais livres e preserva a integridade celular, melhorando o desempenho animal. Isso pode ser verificado pela diminuição dos níveis de peroxidação lipídica tanto nos níveis séricos quanto na carne dos cordeiros do grupo que recebeu o extrato, indicando que a oxidação dos compostos lipídicos está ocorrendo em menor intensidade. Isso ocorre porque polifenóis como ácido gálico e catequinas, que pertencem à família dos flavonoides e são tipicamente encontrados no extrato de acácia negra, têm uma função antioxidante [60], permitindo que o sistema antioxidante seja estimulado pelo fornecimento desses compostos por meio da dieta. O aumento nas enzimas antioxidantes foi observado (GSH no nível sérico e na carne) medido indiretamente por meio de tiois totais e Superóxido Dismutase (SOD) na carne. Outros estudos verificaram a ação antioxidante desses compostos [61–63], relatando a capacidade dos polifenóis de neutralizar os radicais livres, aumentando a atividade de enzimas antioxidantes e promovendo alívio do estresse oxidativo. Resultados semelhantes foram encontrados por pesquisadores [64], que relataram um aumento nos níveis de enzimas antioxidantes ao fornecer resíduo de uva contendo flavonoides, incluindo catequinas, antocianinas e procianidinas.

5. Conclusões

A inclusão de acácia-negra CT na dieta dos cordeiros demonstrou benefícios na modulação da resposta antioxidante e no perfil de ácidos graxos da carne, além de melhorar o rendimento da carcaça e o percentual de gordura da carne. No entanto, não houve impacto significativo no desempenho de crescimento e no consumo de ração. Esses resultados destacam a eficácia do CT na melhoria da qualidade da carne e da saúde geral dos animais, sem comprometer o desempenho produtivo.

Materiais suplementares: As seguintes informações de suporte podem ser baixadas em: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/fermentation10120630/s1>, Tabela S1: Padronização da metodologia utilizada para quantificar os níveis de ácidos graxos de cadeia curta no líquido ruminal; Tabela S2: Interação tratamento vs. dia e efeito dia na bioquímica sérica, biomarcadores de oxidação e variáveis hematológicas de cordeiros alimentados ou não com taninos condensados adicionados ao concentrado; Figura S1: Curva de crescimento (média e erro padrão do peso corporal) durante o período experimental: controle vs. taninos condensados. Efeito dia foi observado ($p < 0,001$).

Contribuições dos Autores: ALRB e ASDS contribuíram para o desenho e implementação da pesquisa, bem como para a análise dos resultados. RW e APK auxiliaram na elaboração do projeto, sua execução e financiamento. ALRB, ALFdS, IZ, GLD, LN, VLM e RVPL participaram da execução do experimento e da coleta de amostras e dados. AdCM, JNN, BFB e BK realizaram as análises laboratoriais. Todos os autores discutiram os resultados e contribuíram para o manuscrito final. Todos os autores leram e concordaram com a versão publicada do manuscrito.

Financiamento: Esta pesquisa não recebeu financiamento externo.

Declaração do Conselho de Revisão Institucional: O Comitê de Ética em Uso de Animais da UDESC submeteu e aprovou este trabalho sob o número de protocolo 3704240422.

Declaração de Consentimento Informado: Não aplicável.

Declaração de disponibilidade de dados: dados como os dos autores podem ser disponibilizados se o leitor estiver interessado e solicitar.

Agradecimentos: Gostaríamos de agradecer à UDESC, CAPES, CNPq, FAPESC e SETA pelo apoio técnico e científico.

Conflitos de interesse: Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

Referências

1. Ávila, AS; Zambom, MA; Faccenda, A.; Fischer, M.L.; Anschau, FA; Venturini, T.; Tinini, RCR; Dessbesell, JG; Facíola, AP Efeitos dos taninos condensados de acácia-negra (*Acacia mearnsii*) na ingestão, população de protozoários, fermentação ruminal e digestibilidade de nutrientes em novilhos Jersey. *Animals* **2020**, *10*, 1011. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
2. Guerra, CC Polifenóis da Uva e do Vinho; Embrapa Uva e Vinho: Bento Gonçalves, Brasil, 2012.
3. De Jesus, NZT; de Souza Falcão, H.; Gomes, SE; de Almeida Leite, TJ; de Moraes Lima, GR; Barbosa-Filho, JM; Tavares, JF; da Silva, MS; de Athayde-Filho, PF; Batista, LM Taninos, úlceras pépticas e mecanismos relacionados. *Internacional J. Mol. Ciência*. **2012**, *13*, 3203–3228. [\[RefCruz\]](#) [\[PubMed\]](#)
4. Guimarães, LJ; Zundt, M.; Tsujiguchi, MP; Giotto, FM; Barbosa, MJPT; Grandis, FA; Silva, IG; Pereira, MCS; Ribeiro, ELA O uso de tanino condensado na dieta de cordeiros altera a população de protozoários do rúmen sem afetar o desempenho zootécnico. *Ruminantes de pequeno porte. Res.* **2023**, *229*, 107122. [\[CrossRef\]](#)
5. Adejoro, FA; Hassen, F.; Akanmu, AM; Morgavi, DP. A substituição da ureia por nitrato como fonte de nitrogênio não proteico aumenta o crescimento dos cordeiros e reduz a produção de metano, enquanto o tanino de acácia não tem efeito. **2020**, *259*, 114360. [\[Referência Cruzada\]](#)
6. Yanza, YR; Fitri ASuwnigyo, B.; Kumalasari, NR; Irawan, A.; Jayanegara, A. A utilização do extrato de tanino como aditivo dietético na nutrição de ruminantes: uma meta-análise. *Animais* **2021**, *11*, 3317. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
7. Luciano, G.; Vasta, V.; Monahan, FJ; López-Andrés, P.; Biondi, L.; Lanza, M.; Priolo, A. Estado antioxidante, estabilidade da cor e resistência da mioglobina à oxidação do músculo longissimus dorsi de cordeiros alimentados com uma dieta contendo tanino. *Food Chem.* **2011**, *124*, 1036–1042. [\[CrossRef\]](#)
8. Mu, C.; Yang, W.; Wang, P.; Zhao, J.; Hao, X.; Zhang, J. Efeitos de uma dieta rica em concentrado suplementada com proantocianidinas de semente de uva sobre o desempenho do crescimento, função hepática, qualidade da carne e atividade antioxidante em cordeiros em fase de terminação. *Anim. Feed Sci. Technol.* **2020**, *266*, 114518. [\[CrossRef\]](#)
9. Vasta, V.; Daghighi, M.; Cappucci, A.; Buccioni, A.; Serra, A.; Viti, C.; Mele, M. Revisão convidada: Polifenóis vegetais e microbiota ruminal responsáveis pela bio-hidrogenação de ácidos graxos, digestão de fibras e emissão de metano: Evidências experimentais e abordagens metodológicas. *J. Dairy Sci.* **2019**, *102*, 3781–3804. [\[CrossRef\]](#)
10. Costa, EldS; Ribeiro, CVDM; Silva, TM; Batista, ASM; Vieira, JF; Barbosa, AM; da Silva Júnior, JM; Bezerra, LR; Pereira, ES; Oliveira, RL Efeito da inclusão de taninos condensados na dieta, provenientes do extrato de *Acacia mearnsii*, sobre o desempenho zootécnico, as características de carcaça e a qualidade da carne de cordeiros. *Livest. Sci.* **2021**, *253*, 104717. [\[CrossRef\]](#)
11. Frutos, P.; Hervás, G.; Giraldez, FJ; Mantecón, AR Taninos e nutrição de ruminantes: uma revisão. *Período. J. Agric. Res.* **2004**, *2*, 191–202. [\[Referência Cruzada\]](#)
12. Orlandi, T.; Kozloski, GV; Alves, TP; Mesquita, FR; Ávila, SC Digestibilidade, fermentação ruminal e fluxo duodenal de aminoácidos em novilhos alimentados com forragem de capim mais concentrado contendo níveis crescentes de extrato de tanino de *Acacia mearnsii*. *Anim. Feed Sci. Tecnologia.* **2015**, *210*, 37–45. [\[CrossRef\]](#)
13. Dos Santos, FM; Bezerra, LR; Vieira, JF; Marcelino, PDR; Barbosa, AM; Pereira Filho, JM; Arce-Cordero, JA; Ribeiro, CVDM; Silva, TM; Oliveira, RL Perfil de ácidos graxos, composição físico-química e características de carcaça de touros Nelore jovens alimentados com extrato de *Acacia mearnsii*. *Ciência da Carne.* **2024**, *216*, 109579. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
14. García Salas, A.; Bárcena-Gama, JR; Ventura, J.; Muñoz-García, C.; Escobar-Espanha, JC; Crosby, M.M.; Hernandez, D. Bioacessibilidade de taninos condensados e seu efeito nas características físico-químicas da carne de cordeiro. *PeerJ* **2024**, *12*, e17572. [\[Referência Cruzada\]](#)
15. Parente, HN; Machado, TMM; Carvalho, FC; García, R.; Rogério, MCP; Barros, NNN; Zanine, AM Desempenho de ovinos confinados alimentados com diferentes dietas. *Arq. Sutiãs. Med. Veterinária Zootec.* **2009**, *61*, 460–466. [\[RefCruz\]](#)
16. Conselho Nacional de Pesquisa (NRC). Exigências Nutricionais de Pequenos Ruminantes: Ovinos, Caprinos, Cervídeos e Camelídeos do Novo Mundo; National Academies Press: Washington, DC, EUA, 2007. [\[CrossRef\]](#)
17. Yuste, S.; Amanzougarene, Z.; de la Fuente, G.; Fondevila, M.; de Vega, A. Efeitos da substituição parcial de cevada por milho e polpa de beterraba no desempenho de crescimento, fermentação ruminal e mudança na diversidade microbiana de bezerros de corte durante a transição de um regime de leite e pasto para uma dieta rica em concentrado. *Livest. Sci.* **2020**, *238*, 104071. [\[CrossRef\]](#)
18. Dirksen, G.; Gründer, HD; Stöber, M. Sistema digestivo. Em *Exame Clínico de Bovinos*, 3ª ed.; Rosenberger, G., Ed.; Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, Brasil, 1993; pp. 166–228.

19. Dacoreggio, M.; Moroni, L.; Kempka, A. Atividades antioxidantes, antimicrobianas e alelopáticas e desinfecção de superfícies de extrato de folhas de *Psidium cattleianum* sabine. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* **2019**, *21*, 101295. [\[CrossRef\]](#)
20. Folin, O.; Ciocalteu, V. Um método colorimétrico para a determinação de fenóis e compostos fenólicos. *J. Biol. Chem.* **1983**, *22*, 305–308. [\[Referência Cruzada\]](#)
21. Bonoli, M.; Bendini, A.; Cerretani, L.; Lercker, G.; Gallina Toschi, T. Análise qualitativa e semiquantitativa de compostos fenólicos em azeites de oliva extravirgem em função do grau de maturação das azeitonas por diferentes técnicas analíticas. *J. Agric. Química de Alimentos.* **2004**, *52*, 7026–7032. [\[CrossRef\]](#)
22. Najafian, L.; Babji, AS Produção de peptídeos bioativos por hidrólise enzimática e identificação de peptídeos antioxidantes a partir do hidrolisado proteico sarcoplasmático de patina (*Pangasius sutchi*). *J. Funct. Foods* **2014**, *9*, 280–289. [\[CrossRef\]](#)
23. Re, R.; Pellegrini, N.; Proteggente, A.; Pannala, A.; Yang, M.; Rice-Evans, C. Atividade antioxidante aplicando um ABTS melhorado ensaio de descoloração de cátions radicais. *Free Radic. Biol. Med.* **1999**, *26*, 1231–1237. [\[CrossRef\]](#)
24. Makkar, HPS Quantificação de taninos na folhagem das árvores; Manual de laboratório; FAO/AIEA: Viena, Áustria, 2000; 26p.
25. Silva, DJ; Queiroz, AC Análise de Alimentos: Métodos Químicos e Biológicos, 3ª ed.; UFV: Viçosa, Brasil, 2002.
26. AOAC. Métodos Oficiais de Análise, 16ª ed.; Método 973.18; Associação de Químicos Analíticos Oficiais: Arlington, VA, EUA, 1997.
27. Komarek, AR Um método aprimorado para usar sacos de poliéster para determinar o teor de fibras em forragens. *J. Anim Sci.* **1993**, *71* (Supl. 1), 220.
28. Senger, CCD; Kozloski, GV; Bonnacarrère Sanchez, LM; Mesquita, FR; Alves, TP; Castagnino, DS Avaliação de procedimentos de autoclave para análise de fibras em forragens e alimentos concentrados. *Anim. Feed Sci. Technol.* **2008**, *146*, 169–174. [\[CrossRef\]](#)
29. Mertens, DR; Allen, M.; Carmany, J.; Clegg, J.; Davidowicz, A.; Drouches, M.; Frank, K.; Gambin, D.; Garkie, M.; Gildemeister, B.; et al. Determinação gravimétrica de fibras detergentes neutras tratadas com amilase em rações com refluxo em béqueres ou cadinhos: estudo colaborativo. *J. AOAC Int.* **2002**, *85*, 1217–1240.
30. Bligh, EG; Dyer, WJ Um método rápido de extração e purificação de lipídios totais. *Can. J. Biochem. Physiol.* **1959**, *37*, 911–917. [\[Referência Cruzada\]](#) [\[PubMed\]](#)
31. Kaneco, JJ; Harvey, JW; Bruss, ML Bioquímica Clínica de Animais Domésticos, 5ª ed.; Acadêmico Cambridge: Davis, MA, EUA, 1997.
32. Militello, L.; El-Khoury, JM; Durant, TJS Considerando as diferenças entre soro e plasma: uma abordagem indireta para derivar intervalos de referência para proteína total, albumina e globulina. *Clin. Chim. Acta* **2024**, *562*, 119851. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
33. Jentzsch, AM; Bachmann, H.; Fürst, P.; Biesalski, HK Análise aprimorada de malondialdeído em fluidos corporais humanos. *Radicaes Livres. Biol. Med.* **1996**, *20*, 251–256. [\[RefCruz\]](#) [\[PubMed\]](#)
34. Ohkawa, H.; Ohishi, N.; Yagi, K. Ensaio para peróxidos lipídicos em tecidos animais por reação com ácido tiobarbitúrico. *Anal. Bioquímica.* **1978**, *95*, 351–358. [\[Referência Cruzada\]](#)
35. Halliwell, B.; Gutteridge, JMC Radicais livres em biologia e medicina; Oxford University Press: Oxford, Reino Unido, 2007.
36. Habig, WH; Pabst, MJ; Jakoby, WB Glutathione S-transferases. A primeira etapa enzimática na formação do ácido mercaptúrico. *J. Biol. Química.* **1974**, *249*, 7130–7139. [\[CrossRef\]](#)
37. Ellman, GL Grupos sulfidríla teciduais. *Arch. Biochem. Biophys.* **1959**, *82*, 70–77. [\[CrossRef\]](#)
38. McCord, JM; Fridovich, I. Superóxido dismutase: Uma função enzimática para a eritrocupreína (hemocupreína). *J. Biol. Chem.* **1969**, *244*, 6049–6055. [\[CrossRef\]](#)
39. Yamamoto, SM; Barbosa, JC; Silva, JF; Santos, LS; Oliveira, RA Inclusão de sementes de girassol na dieta de cordeiros na carcaça Características quantitativas e qualidade da carne. *Semina Ciênc. Agric.* **2013**, *34*, 1925–1934. [\[CrossRef\]](#)
40. Hartman, L.; Lago, RC Preparação rápida de ésteres metílicos de ácidos graxos a partir de lipídios. *Lab. Pract.* **1973**, *22*, 475–477. [\[PubMed\]](#)
41. Visentainer, JV; Franco, MRB Ácidos graxos em óleos e gorduras: identificação e quantificação; Varela: São Paulo, Brasil, 2006.
42. Silva, TH; Magnani, E.; de Andrade, JGP; Amâncio, BR; Meurer, GW; Reolon, HG; Benedeti, PDB; Paula, EM; Branco, RH Avaliação de níveis crescentes de tanino condensado extraído de *Acacia mearnsii* sobre o desempenho, características de carcaça, qualidade da carne, emissão de metano e saúde de touros Nelore em terminação. *Anim. Feed Sci. Technol.* **2024**, *315*, 116046. [\[CrossRef\]](#)
43. Nascimento, TVC; Oliveira, RL; Menezes, DR; de Lucena, ARF; Queiroz, MAÁ.; Lima, AGVO; Ribeiro, RDX; Bezerra, LR Efeitos de dietas com mistura de silagem de mandioca com taninos condensados sobre o comportamento alimentar, digestibilidade, balanço de nitrogênio, produção de leite e composição do leite em cabras leiteiras. *Animal* **2021**, *15*, 100015. [\[CrossRef\]](#)
44. Oliveira, LN; Pereira, MAN; Oliveira, CDS; Oliveira, CC; Silva, RB; Pereira, RAN; DeVries, TJ; Pereira, MN Efeito de baixas concentrações dietéticas de extrato de tanino de *Acacia mearnsii* na mastigação, fermentação ruminal, digestibilidade, partição de nitrogênio e desempenho de vacas leiteiras. *J. Dairy Sci.* **2023**, *106*, 3203–3216. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
45. Ibrahim, SL; Hassen, A. Efeito de taninos de mimosa (*Acacia mearnsii*) encapsulados e não encapsulados no desempenho de crescimento, na digestibilidade de nutrientes, no metano e na fermentação ruminal de cordeiros Merino da raça carneiro sul-africano. *Anim. Feed Sci. Technol.* **2022**, *294*, 115502. [\[CrossRef\]](#)
46. Pimentel, PRS; Pellegrini, CB; Lanna, DPD; Brant, LMS; Ribeiro, CVDM; Silva, TM; Barbosa, AM; da Silva Júnior, JM; Bezerra, LR; Oliveira, RL Efeitos do extrato de *Acacia mearnsii* como fonte de tanino condensado no desempenho animal, rendimento de carcaça e qualidade da carne de caprinos. **2021**, *271*, 114733. [\[CrossRef\]](#)
47. Patel, JR; Patil, SS; Pawar, MM; Gami, YM; Gupta, JP; Chauhan, HD; Raval, SH; Modi, CP Efeito da suplementação com óleo de girassol na produção, composição, perfil de ácidos graxos e metabólitos sanguíneos do leite de búfalos Mehsana. *Asian J. Dairy Food Res.* **2023**, *43*, 31. [\[CrossRef\]](#)

-
48. Makmur, M.; Zain, M.; Sholikin, M. M.; Suharlina Jayanegara, A. Efeitos moduladores dos taninos dietéticos em gorduras poliinsaturadas Bio-hidrogenação ácida no rúmen: uma meta-análise. *Heliyon* **2022**, *8*, e09828. [\[CrossRef\]](#)
49. Yang, Z.; Yang, K.; Zhang, X.; Yang, Q.; Zhang, Y.; Gao, J.; Qu, H.; Shi, J. Ácidos graxos saturados, monoinsaturados ou poli-insaturados na dieta e risco estimado de um primeiro evento cardiovascular grave em 10 anos. *Am. J. Med.* **2023**, *136*, 796–803.e2. [\[CrossRef\]](#)
50. Jacondino, LR; Poli, CHEC; Tontini, JF; Corrêa, GF; Somacal, S.; Mello, RO; Leal, MLR; Raimondo, RFS; Riet-Correa, B.; Muir, JP Suplementação com extrato de tanino de *Acacia mearnsii* e γ -tocoferol na dieta de cordeiros: Efeitos no desempenho de crescimento, peroxidação lipídica sérica e qualidade da carne. **2022**, *294*, 115483. [\[CrossRef\]](#)
51. Wood, JD; Richardson, RI; Nute, GR; Fisher, AV; Campo, MM; Kasapidou, E.; Sheard, PR; Enser, M. Efeitos dos ácidos graxos em Qualidade da carne: Uma revisão. *Meat Sci.* **2021**, *66*, 21–32. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
52. Departamento de Saúde. Relatório sobre saúde e assuntos sociais n.º 46. Em Aspectos Nutricionais das Doenças Cardiovasculares; HM Stationery Office: Richmond, Reino Unido, 1994.
53. Scollan, ND; Dewhurst, RJ; Moloney, AP Melhorando a qualidade dos produtos de pastagens. Em Pastagens: Um Recurso Global; Wageningen Academic: Wageningen, Holanda, 2005; pp. 41–56.
54. Banskalieva, V.; Sahl, T.; Goetsch, AL Composição de ácidos graxos dos músculos e depósitos de gordura da cabra: Uma revisão. *Small Rumin. Res.* **2000**, *37*, 255–268. [\[Referência Cruzada\]](#) [\[PubMed\]](#)
55. Wang, S.; Li, Z.; Ma, Y.; Liu, Y.; Lin, CC; Li, S.; Zhan, J.; Ho, CT Efeitos imunomoduladores dos polifenóis do chá verde. *Moléculas* **2021**, *26*, 3755. [\[Referência Cruzada\]](#)
56. Efraim, P.; Alves, AB; Jardim, D. Revisão: Polifenóis em cacau e implicações: Teores, fatores de variação e efeitos na saúde. *Braz. J. Tecnologia de Alimentos.* **2011**, *14*, 181–201. [\[CrossRef\]](#)
57. Cao, J.; Xu, H.; Yu, Y.; Xu, Z. Funções regulatórias de citocinas na imunidade mediada por linfócitos T e B em peixes teleósteos. *Dev. Comp. Immunol.* **2023**, *144*, 104621. [\[CrossRef\]](#)
58. Jiang, DX; Zhang, MH; Zhang, Q.; Chen, YS; Ma, WJ; Wu, WP; Mu, X.; Chen, W. Influência do ácido gálico na fosfodiesterase 4, IL-6, TNF- γ de neutrófilos suínos e no modelo de artrite em ratos. *J. Integr. Agric.* **2015**, *14*, 758–764. [\[CrossRef\]](#)
59. Esmaeili, S.; Hoseinirad, SM; Rajabian, M.; Taheri, AR; Berenji, F.; Hashemy, SI Avaliação do equilíbrio oxidante-antioxidante, isoprostano e PCR quantitativa em pacientes com leishmaniose cutânea. *Microb. Pathog.* **2019**, *137*, 103738. [\[CrossRef\]](#)
60. Mahindrakar, KV; Rathod, VK Extração aquosa assistida por ultrassom de catequina e ácido gálico do grão de *Syzygium cumini* e avaliação dos teores totais de fenólicos, flavonoides e atividade antioxidante. **2020**, *149*, 107841. [\[CrossRef\]](#)
61. Kearns, M.; Ponnampalam, EN; Jacquier, JC; Grasso, S.; Boland, TM; Sheridan, H.; Monahan, FJ Pastagens botanicamente diversas podem impactar positivamente a composição nutricional e antioxidante da carne de ruminantes? — Revisão convidada. *Meat Sci.* **2023**, *197*, 109055. [\[CrossRef\]](#)
62. Huang, Q.; Liu, X.; Zhao, G.; Hu, T.; Wang, Y. Potencial e desafios dos taninos como alternativa aos antibióticos na alimentação animal produção animal. *Anim. Nutrição.* **2018**, *4*, 137–150. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
63. Ogawa, S.; Yazaki, Y. Taninos de *Acacia mearnsii* De Wild. Casca: Determinação de taninos e atividades biológicas. *Molecules* **2018**, *23*, 837. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
64. Molosse, VL; Deolindo, GL; Cécere, BG; Marcon, H.; da Rosa, G.; Vedovatto, M.; Zotti, CA; Silva, AD; Fracasso, M.; Morsch, VM; et al. Efeito da suplementação dietética com farinha de resíduo de uva sobre o ganho de peso, perfil metabólico, leucograma, proteinograma e resposta antioxidante em cordeiros lactentes. **2021**, *139*, 112–120. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

Aviso Legal/Nota do Editor: As declarações, opiniões e dados contidos em todas as publicações são de responsabilidade exclusiva do (s) autor(es) e colaborador(es) individual(ais) e não da MDPI e/ou do(s) editor(es). A MDPI e/ou o(s) editor(es) isentam-se de responsabilidade por quaisquer danos a pessoas ou propriedades resultantes de quaisquer ideias, métodos, instruções ou produtos mencionados no conteúdo.

18. Artigo 8 Traduzido

Recebido: 12 de julho de 2020 | Revisado: 21 de agosto de 2020 | Aceito: 31 de agosto de 2020

DOI: 10.1111/are.14902

ARTIGO ORIGINAL



WILEY

Efeitos da adição de óleo de açaí em dietas para tilápias sobre o desempenho, enzimas do metabolismo energético hepático e respostas antioxidantes

Tânia C. Leite¹ | Fernanda Picoli² | Diogo de A. Lopes^{1,2} | Matheus D. Baldissera³ | Carine F. Souza³ | Bernardo Baldisserotto³ | Ana Paula O. Costa¹ | Luísa Nora¹ | Alexandre H. Marcelino¹ | Aleksandro S. Da Silva^{1,2}

¹Departamento de Ciência Animal, Estado Universidade de Santa Catarina (UDESC), Chapecó, Brasil

²Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, UDESC, Chapecó, Brasil

³Programa de Farmacologia da Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Brasil

Correspondência

Aleksandro S. Da Silva, Departamento de Zootecnia, Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC), Chapecó, Brasil.
E-mail: aleksandro.silva@udesc.br

Resumo

O objetivo do presente estudo foi determinar se o óleo de açaí (*Euterpe oleraceae*) adição nas dietas de juvenis de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) em sistema de bioflocos estimularia o metabolismo energético hepático e as respostas antioxidantes. Tratamentos são os seguintes: T0 (6%-óleo de soja), T1 (1%-AÇAÍ; 5%-SOJA), T3 (3%-AÇAÍ; 3%-SOJA) e T6 (6%-AÇAÍ). No fígado, os níveis de espécies reativas de oxigênio foram significativamente menores em T1, T3 e T6 do que em T0, os níveis de peroxidação lipídica foram significativamente menores em T3 e T6 do que em T0. Os níveis de T6 e óxido nítrico foram significativamente menores no T6 do que no T0. Glutathione A atividade da peroxidase foi significativamente maior em T3 e T6 do que em T0, enquanto sua atividade da peróxido dismutase e os níveis de capacidade antioxidante total foram significativamente maior no T6 do que no T0. A atividade da adenilato quinase foi significativamente menor no T6 do que em T0. Esses resultados sugerem que a adição de óleo de açaí na dieta de tilápia do Nilo estimula respostas antioxidantes tardias.

PALAVRAS-CHAVE

Açaí, poder antioxidante, bioquímica, desempenho

1 | INTRODUÇÃO

Os antioxidantes são responsáveis por inibir ou reduzir os danos causados por reações oxidativas, reduzindo consequentemente os níveis de radicais, um efeito biológico desejável (Bianchi & Antunes, 1999); em concentrações elevadas, prejudicam a saúde e o crescimento dos animais. Primeiro, os antioxidantes impedem a formação de radicais livres; posteriormente, eles reparar danos às moléculas de DNA e reconstituir as membranas danificadas. Antioxidantes como carotenoides e flavonoides podem ser observados obtidos através da própria dieta, assim como as vitaminas C, E e A (Erdogan & Arslan, 2019; Qiang et al., 2019). Além disso, evidências recentes têm sugerido a melhora da adenilato quinase (AK) e piruvato quinase (PK) como vias importantes ligadas ao aumento de crescimento de peixes, conforme observado por Baldissera et al. (2019) para tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) alimentam-se com biocolina. Essas duas enzimas desenvolver um papel fundamental na transferência e distribuição de energia, bem como

garantindo a homeostase entre o trifosfato de adenosina celular (ATP) consumo e produção (Dzeja & Terzic, 2003). A PK é uma enzima irreversível da via da glicólise que forma piruvato e ATP, exercendo um papel essencial na produção de energia nos tecidos com necessidades energéticas elevadas, como o fígado (Wang et al., 2002). Além disso, AK é reconhecido como um facilitador da comunicação energética entre o núcleo e o citosol através da transferência reversível do grupo γ-fosfato para monofosfato de adenosina (AMP) e consequente liberação de duas moléculas de difosfato de adenosina (ADP) (Dzeja & Terzic, 2009).

Por estas razões, aditivos ou ingredientes com propriedades antioxidantes propriedades são recomendadas para prevenir os efeitos negativos da oxidação desequilíbrio em peixes (Baldissera et al., 2019). O fígado dos peixes tem importante funções fisiológicas relacionadas à digestibilidade dos peixes, seja em termos de desintoxicação ou em termos de biotransformação; simultaneamente, é importante mencionar que o tecido hepático se adapta às condições ambientais

condições através de ajustes contínuos de sua estrutura, assistência- o processo de metabolismo de nutrientes, armazenamento e eliminação de energia de componentes nitrogenados (Segner, 1998). Para reduzir a sobrecarga hepática, produtos à base de plantas, como suplementos antioxidantes, têm sido explorados, incluindo a biocolina (Baldissera et al., 2019). De acordo para Bianchi e Antunes (1999), os antioxidantes são responsáveis por inibindo ou reduzindo os danos causados pelos radicais livres. Primeiro, Os antioxidantes impedem a formação de radicais livres; posteriormente, eles reparar danos às moléculas de DNA, bem como reconstituir as moléculas danificadas membranas.

O óleo de açaí (*Euterpe oleraceae*) pode ser uma opção para melhorar a saúde sistemas antioxidantes e metabólicos (porque a fruta e/ ou seus subprodutos possuem perfis ricos em ácidos graxos; Do Nascimento, 2008). De acordo com a literatura, o açaí possui propriedades monoinsaturadas ácidos graxos poliinsaturados e classificados que são desejáveis para consumo e estão associados à redução do risco de doenças cardiovasculares doenças em humanos (Do Nascimento, 2008). Segundo Rogez (2000), o óleo de açaí é semelhante ao abacate e ao azeite de oliva, pois contém contém ácidos graxos benéficos. O óleo de açaí também é rico em antocianinas responsável por dar cor à fruta. Também modula a regulação lipídica metabolismo, minimizando os danos causados pelo estresse oxidativo no um modelo de rato (Cedrim et al., 2018). Um estudo recente conduzido por Dos Santos et al. (2019) demonstraram que a adição de açaí óleo na dieta de ovelhas leiteiras aumentou a produção de leite, bem como a níveis de compostos antioxidantes no leite, representando uma possível efeito positivo para o consumidor humano. Um estudo usando cravo e manjerição e óleo de gengibre como suplemento à dieta da tilápia mostrou que 0,5% favoreceu o crescimento e o ganho de peso. A suplementação com ambos os óleos respostas imunológicas melhoradas contra patógenos presentes nos peixes fazendas (Fig. ueiredo, 2017).

Devido aos custos de alimentação poderem atingir 70% de todas as despesas numa piscicultura, tornando a alimentação a parte mais dispendiosa do sistema de produção tema (Dossou et al., 2018, 2019). No entanto, o equilíbrio de alta qualidade alimentos como óleo de açaí fornecidos em quantidades adequadas contribuem para alta pro-taxas de ductividade, auxiliando na digestibilidade que ajuda a reduzir o eflu-efluentes lançados no meio ambiente. Portanto, o objetivo deste estudo teve como objetivo verificar se a adição de óleo de açaí na dieta de Os juvenis de tilápia do Nilo estimulariam o metabolismo energético hepático e respostas antioxidantes.

2 | MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 | Óleo de açaí

Os óleos de açaí e de soja foram obtidos de empresas comerciais (óleo de açaí – Óleos Gran®, São Paulo, SP, Brasil; óleo de soja – Bunge Alimentos, Rondonópolis, MT, Brasil respectivamente). Composto de ácidos graxos dados de posição presentes no óleo de açaí foram apresentados por Dos Santos et al. (2019), observando a presença de ácido palmítico (11,3%), ácido esteárico ácido (1,81%), ácido oleico (37,4%), ácido linoleico (44,6%) e linolênico ácido (3,45%). No óleo de soja, esses ácidos graxos foram encontrados presente nas seguintes proporções: ácido palmítico (14,6%), ácido esteárico

ácido (3,0%), ácido oleico (30,3%), ácido linoleico (45,5%) e ácido linolênico ácido (5,33%).

2.2 | Produção e manutenção de bioflocos

Cada unidade experimental recebeu um inóculo inicial de bioflocos (10 L) de culturas anteriores de tilápia do Nilo em um sistema de bioflocos. Sem cloro água foi então adicionada até um volume utilizável de 70 L. Para manter o bio-comunidade microbiana de flocos e condições de cultivo adequadas, uma A relação C:N de 15:1 (Emerenciano et al., 2017) foi mantida usando melaço de pó de cana-de-açúcar como fonte externa de carbono.

2.3 | Monitoramento da qualidade da água

Parâmetros de qualidade da água como temperatura e oxigênio dissolvido (oxímetro ALFAKIT®, modelo AT170, Florianópolis-SC, Brasil) foram monitorados duas vezes ao dia (08:00 e 17:00 horas). pH (pHmetro ALFAKIT®, modelo AT315, Florianópolis-SC, Brasil) e amônia total (fotocolorímetro ALFAKIT®, modelo AT100P, Florianópolis-SC, Foram utilizados os níveis (Brasil) em cada unidade experimental.

O pH em vários momentos do experimento e verificado variação de 5,4 a 6,9 (T0 e T1), 5,4 a 7,1 (T3 e T6).

A amônia em vários momentos do experimento e verificação verificada de 0,1 a 1,5 (T0), 0,1 a 1,3 (T1), 0,2 a 1,5 (T3), 0,2 para 1,2 mg/L (T6).

Os parâmetros da temperatura da água flutuaram ao longo do dia, com média de $24,8 \pm 6,47^{\circ}\text{C}$ pela manhã e $27,7 \pm 4,38^{\circ}\text{C}$ à tarde. Em geral, a temperatura da água oscilou em todos os tratamentos entre 18 e $29,6^{\circ}\text{C}$.

O oxigênio dissolvido médio foi de $8,08 \pm 2,09$ mg/L pela manhã e $5,98 \pm 2,75$ mg/L à tarde. Em geral, o nível de oxigênio na água dissolvido flutuou em todos os tratamentos entre 4,2 e 9,4 mg/L.

Todos os resultados dos parâmetros de qualidade da água do bioflocos o cultivo está de acordo com os valores adequados para a tilápia (El-Sayed, 2006).

2.4 | Peixe

A tilápia-do-nilo juvenil (*Oreochromis niloticus*) foi obtida de um piscicultura comercial; peso inicial médio era de 35 g. Antes da No início do experimento, esses animais foram mantidos por 14 dias em um pol-caixa circular de etileno (volume útil: 350 L) com aeração constante e controle de temperatura ($\sim 28^{\circ}\text{C}$). Durante este período, a manutenção ração (32% de proteína bruta) foi fornecida três vezes ao dia.

Posteriormente, os juvenis foram alocados em circuitos de polietileno caixas circulares (volume útil: 70 L) com aeração individual por meio de pedra porosa (1×2 cm) acoplada a um compressor de ar radial (ASTEN® modelo CRC—2330 11 SS, 0,80 kW, 1,10 cv, monofásico, 50/60 Hz, 4,1 A, 2,75 m³ /min, São Paulo/SP, Brasil) por um período experimental de 31 dias. Cada unidade continha um aquecedor controlado por termostato (Roxin Ht-1300,

TABELA 1 Composição química dos alimentos utilizados no experimento por tratamento

Analisar	T0	T1	T3	T6
Matéria seca, %	93,17	92,98	93,14	93,24
Proteína bruta, % 26,49		26,74	26,99	27,08
Gordura bruta, %	8.19	8.02	8.27	8.11
Cinzas, %	18,79	18.07	18.41	18,65

Nota: 1: Ingredientes: umidade (máx.) 100,00 g/kg; proteína bruta (mín.) 240,00 g/kg. Extrato etéreo (mín.) 40,00 g/kg; fibra bruta (máx.) 100,00 g/kg. Matéria mineral (máx.) 140,00 g/kg; cálcio (mín.) 10,00 g/kg.
kg; cálcio (máx.) 30,00 g/kg; fósforo (mín.) 10,00 g/kg; sódio (mín.) 3.000,00 mg/kg; ferro (mín.) 30,00 mg/kg; cobre (mín.) 5,00 mg/kg; manganês (mín.) 30,00 mg/kg; zinco (mín.) 60,00 mg/kg; iodo (mín.) 1,00 mg/kg; cobalto (mín.) 0,10 mg/kg; selênio (mín.) 0,30 mg/kg; vitamina A (mín.) 12.000,00 UI/kg; vitamina D3 (mín.) 2.400,00 UI/kg; vitamina E (mín.) 50,00 UI/kg; vitamina K3 (mín.) 5,00 mg/kg; vitamina B1 (mín.) 10,00 mg/kg; vitamina B2 (mín.) 20,00 mg/kg; niacina (mín.) 100,00 mg/kg; ácido pantotênico (mín.) 50,00 mg/kg; vitamina B6 (mín.) 10,00 mg/kg; ácido fólico (mín.) 4,00 mg/kg; biotina (mín.) 0,20 mg/kg; vitamina B12 (mín.) 40,00 mcg/kg; vitamina C (mín.) 150,00 mg/kg.
Nota 2: Tratamentos: T0 (inclusão de 6% de óleo de soja, sem adição de óleo de açaí); T1 (1% açaí; 5% soja); T3 (3% açaí; 3% soja); T6 (inclusão de 6% de óleo de açaí, sem adição de óleo de soja).

100 W, 220 V) para manter a temperatura do meio de cultura em ~28°C durante todo o experimento.

2.5 | Desenho experimental e dietas

Os juvenis foram mantidos em quatro tanques experimentais e alojados em 10 peixes por tanque. Como o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do consumo de óleo de açaí no metabolismo energético e estado oxidativo, cada peixe foi considerado uma unidade experimental. A ração utilizada foi de marca comercial (Nutripiscis® Engorda; 24% CP), moído com adição de óleo de açaí e/ou óleo de soja (isoproteico e dietas isoenergéticas), sendo: tratamento T0 (inclusão de 6% de óleo de soja, sem adição de óleo de açaí); T1 (1% açaí; 5% soja); T3 (3% açaí; 3% soja); T6 (inclusão de 6% de óleo de açaí, sem óleo de soja adicionado). Os óleos usados neste estudo apresentaram valores energéticos semelhantes

TABELA 2 Peso corporal e tamanho de tilápias alimentadas com dietas contendo vários níveis de óleo de açaí

Variável	Momento	T0	T1	T3	T6	p-Valor
Peso (g)	Inicial	35,3 ± 2,4	35,8 ± 2,5	35,6 ± 2,8	35,2 ± 2,4	.96
	Final	62,4 ± 3,1	60,5 ± 8,3	55,6 ± 7,5	59,7 ± 7,7	.35
Comprimento total (cm)	Inicial	12,9 ± 0,4	12,9 ± 0,4	12,8 ± 0,4	12,8 ± 0,5	.97
	Final	17,7 ± 0,4	17,7 ± 0,6	17,2 ± 0,8	17,4 ± 0,5	.86
Parcial comprimento (cm)	Inicial	10,2 ± 0,3	10,4 ± 0,5	10,3 ± 0,5	10,3 ± 0,4	.98
	Final	15,8 ± 0,4	15,0 ± 0,6	15,5 ± 0,6	15,4 ± 0,5	.87

Nota: 1: Não houve diferença entre os tratamentos (T0, T1, T3 e T6).
Nota 2: tratamentos—T0 (inclusão de 6% de óleo de soja, sem adição de óleo de açaí); T1 (1% açaí; 5% soja); T3 (3% açaí; 3% soja); T6 (inclusão de 6% de óleo de açaí, sem adição de óleo de soja).

(108 kcal), de acordo com a análise garantida pelo fabricante, real-
filho por que o óleo de soja foi escolhido como ingrediente no grupo de controle.
Após a adição dos óleos, a ração foi homogeneizada e destilada
água foi adicionada para fornecer consistência e permitir a peletização (2–3-
partículas de mm). Usando biometria, calculamos o teor de óleo como
6% da biomassa por tanque por dia.
As análises bromatológicas foram realizadas seguindo os protocolos
estabelecido pelo Compêndio Brasileiro de Alimentação Animal (2005). O
os resultados são apresentados na Tabela 1.

2.6 | Coleta de dados e amostras

No início do experimento foi realizada a biometria inicial
com a pesagem e medição do comprimento total e padrão de
os peixes. Todos os peixes foram capturados e sedados com eugenol (1 mL/L).
A pesagem foi realizada em balança de precisão de 0,01 g (modelo Mars).
ML 600, São Paulo, Brasil). Para medir o comprimento, foi utilizado um cristal poli-
régua de estireno foi utilizada. O desempenho zootécnico não foi ob-
objetivo deste estudo; no entanto, esses dados adicionais foram acrescentados
para o conjunto de dados.
Após o término do experimento, os peixes permaneceram em jejum por
12 horas para coleta de dados biométricos finais (peso e comprimento finais) e fígado
coleta. Os peixes (n = 10 por tratamento) foram anestesiados com eu-
genol (1 mL/L) e eutanasiado por secção medular utilizando me-
métodos aprovados pelo Conselho Nacional de Experimentação Animal
Controle (CONCEA), com dez peixes por tratamento sendo utilizados para fígado
colecção.

2.7 | Estado oxidante e antioxidante hepático

Os fígados foram homogeneizados (1:10 p/v) em meio contendo 120 mM
cloreto de potássio e fósforo tampão 30 mM (pH 7,4) e cent-
trifugado (800 × g, 10 min, 4°C). As frações do sobrenadante foram
congelado a -20°C. As concentrações de proteína foram determinadas pela
Método do azul de Coomassie seguindo a metodologia descrita
por Read e Northcote (1981) usando albumina de soro bovino como
padrão.

A produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) foi medida pela determinação da oxidação de 2',7'-diclorofluoresceína (DCFH) (LeBel et al., 1992) DCFH-DA é hidrolisado por esterases intracelulares para formar DCF não fluorescente, que é então rapidamente oxidado para formar DCF altamente fluorescente na presença de ROS. Fluorescência de DCF a intensidade está correlacionada com a quantidade de ROS formada. A fluorescência foi medido usando comprimentos de onda de excitação e emissão de 480 e 535 nm, respectivamente. Uma curva de calibração foi gerada usando DCF padrões (0,1–1 μ M) e os dados foram expressos como micromoles de DCF formados por mg de proteína.

Os níveis de peroxidação lipídica (LPO) foram medidos usando he- amostras de água diluídas em metanol frio (1:1 v/v) e centrifugadas a 1.000 $\times$ g por 10 min a 4 °C. Esta técnica é baseada na reação de hidroperóxidos com Fe²⁺ (FeSO₄) em meio ácido (H₂SO₄) na presença do corante laranja de xilenol, conforme proposto por Monserrat et al. (2003) e relatado detalhadamente por da Silva et al. (2018). O LPO hepático foi medido nos sobrenadantes utilizando um leitor de microplacas a 550 nm, com hidroperóxido de cumeno como padrão.

Os níveis de NOx foram medidos de acordo com o método de Griess que quantifica indiretamente (400 nm) os níveis de nitrito/nitrato usando Amostra de 50 μ L, conforme descrito anteriormente em detalhes por Tatsch et al. (2011). Os resultados foram expressos como U/L.

A atividade da superóxido dismutase (SOD) foi determinada de acordo com o princípio de auto-oxidação do pirogalol, inibido no presença de SOD. A mudança na densidade óptica foi determinada cinética- icamente por dois minutos a 420 nm, em intervalos de dez segundos, de acordo à metodologia descrita por Beutler (1984). A atividade foi expressa como U/mg de proteína.

A atividade da glutatona S-transferase (GST) foi medida segundo Mannervik e Guthenberg (1981) com ligeiras modificações cátiões. A atividade da GST foi medida pela taxa de formação de dini- trofenil-S-glutaciona a 340 nm em meio contendo 50 mM fosfato de potássio, pH 6,5, 1 mM GSH, 1 mM 1-cloro-2,4-dini- trobenzeno (CDNB) como substrato e sobrenadantes de tecido (aprox. aproximadamente 0,045 mg de proteína). Os resultados foram expressos em U/mg proteína.

A atividade da glutatona peroxidase (GPx) foi medida usando terc-butilhidroperóxido como substrato (Wendel, 1981). A atividade enzimática foi determinada pelo monitoramento da distribuição do NADPH aparência a 340 nm em um meio contendo 100 mM de potássio tampão fosfato/1 mM EDTA, pH 7,7, 2 mM GSH, 0,1 U/mL GR, 0,4 mM de azida, 0,5 mM de hidroperóxido de terc-butila, 0,1 mM de NADPH e sobrenadantes de tecido. Os resultados foram expressos em U/mg proteína.

Capacidade antioxidante contra radicais peroxila (ACAP) no fígado amostras foi feito. Este método fluorométrico é baseado na decomposição térmica (37 ° C) de ABAP (2,2'-azobis (2-metilpropionami- dicloridrato de dine) que gera radicais peroxila, conforme estabelecido por Amado et al. (2009) e relatado em detalhes por da Silva et al. (2018). O soro foi usado para detectar fluorescência usando comprimentos de onda de 485 nm (excitação) e 520 nm (emissão) por 40 min a 37°C. Os resultados foram expressas como fluorescência U/mg de proteína.

2.8 | Análise de enzimas do metabolismo energético hepático

Para avaliar enzimas pertencentes à rede de transferência de fosforil- trabalho, 100 mg de fígado foram lavados em tampão SET (sacarose 0,32 M, 1 mM EGTA, 10 mM Tris-HCl, pH 7,4) e homogeneizado (1:10 p/v) no mesmo tampão SET com um homogeneizador de vidro Potter-Elvehjem Os homogeneizados foram centrifugados a 800 $\times$ g por 10 min a 4°C. Alguns desses sobrenadantes foram usados para avaliar AK

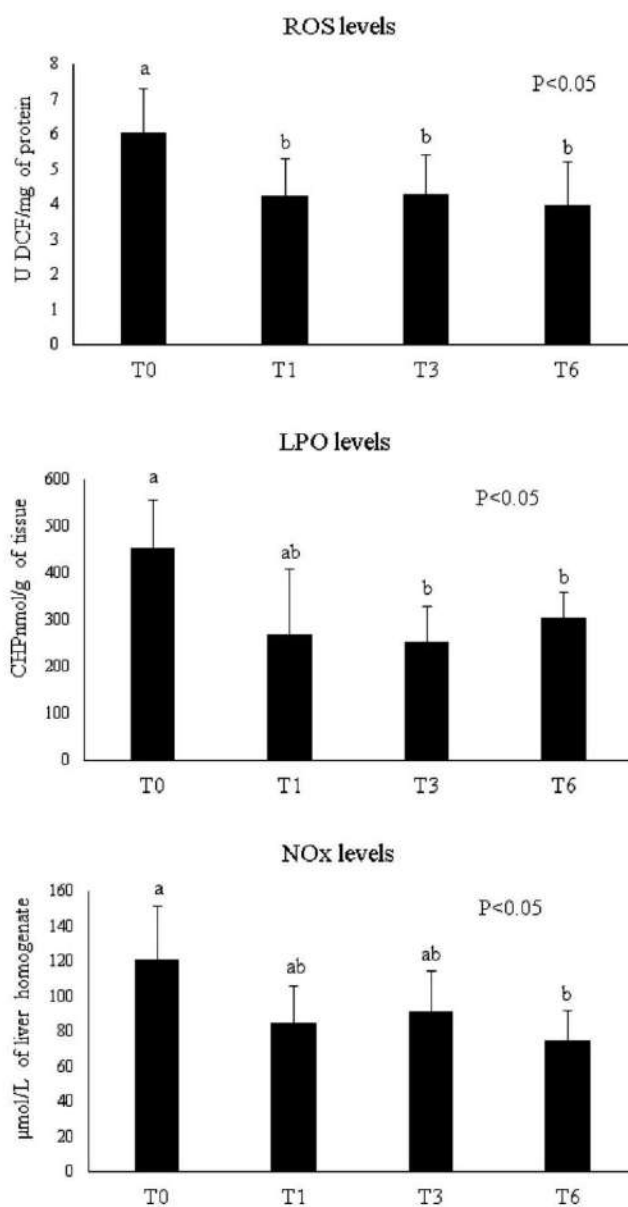


FIGURA 1 Níveis de espécies reativas de oxigênio (ERO), lipoperoxidação (LPO) e nitrito/nitrato (NOx) no fígado de tilápias alimentadas com uma dieta contendo diferentes níveis de óleo de açaí. Nota: *tratamentos — T0 (inclusão de 6% de óleo de soja, sem adição de óleo de açaí); T1 (1% de açaí; 5% de soja); T3 (3% de açaí; 3% de soja); T6 (inclusão de 6% de óleo de açaí, sem adição de óleo de soja); **letras diferentes (a ou diferença ($p \leq 0,05$) entre os tratamentos ^b) abaixo da barra/tratamento no gráfico ilustra estatística (T0, T1, T3 e T6)

atividade; os pellets foram descartados e os sobrenadantes foram centrifugado novamente a $10.000 \times g$ por 15 min a 4°C . O supernatantes contendo citosol foram coletados para determinação de PK.

A atividade da piruvato quinase hepática (PK) foi avaliada de acordo com o protocolo estabelecido por Leong et al. (1981) e publicado em decauda por Baldissera et al. (2017). A atividade foi expressa como pmol piruvato formado/min/mg proteína.

A atividade da adenilato quinase hepática (AK) foi medida com um ensaio enzimático com hexoquinase (HK) e glicose 6-fosfato desidrogenase (G6PD), segundo Dzeja et al. (1999), e detalhadamente por Baldissera et al. (2017). A atividade foi expressa em nmol ATP formado/min/mg proteína.

2.9 | Análise estatística

Os dados não apresentaram distribuição normal, portanto, os dados foram transformados em logaritmo para normalização. Em seguida, os dados foram submetidos à análise de variância unidirecional e, quando significativas foram obtidas, o teste de Tukey a 5% de probabilidade ($p < 0,05$). Os resultados foram expressos como média e padrão desvio de direção.

3 | RESULTADOS

3.1 | Peso e tamanho corporal

Não houve diferenças significativas em relação a todos os parâmetros no início e no final do experimento (Tabela 2).

3.2 | Estado oxidante e antioxidante hepático

Os níveis de ROS hepáticos foram significativamente menores nos tratamentos T1, T3 e T6 do que em T0 (Figura 1a). Da mesma forma, os níveis de TPO no fígado nos tratamentos T3 e T6 foram significativamente menores que os de T0 ($p < 0,05$; Figura 1b). Finalmente, os níveis de NOx do tratamento T6 foram significativamente menores do que aqueles do tratamento de controle ($p < 0,05$; Figura 1c).

Quando o óleo de açaí foi adicionado às dietas de tilápia, houve elevação da a-Respostas antioxidantes (Figura 2). Atividade da GPx nos tratamentos T3 e T6 os tratamentos foram significativamente maiores que os do controle ($p < 0,05$; Figura 2a). Os níveis de atividade de GST não diferiram significativamente entre tratamentos ($p > 0,05$; Figura 2b). A atividade da SOD foi significativamente maior no tratamento T6 do que no controle ($p < 0,05$; Figura 2c). Assim como os níveis de ACAP eles, eles foram significativamente maiores no tratamento T6 do que no controle ($p < 0,05$; Figura 2d).

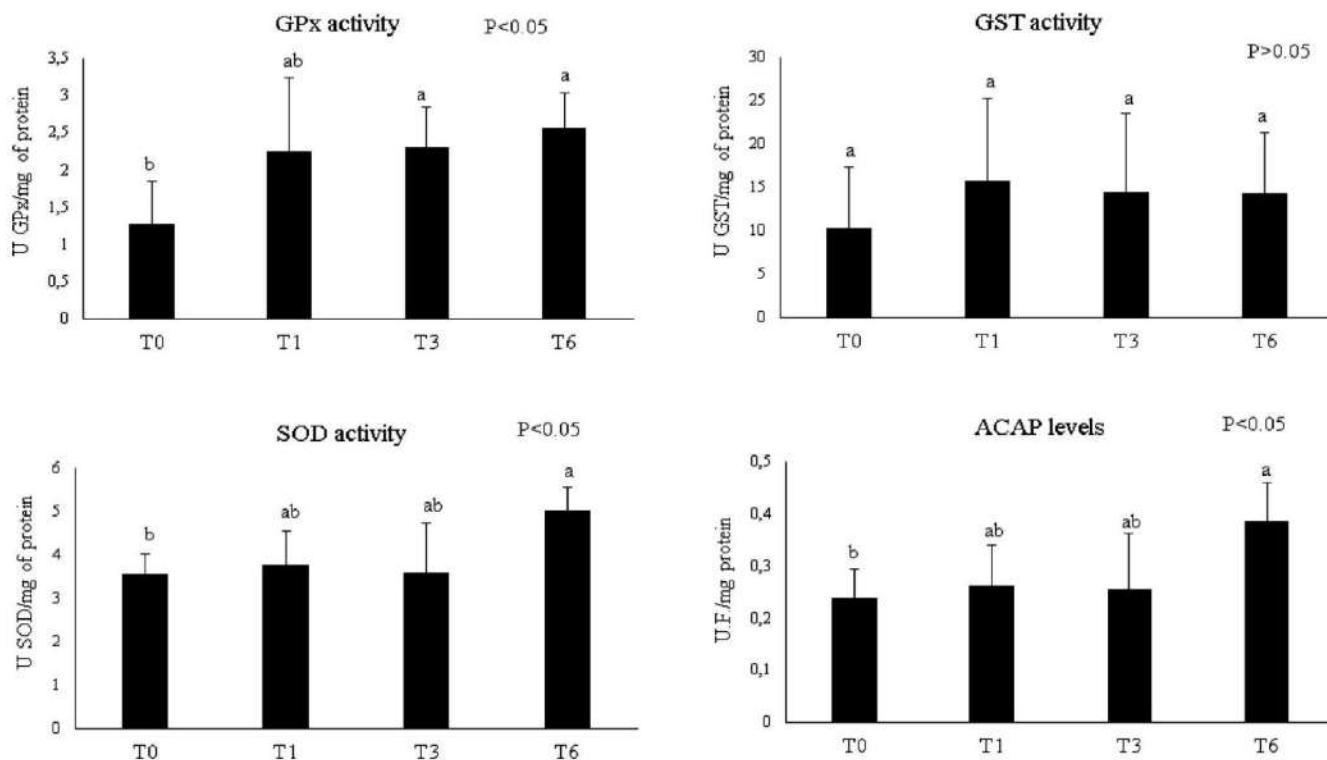


FIGURA 2 Atividade da glutathione peroxidase (GPx), glutathione S-transferase (GST), superóxido dismutase (SOD) e capacidade antioxidante total (ACAP) no fígado de tilápias alimentadas com dieta contendo diferentes níveis de óleo de açaí. Nota: *tratamentos — T0 (inclusão de 6% de óleo de soja, sem adição de óleo de açaí); T1 (1% de açaí; 5% de soja); T3 (3% de açaí; 3% de soja); T6 (inclusão de 6% de óleo de açaí, sem adição de óleo de soja); **letras diferentes (a ou

b) abaixo da barra/tratamento no gráfico ilustram a diferença estatística ($p < 0,05$) entre os tratamentos (T0, T1, T3 e T6)

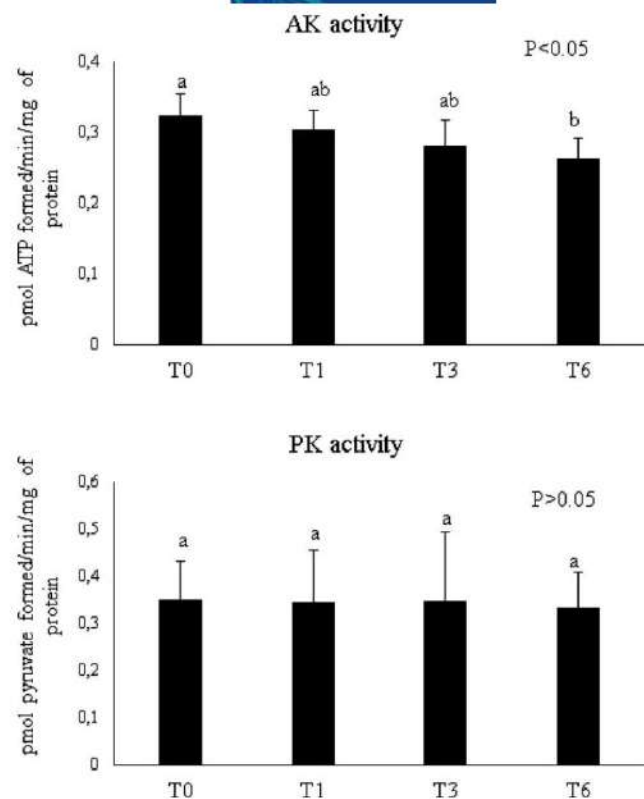


FIGURA 3 Atividade da adenilato quinase (AK) e da piruvato quinase (PK) no fígado de tilápias alimentadas com dieta contendo diferentes níveis de óleo de açaí. Nota: tratamentos — T0 (inclusão de 6% de óleo de soja, sem adição de óleo de açaí); T1 (1% de açaí; 5% de soja); T3 (3% de açaí; 3% de soja); T6 (inclusão de 6% de óleo de açaí, sem adição de óleo de soja); **letras diferentes (a ou ilustram a diferença estatística ($p < 0,05$) entre os ^a sob a barra/tratamento no gráfico tratamentos (T0, T1, T3 e T6)

3.3 | Metabolismo energético enzimático hepático

Os resultados da atividade enzimática hepática relacionada ao metabolismo energético na tilápia são mostrados na Figura 3. A atividade de AK foi significativamente menor nos fígados de tilápia que tiveram a inclusão de 6% de óleo de açaí na dieta (T6) em comparação com o controle ($p < 0,05$; Figura 3a). Para Atividade PK, não houve diferença significativa entre os tratamentos ($p > 0,05$; Figura 3b).

4 | DISCUSSÃO

São necessárias condições ambientais favoráveis para uma produção eficiente e produção satisfatória de peixes. Estes incluem temperatura, oxigênio e pH da água, além de uma alimentação balanceada e de qualidade. Produtos de origem vegetal Os produtos podem melhorar a produção e aumentar a aceitação do produto em produção comercial de peixes. No presente estudo, foi utilizado óleo de açaí devido às suas propriedades antioxidantes, de modo a reduzir os radicais livres e peroxidação lipídica, ambos os quais afetam negativamente o crescimento dos peixes e saúde dos peixes devido ao prejuízo do sistema antioxidante (Baldiessa e outros, 2020).

Devido aos resultados positivos que encontramos para o antioxidante hepático sistema dant, realizaremos estudos no futuro visando avaliar desempenho em outros animais, porque essa pesquisa já relataram eficiência produtiva ao utilizar subprodutos do açaí. Por exemplo ampla, a farinha de açaí na alimentação de galinhas poedeiras melhora a saúde das aves e produziu maior produção e qualidade de ovos (Fortuoso et al., 2019). Dos Santos et al. (2019) relataram que a adição de óleo de açaí à dietas de ovelhas leiteiras aumentaram a produção de leite e a eficiência da produção taxas.

No presente estudo, para todos os tratamentos testados, o óleo de açaí dietético níveis reduzidos de ROS; isso pode estar associado ao aumento de an-defesas antioxidantes em peixes mediadas por antioxidantes que ativam vias enzimáticas ou não enzimáticas (Maritim et al., 2003). Uma A possível explicação para os baixos níveis de ROS é o alto nível de antioxid-capacidade dant; no entanto, a diferença foi observada significativamente apenas em T6. Essa redução de radicais livres também pode ser explicada por a ação das antocianinas que por sua vez são responsáveis por causar redução ou mesmo inibição desses agentes que danificam as células (Gallori et al., 2004). Além das antocianinas, o óleo de açaí também contém flavonoides que possuem propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e antibacterianas propriedades. Os mecanismos antioxidantes dos flavonoides auxiliam na extinção ou eliminação de radicais livres, bem como inibição da formação de enzimas que geram espécies reativas de oxigênio (Kang et al., 2011; Packer & Luz, 2007). Os níveis de LPO também foram menores no grupo tratamentos que continham os maiores teores de óleo de açaí (T3 e T6), conforme observado por Fortuoso et al. (2019) em gemas de ovos de galinhas poedeiras suplementado com farinha de açaí. Segundo Bezerra et al. (2016), ácidos graxos poliinsaturados e monoinsaturados protegem as células e melhorar a saúde animal, assim como os ácidos graxos presentes no açaí que melhorar a saúde animal através de seus efeitos antiinflamatórios e antioxidantes propriedades. O maior nível de óleo de açaí (6%) reduziu os níveis de NOx, um importante radical livre que tem efeitos deletérios em excesso quantidades (Dusse et al., 2003). Devido ao seu potente efeito antioxidante efeitos, o óleo de açaí reduziu os níveis de NOx, possivelmente contribuindo para a redução processos inflamatórios e danos nos tecidos (Udani et al., 2011). A atividade da GPx foi elevada nos tratamentos com níveis mais elevados de açaí óleo. No presente estudo, a atividade da superóxido dismutase (SOD) foi elevado em níveis mais elevados de óleo. Quando a dieta de ratas fêmeas foi suplementada complementado com açaí, houve redução na atividade da SOD, semelhante à dieta padrão. Os autores sugeriram, portanto, que a componentes presentes na polpa do açaí auxiliam na prevenção dos radicais livres formação (Souza, 2009).

A atividade do AK foi menor nos peixes tratados com 6% de óleo de açaí; isso pode ser considerado um efeito negativo da suplementação, porque esta enzima duplica a produção de ATP em condições de estresse energético (Wang et al., 2002). A AK exerce seu papel na manutenção da bioenergética equilíbrio pela reconversão de duas moléculas de ADP em uma de ATP e uma monofosfato de adenosina (AMP), duplicando efetivamente a energia potencial, um passo crucial para melhorar a comunicação energética intracelular comunicação e monitoramento metabólico em tecidos com alta e flutuante-demandas energéticas, como é o caso do fígado (Dzeja & Terzic, 2009). Portanto, a inibição do AK impede a duplicação do potencial energético, possivelmente explicando a ausência de ganho de peso; no entanto, a

mecanismo permanece desconhecido. Neste estudo, não houve diferença significativa foi observado em relação à atividade farmacocinética hepática, em concordância com o observado por Mathias et al. (2019) no coração de ratos que receberam uma dieta suplementada com 5% de polpa de açaí. Segundo esses autores, a exata mecanismo para ausência de efeitos permanece desconhecido, mas parece ligada a um efeito dependente da dose.

5 | CONCLUSÃO

O óleo de açaí na dieta de tilápias estimulou respostas antioxidantes e consequente redução frequente na peroxidação lipídica, bem como na formação de radicais livres no fígado. No entanto, o óleo de açaí teve um impacto negativo no fígado metabolismo por meio da inibição de uma enzima chave associada ao ATP síntese.

RECONHECIMENTO

Os autores agradecem à CAPES e ao CNPq pelo financiamento apoio: bolsa de estudos e pesquisa (PQ).

CONFLITO DE INTERESSES

Os autores declararam não haver conflito de interesses.

APROVAÇÃO ÉTICA

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Uso de Animais (CEUA) para pesquisa na Universidade Estadual de Santa Catarina, protocolo número da coluna 2894161018.

ORCIDA

Fernanda Picoli  <https://orcid.org/0000-0003-1631-9430>
 Matheus D. Baldissera  <https://orcid.org/0000-0002-3280-8528>
 Carine F. Souza  <https://orcid.org/0000-0001-9978-0454>
 Bernardo Baldisserotto  <https://orcid.org/0000-0002-8770-0100>
 Aleksandro S. Da Silva  <https://orcid.org/0000-0002-9860-1933>

REFERÊNCIAS

- Amado, LL, Garcia, ML, Ramos, PB, Freitas, RF, Zafalon, B., Ferreira, JLR, Yunes, JS, & Monserrat, JM (2009). Um método para medir a capacidade antioxidante total contra radicais peroxila em organismos aquáticos: aplicação para avaliar a toxicidade de microcistinas. *Science of the Total Environment*, 407, 2115–2123. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2008.11.038>
- Baldissera, MD, Souza, CF, Baldisserotto, B., Zimmer, F., Paiano, D., Petrolini, TG, & Da Silva, AS (2019). Colina vegetal melhora o desempenho de crescimento, o metabolismo energético e a capacidade antioxidante de alevinos de tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*). *Aquicultura*, 501, 224–229. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.11.021>
- Baldissera, MD, Souza, CF, Santos, RCV, Stefani, LM, Moreira, KLS, da Veiga, ML, da Rocha, MIUM, & Baldisserotto, B. (2017). A cepa PA01 de *Pseudomonas aeruginosa* prejudica enzimas da rede de fosfotransferência nas brânquias de *Rhamdia quelen*. *Microbiologia Veterinária*, 201, 121–125. <https://doi.org/10.1016/j.veterinario.2017.01.016>
- Baldissera, MD, Souza, CF, Zeppenfeld, CC, Velho, MC, Klein, B., Abbad, LB, Ourique, AF, Wagner, R., Da Silva, AS, & Baldisserotto, B. (2020). Suplementação alimentar com nerolidol
- Nanoesferas melhoram o crescimento, o status antioxidante e os perfis de ácidos graxos dos filés de tilápia do Nilo: Benefícios da nanotecnologia para a saúde dos peixes e a qualidade da carne. *Aquicultura*, 516, 734635. <https://doi.org/10.1016/j.aquicultura.2019.734635>
- Beutler, E. (1984). Superóxido dismutase. Em E. Beutler (Ed.), *Metabolismo de células vermelhas. Um manual de métodos bioquímicos* (pp. 83–85). Grune & Stratton.
- Bezerra, VS, Do Amaral, IA, Damasceno, LF et al (2016). O açaí como fonte de ácidos graxos Ômega-9, Ômega-6 e Ômega-3. In: Embrapa Amapá-Resumo em Anais de Congresso (ALICE). In: Jornada Científica da Embrapa Amapá, 2, 2016, Macapá. Resumos... Macapá: Embrapa Amapá.
- Cedrim, PCAS, Barros, EMA, & Nascimento, TG (2018). Propriedades antioxidantes do açaí (*Euterpe oleracea*) na síndrome metabólica. *Revista Brasileira de Tecnologia de Alimentos*, 21, e2017092.
- Da Silva, BJ, Tarouco, FM, de Godoi, FGA, Geihs, MA, Abreu, F. EL, Fillmann, G., Sandrini, JZ, & da Rosa, CE (2018). Indução de estresse oxidativo pelo clorotanolol no poliqueta estuarino *Laonereis aurata*. *Toxicologia Aquática*, 196, 1–8.
- de Bianchi, M., & Antunes, LMG (1999). Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. *Rev Nutr*, 12, 123–130.
- de Souza, MO (2009) Suplementação da dieta com polpa do fruto do açaí (*Euterpe oleracea* Martius) melhorou o perfil lipídico e a capacidade antioxidante – uma avaliação in vivo. 86 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto.
- Do Nascimento, RJ (2008). Composição de ácidos graxos do óleo da polpa de açaí obtido por tecnologia enzimática e hexano. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 30, 498–502.
- dos Santos, D., Klauck, V., Campigotto, G., Alba, DF, dos Reis, JH, Gebert, RR, Souza, CF, Baldissera, MD, Schogor, ALB, Santos, ID, Wagner, R., Vedovatto, M., & Da Silva, AS (2019). Benefícios da inclusão de óleo de açaí na dieta de ovelhas leiteiras sob estresse térmico sobre a saúde, a produção e a qualidade do leite. *Journal of Thermal Biology*, 84, 250–258. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2019.07.007>
- Dossou, S., Koshio, S., Ishikawa, M., Yokoyama, S., Dawood, MAO, El Basuini, MF, Olivier, A., & Zaineldin, AI (2018). Desempenho de crescimento, saúde sanguínea, estado antioxidante e resposta imune em douradas (*Pagrus major*) alimentadas com farinha de colza fermentada por *Aspergillus oryzae* (RM-Koji). *Fish & Shellfish Immunology*, 75, 253–262. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.01.032>
- Dossou, S., Koshio, S., Ishikawa, M., Yokoyama, S., El Basuini, MF, Zaineldin, AI, Mzengereza, K., Moss, A., Dawood, MAO (2019). Efeitos da substituição da farinha de peixe por farinha de colza fermentada e não fermentada no crescimento e nas respostas imunológicas e antioxidantes do sargo-vermelho (*Pagrus major*). *Nutrição em Aquicultura*, 25(2), 508–517.
- Dusse, LM, Vieira, LM, Carvalho, M. & Das, G. (2003). Carvalho M Das G (2003) Revisão sobre óxido nítrico. *J Bras Patol Med Lab*, 39(4), 435–450.
- Dzeja, PP, & Terzic, A. (2003). Redes de fosfotransferência e energética celular. *Journal of Experimental Biology*, 206(12), 2039–2047. <https://doi.org/10.1242/jeb.00426>
- Dzeja, PP, & Terzic, A. (2009). Redes de sinalização de adenilato quinase e AMP: monitoramento metabólico, comunicação de sinais e detecção de energia corporal. *International Journal of Molecular Sciences*, 10, 1729–1772.
- Dzeja, PP, Vitkevicius, KT, Redfield, MM, Burnett, JC, & Terzic, A. (1999). Fosfotransferência catalisada por adenilato quinase no miocárdio: aumento da contribuição na insuficiência cardíaca. *Circulation Research*, 84, 1137–1143. <https://doi.org/10.1161/01.RES.84.10.1137>
- El-Sayed, EM (2006). *Cultura de tilápia*. Publicações CABI.
- Emerenciano, M., Martínez-Córdova, LR, Martínez-Porchas, M., & Mirandabaeza, A. (2017). *Tecnologia de Bioflocos (BFT): Uma ferramenta para gestão da qualidade da água na aquicultura, qualidade da água*. Tecnologia. <https://>

- www.intechopen.com/books/water-quality/biofloc-technology-bft- uma-ferramenta-para-gestão-da-qualidade-da-água-na-aquicultura
- Erdogan, M., & Arslan, T. (2019). Efeitos da vitamina E no crescimento e desempenho reprodutivo de pindani (*Pseudotropheus socolofi* Johnson, 1974). *Aquicultura*, 509, 59–66. <https://doi.org/10.1016/j.aquacultura.2019.05.019>
- Figueiredo, AB (2017) *Suplementação com óleos essenciais de manjer-icão (Ocimum gratissimum L.) e gengibre (Zingiber officinale Rosc.) na dieta de tilápia-do-nilo (Oreochromis niloticus L.)*. Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Aquicultura, Florianópolis.
- Fortuoso, BF, Gebert, RR, De Oliveira, RC, Boiago, MM, Souza, C. F., Baldissera, MD, Vendruscolo, RG, Kempka, AP, Paiano, D., Wagner, R., & Da Silva, AS (2019). Impactos da suplementação de farinha de açaí em torrões na dieta de galinhas poedeiras sobre o desempenho produtivo, perfis de ácidos graxos e capacidade antioxidante em ovos frescos e estocados. *Journal of Food Biochemistry.*, 43, e13022. <https://doi.org/10.1111/jfbc.13022>
- Gallori, S., Bilia, AR, Bergonzi, MC, Barbosa, WLR, Vincieri, FF (2004). Constituintes polifenólicos da polpa do fruto de *Euterpe oleracea* Març. (Açaí). *Cromatografia*, 59, 739–743.
- Kang, J., Xie, C., Li, Z., Nagarajan, S., Schauss, AG, Wu, T., & Wu, X. (2011). Flavonoides da polpa de açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) e suas atividades antioxidante e anti-inflamatória. *Química de Alimentos*, 128, 152–157.
- Lebel, CP, Ischiropoulos, H., & Bondy, SC (1992). Avaliação da sonda 2',7'-diclorofluorescina como indicadora da formação de espécies reativas de oxigênio e estresse oxidativo. *Chemical Research in Toxicology*, 5, 227–231. <https://doi.org/10.1021/tx00026a012>
- Leong, SF, Lai, JC, Lim, L., & Clark, JB (1981). Enzimas metabolizadoras de energia em regiões cerebrais de ratos adultos e idosos. *Journal of Neurochemistry*, 37, 1548–1556.
- Mannervik, B., & Guthenberg, C. (1981). Glutathione transferase (humana placenta). *Métodos em Enzimologia*, 77, 231–235.
- Maritim, AC, Sanders, RA, & Watkins III, JB (2003). Diabetes, oxi-Estresse dativo e antioxidantes: uma revisão. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 17, 24–38. <https://doi.org/10.1002/jbt.10058>
- Mathias, LMBS, Alegre, PHC, dos Santos, IOF, Bachiega, T., Figueiredo, AM, Chiuso-Minicucci, F., Fernandes, AA, Bazan, S. GZ, Minicucci, MF, Azevedo, PS, Okoshi, MP, Zornoff, LAM, Paiva, SAR, & Polegato, BF (2019). A suplementação de *Euterpe oleracea* Mart. (Açaí) atenua a cardiotoxicidade aguda induzida por doxorubicina em ratos. *Fisiologia Celular e Bioquímica*, 53, 388–399.
- Monserat, JM, Geracitano, LA, Pinho, GLL, Vinagre, TM, Faleiros, M., Alciati, JC, & Bianchini, A. (2003). Determinação de peróxidos lipídicos em invertebrados utilizando o complexo Fe (III) xilenol laranja
- formação. *Arquivos de Contaminação Ambiental e Toxicologia*, 45, 177–183.
- Packer, JF, Da Luz, MMS (2007). Método para avaliação e pesquisa da atividade antimicrobiana de produtos de origem natural. *Revista Brasileira De Farmacognosia*, 17(1), 102–107. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2007000100019>
- Qiang, J., Wasipe, A., He, J., Tao, Y.-F., Xu, P., Bao, J.-W., Chen, D.-J., & Zhu, J.-H. (2019). A deficiência de vitamina E na dieta inibe o metabolismo da gordura, a capacidade antioxidante e a regulação imunológica da resposta inflamatória em alevinos de tilápia cultivada geneticamente melhorada (GIFT, *Oreochromis niloticus*) após infecção por *Streptococcus iniae*. *Fish & Shellfish Immunology.*, 92, 395–404. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.06.026>
- Read, SM e Northcote, DH (1981). Minimização da variação na resposta a diferentes proteínas do ensaio de ligação do corante azul de Coomassie G para proteínas. *Analytical Biochemistry*, 116, 53–64. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(81\)90321-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(81)90321-3)
- Rogez, H. (2000) *Açaí: preparo, composição e melhoramento da conservação* vação. EDUFPA, 313 p.
- Segner, H. (1998). Isolamento e cultura primária de hepatócitos teleósteos. *Bioquímica e Fisiologia Comparadas*, 120, 71–81. [https://doi.org/10.1016/S1095-6433\(98\)10012-0](https://doi.org/10.1016/S1095-6433(98)10012-0)
- Tatsch, E., Bochi, GV, Pereira, RS, Kober, H., Agertt, VA, de Campos, MM, Gomes, P., Duarte, MMMF, & Moresco, RN (2011). Uma técnica automatizada simples e de baixo custo para medição de nitrito/nitrato sérico. *Bioquímica Clínica*, 44(4), 348–350.
- Udani, JK, Singh, BB, Singh, VJ e Barrett, ML (2011). Efeitos da preparação de açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) em parâmetros metabólicos em uma população saudável com sobrepeso: um estudo piloto. *Nutrition Journal*, 10, e45. <https://doi.org/10.1186/1475-2891-10-45>
- Wang, H., Chu, W., Das, SK, Ren, Q., Hasstedt, SJ e Elbein, SC (2002). Polimorfismos da piruvato quinase hepática estão associados ao diabetes tipo 2 em caucasianos do norte da Europa. *Diabetes*, 51, 2861–2865. <https://doi.org/10.2337/diabetes.51.9.2861>
- Wendel, A. (1981). Glutathione peroxidase. *Métodos em enzimologia* (pp. 325–333). Imprensa Acadêmica.
- Como citar este artigo:** Leite TC, Picoli F, Lopes DDA, et al. Efeitos da adição de óleo de açaí em dietas para tilápias sobre o desempenho, enzimas do metabolismo energético hepático e respostas antioxidantes. *Aquac. Res.*2021;52:395–402. <https://doi.org/10.1016/j.aquacultura.2021.05.019>

Como citar este artigo: Leite TC, Picoli F, Lopes DDA, et al.

Efeitos da adição de óleo de açaí em dietas para tilápias sobre o desempenho, enzimas do metabolismo energético hepático e respostas antioxidantes. *Aquac. Res.*2021;52:395–402. <https://doi.org/10.1093/aquacult/res/abaa022>

O uso de aditivos alternativos em rações para aquicultura é uma abordagem atraente para melhorar a qualidade nutricional da carne, pois alguns aditivos podem auxiliar em diversas funções essenciais nos organismos (Baldiçsera et al., 2020). A colina vegetal (VC) é um complexo vitamínico B que tem apresentado resultados promissores na alimentação de peixes. Este aditivo em dietas para tilápia do Nilo melhorou consideravelmente o metabolismo energético e o estado oxidante/antioxidante do fígado, causando um efeito hepatoprotetor e melhorando os parâmetros de desempenho (Baldiçsera et al., 2019; Sousa et al., 2020). Um estudo mostrou que a adição de VC à dieta de tilápia reduziu os danos hepáticos induzidos por uma dieta contaminada com aflatoxina (Sousa et al., 2019). A melhora no desempenho pode estar associada à melhora da síntese de metionina, um aminoácido essencial que, como outros aminoácidos, está diretamente relacionado ao desenvolvimento animal (Zhang e Li, 2010).

Outro fator que levou à realização deste estudo é o fato de que o VC auxilia no transporte de gordura do fígado para outros tecidos, diminuindo o acúmulo de gordura hepática (Devlin, 2000). Essa função específica pode influenciar a composição da carne de peixe relacionada ao perfil lipídico. No entanto, há pouca literatura sobre os efeitos do VC na composição nutricional da carne de tilápia do Nilo, principalmente quando cultivada em sistema de bioflocos, onde o sistema possui uma série de microrganismos essenciais para a manutenção da qualidade da água e que podem servir como fontes suplementares de alimento (Wasielesky et al., 2006; Ekasari et al., 2014). Os microrganismos presentes no sistema de bioflocos desempenham papéis fundamentais na suplementação dietética dos organismos cultivados, pois são fontes de proteínas, lipídios, vitaminas e minerais (Martínez-Cordova et al., 2014; Martínez-Cordova et al., 2016). Portanto, o presente estudo teve como objetivo determinar se a adição de VC na dieta da tilápia do Nilo alteraria a composição química e os perfis de ácidos graxos (AG) da carne.

2. Material e métodos

2.1. Colina vegetal

O VC foi extraído das plantas *Azadirachta indica*, *Citrus colo-cynthis*, *Trachyspermum ammi* e *Achyranthes aspera*. O produto comercial é conhecido como Biocholine Powder® (VB). Os níveis garantidos de fosfatidilcolina total (conjugados naturais de colina) são de 16 g kg⁻¹ - pureza de 1,6%. O aditivo VC foi adicionado à ¹VC ração (ração basal) com "on top" nas doses experimentais descritas abaixo.

2.2. Sistema de tecnologia de bioflocos (BFT) e parâmetros de qualidade da água

O cenário experimental foi do tipo macrocosmo-microcosmo (Wasielesky et al., 2006; Emerenciano et al., 2013), constituído por duas bancadas interligadas com aeração e circulação de água constantes utilizando BFT. Adicionalmente, 100 juvenis de tilápia-do-nilo (~15 g) foram estocados em cada macrocosmo, visando à formação e manutenção dos bioflocos. Para tal procedimento, aplicou-se a metodologia proposta por Emerenciano et al. (2012) utilizando uma relação C:N (carbono:nitrogênio) de 20:1 com adição diária de melado de cana-de-açúcar (líquido) como fonte externa de carbono e ração com 28% de proteína bruta (PB) (Anhambí®, Itapejara D'Oeste, PR, Brasil) como fonte de nitrogênio.

Em relação aos parâmetros de qualidade da água, o oxigênio dissolvido médio, a O nível de nitrogênio foi de 6,52 ± ¹temperatura 27,6 ± 0,05 °C e o pH 7,08 0,04 mg L⁻¹ ± 0,02. Em relação aos compostos nitrogenados, a amônia apresentou níveis de 0,21 ± 0,20 mg L⁻¹ e ¹nitrito 0,19,28 ± 0,09 mg L⁻¹ ¹mg L⁻¹ teores de ortofosfato e alcalinidade foram de 25,73 ± 14,65 de CaCO₃, mg L⁻¹ e 44,50 ± 33,54 mg L⁻¹ respectivamente. O sedimentável sólidos apresentaram média de 19,27 ± 14,06 mL L⁻¹ no estudo¹. Detalhes podem ser vistos publicado por Sousa et al.

Para obter uma amostra de biomassa seca do biofoco durante o experimento, 10 L de água foram coletados de cada macrocosmo; esse volume foi misturado para formar uma única amostra. A amostra foi colocada em um recipiente plástico, onde permaneceu por 1 h para decantação dos sólidos. Posteriormente,

Após a remoção do excesso de água, a amostra foi seca em estufa (Cien-lab®, Campinas, SP, Brasil) a 55 °C por 72 h e congelada a -20 °C para posterior análise da composição química e do perfil de ácidos graxos (AG) em um reservatório de biomassa seca de bioflocos. Este procedimento foi realizado para determinar o perfil de AG consumido pelos peixes no experimento, além da ração.

2.3. Desenho experimental e dietas

Amostras de peixe congelado (tilápia do Nilo) foram derivadas de um estudo publicado anteriormente (Sousa et al., 2020). O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado com quatro tratamentos e cinco repetições por tratamento. Os tratamentos consistiram em diferentes níveis de colina vegetal (0, 400, 800 e 1200 mg VC/kg de ração), de acordo com Sousa et al. (2020). Conhecendo os níveis de fosfatidilcolina em CV, os níveis dessa colina na ração suplementada (mg kg⁻¹ mg (T0), 6,4 mg (T400), 12,8 mg (T800) e 19,2 mg (T1200) foram ¹) foram calculados: 0 determinados.

As dietas foram elaboradas a partir de uma ração basal com 48% PB (Tabela 1). No início do experimento, foram estocados 200 juvenis de tilápia do Nilo (peso inicial médio de 8,03 ± 0,03 g), dez peixes por unidade experimental, em uma densidade de 143 peixes m² ³.

Tabela 1

Composição química e perfil de ácidos graxos da dieta de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloti-cus*) com diferentes níveis de colina vegetal (CV) (0, 400, 800 e 1200 mg CV/kg de ração) utilizados no experimento.1 Composição química1

	Nível de inclusão (mg kg ⁻¹)			
	0	400	800	1200
Matéria seca (MS), g kg ⁻¹	895 ± 4,5	902 ± 5,8	903 ± 7,0	897 ± 5,5
Lípidios (g kg ⁻¹ , DM)	70,3 ± 10,8	81,6 ± 9,1	82,7 ± 8,6	93,8 ± 17,1
Proteína bruta (g kg ⁻¹ , DM)	473 ± 2,5	471 ± 5,1	476 ± 4,5	469 ± 5,9
Cinzas (g kg ⁻¹ , DM)	120 ± 3,3	117 ± 4,5	120 ± 2,1	118 ± 2,9
Ácido graxo (g kg ⁻¹)				
C10:0 - ácido cáprico	2,00 ± 0,31	1,90 ± 0,24	1,90 ± 0,38	2,20 ± 0,56
C12:0 - ácido láurico	1,30 ± 0,19	1,10 ± 0,22	1,10 ± 0,09	1,30 ± 0,17
C14:0 - ácido mirístico	11,5 ± 1,36	11,2 ± 0,89	11,5 ± 0,96	11,7 ± 1,06
C15:0 - ácido pentadecílico	1,90 ± 0,25	1,40 ± 0,38	1,30 ± 0,52	1,50 ± 0,30
C16:0 - ácido palmítico	257 ± 2,9	258 ± 8,1	256 ± 9,9	255 ± 3,7
C16:1n7 - ácido palmitoleico	16,0 ± 1,6	15,9 ± 1,8	15,6 ± 1,0	16,5 ± 1,1
C17:0 - ácido margárico	7,50 ± 0,54	7,30 ± 0,39	7,20 ± 0,14	7,30 ± 0,25
C18:0 - ácido esteárico	104 ± 1,47	102 ± 2,96	106 ± 4,10	103 ± 1,40
C18:1n9 - ácido oleico	320 ± 2,87	320 ± 1,69	318 ± 2,08	317 ± 4,74
C18:1n7 - ácido vacênico	7,20 ± 0,45	7,40 ± 0,19	7,00 ± 0,34	7,00 ± 0,68
C18:2n6 - ácido linoleico	232 ± 3,41	234 ± 1,68	235 ± 2,41	236 ± 2,84
C18:3n6 - ácido γ-linolênico	10,6 ± 0,18	10,9 ± 0,36	11,5 ± 0,30	10,8 ± 0,09
C18:3n3 - ácido γ-linolênico	12,2 ± 0,12	12,2 ± 0,32	12,2 ± 0,15	12,7 ± 0,06
C20:1n9 - ácido gondoico	2,30 ± 0,06	1,90 ± 0,09	1,90 ± 0,05	2,50 ± 0,16
C20:3n6 - ácido dihom-γ-linolênico	4,40 ± 0,14	4,40 ± 0,09	4,30 ± 0,18	4,70 ± 0,24
C24:0 - ácido lignocérico	6,70 ± 0,20	6,70 ± 0,02	6,00 ± 0,60	7,20 ± 0,46
C22:6n3 - docosahexaenóico ácido	1,70 ± 0,08	1,60 ± 0,12	1,60 ± 0,10	1,80 ± 0,19

¹ Nota: Os ingredientes utilizados na produção da ração foram publicados anteriormente por Sousa et al. (2020). Resultados apresentados em média ± desvio padrão.

2.4. Amostras

O experimento durou 40 dias, após os quais os peixes de cada tratamento foram eutanasiados para coleta de fragmentos musculares para determinação dos perfis de AG (dois peixes por repetição = 10 por tratamento) e da carcaça total para composição química (três peixes por repetição = 15 por tratamento).

2.5. Composição química

As carcaças (n = 10 por tratamento) foram preparadas para análise. Primeiramente, as carcaças foram pesadas e cortadas em pequenos fragmentos. Em seguida, foram colocadas em uma estufa com circulação forçada de ar por 48 h a uma temperatura de 60 °C. Com a estabilização do peso da amostra (após 48 h), definimos a umidade; na sequência, realizamos a moagem das amostras em um moinho de facas.

Essas amostras de carne foram avaliadas quanto à matéria seca e à composição química (proteína bruta, lipídios e matéria mineral) de acordo com as diretrizes da AOAC (2016). Amostras de ração (dieta) e bioflocos foram preparadas igualmente para as carcaças, e as mesmas análises foram realizadas (AOAC, 2016). Todos os parâmetros foram realizados em triplicata.

2.6. Perfis de FA

Amostras de carne, ração e bioflocos foram usadas para análise do perfil de AG. A extração lipídica foi realizada de acordo com o método de Bligh e Dyer (1959) com algumas modificações: 0,5 g de amostras, 0,4 mL de água, 5 mL de metanol e 2,5 mL de clorofórmio foram adicionados em tubos de polipropileno de 15 mL, e a agitação mecânica foi realizada por 60 min. Em seguida, 2,5 mL de clorofórmio e 2,5 mL de solução de Na2SO4 1,5% foram adicionados para promover um sistema bifásico. Essa mistura foi agitada por 2 min e então centrifugada por 5 min a 3000 rpm. Os lipídios obtidos da fase clorofórmica foram submetidos à análise de FA antes da secagem do solvente por fluxo de N2 .

A metilação de FA da fração lipídica foi realizada por um método de transesterificação/esterificação proposto por Hartman e Lago (1973). Aos lipídios extraídos foram adicionados 1 mL de solução metanólica de KOH 0,4 M em um tubo de ensaio e agitados em um vórtice por 1 min. As amostras foram mantidas em banho-maria por 10 min no ponto de ebulição. Posteriormente, as amostras foram resfriadas à temperatura ambiente e 3 mL de solução metanólica de H2SO4 1 M foram adicionados e agitados em um vórtice e mantidos em banho-maria por 10 min. Após o resfriamento, 2 mL de hexano foram adicionados e centrifugados a 5000 rpm por 5 min. Finalmente, o hexano com os metil ésteres de ácidos graxos (FAME) foi submetido à análise cromatográfica.

A determinação de FAME foi realizada em um cromatógrafo gasoso modelo 3600CX equipado com um detector de ionização de chama (Varian®, Palo Alto, CA, EUA). Um microlitro de amostras foi injetado em um injetor split/splitless, operado em modo splitless a 250 °C (corte do splitter por 0,8 min). Hidrogênio foi utilizado como gás de arraste a uma pressão constante de 34 psi. A separação dos FAMES foi realizada utilizando uma coluna de cromatografia HP-88 (100 m × 0,25 mm; 0,20 μm de espessura de filme, (Agilent®, J & W, Folsom, CA, EUA). A temperatura inicial do forno foi programada em 50 °C por 1 min e aumentada para 185 °C, a uma taxa de 15 °C min⁻¹ aumentando para 195 °C, a uma taxa de 0,5 °C min⁻¹. Então, min⁻¹ e finalmente até 230 °C, e mantida por 5 min em condições isotérmicas. aumentando 15 °C min⁻¹, ções. A temperatura do detector foi mantida constante em 250 °C. Os compostos FAME foram identificados comparando os tempos de retenção experimentais com aqueles de padrões autênticos (FAME Mix-37, Sigma Aldrich®, St. Louis, MO, EUA). Os resultados foram apresentados como uma porcentagem de cada AG identificado na fração lipídica, considerando o fator de resposta equivalente ao tamanho da cadeia e um fator de conversão de éster para o respectivo ácido para cada FAME aplicado ao FID, de acordo com Visentainer (2012).

2.7. Análises estatísticas

Os dados foram testados quanto à normalidade usando o teste de Shapiro-Wilk.

Assimetria, curtose e homogeneidade foram determinadas pelo teste de Levene. A ANOVA unidirecional foi utilizada para analisar todos os parâmetros que apresentaram diferenças, seguida por testes post hoc de Tukey. O valor de p para significância foi estabelecido em p < 0,05.

3. Resultados

3.1. Composição química e perfil de AG em dietas

Em relação à composição química das dietas, a média de gordura seca, lipídios o valor da matéria foi de 899,25 g ¹76,85 g kg⁻¹, CP 472,25 g kg⁻¹ kg⁻¹ e das cinzas 118,75 g ¹. Resultados dos parâmetros de composição química kg⁻¹ e o perfil de AG de cada tratamento (dietas) pode ser visto na Tabela 1.

3.2. Análise de bioflocos

A Tabela 2 apresenta os valores médios da composição química e do perfil de AG da biomassa seca. A matéria seca apresentou uma média de 1 valor de 934 g kg⁻¹ e cinzas 387 g kg⁻¹, lipídios 72,6 g kg⁻¹, kg⁻¹.

3.3. Composição química da carcaça de tilápia do Nilo

Quanto à análise da composição química da carcaça, de A umidade foi significativamente menor com a dose de 1200 mg kg⁻¹ de CV na dieta ¹ em comparação aos outros tratamentos. O teor de lipídios foi significativamente maior nos tratamentos com 800 e 1200 mg kg⁻¹ de CV na ração, em comparação ao grupo controle. Não houve diferença significativa entre os tratamentos em relação à PB e às cinzas (Tabela 3).

3.4. Perfil de AG na carne

Os ácidos graxos saturados totais (AGS) foram significativamente menores tratamento com 400 mg kg⁻¹, ¹ quando comparados ao tratamento controle, enquanto foram significativamente maiores no tratamento com 1200 mg kg⁻¹ em ¹ comparação ao tratamento controle. Os níveis totais de monoinsaturados

Composição química do biofoco	
Variáveis	Níveis (g kg ⁻¹)
Matéria seca	934 ± 3,85
Proteína bruta	387 ± 2,02
Lipídios	72,6 ± 1,69
Cinzas	118 ± 1,91

Perfil de ácidos graxos do biofoco (g kg ⁻¹)	
C14:0 - ácido mirístico	20,2 ± 0,74
C14:1n5 - ácido miristoleico	82,6 ± 1,73
C15:0 - ácido pentadecílico	7,50 ± 0,19
C15:1n5 - ácido pentadecenóico	61,3 ± 2,70
C16:0 - ácido palmítico	217 ± 8,41
Isômero C16:1	21,1 ± 1,01
C16:1n7 - ácido palmitoleico	81,2 ± 2,47
C17:0 - ácido margárico	11,5 ± 1,06
C17:1n7 - ácido heptadecanóico	6,70 ± 0,54
C18:0 - ácido esteárico	126 ± 2,09
C18:1n 9 - ácido oleico	116 ± 3,01
C18:1n7 - ácido vacênico	44,3 ± 1,12
C18:2n6 - ácido linoleico	38,0 ± 0,76
C18:3n6 - ácido γ-linolênico	13,5 ± 0,13
C20:3n6 - ácido dihom-γ-linolênico	18,7 ± 0,38
C20:3n3 - dihom-γ-linolênico	35,4 ± 1,62
C24:0 - ácido lignocérico	12,3 ± 0,63
C22:5n3 - ácido docosapentaenóico	30,3 ± 1,84
C22:6n3 - ácido docosahexaenóico	23,2 ± 0,89

Nota: Resultados apresentados em média ± desvio padrão.

Tabela 3

Umidade e concentração de proteína bruta, lipídios e cinzas na carcaça de tilápia do Nilo suplementada com diferentes níveis de colina vegetal (VC) (0, 400, 800 e 1200 mg VC kg⁻¹ de ração) criados em sistema de bioflocos por mais de 40 dias.*

Variáveis (g kg ⁻¹)	Níveis de inclusão (mg kg ⁻¹) ¹ *				Valor de p
	0	400	800	1200	
Umidade	911 ± 7.4a	906 ± 7,0a	913 ± 9.3a	886 ± 5.1b	<0,001
Proteína bruta	474 ± 19,6	458 ± 23,1	470 ± 11,9	468 ± 15,4	0,214
Lipídios	184 ± 17,5b	210 ± 20,4ab	225 ± 13,0a	239 ± 20,4a	<0,001
Cinzas	22,0 ± 7,8	24,7 ± 10,9	24,2 ± 13,1	24,7 ± 10,3	0,697

* Letras diferentes dentro de uma linha indicam diferenças significativas entre os grupos, utilizando o teste post-hoc de Tukey (P < 0,05). Resultados apresentados em média ± desvio padrão.

Os ácidos graxos poli-insaturados (MUFA) foram significativamente menores no tratamento com 1200 mg kg⁻¹ quando comparado ao tratamento controle. Finalmente, os ácidos graxos poli-insaturados totais (PUFA) foram significativamente maiores nos tratamentos com 800 e 1200 mg kg⁻¹ do que o tratamento de controle. Os níveis de ácido mirístico (C14:0) e ácido palmítico (C16:1) foram significativamente menores na tilápia do Nilo suplementada com 800 e 1200 mg kg⁻¹ em comparação ao grupo controle, enquanto os níveis de ácido pentadecílico (15:0), ácido mirístico (C14:1) e ácido decosapentaenoico (C22:5n3; DPA) foram significativamente maiores na tilápia do Nilo suplementada com 800 e 1200 mg kg⁻¹ em comparação ao grupo controle. Os níveis de ácido nervônico (C24:1) e ácido docosahexaenoico (C22:6n3) foram significativamente maior na tilápia do Nilo suplementada com 1200 mg kg⁻¹ em comparação ao grupo controle (Tabela 4).

4. Discussão

Azim e Little (2008) avaliaram a composição química e a AG perfis do bioflocos e valores observados de 380 g kg⁻¹ de lipídios, 60 g kg⁻¹ de CP, 30 g kg⁻¹ de fibra e 120 g kg⁻¹ de cinzas. De acordo com a composição química do bioflocos em termos nutricionais estavam dentro dos níveis ideais para o cultivo de tilápia em BFT, exceto pelos baixos níveis de lipídios. No presente estudo, o conteúdo lipídico (72,6 g kg⁻¹ porque os níveis de PB, cinzas e perfis de AG) foi maior, sugerindo um bioflocos nutricionalmente mais completo foram semelhantes. No entanto, é essencial observar que a variação na composição nutricional do bioflocos pode ser influenciada por vários fatores, incluindo o tamanho das partículas orgânicas em suspensão, espécies sendo cultivadas, dieta e a fonte externa de carbono utilizada (Ekasari et al., 2014; Rajkumar et al., 2015; Wei et al., 2016). Como resultado, é essencial realizar uma análise nutricional do bioflocos e corrigir a dieta, se necessário, atendendo às necessidades energéticas do peixe e permitindo que ele expresse todo o seu potencial zootécnico.

Em relação à composição química da carne, observamos um aumento nos níveis de lipídios na carne de tilápias suplementadas com níveis de 800 e 1200 mg kg⁻¹ os lipídios nos peixes aumentam de acordo com a literatura. Normalmente, os níveis de porcentagem de lipídios na dieta (El-Kasheif et al., 2011; Ayisi et al., 2017). Sousa et al. (2019) avaliaram vários níveis de farinha de subprodutos de pizzeria na ração para tilápias em um sistema de bioflocos. Eles observaram que o consumo desse carboidrato levou ao aumento dos níveis de lipídios na carcaça, conforme observado por Liu et al. (2021) no fígado de juvenis de kingfish de cauda amarela (*Seriola lalandi*) alimentados com dieta. No presente estudo, também se que a adição de VC na dieta aumentou os níveis desta parâmetro na carne de tilápia.

Os perfis de AG presentes na carne de peixe podem ser influenciados principalmente pelos perfis de AG da ração utilizada (Luo et al., 2010). No presente estudo, foram encontrados altos níveis de C16:0, C18:1n9c, C18:0 e C18:2n6 na carne de tilápia e na ração e bioflocos, fato que reforça essa hipótese.

Tabela 4

Perfil de ácidos graxos na carne de tilápia do Nilo suplementada com diferentes níveis de colina vegetal (VC) (0, 400, 800 e 1200 mg VC kg⁻¹ sistema de bioflocos ao longo de 40 dias (média ± DP).

Ácidos graxos (g kg ⁻¹)	Níveis de inclusão (mg kg ⁻¹) ¹				valor p
	0	400	800	1200	
C14:0	8,13 ± 1,0a	8,85 ± 0,9a	4,94 ± 0,7b	5,57 ± 0,9b	<0,001
C15:0	0 ± 0b	0 ± 0b	10,5 ± 2,7a	12,3 ± 1,3a	<0,001
C16:0	278 ± 41	274 ± 27	265 ± 39	275 ± 45	0,586
C17:0	5,60 ± 1,2	4,83 ± 1,7	4,62 ± 0,81	5,92 ± 1,02	0,296
C18:0	122 ± 12	114 ± 23	122 ± 18	128 ± 32	0,169
C20:0	4,41 ± 0,85	4,04 ± 1,06	3,74 ± 0,62	4,27 ± 0,47	0,016
SFA	419 ± 6,74b	406 ± 4,39c	412 ± 8,31	431 ± 7,12a	<0,001
C14:1n5	11,6 ± 2,4c	10,8 ± 2,1c	10,8 ± 1,8b	25,4 ± 2,6a	<0,001
C16:1n7	19,0 ± 2,2a	18,4 ± 3,4a	12,0 ± 1,7b	8,97 ± 2,0b	<0,001
C18:1n9	244 ± 32,0	266 ± 29,8	246 ± 3,7	231 ± 32,3	0,584
C18:1n7	4,10		2,84	4,9	0,823
C20:1n9	6,55 ± 0,89	7,19 ± 0,63	6,87 ± 0,48	6,66 ± 1,09	0,625
C22:1n9	47,0 ± 1,9	39,8 ± 3,6	47,2 ± 2,4	48,0 ± 3,1	0,070
C24:1n9	16,4 ± 0,7b	16,8 ± 0,9b	16,9 ± 1,5ab	19,4 ± 2,0a	0,038
MUFA	377 ± 5,56ab	389 ± 9,63a	360 ± 8,27b	349 ± 6,76c	<0,001
C18:2n6	117 ± 11	122 ± 24	134 ± 15	123 ± 24	0,769
C18:3n6	2,18 ± 0,96	1,92 ± 1,02	1,99 ± 0,52	2,17 ± 0,76	0,806
C20:3n6	12,3 ± 1,10	12,8 ± 0,74	12,8 ± 0,97	13,8 ± 1,34	0,879
C22:5n3	49,8 ± 2,14ab	46,0 ± 1,87b	54,8 ± 2,74a	54,4 ± 3,10a	<0,001
C22:6n3	13,5 ± 0,87b	14,3 ± 1,24	14,8 ± 0,68 ab	15,5 ± 0,95a	0,042
PUFA	195 ± 4,75c	197 ± 6,41 a.C.	218 ± 6,69a	209 ± 4,79ab	0,018

a,b,cLetras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa entre os tratamentos (P < 0,05). Resultados apresentados em média ± desvio padrão.
Nota 1: Ácido mirístico (C14:0), ácido mirístico (C14:1), ácido pentadecílico (C15:0), ácido palmítico (C16:0), ácido palmítico (C16:1), ácido margárico (C17:0), ácido esteárico (C18:0), ácido oleico (C18:1n9), ácido linoleico (C18:2n6), ácido γ-linolênico (C18:3n6), ácido araquídico (C20:0), ácido gondoico (C20:1n9), ácido dihomog-γ-linolênico (C20:3n6), ácido vacênico (C18:1n7), ácido erúrico (C22:1), ácido nervônico (C24:1), ácido docosapentaenoico (C22:5), ácido docosahexaenoico (C22:6).

Nota 2: ácidos graxos saturados (SFA); ácidos graxos monoinsaturados (MUFA); ácidos graxos poli-insaturados (PUFA).

relação entre ração consumida e composição muscular. Bonaf e et al. (2017) incorporaram ácidos graxos conjugados em tilápia e também encontraram altos níveis de C16:0 e C18:1n9 na carne; entretanto, no presente estudo, os níveis de C14:0 foram menores nos tratamentos com maiores níveis de VC na dieta. Ayisi et al. (2017) avaliaram o óleo de palma em dietas para tilápia do Nilo (0, 2, 4, 6 e 8%) e observaram que o aumento nos níveis de inclusão dessa fonte lipídica também diminuiu os níveis desse AG. Por outro lado, diferentes níveis de lipídios (óleo de arenque) na dieta para tilápia não alteraram o perfil lipídico na carne (Luo et al., 2010). Diferentes processos metabólicos de alguns ácidos graxos podem influenciar sua incorporação na carne, dependendo também da fonte lipídica nas dietas (Sargent et al., 2002). Em 2011, pesquisadores relataram pela primeira vez que a disponibilidade de colina afeta a composição lipídica da membrana muscular e o metabolismo lipídico intracelular (Michel et al., 2011) porque foi verificado que: 1) o principal transportador de colina SLC44A1 foi regulado negativamente pela deficiência de colina no nível de mRNA, e a proteína SLC44A1 foi reduzida nos lisados celulares totais e

mitocôndrias isoladas; 2) a deficiência de colina reduziu a síntese de fosfatidilcolina, mas a degradação de PC não foi afetada; 3) a fosfatidilcolina do músculo com deficiência de colina foi modificada e passou a conter mais ácidos graxos monoinsaturados em detrimento dos ácidos graxos saturados; 4) as células musculares com deficiência de colina também acumularam AG e triacilglicerol na forma de grandes gotículas lipídicas, gotículas formadas a partir de ácidos graxos endógenos e pelo metabolismo mais lento dos triacilgliceróis. Essas informações contribuem para a compreensão dos mecanismos que levaram às alterações no perfil de AG neste estudo, no qual a colina foi suplementada via dieta para peixes.

O ácido docosahexaenóico (C22:6n3 = DHA) é um ácido graxo ômega-3 extremamente importante para a saúde humana, pois previne doenças cardiovasculares e inflamatórias (Yates et al., 2014; Simat et al., 2015).

Os níveis deste AG foram baixos nas dietas aqui utilizadas (~1,68 g kg⁻¹ portanto, ¹), e houve uma contribuição nutricional significativa do biofoco para atender às necessidades nutricionais das tilápias. O valor de DHA encontrado no biofoco foi de 23,2 g kg⁻¹ o que pode explicar os valores encontrados na carne de tilápia (~14,5 g kg⁻¹ com a microalga marinha *Schizochytrium* spp. (0, 25, ¹). Sarker et al. (2016) substituindo o óleo de peixe 50, 75 e 100%) observou-se que a deposição de DHA na carne de tilápia aumentou linearmente até atingir 100% de substituição, o que foi relacionado a uma grande quantidade de DHA presente nas microalgas. Em nosso estudo, os níveis de DHA aumentaram apenas nos peixes alimentados com o maior nível de VC na dieta; no entanto, isso pode estar relacionado a uma função essencial que a colina desempenha no transporte de gorduras para dentro dos peixes (Devlin, 2000); essa função pode ser decisiva para o aumento do conteúdo de lipídios e outros ácidos graxos na carne de tilápia, conforme já observado por Liu et al. (2021).

Os níveis de PUFA na carne foram maiores em 800 e 1200 mg kg⁻¹ em comparação ¹ ao controle, o que pode ser considerado um efeito positivo do ponto de vista dos consumidores. Navarro et al. (2012) suplementaram tilápia com vitamina E e relataram que os níveis de 100 e 150 mg kg⁻¹ aumentaram os níveis de PUFA na carne. Esses mesmos autores observaram níveis mais altos de PUFA em comparação com SFA, uma condição de interesse positivo para os consumidores porque o consumo de SFA está associado a um risco aumentado de doenças cardiovasculares. De acordo com Sarker et al. (2015), pode haver uma relação inversa entre esses dois parâmetros. Em outras palavras, à medida que os níveis de PUFA aumentam, os níveis de SFA podem diminuir. No presente estudo, houve aumentos nos níveis de PUFA na carne de tilápia, especialmente aqueles da série ômega-3, como DHA (C22:6), o que representa uma melhoria na composição nutricional, além de proporcionar benefício aos humanos que o consomem.

Segundo pesquisadores, isso pode ter um efeito protetor contra diversas doenças (Riediger et al., 2009; Nguyen et al., 2010). Muitos estudos buscaram estratégias como o melhoramento genético e o uso de ingredientes alternativos em dietas para aumentar os níveis de PUFA n-3 na carne de tilápia (Nguyen et al., 2010; Dos Santos et al., 2014; Sarker et al., 2016). Isso ocorre porque essa espécie utiliza muito bem o PUFA n-6 para seu desenvolvimento e outras funções fisiológicas (Lim et al., 2011), o que explica os altos níveis de C18:2n6 na ração do presente estudo.

Entretanto, é fundamental ressaltar que o excesso de ácidos graxos da série ômega-6 não é desejável nos alimentos, pois está relacionado à promoção de doenças inflamatórias (Calder, 2006; Simopoulos, 2008); o mesmo não ocorreu no presente estudo: ao contrário, houve aumentos, permanecendo em níveis adequados.

Segundo Nguyen et al. (2010), os teores de SFA e MUFA podem aumentar de acordo com a porcentagem de umidade na carne; inversamente, os teores de PUFA podem diminuir. Este fato não corrobora os teores de MUFA e PUFA encontrados no presente estudo, pois a umidade reduziu o aumento dos níveis de inclusão de VC na carne.

a dieta. Embora não tenha diferido significativamente do tratamento controle, observamos uma maior deposição de AGMI na carne de tilápia na dose de 400 mg kg⁻¹. O AGMI é crítico porque está ¹. De uma perspectiva humana, o consumo de relacionado à prevenção da aterosclerose e de doenças cardiovasculares (Petenuci et al., 2008). Ao mesmo tempo, os resultados mostraram um alto teor médio de AGMI na carne de tilápia no nível mais alto de inclusão de VC na dieta. O consumo excessivo de AGMI

pode aumentar o colesterol LDL e, consequentemente, desencadear doenças cardiovasculares (Griffin, 2017; Lenighan et al., 2019). No entanto, a VC a 400 mg kg⁻¹ diminuiu o teor ¹ desses ácidos graxos, sugerindo uma melhora na qualidade da carne, conforme observado recentemente por Baldissera et al. (2020) em tilápias do Nilo alimentadas com ração contendo nerolidol.

A dose de 800 mg kg⁻¹ proporcionou benefícios para a tilápia em relação ao desempenho zootécnico e melhorias nos processos metabólicos (Baldissera et al., 2019; Souza et al., 2019; Sousa et al., 2020). No presente estudo, constatamos que o CV nas doses de 400 e 800 mg kg⁻¹ na ração em sistemas de biofocos promoveu melhorias nos perfis de AG da carne de tilápia, o que beneficia a saúde do consumidor final.

5. Conclusão

A suplementação de VC na ração para tilápia do Nilo em BFT modulou positivamente o perfil de ácidos graxos na carne; ou seja, produziu melhor ¹

Carne de qualidade para os consumidores. Em resumo, níveis de 400 e 800 mg kg⁻¹ de CV na dieta de tilápia são recomendados para reduzir os ácidos graxos saturados (SFA) e aumentar os ácidos graxos poliinsaturados (PUFA) (principalmente DHA) na carne de peixe.

Comitê de ética

O projeto sobre Uso de Animais em Pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Estadual de Santa Catarina, sob o número: 9595130319.

Contribuições dos autores

Sousa AA, Lopes DA, Petrolli TG e Da Silva AS contribuíram no delineamento e implementação da pesquisa para a análise dos resultados. Wagner R e Baldissera MD auxiliaram na elaboração do projeto, sua execução e financiamento. Nora L e Giacomelli CM participaram da execução do experimento e da coleta de amostras e dados. Nora L e Furlan VJM realizaram as análises laboratoriais. Todos os autores discutiram os resultados e contribuíram para o manuscrito final.

Declaração de Interesse Concorrente

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico; CNPq, Brasil; Fundação ~ de Amparo à Pesquisa Científica e Tecnológica do Estado de Santa Catarina; FAPESC, SC, Brasil. O primeiro autor também recebeu bolsa de mestrado da CAPES/Brasil.

Referências

- AOAC: Associação de Químicos Analíticos Oficiais, 2016. Métodos Oficiais de Análise de AOAC Internacional, 20ª edição.
- Ayisi, CL, Zhao, J., Rupia, EJ, 2017. Desempenho de crescimento, utilização de ração, composição corporal e de ácidos graxos de tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*) alimentada com dietas contendo níveis elevados de óleo de palma. Aquacult. Fish. 2 (2), 67–77. <https://doi.org/10.1016/j.aaf.2017.02.001>.
- Azim, ME, Little, DC, 2008. A tecnologia de biofocos (BFT) em tanques internos: Água qualidade, composição do biofoco, crescimento e bem-estar da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). Aquaculture 283, 29–35. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.06.036>.
- Bagni, M., Civitareale, C., Priori, A., Ballerini, A., Fioino, M., Brambilla, G., Marino, G., 2007. Estresse de aglomeração pré-abate e procedimentos de abate afetam a qualidade e o bem-estar do robalo (*Dicentrarchus labrax*) e da dourada (*Sparus aurata*). Aquaculture 263 (1–4), 52–60. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.07.049>.
- Baldissera, MD, Souza, CF, Baldissarroto, B., Zimmer, F., Paiano, D., Petrolli, TG, Da Silva, AS, 2019. A colina vegetal melhora o desempenho de crescimento, o metabolismo energético e a capacidade antioxidante de alevinos de tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*). Aquaculture 501, 224–229. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.11.021>.
- Baldissera, MD, Souza, CF, Zeppenfeld, CC, Velho, MC, Klein, B., Abbad, LB, Ourique, FA, Wagner, R., Da Silva, AS, Baldissarroto, B., 2020. Dietético

A suplementação com nanoesferas de nerolidol melhora o crescimento, o status antioxidante e os perfis de ácidos graxos dos filés de tilápia do Nilo: benefícios da nanotecnologia para a saúde dos peixes e a qualidade da carne. *Aquaculture* 516, 734635. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734635>.

B'en'e, C., Arthur, R., Norbury, H., Allison, EH, Beveridge, M., Bush, SR, Campling, L., Leschen, W., Little, D., Squires, D., Thilsted, SH, Troell, M., Williams, M., 2016. Contribuição da pesca e da aquicultura para a segurança alimentar e a redução da pobreza: avaliando as evidências atuais. *World Dev.* 79, 177–196. <https://doi.org/10.1016/j.worlddev.2015.11.007>.

Bligh, EG, Dyer, WJ, 1959. Um método rápido de extração e purificação de lipídios totais. *Português C. J. Biochem. Physiol.* 37 (21), 911–917.

Bonaf'e, EG, de Figueiredo, LC, Martins, AF, Monteiro, JP, Junior, OO, Canesin, E. A., Maruyama, SA, Visentainer, JV, 2017. Incorporação de ácidos graxos conjugados em tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). *J. Sci. Food Agric.* 97 (10), 3469–3475. <https://doi.org/10.1002/jsfa.8149>.

Boscolo, WR, Feiden, A., 2007. Industrialização ao de til' apias. GFM Gráfica & Editora, BR, Toledo.

Calder, PC, 2006. Ácidos graxos poli-insaturados n-3, inflamação e doenças inflamatórias. *Am. J. Clin. Nutr.* 83, 1505–1519. <https://doi.org/10.1093/ajcn/83.6.1505S>.

Dawood, MAO, Koshio, S., Esteban, MA, 2018. Funções benéficas dos aditivos para ração como Imunoestimulantes na aquicultura: uma revisão. *Rev. Aquac.* 10, 950–974. <https://doi.org/10.1111/raq.12209>.

Devlin, TM, 2000. *Manual de bioquímica com correlações químicas*. Edgard Blucher. São Paulo.

Dos Santos, HMC, Nishiyama, MF, Bonafe, EG, de Oliveira, CAL, Matsushita, M., Visentainer, JV, Ribeiro, RP, 2014. Influência de uma dieta enriquecida com farelo de semente de perilla na composição de ácidos graxos ômega-3 em tilápia-do-nilo. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 91 (11), 1939–1948. <https://doi.org/10.1007/s11746-014-2545-8>.

Ekasari, J., Angela, D., Waluvo, SH, Bachtir, T., Surawibjaja, EH, Bossier, P., Schryver, P., 2014. O tamanho do biofloclo determina a composição nutricional e a recuperação de nitrogênio por animais de aquicultura. *Aquaculture* 426–427, 102–111. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.01.023>.

El-Kashef, MA, Amal, SS, Seham, A., 2011. Efeitos de níveis variáveis de óleo de peixe em Desempenho de crescimento, composição corporal e características hematológicas da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus* L). *Egito. J. Aquatic Biol. Fish.* 15, 125–141. <https://doi.org/10.21608/ejabf.2011.2082>.

Emerenciano, M., Ballester, ELC, Cavalli, RO, Wasielesky, W., 2012. Biofloclo Aplicação da tecnologia como fonte de alimento em um sistema de viveiro com troca limitada de água para o camarão-rosa *Farfantepenaeus brasiliensis* (Latreille, 1817). *Aquac. Res.* 43, 447–457. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2011.02848.x>.

Emerenciano, M., Gaxiola, G., Cuzon, G., 2013. Tecnologia de Bioflocos (BFT): uma revisão para aplicação em aquicultura e na indústria de ração animal. *J. World Aquacult. Soc.* <https://doi.org/10.5772/53902>. Baton Rouge, Louisiana, Estados Unidos. <https://www.intechopen.com/books/biomass-now-cultivation-and-utilization/biofloc-technology-b-ft-a-review-for-aquaculture-application-and-animal-food-industry>.

Griffin, BA, 2017. Lipoproteína de baixa densidade sérica como biomarcador de risco de doença cardiovascular em função da dieta: consenso e confusão. *Nutr. Bull.* 42, 266–273. <https://doi.org/10.1111/mbu.12282>.

Hartman, L., Lago, RC, 1973. Preparação rápida de ésteres metílicos de ácidos graxos a partir de lipídios. *Laboratório Pract.* 22 (494), 475–477.

Herath, SS, Haga, Y., Satoh, S., 2016. Efeitos da alimentação a longo prazo com dietas à base de coprodutos de milho sobre o crescimento, a coloração dos filés e a composição de ácidos graxos e aminoácidos da tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture* 464, 205–212. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.06.032>.

Jim, F., Garamumhango, P., Musara, C., 2017. Análise comparativa do valor nutricional da carne de *Oreochromis niloticus* (Linnaeus), tilápia do Nilo, de três ecossistemas diferentes. *J. Food Qual.* 1–8. <https://doi.org/10.1155/2017/6714347>.

Lenighan, YM, McNulty, BA, Roche, HM, 2019. Composição da gordura alimentar: substituição de ácidos graxos saturados por AGPI como estratégia de saúde pública, com ênfase no ácido γ -linolênico. *Proc. Nutr. Soc.* 1–12. <https://doi.org/10.1017/s0029665118002793>.

Lim, C., Yildirim-Aksoy, M., Klesius, P., 2011. Exigências de lipídios e ácidos graxos para tilápias. *N. Am. J. Aquac.* 73 (2), 188–193. <https://doi.org/10.1080/15222055.2011.579032>.

Liu, Y., Wen, J., Ning, L., Jiao, J., Qiao, F., Chen, L., Zhang, M., Du, Z., 2019. Comparação dos efeitos de ácidos graxos específicos da dieta no crescimento e no metabolismo lipídico da tilápia do Nilo. *Aquac. Nutr.* 25, 1–11. <https://doi.org/10.1111/anu.12906>.

Liu, A., Pirozzi, I., Codabaccus, BM, Stephens, F., Francis, DS, Sammut, J., Booth, MA, 2021. Efeitos da colina na dieta sobre a composição lipídica do fígado, histologia hepática e bioquímica plasmática de juvenis de peixe-rei-de-cauda-amarela (*Seriola lalandi*). *Br. J. Nutr.* 125, 1344–1358.

Luo, G., Xu, J., Teng, Y., Ding, C., Yan, B., 2010. Efeitos dos níveis de lipídios na dieta sobre o crescimento, enzimas digestivas, utilização de ração e composição de ácidos graxos do robalo japonês (*Lateolabrax japonicus* L.) criado em água doce. *Aquac. Res.* 41 (2), 210–219. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2009.02319.x>.

Martínez-Cordova, LR, Emerenciano, M., Miranda-Baeza, A., Martínez-Porchas, M., 2014. Sistemas microbianos para aquicultura de peixes e camarões: uma revisão atualizada. *Rev. Aquac.* 6, 131–148 <https://doi.org/10.1111/raq.12058>.

Martínez-Cordova, LR, Martínez-Porchas, M., Emerenciano, MGC, Miranda-Baeza, A., Galva, T., 2016. De micróbios a peixes: a próxima revolução na produção de alimentos. *Crit. Rev. Biotecnologia.* 287–295 <https://doi.org/10.3109/07388551.2016.1144043>.

Michel, V., Singh, R., Bakovic, M., 2011. O impacto da disponibilidade de colina no metabolismo lipídico muscular. *Food Funct.* 2, 53–62. <https://doi.org/10.1039/c0fo00069h>.

Navarro, RD, Navarro, FKSP, Ribeiro Filho, OP, Ferreira, WM, Pereira, MM, Seixas Filho, JT, 2012. Qualidade de ácidos graxos polinsaturados em tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) alimentadas com suplementação de vitamina E. *Química Alimentar.* 134 (1), 215–218. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.02.097>.

Nguyen, NH, Ponzone, RW, Yee, HY, Abu-Bakar, KR, Hamzah, A., Khaw, HL, 2010. Base genética quantitativa da composição de ácidos graxos na linhagem GIFT de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) selecionada para alto crescimento. *Aquaculture* 309 (1–4), 66–74. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.08.034>.

Petenuci, ME, Stevanato, FB, Visentainer, JEL, Matsushita, M., Garcia, EE, Souza, NE, Visentainer, JV, 2008. Concentração de ácidos graxos, composição centesimal e composição mineral na farinha de espinha de peixe de tilápia do Nilo. *Arch. Latinoam. Nutr.* 58 (1).

Rajkumar, M., Pandey, PK, Aravind, R., Vennila, A., Bharti, V., Purushothaman, CS, 2015. Efeito de diferentes sistemas de bioflocos na qualidade da água, composição de bioflocos e desempenho de crescimento em *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931). *Aquac. Res.* 47 (11), 3432–3444. <https://doi.org/10.1111/are.12792>.

Riediger, ND, Othman, RA, Miyoung, S., Moghadasian, MH, 2009. Uma revisão sistêmica dos papéis dos ácidos graxos n-3 na saúde e na doença. *J. Am. Diet. Assoc.* 109 (4), 668–679. <https://doi.org/10.1016/j.jada.2008.12.022>.

Roques, S., Deborde, C., Richard, N., Skiba-Cassy, S., Moing, A., Fauconneau, B., 2018. Metabolômica e nutrição de peixes: uma revisão no contexto do desenvolvimento sustentável de rações. *Rev. Aquac.* 1–22. <https://doi.org/10.1111/raq.12316>.

Sargent, J., Tocher, DR, Bell, JG, 2002. Os lipídios. Em: Halver, JE (Ed.), *Fish Nutrition*, 2ª ed., Academic Press, Londres, Reino Unido, pp. 181–257.

Sarker, PK, Gamble, MM, Kelson, S., Kapuscinski, AR, 2015. A tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) apresenta alta digestibilidade de lipídios e ácidos graxos de *Schizochytrium* sp. marinho e proteínas e aminoácidos essenciais de ingredientes de rações de *Spirulina* sp. de água doce. 22 (1), 109–119. <https://doi.org/10.1111/anu.12230>.

Sarker, PK, Kapuscinski, AR, Lanois, AJ, Livesey, ED, Bernhard, KP, Coley, ML, 2016. Rumo a uma alimentação aquática sustentável: a substituição completa do óleo de peixe pela microalga marinha *Schizochytrium* sp. melhora o crescimento e a deposição de ácidos graxos em juvenis de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). *PLoS One* 11 (6), 0156684. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0156684>.

Simat, V., Bogdanović, C., T., Poljak, V., Petricević, S., 2015. Alterações nos ácidos graxos Composição, índices lipídicos aterogênicos e trombogênicos para a saúde e estabilidade lipídica do bogue (*Boops boops* Linnaeus, 1758) durante o armazenamento em gelo: efeito das atividades de piscicultura. *J. Food Compos. Anal.* 40, 120–125. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2014.12.026>.

Simopoulos, AP, 2008. A importância da proporção de ácidos graxos ômega-6/ômega-3 na Doenças cardiovasculares e outras doenças crônicas. *Exp. Biol. Med.* 233 (6), 674–688. <https://doi.org/10.3181/0711-MR-311>.

Sousa, AA, Pinho, SM, Rombenso, AN, Mello, GL, Emerenciano, MGC, 2019. Subproduto de pizzaria: uma fonte complementar de alimento para tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) criada com tecnologia de bioflocos? *Aquaculture* 501, 359–367. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.11.055>.

Sousa, AA, Lopes, DLA, Emerenciano, MGC, Nora, L., Souza, CF, Baldissara, MD, Baldissarro, B., Da Silva, AS, 2020. Fosfatidilcolina em dietas de juvenis de tilápia do Nilo em sistema de bioflocos: efeitos sobre o desempenho, o metabolismo energético e o sistema antioxidante. *Aquaculture* 515, 734574. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734574>.

Souza, ML, Maranhão, TCF, 2001. Rendimento de carcaça, arquivo subprodutos da filetagem da til' apia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), em função do peso corporal. *Anima. Ciência.* 23, 897–9001. <https://doi.org/10.4025/actascianimsci.v23i0.2643>.

Souza, CF, Baldissara, MD, Baldissarro, B., Petrolli, TG, da Gloria, EM, Zanette, R. A., Da Silva, AS, 2019. A colina vegetal na dieta melhora a saúde hepática da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) alimentada com dieta contaminada com aflatoxina. *Comp. Biochem. Physiol. Parte C* 108614. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2019.108614>.

Tsegay, T., Natarajan, P., Zelealem, T., 2016. Análise de dieta e bioquímica composição da Tilápia do Nilo (*O. niloticus*) do reservatório de Tekeze e Lago Hashenge, Etiópia. *J. Peixe. Pecuária Prod.* 4 (2) <https://doi.org/10.4172/2332-2608.1000172>.

Turchini, GM, Torstensen, BE, Wingkeong, N., 2009. Substituição de óleo de peixe na nutrição de peixes ósseos. *Rev. Aquac.* 1, 10–57. <https://doi.org/10.1111/j.1753-5131.2008.01001.x>.

Turchini, GM, Trushenski, JT, Glencross, BD, 2018. Reflexões sobre o futuro de Nutrição em aquicultura: realinhando perspectivas para refletir questões contemporâneas relacionadas ao uso criterioso de recursos marinhos em rações aquáticas. *N. Am. J. Aquac.* 81, 13–39. <https://doi.org/10.1002/naaq.10067>.

Visentainer, JV, 2012. Aspectos analíticos da resposta do detector de ionização ao em chama para ésteres de ácidos graxos em biodiesel e alimentos. *Química Nova* 35 (2), 274–279.

Wasielesky, W., Atwood, H., Stokes, A., Browdy, CL, 2006. Efeito da produção natural em um sistema de cultivo superintensivo baseado em flocos microbianos suspensos com troca zero para o camarão branco *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture* 258, 396–403. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.04.030>.

Wei, Y., Liao, S.-A., Wang, A., 2016. O efeito de diferentes fontes de carbono na Composição nutricional, comunidade microbiana e estrutura de bioflocos. *Aquaculture* 465, 88–93. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.08.040>.

Yates, CM, Calder, PC, Ed Rainger, G., 2014. Farmacologia e terapêutica de Ácidos graxos poli-insaturados ômega-3 em doenças inflamatórias crônicas. *Farmacol. Ther.* 141 (3), 272–282. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2013.10.010>.

Zhang, YC, Li, FC, 2010. Efeito da metionina na dieta sobre o desempenho do crescimento e a expressão do mRNA do fator de crescimento semelhante à insulina-1 em coelhos de corte em crescimento. *J. Anim. Fisiol. Anim. Nutrição.* 94, 803–809. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0396.2009.00975>.

Listas de conteúdo disponíveis no [ScienceDirect](https://www.sciencedirect.com)

Aquicultura

página inicial do periódico: www.elsevier.com/locate/aquaculture

Fosfatidilcolina em dietas de tilápias juvenis do Nilo em tecnologia de bioflocos sistema: Efeitos no desempenho, metabolismo energético e antioxidante sistema

Alison A. Sousaa,¹ Diogo LA Lopesa,² Maurício GC Emerencianoa,³ Luísa Norab,⁴ Carine F. Souza¹, Matheus D. Baldisserad,¹ Bernardo Baldisserottod,¹ Davi F. Albaa,¹ Aleksandro S. Da Silva¹

^a Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC), Chapecó, SC, Brasil

^b Departamento de Zootecnia, UDESC, Chapecó, SC, Brasil

^c Departamento de Engenharia de Pesca, UDESC, Laguna, SC, Brasil

^d Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil

INFORMAÇÕES DO ARTIGO

Palavras-chave:

Colina vegetal
Aditivos
Saúde hepática
Eficiência produtiva

RESUMO

A intensificação dos sistemas de produção aquícola requer dietas nutricionalmente mais completas para maximizar o desempenho produtivo, os processos metabólicos e a saúde geral dos peixes. Em estudos anteriores, a suplementação alimentar A administração de colina (cloreto de colina e fosfatidilcolina) melhorou o desempenho produtivo da tilápia cultivada em água limpa. No entanto, a colina não foi testada em um sistema de tecnologia de bioflocos (BFT), um sistema de cultura sistema habitado por diversos microrganismos que servem de fonte de alimento para peixes. O objetivo deste estudo foi determinar se a suplementação com fosfatidilcolina, também conhecida como colina vegetal (0, 400, 800 e 1200 mg/kg de ração), em dietas de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) em sistema de bioflocos estimulava o metabolismo energético e o sistema antioxidante sérico, com consequentes melhorias no desempenho produtivo. Tilápias juvenis do Nilo (8 g) foram testadas durante 40 dias. Durante esse período, o desempenho zootécnico foi avaliado. Sangue, brânquias e fígado foram coletados ao final do experimento para análises bioquímicas e energéticas. Não houve diferenças significativas entre os tratamentos em relação aos parâmetros de desempenho zootécnico (peso corporal, ganho de biomassa, conversão alimentar, taxa de crescimento específico e hepatossomático). Os níveis de alanina aminotransferase foram significativamente menores em peixes alimentados com 800 mg/kg de fosfatidilcolina do que no grupo controle; os níveis de proteína total aumentaram como resultado do aumento dos níveis de globulina. A enzima creatina quinase (tratamentos com 800 e 1200 mg de colina/kg) e piruvato quinase (1200 mg de colina/kg) foram significativamente maiores nos peixes tratados com colina do que nos controles. A suplementação com as três doses de A colina reduziu a peroxidação lipídica hepática e estimulou a atividade da glutatona S-transferase. Em contraste, a as atividades de outras enzimas antioxidantes (catalase, glutatona peroxidase e superóxido dismutase) foram alteradas nos fígados dos peixes que consumiram as maiores doses de fosfatidilcolina. Concluímos que, em um bioflocos sistema, a suplementação com fosfatidilcolina não teve efeito no desempenho zootécnico da tilápia; no entanto, estimulou o metabolismo energético e contribuiu para a ativação do GST hepático e níveis mais baixos de lipídios peroxidação.

1. Introdução

A tecnologia de bioflocos (BFT) é um sistema de produção com produção mínima ou troca zero de água, amplamente utilizado na aquicultura. O BFT é caracterizado por baixa ou nenhuma descarga de efluentes, alta biossegurança e produtividade (Crab et al., 2012; Avnimelech, 2015). A comunidade microbiana

presente no sistema recicla nutrientes, contribuindo com fontes de nutrição para os organismos cultivados; o sistema diminui as taxas de conversão alimentar e consequentemente reduz os custos de alimentação (Wasielkesky et al., 2006; Ekasari et al., 2014). Além disso, o BFT modula positivamente o sistema imunológico dos organismos e proporciona maior proteção contra doenças (Emerenciano et al., 2013; Kim et al., 2014).

* Autor correspondente.

¹ Autor correspondente. Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC), Chapecó, SC, Brasil.
Endereços de e-mail: alisonasousa@outlook.com (AA Sousa), dasilva.aleksandro@gmail.com (AS Da Silva).

<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734574>

Disponível online 14 de outubro de 2019 em formato revisado em 27 de agosto de 2019; Aceito em 4 de outubro de 2019

Devido à tendência de intensificação dos sistemas de produção, Estudos sobre necessidades dietéticas e dietas de alto desempenho têm aumentado (Cyrino et al., 2010; Turchini et al., 2018). Melhoria na qualidade dos peixes A saúde é crucial para o sucesso da produção. Nesse sentido, suplementos alimentares podem contribuir para esse sucesso (Elkamel et al., 2012; Reda et al., 2016). Em particular, as vitaminas que são necessárias em pequenas quantidades são crucial para os parâmetros de desempenho dos peixes, bem como para melhorar vários processos metabólicos (Halver e Hardy, 2002).

A colina é uma vitamina do complexo B essencial para o desenvolvimento animal. É responsável pela síntese de metionina e pela transporte de gordura do fígado para outros tecidos, evitando seu acúmulo (Devlin, 2000). A colina é comumente encontrada em rações animais forma de cloreto de colina. A fosfatidilcolina (colina vegetal) é uma fonte relativamente nova em rações aquáticas; tem sido usada em dietas para frangos de corte frangos com resultados positivos em termos de parâmetros zootécnicos desempenho (Kumar, 2009). Para a tilápia do Nilo, a fosfatidilcolina tem vem apresentando resultados promissores. Baldissiera et al. (2019) observaram uma melhora do desempenho zootécnico associada a efeito hepatoprotetor e melhora do metabolismo energético hepático em Tilápia do Nilo alimentada com 400, 800 e 1200 mg/kg durante 60 dias. Esse estudo foi conduzido em água limpa; os efeitos da fosfatidilcolina em peixes cultivados em um sistema de bioflocos permanecem desconhecidos. Porque a piscicultura com tecnologia de bioflocos oferece vantagens em relação à piscicultura tradicional (por exemplo, pouca ou nenhuma troca de água e menor impacto ambiental), seu uso aumentou substancialmente; é importante monitorar os efeitos de fosfatidilcolina neste sistema de cultura (De Lima et al., 2018). Portanto, os objetivos do presente estudo foram avaliar o efeito da suplementação dietética de fosfatidilcolina no desempenho produtivo, metabolismo energético e atividades antioxidantes séricas e teciduais em tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) criada em um sistema de bioflocos.

2. Materiais e métodos

O experimento foi realizado no Laboratório de Aquicultura da Oeste (LAQUA-Oeste) da UDESC, Chapecó, SC, Brasil. O peixe usado no experimento (tilápia do Nilo juvenil, *O. niloticus*) foram obtidos de uma piscicultura local, transportada para o laboratório e depois aclimatada e mantidas por 10 dias em tanques redondos de polietileno de 1000 L até o início do experimento. Durante este período, os peixes foram alimentados com dietas contendo 28% de proteína bruta (Anhambí, Itapejara D'Oeste, PR, Brasil), duas vezes ao dia (9h e 17h) na proporção de 4% de biomassa. Os valores médios dos parâmetros de qualidade da água foram os seguintes: oxigênio dissolvido foi de 6,42 mg L⁻¹, temperatura 27,21 °C, pH 7,29 e amônia 0,19 mg L⁻¹.

2.1. Desenho experimental

O dispositivo experimental consistiu em duas bancadas denominadas "macrocosmos-microcosmos" (Wasielesky et al., 2006; Emerenciano et al., 2013). Cada bancada continha vinte unidades experimentais (tanques redondos de polietileno de 100 L com volume útil de 70 L; denominados microcosmos) conectado a um tanque circular de polietileno de 1000 L (com volume útil de 400 L) denominado macrocosmo. A água foi bombeada do macrocosmo às unidades experimentais usando uma bomba externa 0,5 CV (Intech Macchine®, SP, Brasil) e retornado por gravidade. O os macrocosmos também estavam conectados entre si para manter a equivalência qualidade da água e perfil qualitativo-quantitativo de microrganismos (Brol e outros, 2017).

Em cada macrocosmo foram colocados dois termostatos (modelo Atman® BT-300 W, Zhujiang Sanjiao, China) para manter a temperatura próxima a 28 °C durante todo o experimento. A água utilizada foi coletada de rede municipal de abastecimento de água (CASAN), permanecendo por 48 h com aeração contínua para completar o processo de descloração. Para o suspensão de bioflocos e oxigenação da água, microperfurada anéis de mangueira (70 cm) foram colocados na posição central do macrocosmo, e uma pedra porosa (20 mm de diâmetro e 30 mm de altura) foi

instalado em cada microcosmo, alimentado por um soprador de ar radial (800 W). A água desclorada perdida por evaporação foi repostada no sistema. Por fim, foram colocados dois decantadores (um em cada macrocosmo) para controle os sólidos (Ray et al., 2010; Sousa et al., 2019), mantidos na faixa de 20 a 50 mL L⁻¹ (Avnimelech, 2007).

Uma semana antes do início do experimento, um inóculo de bioflocos maduros foi adicionado ao dispositivo experimental (300 L em cada macrocosmo), a partir de Uma cultura anterior de tilápia BFT do LAQUA-Oeste. O inóculo apresentou as seguintes características: amônia 0,21 mg L⁻¹, nitrito 0,06 mg L⁻¹, nitrato 0,39 mg L⁻¹, ortofosfato 46 mg L⁻¹, alcalinidade 30 mg L⁻¹ CaCO₃ e sólidos sedimentáveis 15 mL L⁻¹. Simultaneamente, 100 tilápias juvenis do Nilo (515 g), foram estocadas em cada macrocosmo visando a formação e manutenção dos bioflocos. Para este procedimento, utilizou-se a metodologia proposta por Emerenciano et al. (2012) aplicado usando uma relação C:N (carbono:nitrogênio) de 20:1 com adição diária de melão de cana-de-açúcar (líquido) como fonte externa de carbono e 28% Ração CP (Anhambí, Itapejara D'Oeste, PR, Brasil) como fonte de nitrogênio. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com quatro tratamentos e cinco repetições por tratamento. Os tratamentos consistia em vários níveis de fosfatidilcolina (0, 400, 800 e 1200 g/kg de ração) segundo Baldissiera et al. (2019). As dietas foram Elaborado a partir de uma dieta basal com 48% de proteína bruta (PB). No início do experimento, foram estocados duzentos juvenis de tilápia-do-nilo (peso inicial médio de 8,03 ± 0,03 g), sendo 10 peixes por unidade experimental. em uma densidade de 143 peixes m³O experimento durou 40 dias.

2.2. Dietas e manejo alimentar

As dietas experimentais (isoproteicas e isoenergéticas) foram formuladas e elaboradas no Laboratório de Nutrição Animal (LANA), Universidade Estadual de Santa Catarina (UDESC). Os ingredientes foram pesados (balança Marte®, modelo AS2000C, SP, Brasil), fosfatidilcolina adicionada (Tabela 1) de acordo com cada nível de tratamento (0, 400, 800 e 1200 g/kg de ração) e misturado. Após a mistura, água morna (36 °C) foi adicionada a 300 mL/kg de ração com ligante (gelatina, 1% do peso seco da ração) para peletização subsequente. Os pellets foram secos em estufa a 55 °C (Cienlab®, Campinas, SP, Brasil) por 48 h, após moagem em cadinhos de porcelana e peneiramento (peneira Bertel®, Caieiras, SP, Brasil) para obtenção tamanho de partícula consistente de 2,5 mm. As dietas foram armazenadas em frascos plásticos e identificados de acordo com cada tratamento. Os peixes foram alimentados três vezes ao dia (9:00, 13:30 e 17:00 h).

Tabela 1
Porcentagem e composição química da dieta basal da tilápia do Nilo (*Oreochromis nilo-ticus*) utilizada no experimento.

Formulação de ração básica	
Ingrediente	Quantidade
Farelo de soja 45%	30,00
Farinha de vísceras de aves	24,35
Farinha de arroz	18,89
Farinha de penas	15h00
Farinha de ossos e carne 45%	11h15
Pré-mistura-ap1	0,40
Antifúngico2	0,10
Antioxidante3	0,10
Composição Nutricional Calculada	
Nutrientes	Quantidade
Proteína bruta	48,00
Gordo	7,65
Fibra bruta	4,32
Amida	4,05
Cálcio	2,50
Lisina Total	2,31
Metionina total + cisteína total	1,67
Fosfato disponível	1,51
Sódio	0,28

Observação: ¹ Vacinar (Maringá, PR, Brasil); ² Moldzap alltech (São Paulo, Brasil); ³ Banox alltech (São Paulo, Brasil).

Durante as semanas 1 e 2, a quantidade de ração oferecida foi de 6% da biomassa e, até o final, 4% da biomassa foram oferecidos. A quantidade de ração foi ajustada semanalmente com base em dados obtidos por biometria. No macrocosmo, uma dieta comercial (28% de proteína bruta, Anhambí, Itapejara D'Oeste, PR, Brasil) foi oferecida duas vezes ao dia (9h e 17h) a 4% da biomassa.

2.3. Manutenção e monitoramento da qualidade da água

O pH (Alfakit®, modelo AT 315SP, Florianópolis, SC, Brasil), sólidos sedimentáveis (cone Imhoff), temperatura e oxigênio dissolvido (Alfakit®, modelo AT 160SP) foram monitorados diariamente. Semanalmente, as concentrações de amônia, nitrito, nitrato e ortofosfato foram medidas utilizando um fotocolorímetro (Alfakit®, modelo AT 100P) e a alcalinidade total foi medida por titulação volumétrica utilizando um kit comercial (Alfakit® – códigos 2058 e 2460). Na primeira semana do período experimental, o probiótico Keraacqua® (Farroupilha, RS, Brasil) foi adicionado à água para estimular o crescimento de bactérias heterotróficas e bioflocos, de acordo com o protocolo do fabricante.

2.4. Desempenho zootécnico e índice hepatossomático

Ao final do período experimental, todos os peixes foram pesados individualmente em balança digital com precisão de 0,01 g (Marte®, modelo: ML 600, São Paulo, Brasil). Os parâmetros zootécnicos avaliados foram: peso final (g); conversão alimentar (CA: consumo de ração/ganho de peso); taxa de crescimento específico (TCE: $100 \times \{ \text{peso final In} - \text{peso inicial In} \} / \text{dias de experimento}$); sobrevivência (%; $\{ \text{número final/inicial} \} \times 100$). O índice hepatossomático foi calculado como $(\text{peso do fígado (g)} / \text{peso final (g)} \times 100)$.

2.5. Coleta de peixes para análise hepatossomática e bioquímica

Após avaliação do desempenho zootécnico, três peixes de cada unidade experimental (15 por tratamento) foram anestesiados (eugenol 60 g/L) e, após não haver movimentação, os peixes foram pesados e o sangue (porção caudal) foi coletado sem anticoagulante para obtenção do soro. Após a coleta de sangue, os animais foram imediatamente eutanasiados por secção medular para retirada do fígado e brânquias. O arco branquial de cada peixe (lado direito, parte ventral para baixo) foi coletado para análise bioquímica. Para determinação do índice hepatossomático, foram utilizados três peixes de cada unidade experimental. O sangue, as brânquias e o fígado foram armazenados em microtubos de 2 mL refrigerados até o processamento e análise. Os procedimentos adotados foram realizados de acordo com o Comitê de Ética em Uso Animal (CEUA/UEDES).

2.6. Bioquímica sérica

Amostras de sangue foram centrifugadas a 5500xg por 10 min para obtenção do soro; o material foi coletado e armazenado em microtubos sob congelamento (-20 °C) até a análise. Os níveis séricos de aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), proteína total, albumina, triglicerídeos e colesterol foram medidos utilizando kits comerciais específicos (Analisa) em um equipamento semiautomático (Bio Plus, 2000). Os níveis de globulina foram calculados como níveis de proteína total-albumina.

2.7. Enzimas do metabolismo energético nas brânquias

Para avaliar enzimas pertencentes à rede de transferência de fosforil, 100 mg de filamentos branquiais foram lavados em tampão SET (0,32 M de sacarose, 1 mM de EGTA, 10 mM de Tris-HCl, pH 7,4) e homogeneizados (1:10 p/v) no mesmo tampão SET usando um homogeneizador de vidro Potter-Elvehjem. Os homogeneizados foram centrifugados a 800 x g por 10 min a 4 °C. Alguns desses sobrenadantes foram usados para avaliar a atividade da adenilato quinase (AK); os pellets foram descartados e os sobrenadantes foram novamente centrifugados a 10.000 x g por 15 min a 4 °C. Os sobrenadantes

contendo citosol foram coletados para determinação da atividade da piruvato quinase (PK) e da creatina quinase citosólica (CK). Os pellets, contendo mitocôndrias, foram lavados duas vezes com o mesmo tampão SET e ressuspensos em tampão Trizma 100 mM e MgSO₄ 15 mM (pH 7,5) para avaliar a atividade da CK mitocondrial. Os sobrenadantes foram armazenados por no máximo 1 semana a -80 °C.

A atividade da CK branquial foi avaliada com base no método colorimétrico estabelecido por Hughes (1962), estimando os níveis de creatina no comprimento de onda de 540 nm, conforme relatado em detalhes por Baldissera et al. Os resultados foram expressos como pmol de creatina formada/min/mg de proteína. A atividade PK branquial foi avaliada de acordo com o protocolo estabelecido por Leong et al. (1981) e publicado em detalhes por Baldissera et al. (2017). A atividade foi expressa como nmol de piruvato formado/min/mg de proteína. A atividade da AK branquial foi medida por meio de um ensaio enzimático acoplado com hexoquinase (HK) e glicose 6-fosfato desidrogenase (G6PD), de acordo com Dzeja et al. (1999) e descrito em detalhes por Baldissera et al. (2017). A atividade foi expressa em nmol de ATP formado/min/mg de proteína.

2.8. Estado oxidante e antioxidante no fígado

Os fígados foram homogeneizados (1:10 p/v) em meio contendo 120 mM de cloreto de potássio e 30 mM de tampão fosfato (pH 7,4) e centrifugados (800 x g, 10 min, -4 °C) e a fração sobrenadante obtida foi congelada a -20 °C. As concentrações de proteína foram determinadas pelo método do Azul de Coomassie, seguindo a metodologia descrita por Read e Northcote (1981), utilizando albumina sérica bovina como padrão.

A produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) foi avaliada pela determinação da 2',7'-diclorofluoresceína (DCF) em oxidação (Lebel et al., 1992). A DCFH-DA é hidrolisada por esterases intracelulares para formar DCF não fluorescente, que é então rapidamente oxidada para formar DCF altamente fluorescente na presença de EROs. A intensidade da fluorescência da DCF está correlacionada à quantidade de EROs formada. A fluorescência foi medida.

usando comprimentos de onda de excitação e emissão de 480 e 535 nm, respectivamente. Uma curva de calibração foi gerada usando DCF padrão (0,1–1 μM), e os dados foram calculados como U DCF/mg de proteína.

A peroxidação lipídica foi estimada utilizando substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico. O óleo essencial de biocolina induz estresse em tilápias. O ensaio de TBARS foi realizado utilizando uma reação de malondialdeído (MDA) com ácido 2-tiobarbitúrico (TBA), medido opticamente de acordo com Buege e Aust (1978). Os níveis de TBARS foram expressos em nmol de MDA/g de tecido. A atividade da superóxido dismutase foi determinada de acordo com o princípio de auto-oxidação do pirogalol, inibido na presença de SOD. A variação da densidade óptica foi determinada cineticamente por 2 min a 420 nm, em intervalos de 10 s, de acordo com a metodologia descrita por Beutler (1984). A atividade foi expressa em U de SOD/mg de proteína.

Além disso, a atividade da catalase (CAT) foi medida usando o método descrito por Nelson e Kiesow (1972). A mudança de absorbância de H₂O₂ após 60 s foi medida a 240 nm usando espectrofotometria ultravioleta. A atividade de CAT foi calculada e expressa como μmol CAT min/ mg de proteína. A atividade de GST foi medida de acordo com Mannervik e Guthenberg (1981) com pequenas modificações. A atividade de GST foi medida como a taxa de formação de dinitrofenil-S-glutatonina a 340 nm em um meio contendo 50 mM de fosfato de potássio, pH 6,5, 1 mM de GSH, 1 mM de 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) como substrato e sobrenadantes de tecido (aproximadamente 0,045 mg de proteína). Os resultados foram calculados e expressos como U GST/mg de proteína. Além disso, a atividade da GPx foi medida utilizando hidropéroxido de terc-butila como substrato (Wendel, 1981). A atividade enzimática foi determinada monitorando o desaparecimento de NADPH a 340 nm em um meio contendo 100 mM de tampão fosfato de potássio/1 mM de EDTA, pH 7,7, 2 mM de GSH, 0,1 U/mL de GR, 0,4 mM de azida, 0,5 mM de hidropéroxido de terc-butila, 0,1 mM de NADPH e sobrenadantes teciduais. Os resultados foram calculados e expressos em U GPx mg/proteína.

Tabela 2

Médias (± DP) dos parâmetros de qualidade da água da tilápia do Nilo suplementada com diferentes níveis de fosfatidilcolina (0, 400, 800 e 1200 mg de colina/kg de ração) criados em um sistema de bioflocos durante 40 dias.

Parâmetros	Nível de inclusão				
	0	400	800	1200	Macrocosmo
Oxigênio dissolvido (mg L ⁻¹)	6,50 ± 0,29	6,52 ± 0,29	6,57 ± 0,34	6,55 ± 0,35	6,48 ± 0,30
Temperatura (°C) pH	27,53 ± 1,26	27,62 ± 1,22	27,60 ± 1,21	27,63 ± 1,22	27,66 ± 1,24
7,07 ± 0,68 Sólidos sedimentáveis (mL L ⁻¹)	19,27 ± 14,06 ± 0,68	7,09 ± 0,68	7,09 ± 0,66		7,10 ± 0,67
Amônia (mg L ⁻¹)	0,21 ± 0,20				
Nitrito (mg L ⁻¹)	0,19 ± 0,16				
Nitrato (mg L ⁻¹)	0,28 ± 0,29				
Ortofosfato (mg L ⁻¹)	25,73 ± 14,65				
Alcalinidade (mg L ⁻¹ CaCO ₃)	44,50 ± 33,54				

2.9. Análise estatística

Estatísticas descritivas (média ± DP) foram utilizadas para descrever a parâmetros de qualidade da água em cada tratamento e macrocosmos. Os dados foram analisados usando a linguagem R, v.2.15.1 (R Development Core Team, 2012). A normalidade (teste de Shapiro-Wilk) e a homogeneidade (teste de Levene teste) foram avaliados. Os dados que não atenderam à distribuição normal foram logaritmizados transformados. Uma vez que os dados atenderam às premissas, diferenças significativas entre os tratamentos foram detectados através do teste de Tukey (Sokal e Rohlf, 1995). Todos os dados foram analisados com nível de significância de 5%. (P < 0,05).

3. Resultados

3.1. Qualidade da água, desempenho zootécnico e índice hepatossomático

Os resultados dos parâmetros de qualidade da água são apresentados na Tabela 2. Os valores foram semelhantes entre os tratamentos e os macrocosmos. o nível médio de oxigênio dissolvido foi de 6,52 ± 0,04 mg L⁻¹, temperatura 27,61 ± 0,05 °C e pH 7,08 ± 0,02. Em relação aos compostos nitrogenados, a amônia esteve presente em níveis de 0,21 ± 0,20 mg L⁻¹, nitrito 0,19 ± 0,16 mg L⁻¹ e nitrato 0,28 ± 0,29 mg L⁻¹. Ortofosfato e alcalinidade de os níveis foram de 25,73 ± 14,65 mg L⁻¹ e 44,50 ± 33,54 mg L⁻¹ de CaCO₃, respectivamente. Os sólidos sedimentáveis (volume de bioflocos) estavam presentes em média 19,27 ± 14,06 mL L⁻¹. As taxas de sobrevivência dos tratamentos T0, T400, T800 e T1200 foram 98%, 96%, 96% e 98%, respectivamente. Não houve diferenças significativas entre os tratamentos em termos de peso inicial, peso final, ganho de peso, ganho de biomassa, conversão alimentar, taxa de crescimento específica e índice hepatossomático (P > 0,05) (Tabela 3).

3.2. Bioquímica sérica

Não houve diferenças significativas entre os tratamentos com em relação aos níveis séricos de AST, albumina, colesterol e triglicerídeos (P > 0,05). Os níveis séricos de ALT foram significativamente menores com 800 mg/kg tratamento do que em outros níveis de tratamento.

Tabela 3

Desempenho zootécnico da tilápia do Nilo suplementada com diferentes níveis de fosfatidilcolina (0, 400, 800 e 1200 mg de colina/kg de ração) criada em bioflocos sistema durante 40 dias.

Variável	0	400	800	1200	Valor de p*
Peso inicial (g)	8,03 ± 0,03	8,04 ± 0,04	8,02 ± 0,005	8,02 ± 0,01	0,986
Peso final (g)	29,5 ± 1,5	28,8 ± 1,04	29,9 ± 2,46	29,4 ± 2,33	0,537
Ganho de peso (g/peixe)	21,5 ± 1,39	20,8 ± 0,95	21,8 ± 1,34	21,4 ± 1,98	0,495
BG (g/caixa)	209,1 ± 18,9	196,4 ± 12,5	206,9 ± 20,0	207,3 ± 21,8	0,384
FC	1,30 ± 0,09 3,34	1,36 ± 0,05 3,27	1,36 ± 0,28 3,34	1,32 ± 0,14 3,31	0,621
SGE (% dia ⁻¹)	± 0,13	± 0,09	± 0,26	± 0,28	0,453
DELE	2,86 ± 0,62	2,92 ± 0,75	2,95 ± 0,82	2,84 ± 0,87	0,620

BG = Ganho de biomassa; FC = Conversão alimentar; SGE = Taxa de crescimento específica; HSI = Índice hepatossomático. *Sem diferença significativa (P > 0,05).

Os níveis de globulina sérica e proteína total foram significativamente maiores em os grupos suplementados com 400 e 1200 mg/kg do que no controle grupo, enquanto os níveis séricos de glicose foram significativamente menores no grupo suplementado com 800 mg/kg (Tabela 4).

3.3. Atividade enzimática nas brânquias

A atividade da CK-CYT foi significativamente maior nas brânquias dos peixes alimentados com 800 e 1200 mg/kg de colina do que no controle (0 mg/kg), enquanto a atividade farmacocinética foi significativamente maior na tilápia alimentada com 1200 mg/kg de colina comparado ao controle. Não houve diferença significativa entre os tratamentos com relação à atividade das enzimas CK-MYT e AK (P > 0,05) (Tabela 5).

3.4. Estado oxidante e antioxidante no fígado

Os níveis de TBARS hepáticos foram significativamente menores em peixes dos três tratamentos suplementados com fosfatidilcolina do que no controle (P < 0,05), embora os níveis de ROS não tenham diferido significativamente entre tratamentos (P > 0,05). A atividade da GST foi significativamente maior nos fígados de peixes suplementados com fosfatidilcolina (800 e 1200 mg/kg) do que no grupo controle (P < 0,001), enquanto a atividade da SOD foi significativamente menor nos mesmos grupos. Finalmente, as atividades de GPx e CAT foram significativamente menores no grupo de 1200 mg/kg de colina do que no grupo controle (Tabela 6).

4. Discussão

Os parâmetros de qualidade da água permaneceram dentro dos níveis ideais para as espécies ao longo do experimento (El-Sayed, 2006). Os valores foram consistentes com os de outros experimentos de BFT com tilápia (Azim e Little, 2008; Brol et al., 2017; Sousa et al., 2019). A alcalinidade apresentou média de 44,50 ± 33,54 mg L⁻¹ de CaCO₃, abaixo daqueles recomendado por Avnimelech (2015) com > 100 mg L⁻¹ de CaCO₃ visando manter o processo de nitrificação e a absorção de amônia por bactérias heterotróficas (Hargreaves, 2013). No entanto, o nível observado no o presente estudo não alterou a dinâmica do sistema de pH e nitrogênio

Tabela 4

Bioquímica sérica de tilápia do Nilo (n = 10 por tratamento) suplementada com diferentes níveis de fosfatidilcolina (0, 400, 800 e 1200 mg de colina/kg de ração) criados em um sistema de bioflocos durante 40 dias.

Variável	0	400	800	1200	Valor de p
AST	114,2 ± 29	118,1 ± 36,6	86,5 ± 30,2	90,1 ± 33,7	0,168
ALT	28,0 ± 1,0	26,0 ± 1,50	16,5 ± 1,91	30,20 ± 5,05	0,001*
Proteína total	3,62 ± 0,6	4,46 ± 0,85	4,13 ± 0,70	4,34 ± 0,65	0,050*
Albumina	0,90 ± 0,35	0,89 ± 0,37	0,96 ± 0,43	0,90 ± 0,34	0,895
Globulina	2,45 ± 0,49	3,57 ± 0,81	3,17 ± 0,51	3,44 ± 0,56	0,047*
Glicose	54,8 ± 11,5	59,5 ± 11,7	47,4 ± 5,76	64,4 ± 13,2	0,028*
Colesterol	86,2 ± 14,7	85,8 ± 13,2	88,4 ± 15,7	89,7 ± 10,6	0,924
Triglicerídeos	175,4 ± 32,5	178,8 ± 52,6	156,4 ± 64,7	167,5 ± 42,9	0,687

Nota: O asterisco (*) indica a diferença entre os grupos, sendo a diferença representada por letras diferentes (a, b, c) na mesma linha (P < 0,05). Aspartato aminotransferase (AST: U/L), alanina aminotransferase (ALT: U/L), proteína total (g/dL), albumina (g/dL), globulina (g/dL), glicose (mg/dL), colesterol (mg/dL) e triglicerídeos (mg/dL).

compostos e, portanto, não impactaram negativamente a água em geral qualidade. Ortofosfato apresentado de uma média de 25,73 ± 14,65 mg L⁻¹, um valor semelhante ao relatado por [Sousa et al. \(2019\)](#) de 27,45 mg L⁻¹. A acumulação deste composto é comum no sistema BFT ([Wasielecky et al., 2006](#); [Emerenciano et al., 2017](#)).

No presente estudo, não houve efeito da fosfatidilcolina suplementação no desempenho zootécnico da tilápia. Em contrapartida, [Baldiissera et al. \(2019\)](#) mostraram que a inclusão dietética de 800 mg de fosfatidilcolina/kg em juvenis de tilápia do Nilo (7,10 g) por 61 dias em água limpa melhorou o desempenho do crescimento. Além disso, os autores observou-se no tratamento controle uma média de 24,75 g de peso final, menor que 29,5 g em 40 dias no tratamento controle do presente experimento (peso inicial de 8,03 g). Isso pode sugerir que os bioflocos contribuiu para o crescimento e pode ter suprido a demanda por fosfatidilcolina. Este nutriente estaria naturalmente disponível no forma de microrganismos consumidos pelos peixes, incluindo heterotróficos bactérias, rotíferos, microalgas, nemátodos, anelídeos, protozoários, bactérias heterotróficas e copépodes ([Ray et al., 2010](#); [Sousa et al., 2019](#)). Em Além disso, os bioflocos contêm proteínas, lipídios, ácidos graxos e minerais essenciais. aminoácidos, bem como vitaminas ([Ju et al., 2008](#); [Emerenciano et al., 2013](#); [Ekasari e outros, 2014](#)).

[Khosravi et al. \(2015\)](#) sugeriram que peixes alimentados com dietas deficientes em colina podem apresentar diminuição da ingestão alimentar, retardo de crescimento e baixa sobrevida; isso não foi relatado no presente estudo. Outra explicação pois os diferentes resultados entre bioflocos e água limpa podem estar relacionados à composição nutricional da dieta, e a digestibilidade diferencial dos alimentos pode afetar o fornecimento de micronutrientes e desempenho geral dos peixes ([Furuya e Furuya, 2010](#)). Com relação a índice hepatossomático (HSI), não houve diferenças significativas entre os tratamentos (P > 0,05). Os autores esperariam que isso índice pode ser afetado positivamente pela fosfatidilcolina devido à sua função hepatoprotetora ([Baldiissera et al., 2019](#)); no entanto, esta não aconteceu.

Altos níveis de AST e ALT podem indicar condições fisiológicas ou patológicas, por exemplo, por um aumento do catabolismo proteico ([Luo et al., 2016](#)) ou danos no fígado. No presente estudo, a AST não diferiu entre

tratamentos; no entanto, a ALT apresentou níveis mais baixos no grupo de 800 mg de fosfatidilcolina/kg, possivelmente sugerindo que esta dose teve um efeito efeito hepatoprotetor durante a síntese de proteínas, corroborando os efeitos protetores da colina no sistema hepático ([Baldiissera et al., 2019](#)).

Os níveis totais de proteína sérica aumentaram nos grupos com fosfatidilcolina como resultado do aumento da globulina, uma fração proteica que inclui proteínas envolvidas na resposta imune. Estudos demonstraram que o aumento dos níveis de globulina sanguínea implica em uma melhora na resposta imune sistema de peixes ([Elkamel e Mosaad, 2012](#); [Dorucu et al., 2009](#)), sugerindo que a fosfatidilcolina estimulou direta ou indiretamente o sistema imunológico. O mecanismo permanece desconhecido; no entanto, merece mais pesquisas. Em nosso estudo, observamos níveis séricos de glicose mais baixos em peixes alimentados com 800 mg/kg de fosfatidilcolina, um bom indicador de menor estresse. Em um estudo conduzido por [Baldiissera et al. \(2019\)](#)

Os níveis de glicose no fígado da tilápia foram maiores quando suplementados com 1200 mg/kg. Geralmente, níveis elevados de glicose podem sugerir distúrbios metabólicos e bioquímicos que comprometeriam a produção de ATP.

A CK está presente no citoplasma e nas mitocôndrias da célula geralmente atua como um regulador da homeostase energética ([Wallimann et al., 1998](#)). Em No presente estudo, foi observada maior atividade de CK-CYT nas brânquias de peixes alimentados com 800 e 1200 mg/kg de fosfatidilcolina, sugerindo aumento na produção de ATP nas células branquiais. Houve também aumento na PK atividade com a inclusão de fosfatidilcolina. Este fenômeno podem beneficiar os peixes porque essas enzimas normalmente regulam a energia metabolismo e pode afetar positivamente a saúde dos peixes ([Baldiissera et al., 2017](#)). De acordo com [Wang et al. \(2002\)](#) PK é a principal via de energia fornecimento às células dos tecidos, ou seja, o aumento da atividade da PK pode ter estimulou a geração de ATP nas brânquias. Corroborando nossas observações, [Baldiissera et al. \(2019\)](#) relataram um aumento significativo na atividade farmacocinética hepática da tilápia do Nilo alimentada com dietas contendo 800 e 1200 mg de colina/kg de ração, sugerindo aumento de piruvato e Produção de ATP no tecido hepático, aumentando a transferência e distribuição de energia, além de contribuir para o equilíbrio entre o consumo e a produção de trifosfato de adenosina (ATP) celular. Portanto, O aumento da atividade PK branquial pode contribuir para a melhoria da transferência e distribuição de energia em tecidos com maiores necessidades energéticas, incluindo tecido branquial ([Baldiissera et al., 2019](#)).

Tabela 5

Enzimas envolvidas no metabolismo energético nas brânquias de tilápia do Nilo (n = 10 por tratamento) suplementadas com diferentes níveis de fosfatidilcolina (0, 400, 800 e 1200 mg de colina/kg de ração) criados em um sistema de bioflocos durante 40 dias.

Variável	0	400	800	1200	Valor de p
CK-MIT	0,65 ± 0,11	0,65 ± 0,11	0,60 ± 0,10	0,61 ± 0,09	0,512
CK-CYT	0,27 ± 0,05	0,31 ± 0,09	0,41 ± 0,05	0,40 ± 0,06a	0,011*
PK	0,11 ± 0,03	0,15 ± 0,03	0,17 ± 0,05	1,20 ± 0,05	0,001*
AK	0,25 ± 0,04	0,29 ± 0,11	0,31 ± 0,04	0,29 ± 0,04	0,056

Nota: O asterisco (*) indica a diferença entre os grupos; a diferença é representada por letras diferentes (a, b, c) na mesma linha (P < 0,05). Creatina mitocondrial cinase (CK-MIT: pmol de creatina formada/min/mg de proteína), cinase creatina citosólica (CK-CYT: pmol de creatina formada/min/mg de proteína), cinase piruvato (PK: nmol piruvato formado/min/mg de proteína) e adenilato quinase (AK: nmol ATP formado/min/mg de proteína).

Tabela 6

Variáveis oxidantes e antioxidantes no fígado de tilápia do Nilo (n = 10 por tratamento) suplementada com diferentes níveis de fosfatidilcolina (0, 400, 800 e 1200 mg de colina/kg de ração) criados em um sistema de bioflocos durante 40 dias.

Variável	0	400	800	1200	Valor de p
TBARS	7,62 ± 1,81a	5,85 ± 1,36 ^b	5,75 ± 0,98 ^b	5,68 ± 0,96 ^b	0,001*
ROS	1,96 ± 0,38	1,86 ± 0,64	1,76 ± 0,60	1,83 ± 0,51	0,725
GPx	1,1 ± 0,23 ⁻⁻⁻	0,99 ± 0,34 ^{ab}	0,75 ± 0,33 ⁻⁻⁻⁻	0,60 ± 0,18 ^b	0,050*
GST	4,41 ± 1,47 ^b	8,65 ± 3,14 ⁻⁻⁻⁻	12,7 ± 4,67 ⁻⁻⁻	12,2 ± 2,76 ⁻⁻⁻	0,001*
SOD	3,20 ± 0,50 ⁻⁻⁻	partir de 3,49 ± 0,98 ^a	2,59 ± 0,31 ^{a,c}	2,12 ± 0,22 ^c	0,001*
GATO	0,94 ± 0,25 ⁻⁻⁻	0,84 ± 0,28 ⁻⁻⁻⁻	0,69 ± 0,15 ⁻⁻⁻⁻	0,62 ± 0,14 ^b	0,020*

Nota: O asterisco (*) indica a diferença entre os grupos; a diferença é representada por letras diferentes (a, b, c) na mesma linha (P < 0,05). Peroxidação lipídica (TBARS: nmol MDA/g de tecido), espécies reativas de oxigênio (ROS: U DCF/mg de proteína), glutatona peroxidase (GPx: U GPx/mg de proteína), glutatona S-transferase (GST: U GST/mg de proteína), superóxido dismutase (SOD: U SOD/mg de proteína) e catalase (CAT: μmol/mg de proteína/min).

Doses de colina de 400, 800 e 1200 mg/kg diminuíram a peroxidação lipídica no fígado, conforme observado por Baldissera et al. (2019). As células têm sistemas antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos responsáveis por mantendo o equilíbrio oxidante/antioxidante, evitando assim danos reações bioquímicas. No primeiro estudo com fosfatidilcolina em tilápia, os pesquisadores descobriram que, nos fígados dos peixes suplementados, a capacidade antioxidante total foi maior (Baldissera et al., 2019). No no presente estudo, medimos a atividade de GPx, GST, SOD e CAT, porque estas enzimas constituem defesas contra os radicais livres em níveis exacerbados; no entanto, é importante mencionar que os peixes o sistema de defesa também pode produzir radicais livres para eliminar patógenos; portanto, o equilíbrio entre oxidantes e antioxidantes é importante para a saúde dos peixes. Essas enzimas antioxidantes são importantes para o fígado, desempenhando diversas funções, incluindo a desintoxicação. Essas enzimas são também a primeira linha de defesa das células contra os radicais livres (Hegazi et al., 2010) que, se não bloqueados, causam estresse oxidativo. Hoseinifar et al. (2016) avaliaram o extrato de palma em dietas de carpa comum (4,06 g) e observou-se um aumento nas defesas antioxidantes; GPx foi a principal enzima estimulado pelo extrato de palma. Não observamos esse efeito no presente estudo. Observamos menor atividade dos antioxidantes CAT, SOD e GPx enzimas nos fígados de peixes suplementados com fosfatidilcolina. Essas enzimas são estimuladas por vários fatores, principalmente quando o peixe entra em contato com microrganismos patogênicos presentes no sistema de cultura (Yilmaz, 2019). No sistema de bioflocos, como mencionado, o quantidades de microrganismos são substanciais, possivelmente causando estimulação do sistema antioxidante. Portanto, nossa hipótese é que a colina fígados protegidos nos grupos de 800 e 1200 mg/kg. O mecanismo não houve redução na atividade das enzimas antioxidantes nestes grupos; em vez disso, houve aumento da atividade enzimática hepática nos grupo controle (0 mg/kg).

GST é uma das enzimas antioxidantes mais importantes do fígado. Sua principal função é o sequestro de radicais livres. A atividade de esta enzima aumenta na presença de alguns aditivos alimentares (Metwally et al., 2009). Essa noção foi confirmada quando a fosfatidilcolina influenciou diretamente a atividade da GST hepática no presente estudo. Houve um aumento na atividade de GST em níveis mais elevados de inclusão de fosfatidilcolina, causando um efeito hepatoprotetor e, consequentemente, reduzindo a necessidade da atividade das outras enzimas antioxidantes. O mecanismo pelo qual a fosfatidilcolina estimula a GST é desconhecido; no entanto, a colina já foi associada à regulação da resposta antioxidante em órgãos envolvidos no sistema imunológico resposta dos peixes (Wu et al., 2014). Wu et al. (2014) descobriram que os vegetais colina (310, 607, 896, 1167 e 1820 mg/kg) por 65 dias melhorou o sistema de defesa antioxidante nos órgãos imunológicos (cabeça, rim e baço) da carpa comum (Cyprinus carpio), concluindo que a melhoria do sistema de defesa antioxidante pode contribuir para o aumento da sistema imunológico dos peixes, otimizando a resposta imunológica a patógenos. Shiu et al. (2017) relataram que a colina (1 g/kg) alterou a proteína plasmática perfil e expressão modulada de proteínas imunoestimuladoras relacionadas de Epinephelus coioides, proteínas que desempenham papéis importantes nas respostas imunológicas contra patógenos, sugerindo o uso potencial de

colina para fortalecer o sistema imunológico. É evidente aqui que a fosfatidilcolina influenciou direta e indiretamente no metabolismo de carboidratos séricos, o metabolismo energético das brânquias e o estado antioxidante do fígado da tilápia do Nilo criada no sistema BFT; no entanto, esses efeitos não foram suficientes para se refletirem no desempenho produtivo durante os primeiros 42 dias de suplementação. Portanto, estudos de longo prazo são importantes para verificar o impacto na desempenho produtivo desses peixes.

5. Conclusão

Nossos resultados sugerem que a suplementação dietética de fosfatidilcolina em tilápias do Nilo criadas em sistema BFT não melhorou o desempenho zootécnico. No entanto, a suplementação de fosfatidilcolina estimulou o metabolismo energético (importante na regulação da homeostase celular), bem como a atividade da GST contribuindo para uma menor taxas de peroxidação lipídica.

Comitê de ética

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais em Pesquisa na Universidade Estadual de Santa Catarina, número: 9595130319.

Declaração de interesses conflitantes

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico Desenvolvimento Tecnológico - CNPq (Brasil) e o Programa de Apoio Científico e Fundação de Amparo à Pesquisa Tecnológica do Estado de Santa Catarina - FAPESC. M Emerenciano e AS Da Silva são pesquisadores do CNPq. Em além disso, o primeiro autor recebeu bolsa de mestrado da CAPES (Brasil). Os autores agradecem a toda a equipe do LAQUA-Oeste pelo suporte técnico.

Referências

Avnimelech, Y., 2007. Alimentação com flocos microbianos por tilápias em tanques com tecnologia de bioflocos de descarga mínima. Aquaculture 264, 140–147. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.11.025>.

Avnimelech, Y., 2015. Tecnologia de Bioflocos - um Guia Prático, 3ª ed. J. World Aquaculture Soc., Baton Rouge, Louisiana, EUA.

Azim, ME, Little, DC, 2008. A tecnologia de bioflocos (BFT) em tanques internos: água qualidade, composição de bioflocos, crescimento e bem-estar da tilápia do Nilo (Oreochromis niloticus). Aquicultura 283, 29–35. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.06.036>.

Baldissera, MD, Souza, CF, Baldisserotto, B., Zimmer, F., Paiano, D., Petroliti, TG, da Silva, AS, 2019. Colina vegetal melhora o desempenho de crescimento, o metabolismo energético e a capacidade antioxidante de alevinos de tilápia do Nilo (Oreochromis niloticus). Aquicultura 501, 224–229. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.11.021>.

Baldissera, MD, Souza, CF, Santos, RCV, Stefani, LM, Moreira, KLS, da Veiga, ML, Rocha, MIUM, Baldisserotto, B., 2017. A cepa PA01 de Pseudomonas aeruginosa prejudica enzimas da rede de fosforotransferência nas brânquias de Rhamdia quelen. Veterinário.

- Microbiol. 201, 121–125. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2017.01.016>.
- Beutler, E., 1984. *Superóxido dismutase*. Em: Beutler, E. (Ed.), *Metabolismo de Células Vermelhas. Um Manual de Métodos Bioquímicos*. Grune & Stratton, Filadélfia, PA.
- Brol, J., Pinho, SM, Sgnaulin, T., Pereira, KR, Thomas, MC, de Mello, GL, Miranda-Baeza, A., Emerenciano, MGC, 2017. Tecnologia de bioflocos (BFT) no desempenho zootécnico de tilápias: efeito da linhagem e densidades de estocagem. *Arco. Zootec.* 66, 229–235. <https://doi.org/10.21071/az.v66i254.2326>.
- Buege, JA, Aust, SD, 1978. Peroxidação lipídica microsomal. *Methods Enzymol.* 52, 302–310. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(78\)52032-6](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(78)52032-6).
- Crab, R., Defoirdt, T., Bossier, P., Verstraete, W., 2012. Tecnologia de bioflocos na aquicultura: efeitos benéficos e desafios futuros. *Aquaculture* 356–357, 351–356. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.04.046>.
- Cyrino, JEP, Bicudo, AJA, Sado, RY, Borghesi, R., Dairiki, JK, 2010. A piscicultura e o ambiente – o uso de alimentos ambientalmente corretos em piscicultura. *Rev. Brás. Zootec.* 39, 68–87.
- De Lima, ECR, Souza, RL, Girão, LJM, Braga, IFM, Correia, ES, 2018. Cultivo de tilápias do Nilo em sistema de bioflocos com diferentes fontes de carbono. *Rev. Cien. Agranon.* 49, 458–466.
- Devlin, TM, 2000. *Manual de bioquímica com correlações químicas*. Edgard Blucher, São Paulo.
- Dorucu, M., Colak, SO, Ispir, U., Altinterim, B., Celayir, Y., 2009. O efeito do preto sementes de cominho, *Nigella sativa*, na resposta imune da truta arco-íris, *Oncorhynchus mykiss*. *Mediter. Aquaculture J.* 02, 27–33.
- Dzeja, PP, Vitkevicius, KT, Redfield, MM, Burnett, JC, Terzic, A., 1999. Fosforotransferência catalisada por adenilato quinase no miocárdio: aumento da contribuição na insuficiência cardíaca. *Circ. Res.* 84, 1137–1143. <https://doi.org/10.1161/01.RES.84.10.1137>.
- Ekasari, J., Angela, D., Waluvo, SH, Bachtir, T., Surawibjaja, EH, Bossier, P., de Schryver, P., 2014. O tamanho do biofoco determina a composição nutricional e a recuperação de nitrogênio por animais de aquicultura. *Aquaculture* 426–427, 102–111. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.01.023>.
- Elkamel, AA, Mosaad, GM, 2012. Imunomodulação de tilápias do Nilo, *Oreochromis niloticus*, por *Nigella sativa* e *Bacillus subtilis*. *J. Aquac. Res. Dev.* 3. <https://doi.org/10.4172/2155-9546.1000147>.
- El-Sayed, AM, 2006. *Cultura de tilápias. Série de publicações CABI*, Egito, 2006.
- Emerenciano, M., Ballester, ELC, Cavalli, RO, Wasielesky, W., 2012. Tecnologia de bioflocos Aplicação da tecnologia como fonte de alimento em um sistema de viveiro com troca limitada de água para o camarão-rosa *Farfantepenaeus brasiliensis* (Latreille, 1817). *Aquacult. Res.* 43, 447–457. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2011.02848.x>.
- Emerenciano, M., Gaxiola, G., Cuzon, G., 2013. Tecnologia de Bioflocos (BFT): uma revisão para 347 aplicações em aquicultura e indústria de ração animal. *J. World Aquacult. Soc.*, Baton Rouge, Louisiana, Estados Unidos.
- Emerenciano, MGC, Martínez-Córdova, LR, Martínez-Porchas, M., Miranda-Baeza, A., 2017. Tecnologia de Bioflocos (BFT): Uma Ferramenta para Gestão da Qualidade da Água na Aquicultura. *IntTech*, pp.
- Furuya, WM, Furuya, VRB, 2010. Inovações nutricionais na suplementação de aminoácidos em dietas para tilápias do Nilo. *Rev. Bras. Zootec.* 39, 88–94. <https://doi.org/10.1590/S1516-35982010001300010>.
- Halver, JE, Hardy, RW, 2002. *Nutrição de Peixes*. Elsevier, San Diego.
- Hargreaves, JA, 2013. *Sistemas de Produção de Bioflocos para Aquicultura*. Região Sul Centro de Aquicultura.
- Hegazi, MM, Attia, Zi, Ashour, OA, 2010. Estresse oxidativo e enzimas antioxidantes no fígado e no músculo branco de juvenis de tilápias do Nilo expostos à amônia crônica. *Aquat. Toxicol.* (NY) 99, 118–125. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2010.04.007>.
- Hoseinfar, SH, Ringo, E., Masouleh, AS, Esteban, MA, 2016. Suplementos probióticos, prebióticos e simbióticos na aquicultura de esturjão: uma revisão. *Rev. Aquac.* 8, 89–102. <https://doi.org/10.1111/raq.12082>.
- Hughes, BP, 1962. Um método para estimativa da creatina quinase sérica e seu uso em Comparando a atividade da creatina quinase e da aldolase em soros normais e patológicos. *Clin. Chim. Acta* 7, 597–603. [https://doi.org/10.1016/0009-8981\(62\)90137-7](https://doi.org/10.1016/0009-8981(62)90137-7).
- Ju, ZY, Forster, I., Conquest, L., Dominy, W., 2008. Efeitos de aumento do crescimento em camarão (*Litopenaeus vannamei*) a partir da inclusão de frações de flocos inteiros de camarão em uma dieta formulada. *Aquacult. Nutrição.* 14, 533–543. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2007.00559.x>.
- Khosravi, S., Jang, JW, Rahimnejad, S., Song, JW, Lee, KJ, 2015. Essencialidade da colina E sua necessidade em dietas para juvenis de peixe-papagaio (*Oplehnatus fasciatus*). *Asiático-Australiano. J. Anim. Sci.* 28, 647–653. <https://doi.org/10.5713/ajas.14.0532>.
- Kim, SK, Pang, Z., Seo, HC, Cho, YR, Samocha, T., Jang, IK, 2014. Efeito dos bioflocos no crescimento e na atividade imunológica do camarão branco do Pacífico, *Litopenaeus vannamei* pós-larvas. *Aquacult. Res.* 45, 362–371. <https://doi.org/10.1111/are.12319>.
- Kumar, A., 2009. Eficácia comparativa da biocolina à base de ervas e do cloreto de colina sintético (60%) em frangos de corte comerciais. *Poult. Technol.* 3, 38–40.
- Lebel, CP, Ischiropoulos, H., Bondy, SC, 1992. Avaliação da sonda 2', 7' – di-clorofluorescina como indicador de formação de espécies reativas de oxigênio e estresse oxidativo. *Chem. Res. Toxicol.* 5, 227–231. <https://doi.org/10.1021/cx00026a012>.
- Leong, SF, Lai, JCK, Lim, L., Clark, JB, 1981. Enzimas metabolizadoras de energia em regiões cerebrais de ratos adultos e idosos. *J. Neurochem.* 37, 1548–1556. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1981.tb06326.x>.
- Luo, Z., Wei, C.-C., Ye, H.-M., Zhao, H.-P., Song, Y.-F., Wu, K., 2016. Efeito dos níveis de colina na dieta sobre o desempenho de crescimento, a deposição de lipídios e o metabolismo em juvenis de bagre amarelo *Pelteobagrus fulvidraco*. *Comp. Bioquímica. Fisiologia. B. Bioquímica. Mol. Biol.* 202, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2016.07.005>.
- Mannervik, B., Guthenberg, C., 1981. Glutathione transferase (placenta humana). *Methods Enzymol.* 77, 231–235. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(81\)77030-7](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(81)77030-7).
- Metwally, MAA, 2009. Efeitos do alho (*Allium sativum*) em algumas atividades antioxidantes na tilápias nilótica (*Oreochromis niloticus*). *Mundo J. Fish Mar.* 1, 56–64.
- Nelson, DP, Kiesow, LA, 1972. Entalpia de decomposição de peróxido de hidrogênio pela catalase a 25°C (com coeficientes de extinção molar de soluções de H₂O₂ no UV). *Anal. Bioquímica.* 49, 474–478. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(72\)90451-4](https://doi.org/10.1016/0003-2697(72)90451-4).
- Ray, AJ, Lewis, BL, Browdy, CL, Leffler, JW, 2010. Remoção de sólidos em suspensão para Melhoria na produção de camarão (*Litopenaeus vannamei*) e avaliação de uma ração vegetal em sistemas de cultivo superintensivos de troca mínima. *Aquaculture* 299, 89–98. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2009.11.021>.
- Read, SM, Northcote, DH, 1981. Minimização da variação na resposta a diferentes proteínas do ensaio de ligação do corante azul de Coomassie G para proteínas. *Anal. Biochem.* 116, 53–64. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(81\)90321-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(81)90321-3).
- Reda, RM, Mahmoud, R., Selim, KM, El-Araby, Ie, 2016. Efeitos de acidificantes dietéticos no crescimento, hematologia, resposta imune e resistência a doenças da tilápias do Nilo, *Oreochromis niloticus*. *Fish Shellfish Immunol.* 50, 255–262. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2016.01.040>.
- Shiu, YL, Chiu, KH, Huynh, TG, Liu, PC, Liu, CH, 2017. Análise de proteínas imunes plasmáticas na garoupa-de-manchas-laranjas *Epinephelus coioides*: evidências de expressões alteradas de fatores imunológicos associados a uma dieta suplementada com colina. *Fish Shellfish Immunol.* 65, 235–243.
- Sokal, R., Rohlf, J., 1995. *Biometria: Princípios e Prática da Estatística em Pesquisa Biológica*. WH Freeman, Nova Iorque.
- Sousa, AA, Pinho, SM, Rombenso, AN, Mello, GL, Emerenciano, MGC, 2019. Subproduto de pizzaria: fonte complementar de alimentação para tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) criada em tecnologia de bioflocos? *Aquicultura* 501, 359–367. <https://doi.org/10.1016/j.aquicultura.2018.11.055>.
- Turchini, GM, Trushenski, JT, Glencross, BD, 2018. Reflexões sobre o futuro de Nutrição em aquicultura: realinhando perspectivas para refletir questões contemporâneas relacionadas ao uso criterioso de recursos marinhos em rações aquáticas. *N. Am. J. Aquacult.* 81, 13–39. <https://doi.org/10.1002/naaq.10067>.
- Wallimann, T., Dolder, M., Schlattner, U., Eder, M., Hornemann, T., O'Gorman, E., Rück, A., Brediczka, D., 1998. Alguns novos aspectos da creatina quinase (ck): compartimentação, estrutura, função e regulação para bioenergética e fisiologia celular e mitocondrial. *Biofactors* 08, 229–234.
- Wang, H., Chu, W., Das, SK, Ren, Q., Hasstedt, SJ, Elbein, SC, 2002. Polimorfismos da piruvato quinase hepática estão associados ao diabetes tipo 2 em caucasianos do norte da Europa. *Diabetes* 51, 2861–2865. <https://doi.org/10.2337/diabetes.51.9.2861>.
- Wasielesky, W., Atwood, H., Stokes, A., Browdy, CL, 2006. Efeito da produção natural em um sistema de cultivo superintensivo com flocos microbianos suspensos e com troca zero para o camarão branco *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture* 258, 396–403. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.04.030>.
- Wendel, A., 1981. Glutathione peroxidase. *Methods Enzymol.* 77, 325–333. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(81\)77046-0](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(81)77046-0).
- Wu, P., Jiang, W.-D., Liu, Y., Chen, G.-F., Jiang, J., Li, S.-H., Feng, L., Zhou, X.-Q., 2014. Efeito da colina nas defesas antioxidantes e nas expressões genéticas da molécula de sinalização Nr12 no baço e no rim da cabeça de carpas Jian juvenis (*Cyprinus carpio* var. Jian). *Peixes e mariscos Imunol.* 38, 374–382. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2014.03.032>.
- Yilmaz, S., 2019. Efeitos da suplementação dietética de ácido cafeico nas respostas antioxidantes, imunológicas e de expressão gênica hepática, e na resistência da tilápias do Nilo, *Oreochromis niloticus*, à *Aeromonas veronii*. *Fish Shellfish Immunol.* 86, 384–392. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.11.068>.