

**UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA – UDESC  
CENTRO DE EDUCAÇÃO SUPERIOR DO OESTE – CEO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA – PPGZOO**

**MARCELA MACHADO**

**ADIÇÃO DE ÓLEOS ESSENCIAIS EM CONCENTRADO CONTAMINADO POR  
TRICOTECENOS (T-2 e HT-2) CONSUMIDO POR BEZERROS LEITEIROS:  
EFEITOS SOBRE DESEMPENHO E SAÚDE ANIMAL**

**CHAPECÓ**

**2022**

**MARCELA MACHADO**

**ADIÇÃO DE ÓLEOS ESSENCIAIS EM CONCENTRADO CONTAMINADO POR  
TRICOTECENOS (T-2 e HT-2) CONSUMIDO POR BEZERROS LEITEIROS:  
EFEITOS SOBRE DESEMPENHO E SAÚDE ANIMAL**

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Zootecnia pelo Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC.  
Orientadora: Profa PhD Lenita de Cássia Moura Stefani  
Coorientador: Prof. Dr. Aleksandro Schafer da Silva

**CHAPECÓ**

**2022**

**Ficha catalográfica elaborada pelo programa de geração automática da  
Biblioteca Setorial do CEO/UDESC,  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)**

Machado, Marcela

Adição de óleos essenciais em concentrado contaminado por Tricotecenos (t-2 e HT-2) consumido por bezerros leiteiros : efeitos sobre o desempenho e saúde animal / Marcela

Machado. -- 2022.

55 p.

Orientador: Lenita de Cássia Moura Stefani

Coorientador: Aleksandro Schafer da Silva

Dissertação (mestrado) -- Universidade do Estado de Santa Catarina, Centro de Educação Superior do Oeste, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Chapecó, 2022.

1. Antioxidante. 2. Bezerros. 3. Imunidade. 4. Micotoxina. 5. Óleos essenciais. I. Stefani, Lenita de Cássia Moura . II. Silva, Aleksandro Schafer da. III. Universidade do Estado de Santa Catarina, Centro de Educação Superior do Oeste, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia. IV. Título.

**MARCELA MACHADO**

**ADIÇÃO DE ÓLEOS ESSENCIAIS EM CONCENTRADO CONTAMINADO POR  
TRICOTECENOS (T-2 e HT-2) CONSUMIDO POR BEZERROS: EFEITOS SOBRE  
DESEMPENHO E SAÚDE ANIMAL**

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Zootecnia pelo Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, da Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC.  
Orientadora: Profa PhD Lenita de Cássia Moura Stefani  
Coorientador: Prof. Dr. Aleksandro Schafer da Silva

**BANCA EXAMINADORA**

Membros:

Prof. Dr. Aleksandro Schafer da Silva  
Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC)

Profa. Dra. Carine de Freitas Souza  
Instituto Superior e Centro Educacional Luterano Bom Jesus (IELUSC - BOM  
JESUS)

Prof. Dr. Eduardo Micotti da Gloria  
Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz/ Universidade de São Paulo  
(ESALQ/USP)

Chapecó, 5 de agosto de 2022.

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus pois tenho comigo “que tudo posso naquele que me fortalece”; também a minha família já que sem eles nada disso teria acontecido. Todo apoio e carinho de todos foram fundamentais para que cada etapa fosse concluída. Especialmente ao meu marido, Paulo Eduardo Zambom, que com muito amor me auxiliou durante estes dois anos, do incentivo aos estudos até “bater ração” de final de semana: jamais teria concluído sem sua ajuda. Não poderia deixar de citar meus pais que não me deixaram desistir em nenhum momento, sempre me motivando ao máximo, assim como meus filhos que foram e são a minha dose de ânimo diária!

Foram dois anos de muitos desafios, entre família, trabalho e estudos, e é claro a paciência e dedicação da minha orientadora Lenita de Cássia Moura Stefani que topou participar da minha pesquisa e que com muita atenção me ajudou sem medir esforços. E não menos que isso, meu co-orientador Aleksandro Schafer da Silva que foi o responsável por fazer acontecer e me direcionar sempre no caminho correto. Para ambos a minha gratidão e meu muito obrigado por tudo.

Não poderia deixar de citar as pessoas que estiveram lá me auxiliando em todas as análises de campo e laboratoriais, Tayse Burger Neto Zanin e Luisa Nora, como também todos os envolvidos em todos os processos da pesquisa. Fica o meu muito obrigado!

Pra finalizar, meu muito obrigada a Universidade do Estado de Santa Catarina, a qual tenho um enorme carinho por todos que fazem parte dela. Tenham certeza que cada professor e aluno deixou uma marca na minha vida profissional e eu sou imensamente grata por poder vivenciar isto e poder crescer profissionalmente, mas também pessoalmente com todos.

Muito obrigado!

## RESUMO

A bovinocultura leiteira ocupa um papel importante no agronegócio brasileiro porém, também apresenta desafios a serem superados. A nutrição animal é um deles, principalmente na fase pós desmame quando ocorre a transição da dieta líquida (leite) para sólida (concentrado) formuladas à base de cereais, visando otimizar o desenvolvimento ruminal e o crescimento animal. Sabe-se que rações a base de cereais podem estar contaminadas com fungos micotoxigênicos produtores de tricotocenos (T2 e HT-2), cujos efeitos deletérios em bovinos são pouco conhecidos. Produtos comerciais com óleos essenciais são alternativas naturais com o intuito de mitigar tais efeitos. Neste contexto, o objetivo do presente estudo foi avaliar a adição de um mixture de óleos essenciais (orégano, tomilho, manjerição e alecrim) no concentrado experimentalmente contaminados com tricotocenos. Foram utilizados 12 bezerros desmamados com 70 dias de idade, divididos em 2 grupos: T-C (controle) e T-OE (óleos essenciais) no período de 40 dias, ambos os grupos consumindo ração contaminada por tricotocenos (750 ppb). Os animais do grupo T-OE receberam um mixture via ração na dosagem de 0,75 mL/kg de ração. As coletas de sangue foram realizadas nos dias 1, 20 e 40 para as análises hematológicas e bioquímicas; o escore fecal foi realizado a cada 2 dias em uma escala de 1 a 5 e os exames clínicos foram realizados 3 vezes ao longo do experimento. A pesagem dos animais ocorreu no início e no final; a eutanásia de dois bezerros por grupo para realização de avaliação macroscópica e microscópica dos órgãos (baço, fígado, duodeno, jejuno, íleo, ceco e cólon) foi realizada no final do experimento. Os bezerros do grupo T-OE obtiveram uma tendência ( $P=0.07$ ) de maior peso corporal quando comparado ao T-C. Foi detectado efeito do tratamento e interação tratamento versus dia para as variáveis leucócitos e granulócitos, demonstrando maior contagem dessas células no grupo T-OE em ambos os dias (20 e 40), e o mesmo comportamento ocorreu para a amplitude de distribuição dos eritrócitos (RDW). As enzimas alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST) e gama glutamil transferase (GGT) demonstraram maior atividade sérica no grupo T-C (dias 20 e 40). Os níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) foram menores no soro dos animais do grupo T-OE. Para os bezerros do grupo T-OE a atividade da glutathione S-transferase (GST) foi maior no soro. Os níveis de haptoglobulina e proteína C reativa foram menores nos dias 20 e 40 nos animais do T-OE quando comparado ao grupo T-C. Nas avaliações

macroscópicas e microscópicas não se observou alterações hepáticas e intestinais para os animais do grupo T-OE, diferente dos animais do grupo T-C que foi descrito consistência moderadamente firme difuso do fígado e edema no mesentério no intestino, assim como o estresse oxidativo nos tecidos coletados foi maior nos animais do grupo T-C comparado ao grupo T-OE. Os resultados concluíram que o consumo do mixture possibilitou minimizar os efeitos negativos causados pelos tricoticenos para bezerros leiteiros, sendo assim uma alternativa para melhoria da condição imunológica e antioxidantes, além de um possível adsorvente alternativo.

**Palavras-chave:** Antioxidante; Bezerros; Imunidade; Micotoxina; Óleos essenciais.

## ABSTRACT

Dairy farming plays an important role in Brazilian agribusiness but also presents challenges to be overcome. Animal nutrition is one of them, especially in the post-weaning phase when the transition from liquid (milk) to solid (concentrated) diets based on cereals occurs, aiming to optimize rumen development and growth. It is known that cereal-based rations may be contaminated with mycotoxigenic fungi, which produce trichothecenes (T2 and HT-2), whose deleterious effects on cattle are poorly known. Commercial products with essential oils are natural alternatives in order to mitigate such negative effects. In this context, the objective of the present study was to evaluate the addition of a mixture of essential oils (oregano, thyme, basil and rosemary) in the concentrate experimentally contaminated with trichothecenes. Twelve calves weaned at 70 days of age were used, divided into 2 groups: T-C (control) and T-OE (essential oils) in the period of 40 days, both groups consuming ration contaminated by trichothecenes (500 ppb). The animals in the T-OE group received a mixture 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 to 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 the organs (spleen, liver, duodenum, jejunum, ileum, cecum and colon) was performed at the end of the experiment. The calves in the T-OE 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 the leukocytes and granulocytes variables, demonstrating a higher count of these cells in the T-OE 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-OE group. For the calves of the T-OE group, the activity of glutathione S-transferase was higher in the serum. Haptoglobin and C-reactive protein levels were lower on days 20 and 40 in the T-OE animals when compared to the T-C group. In the macroscopic and microscopic evaluations, hepatic and intestinal changes were not observed for the

animals of the T- OE group, unlike the animals of the T-C group, which was described diffuse moderately firm consistency of the liver and edema in the mesentery in the intestine, as well as oxidative stress in the tissues. collected was higher in the animals of the T-C group compared to the T-OE group. The results concluded that the consumption of the mixture made it possible to minimize the negative effects caused by trichothecenes for dairy calves, thus being an alternative to improve the immunological condition and antioxidants, as well as a possible alternative adsorbent.

**Keywords:** Antioxidant; Calves; E ssential oils; Immunity; Mycotoxin.

## LISTA DE FIGURAS

- Figure 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) ....44
- Figure 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 .....45

## LISTA DE TABELAS

Table 1 - Feed and chemical composition of feed used in the diet of calves.....	36
Table 2 - Growth performance and fecal score of calves consuming ration with experimental contamination by trichothecenes and supplementation of an essential oil mixture.....	37
Table 3 - Clinical examination of calves consuming ration with experimental contamination by trichothecenes and supplementation of an essential oil mixture.....	38
Table 4 - Hemogram of calves consuming ration with experimental contamination by trichothecenes and supplementation of an essential oil mixture .....	39
Table 5 - Serum biochemistry of calves consuming ration with experimental contamination by trichothecenes and supplementation of an essential oil mixture....	41
Table 6 - Serum antioxidant response of calves consuming ration with experimental contamination by trichothecenes and supplementation of an essential oil mixture.....	42
Table 7 - Descriptive results of oxidative status in organs of calves that consumed feed contaminated by trichothecenes and supplementation of an essential oil mixture.....	43
Table 8 - Supplementary Material.....	46

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>14</b>
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>16</b>
2.1 CRIAÇÃO DE GADO JOVEM.....	16
2.2 MICOTOXINAS.....	17
2.3 TRICOTECENOS.....	19
2.4 ÓLEOS ESSENCIAIS.....	20
<b>3 ARTIGO: ADDITION OF AN ESSENTIAL OIL MIXTURE IN CONCENTRATE FEEDSTUFFS EXPERIMENTALLY CONTAMINATED WITH TRICHOTHECENES CONSUMED BY DAIRY CALVES: EFFECTS ON GROWTH PERFORMANCE AND ANIMAL HEALTH.....</b>	<b>22</b>
3.1 INTRODUCTION.....	22
3.2 MATERIALS AND METHODS.....	24
3.2.1 TRICHOTHECENES: T-2 AND HT-2.....	24
3.2.2 MIXTURE OF ESSENTIAL OILS (EOS).....	24
3.2.3 EOS MIXTURE COMPOSITION BY GC/FID AND GC/MS.....	25
3.2.4 ANIMALS AND FACILITIES.....	26
3.2.5 EXPERIMENTAL DESIGN.....	26
3.2.6 WEIGHING, CLINICAL EXAMINATION AND FOOD CONSUMPTION.....	26
3.2.7 SAMPLING.....	27
3.2.8 FECAL SCORE.....	27
3.2.9 LABORATORY ANALYZES.....	28
3.2.10 STATISTICAL ANALYSES.....	29
3.3 RESULTS.....	30
3.3.1 OIL MIXTURE COMPOSITION.....	30
3.3.2 GROWTH PERFORMANCE.....	30
3.3.3 FECAL AND HEALTH SCORE.....	30
3.3.4 HEMOGRAM.....	30
3.3.5 SERUM BIOCHEMISTRY.....	31
3.3.6 OXIDATIVE STATUS.....	31
3.3.7 ACUTE-PHASE PROTEIN.....	32
3.3.8 NECROPSY AND HISTOPATHOLOGY.....	32
3.4 DISCUSSION.....	32
3.5 CONCLUSION.....	34

<b>4 ETHICS COMMITTEE.....</b>	<b>35</b>
<b>5 ACKNOWLEDGMENTS.....</b>	<b>35</b>
<b>6 TABLES AND FIGURES .....</b>	<b>36</b>
<b>7 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>47</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>48</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A nutrição animal normalmente inclui uma combinação de concentrado e forragens conservadas projetados para atender a demanda nutricional do animal, viabilizando custo, mas também fornecendo toda exigência de manutenção, saúde, bem-estar e produção, sendo o concentrado composto por cereais (milho, soja, trigo, aveia, cevada, entre outros) (PEREIRA et al., 2019).

Nos países desenvolvidos, até 70% da colheita do cereal é destinada para alimentação animal, em contra partida em países em desenvolvimento estes cereais são voltados mais para o consumo humano. A demanda global por culturas agrícolas se comporta crescentemente ano a ano, sendo esperando um crescimento de 84% entre 2000 e 2050, o que impacta na maior produção agropecuária por área e consequentemente maior eficiência (PEREIRA et al., 2019; RAY et al., 2013).

As alterações climáticas, o plantio frequente, as condições de transporte e armazenagem dos cereais usados na alimentação animal constituem as principais causas do aumento da incidência de fungos e consequentemente na produção de suas micotoxinas, sendo estimado pela Organização para Alimentação e Agricultura das Nações Unidas (FAO) que aproximadamente 25% dos suprimentos de grãos no mundo está contaminado com micotoxinas (SANTIN et al., 2003; DEVEGOWDA E MURTHY, 2005).

As micotoxinas são metabólitos provenientes de fungos estando presente desde o campo e permanecendo ao longo de toda cadeia produtiva, podendo ocasionar impactos de saúde humana e saúde animal, os principais gêneros de fungos produtores de micotoxinas são: *Fusarium*, *Aspergillus*, *Penicillium* *Claviceps* e *Stachybotrys*, capazes de se desenvolver em diferentes ambientes (JANIK et al., 2021; DONAT et al., 2018).

Em ruminantes, estudos revelaram que estes animais apresentam maior resistência às micotoxinas, entretanto sabe-se que dentre as diversas micotoxinas produzidas por espécie de *Fusarium* as mais significativas são: tricoticenos T-2 e desoxinivalenol (DON), as fumonisinas (FB1, FB2 e FB3), zearalenona, moniliformin e ácido fusárico e são caracterizados como patógenos e endófitos presentes no milho e produtores de micotoxinas no campo, o que possibilita uma alta incidência de micotoxinas na alimentação animal através do consumo deste cereal (BLAKE et al., 2000).

As micotoxinas T-2 e HT-2 são tricotecenos altamente tóxicos e seus sintomas podem ser observados no homem e nos animais, tais como o vômito, angina necrótica, diarreia, anorexia, alterações hematológicas, distúrbios neurológicos, destruição da medula óssea e hemorragias generalizadas seguidos ou não de morte, afetando primeiro a resposta imune celular através de efeitos diretos na medula óssea, no baço, tecidos linfoides, timo e mucosa intestinal, danificando as células que se dividem ativamente (DEVEGOWDA E MURTHY, 2005).

As tecnologias naturais voltadas para a inibição fúngica e manifestação do potencial toxigênico, englobam compostos fenólicos, proteínas, óleos essenciais, parede de levedura, membrana celular, entre outros, porém sua utilização não visa apenas a inibição, mas a melhoria da saúde animal, visto que os compostos fenólicos, alcaloides, terpenos e proteínas também podem auxiliar na atividade funcional do organismo (SCAGLIONI E FURLONG, 2020). Neste sentido, os óleos essenciais tem uma grande variedade de efeitos positivos na saúde, incluindo doenças cardiovasculares, tumores, processos inflamatórios e, em geral, doenças em que se tenha proliferação de radicais livres, estes conseguem inibir a peroxidação de lipídeos de membrana, metais de quelato e estimular atividades de enzimas antioxidantes, capacidade esta que auxilia nos efeitos metabólitos que as micotoxinas podem causar aos organismos (CLAUSAMIGA et al., 2007).

Na nutrição de ruminantes, principalmente confinados, os principais benefícios são as melhorias de desempenho e a redução das doenças metabólicas que poder ser ocasionadas pela alta inclusão de concentrado nas dietas, tais como acidoses lácticas, laminites, paraqueratoses e os abscessos hepáticos. Estudos evidenciam que algumas misturas de OEs contendo limoneno, eugenol, vanilina, guaiacol e timol podem impactara na menor incidência de abscessos hepáticos em animais consumindo grandes quantidades de concentrados (MENEZES et al., 2022).

Frente ao exposto, o presente trabalho teve com o objetivo avaliação mais detalhada da utilização de um mixture de óleos essenciais para minimizar os efeitos patológicos e oxidativos causados pelos tricotecenos sobre o desempenho de crescimento e saúde animal.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 CRIAÇÃO DE GADO JOVEM

É notório que a cadeia produtiva do leite no Brasil, entre os diversos segmentos agropecuários existente, possui um papel significativo no agronegócio brasileiro. Além de gerar uma gama de empregos e ao mesmo tempo fixar o homem no campo, seu crescimento contribui consideravelmente no produto interno bruto do país (PIB), e estima-se que a cada real de aumento no sistema agroindustrial do leite há um aumento correspondente de cinco reais no PIB (FISCHER et al., 2011).

Embora a produção e o consumo tenham crescido praticamente juntos ao longo dos últimos anos, o leite que é produzido ainda é destinado a produção de derivados. Logo é necessário o aumento da produtividade para garantir que o aumento da demanda devido o consumo in natura e do crescimento tecnológico do setor industrial. Podemos incluir como meio de aumentra a produtividade melhoria nos maquinários, na genética, desenvolvimento de novos aditivos e principalmente novos conceitos ligados a nutrição animal priorizando a vida útil dos animais e produção, tecnologia esta que reflete na melhora da atividade leiteira (ASSIS et al., 2016).

A criação de gado jovem é considerada como uma das principais atividades dentro da propriedade leiteira, uma vez que a genética depende da renovação do plantel com descarte de vacas velhas ou com problemas reprodutivo por animais mais jovens e de potencial produtivo mais elevado, sendo a fase inicial de suma importância para uma reposição adequada dos animais (SANTOS & DAMASCENO, 1999).

É necessário que o produtor trabalhe anualmente com uma taxa de descarte de 20 a 30% dos animais em lactação já que este manejo assegura a manutenção e estabilidade do rebanho. Porém, muitas vezes este número é de difícil alcance durante o manejo reprodutivo, prejudicando economicamente a propriedade. Dentre os fatores que podem comprometer essa taxa, está a criação das bezerras e os cuidados para que este animal chegue a puberdade com índices de desempenho que favoreçam a prenhez (MOURA, 2012).

A primeira semana da bezerra é a fase mais crítica, já que em torno de 50% dos animais morrem até um ano e fatores como adequado manejo após o parto, boa colostragem, boa dieta líquida e balanceada, refletem no desempenho e principalmente na imunidade do animal. O período de transformação do aparelho

digestivo da bezerra ocorre do quarto dia de vida até o desmame, e é nesta fase o segundo período mais crítico. Estas mudanças rápidas no sistema digestivo, devido a passagem de uma dieta líquida para uma dieta sólida, adequando o mais o rúmen para sua devida função. O abomaso ocupa em torno de 50% do volume do complexo gástrico, e nos primeiros 60 dias de vida é quando o rúmen apresenta o maior desenvolvimento, caracterizando esta como uma fase importante de transição com grandes mudanças anatômicas, fisiológicas e metabólicas que persiste até o terceiro ou quarto mês de vida, que podem ser aceleradas de acordo com a dieta dos animais (SANTOS et al ., 2002).

Após o segundo período crítico, o animal prepara-se para o desmame, sendo então condicionado a dieta estritamente sólida, composta por concentrado e forragem. A utilização de concentrado na dieta sólida proporciona o desenvolvimento das papilas ruminais permitindo que o animal melhore a capacidade digestiva para este tipo de alimento, sendo de suma importância o balanceamento adequado da dieta, tanto para suprir o desenvolvimento do bezerro, como as exigências que atendam a capacidade digestiva (MOURA, 2012).

Animais mais jovens requerem energia para manutenção e principalmente para o crescimento, e por isso é necessário a utilização de ração compostas por cereais como o milho, farelo de soja, farelo de trigo e cevada. No entanto, a condição destas matérias primas impacta diretamente o desempenho animal, além de interferir na saúde ruminal e no sistema imunológico do bezerro. Diante disso, é primordial trabalhar com matérias primas livres de micotoxinas, evitando um maior desafio ao sistema imunológico que possa comprometer o desempenho zootécnico (SANTOS et al ., 2002).

## 2.2 MICOTOXINAS

As micotoxinas são metabólitos secundários provenientes dos fungos e podem causar problemas de saúde no homem e nos animais. Os fungos produtores de micotoxinas são conhecidos como micotoxigênicos, sendo alguns capazes de produzir mais de uma micotoxina, assim como uma micotoxina pode ser produzida por mais de uma espécie de fungo. Estas são conhecidas como metabólitos diversificados quimicamente, no entanto sua estrutura molecular é simples contendo carbono, hidrogênio, oxigênio e com uma menor frequência nitrogênio. Podem ser encontradas

nos esporos (conídios) ou micélio (hifas) dos fungos produtores, porém também podem ser liberadas nos substratos, ou seja, diretamente nos cereais, rações, fenos, silagens e pastagens (DONAT, 2018).

Estes metabólitos são produzidos através de várias reações consecutivas que são catalisadas por enzimas e sugere-se que a formação destes compostos ocorre através do acúmulo de metabólitos primários que ao se acumularem, ativam a elaboração de metabólitos secundários, mantendo os primários em atividade (OKUMA et al., 2018). Quando estes metabólitos estão presentes em alimentos podem ser patogênicos e causar danos à saúde humana devido as suas propriedades tóxicas. As micotoxinas são classificadas como hepatotoxinas, nefrotoxinas, neurotoxinas e imunotoxinas de acordo com os órgãos que afetam, dependendo da maneira que afetam as células também podem ser classificadas como teratogênicas, mutagênicas, cancerígenas e alérgicas (KAYNARCA et al., 2019). Contudo, o produto das micotoxinas dependem da composição dos alimentos, tipo de fungo e as condições ambientais, tais como umidade, temperatura e pH.

A contaminação por micotoxinas consiste em uma das ameaças mais graves à fabricação de alimentos e a produção animal, a detecção destas iniciou no setor acadêmico no ano de 1961 quando ocorreu a mortalidade em grande quantidade de perus na Inglaterra que, em seguida, foi descoberto e identificado a causa por Aflatoxina, nas décadas seguintes mais micotoxinas foram descobertas assim como seus graus de toxicidade (PENG et al., 2018). Os principais fungos micotoxigênicos são os gêneros *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp. e *Fusarium* spp, as principais micotoxinas de interesse para a saúde humana serem aflatoxinas, tricotecenos, acratozina A, fumonisinas e zearalenona (VOGUEL & VILLAMIL-JIMENEZ, 2006).

Os fungos podem estar presentes ainda na lavoura e seu mecanismo consiste em invadir e produzir micotoxinas nas plantas ainda na fase de crescimento, antecedendo a colheita, ou ainda na pós-colheita, durante o transporte e armazenamento podendo acarretar perdas econômicas bem significativas, sendo as safras mais susceptíveis a contaminações com micotoxinas as de cereais como milho, trigo, cevada e centeio, cereais estes que fazem parte da composição de dietas em nutrição animal (DONAT et al., 2018; TADEI, 2020).

Diferentes estratégias vêm sendo adotadas para prevenir a presença de micotoxinas no campo e também minimizar os efeitos nos animais de produção. No

entanto, no percorrer da cadeia alimentar controlar estes efeitos é um grande desafio para a indústria (DI GREGORIO et al., 2014).

Práticas químicas e físicas de desintoxicação de cereais contaminados com micotoxinas, ainda são restritas devido a critérios ligados a segurança alimentar, composição nutricional do alimento, eficácia e elevado custo. Algumas práticas tais como o uso de aditivos anti-micotoxinas diretamente na dieta dos animais, consistem em uma aplicação mais usual e acessível aos produtores, visando também minimizar os efeitos decorrente destes metabólitos.

### 2.3 TRICOTECENOS

A toxina T-2 e HT-2 são micotoxinas que podem ser sintetizadas pelos fungos *Fusarium*, tendo como requisito a atividade de água de pelo menos 0,88 e temperatura entre 22, a 27,5 °C. Dentre este grupo de micotoxinas, destaca-se a T-2, que no período da Segunda Guerra mundial causou grande complicações em milhares de humanos e animais, sendo responsável por síndromes hemorrágicas, lesões bucais e efeitos neurotóxicos, até óbito (DIAS, 2018).

A toxicidade dos tricotecenos pode produzir vários distúrbios gastrointestinais nos animais, como vômito, diarreia e inflamação. Dentre outros efeitos tóxicos, está a irritação dérmica, aborto, sequelas hematológicas (anemia e leucopenia) e também inapetência. Os mecanismos de toxicidade dos tricotecenos em bezerras ainda não estão elucidados, porém alguns estudos demonstraram que estas micotoxinas podem afetar a síntese de proteína (iniciação, alongamento e término), com relação a toxina T-2, por ser uma molécula anfipática, pode se incorporar aos lipídeos ou porções de proteína da membrana plasmática interferindo em sua função, e também podem afetar o sistema imunológico (BAERE, et al., 2011).

A toxina T-2 é predominantemente encontrada em cereais como trigo, milho, cevada, soja, aveia, feno, silagem e palhada, e possui sua melhor capacidade de desenvolvimento em regiões com condições tropicais, como altas temperaturas e níveis de umidade, além de ser caracterizada com maior poder de toxicidade entre os tricotecenos (JANIK et al., 2021; ADHIKARI et al., 2017).

A nível celular a T-2 pode ocasionar inibição da síntese proteica sendo esse efeito inibidor mais visível em células que se proliferam ativamente (trato gastrointestinal, pele, tireoide, medula óssea e células eritróides) podendo também ocasionar estresse oxidativo associado a efeitos prejudiciais, como peroxidação

lipídica elevada, danos no DNA nuclear e mitocondrial, distúrbios na sinalização celular e vias inflamatórias, afetando o ciclo celular e sendo capaz de induzir apoptose (JANIK, 2021).

O principal metabólito da toxina T-2 no corpo animal é a toxina HT-2 tanto in vivo como in vitro, a desacetilação da toxina T-2 resulta na toxina HT-2, sua toxicidade é bem semelhante à toxina T-2, Richard et al. (2009) relataram que a toxina T-2 é rapidamente metabolizada a toxina HT-2 e que a toxicidade da toxina T-2 pode ser atribuída uma parte a presença da HT-2 (YANG et al., 2013).

## 2.4 ÓLEOS ESSENCIAIS

Os óleos essenciais são compostos secundários que estão presentes nas plantas originados de seu metabolismo secundário, sendo muitas destas plantas destinadas a temperos e especiarias que possuem a função de conferir sabor e efeito pungente a alimentos. Estes são voláteis, odoríferos e imiscíveis, naturalmente atuam em funções específicas da planta que estão relacionadas com mecanismos de defesa contra microrganismos, insetos animais e proteção contra raios ultravioletas (REIS et al., 2020). Estes óleos podem ser extraídos de flores, botões, folhas, ramos, cascas, sementes, frutos, raízes e rizomas, de vários tipos de plantas, dentre elas, *Origanum vulgare* (orégano), *Eugenia caryophyllata* (cravo), *Thymus vulgaris* (tomilho), *Ocimum basilicum* (manjeriço), *Rosmarinus officinalis* (alecrim), sendo que a combinação destes óleos pode potencializar suas ações em um sistema de sinergismo criando um sistema de apoio e inibição do que se estiverem atuando sozinhos (TARCITANO & MESQUITA, 2017; SANTOS et al., 2017).

As diferentes classes de princípios ativos benéficos destas substâncias podem ser como atividade antimicrobiana, antioxidante, antiviral, anti-inflamatória, antifúngica, antisséptica, analgésica, expectorante, inseticida, calmante, digestiva e mucolítica (NOLETO et al., 2017). Esta ação antimicrobiana se deve principalmente em função do caráter lipofílico destas substâncias, o qual gera uma alteração na permeabilidade da membrana celular das bactérias (VIEITIS et al., 2020).

Compostos aromáticos voláteis como, carvacrol, timol, eugenol, terpineno, linalol e carvona, possuem a capacidade de interagir com diferentes moléculas alvo e nas funções de células bacterianas. Inibindo mecanismos antibacterianos como inibição da síntese de ácido nucléico, distúrbios nas propriedades da membrana citoplasmática e também no metabolismo energético beneficiando o sistema

imunológico e digestivo dos animais, refletindo na melhora dos índices de desempenho (POMBO et al., 2018). Espécies vegetais contendo timol (orégano e tomilho) e carvacrol (orégano), apresentam alto potencial antioxidante, pois possuem em suas composições terpenos fenólicos. Em específico o óleo essencial de alecrim possui atividade antimicrobiana mais alta dos demais óleos essenciais contendo vários compostos fenólicos que foram isolados a partir do mesmo (carnosol, rosmanol, rosmaridifenol e rosmarquinona), além de também ser relatado de ter alta atividade antioxidante sob a carne (CAIXETA, 2021).

O óleo de orégano possui uma ação antioxidante rica em flavonoides, tocoferóis e derivados de ácidos fenólicos, além de que é rico em timol e carvacol sendo estes responsáveis pelo efeito antioxidante, sua eficácia de ação destes componentes está diretamente ligada a concentração dos mesmos como também fatores genéticos e condição de ambiente que podem estar afetando os benefícios máximos do óleo (CAMPOLINA, 2022).

Assim como o orégano o óleo essencial de tomilho também possui carvacrol e timol e conseqüentemente um poder antioxidante como também antifúngico, além destes componentes o tomilho também possui hidrocarbonetos, álcoois, ésteres, aldeídos e fenóis, que são eles terpenos, taninos, flavonoides e saponinas (PICOLLOTO et al., 2022).

O óleo essencial de alecrim é utilizado mundialmente como condimento de alimentos além de ser indicado na indústria farmacêutica, sua composição possui hidrocarbonetos monoterpênicos, ésteres terpênicos, linalol, verbinol, terpineol, 3-octanona e acetato de isobornila, dentre outros (RIBEIRO et al., 2012). Além de possuir uma capacidade antimicrobiana, o óleo essencial de alecrim por conter bioativos como carnosol, ácido carsônico e triterpenos também possui uma alta capacidade de conservação como antioxidantes naturais (TIUZZI & FURLAN, 2016). O manjeriço é uma planta medicinal e aromática, podendo ser utilizada in natura e/ou processada na indústria alimentícia e medicinal, seu óleo essencial possui uma atividade antimicrobiana para as bactérias Gram positivas e Gram negativas como *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, dentre outras (VASCONCELOS et al., 2021).

### **3 ARTIGO: ADDITION OF AN ESSENTIAL OIL MIXTURE IN CONCENTRATE FEEDSTUFFS EXPERIMENTALLY CONTAMINATED WITH TRICHOTHECENES CONSUMED BY DAIRY CALVES: EFFECTS ON GROWTH PERFORMANCE AND ANIMAL HEALTH**

Os resultados desta dissertação estão apresentados na forma de artigo a ser submetido, com as seções de acordo com as orientações da revista *Research Veterinary Science*.

#### **3.1 INTRODUCTION**

Mycotoxins are secondary metabolites produced by filamentous fungi that occur naturally in foods, such as fruits and grains (VEDOVATTO et al., 2020). 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 (DAMBROS, 2013). Fungi can infect crops both during plant development in the field, as well as during storage and processing (DAMBRÓS, 2013; DIAS, 2018). Custodio et al. (2019) 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).

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, different nutrient contents, temperature, humidity and oxygen, which results in successful colonization (JANIK et al., 2021).

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 (JANIK et al., 2021, ADHIKARI et al., 2017). Toxicity and its deleterious effects vary according to the

route, time and amount of exposure, as well as the weight and health of the animal, but intoxication occurs mainly by the consumption of feed made from grains, hay and straw that are contaminated (HOSSAM, 2013).

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 (STOEV et al., 2010; WHITLOW & HAGER, 2005). In order to avoid problems with mycotoxins, many feed factories have been using absorbents as a preventive way to reduce the chances of productive losses.

Research demonstrating improved immune and antioxidant status of calves that consumed EOs is well known (WU et al., 2020; LIU et al., 2019; WHITLOW & HAGER, 2005). 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 (CARDOSO et al., 2011). EOs have the ability to act on the glucose metabolism of dairy cows and suppress aflatoxin M1 synthesis (SILVA et al., 2019). It is already known that the action of EO 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 (SILVA et al., 2019; BENCHAAR & GREATHEAD, 2011). 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 (STEVANOVIC et al., 2018).

Oregano (*Origanum vulgare* L.), rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) and basil (*Ocimum basilicum* L.) essential oils have high antioxidant capacity (MENDES et al., 2015; BERTOLIN. et al., 2010). Rosemary oil is widely used by the cosmetics industry, as it has antibacterial, cytotoxic, antimutagenic, antioxidant, anti-inflammatory and chemopreventive properties; basil oil has its antioxidant power attributed to rosmarinic acid (CUTRIM et al., 2019; SOARES, 2020); Oregano and thyme oils have potent antioxidant action attributed mainly due to thymol and carvacrol (SOARES, 2020; PETRE et al., 2020; NASCIMENTO, 2020). In this context, the objective of this experiment was to evaluate whether the addition of a mixture of EOs in the concentrate

feedstuffs experimentally contaminated with trichothecenes fed to dairy calves would be able to avoid the effects of mycotoxicosis on growth performance and health of these animals.

## 3.2 MATERIALS AND METHODS

### 3.2.1 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 ( $1 \times 10^5$  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 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 dose was defined based on results described in previous studies (BUENING et al., 1982; MANN et al., 1982, MANN et al., 1982); aiming a mild intoxication of the animals.

### 3.2.2 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 is not kept at the bottom and steam is introduced through coils (RAMOS, 2000). The EOS mixture was formulated with oregano, thyme, basil and rosemary oil (25 mL each). In one of the groups (T-EO), the mixture of EOS was added (dose of 0.75 mL/kg of feed concentrate), as recommended in the literature (CAMPOLINA et al., 2021; KAZEMI-BONCHENARI, 2017; FROEHLICH et al., 2017). 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.

### 3.2.3 EOS MIXTURE COMPOSITION BY GC/FID AND GC/MS

EOs mixture composition was performed using the gas chromatography technique (GC/FID and GC/MS) where 10  $\mu\text{L}$  was diluted in 1000  $\mu\text{L}$  of chromatographic grade n-hexane (Sigma-Aldrich, Germany,  $\geq 99\%$  purity). For analyte quantification, 1  $\mu\text{L}$  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  $^{\circ}\text{C}$ . The compounds were analyzed in a nonpolar separation column (5% phenyl - dimethylpolysiloxane) (ZB-5MS; 30 m x 0.25 mm x 0.25  $\mu\text{m}$ ; Phenomenex, USA); the analytes were carried by hydrogen gas at 1.6 mL/min. The chromatographic conditions used were in accordance with the methodology described by Adams (2017). The initial temperature of the method was 40  $^{\circ}\text{C}$  and the temperature was raised at a rate of 5  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$  until reaching 250  $^{\circ}\text{C}$ . The total analysis time was 43 minutes. The detection of compounds was performed in a flame ionization detector at 250  $^{\circ}\text{C}$ . 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 $^{\circ}\text{C}$ , while the ion source was kept at 200  $^{\circ}\text{C}$ . 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 (1963) and compared with those provided in the literature, to confirm the identity of the analyzed compounds.

### 3.2.4 ANIMALS AND FACILITIES

The experiment was carried out at the Experimental Farm of the Centro de Educação Superior do Oeste (FECEO), of the State University of Santa Catarina (UDESC), located in the city of Guatambú, SC. 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 m<sup>2</sup> each, containing individual feeders, one for concentrate and the other for hay, with water ad libitum.

### 3.2.5 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 Control (T-C) and EOs (T-EO) groups, 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 am and 4:00 pm), 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 1,000 µg of T-2 and 1.5 mL of the EO every day.

### 3.2.6 WEIGHING, CLINICAL EXAMINATION AND FOOD CONSUMPTION

The animals were weighed at the beginning and at the end of the experiment with the aid of 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.

### 3.2.7 SAMPLING

Blood was collected on days 1, 20 and 40 by puncture of the jugular vein using disposable needles and vacuum tubes with anticoagulant (for hemogram) and without EDTA anticoagulant (biochemical and immunological analyses), and stored in a cooler with ice for immediate transport to the laboratory. Serum was obtained after centrifuging the blood (3,500 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 the T-C group and 2 animals from the T-EO 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). This material was used for analysis of oxidative status (frozen) and fragments preserved in 10% formalin for histopathology.

### 3.2.8 FECAL SCORE

Fecal scoring was performed at intervals of two days individually throughout the experiment according to Litherland (2007) 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.

### 3.2.9 LABORATORY ANALYZES

#### 3.2.9.1 FOOD CHEMICAL COMPOSITION AND MYCOTOXIN QUANTIFICATION

The composition of the concentrate (Table 1) was analyzed according to AOAC (2000), 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. (1991) 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).

#### 3.2.9.2 HEMOGRAM

Total erythrocyte and leukocyte counts, hemoglobin concentration and hematocrit percentage were performed using Sysmex electronic equipment (model KX-21N). Blood smears were performed for leukocyte differential counts, according to Feldman et al. (2000).

#### 3.2.9.3 SERUM BIOCHEMISTRY

Total protein, albumin and urea levels, as well as alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST) and gamma glutamyl transferase (GGT) activity 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.

#### 3.2.9.4 OXIDATIVE STATUS

Serum lipid peroxidation was measured as the amount of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) according to Jentzsch et al. (1996). 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. (1992). Samples were diluted 1:10 with 10 nM Tris (pH 7.4) and 5  $\mu$ L of dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) in methanol and added for 15 minutes 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  $\mu$ M). 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. (1974) 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 (1968) recently described by Maltez et al. (2018), and the results are expressed in mmol NPSH/mL.

The oxidative status was verified in several tissues (liver, duodenum, jejunum, ileum, cecum and colon) of the euthanized animals.

#### 3.2.9.5 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.

#### 3.2.9.6 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).

#### 3.2.10 STATISTICAL ANALYSES

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  $\times$  day,

using animal (treatment) as random effect. The d 1 results were including as an independent covariate. Also, for these variables, to generate the average per treatment, the d 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  $\leq 0.10$ .

### 3.3 RESULTS

#### 3.3.1 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 (Supplemental material 1).

#### 3.3.2 GROWTH PERFORMANCE

Table 2 shows the growth performance results. Trend of treatment x 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 but were 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 every daily gain (ADG), being higher in the T-EO group compared to the T-C group.

#### 3.3.3 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 ( $P \leq 0.05$ ).

#### 3.3.4 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 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 ( $P > 0.05$ ).

### 3.3.5 SERUM BIOCHEMISTRY

The results of serum biochemistry are shown in Table 5. The levels of 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 indicating liver injury had treatment effect and treatment x 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.

### 3.3.6 OXIDATIVE STATUS

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

### 3.3.7 ACUTE-PHASE PROTEIN

C-reactive protein and haptoglobin levels are shown in Figure 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).

### 3.3.8 NECROPSY AND HISTOPATHOLOGY

During the necropsy, the liver of two calves of the control group (T-C) showed firm consistency diffuse moderately; 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 (Figure 2).

## 3.4 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. (2019) 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 (HAMMER et al., 1999; FROEHLICH et al., 2017), but studies relating mycotoxins and EOs are not known in dairy calves, which demonstrates the novelty of this study. Jeshari et al. (2016) 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. (2017) 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.

There were no differences between treatments, regarding our clinical evaluations, which suggests a 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 (RODRIGUES, 2021). Façanha et al. (2011) 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 (PANDE et al., 2006; YANG et al., 2016). Yang et al. (2016) 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 (YANG et al., 2017; CHE et al., 2011), 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 (DOMENICO, 2021; CUSTÓDIO et al., 2017). 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 (MAVROMMATIS et al., 2021), 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 the lipid peroxidation products measured in this study. The most likely explanation for these results is the immunomodulatory properties of the 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 (GRACIA and GOMES, 2019; TRAESEL et al., 2011).

In general, EOs are an excellent food 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, Gabbi et al. (2009) 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. (2020) 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 (JANIK et al., 2021).

Animals in the T-EO group that consumed the concentrate with EOs had higher levels of total protein and globulin, reflecting adequate protein catabolism (WU et al., 2020). Likewise, in studies with thyme's EO, higher concentrations of albumin were observed (VENDRAMINI et al., 2016; KHATERI et al., 2017, WU et al., 2020). 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. (2019) 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 (SANTOS et al., 2021; OLIVEIRA and VEIGA, 2019).

### 3.5 CONCLUSION

T-2 and HT-2 contamination in diets of calves is a silent problem as the animals showed no clinical signs when they consumed around 750 ppb of T-2 and HT-2. However, the consumption of the EOs mixture in the diet of dairy calves favored body growth, as it was able to 750 ppb reduce/avoid intense liver damage and had an anti-inflammatory action, thus reducing the deviation of ATP for oxidative and inflammatory reactions, being the molecule available to be used in muscle production.

#### **4 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.

#### **5 ACKNOWLEDGMENTS**

The authors thank the Foundation for Research Support of Santa Catarina (FAPESC) and The National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), as well as the Santa Catarina State University (UDESC).

## 6 TABLES AND FIGURES

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.

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 <sup>1</sup>		SEM	P – values	
	T-C	T-EO		Treat.	Treat. × Day
Body weight (kg)				-	<b>0.07</b>
d 1	86.8	86.7	0.63		
d 40	106 <sup>b</sup>	109 <sup>a</sup>	0.63		
Weight gain (kg)	19.5 <sup>b</sup>	21.8 <sup>a</sup>	0.87	<b>0.07</b>	-
Average daily gain (kg/day)	0.50 <sup>b</sup>	0.56 <sup>a</sup>	0.02	<b>0.06</b>	-
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		
Average <sup>2</sup>	2.02	1.92	0.23		

<sup>1</sup>Treatments were: T-C and T-EO, represents control (addition of mycotoxin trichothecenes) and treatment (addition of trichothecenes with essential oil mixture).

<sup>2</sup>The d 1 results were removed from the data set to generate the average per treatment in the statistical analysis.

<sup>a-b</sup>Within a row, differ ( $P \leq 0.05$ ) or tend to differ ( $P \leq 0.10$ ).

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

Items	Treatments <sup>1</sup>		SEM	P – values	
	T-C	T-EO		Treat.	Treat. × Day
Rectal Temperature (RT)				0.73	0.64
d 7	38.8	38.8	0.12		
d 14	38.9	39.1	0.12		
d 30	38.7	38.6	0.12		
Average	38.8	38.8	0.09		
Heart Rate (HR)				0.68	0.47
d 7	35.3	36.5	3.04		
d 14	42.5	41.3	3.04		
d 30	39.2	43.5	3.04		
Average	39.0	40.4	2.44		
Respiratory Frequency (RF)				0.69	0.98
d 7	63.8	67.3	6.02		
d 14	76.0	78.0	6.02		
d 30	78.7	82.0	6.02		
Average	72.8	75.8	5.16		
Ruminal Moviments (RM)				0.26	0.47
d 7	4.50	5.33	0.72		
d 14	6.50	6.17	0.72		
d 30	5.33	6.83	0.72		
Average	5.44	6.11	0.39		
Capillary Refill Time (CRT)				0.34	0.39
d 7	2.00	2.00	0.07		
d 14	2.00	2.00	0.07		
d 30	1.83	2.00	0.07		
Average	1.94	2.00	0.04		

<sup>1</sup>Treatments were: T1 and T2, represents control (addition of mycotoxin T-2) and treatment (addition of mycotoxin T-2 with essential oil mixture).

a-b Within a row, differ ( $P \leq 0.05$ ) or tend to differ ( $P \leq 0.10$ ).

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

Items	Treatments <sup>1</sup>			Treat.	P – values Treat. × Day
	T-C	T-EO	SEM		
Erythrocytes (x10 <sup>6</sup> µL)				0.51	0.80
d 1	8.94	8.98	0.25		
d 20	7.89	7.83	0.25		
d 40	8.28	7.96	0.25		
Average <sup>2</sup>	8.07	7.91	0.17		
Hematocrit (%)				0.34	0.93
d 1	31.5	31.4	0.90		
d 20	27.8	27.3	0.90		
d 40	29.2	28.3	0.90		
Average <sup>2</sup>	28.5	27.7	0.54		
Hemoglobin (g/dL)				0.23	0.68
d 1	10.7	10.7	0.33		
d 20	10.5	10.4	0.33		
d 40	10.8	10.1	0.33		
Average <sup>2</sup>	10.6	10.2	0.22		
Leukocytes (x10 <sup>3</sup> µL)				<b>0.01</b>	<b>0.05</b>
d 1	3.61	3.07	1.01		
d 20	3.54 <sup>b</sup>	6.63 <sup>a</sup>	1.01		
d 40	3.43 <sup>b</sup>	7.59 <sup>a</sup>	1.01		
Average <sup>2</sup>	3.48 <sup>b</sup>	7.11 <sup>a</sup>	0.44		
Granulocytes (x10 <sup>3</sup> µL)				<b>0.01</b>	<b>0.01</b>
d 1	2.66	2.22	0.21		
d 20	0.76 <sup>b</sup>	2.05 <sup>a</sup>	0.21		
d 40	0.73 <sup>b</sup>	2.06 <sup>a</sup>	0.21		
Average <sup>2</sup>	0.74 <sup>b</sup>	2.04 <sup>a</sup>	0.75		
Lymphocytes (x10 <sup>3</sup> µL)				<b>0.01</b>	0.11
d 1	2.22	2.07	1.20		
d 20	2.74	3.59	1.20		
d 40	2.47	4.38	1.20		
Average <sup>2</sup>	2.60 <sup>b</sup>	3.98 <sup>a</sup>	0.29		
Monocytes (x10 <sup>3</sup> µL)				0.42	0.11
d 1	1.12	0.78	0.59		
d 20	0.04	1.00	0.59		
d 40	0.23	1.14	0.59		
Average <sup>2</sup>	0.98	1.22	0.19		
MCV (x10 <sup>3</sup> µL)				0.78	0.86
d 1	35.6	35.6	0.61		
d 20	35.8	35.3	0.61		
d 40	35.5	35.5	0.61		
Average <sup>2</sup>	35.7	35.4	0.61		
MHC (x10 <sup>3</sup> µL)				0.45	0,74
d 1	12.1	12.1	0.19		
d 20	13.4	13.3	0.19		
d 40	13.1	12.8	0.19		

Average <sup>2</sup>	13.2	13.0	0.18		
MCHC (x10 <sup>3</sup> µL)				0.42	0.11
d 1	33.9	33.9	1.70		
d 20	37.4	37.9	1.70		
d 40	32.8	36.0	1.70		
Average <sup>2</sup>	35.1	37.0	1.32		
RDW (x10 <sup>3</sup> µL)				<b>0.05</b>	<b>0.006</b>
d 1	23.3	23.2	1.10		
d 20	22.7	22.7	1.10		
d 40	28.9 <sup>a</sup>	22.7 <sup>b</sup>	1.10		
Average <sup>2</sup>	25.8 <sup>a</sup>	22.7 <sup>b</sup>	1.13		
PLT (x10 <sup>3</sup> µL)				0.98	0.76
d 1	456	429	53.9		
d 20	434	417	53.9		
d 40	359	406	53.9		
Average <sup>2</sup>	403	405	47.1		

<sup>1</sup>Treatments were: T-C and T-EO, represents control (addition of trichothecenes) and treatment (addition of trichothecenes with essential oil mixture).

<sup>2</sup>The d 1 results were removed from the data set to generate the average per treatment in the statistical analysis.

a-b Within a row, differ ( $P \leq 0.05$ ) or tend to differ ( $P \leq 0.10$ ).

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

Variable	Treatments <sup>1</sup>		P – values		
	T-C	T-EO	SEM	Treat	Treat x Day
Albumin (g/dL)				0.76	0.73
d 1	2.44	2.40	0.13		
d 20	2.49	2.35	0.13		
d 40	2.74	2.81	0.13		
Average <sup>3</sup>	2.62	2.57	0.11		
Globulin (g/dL)				<b>0.01</b>	0.54
d 1	3.37	3.38	0.28		
d 20	3.55	4.25	0.28		
d 40	3.52	4.08	0.28		
Average <sup>3</sup>	3.53 <sup>b</sup>	4.17 <sup>a</sup>	0.15		
Total protein (g/dL)				<b>0.01</b>	0.35
d 1	5.80	5.78	0.22		
d 20	6.04	6.59	0.22		
d 40	6.26	6.89	0.22		
Average <sup>3</sup>	6.16 <sup>b</sup>	6.73 <sup>a</sup>	0.13		
Urea (mg/dL)				0.78	0.71
d 1	17.3	14.8	2.31		
d 20	23.8	23.6	2.31		
d 40	27.8	28.2	2.31		
Average <sup>3</sup>	26.4	25.3	2.57		
ALT <sup>2</sup> (mg/dL)				<b>0.10</b>	<b>0.02</b>
d 1	14.8	14.4	1.54		
d 20	21.3	21.6	1.54		
d 40	27.6 <sup>a</sup>	20.0 <sup>b</sup>	1.54		
Average <sup>3</sup>	24.5 <sup>a</sup>	20.6 <sup>b</sup>	1.49		
AST <sup>2</sup> (mg/dL)				<b>0.02</b>	<b>0.04</b>
d 1	60.2	60.0	4.79		
d 20	96.5 <sup>a</sup>	72.8 <sup>b</sup>	4.79		
d 40	81.4 <sup>a</sup>	65.8 <sup>b</sup>	4.79		
Average <sup>3</sup>	89.0 <sup>a</sup>	69.2 <sup>b</sup>	4.83		
GGT <sup>2</sup> (mg/dL)				<b>0.009</b>	<b>0.08</b>
d 1	18.7	17.8	1.59		
d 20	22.5 <sup>a</sup>	17.1 <sup>b</sup>	1.59		
d 40	25.2 <sup>a</sup>	17.1 <sup>b</sup>	1.59		
Average <sup>3</sup>	24.1 <sup>a</sup>	16.9 <sup>b</sup>	1.50		

<sup>1</sup>Treatments were: T-C and T-EO, represents control (addition of trichothecenes) and treatment (addition of trichothecenes with essential oil mixture).

<sup>2</sup>Alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST) and gamaglutamyltransferase (GGT). <sup>3</sup>The d 1 results were removed from the data set to generate the average per treatment in the statistical analysis.

<sup>a-b</sup>Within a row, differ ( $P \leq 0.05$ ) or tend to differ ( $P \leq 0.10$ ).

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

Items	Treatments <sup>1</sup>		P – values		
	T-C	T-EO	SEM Treat	Treat × Day	
TBARS (nmol MDA/mL)				0.39	<b>0.01</b>
d 1	20.0	19.6	1.23		
d 20	25.5	28.0	1.23		
d 40	24.2 <sup>a</sup>	19.1 <sup>b</sup>	1.23		
Average <sup>3</sup>	24.9	23.5	1.16		
GST <sup>2</sup> (g/dL)				<b>0.05</b>	0.41
d 1	303	271	17.1		
d 20	298	264	17.1		
d 40	343	274	17.1		
Average <sup>3</sup>	328 <sup>a</sup>	260 <sup>b</sup>	17.3		
Thiols (mmol NPSH/mL)				0.58	0.75
d 1	0.22	0.22	0.02		
d 20	0.30	0.28	0.02		
d 40	0.16	0.13	0.02		
Average <sup>3</sup>	0.23	0.21	0.02		
ROS (U DCFH/mg protein))				<b>0.10</b>	<b>0.001</b>
d 1	0.33	0.32	0.02		
d 20	0.38	0.42	0.02		
d 40	0.47 <sup>a</sup>	0.31 <sup>b</sup>	0.02		
Average <sup>3</sup>	0.43 <sup>a</sup>	0.36 <sup>b</sup>	0.02		

<sup>1</sup>Treatments were: T-C and T-EO, represents control (addition of trichothecenes) and treatment (addition of trichothecenes with essential oil mixture).

<sup>2</sup>Glutathione transferase (GST).

<sup>3</sup> 1 d results were removed from the data set to generate the average/treatment in the statistical analysis.

<sup>a-b</sup>Within a row, differ ( $P \leq 0.05$ ) or tend to differ ( $P \leq 0.10$ ).

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 <sup>1</sup>			
	T-C	T-EO	SEM	Treated vs Control
<i>Liver</i>				
TBARS (nmol MDA/mL)	33.8	23.1	2.03	↓ 31.6 %
GST (g/dL)	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 (g/dL)	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 (g/dL)	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 (g/dL)	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 (g/dL)	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>Cólon</i>				
TBARS (nmol MDA/mL)	4.78	4.86	0.18	↑ 1.67 %
GST (g/dL)	558	563	22.5	↑ 0.89 %
Thiols (μmol SH/mg protein)	0.73	1.03	0.17	↑ 41.0 %
ROS (U DCFH/mg protein)	1.97 <sup>b</sup>	3.20 <sup>a</sup>	0.23	↑ 62.4 %

<sup>1</sup>Treatments were: T-C and T-EO, represents control (addition of trichothecenes) and treatment (addition of trichothecenes with essential oil mixture). <sup>2</sup>Mean and standard deviation. <sup>3</sup>A descriptive and representative difference between groups was considered when the percentage of increase or decrease was greater than 30%.

Figure 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 ( $P \leq 0.10$ ).

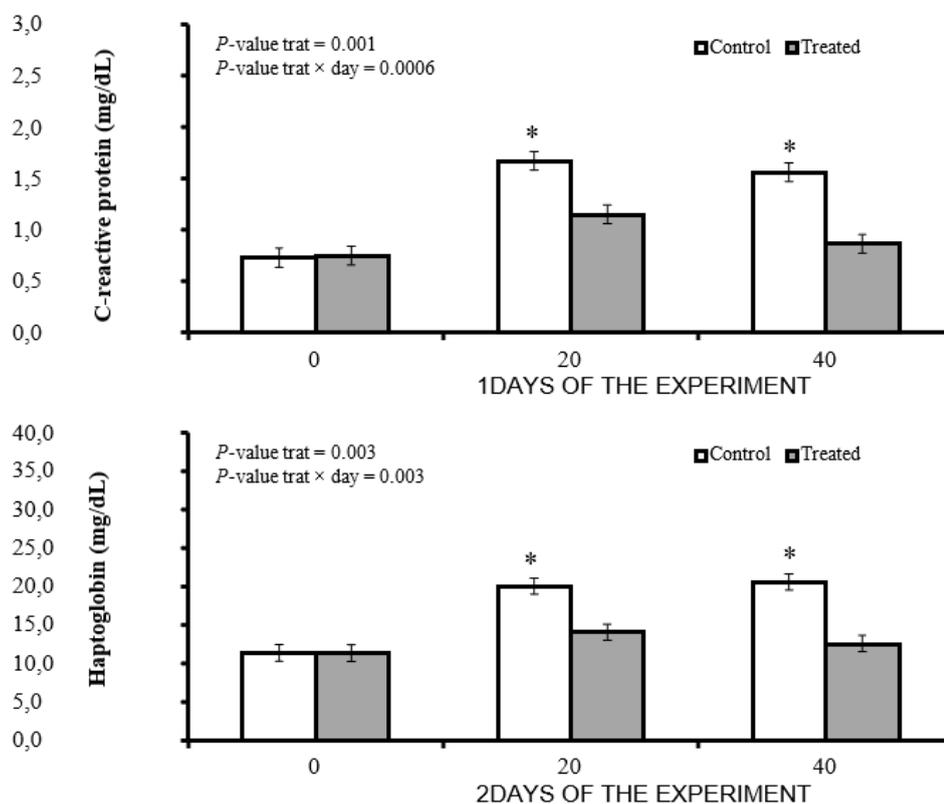


Figure 2 - Histopathology of liver (control – A; treated – B), kidney (control – C; treated – D), spleen (control – E; treated – F) and intestine (control – G; treated – H) without microscopic findings indicative of tissue damage.

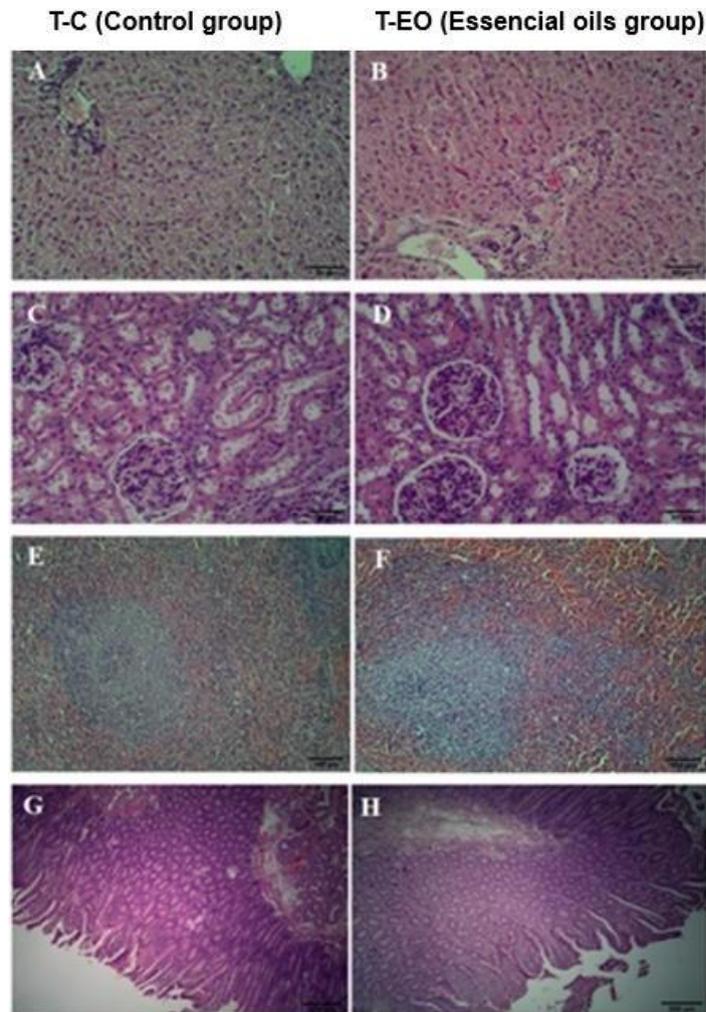


Table 8 - Supplementary Material 1 - Compounds identified in the essential oil blend.

Compounds	g/kg
Alpha-thujene	3.39
Alpha-pinene	48.7
Camphene	13.7
Beta-pinene	7.59
1-octen-3-ol	9.83
Beta-myrcene	9.15
Alpha-terpinene	15.0
Para-cymene	129
Eucalyptol	146
Cis-ocimene	0.47
Gamma-terpinene	35.8
4-thujanol	9.02
Terpinolene	3.77
Trans-sabinene hydrate	50.0
L-linalool	0.61
(E)-p-2-menthen-1-ol	3.26
(-)-alcanfor	38.7
L-borneol	11.9
4-terpineol	39.1
Alpha-terpineol	8.49
Estragole	197
Thymyl methyl ether	4.00
p-cymene-2-ol methyl ether	4.90
Lynalyl acetate	11.2
Thymol	113
Carvacrol	21.5
Caryophyllene	31.2
Methyl eugenol	2.96
Trans alpha-bergamotene	3.44
Alpha-humulene	5.55
Trans beta-farnesene	0.64
D-germacrene	2.80
Gamma-elemene	3.58
Gamma-cadinene	0.38
B-bisabolene	1.29
Cis alpha-bisaboleno	4.98
Caryophyllene oxide	5.18
T-cadinol	0.35

## **7 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

A dosagem avaliada de tricotecenos neste estudo não causou alterações clínicas nos bezerros em nenhum dos grupos experimentais, porém a utilização dos óleos essenciais atuou de maneira satisfatória sobre o sistema imunológico e antioxidante, favorecendo o melhor desempenho dos animais em crescimento. A literatura descreve que os óleos essenciais possuem capacidade antioxidante, o que justificaria a sua utilização no status oxidativo do animal; porém mais estudos são necessários para avaliar as dosagens ideais. Futuramente considera-se avaliar maiores quantidades de micotoxinas e possíveis interações com mais altas dosagens do mixture, para melhor avaliar como o status oxidativo em bovinos leiteiros.

## REFERÊNCIAS

- ADAMS, R. P. Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry. 4.1 ed., Texensis Publishing. ISBN 978-1-932633-21-4, 2017.
- ALI S.F., et al. Reactive Oxygen Species Formation as A Biomarker of Methylmercury and Trimethyltin Neurotoxicity. *Neurotóxico*. 113:637-648. 1992.
- AOAC. Official Methods Analysis of AOAC International. Association of Official Analytical Chemists Associação de Químicos Analíticos Oficiais, Washington, 2000.
- ASSIS, J., et al. Cadeia Produtiva do Leite no Brasil No Contexto do Comércio Internacional. *Rev. Ciência de Empresas, UNIPAR, Umuarama*, v. 17, n. 1, p. 63-93, 2016
- BAERE, S., et al. Quantitative Determination of T2 toxin, HT-2 toxin, Deoxynivalenol and Deoxyepoxy-deoxynivalenol in Animal Body Fluids Using LC-MS/MS Detection. *Journal Chromatography B*, v. 879, p. 2403-2415, 2011.
- BENCHAAR, C; GREATHEAD, H. Essential Oils and Opportunities to Mitigate Enteric Methane Emissions from Ruminants. *Animal Feed Science and Technology*. Vienna, v. 166, p. 338-355, 2011.
- BLAKE, C. K., et al. Effects of the Fusarium Spp. Mycotoxins Fusaric Acid and Deoxynivalenol on the Growth of *Ruminococcus Albus* and *Methanobrevibacter Ruminantium*. *Canadian Journal Microbiology*, 2000.
- BUENING, G. M., et al. The Effect of T-2 Toxin on the Bovine Immune System: Cellular Factors. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v. 3, p. 411-417, 1982.
- CAMPOLINA J. P., et al. 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): e0231068, 2021.
- CARDOSO, S., et al. Efficacy of Piperine in Reducing the Effects of Aflatoxin Intoxication in Broiler Chickens: a preliminary report. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 63, n. 2, p. 495-498, 2011.
- CAIXETA, L. F. S. Avaliação do Uso de Aditivos Aliados ao Manejo Alimentar no Desenvolvimento do Trato Digestivo de Bezerros. Tese (Doutorado em Ciências Fisiológicas) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2021.

- CHE, Z., et al. The Protective Effects of Different Mycotoxin Adsorbents Against Blood and Liver Pathological Changes Induced by Mold-Contaminated Feed In Broilers. *Asian Austral Journal Animal*, v 24, p. 250-257, 2011.
- CALSAMIGLIA, S., et al. Invited Review: Essential Oils as Modifiers of Rumen Microbial Fermentation. *Journal of Dairy Science*. P. 90:2580–2595, 2007.
- CUSTÓDIO, L., et al. Mycotoxin Contamination of Diets for Beef Cattle Finishing in Feedlot. *Revista Brasileira de Zootecnia* 48: e20190079, 2019.
- CUTRIM, E. S. M., et al . Evaluation of Antimicrobial and Antioxidant Activity of Essential Oils and Hydroalcoholic Extracts of *Zingiber officinale* (Ginger) And *Rosmarinus Officinalis* (Rosemary). *Revista Virtual Quimica*, v. 11, n.11, p. 60-81, 2019.
- DAMBROS, F. P. Desenvolvimento e Validação de Metodologia Analítica para a Determinação de Micotoxinas em Vinhos. 2013. Tese de Doutorado (Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2013.
- DI GREGORIO, M. C., et al . Mineral Adsorbents for Prevention of Mycotoxins in Animal Feeds. 33, 125-135, 2014.
- DEVEGOWDA, G., MURTHY, T. N. K. Mycotoxins: Their Effects in Poultry and Some Practical Solutions. In: *The Mycotoxin Blue Book* (D. Diaz, eds). Nottingham University Press, United Kingdom, 2005.
- DIAS, A. S. Micotoxinas em Produtos de Origem Animal. *Revista Científica de Medicina Veterinária*, ISSN 1679-7353, Ano X, n. 30, Periódico Semestral, janeiro de 2018.
- DOMENICO, D. D. Influência da Associação de Adsorvente Bentonita e Antioxidantes no Fígado, Metabolismo Oxidativo Leucocitário e Produção Leiteira de Bovinos Alimentados com Dietas Contendo Micotoxinas Naturalmente Produzidas. Universidade estadual do centro-oeste. Programa de Pós Graduação em Ciências Veterinárias, dissertação de mestrado, Guarapuava, PR, 2021.
- DONAT, P. V., et al. A Review of the Mycotoxin Adsorbing Agents, with an Emphasis on Their Multi-Binding Capacity, For Animal Feed Decontamination. *Journal Food and Chemical Toxicology*, v. 118, 2018.
- FAÇANHA, D. A. E., et al. Respostas Comportamentais e Fisiológicas de Bezerros Leiteiros Criados em Diferentes Tipos de Instalações e Dietas Líquidas. *Acta Veterinária Brasília*, v. 5, n. 3, p. 250-257, 2011.

- FELDMAN, B. F., et al. *Veterinary Hematology*. Williams & Wilkins, Philadelphia, p. 1344, 2000.
- FISCHER, A., et al. Produção e Produtividade de Leite do Oeste Catarinense. *RACE, Unoesc*, v. 10, n. 2, p. 337-362, jul./dez. 2011.
- FROEHLICH, K. A., et al. Evaluation of Essential Oils and Prebiotics for Newborn Dairy Calves. *Journal Animal Science*, p. 95:3772–3782, 2017.
- GABBI, A. M., et al. Parâmetros hematológicos de novilhas leiteiras submetidas a dietas com aditivos fitogênicos. *Revista Brasileira Saúde Produção Animal*, v. 10, n. 4, p. 917- 928, 2009.
- GARCIA, D. A.; GOMES, D. E. A avicultura brasileira e os avanços nutricionais. *Revista Científica UNILAGO - União das Faculdades dos Grandes Lagos*, v. 1, n. 1, 2019.
- HABIG, W. H., et al. Glutathione S-Transferases: the first enzymatic in mercapturic acid formation. *The Journal of Biological Chemistry*, Baltimore, v. 249, n. 22, p. 7130-7139, 1974.
- HAMMER, K. A., et al. Antimicrobial Activity of Essential Oils and Other Plant Extracts. *Journal of Applied Microbiology*, p. 86: 985-990, 1999.
- JANIK, E., et al. T-2 Toxin - The Most Toxic Trichothecene Mycotoxin: Metabolism, Toxicity, and Decontamination Strategies. *Molecules*, 2021.
- JENTZSCH A. M., et al. Improved analysis of malondialdehyde in human body fluids. *Free Radical Biology and Medicine* v. 20, p. 251–256. 1996.
- JESHARI, M., A., et al. Effect of Essential Oils and Distillation Residues Mixtures on Growth Performance and Blood Metabolites of Holstein Calves Weaned Gradually or Abruptly. *Livestock Science*, p. 117–122, 2015.
- KAZEMI-BONCHENARI, M., et al. Essential Oils Improved Weight Gain, Growth and Feed Efficiency of Young Dairy Calves Fed 18 or 20% Crude Protein Starter Diets. *Journal Animal Physiology and Animal Nutrition*, 2018.
- LITHERLAND, N. Oklahoma Dairy Report – A Dairy Nutrition Newsletter. Oklahoma State University Issue 2, v. 1, 2007.
- LIU, Q., et al. Oregano Essential Oil Loaded Soybean Polysaccharide Films: Effect of Pickering Type Immobilization on Physical and Antimicrobial Properties. *Food Hydrocolloids*, v. 87, p. 165-172, 2019.
- MANN, D. D., et al. Effect of Subclinical Levels of T-2 Toxin on the Bovine Cellular Immune System. *Canadian Journal of Comparative Medicine*, 1984.

- MANN, D. D., et al. Effect of T-2 Toxin on the Bovine Immune System: Humoral Factors. *Infection and Immunity*, p. 1249-1252, 1982.
- MALTEZ, L. C., et al. Oxidative Stress and Antioxidant Responses In Juvenile Brazilian Flounder *Paralichthys Orbignyanus* Exposed To Sublethal Levels of Nitrite. *Fish Physiol Biochem*, p. 1-14, 2018.
- MAVROMMATIS, A., et al. Impact of Mycotoxins on Animals' Oxidative Status. *Antioxidants (Basel)*, v. 10, n. 2, p. 214.
- MENEZES, G. L., et al. Efeito do uso de óleos essenciais no desempenho de bovinos de corte confinados. *Revista PUBVET*, v.16, n.01, a1003, p.1-7, 2022.
- MOURA, I. C. F. Utilização do Desmame Precoce ou Amamentação Controlada no Rebanho de Cria em Gado de Corte. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Zootecnia) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos, PR, 2016.
- NASCIMENTO, M. O. Eficácia do Óleo Essencial de Tomilho (*Thymus Vulgaris* L.) no Controle In Vitro de *Aspergillus Flavus*. Universidade De Brasília, Faculdade De Ciências Da Saúde Departamento de Nutrição, Brasília, 2020.
- NOLETO, R. A., et al. Suplementação de Óleo de Copaíba ou Sucupira na Ração de Frangos de Corte. *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal*, p. 83- 92, 2018.
- OKUMA T.A., et al. Use of Enzyme-Linked Immunosorbent Assay to Screen for Aflatoxins, Ochratoxin A, And Deoxynivalenol in Dry Pet Foods. *Mycotoxin Research*, v.34, n.1, p.69-75, 2018.
- OLIVEIRA, J. C. A.; VEIGA, R. S. Impacto do Uso de Alecrim (*Rosmarinus Officinalis* L.) para a Saúde Humana. *Brazilian Journal of Natural Sciences*, Ed. 2, v. 1, 2019.
- PANDE, V. V., et al. Effect of T-2 Toxin on Growth, Performance and Haemato Biochemical Alteration In Broilers. *Indian Journal Experimental Biology*, v. 44, p. 86 – 88, 2006.
- PEREIRA, C. S., et al. Prevalent Mycotoxins in Animal Feed: Occurrence and Analytical Methods. *Toxins*, 2019.
- PETRE, R. O., et al. Characterization and Application of Oregano Oil as a Natural Antioxidant in Fresh Sausage. *Brazilian Journal of Development*, Curitiba, v. 6, n.7, p. 44109-44118, 2020.
- PICOLLOTO, A. M., et al. Thermal Stability and Vaporization of Thyme Essential Oil. *Revista Gestão e Sustentabilidade Ambiental.*, v. 11, n. esp, p. 175-189, 2022.

POMBO, J. C. P., et al. Efeito antimicrobiano e Sinérgico de Óleos Essenciais sobre Bactérias Contaminantes de Alimentos. *Segurança Alimentar e Nutricional*, v. 25, n. 2, 2018.

KHATERI, N., et al. Effects Of A Specific Mixture of Essential Oils on Apparent Nutrient Digestion, Rumen Fermentation and Rumen Microbial Populations in Sheep Fed a 50:50 Alfalfa Hay:Concentrate Diet. *Asian-Australasian Journal Animal Science*, v. 30, p. 30:370– 378, 2017.

NAYAKWADI, S., et al. Toxicopathological Studies on The Effects Of T-2 Mycotoxin and Their Interaction in Juvenile Goats. *PLoS ONE* 15(3), 2020.

RAMOS, L. *Encyclopedia of Separation Science*. Academic Press, p. 1434 – 1441, 2000.

RAY, D.K., et al . Yield Trends São insuficientes para dobrar a produção global de culturas até 2050. *PLOS ONE*, 2013.

REIS, J. B. et al. Evaluation of Antimicrobial Activity of Essential Oils Against Food Pathogens. *Brazilian Journal of Health Review*, v. 3, n. 1, p.342-363, 2020.

RODRIGUES, G. C. N. *Diarreia em Bezerras Leiteiras: Revisão Bibliográfica*. Universidade Estadual Paulista (Unesp), 2021. Disponível em: <http://hdl.handle.net/11449/217934>.

SANTIN, E. et al. Micotoxinas do *Fusarium* spp. na Avicultura Comercial. *Ciência Rural*, \_\_Santa Maria., 31:185-190, 2000.

SANTOS, G. T. et al. Importância do Manejo e Considerações Econômicas na Criação de Bezerras e Novilhas. *Anais do II Sul- Leite: Simpósio sobre Sustentabilidade da Pecuária Leiteira na Região Sul do Brasil– Maringá: UEM/CCA/DZO – NUPEL*, 2002.

SANTOS, G. T.; DAMASCENO, J. C. *Nutrição e Alimentação de Bezerras e Novilhas*. Organizado por: Iran Borges de Oliveira; Lúcio Gonçalves *Nutrição de Gado de Leite*:ed. 1 ed., *Anais...* Belo Horizonte, Escola de Veterinária da UFMG, v. 1, p. 39-64, 1999.

SANTOS, C. H. S., et al. Atividade Antimicrobiana de Óleos Essenciais e Compostos Isolados Frente aos Agentes Patogênicos de Origem Clínica e Alimentar. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, p. 76, 2017.

SANTOS, I. V., et al. Óleos Essenciais Utilizados no Tratamento da Neuralgia: Revisão Sistemática. *Pesquisa, Sociedade e Desenvolvimento*, v. 10, n. 5, p. e6710514606, 2021.

- SEDLAK, J.; LINDSAY, R. H. C. Estimation of total, protein bound and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellmann's reagent. *Analytical Biochemistry*. v. 25, p. 192– 205, 1968.
- SOARES, V. G. Teor de Compostos Fenólicos e Análises Físico-Químicas em Diferentes Condimentos In Natura E Desidratado De Alecrim, Hortelã, Manjerição e Orégano. Trabalho de Curso apresentado ao Curso Superior de Tecnologia em Alimentos do Instituto Federal Goiano – Campus Morrinhos, para obtenção do título de Tecnólogo em Alimentos, 2020.
- STEVANOVIC, Z. D., et al. Essential Oils as Feed Additives Future Perspectives. *Molecules*. Belgrade, v. 23, n. 7, 2018.
- TADEI, N, S., et ao. Micotoxinas de Fusarium na Produção de Cerveja: Características, Toxicidade, Incidência, Legislação e Estratégias de Controle. Universidade de Campinas, São Paulo, 2020.
- TARCITANO, L. A. C.; MESQUITA, E. F. M. Ação dos condimentos alimentares in natura sobre a microbiota patogênica durante o processamento, preparo e/ou consumo do pescado: uma revisão sistemática de literatura. *Arquivos de Ciências do Mar*, p. 141-162, 2017.
- TIUZZI, M; FURLAN, M. R. Atividade Antioxidante do Alecrim. *Revista Eletrônica Thesis*, ano XIII, n. 26, p.99-114, 2º semestre, 2016.
- TRAESEL, C. K., et al. Óleos Essenciais como Substituintes de Antibióticos Promotores de Crescimento em Frangos de Corte: Perfil de Soro proteínas e Peroxidação Lipídica. *Ciência Rural*, v. 41, n. 2, p. 278-284, 2011.
- VAN SOEST, P. J., et al. Methods for Dietary Fiber, Neutral Detergent Fiber, and Nonstarch Polysaccharides in Relation to Animal Nutrition. *Journal of Dairy Science*, v. 74, n. 10, p. 3583-3597, 1991.
- VAN DEN DOOL, H; Kratz, P. D. A Generalization of the Retention Index System Including Linear Temperature Programmed Gas–Liquid Partition Chromatography. *Journal of Chromatography*, p. 463-471, 1963.
- VASCONCELLOS, S. C., et al . Composição Química, Atividade Bactericida e Antioxidante dos Óleos Essenciais das Folhas de *Ocimum basilicum* e *Ocimum gratissimum* (Lamiaceae). *Research, Society and Development*, v.10, n. 8, 2021
- VEDOVATTO, M. G., et al. Micotoxinas na Dieta de Bovinos de Corte: Revisão. *Archivos de Zootecnia* v. 69, n. 266, p. 235, 2020.

- VENDRAMINI, T. H. A., et al . Effects of a mixture of essential oils, chitosan or monensin on nutrient intake and digestibility of lactating dairy cows. *Animal Feed Science Technology*. v. 214, p. 12–21, 2016.
- VIEITES, F.M., et al. Morfologia e Microbiota de Frangos Alimentados com Dietas Contendo Óleos Essenciais: Revisão. *Pesquisa, Sociedade e Desenvolvimento*, v. 9, n. 8, 2020.
- VOGUEL, S. D.; VILLAMIL-JIMENEZ, L. C. Micotoxinas en la Salud Pública, *Revista de la Salud Pública*, 2006.
- WU, J., et al. Feeding A Calf Starter Containing Monensin Alone or in Combination with an Oregano, Prebiotics, and Cobalt Mixture to Holstein Calves. *Journal Animal Science*. p 98, 2020.
- WU, J., et al. Dietary Supplementation with Oregano Essential Oil and Monensin in Combination is Antagonistic to Growth Performance of Yearling Holstein Bulls. *Journal of Dairy Science*, v. 103, n. 9, 2020.
- ZHOU, R., et al. Oregano's Impact on in Vitro Ruminant Fermentation, Methane Production and Ruminant Microbial Community. *Journal Dairy Science*. v. 103, p. 2303–2314, 2019.
- YANG, L., et al. Citotoxicity and Apoptosis Induced by Mixed Mycotoxins (T-2 And HT-2 Toxin) on Primary Hepatocytes of Broilers in Vitro. *Toxicon*, v. 17, 2017.
- YANG, L., et al. Toxicity and Oxidative Stress Induced By T-2 Toxin and HT-2 Toxin in Broilers Hepatocytes. *Food Chemical Toxicology*, v. 87, p. 128-137, 2016.
- YANG, L., et al. Determination of Trichothecenes A (T-2 toxin, HT-2 toxin and diacetoxyscirpenol) in the Tissues of Broilers Using Liquid Chromatography Coupled to Tandem Mass Spectrometry. *Journal of Chromatography*, 2013.



**LAGES**  
CENTRO DE CIÊNCIAS  
AGROVETERINÁRIAS

**Comissão de Ética no  
Uso de Animais**

## CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Efeitos do Consumo de Tricotecenos na Saúde e Desempenho Zootécnico de Bezerros Leiteiros, e Avaliação dos Benefícios da Adição de um Blend de Óleos Essenciais", protocolada sob o CEUA nº 9502210721 (ID 001433), sob a responsabilidade de **Lenita de Cássia Moura Stefani e equipe; Aleksandro Schafer da Silva** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade do Estado de Santa Catarina (CEUA/UDESC) na reunião de 24/09/2021.

We certify that the proposal "Effects of Trichotheccenes on the Health and Performance of Dairy Calves, and the Evaluation of Adding a Blend of Essential Oils ", utilizing 12 Bovines (12 males), protocol number CEUA 9502210721 (ID 001433), under the responsibility of **Lenita de Cássia Moura Stefani and team; Aleksandro Schafer da Silva** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the University of Santa Catarina State (CEUA/UDESC) in the meeting of 09/24/2021.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**

Vigência da Proposta: de **08/2021** a **04/2022** Área: **Zootecnia**

Origem:	<b>Animais provenientes de outros projetos</b>		
Espécie:	<b>Bovinos</b>	sexo:	<b>Machos</b>
		idade:	<b>60 a 110 dias</b>
		N:	<b>12</b>
Linhagem:	<b>Holandês</b>	Peso:	<b>80 a 120 kg</b>

Local do experimento: Baías do Setor de Ruminantes da Fazenda Experimental do CEO/UDESC.

Lages, 18 de julho de 2022

José Cristani  
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade do Estado de Santa Catarina

Pedro Volkmer de Castilhos  
Vice-Coodenador da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade do Estado de Santa Catarina