

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA**

BRUNA POLETTI

**USO DE EXTRATO DE *Acacia mearnsii* (ACÁCIA NEGRA) NA ALIMENTAÇÃO
DE NÃO-RUMINANTES**

Porto Alegre

2022

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

**USO DE EXTRATO DE *Acacia mearnsii* (ACÁCIA NEGRA) NA ALIMENTAÇÃO
DE NÃO-RUMINANTES**

BRUNA POLETTI

Zootecnista/UNIPAMPA

Mestre em Zootecnia/ UFRGS

Tese apresentada como requisito para obtenção do
Grau de Doutor em Zootecnia, na Faculdade de
Agronomia, da Universidade Federal do Rio Grande
do Sul. Área de concentração: Produção Animal
Orientador: Alexandre de Mello Kessler

Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil

Março de 2022

Bruna Poletti
Mestre em Zootecnia

TESE

Submetida como parte dos requisitos
para obtenção do Grau de

DOUTORA EM ZOOTECNIA

Programa de Pós-Graduação em Zootecnia
Faculdade de Agronomia
Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Porto Alegre (RS), Brasil

Aprovada em: 31.03.2022
Pela Banca Examinadora

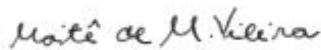
Homologado em: 26/05/2022
Por



ALEXANDRE DE MELLO KESSLER
PPG Zootecnia/UFRGS
Orientador



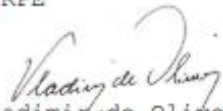
SERGIO LUIZ VIEIRA
Coordenador do Programa de
Pós-Graduação em Zootecnia



Maite de Moraes Vieira
UFRGS



Maria do Carmo Mohaupt Marques Ludke
UFRPE



Vladimir de Oliveira
UFSM



CARLOS ALBERTO BISSANI
Diretor da Faculdade de Agronomia

CIP - Catalogação na Publicação

Poletti, Bruna
USO DE EXTRATO DE *Acacia mearnsii* (ACÁCIA NEGRA)
NA ALIMENTAÇÃO DE NÃO-RUMINANTES / Bruna Poletti. --
2022.
124 f.
Orientador: Alexandre de Mello Kessler.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Faculdade de Agronomia, Programa de
Pós-Graduação em Zootecnia, Porto Alegre, BR-RS, 2022.

1. Nutrição de não-ruminantes. 2. Taninos
condensados. 3. Galinhas poedeiras. 4. Frango de
corte. 5. Suínos. I. de Mello Kessler, Alexandre,
orient. II. Título.

AGRADECIMENTOS

Agradeço inicialmente à minha mãe, Fátima, modelo de coragem e força, por todo o incentivo e amor incondicional. Por me incentivar a buscar meus objetivos incansavelmente, e acreditar que posso. Aos meus melhores amigos, Naiane, Bruna e Rafael, que sempre estiveram ao meu lado me apoiando.

Agradeço ao professor Alexandre, por todas as oportunidades que me foram concedidas, por cada ensinamento, pela dedicação, e principalmente por sempre acreditar no meu potencial.

Aos colegas de orientação e amigos, Yanne e Jone, muito obrigada pela amizade.

À empresa Seta, por ter abraçado e financiado o projeto.

Aos proprietários da Granja Quinta da Passiflora, Sr. Edson e Dona Cláudia, por abrirem as portas da propriedade desde 2016 para realização de experimentos, além de todos os ensinamentos que passaram.

À toda equipe do Setor de Suínos da Universidade Federal de Santa Maria, por ceder seu espaço e auxiliar na condução do experimento.

Agradeço, à UFRGS, seu corpo docente e funcionários, por proporcionarem um ambiente de aprendizado de alta qualidade. Agradeço também a CNPq pelo apoio financeiro que me permitiu a dedicação exclusiva a este trabalho.

Agradeço por fim, à mim mesma, por não ter desistido frente aos inúmeros desafios encontrados durante a minha trajetória.

USO DE EXTRATO DE *Acacia mearnsii* (ACÁCIA NEGRA) NA ALIMENTAÇÃO DE NÃO-RUMINANTES¹

Autora: Bruna Poletti

Orientador: Alexandre de Mello Kessler

Resumo: Estudos recentes sobre a atividade dos taninos desmistificaram seu efeito antinutricional e evidenciaram importantes ações benéficas a produção animal devido às suas propriedades antioxidantes, antibacterianas, reparadoras de tecidos e de regulação enzimática e proteica. O objetivo deste trabalho foi avaliar a adição de extrato da casca de *Acacia mearnsii*, composto rico em taninos condensados, na dieta de poedeiras, frangos de corte e suínos em crescimento e terminação, sobre o desempenho, digestibilidade dos nutrientes, qualidade de ovos e carne, integridade do coxim plantar, vilosidades intestinais e microbioma das fezes. Foram realizados 3 diferentes experimentos: o primeiro utilizando 40 poedeiras Isa Brown com 51 semanas de idade, o segundo com 160 frangos de corte Label Rouge, e o terceiro, com quarenta e oito suínos em terminação Large White x Landrace. Todos experimentos possuíam uma dieta controle e mais 3 dietas com diferentes níveis de inclusão do extrato de acácia negra na dieta, sendo eles: 150, 300 e 450mg/kg para os experimentos 1 e 2; e 500, 1000 e 2000 mg/kg para o 3. Poedeiras que receberam as inclusões de 300 e 450 mg/kg do extrato apresentaram melhora ($P<0,05$) nos escores de lesão por pododermatite ao final do experimento. Em frangos de corte, os menores valores de oxidação lipídica da carne, e maiores valores de altura e largura de vilosidades na análise de morfologia intestinal foram encontrados nas amostras dos animais que receberam 300 e 450 mg/kg de inclusão. Em suínos, o aumento dos níveis de inclusão resultou em uma redução linear na oxidação lipídica ($P<0,04$) e força de cisalhamento ($P<0,003$) da carne. Na análise do microbioma fecal, a diversidade de dois reinos, *Bacteria* e *Archea*, foi identificada, compreendendo sequências de 42 filós, 88 classes, 123 ordens, 287 famílias, 1127 gêneros e 1775 possíveis espécies de microrganismos. O número de espécies não foi diferente ($P>0,05$) entre os tratamentos (0mg/kg: 505 espécies, 500mg/kg: 547 espécies, 1000mg/kg: 570 espécies e 2000mg/kg: 630 espécies). Por outro lado, houve tendência ($P<0,08$) de crescimento linear do número de espécies com o aumento da adição de tanino na dieta. Concluiu-se que o extrato de acácia negra pode ser adicionado na dieta de aves de postura frangos de corte e suínos em crescimento e terminação sem prejuízos ao desempenho, qualidade dos ovos e metabolismo e digestibilidade de nutrientes. Além disso, sua inclusão melhorou a integridade do coxim plantar das aves de postura, o tamanho das vilosidades intestinais dos frangos de corte, a qualidade oxidativa e maciez da carne de frangos e suínos, além de modular o microbioma fecal dos suínos.

Palavras-chave: Desempenho; Metabolismo de nutrientes; Morfologia intestinal; Microbioma; Pododermatite; Qualidade de ovos; Qualidade de carne; Taninos condensados.

¹Tese de Doutorado em Zootecnia – Produção Animal, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (124p.) Março, 2022.

USE OF *Acacia mearnsii* (BLACK ACACIA) EXTRACT IN THE FEEDING OF NON-RUMINANTS¹

Author: Bruna Poletti

Adviser: Alexandre de Mello Kessler

Abstract: Recent researches on the activity of tannins have demystified its anti-nutritional effect and evidenced important beneficial actions on animal farming due to its antioxidant, antibacterial, tissue repairing and enzymatic and regulatory properties protein. The objective of this work was to evaluate the addition of *Acacia mearnsii* bark extract, a compound rich in condensed tannins, in the diet of laying hens, broilers and growing and finishing pigs, on performance, nutrient digestibility, egg and meat quality, footpad integrity, intestinal villi and fecal microbiome. Three different experiments were carried out: the first using 40 Isa Brown laying hens at 51 weeks of age, the second with 160 Label Rouge broilers, and the third with forty-eight Large White × Landrace finishing pigs. All experiments had a control diet and 3 more diets with different levels of inclusion of black wattle extract in the diet, namely: 150, 300 and 450mg/kg for experiments 1 and 2; and 500, 1000 and 2000 mg/kg for 3. Laying hens that received the inclusions of 300 and 450 mg/kg of the extract showed improvement ($P<0.05$) in pododermatitis lesion scores at the end of the experiment. In broilers, the lowest values of meat lipid oxidation, and the highest values of height and width of villus in the analysis of intestinal morphology were found in samples from animals that received 300 and 450 mg/kg of inclusion. In pigs, increasing inclusion levels resulted in a linear reduction in lipid oxidation ($P<0.04$) and shear force ($P<0.003$) of the meat. In the analysis of the fecal microbiome, the diversity of two kingdoms, *Bacteria* and *Archea*, was identified, comprising sequences of 42 phyla, 88 classes, 123 orders, 287 families, 1127 genera and 1775 possible species of microorganisms. The number of species was not different ($P>0.05$) between treatments (0mg/kg: 505 species, 500mg/kg: 547 species, 1000mg/kg: 570 species and 2000mg/kg: 630 species). On the other hand, there was a trend ($P<0.08$) of linear growth in the number of species with increasing addition of tannin in the diet. It was concluded that the black wattle extract can be added to the diet of laying hens, broilers and growing and finishing pigs without prejudice performance, egg quality, metabolism and nutrient digestibility. In addition, its inclusion improved the integrity of the footpad of laying hens, the size of the intestinal villi in broilers, the oxidative quality and tenderness of chicken and swine meat, in addition to modulating the fecal microbiome of swine.

Keywords: Condensed tannins; Egg quality; Intestinal morphology; Microbiome; Meat quality; Nutrient metabolism; Performance; Pododermatitis; .

¹ Doutoral thesis in Animal Science – Animal Production, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (124 p.) March, 2022.

SUMÁRIO

CAPÍTULO I	14
1. INTRODUÇÃO.....	15
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
2.1 Panorama de Produção.....	17
2.1.1 Panorama de Produção em Sistemas Orgânicos.....	18
2.2 Uso de aditivos na produção animal.....	20
2.2.1 Uso de aditivos substitutos aos antimicrobianos promotores e crescimento na produção animal convencional.....	20
2.2.2 Uso de aditivos na produção animal orgânica.....	22
2.3 Uso de aditivos fitogênicos.....	23
2.4 Taninos.....	24
2.4.1 Taninos hidrolisáveis	26
2.4.2 Taninos condensados.....	26
2.4.3 Taninos condensados de Acácia negra.....	28
2.4.4 Uso de taninos na nutrição animal.....	30
3. HIPÓTESES E OBJETIVOS.....	34
CAPÍTULO II.....	35
Black wattle (<i>acacia mearnsii</i>) extract in the diet of laying hens in an organic production system.....	36
Introduction.....	36
Materials and Methods.....	37
Results.....	42
Discussion.....	46
Conclusions.....	50
References.....	50

CAPÍTULO III	56
Effects of condensed tannin supplementation on performance, nutrient digestibility, carcass characteristics, meat quality and fecal microbiome in pigs.....	57
Introduction.....	58
Material and methods.....	59
Results.....	65
Discussion.....	73
References.....	78
CAPÍTULO IV.....	85
Extrato de Acácia negra na dieta de frangos de corte em sistema orgânico de produção	86
Introdução.....	87
Material e Métodos	88
Resultados.....	92
Discussão	96
Referencias	100
CAPÍTULO V	104
Considerações Finais	105
Referências	107
Anexos	115
Vita	124

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

CAPÍTULO I

- Figura 1.** Ranking mundial dos países com as maiores produções de carne de frango (em milhões de toneladas) no ano de 2021.....17
- Figura 2.** Ranking mundial dos dez países com o maior aumento de terras destinadas à produção orgânica.....19
- Figura 3.** Unidades monoméricas de taninos condensados (catequina e galocatequina) e taninos hidrolisáveis (ácido gálico e ácido elágico).....26
- Figura 4.** Fluxograma do processo de produção de taninos a partir da casca de *Acacia mearnsii*.....29

CAPÍTULO II

- Figura 1.** Frequency of pododermatitis scores in laying hens with addition of black wattle extract in the diet (0, 150, 300 e 450 mg/kg).....45

CAPÍTULO III

- Figure 1.** Beta diversity visualized using UniFrac distances with Principal Coordinate Analysis (PCoA), in feces of pigs fed diets with 0 (T1), 500 (T2), 1000 (T3) or 2000 (T4) mg/kg of *Acacia mearnsii* bark extract.....69

CAPÍTULO IV

- Figura 1.** Peso médio (g) de frangos de corte da linhagem Label Rouge, criados em sistema orgânico de produção, recebendo dietas com diferentes níveis de inclusão de extrato de acácia negra na dieta, dos 35 aos 63 dias de idade.....93
- Figura 2.** Consumo médio de ração (g) dos dias 42 a 49 (segunda semana de experimento) de frangos de corte da linhagem Label Rouge, criados em sistema orgânico de produção, recebendo dietas com diferentes níveis de inclusão de extrato de acácia negra na dieta.....95
- Figura 3.** Altura e largura (μm) das vilosidades intestinais de frangos de corte, da linhagem Label Rouge, suplementados com extrato de acácia-negra96

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II

Table 1. Composition of the diet.....	39
Table 2. Performance of 55-week-old brown laying hens receiving a diet with the addition of black wattle extract in an organic production system	43
Table 3. Egg quality of brown laying hens at 55 weeks of age receiving a diet with the addition of black wattle extract in an organic production system.....	44
Table 4. Nutrient metabolism in 55-week-old brown laying hens receiving a diet with the addition of black wattle extract in an organic production system.....	45

CAPÍTULO III

Table 1. Ingredient composition of phase 1, 2 and 3 diets for growing pigs.....	60
Table 2. Total performance and by phase of pigs fed diets with different levels of inclusion of <i>Acacia mearnsii</i> bark extract.....	66
Table 3. Apparent total tract digestibility (ATTD) of the components measured in pigs in phase 2 (70-75 kg body weight) with diets with different levels of inclusion of <i>Acacia mearnsii</i> bark extract.....	67
Table 4. Evaluation of carcass characteristics of pigs fed diets with different levels of <i>Acacia mearnsii</i> bark extract.	67
Table 5 - Meat quality evaluation of pigs fed diets with different levels of <i>Acacia mearnsii</i> bark extract.....	68
Table 6. Predominant phyla of Bacteria and Archea (expressed as % of abundance) present in the feces of pigs fed diets with 0, 500, 1000 or 2000 mg/kg of <i>Acacia mearnsii</i> bark extract.	70
Table 7. Predominant orders of Bacteria (expressed as % of abundance) present in the feces of pigs fed diets with 0, 500, 1000 or 2000 mg/kg of <i>Acacia mearnsii</i> bark extract... ..	71

Table 8. Predominant genera of Bacteria (expressed as % of abundance) present in the feces of pigs fed diets with 0, 500, 1000 or 2000 mg/kg of Acacia mearnsii bark extract... ..72

CAPÍTULO IV

Tabela 1. Composição em ingredientes da dieta crescimento, composição calculada e analisada (matéria natural*) dos nutrientes da dieta padrão para frangos de 35 a 63 dias85

Tabela 2. Ganho médio de peso, consumo médio de ração e eficiência de frangos de corte da linhagem Label Rouge, criados em sistema orgânico de produção, que receberam dietas com diferentes níveis de inclusão de extrato de acácia negra na dieta, dos 35 aos 63 dias92

Tabela 3. Oxidação lipídica e coloração da carne de coxa e perna de frangos de corte da linhagem Label Rouge, criados em sistema orgânico de produção, recebendo dietas com diferentes níveis de inclusão de extrato de acácia94

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ABPA	Associação Brasileira de Proteína Animal
AOAC	Association of Official Agricultural Chemists
FAO	Food Agriculture Organization
g	Gramas
GRFC	Relatório Global sobre Crises Alimentares
HU	Unidade Haugh
IPEA	Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada
Kcal	Quilocaloria
kg	Quilograma
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
mg	Miligramas
OMS	Organização Mundial da Saúde
TAC	Tanino de alta concentração
TBC	Tanino de baixa concentração
TC	Taninos condensados
TH	Taninos hidrolisáveis

CAPÍTULO I

1. INTRODUÇÃO

O mercado de aves e suínos no Brasil está em constante crescimento, de acordo com a Associação Brasileira de Proteína Animal (ABPA, 2022) há projeções de recordes produção, exportações e consumo para a avicultura e a suinocultura do país para 2021 e 2022. Segundo Junqueira *et al.*, (2021), entre os motivos que estão associados a este crescimento, podemos citar 3 fatores: a conscientização dos consumidores sobre as propriedades de saúde, segurança e qualidade dos produtos alimentícios de origem animal; a proibição do uso de promotores de crescimento e de antibióticos em alimentos para animais, desde 2003; e o crescimento dos sistemas de produção alternativos, como o orgânico e agroecológico. Estes fatores aumentaram a popularidade dos suplementos naturais na produção animal, deslocando a atenção dos produtores para os suplementos à base de plantas (Lipiński, 2017). Os suplementos à base de plantas e seus metabólitos secundários são promotores de crescimento naturais alternativos, que são amplamente utilizados na pecuária (Wallace *et al.*, 2010; Yesilbag *et al.*, 2011). Conseqüentemente, pesquisadores estão procurando uma alternativa aos antibióticos para melhorar o desempenho dos animais, otimizar a saúde intestinal (Abudabos *et al.*, 2016; Hafeez *et al.*, 2016; Kiczorowska *et al.*, 2017) e atender as demandas dos novos sistemas de produção que estão em ascensão. Entre as alternativas possíveis, aditivos fitogênicos apresentam efeitos positivos sobre saúde e produtividade (Gianennas *et al.*, 2018; Ahsan *et al.*, 2018; Khoobani *et al.*, 2019), relatando que seu uso pode desempenhar um papel significativo na saúde e desempenho das aves por estimulação do consumo de ração, secreção de enzimas endógenas, efeito antioxidante e antibacteriano.

Um dos maiores componentes dos extratos de plantas são os polifenóis, metabólitos secundários de plantas que contêm componentes bioativos e produzem efeitos positivos nos animais, pois são reconhecidos por seus efeitos anti-inflamatórios, imunomoduladores e antimutagênicos (Lipiński, 2017). Eles têm propriedades antioxidantes e minimizam as conseqüências negativas do estresse oxidativo, além de exercerem efeitos não específicos sobre o metabolismo celular e proporcionarem uma série de benefícios para a saúde e desempenho dos animais, ação antibacteriana, ação sobre protozoários, reparação de tecidos, regulação enzimática e protéica, (Kamboh *et al.*, 2013).

Dentro do grupo dos polifenóis encontramos os compostos tânicos, que estão presentes em uma grande variedade de plantas, pois resultam do metabolismo secundário vegetal ou metabolismo especial. São compostos fenólicos que representam o quarto componente de maior concentração nas plantas, portanto, configuram-se como um extrato vegetal de ampla distribuição na natureza (Vieira *et al.*, 2020).

Os taninos têm um impacto importante na nutrição animal por causa de sua habilidade de formar complexos com numerosos tipos de moléculas, incluindo proteínas, polissacarídeos, membranas celulares de bactérias e enzimas envolvidas na digestão da proteína e carboidratos dos alimentos (Castejon, 2014). Consequentemente, em níveis altos no alimento (até 5%), os taninos podem comprometer a digestibilidade, bem como causar eventos de toxicidade associados em não-ruminantes: depressão no crescimento, baixa utilização da proteína, dano à mucosa intestinal, alteração na excreção de cátions (Giner-Chavez, 1996). Na alimentação de não-ruminantes, a fonte mais usual de taninos estudada foi o grão de sorgo. Embora não cause toxicidade evidente, seu uso na alimentação de suínos reduz a digestibilidade da energia e aminoácidos, consequentemente prejudicando a eficiência alimentar, sendo este efeito proporcional à quantidade de taninos do sorgo (Cousins *et al.*, 1981; Pan *et al.*, 2016). Em níveis moderados, por outro lado, os taninos são potencialmente benéficos na alimentação animal. Em não-ruminantes, têm potencial benéfico em função de suas numerosas atividades biológicas, entre as quais, são as mais importantes para a moderna produção animal: propriedades antimicrobiana, anti-parasítica, anti-viral, anti-inflamatória e anti-oxidante (Huang *et al.*, 2018). Os taninos também podem reduzir o odor dos dejetos produzidos pelos suínos, pois reduzem a produção de gases como o metano e o sulfeto de hidrogênio (Whitehead *et al.*, 2013).

O objetivo deste trabalho foi avaliar a adição de diferentes níveis de um extrato de taninos condensados na dieta de poedeiras marrons, frangos de cortes e suínos em crescimento, sobre desempenho, metabolismo e digestibilidade de nutrientes, bem-estar animal, saúde intestinal, qualidade de carne e ovos, rendimento e características de carcaças destas espécies.

2.REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Panorama de Produção

De acordo com a ABPA, a produção de carne de frango alcançou em 2021 14,350 milhões de toneladas, 3,5% a mais do registrado no ano anterior, com 13,850 milhões de toneladas. O Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA - Foreign Agricultural Service) projetou para 2022 que a produção brasileira de carne de frango poderá chegar até 14,900 milhões de toneladas, 4% maior em relação a 2021, e as exportações 8% superiores ao alcançado em 2020. O consumo per capita também teve um aumento de 2% no ano passado, provavelmente em função do baixo custo desta proteína em relação à carne bovina. O Brasil hoje ocupa o segundo lugar no ranking mundial de produção de carne de frango (Figura 1).

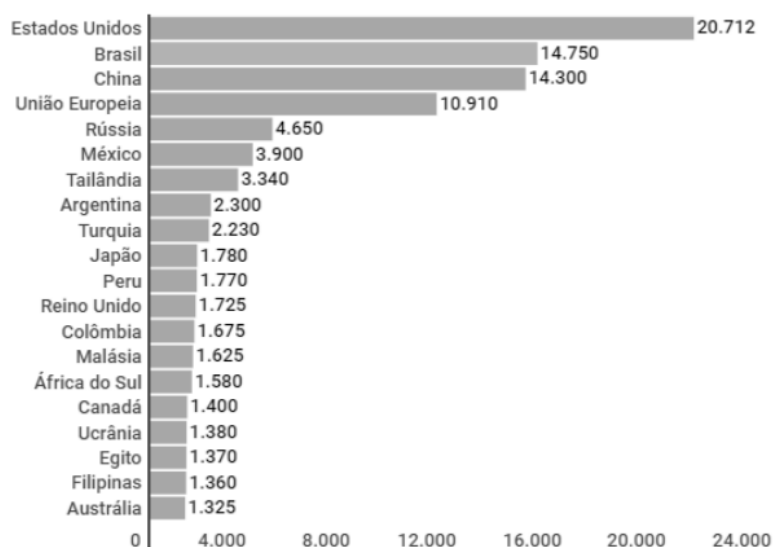


Figura 1: Ranking mundial dos países com as maiores produções de carne de frango (em milhões de toneladas) no ano de 2021. (Fonte: USDA | Foreign Agricultural Service, 2021)

No caso de carne suína, segundo o USDA, a produção deverá alcançar neste ano até 4,700 milhões de toneladas, número 6% superior ao registrado no ano passado, com 4,436 milhões de toneladas. Em exportações, o país alcançou 1,130 milhão de toneladas, 10,5% superior ao alcançado em 2020 (ABPA, 2021). O brasileiro também aumentou o seu consumo per capita, alcançando 16,80 quilos em

2021, 5% a mais do que no ano anterior. Além de ser uma proteína de baixo custo, também estão sendo quebradas barreiras culturais quanto ao consumo de carne suína, através da disseminação de informações sobre suas propriedades nutricionais e benefícios à saúde (Talamini e Martins, 2021).

Para o setor de ovos, a produção foi de 54,503 bilhões de unidades em 2021, 1,8% a mais ao registrado no ano passado (ABPA, 2021). O volume projetado para 2022 poderá chegar até 56,200 bilhões de toneladas, volume 3% maior em relação a 2021 de acordo com o USDA (2022). Foram exportados 9,550 mil toneladas em 2021, número 52,9% superior ao alcançado em 2020, e com projeção de aumento contínuo para este ano. O consumo per capita foi de 255 unidades, 1,55% maior que o consumo registrado em 2020. Tanto a produção quanto às exportações de 2021 e projeções para 2022 para carne de frango, carne suína e de ovos, são recordes históricos (USDA, 2022).

Além do grande desenvolvimento do setor de aves e suínos nos sistemas convencionais, os números referentes à produção orgânica e agroecológica do país também se destaca cada vez mais.

2.1.1 Panorama de Produção em Sistemas Orgânicos

Impulsionada pela demanda crescente por alimentos saudáveis, a agricultura orgânica avança em certificação, área plantada, número de produtores e volume produzido no Brasil e no mundo, para consumo interno ou exportação.

Segundo a FAO (Food Agriculture Organization), define-se como agricultura orgânica, a produção holística de um sistema de manejo, que promove e estimula a saúde do agrossistema, incluindo a biodiversidade, ciclos biológicos e a atividade biológica do solo. O sistema enfatiza ainda, práticas de manejo ao invés do uso de insumos externos à propriedade, levando-se em conta à adaptação dos sistemas às condições regionais.

De acordo com dados de um estudo feito pelo Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada (IPEA, 2020), a demanda mundial tende a se ampliar ainda mais nos próximos anos, pois os produtos oriundos desse sistema são associados a níveis mais elevados de segurança e saúde dos consumidores, bem como seus impactos sociais e ambientais. O Instituto de Pesquisa em Agricultura Orgânica publicou suas estatísticas anuais sobre a produção orgânica mundial, em colaboração com a IFOAM

- Organics Europe and International (2022), mostrando que, em 2020, a agricultura orgânica registrou um crescimento recorde. Na União Européia foi atingida a marca de 14,9 milhões de hectares, atingindo € 44,8 bilhões, o que torna o continente europeu no segundo maior mercado, depois dos EUA.

No Brasil, a agricultura orgânica é um dos setores do agro que mais crescem nos últimos anos, em 2020 o país contabilizou 68.716 estabelecimentos agropecuários certificados para a produção orgânica, onde 18.215 se dedicavam à produção animal e 10.858 à produção vegetal e animal (IPEA, 2020). Uma estimativa do Conselho Brasileiro da Produção Orgânica e Sustentável aponta que no ano de 2020, o setor de orgânicos registrou um crescimento de 30%. e movimentou cerca de R\$ 5,8 bilhões. A área dedicada a esse tipo de cultivo cresceu a uma média anual de 10%, para o mesmo período, colocando país, hoje, no ranking mundial entre os 10 países com as maiores áreas de produção orgânica (Figura 2), sendo o país da América Latina que mais se destaca no setor.

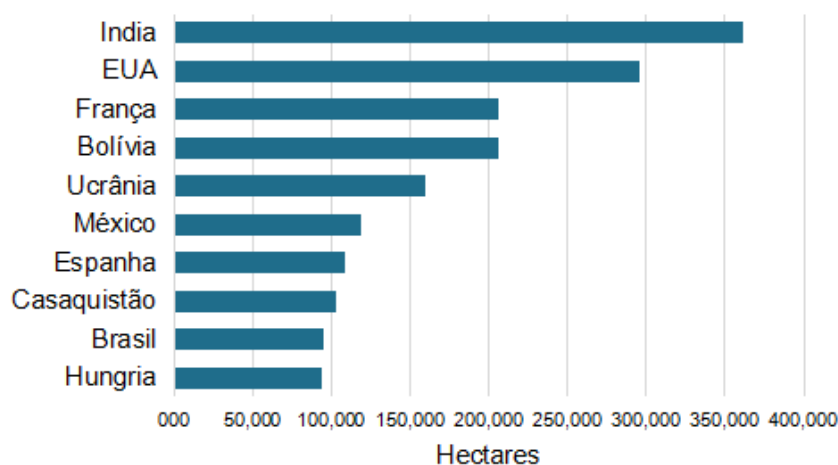


Figura 2: Ranking mundial dos dez países com o maior aumento de terras destinadas à produção orgânica. (Fonte: Adaptado de Research Institute of Organic Agriculture FiBL and IFOAM – Organics International, 2021).

A regulamentação orgânica brasileira é muito abrangente, e inclui programas de promoção e controle de qualidade dos sistemas. Todavia, o país não dispõe, hoje, de dados estatísticos oficiais da produção orgânica, tem-se um cadastro nacional e único de produtores de orgânicos Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), mas não há estimativas de produção e produtividade (Lima, *et al.*, 2021). De acordo com Junqueira *et al.*, (2021), a produção animal (bovina, suína, ovina e frango)

ainda é pequena, porém com uma demanda crescente, à exemplo de outros produtos de origem animal, como leite, carne e ovos. A maior parte da produção orgânica brasileira é destinada à exportação, o mercado interno de orgânicos absorve apenas 15% do total produzido no país (Junqueira *et al.*, 2021). Os mesmos autores afirmaram ainda que uma das principais características do sistema orgânico do país, é a produção familiar ou em pequenas propriedades, apesar de grandes empresas nacionais, de avicultura principalmente, estarem se adequando e inserindo o sistema ao seu modelo de produção.

2.2 Uso de aditivos na produção animal

De acordo com o MAPA (Instrução Normativa Nº. 13 de 30/11/2004) e segundo orientações do Codex Alimentarius, aditivos são produtos destinados à alimentação animal e é definido como "substância, microrganismo ou produto formulado, adicionado intencionalmente aos produtos, que não é utilizada normalmente como ingrediente, tenha ou não valor nutritivo e que melhore as características dos produtos destinados à alimentação animal ou dos produtos animais, melhore o desempenho dos animais sadios e atenda às necessidades nutricionais ou tenha efeito anticoccidiano.

Os aditivos atuam, entre outras funções, melhorando as condições estruturais da mucosa intestinal, promovendo, dessa forma, melhor absorção dos nutrientes e, conseqüentemente, melhorando o desempenho e a qualidade dos produtos de origem animal (Lemos *et al.*, 2017).

2.2.1 Uso de aditivos substitutos aos antimicrobianos promotores de crescimento na produção animal convencional

O uso de antibióticos/antimicrobianos na alimentação animal teve início na década de 50, com o objetivo de otimizar o desempenho dos animais, resultando em taxas de crescimento e conversão alimentar melhores, prevenção de infecções e redução nas taxas de mortalidade e morbidade (Vieites *et al.*, 2020). Com o passar dos anos, começaram a surgir preocupações em relação ao uso de antibióticos na cadeia produtiva animal, tais como: resistência das bactérias aos antibióticos, resíduos na carcaça e nos alimentos derivados de origem animal e reações alérgicas

em pessoas previamente sensíveis (Schwarz & Chaslus-Dancla, 2001). Frente aos receios ao uso indiscriminado de antibióticos, a maioria dos países europeus aboliu o uso desses agentes na produção animal. A Organização Mundial da Saúde, em 2017, determinou normas que delimitam o uso de antimicrobianos de forma consciente. No Brasil, houve reavaliação da legislação, assim, em 2018 os antibióticos tilosina, loncomicina, virginiamicina, bacitracina e tiamulina foram proibidos pela portaria nº 171 da Secretaria de Defesa Agropecuária, ligada ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Brasil, 2018) e a Instrução Normativa nº 03 de janeiro de 2020 (Brasil, 2020) passou a restringir ainda mais os antimicrobianos como aditivo zootécnico adicionado às rações animais. Tendo em vista esse cenário, e juntamente com a pressão dos consumidores, têm aumentado a busca por alternativas que garantam o desempenho produtivo sem interferir na qualidade do produto, e garantam a saúde animal e humana (Gresse *et al.*, 2019).

A alta produtividade apresentada pela indústria de aves e suínos foi, sem dúvida, alavancada através da utilização de aditivos nas dietas, que quando adicionados as rações, são capazes de melhorar o desempenho animal, as características físicas dos alimentos e até mesmo possibilitar maior utilização de ingredientes alternativos. Uma enorme variedade de aditivos como probióticos, prebióticos, simbióticos, ácidos orgânicos, extratos vegetais e enzimas exógenas, vêm sendo bastante estudada na alimentação animal (Vieites *et al.*, 2020; Naumann, 2017; Alves, 2018).

Os aditivos antimicrobianos de origem natural agem como melhoradores de desempenho de animais criados de forma intensiva, auxiliando na manutenção da saúde intestinal, permitindo maior ganho de peso diário e melhorando a conversão alimentar destes animais (Costa *et al.*, 2007). Estes aditivos vêm sendo testados na produção animal como potenciais alternativas aos antibióticos e quimioterápicos convencionalmente usados como melhoradores de desempenho (Kim *et al.*, 2011; 2012). A melhora no desempenho de animais de produção que recebem aditivos alimentares pode ocorrer devido ao aumento na digestibilidade e absorção de nutrientes, estímulo da secreção de enzimas digestivas (Costa *et al.*, 2007), pela melhora na saúde intestinal por meio da manutenção da microbiota benéfica e pelos efeitos benéficos no epitélio intestinal (Claus *et al.*, 2007), além de outros efeitos inerentes a cada aditivo.

2.2.2 Uso de aditivos na produção animal orgânica

O uso substâncias sintéticas é proibido em sistemas de produção orgânicos, ferindo as características dos mesmos e a Instrução Normativa 24 (Brasil, 2011) e Portaria nº 52, de 15 de Março de 2021 (Brasil, 2021), que estabelecem o Regulamento Técnico para os Sistemas Orgânicos de Produção e as listas de substâncias e práticas para o uso nesses sistemas. De acordo com o Anexo III (Aditivos Alimentares e Coadjuvantes de Tecnologia Permitidos no Processamento de Produtos de Origem Vegetal e Animal Orgânicos) desta portaria, extratos vegetais e taninos estão liberados para uso como aditivos na alimentação dos animais em sistemas orgânicos de produção. Além disso, os Anexos IV, V e VI permitem a utilização de taninos como agente de desinfecção e fertilizantes.

Com base no exposto, a dificuldade que os pequenos e médios produtores de carne de frango ou ovos enfrentam para competir com as grandes empresas avícolas, ou até mesmo para essas empresas se adequarem às exigências e tendências de mercado atuais sem comprometer a sua produtividade, é inegável, pois o retorno sobre o investimento, tanto para instalação quanto para a manutenção da granja, nem sempre compensa e faz com que muitos avicultores desistam de suas criações (Costa *et al.*, 2021). Contudo, tendo em vista o cenário de constate crescimento do sistema, nos últimos anos, cada vez mais pesquisadores focam pesquisas e buscam alternativas para manter sua rentabilidade, sem descaracterizá-lo.

Diversos estudos demonstram que o uso de extratos naturais de plantas e compostos bioativos na dieta podem ser uma opção, uma vez que possuem efeito favorável na saúde e produtividade animal (Christaki *et al.*, 2012). Eles possuem propriedades que podem otimizar a saúde intestinal (Abudabos *et al.*, 2016; Hafeez *et al.*, 2016; Kiczorowska *et al.*, 2017) e atender as demandas do sistema orgânico de produção. Entre as alternativas possíveis, aditivos fitogênicos apresentaram efeitos positivos sobre saúde e produtividade em poedeiras e frangos (Gianennas *et al.*, 2018; Ahsan *et al.*, 2018; Khoobani *et al.*, 2019), relatando que seu uso pode desempenhar um papel significativo na saúde e desempenho das aves por estimulação do consumo de ração, secreção de enzimas endógenas, efeito antioxidante, anti-helmíntico e antibacteriano.

2.3 Uso de aditivos fitogênicos

As propriedades das plantas medicinais têm sido observadas desde a antiguidade (Costa *et al.*, 2007) e a primeira avaliação da utilização de extratos de plantas com atividade antibacteriana data de 1881 (Rizzo *et al.*, 2008). A utilização de extratos herbais é considerada como uma abordagem complementar ou alternativa a medicina alopática (Cravotto *et al.*, 2010), e tem recebido maior atenção dos pesquisadores e indústria por atuarem como potenciadores de desempenho e manutenção da saúde animal (Hashemi & Davoodi, 2011).

Este crescimento deve-se a expansão da utilização e pesquisa destes fitogênicos devido as restrições e proibições realizadas nas últimas décadas aos antimicrobianos utilizados na produção animal, bem como da consciência acerca dos produtos naturais e também ao crescimento dos sistemas alternativos de criação, onde não são permitidos o uso de nenhum aditivo químico na produção, como por exemplo os sistemas orgânicos ou agroecológicos.

Aditivos fitogênicos são compostos derivados de plantas ou ervas e apresentam elevados níveis de compostos bioativos que participam do metabolismo secundário das plantas (Lipori, 2019). Possuem propriedades que ao serem incorporados nas dietas animais, têm como objetivo melhorar os índices zootécnicos, pelo fato de melhorar a saúde animal, melhorando o sistema imune (Dong *et al.*, 2016; Farahat *et al.*, 2016) e diminuindo agentes patogênicos no sistema digestivo pela ação antimicrobiana (Jang *et al.* 2007), além de atuar como antioxidante diminuindo estresse oxidativo e oxidação lipídica dos produtos (Khan, 2014). Estes resultados refletem em aumento do ganho de peso, melhor eficiência alimentar e melhor qualidade dos produtos finais. Os fitogênicos classificam-se de acordo com a sua origem e processamento em: extratos, condimentos, óleos essenciais (compostos lipofílicos extraídos por vaporização ou destilação a álcool) e oleoresinas (compostos extraídos por solventes não aquosos) (Windisch *et al.*, 2008).

Os extratos vegetais são ricos em princípios ativos, sendo que estes variam muito em concentração e em atividade antibacteriana, de acordo com a espécie botânica e parte da planta que são extraídas (Cheng *et al.*, 2014; Costa *et al.*, 2008). Esses compostos são conhecidos por seus efeitos anti-inflamatório, antiviral (Costa *et al.*, 2007), antioxidante, antiparasitário, coccidiostático e efeito imunomodulador, sendo que suas propriedades multifuncionais dependem dos compostos bioativos presentes em cada extrato (Cheng *et al.*, 2014). Dentre os princípios ativos

responsáveis por estas diferentes propriedades estão: saponinas, taninos, flavonóides, mucilagens, glucosídeos, alcalóides (alcoóis, aldeídos, cetonas, éteres, ésteres e lactonas); compostos fenólicos e polifenólicos (responsáveis pelas propriedades antibacterianas -quinonas, flavonas, taninos e cumarinas); substâncias sulfurosas; terpenos (divididos em monoterpenos: carvacrol, timol, mentol; sesquiterpenos e diterpenos, triterpenos e esteróides), saponinas, mucilagens e óleos essenciais (Martins *et al.*, 2000). Estes compostos químicos estão diretamente relacionados com suas propriedades biológicas (Hashemi & Davoodi, 2011).

2.4 Taninos

As plantas produzem uma ampla variedade de metabólitos secundários, sendo já identificadas mais de 200.000 estruturas (Hartmann, 2007; Patra e Saxena, 2010). Os metabólitos secundários podem ser classificados em três grupos principais: terpenos, compostos contendo nitrogênio e compostos fenólicos, neste último estão incluídos os taninos (Agostini-Costa *et al.*, 2012).

Os taninos são polímeros de polifenóis de origem vegetal, solúveis em água, com pesos moleculares geralmente entre 500 e 3000 Daltons (Mangan, 1988), e com a habilidade de formar ligações e se precipitar com vários tipos de proteínas, aminoácidos e polissacarídeos (Swain & Bate-Smith citados por Sarkar & Howarth, 1976).

O termo taninos é largamente utilizado para designar qualquer grande composto polifenólico, de alto peso molecular, contendo um número suficiente de grupos hidroxila e outros grupos químicos, como a carboxila, que propiciem a formação de complexos fortes com proteínas e outras macromoléculas (Cordão, 2010). Este complexo formado entre taninos e proteínas ou outros compostos são geralmente instáveis, suas ligações químicas são continuamente quebradas e refeitas, e são divididos de acordo com o tipo de ligação: ligação de hidrogênio (reversível e dependente de pH) entre o radical hidroxila do grupo fenol e o oxigênio do grupo amida nas ligações de proteína; ligação hidrofóbica (reversível e dependente do pH) entre o anel aromático e a região hidrofóbica da proteína; ligações iônicas (reversível) entre o íon fenolato e o sítio catiônico da proteína (exclusivo para taninos hidrolisáveis) e ligações covalentes (irreversíveis), resultante da oxidação de polifenóis que gera quinonas, as quais reagem e se condensam com grupos

nucleofílicos de proteínas (Frutos *et al.*, 2004).

As ligações entre os taninos e as proteínas são feitas por pontes de hidrogênio, entre os grupos hidroxifenóis dos taninos e os grupos carbonila das ligações peptídicas. Segundo Makkar (1988), uma vez complexados, a utilização da proteína é diminuída, afetando a digestibilidade dos carboidratos e a absorção e retenção de algumas vitaminas e minerais. Os taninos são principalmente encontrados nos vacúolos das plantas, interferindo no metabolismo vegetal somente após lesão ou morte das mesmas, possuindo metabolismo eficiente nestes locais (Cannas, 2005). De acordo com Hemingway (1988), as principais enzimas envolvidas na síntese e armazenamento dos taninos são a chalcone sintetase (CHS), chalcone isomerase (CHI), flavonóide-3-hidroxilase (F3H), flavanona-3- hidroxilase (F3H), dihidroflavanol redutase (DFR), leucoantocianidina redutase (LAR), antocianidina sintetase (ANS), favanol-UDP-glicosil transferase (FGT), glutathione trans- membrana (GHS).

Na forma não oxidada, os taninos reagem com as proteínas através de pontes de hidrogênio e/ou ligações hidrofóbicas. Quando oxidados os taninos se transformam em quinonas, as quais formam ligações covalentes com alguns grupos funcionais das proteínas (Sgarbieri, 1996).

Na Figura 3, observa-se que, baseados em sua estrutura e propriedades químicas, os taninos são divididos em: taninos hidrolisáveis (TH) os quais possuem um núcleo central de carboidrato ao qual os ácidos carboxílicos fenólicos são ligados por ésteres de ácido gálico (galotanino) ou ácido elágico (elagitaninos); e taninos condensados (TC), os quais não possuem carboidrato central e são derivados por condensação de precursores de flavonóides ou polímeros de flavonóides (Baker, 1999).

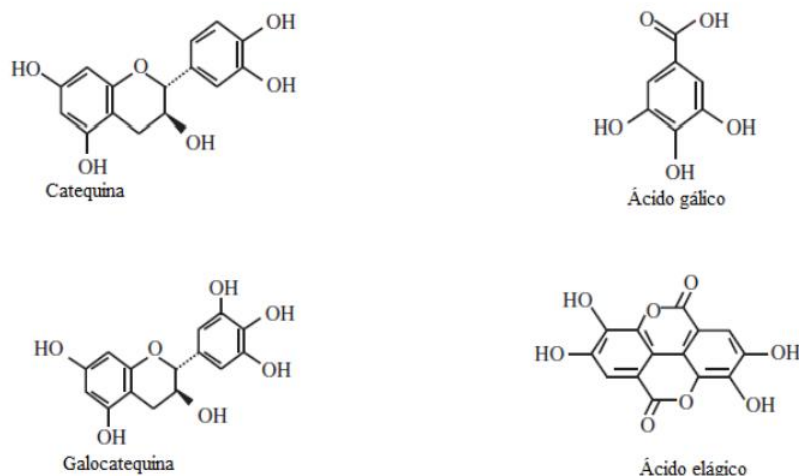


Figura 3: Unidades monoméricas de taninos condensados (catequina e galocatequina) e taninos hidrolisáveis (ácido gálico e ácido elágico). (Fonte: Adaptado de Patra e Saxena (2010).

2.4.1 Taninos hidrolisáveis

Taninos hidrolisáveis são definidos como poliésteres de ácidos fenólicos, possuem um grupo polioliol central (em sua maioria, é β -d- glicose, mas também o ácido quínico, outros fenóis e outros glicosídeos); e hidroxilas esterificadas pelo ácido gálico (parte fenólica) (Khanbabaee & Ree, 2001). Eles estão presentes nas famílias Choripetalae das dicotiledôneas, dicotiledôneas herbáceas e lenhosas, e não são muito abundantes na natureza (Müller-Harvey & McAllan, 1992).

Os grupos hidroxila dos carboidratos encontram-se parcial ou totalmente esterificados com grupos fenólicos, como o ácido gálico (nos galotaninos) ou o ácido elágico (nos elagitaninos). Os TH por hidrólise ácida liberam ácidos fenólicos: gálico, caféico, elágico e um açúcar (Sgarbieri, 1996). Este tipo de taninos pode sofrer facilmente hidrólise por bases, ácidos e esterases. A hidrólise do ácido tânico, um típico tanino hidrolisável, pode acontecer espontaneamente ou pela ação de enzimas, e tem como resultado a glicose e o ácido gálico. (Singleton & Kratzer, 1973).

2.4.2 Taninos condensados

Os taninos condensados estão presentes na fração fibra alimentar de diferentes alimentos, são normalmente chamados de proantocianidinas devido à

apresentação de pigmentos avermelhados da classe das antocianidinas, como cianidina e delphinidina (Avila, 2018). Essas moléculas têm ampla variação na estrutura, resultado de padrões de substituições entre unidades flavânicas, e da diversidade de posições das ligações e a estereoquímica (Waghorn, 2008).

Os TC consistem em oligômeros e polímeros de subunidades de flavan-3-ol, que são subunidades variáveis, mas normalmente a sua ocorrência inclui catequinas, galocatequinas e epigalocatequinas (Naumann *et al.*, 2017). O número de unidades pode variar e isso determina o grau de polimerização para di, tri e tetraflavonóides para oligômeros maiores, podendo, desta forma, produzir uma ampla variedade de estruturas químicas e diferentes propriedades biológicas (Waghorn, 2008). Os TC são concentrados nos vacúolos intracelulares das plantas e essencialmente não reativos, somente são liberados quando ocorre uma ruptura celular e, após essa ruptura pode ocorrer uma extensiva ligação com diversas proteínas (planta, animal, microbiana, salivar, enzimas, etc.) (Waghorn e McNaab, 2003). A razão para sua síntese e mobilização ainda não é clara, Waghorn (2008) sugere que sua síntese esteja relacionada à função de proteção contra herbívoros, defesa da planta contra patógenos, conservação de energia (para mobilização em períodos de necessidade) e conservação do nitrogênio.

Apesar de muitos dos TC serem hidrossolúveis, alguns de grande dimensão são insolúveis na água. Sob hidrólise ácida, produzem antocianidinas e catequinas (Mueller-Harvey e McAllan, 1992). Os taninos condensados são mais difíceis de serem degradados que os hidrolisáveis, podendo ser tóxicos para uma variedade de microrganismos. Isto pode explicar o efeito destas moléculas em retardar a biodegradação e diminuir a decomposição da matéria orgânica (Bhat *et al.*, 1998). Informações quanto a absorção, distribuição, metabolismo e eliminação dos polifenóis são escassos (Efraim *et al.* 2011; Manach *et al.*, 2004). Os taninos condensados não são absorvidos pelo trato digestivo, podendo causar danos na mucosa do trato gastrointestinal, diminuindo a absorção de nutrientes como, por exemplo, os aminoácidos essenciais metionina e lisina (Cannas, 1999). A absorção dos TC no intestino delgado seria limitada pela formação de complexos com proteínas, amido e enzimas digestivas (Manach *et al.*, 2004; Serrano *et al.*, 2007). No cólon, os TC que apresentam baixo peso molecular são degradados em fenóis simples ou excretados nas fezes (Jardini & Mancini Filho, 2007), enquanto os com alto peso molecular e alta polimerização não são afetados pela microbiota (Bravo, 1998).

A grande tendência dos taninos para formar complexos com proteínas ao invés de carboidratos e outros polímeros, pode explicar a baixa digestibilidade das proteínas de leguminosa, inibição do crescimento e aumento da excreção de nitrogênio fecal em animais (Deshpande & Damodaran, 1990; Kaur & Kapoor, 1992; Giner-Chaves, 1996; Lipinski, 2017). Os polifenóis ou taninos condensados, particularmente de genótipos coloridos, são mencionados com frequência como maiores limitantes do valor nutritivo de leguminosas, visto que estudos com animais alimentados com dietas ricas em polifenóis indicam redução da ingestão de alimentos e baixo quociente de eficiência protéica (Deshpande, 1992). No processo de intoxicação de animais por taninos, metionina e colina reagem com taninos para formar monometil éteres para a desintoxicação, o que pode resultar em depleção de doadores de metil metionina e colina no organismo (Reddy *et al.*, 1985).

Os TC são utilizados para a adstringência de bebidas populares, como o chá e o vinho, além de ser utilizado para a estabilização da cerveja e produção de resinas para uso na indústria de painéis de madeira (Avila, 2018). Além, é claro, de ser amplamente utilizado no processo de curtimento do couro, graças à sua capacidade de se combinar com proteínas da pele animal inibindo o processo de putrefação (Deshpande *et al.*, 1986). Atualmente, também vem sendo utilizado como aditivo na alimentação animal em ruminantes, há mais tempo, e em não-ruminantes mais recentemente. (Grainger *et al.*, 2009; Griffiths *et al.* 2013; Aguerre *et al.*, 2016).

2.4.3 Taninos condensados da Acácia Negra (*Acacia mearnsii*)

A Acácia negra (*Acacia mearnsii*) é natural da Austrália, caracterizando-se por ser uma árvore de folhagem verde escura, que atinge de 10 a 30 m de altura, com boa adaptação em diferentes tipos de solo (Schneider *et al.*, 2000). No Brasil, esta espécie é cultivada principalmente na região sul, para a extração comercial de taninos a partir de sua casca (Higa, 1999; Ribeiro, 2014) também para a produção de energia a partir do carvão, fixação de nitrogênio e recuperação de solos degradados (Grigoletti *et al.*, 2003).

Um dos processos para a obtenção dos taninos a partir da casca da acácia negra inicia-se com a moagem da casca. Posteriormente, é realizada a hidrosolubilização em vasos pressurizados (autoclaves) a uma temperatura de 100°C, seguida pela evaporação (concentração do extrato) e atomização (aplicação do

2.4.4 Uso de taninos na nutrição animal

Os taninos condensados são bastante conhecidos como fatores antinutricionais de alimentos utilizados em dietas dos animais de produção. Representam o grupo mais importante de polifenóis na nutrição animal, em função dos efeitos deletérios no aproveitamento das rações e no desempenho produtivo dos animais (Warreham *et al.*, 1994).

Os taninos na nutrição animal interferem de maneira distinta em ruminantes e não-ruminantes. Em ruminantes, os taninos podem produzir efeitos positivos reduzindo a quantidade de proteína digerida no rúmen e, aumentar a quantidade de proteína disponível no intestino delgado, eliminar parasitas e diminuir o timpanismo espumoso (Mueller-Harvey, 2010). Já em dietas de não-ruminantes, suínos, aves e peixes, os taninos condensados afetam o valor nutricional dos alimentos, em consequência da formação de complexos com as proteínas, carboidratos e outros nutrientes; pela inibição da atividade de enzimas, pela diminuição da absorção de nutrientes e pela lesão de células intestinais (Warreham *et al.*, 1994). Podem, também, inibir enzimas relacionadas à digestão de carboidratos (α -amilase, α -glicosidases), de lipídios (lipase pancreática e gástrica) e de proteínas (tripsina e proteases diversas) (McDOUGALL *et al.*, 2005).

Em trabalho realizado por Stringhini *et al.*, (2013a) foram testados três níveis de inclusão (1.000, 2.000 e 3.000 mg/Kg) de extrato de barbatimão (*Stryphnodendron adstringens*), apresentando 5,95% de taninos totais, na dieta de poedeiras comerciais comparados ao controle negativo (sem inclusão de antibiótico melhorador de desempenho), ao controle positivo (com inclusão de halquinol) e ao prebiótico mananoligossacarídeo (MOS), com avaliação da qualidade dos ovos. Não foi observado efeito de regressão em função dos níveis de extrato de barbatimão nas variáveis, no entanto, a maior inclusão do extrato de barbatimão, semelhante ao halquinol e MOS, apresentou maior peso do ovo. A qualidade da casca, expressa pela espessura da casca e pela gravidade específica, foi superior aos resultados obtidos com a inclusão de antibiótico e mananoligossacarídeo. Entretanto, Haslam (1996) ressaltou a existência de relação entre os taninos e a redução do peso da casca do ovo, devido à complexação e conseqüentemente, indisponibilidade de íons metálicos essenciais à formação da casca, como o cálcio. Stringhini *et al.*, (2013b) também forneceram para poedeiras comerciais de 36 a 40 semanas de idade rações

suplementadas (1.000, 2.000 e 3.000 mg/Kg) com extrato de pacari (*Lafoensia pacari* A. St.-Hil (Lythraceae)), com 4,52% de taninos totais, comparados ao controle negativo (sem inclusão de antibiótico melhorador de desempenho), ao controle positivo (com inclusão de halquinol) e ao prebiótico mananoligossacarídeo, com avaliação na qualidade dos ovos. Não se observou efeito de regressão em função dos níveis de extrato, mas, o menor e o maior nível de suplementação do extrato de pacari resultaram em peso do ovo semelhante ao halquinol e MOS. De forma geral, a inclusão do extrato de pacari melhorou a qualidade da casca, refletida na porcentagem da casca e na gravidade específica. Na porcentagem de gema houve semelhança nos resultados para o pacari, halquinol e MOS ($P < 0,05$). Ting *et al.*, (2011) avaliaram os efeitos da suplementação de diferentes níveis de hesperetina e naringenina na qualidade de ovos, características séricas e atividade antioxidante em poedeiras e concluíram que tanto a hesperetina quanto a naringenina poderiam reduzir os níveis de colesterol sérico e de gema de ovo e melhorar as atividades antioxidantes. Mariscal-Landín *et al.* (2004) relatam que a presença do tanino pode influenciar a digestibilidade das dietas ao complexar proteínas no trato digestório minimizando seu aproveitamento. Os resultados indicaram uma potencialidade na utilização dos extratos de barbatimão e de pacari como aditivo fitogênico em rações de poedeiras comerciais.

Como ingrediente utilizado rotineiramente na ração, o sorgo é o alimento que possui maiores teores de taninos condensados. Garcia *et al.* (2005) afirmaram que, apesar da maior parte do sorgo produzido atualmente no Brasil possuir baixo tanino, em algumas regiões (Sul e Nordeste) há necessidade do cultivo de variedades com teor de tanino mais elevado visto a susceptibilidade deste grão ao ataque de pássaros. Estes mesmos autores avaliaram dietas com milho e farelo de soja, sorgo com alto tanino e farelo de soja e sorgo com baixo tanino e farelo de soja e o desempenho, o rendimento de carcaça e medidas gastrintestinais de frangos. Concluíram, que ao utilizar sorgo com alto tanino (1,89 g/kg de tanino) e sorgo com baixo tanino (0,49 g/kg) em substituição ao milho não houve efeito para desempenho e rendimento de carcaça, vísceras e medidas de intestinos (comprimento e peso relativo). Anteriormente, Nunes *et al.* (2001) observaram que ao substituir o milho pelo sorgo em dietas de frangos, houve alteração na morfologia intestinal como a atrofia da mucosa ileal, encurtamento de vilosidades, edema no tecido conjuntivo, hiperplasia e hipertrofia das células secretoras de muco.

Já em estudo realizado por Kambooh *et al.*, (2013) para investigar os efeitos

suplementares de bioflavonóides purificados (genisteína e hesperidina), individualmente e em combinação para perfil de ácidos graxos, metabólitos lipídicos e status antioxidante de frangos de corte, afirmam que os bioflavonóides da dieta genisteína e hesperidina podem melhorar positivamente o perfil de ácidos graxos e metabólitos lipídicos da carne de peito de frango de maneira dose-dependente.

Brenes *et al.*, 2010 investigaram o efeito de diferentes níveis de extrato de semente de uva em frangos de corte (1 a 42 dias) sobre o desempenho de crescimento, pesos relativos (pâncreas, baço e fígado) e comprimentos (duodeno, jejuno, íleo e ceca) dos órgãos digestivos, pesos relativos da gordura do fígado e da gordura abdominal, digestibilidade da proteína ileal, digestibilidade do polifenol extraível dos excrementos e atividade antioxidante da dieta e excreta. Os autores afirmaram que a inclusão não afetou o desempenho e os pesos relativos do fígado e do pâncreas, causou um aumento do peso relativo do baço aos 42 dias de idade e que a digestibilidade ileal da proteína bruta aumentou aos 21 dias de idade. Além disso, a digestibilidade do polifenol extraível com excreta foi aumentada aos 21 e 42 dias de idade pela inclusão de extrato de semente de uva nas dietas concluindo que este poderia ser uma nova fonte de antioxidantes na nutrição animal.

Viveros *et al.*, 2011 conduziram um experimento para estudar o efeito da inclusão de concentrado de bagaço de uva e uva na dieta de frangos de corte sobre desempenho, microbiota intestinal (por cultura e polimorfismo terminal de fragmentos de restrição) e morfologia intestinal aos 21 dias de idade, concluindo que os produtos de uva ricos em polifenóis na dieta modificam a morfologia intestinal e a microbiota intestinal e aumentam o grau de biodiversidade das bactérias intestinais em frangos de corte.

Na alimentação de suínos, um número ainda pequeno de trabalhos com a inclusão de taninos, especialmente os hidrolisáveis, foi reportado. Bee *et al.* (2016) testaram a inclusão de 1% de taninos hidrolisáveis em dietas para leitões recém desmamados infectados artificialmente com cepa enterotóxica de *E. coli*, e verificaram redução na severidade da diarreia na primeira semana pós-infecção com o uso do tanino, mas sem diferenças observadas no desempenho produtivo. Em estudo utilizando 0,19% de taninos hidrolisáveis e 0,16% de mistura de ácidos orgânicos em dietas para leitões dos 23 aos 127 dias de idade, Brus *et al* (2013) verificaram maior ganho de peso e melhor conversão alimentar dos animais recebendo dieta com taninos+ácidos orgânicos, e menores contagens fecais de *E. coli* e maiores de

bactérias lácticas neste tratamento. Os resultados foram superiores aos do tratamento controle e tratamento com adição apenas de ácidos orgânicos.

Com suínos dos 30 aos 120 kg de peso vivo, Brus *et al.* (2013b) utilizaram dietas sem e com 0,2% de taninos hidrolisáveis, encontrando resultados significativamente melhores no desempenho animal e nas medidas de histologia da mucosa intestinal. Dietas com taninos condensados na forma de inclusão dietética de 10 a 30% de farinhas de folhas de acácia (*A. karroo* e *A. nilotica*) determinaram maior ganho de peso e digestibilidade da matéria seca em suínos de 30-40kg de peso vivo e a inclusão das farinhas induziu o aumento na produção de proteínas ricas em prolina nas glândulas salivares parótidas dos animais (Halimani *et al.*, 2005). No trabalho de Choy *et al.* (2014), a adição de 1% de taninos condensados de sementes de uva afetou positivamente o microbioma fecal de suínos em terminação, com maior abundância de *Lactobacilli* e *Ruminococcaceae*.

Huang *et al.* (2018) em sua revisão sobre o potencial do uso de taninos na alimentação animal citam 13 trabalhos publicados com suínos, dos quais 7 apresentaram resultados positivos no desempenho produtivo, ou na modificação da microbiota intestinal ou nas características histológicas intestinais. Destes 13 trabalhos, 9 utilizaram taninos hidrolisáveis e 4 taninos condensados.

Os estudos sobre uso de extratos vegetais como aditivos fitogênicos e terapêuticos têm aumentado o interesse nos mesmos. O grande desafio é adequar o nível de inclusão nas dietas, de forma que possa promover efeitos benéficos antibacterianos e antiparasitários sem produzir alterações prejudiciais na digestibilidade de nutrientes. Atividades bactericidas e fungicidas ocorrem por três características gerais: complexação com íons metálicos; atividade antioxidante e habilidade de complexar com proteínas e polissacarídeos (Mello & Santos, 2001).

Percebeu-se, ao revisar a literatura publicada, que alguns resultados são contraditórios. A detecção de taninos em produtos de origem animal ainda não foi reportada, no entanto, o uso de indicadores do potencial antioxidante de taninos na dieta e seus efeitos na produção animal foi verificado em diversos trabalhos tanto em poedeiras (Ting *et al.*, 2011; Stringhini *et al.*, 2013a; Stringhini *et al.*, 2013b;) quanto em frangos de corte (Brenes *et al.*, 2010; Viveros *et al.*, 2011; Kambooh *et al.*, 2013), e também em suínos (Brus, 2013a; Brus, 2013b; Choy, 2014; Bee, 2016; Huang, 2018).

3. HIPÓTESES E OBJETIVOS

Hipótese:

- 1- Os taninos condensados podem melhorar a cor da gema dos ovos e da carne, devido a presença de pigmentos naturais presentes no extrato .
- 2- As propriedades prebióticas dos taninos condensados podem melhorar a qualidade externa e interna de ovos de poedeiras.
- 3- As propriedades antioxidantes e de cicatrização dos polifenóis auxiliam na melhora da integridade das patas de poedeiras.
- 4- Os taninos condensados melhoram a qualidade da carne de frango e suínos, devido às propriedades antioxidantes dos mesmos, diminuindo a oxidação lipídica da carne e melhorando a maciez.
- 5- Os taninos condensados influenciam na população do microbioma fecal de suínos, sendo positivo para o desempenho dos mesmos.
- 6- O extrato de acácia negra, rico em taninos condensados, pode ser utilizado como aditivo fitogênico na produção de aves e suínos, sem prejuízos ao desempenho e metabolismo de nutrientes.

Objetivos

- 1- Avaliar os efeitos da suplementação de dieta com taninos sobre o desempenho, metabolismo e qualidade de ovos e do coxim plantar de poedeiras comerciais.
- 2- Avaliar os efeitos da suplementação de dieta com taninos sobre o desempenho, bem-estar, saúde intestinal e qualidade de carne de frangos de corte.
- 3- Avaliar os efeitos da suplementação de dieta com taninos sobre o desempenho, qualidade de carne e características de carcaça, e microbioma fecal de suínos nas fases de terminação e crescimento.

CAPÍTULO II¹

¹Elaborado conforme as normas da Scientia Agricola.

1 **BLACK WATTLE (*ACACIA MEARNsii*) EXTRACT IN THE DIET OF LAYING** 2 **HENS IN AN ORGANIC PRODUCTION SYSTEM**

3 4 **Condensed tannins in laying poultry**

5
6 **Abstract** - Plant extracts have been tested with potentially positive effects on the performance
7 and metabolism of hens, thus, the addition of black wattle extract in the diet of laying hens in
8 an organic production system was evaluated in order to evaluate performance, quality of eggs,
9 nutrient metabolism, and foot pad integrity through pododermatitis scores. Four levels of black
10 wattle extract were added to the diet (0, 150, 300, and 450 mg/kg) and tested in 40 brown laying
11 hens, 50 weeks old, for 28 days. There was no significant difference ($P > 0.05$) regarding the
12 different diets in the performance, egg quality, and nutrient metabolism responses. The hens
13 that received 300 and 450 mg/kg of black wattle extract in the diet improved ($P < 0.05$) their
14 scores of pododermatitis injuries at the end of the experiment. Black wattle extract can be added
15 to the diet of laying hens in an organic production system, without prejudice to performance,
16 egg quality, and nutrient metabolism. The integrity of the foot pad of laying hens in an organic
17 production system can be improved with the incorporation of black wattle extract in their diet.
18 **Key Words:** egg quality, nutrient metabolism, performance, pododermatitis, poultry
19 production, tannin.

20 21 **Introduction**

22 Poultry farming is one of the agricultural activities that has evolved the most in recent
23 decades. In the diet of laying hens, the search for phytogetic and therapeutic additives has been
24 a growing focus of research, precisely to improve production systems and reach new markets
25 (Seidavi, 2020; Omer, 2019). In the organic egg production system, where there are restrictions
26 on the use of chemical additives, growth promoters, and antibiotics (Brazil, 2003), the addition
27 of bioactive compounds and plant extracts to the diet may be an option, since they have an
28 effect favorable to health and animal productivity (Christaki *et al.*, 2012).

29 Plant extracts have been tested with potential positive effects on chicken metabolism
30 (Li *et al.*, 2015). Black wattle (*Acacia mearnsii*) extract contains 75% of total polyphenols, with
31 tannin being the main group present in these plants (Ogawa and Yazaki, 2018). Tannins are
32 water-soluble polyphenolic components (Keshavarzi *et al.*, 2017) and have historically been
33 seen as an anti-nutritional factor in food (Houshmand *et al.*, 2015; Tomaszewska *et al.*, 2018).
34 However, recently, tannin has been used as a modulator of intestinal microbiomes, and it can

35 be used in substitution for growth-promoting antibiotics (Yang *et al.*, 2015). Another benefit
36 attributed to tannins is physiological activities, such as stimulation of phagocytic cells and
37 tumor action, and anti-infective activities (Seidavi, 2020). This characteristic meets the need to
38 maintain the integrity of the hens' foot, since it is directly related to the well-being of the
39 production system. The decrease in the incidence of pododermatitis has been sought through
40 nutritional components added to the diet such as zinc, biotin, and methionine (Burguer *et al.*,
41 1984; Vieira *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 1998).

42 Meeting the demands of the current consumer, who is increasingly concerned with
43 the origin and quality of food, animal health and well-being, without compromising
44 productivity and respecting the restrictions in force for the organic system, can be a challenge.
45 The aim of this study was to evaluate the addition of black wattle extract to the diet of laying
46 hens in an organic production system to evaluate performance, egg quality, nutrient
47 metabolism, and foot pad integrity.

48

49 **Materials and Methods**

50 **Ethics Statement**

51 The authors confirm that the procedures used in this experiment were in accordance to all
52 ethical and legal principles for animal experimentation, as noted on the journal's guidelines
53 page. The experiment was approved by the Animal Use Ethics Committee of the *Universidade*
54 *Federal de Santa Maria* (UFSM, Federal University of Santa Maria), protocol number
55 4474130720, and in agreement with the current Normative Instructions for the production of
56 organic eggs (Brazil, 2003).

57

58 **Hens, management, and diets**

59 The field experiment was conducted in the city of Viamão, in the state of Rio Grande do
60 Sul, Brazil (30 ° 06'28.4 "S 51 ° 03'57.0" W). The farm is registered and certified as an organic
61 producer, and is linked to the *Associação Agroecológica do Rio Grande do Sul* (Rio Grande do
62 Sul Agroecological Association), following all established norms and instructions, ensuring
63 that the experiment complies with current organic egg production legislation. The experiment
64 did not interfere with the property's production system, nor did it de-characterize it.

65 Forty laying hens (Isa Brown breed), 50 weeks old, with an initial weight of 1.815 ± 0.135
66 kg were used. The hens were kept in a shed with controlled ventilation and light, housed in
67 cages for 32 days, with 4 days of adaptation and 28 days of experiment. Each cage, measuring
68 90 x 40 cm (3600 cm²), had a hen. Thus, the space made available for each animal was well

69 above the recommended minimum (375 cm² for each hen) in the Laying Hens' Well-being
70 protocol, of the Brazilian Poultry Union and above the minimum allowed in the organic egg
71 production system, 1.666,66 cm² per hen, according to Normative Instruction 17 of the
72 Brazilian legislation (Brazil, 2003). The hens, with the same age, randomly selected, were
73 weighed and housed in randomly selected cages. All cages had an individual feeder and waterer.

74 The hens were divided into four treatments consisting of 10 hens each. In treatment I the
75 hens received a control diet based on corn and soybean meal (Table 1), being isoproteic,
76 isoenergetic and based on the nutritional requirements of brown laying hens according to the
77 recommendations of Rostagno *et al.* (2017). In the other three treatments, the hens received the
78 same control diet, previously mixed with 150, 300 or 450 mg/kg of black wattle extract,
79 respectively. The level of condensed tannin analyzed in the black wattle extract was 78.41%.
80 The water supply was unlimited and the food supply was limited to 120 g/d equivalent to 313.9
81 kcal of metabolizable energy (ME) per day for each hen. The ration was offered twice a day,
82 60 g at 9:00am and 60 g at 4:00pm. The control diet was analyzed for its levels of dry matter,
83 crude energy, crude protein, ash, crude fiber, and crude fat.

84

85

86

87

88

89

90

91

92

93

94

95

96

97

98

99

100

101

102

103 **Table 1** – Composition of the diet.

Ingredients	g/kg*
Corn	610
Soybean meal	270
Sunflower oil	10.8
Limestone	76.4
Salt	2.6
Premix ORG 193**	30
Diet composition***	Calculated composition
Metabolizable Energy (kcal/kg)	3075
Crude Protein (%)	18.88
Ash (%)	14.34
Crude Fiber (%)	2.30
Crude Fat (%)	3.92
Calcium (%)	4.08
Digestible phosphorus (%)	0.38

104 Calculated (as fed basis*) composition of the nutrients in the control diet. * Dry matter analyzed
 105 diet 88.98%; ** Guarantee levels per kg of product: Choline: 2667 mg; Folic Acid: 3.33mg;
 106 Vitamin E: 66 IU; Vitamin K3: 9.34 mg; Vit. B2: 28 mg; Vit. B6: 18.67 mg; Iron: 1800 mg;
 107 Zinc: 1667 mg; Vit D3: 9338 IU; Vit A: 53360 IU; Methionine: 19.10 g; Vit B1: 8.67 mg;
 108 Copper: 300 mg; Iodine: 20 mg; B.C. Nicotinic: 120 mg; B.C. Pantothenic: 44 mg; Vit B12: 44
 109 mcg; Manganese: 2100 mg; Selenium: 10 mg; Calcium: 287.6 g; Phosphorus: 91.60 g; ***
 110 Calculated for individual consumption of 120 g/d.

111

112 **Experimental procedure and analysis of samples**

113 Performance characteristics, egg quality, nutrient metabolism, and pododermatitis score
 114 were evaluated.

115

116 **Performance**

117 The performance characteristics evaluated were: feed intake (g/d), egg production and egg
 118 weight (g). Through these, the performance responses were calculated: feed conversion per
 119 dozen eggs; feed conversion by mass of eggs; average egg weight; average egg mass; and laying
 120 percentage. Feed intake was determined by the difference between the weight of the feed
 121 provided and the weight of the feed leftover in the feeders. For the determination of egg
 122 production and weight, daily the collection, quantification, and individual weighing of eggs

123 from each cage was performed.

124 Feed conversion per dozen eggs is the relationship between the amount of feed intake (kg)
125 per dozen eggs produced by each animal, throughout the experimental period. Conversion by
126 egg mass is expressed by the relationship between each gram of feed eaten by the hens and the
127 egg mass produced (g).

128 The average egg weight was calculated using the average weight of all eggs of each animal,
129 produced during the entire experimental period. The average egg mass was calculated as the
130 product between the percentage of eggs produced by each animal throughout the experimental
131 period and the average egg weight for each hen, within the experimental period. The laying
132 percentage was determined at the end of the experimental period, the ratio between the total
133 number of eggs produced and the total number of days of the experiment, then multiplied by
134 100 to express the result as a percentage.

135

136 **Egg quality**

137 The quality of the eggs was evaluated in relation to the external quality, basically the
138 characteristics related to the eggshell, and internal, related to the other components of the egg.
139 At the end of the 28-day experimental period, the eggs of each hen were collected and evaluated
140 individually, considering the egg weight (g), specific gravity (g/cm^3), yolk color, albumen
141 height (mm), Haugh Unit, eggshell thickness (mm), and percentage of albumen, yolk, and
142 eggshell.

143 Specific gravity was determined using the saline immersion method (Hamilton, 1982). The
144 eggs were immersed in saline solutions with known densities, ranging from 1.064 to 1.120
145 g/cm^3 . The eggs were successively immersed in containers with saline solutions in an increasing
146 order of density. The specific gravity of the egg was considered as the lowest-density solution
147 to make it float. This analysis is one of the most used techniques to determine the quality of the
148 eggshell due to the speed, practicality and low cost of the process.

149 The color evaluation of the yolk was carried out by the subjective analysis method using
150 the colorimetric fan, which consisted of always evaluating on a non-reflective white surface,
151 eliminating the influence of surrounding or adjacent colors. Indirect natural light was used,
152 without strong artificial light, avoiding the reflection of the egg yolk surface. The blades of the
153 fan were positioned immediately in the yolk and observed vertically, from top to bottom, with
154 the numbers facing downwards, positioning the yolk between the blades. A single observer
155 performed the color reading throughout the experiment.

156 To determine the height of the albumen, the eggs were broken on a flat, smooth glass

157 surface, where the height measurements of the dense albumen were performed with the aid of
158 a digital caliper, expressing the result in millimeters (mm).

159 The Haugh unit (HU) is an indicator of albumen quality and correlates the height of the
160 dense layer of the album with the weight of the egg, being calculated using the equation: $HU =$
161 $100 \log (H + 7.57 - 1.7 \times W^{0.37})$, where H = height of dense albumen (mm) and W = egg weight
162 (g) (Haugh, 1937). Eggs considered to be of excellent, high, and low quality must have,
163 respectively, HU values above 72; between 60 and 72; and less than 60 (USDA, 2000).

164 Eggshell thickness was measured in three different parts. With the results of the
165 measurements of the three sections, the average was calculated to obtain the thickness of the
166 eggshell expressed in millimeters (mm). The measurements were taken with the aid of a digital
167 caliper, after the eggshells were washed and naturally dried for 12h.

168 To obtain the percentage of the egg components, the weight of the yolk, albumen, and
169 eggshell was evaluated. The shell of each egg, after washing and natural drying (to remove the
170 inner membrane), and the yolk were weighed individually. The weight of the albumen was
171 calculated as the difference between the weight of the egg and the weights of the yolk and the
172 eggshell. These weights were divided by the total egg weight and multiplied by 100, with the
173 results expressed as percentages (%).

174

175 **Nutrients Metabolism**

176 For the evaluation of nutrient metabolism, the method of total collection of excreta,
177 proposed by Sibbald and Slinger (1963), was used. Stretched plastic bags were placed under
178 the cages to allow the collection of excreta, which was made daily, in the last 4 days of the
179 experiment. The diets provided were weighed at the beginning and at the end of the total
180 collection period, in order to obtain total hen feed intake, and the amounts of excreta produced
181 in the total period were noted.

182 The excreta collected in each experimental unit, after elimination of feathers, feed residues
183 or other possible sources of contamination, were transferred to properly identified plastic bags,
184 weighed, and stored refrigerated. Subsequently, they were homogenized and pre-dried in a
185 forced ventilation oven at 60.0 °C for 72 hours. Then, they were weighed, ground, and packed
186 for the analysis of dry matter (method number 930.15) and crude protein (method number
187 984.13) according to the Association of Official Agricultural Chemists (AOAC) (1995). The
188 gross energy values were determined using an isoperibolic bomb calorimeter, model C2000,
189 produced by IKA Werke GmbH & Co. KG, manufactured in the city of Staufen (Germany). All
190 analyzes were performed in duplicates.

191 After obtaining the results of laboratory analyzes of diets and excreta, the metabolism
192 coefficients of dry matter, crude protein, and gross energy, and apparent metabolizable energy
193 corrected by the nitrogen balance (AMEn) were calculated. The metabolizability coefficients
194 were determined by calculating: $M = (NI - NF / NI) * 100$. Where: NI = Amount of nutrient or
195 energy ingested; NF = Amount of nutrient or energy excreted.

196 The Apparent Metabolizable Energy corrected by nitrogen (AMEn), was calculated using
197 the formula: $AMEn = ((GE \text{ diet} \times MGE) - EN_{\text{retained}})$. Where: GE diet = gross energy of the
198 diet, MGE = Metabolizability of gross energy and $EN_{\text{retained}} = \text{Retained nitrogen energy}$
199 (8.22 kcal/g).

200

201 **Foot pad integrity**

202 By definition, the chicken paw is the portion below the spur, whereas chicken feet include
203 the lower leg as well as the foot (Shepherd and Fairchild, 2010). The evaluation of foot
204 pad integrity was performed at the beginning of the experiment, on the first day in the cage, and
205 at the end of the experiment, using the pododermatitis score. The applied methodology was
206 based on the Welfare Quality Index (2009). Both feet of each laying hen were evaluated and
207 the score for the severity of pododermatitis was verified, assigning a score from 0 to 5, where
208 the lowest score indicated no injuries, and the highest score indicated severe injuries.

209

210 **Experimental design and Statistical analysis**

211 The experimental design was completely randomized, with 4 treatments and 10 repetitions
212 each. The data were analyzed using the GLM procedure of the SAS software (Statistical
213 Analysis System, v9.2). The SNK test was applied to determine the difference between all
214 treatments. To analyze the pododermatitis score, we used frequency analysis with the Chi-
215 square test. The differences were considered statistically significant at a 5% probability ($P <$
216 0.05).

217

218 **Results**

219 The addition of black wattle extract to the diet did not affect the performance of the animals
220 (Table 2), which was within the expected for brown laying hens at 55 weeks of age. The average
221 feed intake during the study was 116 g/d. The average egg weight was 64 g, whereas the average
222 egg mass was 53 g. The laying hens in this study had an 82% laying rate, a feed conversion per
223 mass of 2.25 g of feed for each gram of egg, and a conversion of 1.72 kg of feed for each dozen
224 eggs produced.

225 **Table 2:** Performance of 55-week-old brown laying hens receiving a diet with the addition of
 226 black wattle extract in an organic production system.

	Black wattle extract (mg/kg)				P*	SE**
	0	150	300	450		
Feed Intake (g/d)	116.0	115.1	117.7	116.2	0.753	4.9
Average egg weight (g)	62.2	63.7	66.3	64.6	0.545	5.5
Feed conversion by dozen eggs (kg/dozen)	1.709	1.676	1.752	1.741	0.882	0.215
Feed conversion by egg mass (g/g)	2.292	2.212	2.243	2.249	0.966	0.33
Egg mass (g)	52.0	53.1	53.3	52.2	0.985	8.0
Percentage laying (%)	82.9	83.0	81.0	81.3	0.984	10.7

227 *Probability ($P > 0.05$; there is no significant difference between treatments); ** Standard error.

228

229 In the evaluation of the external and internal quality of the eggs from 55-day-old laying
 230 hens (Table 3), the responses evaluated were not altered by the addition of black wattle extract
 231 to the diet ($P > 0.05$).

232

233

234

235

236

237

238

239

240

241

242

243

244

245

246

247

248

249 **Table 3:** Egg quality of brown laying hens at 55 weeks of age receiving a diet with the addition
 250 of black wattle extract in an organic production system.

	Black wattle extract (mg/kg)				P*	SE**
	0	150	300	450		
Specific Gravity (g/cm)	1.096	1.095	1.099	1.099	0.466	0,001
Yolk color	8	8	8	8	0.848	1.1
Albumen heigth (mm)	8.12	7.97	8.23	8.68	0.928	2.02
Haugh Unit	88.5	86.9	87.3	91.4	0.919	12.6
Eggshell thickness (mm)	0.43	0.41	0.45	0.45	0.620	0.06
Albumen percentage (%)	65.4	66.0	66.1	66.0	0.870	2.8
Yolk percentage (%)	25.3	24.6	23.8	24.0	0.586	2.1
Eggshell percentage (%)	9.3	9.4	10.1	10.0	0.618	1.3

251 Probability ($P > 0.05$; there is no significant difference between treatments); ** Standard error.

252

253 In evaluating the external quality of the eggs, the average specific gravity of eggs in the
 254 present study was 1.097 mg/cm^3 . The specific gravity, which estimates the amount of eggshell
 255 deposited, is related to the percentage of eggshell, although the results for this variable have not
 256 changed significantly ($P > 0.05$) in the present study, the addition of tannin at 300 and 450
 257 mg/kg promoted a slight increase in the percentage and thickness of eggshell, also not
 258 significant.

259 There was no statistical difference between treatments regarding yolk color, albumen
 260 height and the Haugh Unit of eggs.

261 In the evaluation of nutrient metabolizability (Table 4), there was no significant difference
 262 between the diets used. It was observed that the average use of dry matter, protein and gross
 263 energy was 72.78%, 64.60% and 77.08%, respectively. The mean apparent metabolizable
 264 energy corrected for nitrogen was 3008 kcal/kg. These results demonstrated that the laying hens
 265 had the utilization of nutrients within the expected for the category, with no losses with the
 266 presence of condensed tannins in the diet, however, as well as the other variables analyzed,
 267 there was no statistically significant result ($P > 0.05$).

268

269

270

271

272

273 **Table 4:** Nutrient metabolism in 55-week-old brown laying hens receiving a diet with the
 274 addition of black wattle extract in an organic production system.

	Black wattle extract (mg/kg)				P*	SE**
	0	150	300	450		
Metabolizability of Dry Matter (%)	73.82	72.22	72.65	72.44	0.817	5.89
Metabolizability of Crude Protein (%)	62.27	63.65	65.52	66.97	0.955	1215
Metabolizability of Gross Energy (%)	76.38	77.06	77.52	77.35	0.655	5.86
Apparent Metabolizable Energy Nitrogen-Corrected (kcal/kg)	2983	3009	3023	3017	0.65	224

275 *Probability ($P > 0.05$; there is no significant difference between treatments); ** Standard
 276 error.

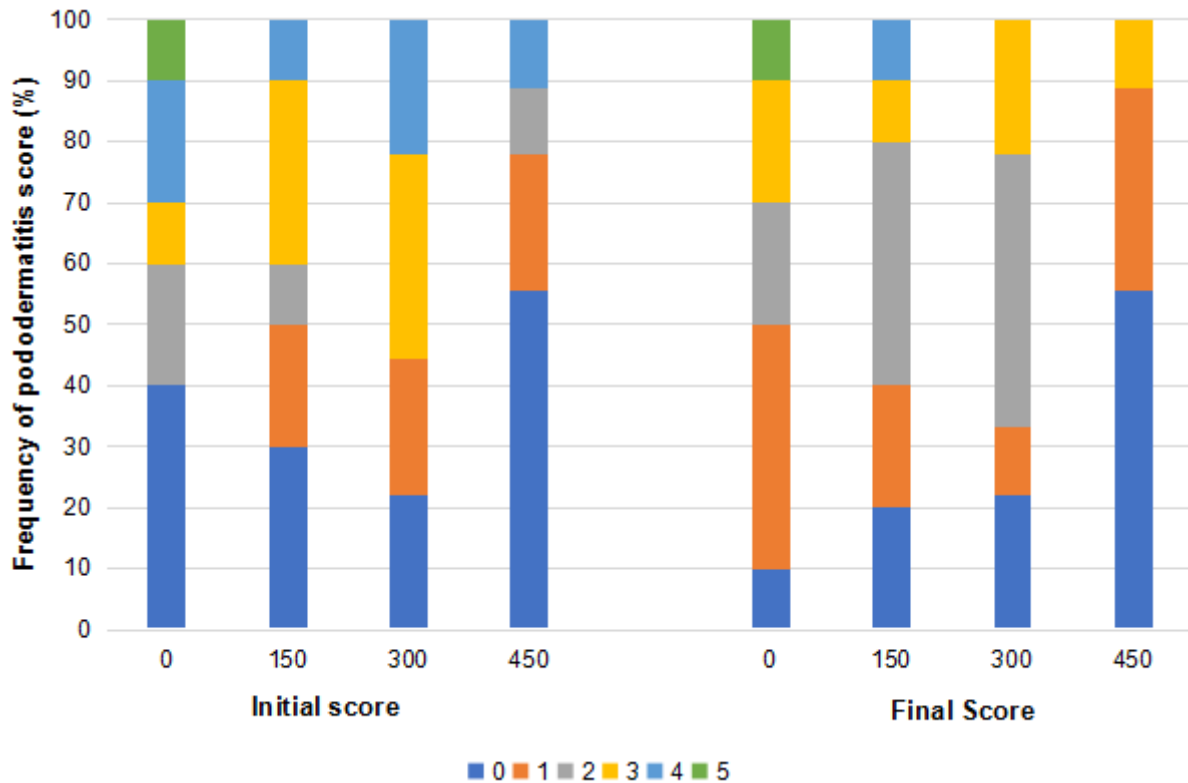
277

278 There was a significant improvement in the lesions of pododermatitis (Figure 1) in the foot
 279 of hens that received tannin in their diet ($P = 0.045$). Scores of 0, 1, and 2 are the best to indicate
 280 a higher integrity of the foot pad in laying hens, and consequently, greater well-being. The hens
 281 that received 300 and 450mg/kg of tannin in the diet had the lowest lesion scores at the end of
 282 the experiment.

283

284

285



286

287 **Fig.1.** Frequency of pododermatitis scores in laying hens with addition of black wattle extract
 288 in the diet (0, 150, 300 e 450 mg/kg).

289 Discussion

290 Diets with tannin levels below 0.70% do not interfere in the zootechnical performance of
 291 hens (Mueller-Harvey, 2006). The laying percentage was slightly lower, but with no statistical
 292 difference, when the higher levels of inclusion were used, in agreement with the results found
 293 by Assuena *et al.* (2008) supplied low tannin sorghum to replace corn and found that feed intake,
 294 egg production, egg weight, egg mass, and feed conversion were not affected.

295 Moreno *et al.* (2007) provided diets with corn substitution for low tannin sorghum at rates
 296 of 50% and 100% for commercial laying hens, with 0.08% and 0.16% of condensed tannin
 297 diluted in the diets, respectively, and a total tannin content of 0.26% . Feed intake, egg weight,
 298 and feed conversion were not altered, however, the posture was significantly reduced when
 299 replacing corn entirely with sorghum.

300 The condensed tannins present in the black wattle extract did not promote antinutritional
 301 effects caused by the presence of phenolic compounds, although Tomaszewska *et al.*, (2018)
 302 reported that, when present in the diet of poultry, pig, and fish, condensed tannins affect the
 303 nutritional value of feed by complexing with proteins and carbohydrates. Tannins inhibit the
 304 activity of digestive enzymes and reduce the absorption of other nutrients by the cell wall, due
 305 to the formation of complexes with divalent metal ions (Warreham *et al.*, 1994; Keshavarzi,

2017). The different effects of tannins on digestion result from changes in the physiological capacities of animals and the different chemical reactions presented by the various groups of tannins, thus demonstrating the correlation between the type of feed and the animal species. (Hagerman *et al.*, 1992; Yang *et al.*, 2015). However, in the present experiment there was no impairment in the performance of the hens with the addition of black wattle extract in their diet.

As the specific gravity increases, the resistance to breaking also increases, and although the specific gravity value of 1.080mg/cm is satisfactory (Peebles and McDaniel, 2004), the results with 300 and 450 mg/kg of condensed tannins from black wattle were of higher values. The ability to complex metal ions, such as calcium, by the tannins present in the extracts was not statistically observed by Houshmand *et al.* (2015) and Bozkurt *et al.*, (2014), who carried out an experiment with phytogetic herb compounds in laying hens, found better egg quality, mainly in relation to eggshell thickness and specific gravity of eggs. An increase in the thickness of the eggshell could be due to the prebiotic influence of tannins on the metabolic activity of the beneficial bacteria colony within the laying intestine, which positively influences the absorption rate of minerals, especially the absorption of Ca²⁺ and Mg²⁺ (Roberfroid *et al.*, 2000). However, the mode of action of the black wattle extract added in the diet to obtain a better eggshell quality is not completely clear. It is speculated that other compounds present in black wattle extract, with differentiated and not totally elucidated activities, may have influenced the quality of eggs.

The color of the egg yolk was not influenced by the addition of black wattle extract to the diet of the hens. Vakili and Majidzadeh-Heravi (2016) also observed that the phytogetic fennel extract (40 mg/kg) added to the diet did not influence the color of the egg yolk. A positive effect of supplementation of black wattle extract in the diets of laying hens based on the color of the egg yolk has not been previously reported. Gharaghani *et al.* (2015) observed that phytogetic supplementation with fennel in laying diets also increased the Haugh unit; as well as Khan *et al.* (2013) when testing the addition of phytogetic based on black cumin seeds to the diet of laying hens. The use of phytogetic additives with antibacterial and antioxidant properties, such as black wattle extract, can improve albumen quality, as previously reported by Bozkurt *et al.* (2012), who added a mixture of phytogetic essential oils to the diet of laying hens. In addition, the bioactive ingredients of herbal plants have been shown to protect the magnum and the uterus and to stimulate the secretion of albumin in laying hens (Radwan *et al.*, 2008). Notable improvements in the eggshell quality of broiler breeders (Berry and Lui, 2000) and decreased eggshell deformation in laying hens (Çabuk *et al.*, 2006) have been reported when chickens were fed diets supplemented with essential oils or a mix of phytogetic additives. The

340 percentages of albumen, yolk, and eggshell are within the expected for 55-week-old laying
341 hens, and corroborate the results found in other studies (Omer *et al.*, 2019; Seidavi *et al.*, 2020).

342 There was no significant effect of the diets regarding dry matter metabolizability in 55-
343 week-old brown hens. Balenovic (2018) found that plant extracts also did not influence the
344 metabolizability of nutrients in diets for broilers. Crude protein metabolizability was
345 numerically greater for diets in which the black wattle extract was added from 300 mg kg⁻¹ and
346 there was also a numerical increase in the metabolizability of gross energy, but without
347 statistical effect ($P > 0.05$). These results can be considered promising, considering that it is
348 known that tannin in sorghum grain decrease the energy use of diets for hens. There is a highly
349 significant negative correlation between the apparent metabolizable energy of sorghum grains
350 and their tannic acid content, which may justify less digestibility with increasing tannic acid
351 concentration (Gous *et al.*, 1982). True apparent digestibility values of 3,300 and 3,970 kcal/kg
352 for high and low tannin sorghum, respectively, were reported by Sibbald (1977). Abou-Elkhair
353 *et al.* (2018) did not find differences in protein metabolism when evaluating the effects of
354 phytogenics based on fennel seeds, black cumin, and red pepper, in 32-week-old brown laying
355 hens, however, they found improvement in the lipid metabolism of hens. The addition of grape
356 seed extract to the diet of 28-week-old brown laying hens (Sun *et al.*, 2018) and the addition of
357 mangrove leaves extract to the diet of 60-week-old white laying hens (Al-Harathi *et al.*, 2009)
358 resulted in a significant improvement in lipid metabolism and a small increase in protein
359 metabolizability. Both the grape seed extract and the mangrove leaves extract, and the black
360 wattle extract used in the present study, are rich in polyphenols and condensed tannins.

361 The mechanism by which the bioactive components of tannin, present in black wattle
362 extract, are highly efficient in increasing the metabolism of nutrients and energy metabolism,
363 can be through the improvement of the activities of glucose-6 phosphate dehydrogenase, of
364 lipoprotein lipase in adipose tissue, and pancreatic and intestinal enzymes (Tomaszewska *et al.*,
365 2018). Another hypothesis is that diets with plant extracts may improve enzyme secretion and
366 improve the metabolism of nutrients by stimulating the production of saliva and gastric and
367 pancreatic juices (Mellor, 2000). The absence of statistical differences in metabolism responses
368 may be related to the high metabolizability of the ingredients used in the formulation of the
369 control diet. According to Keshavarzi *et al.* (2017), the use of highly digestible diets makes it
370 difficult to detect increased digestibility caused by the inclusion of performance-enhancing
371 additives. On the other hand, it can be inferred that a depressive effect of tannins on the
372 digestibility of nutrients was not manifested, as the levels of tannins in this study can be
373 considered low (150 to 450 mg/kg), when compared with diets containing tannin sorghum.

374 Sedghi *et al.* (2011) estimated a reduction of 469 kcal/kg in the metabolizable energy of
375 sorghum for poultry, but for 10,000 mg/kg (1%) of tannins present.

376 The addition of black wattle extract to the diet had a positive effect on the integrity of the
377 foot pad in laying hens. The improvement in the integrity of the foot pad can be attributed to
378 the antimicrobial and antioxidant properties of the condensed tannins present in the black wattle
379 extract. Bactericidal and fungicidal activities occur due to three general characteristics common
380 to the two groups of tannins: the ability to complex with metal ions; antioxidant and free radical
381 scavenging activity; ability to complex with other molecules, mainly proteins and
382 polysaccharides (Seidavi *et al.*, 2020). In wound healing, burns and inflammation processes,
383 tannins help by forming a protective layer (tannin-protein and/or polysaccharide complex) over
384 injured epithelial tissues, allowing the tissue repair process to naturally occur just below this
385 layer (Muhammad *et al.*, 2020; Yitabarek, 2020). Hernandez *et al.* (2010) used an ointment
386 based on the semipurified fraction of the extract from the bark of *Stryphnodendron adstringens*
387 (condensed tannins), at a concentration of 1%, in cutaneous wounds of rats. The ointment had
388 a trophic effect on the proliferation of keratinocytes, by stimulating the proliferation of these
389 cells along the re-epithelization process in relation to the control group on the fourth, seventh,
390 and tenth days after the lesions. In rabbits, the ointment based on aqueous extract with 20% of
391 total tannins and 50% of total phenols, aided in the tissue repair of induced wounds, and there
392 was early centripetal retraction of the wound (Rodrigues *et al.*, 2013). Likewise, the authors
393 described the use of glycolic extract at 20% of the bark of the *Stryphnodendron adstringens*
394 trunk with a high content of condensed tannins, as a 5% footbath solution; the phytotherapeutic
395 aided in the treatment of induced interdigital lesions, with a diameter of 10 mm, in cattle. There
396 were no macroscopic differences in the healing process compared to the group that received
397 just water in the footbath, however, the amount of collagen fibers in the group that received
398 *Stryphnodendron adstringens* extract was greater, thus promoting qualitatively better healing.
399 The results found in this evaluation are extremely important, as they represent an alternative for
400 maintaining animal well-being by guaranteeing the integrity of the foot pad in laying hens.

401 Phytogetic additives in the diet have favorable effects, but the knowledge of their use in
402 poultry feeding is still incipient, requiring additional studies, together with the support from
403 farmers in the production of feed additives from locally available plants. Several studies (Abou-
404 Elkhair *et al.*, 2018; Yitbarek, 2015), as well as the present one, have indicated that phytoGENICS
405 can be added to the diet of hens in order to obtain better results in poultry production. These
406 findings clearly indicate the justifiable addition of plants, polyphenols as their active
407 ingredients, to animal food because of their antimicrobial and immunostimulatory actions

408 (Grashorn, 2010; Yang *et al.*, 2009; Fallah *et al.*, 2013).

409 Over the years, there has been a demystification of the use of tannins in the diet of non-
410 ruminants, as these represent much more than an anti-nutritional factor. Because tannin is a
411 natural compound, it can be used in alternative breeding systems, which represent a growing
412 market today. More and more consumers are looking for quality products combined with the
413 well-being of the animals in question. The use of plant extracts rich in condensed tannins in
414 animal feed will depend on the adequacy of the level of inclusion in the diet, therefore, further
415 studies are needed to identify the best supplementation of this compound in relation to the
416 expected beneficial effects. Finally, it is complex to relate the studies of different plant species
417 due to the variability of chemical compounds present in each plant, their presence and the
418 contents of active ingredients, harvest time, and part of the processed plant (Brenes and Roura,
419 2010). Thus, the originality of this study with the evaluation of black wattle extract on
420 performance, egg quality, nutrient metabolism and the foot pad integrity of brown hens makes
421 difficult an in-depth discussion with other studies due to differences in the compounds tested
422 between studies.

423

424 **Conclusion**

425 Black wattle extract can be added to the diet of 55-week-old brown laying hens in an
426 organic production system, without prejudice to performance, egg quality and nutrient
427 metabolism.

428 The foot pad of the laying hens in an organic production system can be improved with the
429 addition of black wattle extract to the diet.

430

431 **Acknowledgments**

432 This work was supported by the National Council for Scientific and Technological
433 Development (CNPq), thanks for granting the first author's scholarship. We would also like to
434 thank Granja Quinta da Passiflora for providing its space and the animals of the experiment,
435 and the Seta Company for financing the diets and providing the black wattle extract tested in
436 this study.

437

438 **References**

439 Abou-Elkhair, R., Selim, S., Hussein, E. 2018. Effect of supplementing layer hen diet with
440 phytogenic feed additives on laying performance, egg quality, egg lipid peroxidation and blood
441 biochemical constituents. *Animals Nutrition*, 4:394-400.

- 442 <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2018.05.009>.
- 443 Al-Harhi, M.A., El-Deek, A. A., Attia, Y. A., Bovera, F., Qota, E.M. 2009. Effect of different
444 dietary levels of mangrove (*Laguncularia racemosa*) leaves and spice supplementation on
445 productive performance, egg quality, lipid metabolism and metabolic profiles in laying hens.
446 *British Poultry Science*, 50:6:700—708. <https://doi.org/10.1080/00071660903202948>.
- 447 Assuena, V., Silva, R.F., Junqueira, O.M., Casartelli, E.M., Laurentiz, A.C., Ferreira, K.D.
448 2008. Replacement of maize by sorghum in laying hens diets formulated to attempt different
449 criteria in amino acid requirements. *Ciência Animal Brasileira*, 9:93-99.
450 <https://www.revistas.ufg.br/vet/article/view/3667/3432>
- 451 Balenovic, M., Savić, V., Janječić, Z., Popović, M., Šimpraga, B., Carović-Stanko, K.,
452 Bedeković, D., Zelenika, T.A. 2018. Immunomodulatory and antimicrobial effects of selected
453 herbs on laying hens. *Veterinarski Archive*, 88:5:673-686.
454 <https://doi.org/10.24099/vet.arhiv.0104>
- 455 Berry, W. D., and P. Lui. 2000. Egg production, egg shell quality and bone parameters in broiler
456 breeder hens receiving Biol.-Mos and Eggshell. *Poultry Science*, 79:1:124.
457 <https://doi.org/10.1590/1806-9061-2016-0292>.
- 458 Bozkurt, M., Hippenstiel, F., Abdel-Wareth, A.A.A., Kehraus, S., Küçükyılmaz, K., Südekum,
459 K.H. 2014. Effects of selected herbs and essential oils on performance, egg quality and some
460 metabolic activities in laying hens—A review. *European Poultry Science*, 78:15. DOI:
461 10.1399/eps.2014.49.
- 462 Bozkurt, M., Küçükyılmaz, K., Çatli, A.U., Çınar, M., Bintaş, E., Çöven, F., 2012.
463 Performance, egg quality, and immune response of laying hens fed diets supplemented with
464 mannan-oligosaccharide or an essential oil mixture under moderate and hot environmental
465 conditions. *Poultry Science* 91, 1379–1386. <https://doi.org/10.3382/ps.2011-02023>.
- 466 BRASIL, Lei nº 10.831, de 23 de Dezembro de 2003, no Decreto no 6.323, de 27 de Dezembro
467 de 2007. Dispõe sobre a agricultura orgânica, e dá outras providências. Ministério da
468 Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Brasil, 2003.
469 http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2007-2010/2007/decreto/d6323.html/ (accessed 13
470 March 2021).
- 471 Brenes, A.; Roura, E. 2010. Essential oils in poultry nutrition: main effects and modes of action.
472 *Animal of Feed Science and Technology*, 15:8:1–14.
473 <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2010.03.007>.
- 474 Burguer, R.A., Atuahene, Y. O., ARSCOTT, G.H. 1984. Effect of Several Dermatitis
475 Preventing Agents on Foot Pad Dermatitis in Dwarf and Normal Sized Single Comb White

- 476 Leghorn Layers. Poultry Science, 63:997-1002. <https://doi.org/10.3382/ps.0630997>.
- 477 Çabuk, M.; Bozkurt, M.; Alçiçek, A.; Çatlı, A.U.; Başer, K.H.C. 2006. The effect of a mixture
478 herbal essential oils, a mannan oligosaccharide or an antibiotic on performance of laying hens
479 in the summer season. South African Journal of Animal Science, 36:135–
480 141. [https://www.researchgate.net/publication/233854768_Effect_of_a_dietary_essential_oil_](https://www.researchgate.net/publication/233854768_Effect_of_a_dietary_essential_oil_mixture_on_performance_of_laying_hens_in_the_summer_season)
481 [mixture_on_performance_of_laying_hens_in_the_summer_season](https://www.researchgate.net/publication/233854768_Effect_of_a_dietary_essential_oil_mixture_on_performance_of_laying_hens_in_the_summer_season).
- 482 Christaki, E., Bonos, E., Giannenas, I., Florou-Paneri, P. 2012. Aromatic plants as a source of
483 bioactive compounds. Agriculture, 2: 228-243. <https://doi.org/10.3390/agriculture2030228>.
- 484 Fallah, R., Kiani, A., Azarfar, A. 2013. A review of the role of five kinds of alternatives to in-
485 feed antibiotics in broiler production. Journal of Veterinary Medicine and Animal Health,
486 5:317-321. DOI 10.5897/JVMAH2013.0237.
- 487 Gharaghani, H.; Shariatmadari, F.; Torshizi, M.A. 2015. Effect of Fennel (*Foeniculum Vulgare*
488 Mill.) Used as a Feed Additive on The Egg Quality of Laying Hens Under Heat Stress. Brazilian
489 Journal of Poultry Science, 17:2:199-207. <https://doi.org/10.1590/1516-635x1702199-208>.
- 490 Gous, R. M., M. A. Kuyper, and C. Dennison. 1982. The relationship between tannic acid
491 content and metabolizable energy concentration of some sorghum cultivars. South African
492 Journal Animal Science, 12:39-44. <https://www.ajol.info/index.php/sajas/article/view/139408>.
- 493 Grashorn, M. A. 2010. Use of phytobiotics in broiler nutrition - an alternative to infeed
494 antibiotics? Journal Animal Feed Science, 19:338-347.
495 <https://doi.org/10.22358/jafs/66297/2010>.
- 496 Hagerman, A.E., Robbins, C. T., Weerasuriya, Y., Wilson, T.C., McArthur, C. 1992. Tannin
497 chemistry in relation to digestion. Journal of Range management, 45:1:57-62.
498 <https://doi.org/10.2307/4002526>.
- 499 Hamilton, R.M.G. 1982. Methods and factors that affect the measurement of egg shell quality.
500 Poultry Science, v.61, p.2022-2039. <https://doi.org/10.3382/ps.0612022>.
- 501 Haugh, R.R. 1937. The Haugh unit for measuring egg quality. United States Egg and Poultry
502 Magazine, 43: 522-555.
- 503 Hernandes, L., Pereira, L.M.D.S., Palazzo, F., Mello, J.C.P.D. 2010. Woundhealing evaluation
504 of ointment from *Stryphnodendron adstringens* (barbatimão) in rat skin. Brazilian Journal of
505 Pharmaceutical Sciences, 46:3: 431-436. <https://doi.org/10.1590/S1984-82502010000300005>.
- 506 Houshmand, M.; Hojati, F.; Parsaie, S. 2015. Dietary Nutrient Manipulation to Improve the
507 Performance and Tibia Characteristics of Broilers Fed Oak Acorn (*Quercus Brantii* Lindl).
508 Revista Brasileira de Ciência Avícola, 17:1:17-24. [https://doi.org/10.1590/1516-635x170117-](https://doi.org/10.1590/1516-635x170117-24)
509 24.

- 510 Keshavarzi, S.; Houshmand, M.; Bahreini-Behzadi, M.R. 2017. Age-Specific Response of
511 Broilers to Dietary Inclusion of a High-Tannin Feedstuff. *Poultry Science Journal*, 5:2:83-90.
512 DOI: 10.22069/psj.2017.12406.1232.
- 513 Khan, S.H.; Anjum, M.A.; Parveen, A.; Khawaja, T.; Ashraf, N.M. 2013. Effects of black
514 cumin seed (*Nigella sativa*L.) on performance and immune system in newly evolved crossbred
515 laying hens. *Veterinary Quarterly* 33, 13–19. <https://doi.org/10.1080/01652176.2013.782119>.
- 516 Li, H., Li, Z.J., Wei, Z.S., Liu, T., Zou, X.Z., Liao, Y., Luo, Y. 2015. Long-term effects of oral
517 tea polyphenols and *Lactobacillus brevis* M8 on biochemical parameters, digestive enzymes,
518 and cytokines expression in broilers. *Journal of Zhejiang University* 16:1019-1026.
519 <https://doi.org/10.1631/jzus.B1500160>.
- 520 Mellor, S. 2000. Alternatives to antibiotic. *Pig Progress*, 16:18-21.
- 521 Moreno, J.D.O., Silva, F.M.C.D., Espíndola, G.B., Santos, M.D.S.V.D., Freitas, E.R., Gadelha,
522 A.C. 2007. Performance and egg quality of laying hens fed with sorghum and paprika based
523 diets to replace the corn. *Acta Scientiarum - Animal Sciences*, 29:2:159-163.
524 <https://doi.org/10.4025/actascianimsci.v29i2.220>.
- 525 Mueller-Harvey, I. 2006. Unravelling the conundrum of tannins in animal nutrition and health.
526 *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86:13:2010-2037.
527 <https://doi.org/10.1002/jsfa.2577>.
- 528 Muhammad, A.Z., Abbas, R. Z., Qamar, W., Qamar, M. F., Mehreen, U., Shahid, Z., Kamran,
529 M. 2020. Role of secondary metabolites of medicinal plants against *Ascaridia galli*. *World's*
530 *Poultry Science Journal*, 76:3:639-655. <https://doi.org/10.1080/00439339.2020.1782801>.
- 531 National Chicken Council. 2010. National chicken council animal welfare guidelines and audit
532 checklist. Washington, DC, 35p. [https://www.nationalchickencouncil.org/wp-](https://www.nationalchickencouncil.org/wp-content/uploads/2017/07/NCC-Welfare-Guidelines-Broilers.pdf)
533 [content/uploads/2017/07/NCC-Welfare-Guidelines-Broilers.pdf](https://www.nationalchickencouncil.org/wp-content/uploads/2017/07/NCC-Welfare-Guidelines-Broilers.pdf).
- 534 Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 16.ed.
535 Washington, DC: AOAC, 1995.
- 536 Ogawa, S. and Yazaki, Y., 2018. Tannins from *Acacia mearnsii* De Wild. Bark: Tannin
537 determination and biological activities. *Molecules*, vol. 23, no. 4, pp. 1-18.
538 <https://doi.org/10.3390/molecules23040837>.
- 539 Omer, H.A.A., El-Mallah, G.M.H., Abdel-Magid, S.S., Bassuony, N.I., Ahmed, S.M., El-
540 Ghamry, A.K.A. 2019. Impact of adding natural bioactive mixture composed of lemon, onion,
541 and garlic juice at different levels on productive performance, egg quality, and some blood
542 parameters of commercial laying hens. *Bull National Research Center*, 43:137-142.
543 <https://doi.org/10.1186/s42269-019-0160-4>.

- 544 Peebles, E.D.; McDaniel, C.D. 2004. A practical manual for understanding the shell structure
545 of broiler hatching eggs and measurements of their quality. Office of Agricultural
546 Communications, a unit of the Division of Agriculture, Forestry, and Veterinary Medicine at
547 Mississippi State University. <http://www.msstate.edu/dept/poultry/b1139.pdf>. Accessed in
548 08/April/ 2020.
- 549 Radwan, L.N.; Hassan, R.A.; Qota, E.M.; Fayek, H.M. 2008. Effect of Natural Antioxidant on
550 Oxidative Stability of Eggs and Productive and Reproductive Performance of Laying Hens.
551 International Journal of Poultry Science, 7: 134-150. DOI: 10.3923/ijps.2008.134.150.
- 552 Roberfroid, M.B., 2000. Prebiotics and probiotics: are they functional foods?. The American
553 Journal of Clinical Nutrition 71:1682–1687. <https://doi.org/10.1093/ajcn/71.6.1682S>.
- 554 Rodrigues, D.F., Mendes, F.F., Noronha Filho, A.D.F., Silva, J.A., Silva, L.A.F. 2013. The bark
555 extract of *Stryphnodendron adstringens* (martius) coville in skin wound healing in animals.
556 Enciclopédia Biosfera, 9:16:1584-1602.
557 [https://repositorio.bc.ufg.br/bitstream/ri/13256/5/Artigo%20-%20Danilo%20](https://repositorio.bc.ufg.br/bitstream/ri/13256/5/Artigo%20-%20Danilo%20Ferreira%20Rodrigues%20%20-%202013.pdf)
558 [Ferreira%20Rodrigues%20%20-%202013.pdf](https://repositorio.bc.ufg.br/bitstream/ri/13256/5/Artigo%20-%20Danilo%20Ferreira%20Rodrigues%20%20-%202013.pdf).
- 559 Rostagno, H. S., Albino, L.F.T., Hannas, M.I., Donzele, J.L., Sakomura, N.K., Perazzo, F.G.,
560 Saraiva, A., Teixeira, M.L., Rodrigues, P.B., Oliveira, R.F., Barreto, S.L.T., Brito, C.O. 2017.
561 Tabelas Brasileiras para Aves e Suínos. Composição de Alimentos e Exigências Nutricionais.
562 Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Zootecnia. 4^a. Ed. 186p.
- 563 Sedghi, M., Ebadi, M.R., Golian, A., Ahmadi, H. 2011. Estimation and modeling true
564 metabolizable energy of sorghum grain for poultry. Poultry Science, 90:5:1138-43.
565 <https://doi.org/10.3382/ps.2010-01005>.
- 566 Seidavi, A., Belali, M., Elghandour, M.M.Y., Adegbeye, M.J., Salem, A.Z.M. 2020. Potential
567 impacts of dietary inclusion of green tea (*Camellia sinensis* L.) in poultry feeding: a
568 review. Agroforest Systems, 94:1161–1170. <https://doi.org/10.1007/s10457-019-00444-x>.
- 569 Shepherd, E.M., Fairchild, B.D., 2010. Footpad dermatitis in poultry. Poultry Science 89, 2043–
570 2051. <https://doi.org/10.3382/ps.2010-00770>.
- 571 Sibbald, I.R.; Slinger, S.J. 1963. A biological assay for metabolizable energy in poultry feed
572 ingredients together with findings which demonstrate some of the problems associated with the
573 evaluation of fats. Poultry Science, 42:2:313-325. DOI : 10.3382/ps.0420313.
- 574 Sibbald, I.R., 1976. A bioassay for true metabolizable energy in feeding-stuffs. Poultry Science,
575 55:303-308. <https://doi.org/10.3382/ps.0550303>.
- 576 Sun, P., Lu, Y., Cheng, H., Song, D., 2018. The Effect of Grape Seed Extract and Yeast Culture
577 on Both Cholesterol Content of Egg Yolk and Performance of Laying Hens. Journal of Applied

- 578 Poultry Research 27, 564–569. <https://doi.org/10.3382/japr/pfy035>.
- 579 Tomaszewska, E., Dobrowolski, P., Klebaniuk, R., Kwiecień, M., Tomczyk-Warunek, A.,
580 Szymańczyk, S., Kowalik, S., Milczarek, A., Blicharski, T., Muszyński, S. 2018. Gut-bone axis
581 response to dietary replacement of soybean meal with raw low-tannin faba bean seeds in broiler
582 chickens. *Plos One*, 3:3:1-22. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0194969>.
- 583 United States Department Of Agriculture - USDA. 2000. Egg Grading Manual. Washington:
584 Department of Agriculture. 56p. (Agricultural Marketing Service, 75).
- 585 Vakili, R.; Majidzadeh-Heravi, R. 2016. Performance and Egg Quality of Laying Hens Fed
586 Diets Supplemented with Herbal Extracts and Flaxseed. *Poultry Science Journal*, 4:2:107-116.
587 DOI: 10.22069/PSJ.2016.9833.1156
- 588 Vieira, M.M., Ribeiro, A.M.L., Kessler, A.M., Moraes, M.L., Kunrath, M.A., Ledur, V.S. 2013.
589 Different sources of dietary zinc for broilers submitted to immunological, nutritional, and
590 environmental challenge. *Journal of Applied Poultry Research*, 22:4:855-861.
591 <https://doi.org/10.3382/japr.2013-00753>.
- 592 Wang, G., Ekstrand, C., Svedberg, J. 1998. Wet litter and perches as risk factors for the
593 development of foot pad dermatitis in floor-housed hens. *British Poultry Science*, 39: 191–197.
- 594 Warreham, C. N.; Wiseman, J.; Cole, D. J. A. 1994. Processing and antinutritive factors in
595 feedstuffs. In: Cole, D. J. A.; Varley, M. A. (Eds.) *Principles of pig sciences*. Nottingham. 427p.
596 doi:10.1017/S0021859600070489.
- 597 Welfare Quality. Butterworth, A., Veissier, I., van Niekerk, T.G.C.M., Keeling, L.J. Welfare
598 Quality[®], Assessment protocol for Poultry. 2009. Netherlands: ASG Veehouderij BV, p.114.
- 599 Yang, Y., Iji, P.A., Choct, M. 2009. Dietary modulation of gut microflora in broiler chickens:
600 a review of the role of six kinds of alternatives to in-feed antibiotics. *World Poultry Science*
601 *Journal*, 65: 97-114. <https://doi.org/10.1017/S0043933909000087>.
- 602 Yang, C., Chowdhury, M.A., Huo, Y., Gong, J. 2015. Phytogetic compounds as alternatives to
603 in-feed antibiotics: potentials and challenges in aplication. *Pathogens*, 4:137-156.
604 <https://doi.org/10.3390/pathogens4010137>.
- 605 Yitbarek, M.B. 2015. Phytogetics as Feed Additives in Poultry Production: A Review.
606 *International Journal of Extensive Research*, 3:49–60.
607 <https://www.researchgate.net/publication/344188943>.

CAPÍTULO III¹

¹Manuscrito elaborado conforme as normas da Livestock Science.

Effects of condensed tannin supplementation on performance, nutrient digestibility, carcass characteristics, meat quality and fecal microbiome in pigs

Highlights

- Tannins in *Acacia mearnsii* extract do not impair performance and nutrient digestibility in pigs.
- Increasing the extract levels linearly reduces lipid oxidation and shear force in the meat.
- Inclusion on 2000 mg/kg of extract resulted in an important increase in the abundance of *Lactobacillales* in the fecal microbiome of pigs.
- Additives with polyphenols and tannins can be useful for pigs.

Abstract

Recent studies on the activity of tannins have demystified their anti-nutritional effect and evidenced important beneficial actions to animal performance, nutrient digestibility, and meat quality, due to their antioxidant, antibacterial, tissue repair and enzyme and protein regulation properties. The objective of this study was to evaluate the effect of the addition of *Acacia mearnsii* bark extract (AMBE), a compound rich in condensed tannins, in the diet of growing and finishing pigs on the performance, nutrient digestibility, carcass characteristics, meat quality and fecal microbiome. Forty-eight Large White × Landrace finishing pigs (24 males and 24 females), with average initial body weight of 30 ± 3.67 kg, were randomly assigned to receive four different diets according to the level of AMBE (0, 500, 1000 and 2000 mg/kg) for 70 days. Diets and water were offered ad libitum and two pigs were housed in the same pen. There was no difference between treatments in performance, nutrient digestibility and carcass characteristics. Increasing levels of inclusion of tannins resulted in a linear reduction in lipid oxidation ($P < 0.040$) and shear force ($P < 0.002$) in the meat. Supplementation of 2000 mg/kg of tannin in the diet resulted in a greater predominance of the phylum *Firmicutes* in fecal samples, due to the proportional increase in the order *Lactobacillales*. The addition of AMBE in the diet of pigs in the growing and finishing phases can be viable without impairing performance, digestibility and carcass of the animals, and can improve the oxidative quality and tenderness of the meat, in addition to modulating the fecal microbiome of pigs.

Keywords: intestinal modulation, lipid oxidation, polyphenols, shear force.

34 Introduction

35 Natural extracts such as tannins have been widely studied for their promising
36 antioxidant, anti-inflammatory and antibacterial properties (Lipiński, 2017). Tannic
37 compounds are polyphenols, present in a wide variety of plants, representing the most
38 important group of polyphenols in animal nutrition (Warreham *et al.*, 1994), which are
39 highly chemically reactive and generate intra and intermolecular hydrogen bonds
40 (Castejon *et al.*, 2014). Studies on the activity of tannins demystified their anti-
41 nutritional effect and evidenced important antibacterial and fungicidal action (Costa *et al.*
42 *et al.*, 2021), action on protozoa (Seidavi, 2020), tissue repair and enzyme and protein
43 regulation, which occur due to its complexation with metal ions, antioxidant activities
44 and ability to complex proteins and polysaccharides (Rodrigues *et al.*, 2013; Passareti
45 *et al.*, 2016). These effects depend on the dose, the type of tannin and the period of
46 ingestion (Yesilbag, 2011). In non-ruminants, moderate levels of tannins in the diet
47 have beneficial effects due to their numerous activities. According to the literature
48 review performed by Huang *et al.* (2018), 13 studies support the use of tannins for pig
49 feeding, in which 7 studies have demonstrated positive results in productive
50 performance, intestinal microbiome or intestinal histological characteristics. The
51 addition of tannins to pig diets can benefit animal performance (Brus *et al.*, 2013b;
52 Khanyiele *et al.*, 2014) and nutrient digestibility (Halimani *et al.*, 2005). However, the
53 results of the effect in meat quality are poorly reported (Hanczakowska *et al.*, 2017)
54 and the effect on carcass quality has not yet been evidenced (Galassi *et al.*, 2019). The
55 combination of hydrolysable and condensed tannins appears to modulate the intestinal
56 microbiome of growing pigs (Tretola *et al.*, 2019).

57 *Acacia mearnsii* is a leguminous species originating in Australia, and its bark
58 makes it possible to obtain extracts rich in tanning agents and phenols that originate
59 tannins. The tannins in the *Acacia mearnsii* represent up to 40% of its composition on
60 a dry basis (Caldeira *et al.*, 1998). Acacia bark has a good concentration of
61 macronutrients, such as calcium, potassium, phosphorus and magnesium (Foelkel,
62 2008). This variety of tree produces condensed tannins, that are polyphenolic
63 compounds that facilitate reacting and precipitating of proteins, being superior to other
64 types of tannins (Veronese, 2011). There are few publications using other wattle
65 varieties, mainly using leaves or bark of *Acacia tortillis*. Nonetheless, for the best of our
66 knowledge, there are no studies evaluating black wattle extract in the diet of pigs. Thus,
67 the aim of this study was to evaluate the effects of tannins present in *Acacia mearnsii*

68 bark extract in the diet of growing and finishing pigs on performance, nutrient
69 digestibility, carcass characteristics, meat quality and fecal microbiome.

70

71 **Materials and Methods**

72 **Ethics Statement**

73 The authors confirm that the procedures used in this experiment were in
74 accordance with all ethical and legal principles for animal experimentation, as noted
75 on the journal's guidelines page. The experiment was approved by the Animal Use
76 Ethics Committee of the Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, Federal
77 University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil), protocol number 4474130720.

78

79 **Animals, management, and diets**

80 The field experiment was conducted in the city of Santa Maria, Rio Grande do Sul,
81 Brazil (29°41'29"S, 53°48'3"W).

82 The addition of *Acacia mearnsii* bark extract (AMBE) in a corn-based diet and
83 soybean meal for pigs in the growing and finishing phases (30 to 115 kg) was tested.

84 Twenty-four castrated males and 24 females from commercial breeding (Landrace
85 x Large White) were used in this study. Animals were weaned at 28 days of age, and
86 the average initial body weight was 32 ± 3.67 kg. The animals were housed in a shed
87 with 24 pens (6 pens for each treatment and 2 animals in each pen). Access to water
88 and diets was ad libitum. Diets were fed using an automatic feeder, and water was
89 provided through low pressure nipple drinkers, fitted opposite to the bin feeders. The
90 shed was equipped with a ceiling and curtains to attenuate extremes of humidity (which
91 ranged from 60 to 75%) and temperature (7 to 17° C).

92 The diets were composed by corn and soybean meal, and were formulated to be
93 isonutritive for all treatments, according to the nutritional requirements of the NRC
94 (2012), for 3 growth phases: phase 1 - from 30 to 60kg; phase 2 - from 60 to 90kg; and
95 phase 3 - from 90 to 120 kg (Table 1). The level of condensed tannin analyzed in the
96 AMBE was 78.41%.

97

98

99

100

101 **Table 1-** Ingredient composition of phase 1, 2 and 3 diets for growing pigs.

Ingredients	Phase 1 (g/kg)	Phase 2 (g/kg)	Phase 3 (g/ kg)
Corn grain	731.4	796.5	862.4
Soybean Meal 45	235	174	115.6
Common salt	3.85	3.9	3.59
Calcitic limestone	10.34	7.28	7.74
Dicalcium phosphate	8.66	5.74	2.29
Vitamin Premix ¹	0.35	0.28	0.2
Mineral Premix ²	0.7	0.55	0.38
DL-Methionine	1.275	0.828	0.54
L-Lysine HCl	4.575	3.761	3.765
Choline Cl 60%	0.355	0.386	0.41
L-threonine	1.2	0.884	0.725
L-tryptophan 99%	0.245	0.341	0.31
10000 FTU/g phytase	0.05	0.05	0.05
Filler/treatments ³	2	2	2
Titanium dioxide	-	3.5	-
Calculated composition			
Dry matter (g/kg)	880.2	877.6	875.6
Metabolizable energy (kcal/kg)	3278	3307	3328
Crude protein (g/kg)	167.9	145.1	123.7
Ether extract (g/kg)	31.4	32.7	33.8
Crude fiber (g/kg)	28.8	27.1	25.3
Digestible Lysine (g/kg)	10.7	8.66	7.29
Digestible Met+Cis (g/kg)	6.10	5.16	4.38
Digestible threonine (g/kg)	6.70	5.63	4.74
Digestible tryptophan (g/kg)	1.95	1.73	1.40
Calcium (g/kg)	7.22	5.40	4.61
Available phosphorus (g/kg)	4.12	3.52	2.82
Choline (mg/kg)	1250	1150	1050

102 ¹ Composition per kg of premix: vitamin A 20800000 IU, vitamin D3 4570000 IU, vitamin E 72000 IU,
 103 vitamin K3 9000 mg, vitamin B1 3100 mg, vitamin B2 11500 mg, vitamin B6 6100 mg, vitamin B12 51
 104 mg, niacin 90000 mg, pantothenic acid 46000 mg, folic acid 970 mg, biotin 320 mg.

105 ² Composition per kg of premix: zinc 132000 mg, copper 14600 mg, iron 97000 mg, manganese 45500
 106 mg, iodine 1200 mg, selenium 440 mg.

107 ³ 0, 500, 1000 or 2000 mg/kg of tannin replacing microcrystalline cellulose.

108

109 The treatments were composed by formulating a control diet and adding AMBE at
110 different inclusion levels: 500, 1000 and 2000 mg/kg

111 The diets were prepared weekly, the feed was supplied after the animals were
112 weighted. Feeders were checked daily, and in the case of technical problems, were
113 replaced. Stalls were cleaned twice a day, at 7 am and 5 pm, and the feed orts were
114 collected and quantified.

115

116 **Experimental procedure and sample analysis**

117 Performance characteristics, nutrient metabolism, carcass characteristics, meat
118 quality and fecal microbiome were evaluated.

119

120 **Performance**

121 Body weight was measured at the first day of housing, and weekly after the onset
122 of the experiment to determine growth rate. Animals were submitted to a 12-hour
123 fasting period before the body weight measurement.

124 The average daily weight gain was estimated from the average difference between
125 the final and initial weights of each pen. Feed intake was estimated from the difference
126 between weekly feed supply and daily waste in each pen. The feed conversion ratio
127 was calculated by dividing the total feed intake and the total weight gain.

128

129 **Apparent total tract digestibility (ATTD)**

130 The digestibility test was conducted when the animals reached 70 kg of body
131 weight (Phase 2). The partial fecal collection method was used, with the addition of 3.5
132 g/kg of titanium dioxide (TiO₂) as a fecal marker. The animals were subjected to an
133 adaptation period of 7 days to the experimental diets, followed by 2 days of collection.
134 Feces were collected twice a day, immediately after excretion, placed in identified
135 plastic bags and frozen. At the end of the collection period, the samples were thawed,
136 homogenized and pre-dried in a forced ventilation oven at 65° C for 72 hours. Then,
137 each sample was weighted, grounded and sent to the laboratory for analysis.

138 The titanium dioxide content in feces and feed was determined according to Myers
139 *et al.* (2004). A fecal sample of 0.5 g was digested, for 2 hours, at a temperature of
140 400°C, using tubes for protein determination. After digestion, 10 ml of hydrogen
141 peroxide (H₂O₂ - 30%) was added slowly and the tube material was transferred to a

142 glass vial and topped up with distilled water to 100 g. Following, the content was
143 transferred to 100 ml flasks and added with another 3 drops of H₂O₂ (30%). In the
144 digestion, 15 ml of sulfuric acid and 5 g of the protein digester mixture (macro Kjeldahl)
145 were used. A standard curve was prepared with 0, 2, 4, 6, 8 and 10 mg of titanium
146 dioxide and the readings were performed in an Ultraviolet Spectrophotometer:
147 SPENCER - LGI-VS-721N, with a wavelength of 410 nm.

148 Feed and fecal samples were also analyzed for dry matter (method number
149 930.15), crude protein (method number 984.13), ash (method number 942.05), ether
150 extract (method number 920.39), crude fiber (method number 978.10) according to the
151 Association of Official Agricultural Chemists (1995). Gross energy values were
152 determined using an isoperibolic pump calorimeter, model C2000, produced by IKA
153 Werke GmbH & Co. KG. All analyzes were performed in duplicate.

154 Apparent digestibility coefficients of dry matter, crude protein, ether extract, ash,
155 crude fiber, nitrogen-free extracts, and gross energy were calculated. The following
156 equation was used:

$$157 \text{ ATTD (g/g)} = 1 - ((\text{TiO}_2 \text{ diet/TiO}_2 \text{ feces}) * \text{nutrient in feces/nutrient in diet})$$

158

159 **Carcass characteristics**

160 After 70 days of the experiment, the pigs reached an average of 120 kg body
161 weight, being taken to slaughter. The animals were fasted for eight hours before the
162 transport. At the slaughterhouse, pigs were weighed individually, and housed in
163 collective pens with free access to water. The time between transport and slaughter
164 was approximately twelve hours. Using standard handling pre-slaughter to minimize
165 stress, the pigs were stunned with an electrical system, followed immediately by
166 bleeding, scalding, mechanical depilation and evisceration. The carcass was weighed
167 and divided lengthwise. Afterwards, hot carcass weight (HCW) and cold (CCW) were
168 collected (without head and feet); temperature and pH 45 minutes post-slaughter (pH-
169 45) and temperature and pH 24 hours post-slaughter (pH-24), measured in the
170 *longissimus dorsi* muscle using the portable pH meter DM-2 Digimed®.

171 In the region of the third and fourth ribs in the caudal-cranial direction, a cross-
172 section was performed, where the muscle depth (MD) of *Longissimus lumborum* and
173 backfat thickness was measured (at three points) using a digital caliper.

174 The carcass yield (CY) and carcass water loss meat (CWL), were estimated
175 through equations described by Bridi & Silva 2007):

176 Carcass yield (%) = (hot carcass weight x 100)/ live weight

177 Carcass water loss (%) = hot carcass weight – cold carcass weight

178 The carcass length (CL) was measured with a graduated measuring tape from the
179 cranial edge of the pubic symphysis to the cranioventral edge of the left half carcass
180 atlas (Bridi & Silva, 2007). The yield of carcass meat (YCCM) and the meat content in
181 the carcass (MCC) were calculated according to the formulas of Bridi & Silva (2007):

182
$$YCCM (\%) = (65.92 \times \text{Backfat thickness}) + (0.094 \times \text{muscle depth})$$

183
$$- (0.026 \times \text{hot carcass weight})$$

184
$$MCC (kg) = \text{Cold carcass weight} \times YCCM$$

185

186 **Meat quality**

187 Three samples of the *longissimus dorsi* muscle of each carcass were taken, one
188 for analysis of drip loss, the other two were frozen for subsequent analysis of color,
189 lipid oxidation and shear force.

190 Drip loss was determined using approximately 150 g of meat, suspended and
191 wrapped with a plastic bag, without contact, in a cold chamber at 4 °C, being weighted
192 at the beginning and forty-eight hours later. The water loss by dripping was expressed
193 as a percentage of the initial weight, according to Bridi & Silva (2007):

194
$$\text{Drip loss (\%)} = (100 - (\text{final sample weight} - 100)) / \text{initial sample weight}$$

195 The color measurement was performed on the sample using a portable
196 MINOLTA® spectrophotometer (model CM 508d), using the luminosity (L*), red
197 intensity (a*) and yellow intensity (b*) scale of the CIELAB system, with D65 light
198 source and 11 mm aperture, and 10 degree standard observer angle. Calibration was
199 performed using a white background.

200 Lipid oxidation analysis was performed according to the method described by Zeb
201 and Ullah (2016), with modifications. This analysis aims to quantify malondialdehyde
202 (MDA) through the verification of substances reactive to thiobarbituric acid (TBA). For
203 analysis of lipid oxidation, 1 sample from each of the slaughtered animals was used.
204 The samples were individually ground using a meat processor. Three grams of each
205 sample were weighted and homogenized in 15 ml of a standard solution of 4.0 mM
206 TBA prepared in glacial acetic acid with 0.01 % BHT (Butylated hydroxytoluene). The
207 sample was then placed on a shaker for 60 minutes. Afterwards, the solution was
208 filtered and 4 ml of the filtrate from each sample were mixed with another 4 ml of

209 standard TBA solution, in a ratio of 1:1, and placed in a water bath at 90 °C for 60
210 minutes. The samples were then cooled and measured in a spectrophotometer
211 (Amersham Biosciences; Ultrospec 3100) using a wavelength of 532 nm. For the
212 determination of the amount of MDA present in the samples, a standard curve from the
213 dilution of MDA (malondialdehyde) solutions was used. Lipid oxidation tests were
214 performed in triplicate. Results were presented in mg of MDA per kg of sample.

215 The shear force was determined to assess the tenderness of the meat. The samples
216 were cut into 2 cm thick steaks and roasted in a preheated oven until reaching an
217 internal temperature of 71°C. Then, the samples were removed from the oven, cooled
218 until reaching room temperature (20 to 23°C) and two homogeneous cylinders pieces,
219 1.27 cm in diameter, were removed from each steak. The cylindrical samples were
220 sheared perpendicularly to the orientation of the muscle fibers, using a Warner-Bratzler
221 apparatus. Results were expressed in kg.

222

223 **Fecal microbiome**

224 The analysis of the fecal microbiome was performed using newly produced feces
225 that were collected for two consecutive days from animals weighing around 70 kg.
226 Samples were collected by rectal stimulation or from the floor pen, immediately after
227 defecation, consisting of a single sample of the two animals in the pen. Total DNA was
228 extracted immediately after thawing the samples using a QIAmp DNA Mini Stool Kit
229 (QIAGEN, Hilden, Germany) and stored at -20°C for further analysis. DNA
230 concentration was measured using an Eppendorf BioPhotometer Plus. DNA was
231 obtained by extraction with the PowerSoil DNA Isolation Kit (MO BIO Inc. Laboratories,
232 USA), according to the manufacturer's instructions.

233 The analysis of bacterial communities was performed by sequencing the V6 region
234 of the 16S rRNA gene, using primers 967F and 1046R. The generated amplicons were
235 purified with the Charge Switch PCT Clean Up kit (Invitrogen, USA) and sequenced on
236 the Illumina® platform. Sequence analysis, clustering and sequence signing were
237 conducted using the Illumina basespace 16S Metagenomics App (Illumina Inc., San
238 Diego, CA, USA). Sequence classification used the algorithm developed by Wang *et*
239 *al.* (2007). The database used to identify the sequences was the Greengene
240 Consortium Database (de Santis *et al.*, 2006). At each taxonomic level, the results per
241 sample were expressed in relative abundance of the total sequences.

242

243 **Design and Statistical Analysis**

244 The experimental design was in randomized blocks, with sex being the block
245 effect, with 4 treatments (4 experimental diets) and 6 repetitions per treatment, where
246 each pen with two animals was considered an experimental unit. The results were
247 submitted to analysis of variance by the GLM procedure (SAS, 1999) and the
248 significantly different means were compared by the SNK test at 5% probability. When
249 pertinent, polynomial regression analysis was used to assess the effect of tannin levels
250 in the diet. One-way Analysis of Variance (ANOVA) followed by Tukey's post hoc test
251 was conducted in the comparison analysis of abundances of taxonomic groups. Such
252 analysis was performed using GraphPad 6.0 software (GraphPad Software Inc., San
253 Diego, CA, USA). The Shannon-Wiener Index for each sample was calculated by the
254 App 16S Metagenomics (Illumina Inc., San Diego, CA, USA) and was used to assess
255 species diversity. Principal Coordinate Analysis (PCoA) with UniFrac distances was
256 used to test gender diversity in relation to treatments. The PCoA was conducted in the
257 R environment, using the ggbiplot package.

258

259 **Results**

260

261 There was no significant difference ($P > 0.05$) between treatments for total
262 performance and performance by phase (Table 2). The results found are within
263 expectations for the animals of the breed. In contrast to what was found in other
264 experiments, the addition of AMBE did not limit the animals feed intake or did it affect
265 their performance in a negative way. The animals started the experiment with a similar
266 weight between treatments, and there was no sanitary challenge throughout the
267 experiment, factors that may have allowed for a non-statistical difference between
268 treatments.

269

270

271

272

273

274 **Table 2** - Total performance and by phase of pigs fed diets with different levels of
 275 inclusion of *Acacia mearnsii* bark extract.

Performance	<i>Acacia mearnsii</i> bark extract inclusion (mg/kg)				SEM	P
	0	500	1000	2000		
Initial body weight (kg)	34.86	34.04	32.81	33.83	4.20	0.882
Final body weight (kg)	116.9	116.6	112.7	113.4	4.90	0.392
Average total gain (kg)	82.77	82.47	78.56	79.33	4.90	0.391
Average daily gain (kg)	1.15	1.14	1.09	1.10	0.07	0.392
Average daily feed intake (kg)	3.17	3.17	3.10	3.19	0.21	0.891
Feed conversion rate	2.72	2.76	2.83	2.90	0.13	0.216
Phase 1 (30 - 60 kg)						
Average daily gain (kg)	1.03	1.07	1.03	0.98	0.07	0.262
Average daily feed intake (kg)	2.39	2.15	2.24	2.31	0.27	0.465
Feed conversion rate	2.20	2.08	2.17	2.34	0.20	0.195
Phase 2 (60 - 90 kg)						
Average daily gain (kg)	1.25	1.22	1.18	1.24	0.17	0.918
Average daily feed intake (kg)	3.07	3.25	3.06	3.28	0.43	0.728
Feed conversion rate	2.35	2.69	2.57	2.67	0.20	0.195
Phase 3 (90 – 120 kg)						
Average daily gain (kg)	1.18	1.26	1.14	1.17	0.11	0.399
Average daily feed intake (kg)	3.45	3.46	3.21	3.24	0.33	0.581
Feed conversion rate	2.92	2.74	2.84	2.86	0.32	0.827

276

277

278 The total apparent digestibility was not significantly different ($P > 0.05$) between
 279 the control diets and the different levels AMBE inclusion (Table 3).

280

281

282

283

284

285 **Table 3** – Apparent total tract digestibility (ATTD) of the components measured in pigs
 286 in phase 2 (70-75 kg body weight) with diets with different levels of inclusion of *Acacia*
 287 *mearnsii* bark extract.

Item	<i>Acacia mearnsii</i> bark extract inclusion (mg/kg)				SEM	P
	0	500	1000	2000		
Dry matter (g/g)	0.876	0.871	0.861	0.873	0.0135	0.500
Crude protein (g/g)	0.817	0.872	0.783	0.800	0.0259	0.423
Ether extract (g/g)	0.526	0.517	0.479	0.567	0.0590	0.308
Ash (g/g)	0.554	0.510	0.504	0.554	0.0551	0.553
Crude fiber (g/g)	0.449	0.438	0.449	0.503	0.0738	0.663
Nitrogen free extract (g/g)	0.935	0.933	0.926	0.930	0.0073	0.468
Gross energy (kcal/kcal)	0.856	0.849	0.835	0.850	0.0152	0.368

288

289 There was no difference between treatments in the evaluations of carcass
 290 characteristics (Table 4). According to Bridi (2007), the pH values considered normal
 291 are: greater than 5.8 for initial pH and equal to or less than 5.9 after 24 hours of
 292 slaughter. The pH results found in this work were within these values.

293

294 **Table 4** - Evaluation of carcass characteristics of pigs fed diets with different levels of
 295 *Acacia mearnsii* bark extract.

Carcass characteristics	<i>Acacia mearnsii</i> bark extract inclusion (mg/kg)				SEM	P
	0	500	1000	2000		
Slaughter weight (kg)	115.02	116.14	114.05	114.02	8.71	0.940
Hot carcass weight (kg)	81.79	81.25	81.25	81.16	6.26	0.995
Cold carcass weight (kg)	78.58	77.60	78.15	77.72	5.65	0.976
Carcass length (mm)	96.72	95.54	96.54	97.32	2.95	0.601
Carcass yield (%)	67.11	69.99	71.23	71.22	1.64	0.298
Yield of carcass meat (%)	59.67	61.91	60.73	59.76	3.50	0.428
Meat content in carcass	47.72	46.57	46.75	47.46	3.21	0.810
Carcass water loss (%)	3.20	3.65	3.10	3.43	1.10	0.675
Muscle depth (mm)	71.41	71.03	71.50	70.58	5.89	0.980
Backfat thickness P2 (mm)	14.00	14.87	15.50	13.50	3.48	0.517
Backfat thickness*(mm)	28.96	30.88	33.71	30.71	5.81	0.227
pH - 45 min	6.04	6.05	5.96	6.06	0.20	0.598
pH - 24h	5.60	5.64	5.66	5.67	0.17	0.773

296 * as average of three measurements

297

298 There was no significant difference ($P>0.05$) between treatments for meat quality
 299 characteristics, except for lipid oxidation and shear force (Table 5). In the evaluation of
 300 lipid oxidation, the values found in meat samples from animals with a higher level of
 301 AMBE inclusion in the diet were lower than those of the treatment without inclusion.
 302 The higher levels of inclusion also showed a significant reduction in shear force
 303 compared to the control diet, therefore the use of AMBE in the diet provided greater
 304 tenderness to the meat. By regression analysis, with increasing levels AMBE inclusion,
 305 there was a linear reduction in lipid oxidation ($P<0.040$) and shear force ($P<0.002$).
 306

307 **Table 5** - Meat quality evaluation of pigs fed diets with different levels of *Acacia*
 308 *mearnsii* bark extract.

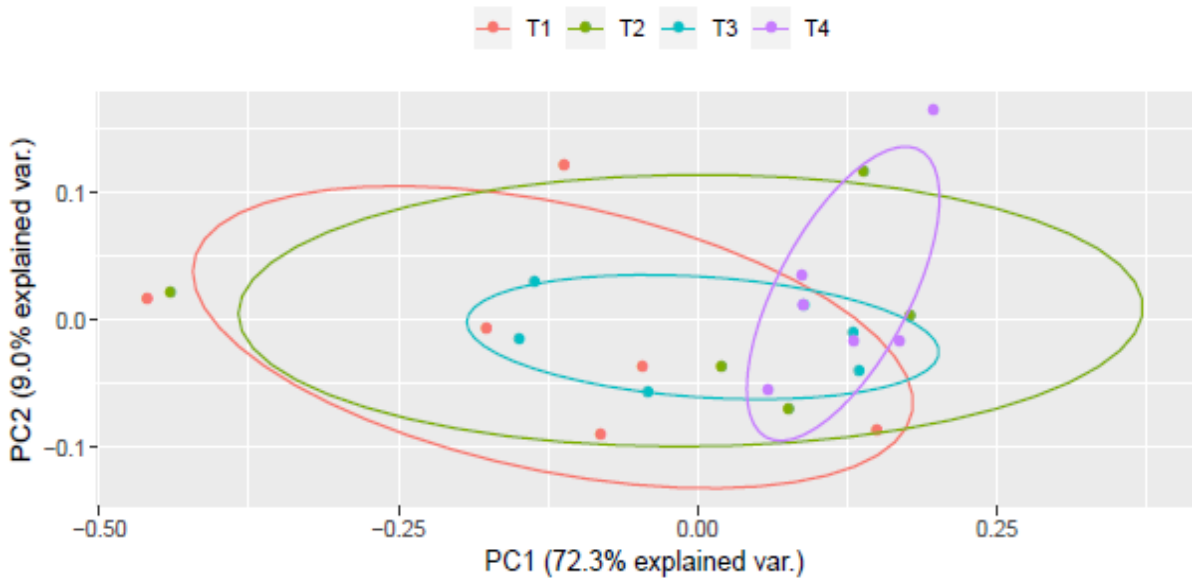
Meat quality	<i>Acacia mearnsii</i> bark extract inclusion (mg/kg)				SEM	P	Regression
	0	500	1000	2000			
Drip loss (%)	2.80	2.84	2.92	3.60	1.21	0.358	NS
Lipid oxidation (mg of MDA/kg of sample) ¹	0.290 ^a	0.262 ^{ab}	0.243 ^{ab}	0.216 ^b	0.0643	0.046	L ²
Color L*	50.27	47.08	49.33	48.62	4.98	0.510	NS
Color a*	6.60	6.65	6.29	7.25	1.59	0.545	NS
Color b*	6.11	5.35	5.95	5.82	1.49	0.680	NS
Shear force (kg) ¹	4.37 ^a	4.13 ^{ab}	3.33 ^b	3.26 ^b	0.817	0.031	L ²

309 ¹ Different letters on the line indicate a significant difference between means by the SNK test ($P<0.05$).
 310

311 ²L Linear polynomial regression: lipid oxidation ($Y= 0.285 -0.0000363* \text{ AMBE (mg/kg)}$; $R^2 = 0.173$,
 $P<0.040$); shear force ($Y= 4.260 -0.0005507* \text{ AMBE (mg/kg)}$; $R^2 = 0.206$, $P<0.002$).
 312

313 In the analysis of the fecal microbiome, the diversity of two kingdoms, *Bacteria* and
 314 *Archea*, was identified, with sequences of 42 phyla, 88 classes, 123 orders, 287
 315 families, 1127 genera and 1775 possible species of microorganisms. *Bacteria*
 316 sequences predominated, with 96% of the total, while *Archea* represented an average
 317 of 4%. The number of species was not different ($P>0.05$) between treatments (0mg/kg:
 318 505 species, 500mg/kg: 547 species, 1000mg/kg: 570 species and 2000mg/kg: 630
 319 species). On the other hand, there was a trend ($P<0.08$) of linear growth in the number
 320 of species with the increase in the addition of AMBE in the diet. No difference was
 321 identified in the diversity between treatments, measured by the Shannon-Wiener Index
 322 of species diversity (0mg/kg: 2.590, 500mg/kg: 2.571, 1000mg/kg: 2.993 and
 323 2000mg/kg: 2.595). Beta diversity was also assessed at the genus level and Principal

324 Coordinate Analysis using UniFrac distances demonstrated the lack of separation
 325 between groups, especially 0, 500 and 1000 mg/kg, indicating that there is no
 326 difference in beta diversity between these groups (Figure 1). The two axes (PC1 and
 327 PC2) explained 81.3% of the total variability.



328
 329 **Figure 1.** Beta diversity visualized using UniFrac distances with Principal Coordinate
 330 Analysis (PCoA), in feces of pigs fed diets with 0 (T1), 500 (T2), 1000 (T3) or 2000
 331 (T4) mg/kg of *Acacia mearnsii* bark extract.

332

333 At the phylum level (Table 6), there was a clear predominance of *Firmicutes*
 334 (average of 71.4%), followed by *Bacteroidetes* (average of 15.3%) and *Euryarchaeota*
 335 (average of 4.3%). A greater abundance of *Armatimonadetes* ($P < 0.05$) was identified
 336 in the feces of pigs receiving 500 mg/kg of AMBE, compared to the other treatments.
 337 There was a quadratic response of *Euryarchaeota* abundance with the increase in
 338 supplemented tannin, with the highest values at intermediate levels (500 and 1000
 339 mg/kg). The higher concentration in phylum *Firmicutes* may explain the apparent
 340 concentration of diversity found in PCoA, in the 2000mg/kg treatment (T4).

341

342

343

344

345

346 **Table 6** - Predominant phyla of *Bacteria* and *Archea* (expressed as % of abundance)
 347 present in the feces of pigs fed diets with 0, 500, 1000 or 2000 mg/kg of *Acacia*
 348 *mearnsii* bark extract.

Phylum	<i>Acacia mearnsii</i> bark extract inclusion (mg/kg)				SEM	P	Regression
	0	500	1000	2000			
<i>Actinobacteria</i>	0.39	0.48	0.41	3.60	0.140	0.816	NS
<i>Armatimonadetes</i>	0.35 ^a	0.68 ^b	0.26 ^a	0.26 ^a	0.094	0.010	NS
<i>Bacteroidetes</i>	17.02	13.99	15.64	14.56	3.944	0.928	NS
<i>Euryarchaeota</i>	2.57	6.10	6.47	2.19	1.716	0.113	Q ²
<i>Firmicutes</i>	76.13 ^{ab}	65.58 ^a	65.18 ^a	78.52 ^b	4.165	0.039	Q ²
<i>Proteobacteria</i>	1.25	1.19	1.67	1.07	0.426	0.533	NS
<i>Spirochaetes</i>	1.33	10.68	7.13	1.29	3.166	0.135	NS
<i>Verrucomicrobia</i>	0.41	0.61	1.44	0.79	0.600	0.621	NS

349 ¹Different letters on the line indicate a significant difference between means by the SNK test (P<0.05)

350 ² Q: Quadratic polynomial regression: *Euryarchaeota*: $Y=2.702 + 0.00821* \text{ AMBE (mg/kg) } -0.000004245*$
 351 AMBE (mg/kg)^2 ; R² = 0.463, P<0.045. *Firmicutes*: $Y=75.47 - 0.0222* \text{ AMBE (mg/kg) } + 0.00001192*$
 352 AMBE (mg/kg)^2 ; R² = 0.568, P<0.015.

353

354 At the level of order (Table 7), *Chthonomonadales* was a determinant of the effect
 355 on the phylum *Armatimonadetes*, *Methanobacteriales* represented the variation in
 356 *Euryarchaeota*, and in the effect on the abundance of *Firmicutes*, the order
 357 *Lactobacillales* predominated, with much greater participation in the feces of pigs fed
 358 with 2000 mg/kg of AMBE.

359

360

361

362

363

364

365

366

367

368

369

370

371

372

373 **Table 7** - Predominant orders of *Bacteria* (expressed as % of abundance) present in
 374 the feces of pigs fed diets with 0, 500, 1000 or 2000 mg/kg of *Acacia mearnsii* bark
 375 extract.

Phylum/order	<i>Acacia mearnsii</i> bark extract inclusion (mg/kg)				SEM	P	Regression
	0	500	1000	2000			
<i>Actinobacteria</i>							
<i>Bifidobacteriales</i>	0.14	0.18	0.12	0.22	0.109	0.850	NS
<i>Coriobacteriales</i>	0.19	0.22	0.24	0.28	0.094	0.884	NS
<i>Armatimonadetes</i>							
<i>Chthonomonadales</i>	0.35 ^a	0.67 ^b	0.25 ^a	0.25 ^a	0.097	0.010	NS
<i>Bacteroidetes</i>							
<i>Bacteroidales</i>	15.86	13.02	14.73	13.78	3.777	0.937	NS
<i>Cytophagales</i>	0.35	0.39	0.26	0.39	0.074	0.451	NS
<i>Flavobacteriales</i>	0.41	0.33	0.36	0.23	0.121	0.700	NS
<i>Sphingobacteriales</i>	0.23 ^{ab}	0.28 ^b	0.24 ^b	0.15 ^a	0.028	0.027	Q ²
<i>Euryarchaeota</i>							
<i>Methanobacteriales</i>	2.61	6.24	6.62	2.24	1.762	0.114	Q ²
<i>Firmicutes</i>							
<i>Bacillales</i>	0.42	0.61	0.58	0.40	0.156	0.542	NS
<i>Clostridiales</i>	54.63	53.18	52.17	42.70	6.141	0.406	NS
<i>Erysipelotrichales</i>	2.31	1.37	0.87	2.76	0.796	0.226	NS
<i>Lactobacillales</i>	10.36 ^a	4.78 ^a	5.93 ^a	23.01 ^b	4.455	0.024	Q ²
<i>Selenomonadales</i>	8.99	5.84	7.14	10.58	4.612	0.847	NS
<i>Proteobacteria</i>							
<i>Aeromonadales</i>	0.332	0.271	0.837	0.453	0.261	0.334	NS
<i>Spirochaetes</i>							
<i>Spirochaetales</i>	1.36	10.94	7.30	1.33	3.234	0.133	NS
<i>Verrucomicrobia</i>							
<i>Verrucomicrobiales</i>	0.00	0.02	0.85	0.03	0.407	0.590	NS

376 ¹ Different letters in the line indicate a significant difference between means by the SNK test (P<0.05).

377 ²Q: Quadratic Polynomial Regression: *Sphingobacteriales*: $Y = 0.2346 + 0.0000750 * AMBE(mg/kg) - 5.9057E -$
 378 $8 * AMBE (mg/kg)^2$; $R^2 = 0.576$, $P < 0.014$. *Methanobacterial*: $Y = 2.745 + 0.008436 * AMBE (mg/kg) -$
 379 $0.00000436 * AMBE(mg/kg)^2$; $R^2 = 0.462$, $P < 0.045$. *Lactobacillales*: $Y = 10.20 - 0.01544 * AMBE (mg/kg) +$
 380 $0.00001094 * AMBE (mg/kg)^2$; $R^2 = 0.632$, $P < 0.007$.

381

382 At the genus level (Table 8), the effect of the treatments on the abundance of
 383 *Streptococcus*, within the order *Lactobacillales*, was evident, with a quadratic effect on
 384 the AMBE levels (P<0.001), with the 2000 mg/kg level showing a percentage greater
 385 than that of other treatments.

386

387

388 **Table 8** - Predominant genera of Bacteria (expressed as % of abundance) present in
 389 the feces of pigs fed diets with 0, 500, 1000 or 2000 mg/kg *Acacia mearnsii* bark
 390 extract.

¹ Different letters in the line indicate a significant difference between means by the SNK test (P<0.05)

Phylum/genus	<i>Acacia mearnsii</i> bark extract inclusion (mg/kg)				SEM	P	Regression
	0	500	1000	2000			
<i>Actinobacteria</i>							
<i>Olsenella</i>	0.02	0.01	0.03	0.03	0.012	0.489	NS
<i>Bacteroidetes</i>							
<i>Alloprevotella</i>	1.23	0.85	1.73	0.38	0.441	0.169	NS
<i>Barnesiella</i>	4.67	3.83	4.00	4.37	1.215	0.929	NS
<i>Prevotella</i>	4.99	4.22	4.07	4.37	1.805	0.966	NS
<i>Rikenella</i>	0.51	0.48	1.34	2.50	1.120	0.559	NS
<i>Euryarchaeota</i>							
<i>Methanobrevibacter</i>	2.70	6.94	7.26	2.38	1.896	0.106	NS
<i>Methanosphaera</i>	0.12	0.03	0.09	0.01	0.069	0.632	NS
<i>Firmicutes</i>							
<i>Acidaminobacter</i>	0.80	0.87	0.92	0.37	0.500	0.783	NS
<i>Anaerovorax</i>	2.62	2.46	3.65	1.37	0.931	0.241	NS
<i>Blautia</i>	2.15	1.85	1.36	2.39	0.620	0.420	NS
<i>Clostridium_III</i>	1.54	1.96	1.52	1.13	0.330	0.301	NS
<i>Clostridium_IV</i>	1.32	1.29	1.34	1.05	0.345	0.702	NS
<i>Clostridium_sensu_stricto</i>	8.27	4.63	5.14	6.77	1.798	0.287	NS
<i>Clostridium_XIVa</i>	4.64	3.78	5.33	4.42	1.123	0.648	NS
<i>Clostridium_XIVb</i>	0.51	2.19	2.39	0.47	1.214	0.422	NS
<i>Eubacterium</i>	3.20	3.63	3.08	2.16	0.581	0.305	NS
<i>Intestinimonas</i>	1.70	1.31	1.90	1.31	0.517	0.696	NS
<i>Lachnoanaerobaculum</i>	0.02	0.01	0.02	0.01	0.006	0.280	NS
<i>Lachnospiracea incertae sedis</i>	2.30	1.63	2.45	1.80	0.635	0.580	NS
<i>Lactobacillus</i>	3.20	1.84	1.11	1.72	1.478	0.670	NS
<i>Oscillibacter</i>	2.59	2.76	2.39	2.02	0.499	0.606	NS
<i>Papillibacter</i>	0.93	1.46	1.01	0.65	0.270	0.123	NS
<i>Phascolarctobacterium</i>	1.21	0.68	1.14	0.85	0.369	0.576	NS
<i>Pseudobacteroides</i>	4.58	4.82	4.15	2.73	0.935	0.321	NS
<i>Ruminococcus</i>	4.10	3.39	3.46	2.89	1.028	0.789	NS
<i>Streptococcus</i>	7.93 ^a	3.27 ^a	5.28 ^a	22.33 ^b	3.354	0.004	Q ²
<i>Turcibacter</i>	1.82	1.03	0.51	2.14	0.899	0.397	NS
<i>Proteobacteria</i>							
<i>Escherichia/Shigella</i>	0.39	0.01	0.02	0.01	0.130	0.397	NS
<i>Spirochaetes</i>							
<i>Treponema</i>	1.49	12.17	8.00	1.41	3.555	0.128	NS

² Q: Quadratic Polynomial Regression: *Streptococcus*: $Y = 7.723 - 0.01284 \cdot \text{AMBE}(\text{mg/kg}) + 0.00001009 \cdot \text{AMBE}(\text{mg/kg})^2$; $R^2 = 0.756$, $P < 0.0009$.

392

393

394

395

396

397

398 Discussion

399

400 Tannins have an important impact on animal nutrition because of their ability to
401 form complexes with numerous types of molecules, including carbohydrates, proteins,
402 polysaccharides, bacterial cell membranes, and enzymes involved in the digestion of
403 protein and carbohydrates in feeds (Castejon, 2014). In pig feeding, a still small
404 number of experiments with the inclusion of tannins, especially hydrolysable, were
405 reported; and the vast majority of these were made with sorghum. There are no
406 published works that tested *Acacia mearnsii* extract in pigs, only some publications
407 with other acacia varieties, mainly with *Acacia tortillis* leaves (Khanyile *et al.*, 2020;
408 Khanyile *et al.*, 2014; Halimani *et al.*, 2005). Other ingredients rich in tannins and
409 polyphenols have also been tested in recent years, such as components of oak species
410 (*Quercus pubescens*, *Q. ilex* L., *Q. pubescens* Willd. and *Q. suber* L. (Cappai *et al.*,
411 2010; Cappai *et al.*, 2013), chestnuts (Liu *et al.*, 2020; Galassi *et al.*, 2019), grape
412 pomace (Yan *et al.*, 2011) and some variety of beans (White *et al.*, 2015).

413 Brus *et al.* (2013b), with pigs from 30 to 120 kg of body weight, used diets without
414 or with 0.2% of chestnut and oak tannins, finding better results in animal performance
415 and in the measurements of histology of the intestinal mucosa. The dietary inclusion
416 of 10 to 30% of condensed tannins in the form of acacia leaf flours (*A. karroo* and *A.*
417 *nilotica*) resulted in a greater weight gain and dry matter digestibility in pigs weighting
418 30-40 kg and induced an increased production of proline-rich proteins in the parotid
419 salivary glands of animals (Halimani *et al.*, 2005). Khanyile *et al.* (2014) tested
420 incorporation of 0, 50, 100 and 150, 200 and 250 g / kg of *Acacia tortillis* leaf meal in
421 the diets of pigs with 30 kg body weight, and demonstrated that the best values for
422 weight gain, feed intake and feed conversion were achieved at 100 and 150g/kg
423 inclusion. The authors further stated that the differences in the average daily gain of
424 each phase, as observed in the present study, can be attributed to the fact that, as the
425 animals grow, their ability to use the product offered increases with continuous
426 exposure. In phase 3, yet not statistically significant, better feed conversion values
427 were found in animals that received diets that contained AMBE, suggesting that the
428 ability of growing pigs to digest foods with tannin improves with age and previous
429 exposition, corroborating other studies that used some type of condensed tannin in the
430 diet of pigs (Hlatini *et al.*, 2016; Halimani *et al.*, 2007; Reed *et al.*, 1882).

431 The bioactive characteristics of tannins can affect the palatability, digestibility, and
432 protein use of feeds (Reedy, 1985; Bindelle *et al.*, 2008; Ndou *et al.*, 2013a,b). The
433 ability to bind proteins and carbohydrates in monogastric animals is associated with
434 the antinutritional effects of tannins in reducing the palatability of the feed (Bee *et al.*,
435 2016b). In contrast to several published experiments, in the current study, there was
436 no consumption limitation with the inclusion of AMBE in the diet, and these results can
437 be attributed to the quality and dosage of the extract offered, and to the evidence of
438 pigs developing coping mechanisms against diets containing tannins and high fiber
439 (Nyachoti *et al.*, 2004; Cappai *et al.*, 2010, Cappai *et al.*, 2013). An increase in the
440 concentration of proline in the parotid glands of animals treated with tannins from
441 acorns (*Quercus pubescens Willd*) led to the release of greater amounts of the tannin-
442 protein complex in saliva (Cappai *et al.*, 2013). Condensed tannins, or
443 proanthocyanidins, have a high affinity for the proline-rich protein, and the strength of
444 the interaction depends on the nature of the protein and molecule (Caprarulo *et al.*,
445 2021). An animal's ability to tolerate the anti-nutritional effects of hydrolysable or
446 condensed tannins is therefore an essential defense mechanism that ensures its
447 beneficial nutritional and extra-nutritional effects (Candek Potokar *et al.*, 2015).

448 Studies have demonstrated conflicting results when tannins were evaluated for
449 amino acid and protein digestibility (Galassi *et al.*, 2019). The ability of tannins to bind
450 proteins is not necessarily negative. In fact, the formation of a tannin protein complex
451 in the digestive tract can protect proteins, carbohydrates, and lipids from oxidative
452 damage during digestion (Cappai *et al.*, 2013). In general, digestibility is a key factor in
453 determining the effect of tannins at the gastrointestinal level. Thus, the biodegradation
454 and absorption of hydrolysable tannins along the gastrointestinal tract has been
455 investigated by several studies, while destination and absorption of condensed tannins
456 appear to be more complex due to their structural complexity (Mueller-Harvey, 2006).
457 As reported by Reggi *et al.* (2020), the antimicrobial and antioxidant activity of
458 hydrolysable and condensed tannins was reduced after *in vitro* digestion, which may
459 be due to lower bioavailability or excessive degradation of antimicrobial and antioxidant
460 molecules. The authors, however, reported a beneficial effect on *in vitro* digested
461 tannins when administered to experimentally damaged porcine intestinal cells,
462 suggesting that a trophic effect on the intestinal epithelium occurred. The bioavailability
463 of tannins after oral supplementation plays a crucial role and must be considered, and
464 their mechanisms of action and the understanding of the mechanisms for the

465 degradation of molecules must be deeply investigated at the intestinal level (Caprarulo
466 *et al.*, 2021).

467 Bahelka *et al.*, (2021), using a diet supplemented with 1%, 2%, 3%, and 4%
468 chestnut extract, containing 75% tannins, also reported that the carcass quality of the
469 animals was not affected by the supplementation. However, although there is no
470 significant difference, the authors address that the values of meat yield on the carcass
471 and backfat thickness were higher in treatments including the extract in the diet. Since
472 other carcass traits did not result in significant differences between tannin-
473 supplemented pigs and control pigs, it can be summarized that dietary tannin
474 administration did not have an adverse impact on carcass quality. No significant effect
475 of tannins on carcass value has been reported in other studies using higher
476 concentrations (1.5, 3%) of chestnut tannins in the diets and for a longer period of
477 supplementation (Bee *et al.*, 2016; Galassi *et al.*, 2019).

478 Hanczakowska *et al.*, (2017) tested the inclusion of 500 and 1000 mg/kg of hop
479 extract, which is also rich in tannins, in the diet of pigs from 60 to 120 kg and found
480 significant improvement ($P < 0.01$) in the oxidative stability of meat, in comparison to
481 the control group. The highest dose of the extract showed the best results. There was
482 no significant difference in the water retention capacity of the meat. The authors also
483 reported greater color stability and lower yellow saturation in meat samples from pigs
484 fed the supplements than in controls. These results are in line with the data from the
485 current study, the greater inclusion of AMBE in the diet, results in lower concentration
486 of MDA/kg of sample, lower lipid oxidation and, consequently, higher meat quality.
487 There was also the same behavior for meat coloring. Plants and plant extracts are a
488 rich source of polyphenols, which exhibit a wide range of physiological properties
489 (Balasundram *et al.* 2006), such as the potent antioxidant activity. This activity
490 maintains meat color, likely preventing the conversion of myoglobin to metmyoglobin
491 (Faustman and Cassens 1990). According to Wood *et al.*, (1999), an antioxidant
492 supplement in pig feed can improve the fatty acid profile of meat and prevent oxidative
493 changes that occur during storage and cooking. The AMBE reduced the lipid oxidation
494 process, which is confirmed by a significantly lower level of TBA, inferring that its use
495 is a good alternative to maintain the quality of meat, which may increase its shelf-life.

496 Another result that can be explained by the antioxidant capacity of the extract used
497 in this study is the shear strength or tenderness of the meat, which improved according

498 to the inclusion of AMBE in the diet. The highest inclusion of AMBE resulted in the
499 lowest values in the shear force. According to the desired standards for several
500 attributes related to the technological and sensory quality of pork, defined by the
501 National Research Council (2012), meats of higher quality and tenderness have a
502 shear force of less than 3.2 kg. The inclusion of 2000 mg/kg AMBE resulted in 3.26 kg
503 shear force. This value can be affected by many factors, including pre- and post-
504 slaughter management, sarcomere length, age, race, muscle type, and cooking
505 handling (Abdullah and Qudsieh, 2009). Connective tissue is a dynamic network of
506 molecules secreted by fibroblasts, and their cross-linking contributes to the underlying
507 hardness of meat (Purslow, 2005). Several studies with different animal species tested
508 the dietary inclusion of grape pomace extract, which, similar to AMBE, is rich in
509 phenolic compounds, and showed an antioxidant effect on chicken meat (Chamorro *et*
510 *al.*, 2015), pigs (Bertol *et al.*, 2017) and sheep (Martins Flores *et al.*, 2019). Rezar *et al.*,
511 (2017) reported that the inclusion of 1, 2 and 3% of chestnut bark, rich in hydrolysable
512 tannins, promoted an improvement in the tenderness of the meat of growing pigs.

513 The inclusion of AMBE promoted, in general, a trend towards greater diversity in
514 the microbiome of animals. Different microbiome compositions exert important
515 functions that help the host, alter the metabolic profile of the energy muscle, promote
516 the efficient use of fibers, play a fundamental role in the maintenance of the host
517 physiological homeostasis, promote the development of the immune system, directly
518 impact intestinal health and regulate metabolism (Vigors *et al.*, 2020). The profile and
519 diversity of the microbiome can influence the establishment of diseases (Han *et al.*,
520 2017) and the bacterial composition of the intestine (Hou *et al.*, 2015), directly favoring
521 the maintenance of intestinal cells, and impacting metabolism, absorption and
522 digestibility of nutrients. *Firmicutes* and *Bacteroidetes* are the most prevalent phyla in
523 the intestinal microbiome in pigs and can be modified by diet, host health status, use
524 of growth promoters, antimicrobials, and additives (Souza Daniel, 2018).

525 An important gut aspect is how tannins modulate the gut microbiome. High doses
526 of the combination of hydrolysable and condensed tannins (3%) have been shown to
527 modulate the intestinal microbiome of growing pigs (Tretola *et al.*, 2019). In another
528 study (Reggi *et al.*, 2020), alpha diversity analysis revealed that the bacterial
529 community index and operational taxonomic units and phylogenetic diversity of the pig
530 microbiome decreased with supplementation. However, they increased the genus
531 *Oscillospira* of the *Ruminococcace* family and reduced the order *Lactobacillales*,

532 families *Streptococcaceae* e *Veillonellaceae*. The AMBE were able to modulate some
533 bacterial genera and families considered beneficial in preventing intestinal
534 inflammation, along with other families that tend to be harmful to intestinal integrity and
535 health. However, the order *Lactobacillales* was reduced by the supplementation of
536 condensed and hydrolysable tannins, differently from the present work, where the
537 abundance of *Lactobacillales* was significantly higher with the supplementation of 2000
538 mg/kg of AMBE. In the study by Choy *et al.* (2014), the addition of 1% condensed grape
539 seed tannins positively affected the fecal microbiome of finishing pigs, with a greater
540 abundance of *Lactobacilli* and *Ruminococcaceae*. The in vitro and in vivo results
541 highlighted the promising effects of tannins on different types of bacteria, such as the
542 species *Salmonella typhimurium*, the genus *Oscillospira* and the families
543 *Streptococcaceae* and *Veillonellaceae*. In addition to its effectiveness on numerous
544 bacteria, both gram-positive and gram-negative, there is a lack of studies on the
545 intestinal ecology of growing and finishing pigs. The inclusion of 2000 mg/kg of AMBE
546 promoted a very significant increase in the frequency of *Streptococcus*, and certain
547 species of bacteria are known for their probiotic properties and protective factors
548 against potentially pathogenic microorganisms (Souza Daniel, 2018).

549 The addition of AMBE in the diet of pigs in the growing and finishing phases can
550 be viable without harming the performance of the animals. Although there is no
551 significant difference in animal performance, the AMBE, rich in tannin, shows up
552 promisingly in animal nutrition, showing benefits on the oxidative quality and
553 tenderness of meat. In the fecal microbiome, there was a more evident effect of the
554 level of 2000 mg/kg of AMBE in diet, leading to a greater predominance of the phylum
555 *Firmicutes*, due to the proportional increase in the order *Lactobacillales*. More studies
556 can be carried out in order to determine the optimal level of inclusion of tannins in the
557 pig diet.

558

559

560

561

562

563

564

565 **References**

- 566 Abdullah, Yusuf & Qudsieh, Rasha. 2009. Effect of slaughter weight and aging time on
567 the quality of meat from Awassi ram lambs. *Meat science*, 82:309-16.
568 10.1016/j.meatsci.2009.01.027.
- 569 Bahelka, I.; Buřcko, O.; Fl'ak, P. 2021. Can Hydrolysable Tannins in Diet of Entire Male
570 Pigs Affect Carcass, Pork Quality Traits, Amino and Fatty Acid Profiles, and Boar Taint,
571 Skatole and Androstenone Levels?. *Animals*, 11:896.
572 <https://doi.org/10.3390/ani11030896>
- 573 Balasundram N., Sundram K., Samman S. (2006): Phenolic compounds in plants and
574 agri-industrial by-products: antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food*
575 *Chemistry*, 99:191–203.
- 576 Bee, G., 2015. Hydrolysable tannin fed to entire male pigs affects intestinal production,
577 tissue deposition and hepatic clearance of skatole. *Veterinary Journal*, 204:162–167.
- 578 Bee, G.; Thanner, S.; Marion, G.; Gutzwiller, A. 2016. Supplementation of chestnut
579 tannins in artificially infected weaned piglets. *Journal of Animal Science*, 94: 485–486.
- 580 Bee, G.; Silacci, P.; Ampuero-Kragten, S.; Č Andek-Potokar, M.; Wealleans, A.L.;
581 Litten-Brown, J.; Salminen, J.-P.; Mueller-Harvey, I. 2016b. Hydrolysable tannin-based
582 diet rich gallotannins has a minimal impact on pig performance but significantly reduces
583 salivary and bulbourethral gland size. *Animal*, 11:1–9.
- 584 Bertol, T.M., Ludke, J.V., Campos, R.M.L.D., Kawski, V.L., Cunha Junior, A.,
585 Figueiredo, E.A.P.D., 2017. Inclusion of grape pomace in the diet of pigs on pork
586 quality and oxidative stability of omega-3 enriched fat. *Ciência Rural*, 47.
587 doi:10.1590/0103-8478cr20150358
- 588 Bertol, T.M., Oliveira, E.A., Santos Filho, J.I. 2019. Composição e aspectos de
589 qualidade da carne suína, in: Bernardi, D.M., Freitas, E.S., Oliveira, A., Santos Filho,
590 J.I., Silva, S.Z., Bertol, T.M., Sgarbieri, V.C., *Estratégias nutricionais para melhoria da*
591 *qualidade da carne suína*. E-Publishing Inc., Brasília, pp. 11–38.
- 592 Bindelle, J., Leterme, P., Buldgen, A. 2008. Nutritional and environmental
593 consequences of dietary fibre in pig nutrition: review. *Biotechnology Agronomics*
594 *Soc.* 12:69–80.
- 595 Bridi, A. M.; Silva, C. A. 2007. Métodos de avaliação da carcaça e da carne suína.
596 Midiograf, Londrina, PR.
- 597 Brus, M.; Dolinšek, J.; Cencič, A.; Škorjanc, D. 2013. Effect of chestnut (*Castanea*
598 *sativa* Mill.) wood tannins and organic acids on growth performance and faecal

- 599 microbiota of pigs from 23 to 127 days of age. *Bulgarian Journal of Agricultural*
600 *Science*, 19 (4): 841-847.
- 601 Brus, M.; Bavdek, S. V.; Skok, J; Škorjanc, D. 2013b. Impact of supplementing pig diet
602 with tannins on histological characteristics of small intestine and growth performance
603 of fattening pigs. *Acta argiculturae Slovenica*, Supplement 4:135–138.
- 604 Caldeira, M. V. W. *et al.* 1998. Quantificação de tanino em três povoamentos de *Acacia*
605 *mearnsii* De Wild. *Boletim de Pesquisa Florestal*, Colombo, 37:81-88.
- 606 Candek-Potokar, M., *et al.* 2010. QIIME allows analysis of high-throughput community
607 sequencing data. *Nature Methods*, 7:335-336.
- 608 Cappai, M.G., Wolf, P., Pinna, W., Kamphues, J. 2013. Pigs use endogenous proline
609 to cope with acorn (*quercus pubescens* willd.) combined diets high in hydrolysable
610 tannins. *Livestock Science*;155(2-3):316-322.
- 611 Cappai, M.G., Wolf,P., Grosse-Liesner,V., Kastner,A., Nieddu,G., Pinna,W.,
612 Kamphues,J. 2010. Effect of whole acorns (*Quercuspubescens*) shred based diet on
613 parotid gland in growing pigs in relation to tannins. *Livestock Science*,134:183–186.
- 614 Caprarulo, V., Giromini, C., Rossi, L. 2021. Review: Chestnut and quebracho tannins
615 in pig nutrition: the effects on performance and intestinal health. *Animal*, 15(1).
616 <https://doi.org/10.1016/j.animal.2020.100064>.
- 617 Castejon, F.V., Moreira, J.S., Stringhini, J.H. 2014. Taninos na alimentação de
618 monogástricos. *Revista Produção Animal-Avicultura*.
- 619 Chamorro, S., Viveros, A., Rebolé, A., Rica, B.D., Arija, I., Brenes, A. 2015. Influence
620 of dietary enzyme addition on polyphenol utilization and meat lipid oxidation of chicks
621 fed grape pomace. *Food Research International*, 73:197-203.
622 <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.11.054>.
- 623 Choy, Y.Y., Quiferrada, P. *et al.* 2014. Phenolic metabolites and substantial
624 microbiome changes in pig feces by ingesting grape seed proanthocyanidins. *Food*
625 *Function*, 5(9):2298.
- 626 Costa, E.I.D.S., Ribeiro, C.V.D.M., Silva, T.M., Batista, A.S.M., Vieira, J.F., Barbosa,
627 A.M., Da Silva Júnior, J.M., Bezerra, L.R., Pereira, E.S., Oliveira, R.L., 2021. Effect of
628 dietary condensed tannins inclusion from *Acacia mearnsii* extract on the growth
629 performance, carcass traits and meat quality of lambs. *Livestock Science*, 253:104717.
630 <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2021.104717>
- 631 De Santis, T.Z., *et al.* 2006. Greengenes, a chimera-checked 16s rRNA gene database

- 632 and workbench compatible with ARB. *Applied and Environmental Microbiology*
633 *Journal*, 72: 5069-5072. doi: <https://doi.org/10.1128/AEM.03006-05>
- 634 Faustman, C. & Cassens, R. G. 1990. The biochemical basis for discoloration in fresh
635 meat: a review. *Journal of Muscle Foods*, 1:217-243.
- 636 Foelkel, C. 2008. Os eucaliptos e as leguminosas: Parte 01: *Acacia mearnsii*.
637 *Eucalyptusonline Book & Newsletter*.
- 638 Galassi, G.; Mason, F.; Rapetti, L.; Crovetto, G.M.; Spanghero, M. 2019. Digestibility
639 and metabolic utilisation of diets containing chestnut tannins and their effects on growth
640 and slaughter traits of heavy pigs. *Italian Journal Animal Science*, 18:, 746–753.
- 641 Halimani, T. E.; Ndlovu, L. R.; Dzama, K.; Chimonyo, M.; Miller, B. G. 2005. Metabolic
642 response of pigs supplemented with incremental levels of leguminous *Acacia karroo*,
643 *Acacia nilotica* and *Colophospermum mopane* leaf meals. *Animal Science*, 81: 39-45.
- 644 Halimani, T.E., Ndlovu,L.R., Dzama,K., Chimonyo,M., Miller,B.G. 2007. Growth
645 performance of pigs fed on diets containing *Acacia karroo*, *Acacia nilotica* and
646 *Colophospermum mopane* leaf meals. *Livestock Research for Rural Development*,
647 19:187.<http://www.lrrd.org/lrrd19/12/hali19187>.
- 648 Han, G.G., Lee, J.-Y., Jin, G.-D., Park, J., Choi, Y.H., Chae, B.J., Kim, E.B., Choi, Y.-
649 J., 2017. Evaluating the association between body weight and the intestinal microbiota
650 of weaned piglets via 16S rRNA sequencing. *Applied Microbiology and Biotechnology*,
651 101: 5903–5911. doi:10.1007/s00253-017-8304-7.
- 652 Hanczakowska E., Świątkiewicz M., Grela E.R. 2017: Effect of dietary supplement of
653 herbal extract from hop (*Humulus lupulus*) on pig performance and meat quality. *Czech*
654 *Journal of Animal Science*, 62: 287-295. <https://doi.org/10.17221/49/2016-CJAS>.
- 655 Hlatini VA, Khanyile M, Zindove TJ, Chimonyo M. 2016. Feed intake and growth
656 performance of growing pigs fed on *Acacia tortilis* leaf meal treated with polyethylene
657 glycol. *Tropical Animal Health and Production*, 48(3):585-91. doi: 10.1007/s11250-
658 016-1002-0.
- 659 Hou C, Liu H, Zhang J, Zhang S, Yang F, Zeng X, Thacker PA, Zhang G, Qiao S. 2015.
660 Intestinal microbiota succession and immunomodulatory consequences after
661 introduction of *Lactobacillus reuteri* I5007 in neonatal piglets. *PLoS One*, 10:e0119505.
662 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0119505>.
- 663 Huang, Q.; Liu, X.; Zhao, G.; Hu, T.; Wang, Y. 2018. Potential and challenges of tannins
664 as an alternative to in-feed antibiotics for farm animal production. *Animal Nutrition*, 4:
665 137-150, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2017.09.004>.

- 666 Khanyile, M., Mapiye, C., Thabethe, F., Ncobela, C.N., Chimonyo, M., 2020. Growth
667 performance, carcass characteristics and fatty acid composition of finishing pigs fed
668 on graded levels of *Vachellia tortilis* leaf meal. *Livestock Science*, 241:104259.
669 doi:10.1016/j.livsci.2020.104259
- 670 Khanyile, M., Ndou, S.P., Chimonyo, M., 2014. Influence of *Acacia tortilis* leaf meal-
671 based diets on growth performance of pigs. *Livestock Science*, 167:211–218.
672 doi:10.1016/j.livsci.2014.04.016
- 673 Lipiński, H., Mazur, M., Antoszkiewicz, Z., Purwin, C. 2017. Polyphenols in
674 monogastric nutrition – a review. *Animal Science*, 17(1): 41–58.
675 <https://doi.org/10.1515/aoas-2016-0042>.
- 676 Liu, X., Kim, S.H., Kim, I.H., 2020. Effects of the combination of multistrain probiotics
677 and *Castanea crenata* shell extract on growth performance, nutrient digestibility, fecal
678 microbial shedding, meat quality, noxious gas emissions, and blood parameters in
679 finishing pigs. *Livestock Science*, 240:104185. doi:10.1016/j.livsci.2020.104185
- 680 Martins Flores, D.R., Fonseca, P.A., Nörnberg, J.L. 2019. Effect of grape pomace
681 inclusion on the production and quality of sheep meat. *Trends in Applied Sciences*
682 *Research*, 14: 226-232. 10.3923/tasr.2019.226.232
- 683 Mueller-Harvey, I. 2006. Unravelling the conundrum of tannins in animal nutrition and
684 health. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86(13):1097-0010.
685 <https://doi.org/10.1002/jsfa.2577>
- 686 Myers, W.D., *et al.* 2004. Thecnical Note: a procedure for the preparation and
687 quantitative analysis of samples for titanium dioxide. *Journal of Animal Science*, v.82,
688 n.1, p.179-183. DOI: 10.2527/2004.821179x
- 689 National Research Council. 2012. Nutrient requirements of swine. 11th rev. ed.
690 Washington, DC: National Academy Press, 400 p.
- 691 Ndou, S.P., Gous, R.M., Chimonyo, M. 2013. Prediction of scaled feed intake in
692 weaner pigs using physico chemical properties of fibrous diets. *British Journal of*
693 *Nutrition*,110:774–780. <https://doi.org/10.1017/S0007114512005624>
- 694 Ndou, S.P., Bakare, A.G., Chimonyo, M. 2013b. Prediction of voluntary feed intake from
695 physico chemical properties of bulky feeds in finishing pigs. *Livestock*
696 *Science*,155:277–284. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2013.04.012>
- 697 NRC. 2012. Nutrient requirements of swine. 11th Ed. National Academies Press,
698 Washington DC. 400 p.

- 699 Nyachoti, C.M., Zijlstra, R.T., deLange, C.F.M., Patience, J.F. 2004. Voluntary feed
700 intake in growing-finishing pigs: a review of the main determining factors and potential
701 approaches for accurate predictions. *Canadian Journal Animal Science*, 84:549–566.
702 <https://doi.org/10.4141/A04-001>
- 703 AOAC, 1995. Official methods of analysis of the Association of Official Analytical
704 Chemists. 16.ed. Washington, DC:
- 705 Passaretti, T., Guarnieri, A. P., Filipini, R., Alves, B. da C. A., & Fonseca, F. L. A. 2016.
706 Effective use of *Barbatiman* (*Stryphnodendron barbatiman*) in the healing process of
707 lesions: a literature review. *ABCS Health Sciences*, 41(1).
708 <https://doi.org/10.7322/abcshs.v41i1.846>
- 709 Purslow, P.P. 2005. Intramuscular connective tissue and its role in meat quality. *Meat*
710 *Science*, 70(3):435-47. doi: 10.1016/j.meatsci.2004.06.028. PMID: 22063743.
- 711 Reddy, N.R., Pierson, M.D., Sathe, S.K., Salunkhe, D.K. 1985. Dry bean tannins: a
712 review of nutritional implications. *Journal of the American Oil Chemist's Society*,
713 62(3):541-549. <https://doi.org/10.1007/BF02542329>
- 714 Reed, J.D., McDowell, R.E., VanSoest, P.J., Horvath, P.J. 1982. Condensed tannins:
715 a factor limiting the use of cassava forage. *Journal of the Science of Food and*
716 *Agriculture*, 33:213–220. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740330302>
- 717 Reggi, S., Giromini, C., Dell'Anno, M., Baldi, A., Rebutti, R., Rossi, L., 2020. In vitro
718 digestion of chestnut and quebracho tannin extracts: antimicrobial effect, antioxidant
719 capacity and cytomodulatory activity in swine intestinal IPEC-J2 cells. *Animals* 10, 195.
- 720 Rezar, V., Salobir, J., Levart, A., Tomažin, U., Škrlep, M., Lukač, N.B., Čandek-
721 Potokar, M. 2017. Supplementing entire male pig diet with hydrolysable tannins: Effect
722 on carcass traits, meat quality and oxidative stability. *Meat Science*, 133: 95-102.
723 <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2017.06.012>.
- 724 Rodrigues, D.F., Mendes, F.F., Noronha Filho, A.D.F., Silva, J.A., Silva, L.A.F. 2013.
725 The bark extract of *Stryphnodendron adstringens* (martius) coville in skin wound
726 healing in animals. *Enciclopédia Biosfera*, 9(16):1584-1602
- 727 SAS Institute. 1999. SAS/STAT: user's guide. 11.ed. Cary: SAS Institute.
- 728 Seidavi, A., Belali, M., Elghandour, M.M.Y., Adegbeye, M.J., Salem, A.Z.M. 2020.
729 Potential impacts of dietary inclusion of green tea (*Camellia sinensis* L.) in poultry
730 feeding: a review. *Agroforest Systems*, 94:1161–1170. DOI: 10.1007/s10457-019-
731 00444-x
- 732 Souza Daniel, A.G. 2018. Diversidade microbiana intestinal de suínos saudáveis e

- 733 afetados por disenteria suína e enteropatia proliferativa. Tese (Doutorado). Programa
734 de Pós-graduação em Ciência Animal da Universidade Federal de Minas Gerais, 119p.
- 735 Tretola M, Luciano A, Ottoboni M, Baldi A, Pinotti L. 2019. Influence of Traditional vs
736 Alternative Dietary Carbohydrates Sources on the Large Intestinal Microbiota in Post-
737 Weaning Piglets. *Animals (Basel)*. 1;9(8):516. doi: 10.3390/ani9080516.
- 738 Veronese. 2011. A hora e a vez dos taninos condensados. *Revista Food Ingredients*
739 *Brasil*, nº 19.
- 740 Vigers, S., O' Doherty, J.V., Sweeney, T. 2020. Colonic microbiome profiles for
741 improved feed efficiency can be identified despite major effects of farm of origin and
742 contemporary group in pigs. *Animal*, 14(12): 2472-2480,
743 <https://doi.org/10.1017/S1751731120001500>.
- 744 Wang, Q., Garrity, G.M., Tiedje, J.M. and Cole, J.R. 2007. Naive Bayesian Classifier
745 for Rapid Assignment of rRNA Sequences into the New Bacterial Taxonomy. *Applied*
746 *and Environmental Microbiology*, 73: 5261-5267.
747 <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.00062-07>
- 748 Warreham, C.N.; Wiseman, J.; Cole, D.J.A. 1994. Processing and antinutritive factors
749 in feedstuffs. *Principles of pig sciences*. Nottingham, 427p
- 750 White, G.A., Smith, L.A., Houdijk, J.G.M., Homer, D., Kyriazakis, I., Wiseman, J., 2015.
751 Replacement of soya bean meal with peas and faba beans in growing/finishing pig
752 diets: Effect on performance, carcass composition and nutrient excretion. *Animal Feed*
753 *Science and Technology* 209:202–210. doi:10.1016/j.anifeedsci.2015.08.005.
- 754 Wood, J. D., Enser, M., Fisher, A. V., Nute, G. R., Richardson, R. I. & Sheard, P. R.
755 1999. Manipulating meat quality and composition. *Proceedings of the Nutrition Society*,
756 58:363- 370. DOI: 10.1017/s0029665199000488
- 757 Yan, L., Kim, I.H. 2011. Effect of dietary grape pomace fermented by *saccharomyces*
758 *boulardii* on the growth performance, nutrient digestibility and meat quality in finishing
759 pigs. *Asian-Australasian Journal Animal Science*; 24(12):2806e13. DOI:
760 10.5713/ajas.2011.11189
- 761 Yesilbag, D., Eren, M., Agel, H., Kovanlikaya, A., Balci, F. 2011. Effects of dietary
762 rosemary, rosemary volatile oil and vitamin E on broiler performance, meat quality and
763 serum SOD activity. *British Poultry Science*, 52: 472–482. DOI:
764 10.1080/00071668.2011.599026
- 765 Zeb A, Ullah F. 2016. A Simple Spectrophotometric Method for the Determination of

766 Thiobarbituric Acid Reactive Substances in Fried Fast Foods. *Journal of Analytical*
767 *Methods in Chemistry*. DOI: 10.1155/2016/9412767.

CAPÍTULO IV

Extrato de Acácia negra na dieta de frangos de corte em sistema orgânico de produção

Resumo: Taninos são polifenóis e contêm componentes bioativos que podem proporcionar uma série de benefícios para a saúde e desempenho dos animais e qualidade dos produtos de origem animal. O objetivo do trabalho foi avaliar os efeitos da suplementação da dieta com extrato de acácia negra sobre desempenho, qualidade da carne e morfologia intestinal de frangos de corte criados em sistema orgânico de produção. Foram testados 4 dietas, com diferentes níveis de inclusão de tanino: 0, 150, 300 e 450 mg/kg, utilizando 160 frangos da linhagem Label Rouge, mistos, de 35 à 63 dias de idade. Os animais foram alojados em quatro galinheiros móveis, cada um contendo 4 boxes (10 animais por box). Avaliou-se desempenho dos animais, qualidade da carne através do teste de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e coloração (L^* , a^* e b^*) de coxa e perna; e a morfohistologia das vilosidades intestinais. As aves que receberam 150mg kg⁻¹ de tanino na dieta resultaram em carnes com menor oxidação lipídica, ou seja, com maior qualidade. Quanto à coloração da carne, não houve diferença estatística entre os tratamentos, todavia, tratamentos com inclusão de tanino na dieta, apresentaram valores de luminosidade (L^*) maiores: 44,69 e 46,79 para perna e, 52,42 e 53,00 para coxa, nos tratamentos 0 e 450 mg/kg, respectivamente, demonstrando potencial do aditivo em relação à esta característica. Em relação à saúde intestinal dos animais, não houve diferença significativa entre as alturas e larguras de vilosidade dos intestinos ($P>0,05$). O uso de extrato de acácia negra como aditivo na dieta de frangos de corte não prejudica o desempenho dos animais, e apresenta resultados promissores em relação à oxidação lipídica e coloração da carne, além de possível melhora na absorção de nutrientes devido ao fato de auxiliar no desenvolvimento das vilosidades intestinais.

Palavras-chave: Desempenho, Morfologia intestinal, Qualidade de carne, oxidação lipídica, taninos condensados.

INTRODUÇÃO

A conscientização do consumidor, que busca cada vez mais alimentos saudáveis e em boas condições de produção, visando o bem-estar animal e conservação do ambiente, aumentaram a popularidade de sistemas alternativos de produção animal, como o orgânico e agroecológico. Aliado à outros fatores, isto fez com que aumentasse a popularidade dos suplementos naturais na produção animal, deslocando a atenção dos produtores para os suplementos à base de plantas (Lipiński, 2017), uma vez que o uso de antibióticos e promotores de crescimentos químicos são proibidos neste tipo de sistema produtivo. Consequentemente, pesquisadores estão procurando uma alternativa para melhorar o desempenho do frango e qualidade da carne (Seidavi *et al.*, 2020; Ncube *et al.*, 2018), otimizar a saúde intestinal (Abudabos *et al.*, 2016; Hafeez *et al.*, 2016; Kiczorowska *et al.*, 2017) e, desta forma, atender as demandas dos novos sistemas de produção. Entre as alternativas possíveis, aditivos fitogênicos apresentam efeitos positivos sobre saúde e produtividade em frangos (Gianennas *et al.*, 2018; Ahsan *et al.*, 2018; Khoobani *et al.*, 2019), relatando que seu uso pode desempenhar um papel significativo na saúde e desempenho das aves por estimulação do consumo de ração, secreção de enzimas endógenas, efeito antioxidante e antibacteriano.

A Acácia-negra (*Acacia mearnsii*) é uma espécie de leguminosa pertencente à família *Fabaceae*, originária da Austrália. A partir da sua casca, obtêm-se extratos ricos em tanantes e fenóis que originam os taninos, Alves *et al.*, (2017) relataram que o extrato de *Acacia mearnsii* contém 75% de polifenóis totais, sendo o tanino o principal grupo presente nestas plantas. Existem relatos também de que a casca da acácia apresenta boa quantidade de macronutrientes, como cálcio, potássio, fósforo e magnésio (Foelkel, 2008).

Taninos são componentes polifenólicos hidrossolúveis (Keshavarz *et al.*, 2017), que representam o quarto componente de maior concentração nas plantas, portanto, configuram-se como um extrato vegetal de ampla distribuição na natureza (Vieira *et al.*, 2020) e representam o grupo mais importante de polifenóis na nutrição animal (Warreham *et al.*, 1994). Historicamente, eles sempre foram vistos como fator antinutricional presente nos alimentos (Houshmand *et al.*, 2017; Tomaszewska *et al.*, 2018). No entanto, diversos estudos sobre a atividade dos taninos evidenciaram

importante ação antibacteriana e fungicida, ação sobre protozoários, modulação de microbiota intestinal (Petrolli *et al.*, 2019), reparação de tecidos e regulação enzimática e proteica, que ocorrem devido à sua complexação com íons metálicos, atividades antioxidantes e habilidade de complexar proteínas e polissacarídeos (Mello e Santos *et al.*, 2001). Devido à esses fatores, seu uso é considerado promissor na produção animal.

Ainda há poucos relatos da utilização de aditivos fitogênicos cujo princípio ativo sejam os taninos condensados, apesar do seu grande potencial de utilização já documentado. Com base nisso, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da suplementação da dieta com casca de acácia-negra sobre o desempenho, qualidade de carne e morfologia intestinal de frangos de corte em sistema orgânico de produção.

MATERIALS E MÉTODOS

Os procedimentos utilizados neste experimento atenderam a todos os princípios éticos e legais para experimentação animal, sendo aprovado na Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Maria.

Alojamento dos animais e preparo das dietas

O experimento de campo foi conduzido em granja comercial no município de Viamão, Rio Grande do Sul, Brasil (30° 06' 28.4"S 51° 03' 57.0"W). A granja possui registro e certificação de produto orgânico, estando vinculada à Associação Agroecológica do Rio Grande do Sul, seguindo todas as normas e instruções estabelecidas, fazendo com que o experimento respeite as legislações vigentes de produção de ovos orgânicos. O experimento não interferiu no sistema de produção da propriedade e nem descaracterizou o sistema orgânico.

Foram alojadas 160 aves de 35 dias de idade da linhagem Label Rouge, machos e fêmeas, durante o período de 28 dias. As aves foram adquiridas de um incubatório certificado, com 1 dia, e foram mantidas em galpão com controle de ventilação e luz, alojadas em um pinteiro circular com diâmetro de 3 metros, até completarem 35 dias de idade. Posteriormente, foram escolhidas aleatoriamente, pesadas e alojadas em quatro galinheiros móveis com quatro boxes cada um, onde cada box correspondia a um tratamento com 10 animais, sendo 5 machos e 5 fêmeas. Todos os boxes dos galinheiros possuíam comedouro e bebedouro. O espaço

disponibilizado para cada animal foi acima do recomendado, 375 cm² para cada ave, no protocolo de Bem-estar da União Brasileira de Avicultura e dentro do permitido no sistema de produção de ovos orgânicos, conforme a Instrução Normativa 17 da legislação brasileira (Brasil, 2003).

A dieta padrão foi formulada à base de milho e farelo de soja, de acordo com as recomendações da FEDNA (2018), isoprotéicas e isoenergéticas, atendendo as exigências nutricionais da linhagem conforme a idade (Tabela 1). O fornecimento de água e ração foi à vontade. Os tratamentos foram compostos a partir da dieta controle com a adição de 3 diferentes níveis de inclusão de extrato de acácia negra: 150, 300 e 450 mg/kg, respectivamente. As dietas foram analisadas quanto a sua energia bruta, proteína bruta, matéria seca, extrato etéreo e cinzas.

Tabela 1 – Composição em ingredientes da dieta crescimento, composição calculada e analisada (matéria natural*) dos nutrientes da dieta padrão para frangos de 35 a 63 dias.

Ingredientes	g/kg
Milho grão	705
Farelo de soja	255
Pó de rocha	2,5
Sal Comum	7,5
Núcleo ORG Brascorte**	30
Composição da dieta	Calculada (Analisada)
Energia Metabolizável (kcal/kg)	2950***
Proteína Bruta (%)	17,41 (16,28)
Cinzas (%)	6,89 (6,42)
Fibra Bruta (%)	2,35 (2,64)
Gordura Bruta (%)	3,17 (2,42)
Cálcio (%)	0,94
Fósforo disponível (%)	0,45

*Matéria seca analisada dieta 87,90%; **Níveis de garantia por kg de produto: Cálcio: 280 g; Fósforo: 115 g; Fluor (Max): 1100mg; Vitamina A: 333000 UI; Vitamina D3: 66000UI; Vitamina E: 500mg; Vitamina K3: 57mg; Vitamina B1: 60mg; Vitamina B2: 200mg; Vitamina B6: 84mg; Vitamina B12: 400mcg; Niacina: 1334mg; Ácido fólico: 36mg; Ácido pantotênico: 533mg; Colina: 16,7mg; Biotina: 2,7mg; Metionina: 60g; Manganês: 3334mg; Zinco: 2000mg; Ferro: 1670mg; Cobre: 334mg; Iodo: 20mg; Selênio: 11mg.***Energia bruta.

Procedimento experimental e análise das amostras

Avaliaram-se características de desempenho, qualidade de carne e morfologia intestinal dos animais.

Desempenho

As características de desempenho avaliadas foram: consumo de ração médio (g/ave), ganho de peso médio (g/ave), peso médio (g) e eficiência alimentar.

A pesagem dos animais foi realizada aos 35, 42, 49, 56 e 63 dias de idade dos animais. Nos mesmos dias também foram pesadas as ofertas e sobras de ração para calcular o consumo médio. O ganho de peso médio se deu através da subtração dos pesos inicial e final de cada animal. Ainda foi calculado o consumo de ração médio. A eficiência alimentar foi calculada dividindo o ganho de peso médio diário pelo consumo médio diário por ave ao final de cada semana.

Aos 63 dias de idade foram abatidos 32 aves, sendo 8 aves de cada tratamento. Foi realizado o abate comercial. Foram coletados: terço inicial do duodeno e a perna esquerda (coxa e sobre coxa) de cada ave.

Qualidade de carne

Para a avaliação de qualidade de carne foram avaliadas a coloração e oxidação lipídica das amostras. Foram utilizadas 8 amostras de coxa e perna dos animais de cada um dos tratamentos, sendo um macho e uma fêmea de cada um dos galinheiros.

As leituras de cor foram medidas usando um Colorímetro Konica Minolta CR-400, através dos valores do espaço de cor $L^*a^*b^*$, que é atualmente o mais popular dos espaços de cores uniformes usados, pois correlaciona consistentemente os valores de cor com a percepção visual. O L^* indica luminosidade, já a^* e b^* são coordenadas cromáticas, onde a^* é coordenada vermelho/verde (maior valor de a^* indica vermelho e menor indica verde), e b^* coordenada amarelo/azul (maior valor indica amarelo e menor indica azul). O instrumento foi calibrado antes de cada análise, e a medição da cor foi realizada em dois locais diferentes em cada amostra, uma na coxa e outra na perna.

A determinação da oxidação lipídica foi realizada segundo o método estabelecido por Zeb e Ullah (2016), com modificações. Essa análise visa a quantificação de malondialdeído (MDA) através da verificação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA). As amostras foram desossadas e moídas individualmente. A moagem foi feita com o auxílio de um processador. Foram pesadas

três gramas de cada uma das amostras e homogeneizadas em 15 ml de uma solução de 4mM de TBA em ácido acético glacial com 0,01 % BHT (Hidroxitolueno butilado). A amostra foi, então, colocada em um agitador por 60 minutos. Após, as mesmas foram filtradas e, em uma proporção de 1:1, foram misturadas com uma solução de 4 mM de TBA e colocado em banho maria quente (90 °C) por 60 minutos, utilizando 4 ml de amostra filtrada e 4 ml de solução. As amostras, então, foram resfriadas e mensuradas em um espectrofotômetro (Amersham Biosciences; Ultrospec 3100 pro) utilizando-se o comprimento de onda de 532 nm. Os testes de oxidação lipídica foram realizados em triplicata. Os resultados são apresentados em mg de MDA por kg de amostra. Para definir as mg de MDA presentes nas amostras, utilizou-se de uma curva padrão criada a partir de uma série diluída de soluções de MDA (malondialdeído). Para tal, foi feita uma reação de tetraetoxipropano (TEP -1 mM) com ácido acético glacial (100 mL) em banho maria quente (90 °C por 60 minutos). Depois, as diluições: 1 – 5ml solução TEP; 0,8 – 4 ml solução TEP + 1ml ácido acético; 0,6 - 3 ml solução TEP + 2ml ácido acético; 0,4 - 2 ml solução TEP + 3ml ácido acético; 0,2 - 1 ml solução TEP + 4 ml ácido acético; 0,1 – 0,5 ml solução TEP + 4,5 ml ácido acético; e 0 – 5 ml ácido acético.

Morfologia Intestinal

A avaliação da morfologia intestinal foi realizada através da coleta do primeiro terço do duodeno das aves para realização da análise morfo histológica das vilosidades intestinais. Após retirada do intestino, foi realizada coleta de fragmento (2cm), a qual foi fixada em formalina 10% por 24 horas e conservada em álcool 70% para avaliação das características morfo histológicas da mucosa intestinal (altura e largura das vilosidades). O processamento histológico das amostras ocorreu no Laboratório de Morfologia da Universidade Federal do Rio Grande (FURG) conforme procedimento rotineiro para preparação de lâminas histológicas, coradas com hematoxilina e eosina (HE), seguindo a metodologia de Prophet *et al.*(1992). Em cada lâmina confeccionada, foram medidos a altura e largura, em micra (μm), de 6 vilosidades. A altura foi medida do ápice à base de cada uma das seis vilosidades, e a largura foi obtida com as medidas do maior distância interna horizontal de cada uma das vilosidades, através da digitalização das amostras em objetiva de 20X, utilizando microscópio Olympus BX41 e posteriormente utilizando o Software analisador de

imagens Image G. Os resultados foram expressos em μm .

Delineamento experimental e análises estatísticas

O delineamento experimental foi em blocos casualizado, com 4 tratamentos (4 dietas experimentais) e 4 repetições por tratamento onde cada galinheiro móvel foi um bloco. Os resultados foram submetidos à análise de variância pelo procedimento GLM (SAS, 1999) e as médias diferentes significativamente foram comparadas pelo teste SNK à 5% de probabilidade. A análise de regressão foi testada onde a adição de tanino foi considerada variável regressora ($p < 0.05$).

RESULTADOS

O desempenho das aves durante o período experimental foi dentro do esperado para a linhagem. Não foram verificadas diferenças estatísticas entre os tratamentos (Tabela 2) no período total do experimento, ou seja, a inclusão de tanino na dieta das aves não prejudicou seu crescimento e desempenho ao longo do período experimental.

Tabela 2 - Ganho médio de peso, consumo médio de ração e eficiência de frangos de corte da linhagem Label Rouge, criados em sistema orgânico de produção, que receberam dietas com diferentes níveis de inclusão de extrato de acácia negra na dieta, dos 35 aos 63 dias.

Nível de inclusão do extrato	Ganho de peso médio (g)	Consumo ração (g)	Eficiência (g/g)
0 (control)	1194,38	3060,50	0,391
150 (mg/kg)	1119,35	3134,6	0,358
300 (mg/kg)	1167,95	3268,60	0,357
450 (mg/kg)	1192,75	3181,11	0,375
Probabilidades			
P	0,150	0,442	0,406
CV	3,98	5,55	8,38
SE	46,54	175,65	0,03

Não houve diferença no peso médio dos animais entre os tratamentos ao longo do experimento (Figura 1).

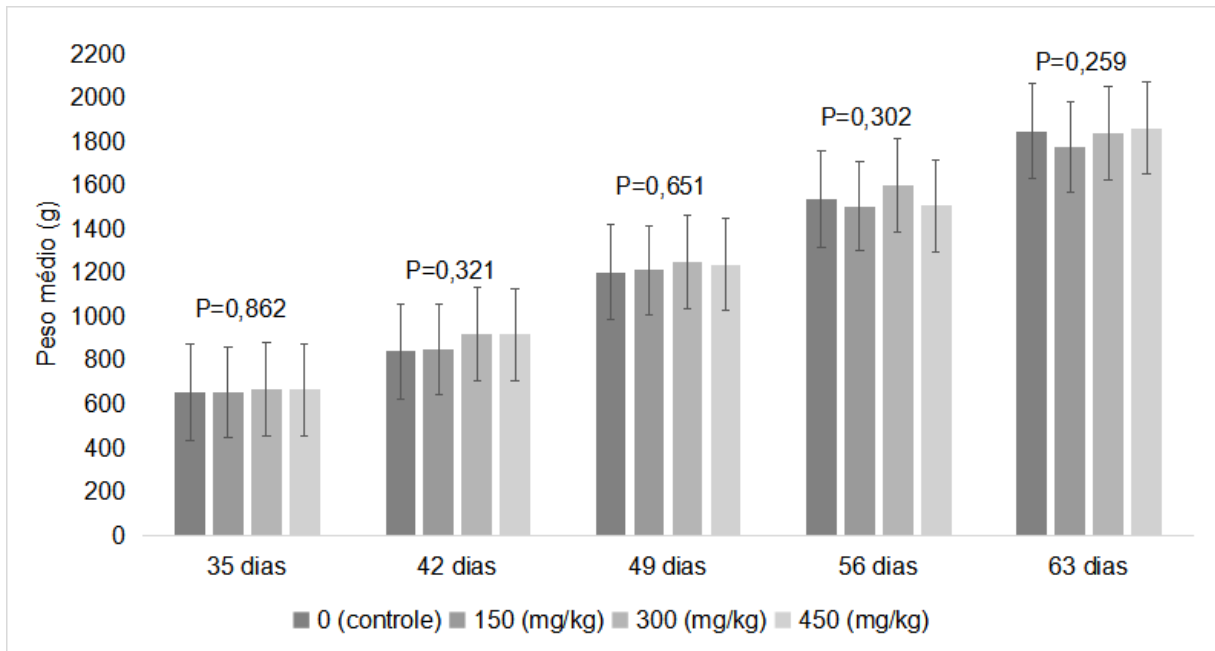


Figura 1 — Peso médio (g) de frangos de corte da linhagem Label Rouge, criados em sistema orgânico de produção, recebendo dietas com diferentes níveis de inclusão de extrato de acácia negra na dieta, dos 35 aos 63 dias de idade.

Na avaliação de desempenho semanal, houve diferença significativa ($P=0,058$) para consumo de ração na segunda semana (dias 42 a 49), onde os animais que receberam dietas com 300 mg/kg do extrato de acácia negra foram os que consumiram mais alimento (Tabela 3). Na análise de regressão da variável para esse período, encontrou-se efeito quadrático, como pode ser observado na Figura 2.

Tabela 3 - Desempenho semanal de frangos de corte da linhagem Label Rouge, criados em sistema orgânico de produção, que receberam dietas com diferentes níveis de inclusão de extrato de acácia negra na dieta.

Nível de inclusão	Ganho de peso médio (g)				Consumo de ração (g)				Eficiência (g/g)			
	d 35-42	d 42-49	d 49-56	d 56-63	d 35-42	d 42-49	d 49-56	d 56-63	d 35-42	d 42-49	d 49-56	d 56-63
0 (controle)	217,13	332,63	342,10	319,25	502,50	693,25 ^b	906,3	1003,38	0,436	0,479	0,377	0,319
150 (mg/kg)	194,60	362,38	304,23	258,38	565,13	767,13 ^{ab}	866,4	999,63	0,341	0,479	0,351	0,276
300(mg/kg)	252,70	325,25	325,04	275,13	584,00	792,75 ^a	925,25	983,00	0,446	0,411	0,351	0,281
450(mg/kg)	250,13	320,50	322,5	336,63	589,63	741,25 ^{ab}	1012,65	989,63	0,431	0,431	0,318	0,341
Probabilidades												
P	0,231	0,333	0,416	0,236	0,364	0,058	0,213	0,651	0,367	0,287	0,422	0,430
CV	18,58	9,84	16,36	18,93	13,02	5,96	10,92	8,26	21,67	21,76	22,31	20,14
Erro Padrão	42,49	32,99	0,736	56,30	72,96	44,65	0,25	80,82	0,09	0,09	0,09	0,06

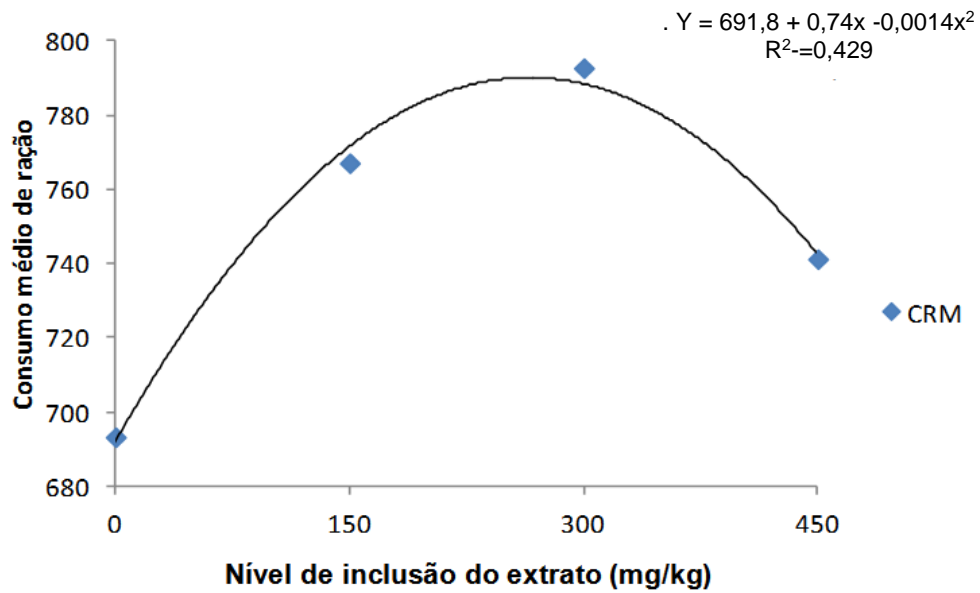


Figura 2 — Consumo médio de ração (g) dos dias 42 a 49 (segunda semana de experimento) de frangos de corte da linhagem Label Rouge, criados em sistema orgânico de produção, recebendo dietas com diferentes níveis de inclusão de extrato de acácia negra na dieta.

Os dados de oxidação lipídica (expresso em mg de MDA/ kg de amostra) e cor da carne da coxa e perna dos animais podem ser vistos na Tabela 4. Não houve diferença estatística entre os tratamentos, todavia podemos observar que existe uma tendência de melhora com inclusão do extrato de acácia negra na dieta.

Tabela 4 - Oxidação lipídica e coloração da carne de coxa e perna de frangos de corte da linhagem Label Rouge, criados em sistema orgânico de produção, recebendo dietas com diferentes níveis de inclusão de extrato de acácia negra.

	L		a*		b*		MDA (mg/kg de carne)
	Perna	Coxa	Perna	Coxa	Perna	Coxa	
0 mg/kg	46,69	54,7	3,9	3,19	3,87	1,26	0,505
150 mg/kg	45,77	53,72	4,22	3,01	4,24	1,79	0,506
300 mg/kg	47,54	54,45	4,95	2,26	4,51	3,08	0,490
450 mg/kg	47,95	50,93	3,66	3,29	5,55	2,05	0,459
Probabilidades							
P	0.307	0.665	0.404	0.099	0.195	0.0975	0.696
CV	10.22	11.07	9,77	3,12	2,71	3.14	1,29
Erro Padrão	0.755	0.679	0.276	0.207	0.356	0.354	0.026

Os resultados das análises estatísticas para os atributos da cor em carne de coxa e perna de frangos estão representados na Figura 3. A comparação entre as médias demonstrou não haver diferença significativa, entre os diferentes níveis de inclusão ofertados nas dietas, para luminosidade e tom da carne das amostras ($P>0,05$). Os valores encontrados estão de acordo com o esperado para a linhagem.

Na avaliação de morfologia intestinal (Figura 3), não houve diferença estatística nos valores de altura e largura dos vilos com a inclusão de extrato de acácia negra na dieta dos frangos.

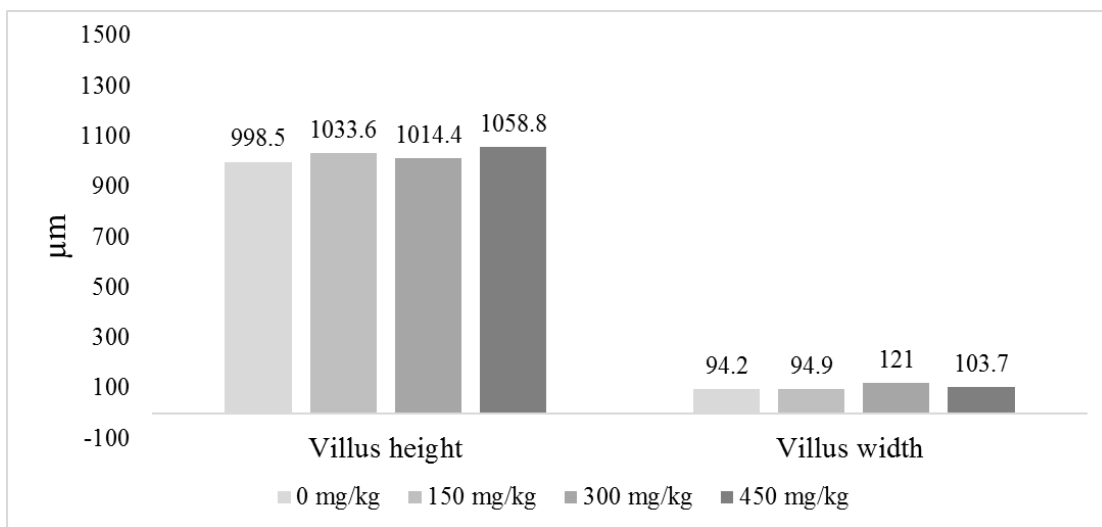


Figura 3: Altura e largura (μm) das vilosidades intestinais de frangos de corte, da linhagem Label Rouge, suplementados com extrato de acácia-negra (Altura: $P=0,145$; Largura: $P=0,179$).

DISCUSSÃO

A grande maioria dos trabalhos com frangos de corte que testam a inclusão de alguma fonte de tanino na dieta dos animais é realizado com sorgo e suas variedades, por se tratar de um possível substituto do milho ou soja. Contudo, nos últimos é crescente o número de pesquisas desenvolvidas com o uso de ingredientes alternativos à base de plantas, evidenciando os inúmeros benefícios que os taninos podem trazer na produção animal, e desmistificando o seu histórico como fator anti-nutricional dos alimentos.

Como os taninos são conhecidos por apresentar sabor adstringente, esperava-se que houvesse restrição no consumo, o que não foi observado neste estudo,

corroborando com os resultados encontrados por Petrolli *et al.* (2019), que avaliaram suplementação com um blend de extratos herbais, contendo 30% de extrato de acácia, quando comparadas às aves mantidas no tratamento controle. Além disso, os mesmos autores observaram maior ganho de peso e menor conversão alimentar ($P < 0,05$) nas aves. Os resultados encontrados pelos autores para a variável ganho de peso (1-42 dias) foram 2515g para o tratamento controle e 2720g, 2727g, 2710g para inclusão de 300, 600 e 1200 ppm de extrato contendo acácia em sua composição. No presente trabalho, apesar de não haver diferença estatística, podemos observar que nos tratamentos onde houve a inclusão do extrato, nas duas semanas finais, o ganho de peso médio dos animais foi superior.

Carrasco *et al.* (2018) descreveram efeito de modulação microbiana intestinal em frangos de corte através da utilização de extratos herbais contendo taninos na dieta, comprovando os efeitos benéficos de sua utilização sobre o desempenho das aves. Ainda, Ebrahim *et al.* (2015) verificaram melhora no perfil de aminoácidos do músculo do peito de frangos de corte suplementados com taninos, gerando efeitos positivos sobre o rendimento de carcaça e a conversão alimentar das aves.

A oxidação lipídica é um importante determinante da vida de prateleira da carne e dos produtos cárneos, pois é a principal causa da deterioração da sua qualidade (Yesilbag *et al.*, 2011). Antioxidantes são substâncias naturais e ou sintéticas usadas para prevenir a oxidação lipídica. Neste estudo, apesar de não encontrarmos diferença estatística entre os tratamentos, foi possível observar que as amostras de carne dos animais que receberam os níveis mais elevados de extrato, apresentaram os menores valores de concentração de MDA (mg/kg de amostra), conseqüentemente menor oxidação lipídica. Gianenas *et al.* (2018), utilizando 3 diferentes compostos fenólicos comerciais para avaliar os resultados encontrados frangos, relataram que os níveis mais altos de fenóis na dieta influenciam positivamente o desempenho do frango e estabilidade oxidativa dos lipídios da carne.

Vários estudos avaliaram a atividade antioxidante de muitas ervas, especiarias e seus extratos (Lopez-Bote *et al.*, 1998; Botsoglou *et al.*, 2002; Miura *et al.*, 2002). Ênfase particular foi dada às ervas da família Laminaceae, especialmente ao alecrim, sálvia, orégano e chá verde, todos com atividade antioxidante relatada (Economou *et al.*, 1991).

A aparência da carne é uma das primeiras características observadas pelos

consumidores, sendo a cor um importante atributo de qualidade que influencia a aceitação do consumidor na compra da carne de frango e, geralmente. As alterações nos valores da sua coloração, principalmente em relação à luminosidade (L^*) estão associadas às variações nos valores de pH final da carne (Ramos e Gomide, 2017). Já os valores referentes às coordenadas que indicam a coloração amarela da carne (b^*), são influenciados pela presença de carotenóides na dieta dos animais (Harder *et al.*, 2010). Não foram encontradas diferenças significativas entre os tratamentos ($P < 0,05$) para a coloração da carne da coxa e perna. Apesar de não haver muitos estudos avaliando os efeitos dos fitogênicos sobre a cor destes cortes, os valores encontrados no presente trabalho se encontram dentro dos valores relatados anteriormente por outros pesquisadores (Cruz, 2019; Harder *et al.*, 2010).

Em geral, a inclusão de aditivos com polifenóis na dieta de frangos de corte promove uma maior defesa antioxidante no organismo, o que pode ser responsável por redução na oxidação dos pigmentos de mioglobina, aumentando assim a intensidade da cor da carne (Boiago *et al.*, 2014). Os antioxidantes naturais, assim como os antioxidantes sintéticos, agem na fase de iniciação da reação, reagindo de forma a interferir na participação do O_2 ou competindo com os radicais livres dos ácidos graxos (Bobbio *et al.*, 1992). As atividades de sequestro de radicais livres e antioxidantes dependem do arranjo dos grupos funcionais ao redor da estrutura nuclear, sendo que o número e a configuração dos grupos hidroxila doadores de hidrogênio são as principais características que as influenciam (Cao *et al.*, 1996). Os antioxidantes naturais atuam como agentes redutores, como quelantes ou sequestradores de oxigênio singlete, inibidores de radicais livres e como desativadores de metais pró-oxidantes (Pratt, 1992; Rice-Evans *et al.*, 1995).

Neste estudo, a suplementação dietética com extrato de acácia-negra não afetou a altura e a largura das vilosidades nas seções duodenais de frangos de corte da linhagem Label Rouge em comparação com o grupo de controle. Todavia, os valores para estas variáveis foram maiores nos animais que receberam suplementação na dieta, o que mostra um efeito promissor extrato testado na saúde intestinal de frangos. O aumento da altura e da largura das vilosidades estão ligados ao aumento da área de superfície que, por sua vez, leva a uma melhor digestão e absorção (Murugesan *et al.*, 2014). Este aumento também sugere um maior número de células caliciformes por vilo, indicando maior produção de mucinas e compostos de glicoproteína que se ligam com o agente patogênicos e bactérias, evitando assim

a sua ligação com a mucosa intestinal (Chacher *et al.* , 2017).

Ahsan *et al.*, (2018), testando um blend de aditivos fitogênicos para frangos de corte da linhagem Ross, relataram melhora significativa na altura e largura das vilosidades intestinais dos animais. Os autores afirmam que compostos fitogênicos apresentam resultados promissores, porém a disponibilidade de uma grande variedade moléculas bioativas e ingredientes ativos disponíveis nesses compostos dificultam a comparação dos resultados das investigações científicas. Petrolli *et al.*, (2019) mostram em seu estudo que as aves que receberam 1200ppm do blend de compostos herbais com 30% de extrato de acácia, apresentaram maior altura de vilosidade em relação as aves alimentadas com 300ppm e as aves pertencentes ao controle negativo. Este comportamento observado pode ter ocorrido em virtude do efeito dos taninos sobre a microbiota, diminuindo o desafio sanitário entérico e melhorando os parâmetros da saúde intestinal. Carrasco *et al.* (2018) comprovaram o efeito modulador na microbiota intestinal através da utilização de taninos na dieta, o que corrobora os dados constatados.

De forma geral, o uso de extrato de acácia negra pode ser utilizado sem prejuízos aos frangos de corte, e deve ser encorajado, uma vez que o pode trazer benefícios à qualidade da carne e morfologia intestinal, sem limitar consumo de alimento, tão pouco interferir de forma negativa no ganho de peso dos animais. Encontrar um suplemento que ajude na redução da oxidação lipídica e, conseqüentemente, manutenção da qualidade de carne por mais tempo, é de grande importância. A carne de frango é mais suscetível à oxidação lipídica do que a carne bovina e suína, pois possui maior proporção de ácidos graxos poli-insaturados na sua composição, originando radicais livres, formando óxidos de colesterol, alterando a composição de ácidos graxos e a produção de compostos voláteis, que promovem alterações sensoriais, ocasionando redução do valor nutricional durante o processamento e armazenamento (Silva, 2019). Os resultados da morfologia intestinal do presente estudo, sugerem que a suplementação com acácia negra poderia melhorar a microbiota intestinal em frangos de corte, uma vez que maiores tamanhos de vilosidades elevam, potencialmente, a capacidade absorptiva do intestino, e conseqüentemente, propiciam um ambiente com maior diversidade de microbiota intestinal.

REFERENCIAS

ABUDABOS, ALAELDEIN M. The effect of phytogetic feed additives to substitute in-feed antibiotics on growth traits and blood biochemical parameters in broiler chicks challenged with *Salmonella typhimurium*. **Environmental science and pollution research international**, vol. 23, n.23, p.24151-24157, 2016.

AHSAN, U., KUTER, E., RAZA, I., KÖKSAL, B., CENGİZ, Ö., YILDIZ, M., KIZANLIK, P., KAYA, M., TATLI, O., SEVİM, Ö. Dietary Supplementation of Different Levels of Phytogetic Feed Additive in Broiler Diets: The Dynamics of Growth Performance, Caecal Microbiota, and Intestinal Morphometry. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v.20, p.737–746, 2018.

BOBBIO, F. O.; BOBBIO, P. A.; STRINGHETA, P. C. Stability of copigmented anthocyanins from *Panicum elinis* toward light and oxygen at different pH. **Bulletin Liaison-Groupe Polyphelnols**, v. 16, p. 241-244, 1992.

BOIAGO, M. M. *et al.* Sources and levels of selenium on breast meat quality of broilers. **Ciência Rural**, v. 44, p. 1692-1698, 2014.

CALDEIRA, M. V. W. *et al.* Quantificação de tanino em três povoamentos de *Acacia mearnsii* De Wild. **Boletim de Pesquisa Florestal**, Colombo, n. 37, p. 81-88, jul./dez. 1998

CAO, G.; SOFIC, E.; PRIOR, R. L. Antioxidant capacity of tea and common vegetables. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, p. 3426-3431, 1996.

CRUZ, F.L., MIRANDA, D.A., PONTES, L.L.B., RUBIM, F.M., GERALDO, A., FARIA, P.B. Qualidade da carne de frangos da linhagem Label Rouge suplementados com minerais biocomplexados e criados em sistema alternativo. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.73, p.214–222, 2021.

FEDNA. **Necesidades Nutricionales para Avicultura** – Normas Fedna. 2ª Edición. Fundación Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal. Madrid. 194p. 2018.

FOELKEL, C. Os eucaliptos e as leguminosas: Parte 01: Acacia mearnsii. Eucalyptusonline Book & Newsletter, 2008.

GIANNENAS, I *et al.* "Effect of herbal feed additives on performance parameters, intestinal microbiota, intestinal morphology and meat lipid oxidation of broiler chickens." **British poultry science** vol. 59,n.5, p.545-553, 2018.

HAFEEZ, A. Effect of supplementation of phytogenic feed additives (powdered vs. encapsulated) on performance and nutrient digestibility in broiler chickens. **Poultry science**, Champaign, vol. 95, n.3, p. 622-629, 2016.

HOUSHMAND, M.; HOJATI, F.; PARSAIE, S. 2015. Dietary Nutrient Manipulation to Improve the Performance and Tibia Characteristics of Broilers Fed Oak Acorn (*Quercus Brantii* Lindl). **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, 17:1:17-24.

JUNQUEIRA, Ana Maria Resende *et al.*. PRODUÇÃO ORGÂNICA E SUSTENTABILIDADE.. In: Anais do **59º Congresso da Sociedade Brasileira de Economia, Administração e Sociologia Rural (SOBER)** & 6º Encontro Brasileiro de Pesquisadores em Cooperativismo (EBPC). Anais...Brasília(DF) UnB, 2021.

KESHAVARZI, S.; HOUSHMAND, M.; BAHREINI, M.; BEHZADI, M.R. Age-Specific Response of Broilers to Dietary Inclusion of a High-Tannin Feedstuff. **Poultry Science Journal** , 5 (2): 83-90, 2017.

KHOOBANI, MOHAMMADREZA *et al.* "Effects of Dietary Chicory (*Chicorium intybus* L.) and Probiotic Blend as Natural Feed Additives on Performance Traits, Blood Biochemistry, and Gut Microbiota of Broiler Chickens." **Antibiotics (Basel, Switzerland)** vol. 9,1 5. 20 Dec. 2019.

KICZOROWSKA, BOŻENA, SAMOLIŃSKA, WIOLETTA, AL-YASIRY, ALI RIDHA MUSTAFA, KICZOROWSKI, PIOTR AND WINIARSKA-MIECZAN, ANNA. "The natural feed additives as immunostimulants in monogastric animal nutrition – a review" **Annals of Animal Science**, vol.17, no.3, 2017, pp.605-625.

LIPIŃSKI, H., MAZUR, M., ANTOSZKIEWICZ, Z., PURWIN, C. Polyphenols in monogastric nutrition – a review. **Animal Science**, 17(1): 41–58, 2017.

MELLO, J. C.P.; SANTOS, S. C. Taninos. In: SIMÕES, C.M.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 3 ed. Porto Alegre: Ed.UFGRS/Ed.UFSC, cap. 24, p.517-543,2001..

NCUBE, S., HALIMANI, T.E., MWALE, M., SAIDI, P.T. Effect of Acacia angustissima Leaf Meal on the Physiology of Broiler Intestines. **Journal of Agricultural Science**, v.9, 53, 2017.

PETROLI, P.G.; GUARNIERI, P.C.; FACCHI, F.L.; VALENTINI, F.D.A. Taninos e ácido butírico como melhoradores de desempenho para frangos de corte. **ENCICLOPÉDIA BIOSFERA**, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.16 n.29; p. 2019.

PRATT, D. E. Natural antioxidants from plant material. In Phenolic Compounds in Food and Their Effect on Health II: Antioxidants and Cancer Prevention; Huang, M.-T., Ho, C.-T., Lee, C. Y., Eds.; **American Chemical Society**: Washington, DC, p 54-71, 1992.

PROPHET, EB; MILLS, B; ARRINGTON, JB; SOBIN, LH . Laboratory methods in histotechnology, American Registry of Pathology, Armed Forces Institute of Pathology, Washington, DC, USA (1992).

RAMOS, E.M.; GOMIDE, L.A.M. (Eds.). Avaliação da qualidade de carnes: fundamentos e metodologias. Viçosa: UFV, 2017. 472p.

RICE-EVANS, C. A.; MILLER, J., PAGANGA. G. Antioxidant properties of phenolic

compounds. **Trends Plant Science**, v. 2, p. 152-159, 1997.

SEIDAVI, A., BELALI, M., ELGHANDOUR, M.M.Y., ADEGBEYE, M.J., SALEM, A.Z.M. Potential impacts of dietary inclusion of green tea (*Camellia sinensis* L.) in poultry feeding: a review. **Agroforest Systems**, 94:1161–1170, 2020.

SILVA, A.L. Aditivos fitogênicos na dieta de frangos de corte: desempenho, qualidade de carne e estabilidade oxidativa da carne e sangue. 2015. viii, 68 f. **Dissertação (mestrado)** - Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, 2015.

TOMASZEWSKA, E., DOBROWOLSKI, P., KLEBANIUK, R., KWIECIEŃ, M., TOMCZYK-WARUNEK, A., SZYMAŃCZYK, S., KOWALIK, S., MILCZAREK, A., BLICHARSKI, T., MUSZYŃSKI, S. Gut-bone axis response to dietary replacement of soybean meal with raw low-tannin faba bean seeds in broiler chickens. **Plos One**, 3:3:1-22, 2018.

VIEIRA, L.V.; SCHMIDT, A.P.; BARBOSA, A.A.; FEIJÓ, J. DE O.; BRAUNER, C.C.; RABASSA, V.R.; CORRÊA, M.N.; SCHMITT, E.; DEL PINO, F.A.B. Utilização de taninos como aditivo nutricional na dieta de ruminantes. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR**, Umuarama, v. 23, n.1, 2020.

WARREHAM, C.N.; WISEMAN, J.; COLE, D.J.A. Processing and antinutritive factors in feedstuffs. In: COLE, D.J.A.; VARLEY, M.A. **Principles of pig sciences**. Nottingham, 1994. 427p.

YESILBAG, D., EREN, M., AGEL, H., KOVANLIKAYA, A., BALCI, F. Effects of dietary rosemary, rosemary volatile oil and vitamin E on broiler performance, meat quality and serum SOD activity. **British Poultry Science**, 52: 472–482, 2011.

ZEB A, ULLAH F. A Simple Spectrophotometric Method for the Determination of Thiobarbituric Acid Reactive Substances in Fried Fast Foods. **Journal of Analytical Methods in Chemistry**, 2016.

CAPÍTULO V

1. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados encontrados demonstram que o uso de extrato de acácia negra, composto rico em taninos condensados, pode ser uma alternativa viável como aditivo na alimentação de aves de postura, frangos de corte e suínos nas fases de crescimento e terminação. A adição de taninos, nos níveis propostos, ao contrário do esperado não interferiu ou limitando o consumo de nenhuma das espécies estudadas. Também não afetou de maneira negativa o desempenho dos animais, o que seria esperado devido aos diversos fatores antinutricionais associado aos taninos.

Nas poedeiras, a inclusão do aditivo teve efeito positivo na integridade do coxim plantar das aves, evidenciando as propriedades antimicrobianas e antioxidantes dos taninos condensados presentes no extrato de acácia negra. Esse resultado é de extrema importância, pois representam uma garantia da integridade de patas nas aves, sendo uma alternativa para manutenção do bem-estar animal, além de manter a qualidade de uma parte dos frangos que possui uma valorização crescente no mercado, as patas. Países como a China consomem muito esse corte, e até mesmo no Brasil o consumo vêm sendo estimulado, e uma alternativa que ajude na manutenção da qualidade do mesmo, é de grande validade. A inclusão de taninos na dieta de frangos e suínos, resultou em tendências na melhoria da qualidade da carne de ambos, diminuindo os valores de oxidação lipídica, fato que é essencial para manutenção da sua qualidade ao longo da vida de prateleira. Além disso, na carne suína também foram notadas melhoras na coloração e maciez. Outro resultado positivo encontrado no trabalho foi o aumento da diversidade do microbioma dos suínos que receberam dietas com adição de tanino. As principais funções da microbioma intestinal para seu hospedeiro incluem atividades metabólicas que podem resultar no melhor aproveitamento de energia e nutrientes absorvíveis, maturação do epitélio intestinal e sistema imune, proteção do animal contra a colonização de microrganismos patogênicos, auxiliando na homeostase. Desta forma, o extrato utilizado nesse estudo pode funcionar como modulador de microbioma de maneira favorável, e esta modulação pode influenciar o desempenho dos animais. Estudos com uso do extrato nas fases iniciais devem ser encorajados, uma vez que os resultados encontrados são promissores.

Por fim, os resultados evidenciam que o uso de extrato de acácia negra, composto rico em taninos condensados apresenta propriedades que podem interessar a produção animal, no entanto, ainda é preciso estudar suas interações com outros aditivos para que se tenha um melhor conhecimento, bem como, aplicar o produto em algum caso de desafio (sanitário ou nutricional). Por ser tratar de um composto natural, o extrato também pode ser utilizado em sistemas orgânicos e agroecológicos, sem ferir as normas de utilização de aditivos dos mesmos e trazendo melhores resultados zootécnicos às propriedades.

REFERÊNCIAS

- ABUDABOS, A. M. The effect of phytogetic feed additives to substitute in-feed antibiotics on growth traits and blood biochemical parameters in broiler chicks challenged with *Salmonella typhimurium*. **Environmental Science and Pollution Research International**, Berlin, v. 23, n. 23, p. 24151-24157, 2016.
- AHSAN, U. *et al.* Dietary supplementation of different levels of phytogetic feed additive in broiler diets: the dynamics of growth performance, caecal microbiota, and intestinal morphometry. **Brazilian Journal of Poultry Science**, Campinas, v. 20, p. 737–746, 2018.
- BOBBIO, F. O.; BOBBIO, P. A.; STRINGHETA, P. C. Stability of copigmented anthocyanins from *Panicum elinis* toward light and oxygen at different pH. **Bulletin de Liaison-Groupe Polyphénols**, Paris, v. 16, p. 241-244, 1992.
- BOIAGO, M. M. *et al.* Sources and levels of selenium on breast meat quality of broilers. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 44, p. 1692-1698, 2014.
- CALDEIRA, M. V. W. *et al.* Quantificação de tanino em três povoamentos de *Acacia mearnsii* De Wild. **Boletim de Pesquisa Florestal**, Colombo, PR, n. 37, p. 81-88, jul./dez. 1998.
- CAO, G.; SOFIC, E.; PRIOR, R. L. Antioxidant capacity of tea and common vegetables. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, DC, v. 44, p. 3426-3431, 1996.
- CRUZ, F. L. *et al.* Qualidade da carne de frangos da linhagem Label Rouge suplementados com minerais biocomplexados e criados em sistema alternativo. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 73, p. 214–222, 2021.
- FOELKEL, C. **Os eucaliptos e as leguminosas: Parte 01: *Acacia mearnsii***. São Paulo: ABTCP, 2008. (Eucalyptus online Book & Newsletter).
- GIANNENAS, I. *et al.* Effect of herbal feed additives on performance parameters, intestinal microbiota, intestinal morphology and meat lipid oxidation of broiler chickens. **British Poultry Science**, Abingdon, v. 59, n. 5, p. 545-553, 2018.
- HAFEEZ, A. Effect of supplementation of phytogetic feed additives (powdered vs. encapsulated) on performance and nutrient digestibility in broiler chickens. **Poultry Science**, Champaign, v. 95, n. 3, p. 622-629, 2016.
- HOUSHMAND, M.; HOJATI, F.; PARSAIE, S. Dietary nutrient manipulation to improve the performance and tibia characteristics of broilers fed oak acorn (*Quercus Brantii* Lindl). **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, Campinas, v. 17, n. 1, p. 17-24, 2015.
- JUNQUEIRA, A. M. R., *et al.* Produção orgânica e sustentabilidade. *In*: CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ECONOMIA, ADMINISTRAÇÃO E

SOCIOLOGIA RURAL –SOBER, 59.; ENCONTRO BRASILEIRO DE PESQUISADORES EM COOPERATIVISMO –EBPC, 6., 2021, Brasília, DF. **Anais** [...]. Brasília, DF: UnB, 2021. *Online*. [Trabalho n. 343343, 21 p.].

KESHAVARZI, S.; HOUSHMAND, M.; BAHREINI BEHZADI, M. R. Age-specific response of broilers to dietary inclusion of a high-tannin feedstuff. **Poultry Science Journal**, Golestan Province, v. 5, n. 2, p. 83-90, 2017.

KHOOBANI, Mohammadreza *et al.* Effects of dietary chicory (*Chicorium intybus* L.) and probiotic blend as natural feed additives on performance traits, blood biochemistry, and gut microbiota of broiler chickens. **Antibiotics**, Basel, v. 9, n. 1, [art.] 5, 2019.

KICZOROWSKA, B. *et al.* The natural feed additives as immunostimulants in monogastric animal nutrition – a review. **Annals of Animal Science**, Warsaw, v. 17, n. 3, p. 605-625, 2017.

LIPIŃSKI, H. *et al.* Polyphenols in monogastric nutrition – a review. **Animal Science**, Cambridge, v. 17, n. 1, p. 41–58, 2017.

MELLO, J. C. P.; SANTOS, S. C. Taninos. *In*: SIMÕES, C. M. *et al.* **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 3. ed. Porto Alegre: Ed. UFRGS; Florianópolis: Ed. UFSC, 2001. cap. 24, p. 517-543.

NCUBE, S. *et al.* Effect of *Acacia angustissima* leaf meal on the physiology of broiler intestines. **Journal of Agricultural Science**, Toronto, v. 9, p. 53-62, 2017.

PETROLLI, P. G. *et al.* Taninos e ácido butírico como melhoradores de desempenho para frangos de corte. **Enciclopédia Biosfera**, Goiânia, v. 16, n. 29, p. 1408-1420, 2019.

PRATT, D. E. Natural antioxidants from plant material. *In*: HUANG, M.-T.; HO, C.-T.; LEE, C. Y. (ed.). **Phenolic compounds in food and their effect on health II: antioxidants and cancer prevention**. Washington, DC: American Chemical Society, 1992. p. 54-71.

PROPHET, E. B. *et al.* **Laboratory methods in histotechnology**. Washington, DC: American Registry of Pathology, 1992.

RAMOS, E. M.; GOMIDE, L. A. M. (ed.). **Avaliação da qualidade de carnes: fundamentos e metodologias**. Viçosa, MG: UFV, 2017. 472 p.

RICE-EVANS, C. A.; MILLER, J.; PAGANGA, G. Antioxidant properties of phenolic compounds. **Trends in Plant Science**, Kidlington, v. 2, p. 152-159, 1997.

SANTOMÁ, G.; MATEOS, G. G. **Necesidades nutricionales para avicultura: normas FEDNA**. 2. ed. Madrid: Fundación Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal, 2018. 194 p.

SEIDAVI, A. *et al.* Potential impacts of dietary inclusion of green tea (*Camellia*

sinensis L.) in poultry feeding: a review. **Agroforest Systems**, Dordrecht, v. 94, p. 1161–1170, 2020.

SILVA, A. L. **Aditivos fitogênicos na dieta de frangos de corte**: desempenho, qualidade de carne e estabilidade oxidativa da carne e sangue. 2015. 68 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Campus de Botucatu, Botucatu, 2015.

TOMASZEWSKA, E. *et al.* Gut-bone axis response to dietary replacement of soybean meal with raw low-tannin faba bean seeds in broiler chickens. **PLoS One**, San Francisco, v. 13, n. 3, [art.] e0194969, [p. 1-22], 2018.

VIEIRA, L. V. *et al.* Utilização de taninos como aditivo nutricional na dieta de ruminantes. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR**, Umuarama, v. 23, n. 1, [art.] e2306, [p. 1-13], 2020.

WARREHAM, C. N.; WISEMAN, J.; COLE, D. J. A. Processing and antinutritive factors in feedstuffs. *In*: COLE, D. J. A.; VARLEY, M. A. **Principles of pig sciences**. Nottingham: Nottingham University Press, 1994. p.427.

YESILBAG, D. *et al.* Effects of dietary rosemary, rosemary volatile oil and vitamin E on broiler performance, meat quality and serum SOD activity. **British Poultry Science**, Abingdon, v. 52, p. 472–482, 2011.

ZEB, A.; ULLAH, F. A simple spectrophotometric method for the determination of thiobarbituric acid reactive substances in fried fast foods. **Journal of Analytical Methods in Chemistry**, Cairo, v. 2016, [art.] 9412767, 2016.

2. ANEXOS

Anexo1: Tabelas dos Anexos III, IV e V da Portaria nº 52, de 15 de Março de 2021, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.

ANEXO III

SUBSTÂNCIAS E PRODUTOS AUTORIZADOS NA ALIMENTAÇÃO DE ANIMAIS EM SISTEMAS ORGÂNICOS DE PRODUÇÃO

SUBSTÂNCIAS E PRODUTOS*	CONDIÇÕES DE USO
Algas e seus derivados	Algas marinhas tem que ser lavadas a fim de reduzir o teor de iodo.
Aminoácidos, vitaminas e pró-vitaminas	Atendidos os critérios constantes no art. 60 deste Regulamento Técnico.
Enzimas	Desde que de origem natural.
Extratos protéicos vegetais	-
Forragens e outros alimentos grosseiros e seus derivados	-
Frutas e seus derivados	-
Grãos de cereais, seus produtos e subprodutos	-
Hortaliças e seus derivados	-
Leite, produtos e subprodutos lácteos	Lactose em pó somente extraída por meio de tratamento físico.
Melaço	-
Microrganismos	-
Óleos e gorduras	-
Peixes, outros animais aquáticos e derivados	-
Pós e extratos de plantas	-
Produtos de animais terrestres e seus derivados (tais como farinha de sangue)	Atender a legislação específica.

Peróxidos (tais como farinha de trigo, farinha de carne e ossos, entre outros)	Permitidos a registro de espécimes.
Sal marinho	O produto não pode ser refinado.
Sementes ou frutos de leguminosas, de oleaginosas e outras e seus derivados	-
Tubérculos, raízes e seus derivados	-
Ácido acético Ácido fórmico Ácido láctico Ácido propiônico	Para uso apenas para ensilagem.
Argilas cauliniticas Bentonita Diatomita Perlita Sepiolita	Utilizados como agentes aglutinantes, antiaglomerantes e coagulantes (aditivos tecnológicos).
Sílica coloidal Vermiculita	
Bicarbonato de sódio Calcário calcítico Carbonato de cálcio Carbonato de sódio Cloreto de sódio Fosfato bicálcico desfluorado Fosfatos bicálcicos de osso precipitados Fosfato monocálcico desfluorado Gluconato de cálcio Lactato de cálcio Magnésio anidro Sal não refinado Sulfato de magnésio Sulfato de sódio	Permitidos desde que não contenham resíduos contaminantes oriundos do processo de fabricação.
Carbonato básico de cobalto monohidratado Carbonato básico de cobre monohidratado Carbonato de magnésio Carbonato de zinco Carbonato ferroso Carbonato manganoso Cloreto de magnésio Iodato de cálcio anidro Iodato de cálcio hexahidratado Iodeto de potássio Molibdato de amônio Molibdato de sódio Óxido cúprico Óxido de zinco Óxido férrico	Permitidos desde que não contenham resíduos contaminantes oriundos do processo de fabricação.

Óxido manganoso e óxido mangânico Selenato de sódio Selenito de sódio Sulfato de cobalto mono ou heptahidratado Sulfato de cobre penta-hidratado Sulfato de zinco mono ou heptahidratado Sulfato ferroso monohidratado Sulfato manganoso mono ou tetra hidratado	
---	--

*As substâncias e produtos deverão ser utilizados de acordo com o estabelecido no plano de manejo orgânico.

ANEXO IV

SUBSTÂNCIAS E PRODUTOS AUTORIZADOS NA DESINFESTAÇÃO, HIGIENIZAÇÃO E CONTROLE DE PRAGAS DAS COLMEIAS EM SISTEMAS ORGÂNICOS DE PRODUÇÃO

SUBSTÂNCIAS E PRODUTOS*
Ácidos acético, fórmico, láctico, oxálico, peracético
Agentes de controle biológico
Álcool
Cal (óxido de cálcio) e cal virgem
Detergentes biodegradáveis
Enxofre
Eucaliptol, mentol e timol
Extratos vegetais
Hipoclorito de sódio
Peróxido de hidrogênio
Potassa cáustica (óxido ou hidróxido de potássio)
Sabões potássicos e sódicos
Soda cáustica

*As substâncias e produtos deverão ser utilizados de acordo com o estabelecido no plano de manejo orgânico.

ANEXO V

SUBSTÂNCIAS E PRODUTOS AUTORIZADOS COMO FERTILIZANTES, CORRETIVOS E SUBSTRATOS EM SISTEMAS ORGÂNICOS DE PRODUÇÃO

SUBSTÂNCIAS E PRODUTOS*	RESTRIÇÕES, DESCRIÇÕES, REQUISITOS DE COMPOSIÇÃO E CONDIÇÕES DE USO	
	Condições Gerais	Condições adicionais para as substâncias e produtos obtidos de sistemas de

		produção não orgânicos
Ácido bórico e bórax	-	Permitidos somente em biofertilizantes na concentração máxima de 8g por litro, desde que autorizado pelo OAC ou pela OCS.
Ácidos naturais não sintéticos	Permitido o uso como acidificante no preparo de biofertilizantes.	-
Aubos verdes	-	-
Algas marinhas	Desde que provenientes de extração legal ou de produção legalizada.	-
Argilas	Desde que provenientes de extração legal.	-
Biofertilizantes obtidos de componentes de origem vegetal	Permitidos desde que seu uso e manejo não causem danos à saúde e ao meio ambiente.	Permitidos desde que a matéria-prima contenha apenas substâncias e produtos autorizados neste Regulamento Técnico. Permitidos somente com a autorização do OAC ou da OCS.
Carbonatos, hidróxidos e óxidos de cálcio e magnésio (calcários e cal)	-	-
Carcaças e resíduos de abate para consumo próprio	Permitidos desde que oriundos da própria unidade de produção, compostados e bioestabilizados. Permitidos somente com a autorização do OAC ou da OCS.	Permitidos apenas se oriundos da produção paralela.
Cloreto de cálcio	-	Permitido somente nas formulações de biofertilizantes, na concentração máxima de 12 g por litro, desde que autorizado pelo OAC ou pela OCS.
		Permitido somente com a autorização do OAC ou da OCS. A análise de risco indicará a

01/03/2021 20:28

PORTARIA Nº 02, DE 19 DE MARÇO DE 2021 - PORTARIA Nº 03, DE 19 DE MARÇO DE 2021 - OCU - Inspetoria Nacional

Composto orgânico, vermicomposto	Permitidos desde que seu uso e manejo não causem danos à saúde e ao meio ambiente.	necessidade de verificação dos contaminantes constantes do Anexo VI deste Regulamento Técnico, e deve levar em consideração o estabelecimento ou propriedade de origem do insumo, não sendo obrigatória por partida.
Composto proveniente de resíduos orgânicos domésticos, resíduos de alimentos oriundos de comercialização, resíduos do preparo e consumo em estabelecimentos comerciais e industriais	Permitidos desde que oriundo de coleta seletiva e bioestabilizado. Permitidos desde que seu uso e manejo não causem danos à saúde e ao meio ambiente.	Permitidos desde que não usado diretamente nas partes aéreas comestíveis, e autorizado pelo OAC ou OCS mediante a realização de análise de risco. A análise de risco indicará a necessidade de verificação dos contaminantes constantes do Anexo VI
		deste Regulamento Técnico, e deve levar em consideração o estabelecimento ou propriedade de origem do insumo, não sendo obrigatória por partida.
Escórias industriais de reação básica	Respeitados os limites máximos de metais pesados estabelecidos no Anexo VI deste Regulamento Técnico. Permitidas somente com a autorização do OAC ou da OCS.	-
Enxofre elementar	Permitido somente com a autorização do OAC ou da OCS.	-
Enzimas, inoculantes e microrganismos	-	Desde que não sejam geneticamente modificados ou originários de organismos geneticamente modificados. Desde que não causem danos à saúde e ao

<http://www.in.gov.br/ext/assinatura/portaria-02-de-19-de-marco-de-2021-00000708>

2/50

		ambiente.
Excrementos de animais, compostos e biofertilizantes obtidos de componentes de origem animal	Permitidos desde que compostados ou bioestabilizados, para aplicação direta no solo. Quando não compostados, aplicar com pelo menos 60 (sessenta) dias de antecedência da colheita em caso de culturas que possuam partes comestíveis em contato com o solo. Proibida a aplicação direta nas partes comestíveis. Permitidos desde que seu uso e manejo não causem danos à saúde e ao meio ambiente.	O produto oriundo de sistemas não orgânicos de criação só será permitido quando na região não existir alternativa disponível e deverá ser obrigatoriamente compostado. Permitido somente com a autorização do OAC ou da OCS. A análise de risco indicará a necessidade de verificação dos contaminantes constantes do Anexo VI deste Regulamento Técnico, e deve levar em consideração o estabelecimento ou propriedade de origem do insumo, não sendo obrigatória por partida.
Excrementos humanos e de animais carnívoros domésticos	Não aplicado a cultivos para consumo humano. Bioestabilizado. Não aplicado em adubação de cobertura na superfície do solo e parte aérea das plantas. Permitidos somente com a autorização do OAC ou da OCS.	Uso proibido.
Fosfatos de rocha, hiperfosfatos e termofosfatos	-	-
Micronutrientes - Boro (B), Cobre (Cu), Cloro (Cl), Cobalto (Co), Ferro (Fe), Manganês (Mn), Molibdênio (Mo) e Zinco (Zn)	-	Desde que o produto seja constituído somente por substâncias autorizadas neste Regulamento Técnico.
Pós de rocha	-	Respeitados os limites máximos de metais pesados estabelecidos no Anexo VI deste

		Regulamento Técnico.
Pó de serra, casca e outros derivados da madeira, pó de carvão e cinzas	Permitidos desde que a matéria-prima contenha apenas substâncias e produtos autorizados neste Regulamento Técnico. Permitidos desde que sejam oriundos de atividade legal.	Permitidos desde que sejam oriundos de atividade legal.
Preparados biodinâmicos e homeopáticos	-	-
Produtos derivados da aquicultura e pesca	Permitidos desde que processados. O uso em partes comestíveis das plantas é permitido somente com a autorização do OAC ou da OCS.	Restrição para contaminação química e biológica.
Produtos, subprodutos e resíduos industriais de origem vegetal	Permitidos desde que sejam oriundos de atividade legal. Permitidos desde que seu uso e manejo não causem danos à saúde e ao meio ambiente. Permitidos somente com a autorização do OAC ou da OCS. Proibido o uso de vinhaça amônica.	Desde que não sejam geneticamente modificados ou derivados de organismos geneticamente modificados.
Produtos e subprodutos processados de origem animal	Permitidos desde que sejam oriundos de atividade legal e somente com a autorização do OAC ou da OCS.	O produto oriundo de sistemas de criação com o uso intensivo de alimentos e produtos veterinários não autorizados neste Regulamento Técnico só será permitido quando na região não existir alternativa disponível. A análise de risco indicará a necessidade de verificação dos contaminantes constantes do Anexo VI deste Regulamento Técnico, e deve levar em

		estabelecimento ou propriedade de origem do insumo, não sendo obrigatórias por partida.
Resíduos de biodigestores e de lagoas de decantação e fermentação	Permitidos desde que seu uso e manejo não causem danos à saúde e ao meio ambiente. Permitidos desde que bioestabilizados. Proibido o contato com partes comestíveis das plantas. Proibidos resíduos de biodigestores e lagoas que recebam excrementos humanos.	Permitidos somente com a autorização do DAC ou da OCS. A análise de risco indicará a necessidade de verificação dos contaminantes constantes do Anexo VI deste Regulamento Técnico, e deve levar em consideração o estabelecimento ou propriedade de origem do insumo, não sendo obrigatórias por partida.
Resíduos de origem vegetal, incluindo materiais de podas		Permitidos somente com a autorização do DAC ou da OCS. Desde que não sejam geneticamente modificados ou derivados de organismos geneticamente modificados. A análise de risco indicará a necessidade de verificação dos contaminantes constantes do Anexo VI deste Regulamento Técnico, e deve levar em consideração o estabelecimento ou propriedade de origem do insumo, não sendo obrigatórias por partida.
Solo	Permitido desde que obtido sem causar dano ambiental.	Desde que não tenham sido utilizados substâncias e produtos não autorizados neste Regulamento Técnico, nos últimos 18 meses.
	Permitidos desde que	Proibido o uso de radiação. Permitido desde que utilize

Substrato para plantas	obtido sem causar dano ambiental.	apenas substâncias e produtos autorizados neste Regulamento Técnico.
Substrato para produção fora do solo	Permitidos desde que obtido sem causar dano ambiental.	Proibido o uso de radiação. Permitido desde que utilize apenas substâncias e produtos autorizados neste Regulamento Técnico. Na produção de mudas e de cogumelos orgânicos, 50% da composição do substrato deverá ser oriundo de sistemas orgânicos de produção.
Sulfato de cálcio (gesso)	-	Desde que o nível de radioatividade não ultrapasse o limite máximo regulamentado. Gipsita (gesso mineral) sem restrição.
Sulfato de magnésio ou sulfato de magnésio monohidratado (Kieserita)	Sais de extração mineral. Permitido desde que de origem natural.	-
Sulfato de potássio e sulfato duplo de potássio e magnésio	-	Desde que obtidos por procedimentos físicos, não enriquecidos por processo químico e não tratados quimicamente para o aumento da solubilidade. Permitidos somente com a autorização do OAC ou da OCS.
Turfa	Autorizado apenas como veículo nas formulações de inoculantes microbianos, desde que proveniente de extração legal e que os limites de contaminantes não ultrapassem os estabelecidos no Anexo VI deste Regulamento Técnico.	-

*As substâncias e produtos deverão ser utilizados de acordo com o estabelecido no plano de manejo orgânico.

Anexo 2: Galinheiros móveis experimentais construídos para a realização do estudo de frangos de corte em sistema orgânico de produção.











Comissão de Ética no Uso de Animais
da *Universidade Federal de Santa Maria*

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação do uso de extrato de tanino condensado de *Acacia meansii* (Acácia Negra) na alimentação de não ruminantes", protocolada sob o CEUA nº 4474130720 (ID 003180), sob a responsabilidade de **Vladimir de Oliveira e equipe; Bruna Poletti; Henrique da Costa Mendes Muniz; Josué Sebastião Kunzler; Luciane Inês Schneider; Arlei Rodrigues Bonet de Quadros; Marrone da Silva dos Santos; Alexandre de Mello Kessler** - 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 Federal de Santa Maria (CEUA da UFSM) na reunião de 15/09/2020.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa](#)

Vigência da Proposta: de [01/2020](#) a [01/2021](#)

Área: [Departamento de Zootecnia](#)

Santa Maria, 20 de maio de 2022

Dra. Patrícia Bräunig
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Santa Maria

Profa. Dra. Vania Lucia Loro
Vice-Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Santa Maria

3. VITA

Bruna Poletti, filha de Fátima Maria Poletti, nasceu em 6 de Julho de 1992 em Sapucaia do Sul. Residiu em São Leopoldo durante parte da sua infância e depois mudou-se para Garibaldi, onde terminou de cursar o ensino fundamental na Escola Municipal de Ensino Fundamental Visconde de Cairú. Concluiu, em 2009, o ensino médio concomitantemente ao curso Técnico em Agropecuária com Habilitação em Zootecnia no Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul (IFRS), Campus Bento Gonçalves. Em Março de 2010 iniciou o curso de Zootecnia na Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA). Graduou-se como Zootecnista em março de 2015. Em 2017, obteve o título de Mestra em Zootecnia pelo Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Faculdade de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), como bolsista CAPES, sob orientação da professora Dra. Maitê de Moraes Vieira, com a dissertação “Vida de prateleira de ovos de poedeiras com diferentes idades de postura em sistema orgânico de produção”. Em março de 2018 iniciou o Doutorado em Zootecnia no mesmo Programa de Pós-Graduação, como bolsista CNPq, sob orientação do Prof. Dr. Alexandre de Mello Kessler, submetendo sua tese a exame em Março de 2022.