

Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”

Efeito de níveis crescentes de aditivo alternativo à base de ácidos orgânicos e mosto de tangerina (*Citrus reticulata*) como melhorador de desempenho em frangos de corte

Leonardo Mazzero

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

Piracicaba
2022

Leonardo Mazzero
Zootecnista

Efeito de níveis crescentes de aditivo alternativo à base de ácidos orgânicos e mosto de tangerina (*Citrus reticulata*) como melhorador de desempenho em frangos de corte
versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador:
Prof. Dr. **JOSÉ FERNANDO MACHADO MENTEN**

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

Piracicaba
2022

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

Mazzero, Leonardo.

Efeito de níveis crescentes de Aditivo à base de ácidos orgânicos e mosto de tangerina (*Citrus reticulata*) como melhorador de desempenho em frangos de corte / Leonardo Mazzero. - - versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2022.

55 p.

Dissertação (Mestrado) - - USP / Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. Ácidos orgânicos 2. Flavonoides 3. Frango de corte 4. Livre de antibióticos I. Título

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho ao meu pai, Luis Alberto Mazzero, que me ensinou o amor pelas aves, de todos os tipos, cores e espécies, e muitos conhecimentos da área, com toda sua dedicação e amor aos animais, que carrego como exemplo e com muito carinho.

Dedico também a todos aqueles que são amantes de aves, em especial a todos os criadores e entusiastas que estão iniciando suas criações e estudos na área, saibam que mesmo muitas vezes encontrando vários desafios, são eles que quando superados, trarão sucesso, satisfação e aprendizado.

Leonardo Mazzero

AGRADECIMENTOS

Esse trabalho não é resultado apenas do meu esforço, pelo contrário, é resultado do esforço de diversas pessoas que estiveram ao meu lado me ajudando, apoiando e dando força, por isso espero ter lembrado de todos nos agradecimentos a seguir, para aqueles que não lembrei fica aqui, com carinho, meu agradecimento.

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus e a minha família, em especial aos meus pais, Luis e Gilssane, meu irmão Eduardo, meus padrinhos Carlos e Juliana, e meus avós Lurdes, Angélica e “Téca”.

Agradeço ao Prof. Dr. José Fernando Machado Menten, pela oportunidade de e conhecimento compartilhado durante o período que estive como meu orientador. Também ao Prof. Dr. Gerson Barreto Mourão, que me orientou no início do mestrado, pelos ensinamentos e orientação.

Aos companheiros de pesquisa do grupo GMAB: Izally Gervásio, Laura De Vechi, Sofia Andrade, Luiz Firmino, Fabrício Pilonetto, Giovanni Ladeira, Paola Bóscolo, Letícia Sartori, Karoline Barbuio, Luciara de Paiva e Beatriz Delcarne.

Aos companheiros de pesquisa do grupo de Pesquisa em Não-ruminantes: José Matheus de Moura Andrade, Hélio Moreira Junior, José Andrew Barbosa e Glaucia Komatsu.

Aos amigos Wilian Fazolin, Iago Carraschi, Vinicius Moura, , Deivid Felipe, Jefferson Darlan, Tiago Tavares, Murilo Tagiariolli, Higor Marota, Gustavo Santos, Micheli Costa, Bruna Maganhe, Luana Troni, Mario Salviato, Evandro Moraes e outros.

Aos funcionários do Departamento de Zootecnia em especial ao Paulinho, Antônio Carlos (“Carlão”), “Gaúcho” e Gilberto por toda ajuda ao longo dos experimentos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudos.

Aos professores da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ/USP), da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (FZEA/USP) e da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ/USP) pelo conhecimento compartilhado durante as disciplinas.

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”.

À Universidade de São Paulo, obrigado.

EPÍGRAFE

“Life finds a way”.

Ian Malcolm, Filme “Jurassic Park” (1993)

SUMÁRIO

RESUMO.....	8
ABSTRACT	9
1. INTRODUÇÃO	11
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
2.1. Panorama da avicultura de corte brasileira.....	13
2.2. Microbiota intestinal do frango de corte e sua importância na produtividade..	14
2.3. Uso de antibióticos na produção animal	16
2.4. Uso de aditivos nutricionais substitutos aos antibióticos na avicultura de corte	18
2.5. Ácidos orgânicos na nutrição animal	19
2.5.1. Características químicas dos ácidos orgânicos	19
2.5.2. Ácidos orgânicos e seus sais como aditivos na nutrição animal	21
2.6. Mosto de tangerina (<i>Citrus reticulata</i>) e seus flavonoides	24
2.6.1. Flavonoides e suas propriedades.....	25
2.6.2. Atividade antimicrobiana dos flavonoides	26
2.6.3. Hesperidina e outros flavonoides como aditivos nutricionais	27
3. MATERIAL E MÉTODOS	29
3.1. Animais e instalações	29
3.2. Aditivo e dietas experimentais	32
3.3. Medições e métodos de análise.	34
3.4. Análise estatística	35
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	37
4.1. Desempenho	37
4.2. Microbiota, morfologia e morfometria do jejuno.	43
4.3. Viabilidade	44
5 CONCLUSÃO.....	47
REFERÊNCIAS.....	48

RESUMO

Efeito de níveis crescentes de aditivo alternativo à base de ácidos orgânicos e mosto de tangerina (*Citrus reticulata*) como melhorador de desempenho de frangos de corte

Aditivos alternativos aos antibióticos, como ácidos orgânicos e substâncias ricas em polifenóis como mosto de tangerina podem promover a melhoria da saúde intestinal de frangos de corte, modulando a população microbiana e melhorando a utilização de nutrientes. Neste trabalho foi estudado um produto que combina ácidos orgânicos (ácido fumárico 0,5%, ácido láctico 5,13%, ácido cítrico 5,44% e ácido ascórbico 1,2%) e mosto de tangerina (*Citrus reticulata*) 8,36%. Para determinar o efeito e nível mais adequado de inclusão deste produto na dieta de frangos de corte, foi realizado um experimento com 1400 frangos machos, em galpão convencional, avaliando o desempenho de 1 a 42 dias de idade. As aves foram alojadas em DCB com 5 tratamentos e 7 repetições de 40 aves cada, e foram avaliadas as dietas com as inclusões do aditivo: A250 (250 mg/kg), A500 (500 mg/kg), A1000 (1000 mg/kg) mais os controles: CN (negativo) e PC (positivo, com 10 mg/kg de enramicina). As rações foram formuladas à base de milho e farelo de soja atendendo exigências nutricionais de frangos de corte de desempenho regular, sendo isonutritivas, com fitase e sem agente anticoccidiano. Foram avaliadas características de desempenho, contagem das bactérias, morfometria e morfologia do jejuno. Considerando o período total do experimento, a inclusão do Aditivo à base de ácidos orgânicos e mosto de tangerina em diferentes níveis (250, 500 e 1000 mg/kg) não diferiu da dieta controle negativo e ao controle positivo com inclusão do antibiótico enramicina para características de desempenho ($p>0,05$), assim como para a contagem das bactérias, morfologia, morfometria do jejuno e viabilidade considerando o período total. Quando observado de forma isolada no período de 29-35 dias o tratamento com 500 mg/kg do Aditivo melhorou o ganho de peso e o consumo de ração dos animais ($p<0,05$), mas não teve efeito sobre a conversão alimentar.

Palavras-chave: Ácidos orgânicos, Flavonoides, Frango de corte, Livre de antibióticos

ABSTRACT

Effect of a feed additive based on organic acids and tangerine (*Citrus reticulata*) as growth promoter for broiler chickens

Feed additives alternatives to antibiotics such as organic acids and substances rich in polyphenols such as tangerine wort can improved intestinal health in broilers by modulating the microbial population and improving nutrient utilization. In this work, it was studied a product which combines organic acids (fumaric acid 0.5%, lactic acid 5.13%, citric acid 5.44% and ascorbic acid 1.2%) and tangerine must (*Citrus reticulata*) 8,36%. To determine the effect and the most appropriate level of inclusion of this product in the diet of broilers, an experiment was carried out with 1400 male chickens, in a conventional poultry house, evaluating the performance from 1 to 42 days of age. The birds were housed in RCB design with 5 treatments and 7 replicates of 40 birds each, and the diets with the additive inclusions were evaluated: A250 (250 mg/kg), A500 (500 mg/kg), A1000 (1000 mg/kg) and the controls: NC (negative) and PC (positive, with 10 mg/kg of enramycin). The diets were formulated based on corn and soybean meal, meeting the nutritional requirements of broilers of regular performance, being isonutritive, containing added phytase and without anticoccidial additive. Performance characteristics, bacteria count, morphometry and morphology of jejunum were evaluated. Considering the total period of the experiment, the inclusion of the alternative additive based on organic acids and tangerine wort at different levels (250, 500 and 1000 mg/kg) did not differ from the negative control diet and the positive control with the inclusion of the antibiotic enramycin for performance traits ($p>0.05$), as well as for the bacteria count, morphology, morphology of jejunum and viability when considering the total period. Considering the period of 29-35 days alone, treatment with 500 mg/kg of alternative additive improved weight gain and feed intake of the chickens ($p<0.05$), but had no effect on feed conversion.

Keywords: Organic acids, Flavonoids, Broiler, Antibiotic free

1. INTRODUÇÃO

A grande expansão da avicultura mundial a partir da década de 1960, em busca de melhora tecnológica e produtiva para viabilizar a produção em massa de carne de frango, atendendo assim o mercado mundial, levou à busca por aditivos alimentares que melhorassem a eficiência das aves em questão de saúde e desempenho (BISCHOFF, 2004).

O uso de antibióticos como aditivos melhoradores de desempenho tem sua eficiência comprovada e utilizada há muitos anos. Através da administração de doses subterapêuticas na alimentação dos animais eles tem como efeito a melhora na absorção de nutrientes, através da modulação da microbiota e da saúde do trato intestinal, resultando em melhores índices de ganho de peso e conversão alimentar (TORRES; DREHER; SIMIONI, 2015).

A partir de um movimento global, frente a preocupações relacionadas à saúde humana, vieram restrições e proibições do uso de antibióticos como melhoradores de desempenho na alimentação animal, uma vez que o uso desses produtos poderia selecionar micro-organismos resistentes (FLEMING-DUTRA *et al.*, 2016).

Aditivos nutricionais alternativos para melhora no desempenho começaram a ser estudados após as proibições parciais, em 1998, e totais em 2006, de antibióticos promotores de crescimento na alimentação animal estabelecidas pela União Europeia, com objetivo de promover desempenho sem que houvesse risco à saúde humana e animal, através da modulação da microbiota e melhora da digestão e absorção de nutrientes (HUYGHEBAERT; DUCATELLE; IMMERSSEEL, 2011).

Alguns desses compostos são aditivos como probióticos, prebióticos, bacteriocinas, peptídeos com ação antimicrobiana, bacteriófagos, enzimas, ácidos orgânicos, minerais, fitoterápicos e formulações nano-tecnológicas que procuram melhorar o desempenho dos animais, através do conceito de saúde única, que engloba biossegurança, uso dos aditivos nutricionais e melhores manejos que melhorem a segurança alimentar da população (SANTOS, 2005; THAKUR; GRAY, 2019).

Dentre os aditivos com efeito de melhora no desempenho destacam-se os ácidos orgânicos, substâncias químicas de origem natural com estrutura geral R-COOH e com propriedades ácidas (KIM *et al.*, 2015). Os ácidos orgânicos de cadeia

curta (C1-C7) são utilizados com maior frequência na alimentação animal (MENTEN *et al.*, 2014) como o fórmico, acético, propiônico, butírico, láctico, málico, tartárico e ácido cítrico. (DIBNER; BUTTIN, 2002).

Entre os modos de ação destes compostos destaca-se a ação da forma não dissociada que o entra no citoplasma bacteriano e causa alterações em seu metabolismo e equilíbrio osmótico causando a morte da célula bacteriana e alguns efeitos indiretos como o favorecimento dos enterocitos pelo fornecimento de energia vindo dos ácidos orgânicos, melhora na imunidade e acidificação do lúmen intestinal eliminando algumas bactérias patogênicas (AHSAN *et al.*, 2016).

Assim como os ácidos orgânicos, substâncias ricas em polifenóis como mosto de algumas frutas como os cítricos e as uvas, podem ter efeito de melhorador de desempenho. Alguns polifenóis como hesperidina e rutina, que são substâncias aromáticas compostas por anéis fenólicos e presentes no mosto de tangerina, possuem efeitos sobre a microbiota intestinal. Seu modo de ação se baseia na clivagem dos anéis aromáticos para produção de energia por alguns micro-organismos, o que, em contrapartida, gera metabólitos com efeito bactericida (IQBAL *et al.*, 2020).

A associação de diferentes métodos de modulação da microbiota intestinal como a de ácidos orgânicos com polifenóis pode favorecer o desempenho de frangos de corte (FASCINA *et al.*, 2017). Por isso, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de um aditivo comercial que combina os ácidos orgânicos: ácido fumárico, ácido láctico, ácido cítrico e ácido ascórbico com mosto de tangerina rico nos polifenóis rutina e hesperidina, na sua dose padrão recomendada pelo fabricante (500 mg/kg), uma subdose (250 mg/kg) e sobredose (1000 mg/kg) sobre o desempenho e saúde intestinal de frangos de corte criados em galpão convencional, com a hipótese que esse tipo de produto pode ser utilizado na substituição de antibióticos melhoradores de desempenho sem comprometimento do desenvolvimento das aves.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Panorama da avicultura de corte brasileira

A carne de frango é um alimento nobre presente nas mais variadas culturas gastronômicas mundiais, sendo de suma importância para o consumo humano, principalmente devido ao seu custo, mais baixo que de outras proteínas animais, que garante a alimentação de milhões de pessoas ao redor do mundo.

O Brasil é o maior exportador mundial e terceiro maior produtor de carne de frango, atrás somente dos Estados Unidos e da China, e tem grande importância nesse cenário. Segundo a ABPA (2022), em 2021 foram 14,3 milhões de toneladas de carne de frango produzidas em território nacional; dessas, 4,6 milhões de toneladas foram destinadas à exportação para países como China, Arábia Saudita, Japão, Emirados Árabes e países da União Europeia.

Os principais estados produtores estão localizados na região Centro-Sul do país, sendo o Paraná, Santa Catarina, Rio Grande do Sul, São Paulo e Goiás os maiores produtores com 35,54%, 14,89%, 13,65%, 8,32% e 8,27% da produção total respectivamente. Parte dessa produção segue para Ásia, Oriente Médio, África e União Europeia principalmente na forma de cortes, salgados e industrializados (ABPA, 2022).

A cadeia produtiva é composta por integração de milhares de produtores e por empresas beneficiadoras e exportadoras, por meio das quais há a organização da cadeia, com finalidade de estabelecerem inovações tecnológicas e de pesquisa para um rápido desenvolvimento e alcance mundial de distribuição (SCHMIDT; DA SILVA, 2018).

Esse alcance permitiu o contato da avicultura brasileira com diferentes exigências de mercado como a redução ou proibição dos melhoradores de desempenho, empregados há muitos anos no setor com uso sub-terapêutico, tendo como o principal efeito a melhora no desempenho, porém com o risco de selecionar bactérias super-resistentes nocivas à saúde humana, o que levou a busca por alternativas mais seguras (PANDOLFI, 2020).

2.2. Microbiota intestinal do frango de corte e sua importância na produtividade

O sistema digestório das aves é composto basicamente pelo bico, papo, proventrículo, moela, intestino delgado, intestino grosso e glândulas anexas (ARTONI *et al.*, 2014), todos contendo populações microbianas complexas e variadas e podendo conter bactérias, fungos, archaeas, protozoários e vírus.

Nesta microbiota predominam populações bacterianas de *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Eubacterium*, *Bacteroides*, *Escherichia coli*, *Prevotella*, *Selenomonas*, *Streptococcus*, *Megasphaera*, *Fusobacterium*, e *Bifidobacterium*, tendo sua concentração variada de acordo com a dieta, respostas imunes do hospedeiro e das substâncias produzidas por esse complexo microbiológico (IQBAL *et al.*, 2020).

A microbiota intestinal é um grande sistema vivo e em equilíbrio, denso e rico em diversidade de espécies, podendo conter mais de 30 gêneros e mais de 600 espécies de bactérias em um organismo saudável, variando de uma concentração de 10^3 a 10^{11} UFC (unidades formadoras de colônia) / grama de conteúdo intestinal (MENTEN *et al.*, 2014; SMITH, 1965; TOROK *et al.*, 2011).

Tanto bactérias associadas a aumento da produtividade, chamadas de benéficas, quanto daquelas associadas a problemas de saúde, chamadas de patogênicas, habitam o sistema digestório de aves saudáveis (MENTEN *et al.*, 2014). Mais de 85% desta população é composta por bactérias Gram-positivas benéficas que dominam e mantêm um equilíbrio dinâmico das demais espécies (IQBAL *et al.*, 2020; SUGIHARTO, 2016).

Este equilíbrio, chamado de eubiose, é responsável por uma boa digestão e absorção de nutrientes, desenvolvimento estrutural do intestino, estímulo ao sistema imune e, conseqüentemente, resistência a doenças. A comunidade microbiana distal (ceco e cólon), por exemplo, pode atuar na liberação de vitaminas (vitamina K e vitaminas do complexo B), aminoácidos e ácidos graxos de cadeia curta (ácido acético, butirico e propiônico), do alimento não digerido nas demais porções do intestino, que podem se tornar disponíveis para o animal (ABDELLI; SOLÀ-ORIOLO; PÉREZ, 2021).

Outro exemplo de benefícios da eubiose é a liberação de ácidos graxos voláteis, oriundos da fermentação realizada por algumas bactérias, que promovem uma ação bacteriostática, eliminando bactérias patogênicas como a *Salmonella spp.*

e fornece energia que estimula a proliferação de células epiteliais intestinais, melhorando a superfície de absorção intestinal na porção final do intestino (ABDELLI; SOLÀ-ORIOLO; PÉREZ, 2021; DIBNER; RICHARDS, 2005; RICKE, 2003).

Quando acontece qualquer mudança na composição populacional da microbiota, seja ela qualitativa ou quantitativa, o resultado é uma disbiose, levando a um prejuízo na digestão e absorção de nutrientes quando há o aumento de micro-organismos indesejáveis (IQBAL *et al.*, 2020).

Em desequilíbrio, a população microbiana intestinal pode se tornar patogênica e causar doenças prejudiciais para as aves. Sendo que a população de bactérias benéficas pode agir via exclusão competitiva, competição por sítios de ligação, estímulo do sistema imunológico ou produção de antibióticos próprios, na eliminação e controle da proliferação de micro-organismos patogênicos, prevenindo algumas doenças intestinais, tais como as doenças causadas por *Clostridium perfringens*, *Escherichia coli* e *Salmonella spp.* (MENTEN *et al.*, 2014).

A regulação da função intestinal depende da estabilidade da microbiota bem como da digestão e absorção de nutrientes, estado imunológico eficaz, estruturação da mucosa intestinal, função neuroendócrina e motora do intestino (ABDELLI; SOLÀ-ORIOLO; PÉREZ, 2021; CELI *et al.*, 2017). Fatores tais como o clima, idade, genética e condições de estresse podem afetar a composição da microbiota, porém o fator mais relevante é a composição da dieta, que proporciona substrato para o crescimento e proliferação de micro-organismos (DIAZ CARRASCO; CASANOVA; FERNÁNDEZ MIYAKAWA, 2019).

A composição da dieta (ingredientes, nutrientes e aditivos), bem como seus atributos físicos e tamanho de partículas, podem afetar o funcionamento do trato gastrointestinal por meio, principalmente, da modulação do sistema imunológico e da microbiota intestinal (ABDELLI; SOLÀ-ORIOLO; PÉREZ, 2021).

Além disso, alguns tipos de fibras alimentares, inibidores de tripsina, fitato, lectinas, proteínas não-digeridas, bem como micotoxinas, podem gerar um processo inflamatório, afetando a integridade estrutural e funcional do intestino, em contrapartida, aditivos fitobióticos, ácidos orgânicos, enzimas, prebióticos e probióticos, alimentos nutracêuticos podem modular a microbiota selecionando a melhor composição populacional e levando à um melhor aproveitamento de nutrientes, melhor desempenho e promoção da saúde (ABDELLI; SOLÀ-ORIOLO; PÉREZ, 2021).

Ademais, alguns tipos de alimentos não-digeridos, bem como micotoxinas, podem gerar um processo inflamatório, afetando a integridade estrutural e funcional do intestino, em contrapartida, alguns aditivos como os ácidos orgânicos podem modular a microbiota selecionando a melhor composição populacional e levando à um melhor aproveitamento de nutrientes, melhor desempenho e promoção da saúde (ABDELLI; SOLÀ-ORIOLO; PÉREZ, 2021).

O bom funcionamento do trato gastrointestinal depende também da manutenção de uma barreira física de comunidades microbianas complexas densamente povoadas que agem contra patógenos, promovem proteção e aporte nutricional ao animal, podendo até mesmo estimular o desenvolvimento do sistema imunológico da monocamada epitelial, formando uma barreira protetora entre o conteúdo intestinal e a superfície de absorção intestinal (ABDELLI; SOLÀ-ORIOLO; PÉREZ, 2021).

2.3. Uso de antibióticos na produção animal

O primeiro antibiótico a ser descoberto foi a penicilina em 1928 por Alexander Fleming. Enquanto realizava pesquisas com *Staphylococcus sp.*, observou contaminação fúngica em uma das placas e que ao redor do mofo se formava uma área transparente, em que não havia proliferação bacteriana, indicando que o organismo produzia substâncias anti-bacterianas. Posteriormente o fungo foi identificado, como pertencente ao gênero *Penicillium*, a substância foi chamada de penicilina e seu uso em humanos foi estudado, sendo a partir de 1940 produzida em escala industrial, gerando grande impacto na medicina mundial (GAYNES, 2017).

Em meados de 1946, após a Segunda Guerra Mundial, os antibióticos foram introduzidos na alimentação animal com o objetivo de melhorar a sanidade dos plantéis de aves, no entanto também foi observado grande efeito no desempenho (MENTEN *et al.*, 2014), sendo a sulfasuxidina e estreptomicina os principais utilizados. Com o aumento populacional no pós guerra, foram realizados estudos na área de nutrição animal com o objetivo de intensificar a produção e reduzir os custos, tais como o uso de aditivos e entre eles os melhoradores de desempenho antimicrobianos (KIRCHHELLE, 2020).

Os antibióticos podem desempenhar diferentes funções de acordo com sua finalidade e modo de ação, podendo atuar no tratamento direto de doenças (uso terapêutico), na prevenção de doenças (metafilaxia), pode agir no controle da inflamação intestinal, melhorar a absorção de nutrientes e ter efeito como melhorador de desempenho (MENTEN, 2014; POOLE; SHEFFIELD, 2013; TARRADAS *et al.*, 2020).

Como efeitos de interesse zootécnico do uso de antibióticos como promotores de crescimento destacam-se o aumento da eficiência na utilização dos alimentos, redução dos distúrbios intestinais e melhora do desempenho animal e modulação da microbiota intestinal, associado a isso tem-se a redução de perdas fecais, bem como do impacto ambiental e redução dos custos de produção (MENTEN *et al.*, 2014).

Houve nos últimos anos o surgimento de cepas de micro-organismos extremamente resistentes a antibióticos que, segundo Fleming-Dutra *et al.* (2016), se originaram do uso indiscriminado de antibióticos na medicina por indicações desnecessárias, venda sem prescrição médica e também pelo uso na agropecuária. A agropecuária é responsável pelo maior consumo de antibióticos em toneladas, perfazendo 63 a 240 mil toneladas anuais, utilizadas como promotores de crescimento, como uso preventivo e para tratar infecções (GRACE, 2015; LANDERS *et al.*, 2012; VENTOLA, 2015).

Os antibióticos melhoradores de desempenho são utilizados em doses subterapêuticas na alimentação dos animais com o objetivo de inibir o crescimento de bactérias patogênicas, assim promovendo o crescimento de bactérias benéficas, tendo efeito anti-inflamatório, de melhora na digestibilidade de gorduras, melhorando a absorção de energia, e supressão do quórum bacteriano, alterando positivamente a conversão alimentar (BROOM, 2017; MENTEN, 2014).

A chegada de preocupações sobre sustentabilidade, segurança alimentar e bem-estar animal ao mercado consumidor levou a uma maior pressão em prol de modificações na cadeia de produção de alimentos de origem animal, como a proibição de antibióticos como promotores de crescimento, realizada pela União Europeia em 2006, com base no princípio de precaução (SMITH, 2006).

Essa preocupação com a resistência a antibióticos levou outros países a buscar restrições no seu uso para promotores de crescimento, principalmente pensando do conceito de saúde única, englobando saúde animal, humana e do meio

ambiente. O Brasil proibiu em 2016 em todo território nacional a importação e fabricação do sulfato de colistina que era usado como melhorador de desempenho (BRASIL, 2016). Em 2018 os antibióticos tilosina, lincomicina, virginiamicina, bacitracina e tiamulina foram proibidos de serem utilizados com a finalidade de melhoradores de desempenho (BRASIL, 2018).

Em contrapartida à demanda do mercado consumidor para a proibição do uso de antibióticos como promotores de crescimento surgem consequências como perdas econômicas, chegando até 20% a mais no custo de produção, pela diminuição da eficiência na absorção de nutrientes, aumento do uso de antibióticos com fins terapêuticos e de alternativas para controle de doenças subclínicas (MENTEN, 2014; SMITH, 2011).

Todo esse cenário levou à adoção de estudos, por parte da indústria e instituições de pesquisa, em busca da substituição parcial ou total dos antibióticos como melhoradores de desempenho, focados na melhora da absorção dos nutrientes, melhoria do manejo e condição sanitária dos plantéis e saúde intestinal através da modulação da população microbiana.

2.4. Uso de aditivos nutricionais substitutos aos antibióticos na avicultura de corte

Com a incorporação de novas tecnologias ao setor avícola, tem-se buscado a otimização da produtividade para alcançar melhores índices econômicos e produzirem-se alimentos mais seguros e saudáveis para o mercado consumidor (SANTOS, 2005). Dentre os avanços tecnológicos que alavancaram a avicultura, pode-se destacar os avanços em genética, sanidade e nutrição animal, com o uso de diversas estratégias nutricionais e novos produtos adicionados às dietas com o objetivo de melhorar a produtividade, principalmente, por meio da melhoria da saúde intestinal das aves.

O uso de aditivos nutricionais como probióticos, prebióticos, bacteriocinas, peptídeos com ação antimicrobiana, bacteriófagos, enzimas, ácidos orgânicos, minerais, fitoterápicos e formulações nano-tecnológicas que permitam uma melhor ação dos aditivos em um determinado alvo específico, são exemplos de substitutos dos antimicrobianos em uma nova era produtiva (MENTEN *et al.*, 2014; SANTOS, 2005).

Dentre esses produtos alternativos destacam-se o uso de ácidos orgânicos e compostos biologicamente ativos, chamados de bioflavonoides ou polifenóis, como promotores de desempenho e moduladores de microbiota intestinal em aves. Alguns benefícios foram observados com o uso de ácidos orgânicos na função de modulador da microbiota no trato intestinal e melhoria na renovação do epitélio intestinal, devido a redução da proliferação de bactérias patogênicas (MENTEN *et al.*, 2014).

2.5. Ácidos orgânicos na nutrição animal

Os ácidos orgânicos fazem parte do organismo de plantas e animais naturalmente, sendo formados por processos metabólicos ou pela fermentação microbiana no trato intestinal (MENTEN *et al.*, 2014). A definição de ácido orgânico é qualquer substância química com estrutura geral R-COOH e com propriedades ácidas (KIM *et al.*, 2015).

Nem todos os ácidos orgânicos têm ação antimicrobiana, sendo os ácidos graxos de cadeia curta (C1-C7) mais utilizados na alimentação de aves com esta finalidade (MENTEN *et al.*, 2014). Os monocarboxílicos como o fórmico (C1), acético (C2), propiônico (C3), butírico (C4) e outros ácidos carboxílicos como o láctico, málico, tartárico, ácido cítrico, fumárico e sórbico possuem propriedades físicas e químicas benéficas às dietas de aves (DIBNER; BUTTIN, 2002).

Os ácidos orgânicos promovem a modulação da microbiota intestinal de diversas formas, diretas e indiretas. O principal modo de ação dos ácidos orgânicos é na sua forma não dissociada, lipossolúvel, que atravessa a membrana das bactérias e altera todo o metabolismo bacteriano, levando a célula a morte, outros mecanismos indiretos como acidificação do meio e nutrição energética dos enterócitos também são fatores relevantes na melhora da saúde intestinal (AHSAN *et al.*, 2016).

2.5.1. Características químicas dos ácidos orgânicos

Os ácidos têm a característica química de serem doadores de prótons, enquanto que as bases são receptoras; o conjunto de ambos pode ser chamado de

par ácido-base conjugado (LEHNINGER, 1993). Em sistemas biológicos é comum a presença de ácidos e bases fracas, que não ionizam completamente quando dissolvidos em água, tendo papel importante na regulação do metabolismo e ações enzimáticas (MENTEN *et al.*, 2014).

A constante de dissociação (pKa) é utilizada para medir a capacidade de cada ácido que está protonado (não dissociada) de liberar prótons, ou seja, sua força relativa de dissociação. Através de uma curva de titulação é possível determinar o pKa de uma determinada solução. Esse procedimento leva em consideração a titulação do ácido com uma base forte, normalmente hidróxido de sódio (NaOH), adicionado em pequenas quantidades até o ácido ser consumido (neutralizado). A concentração do ácido então pode ser calculada pelo volume e concentração de NaOH adicionado, e, ao plotar o pH medido contra a quantidade de NaOH, tem-se a curva de titulação do ácido (MENTEN, *et al.* 2014).

Pode-se determinar, por meio da equação de Henderson-Hasselbach, a relação entre o pH e ação tamponante de uma mistura entre um ácido fraco e sua base conjugada, assim como o pKa do ácido, por meio de curvas conhecidas de titulação de todos os ácidos fracos, acessada por essa equação. Sabe-se, então, que o pKa de ácido fraco é igual ao pH da solução no ponto de equivalência da titulação. Pela equação de Henderson-Hasselbach também é possível determinar o pKa de qualquer ácido a partir da relação molar entre os compostos doadores e receptores de prótons em determinado pH (MENTEN *et al.*, 2014).

A constante de dissociação (pKa), definida no pH em que 50% do composto está dissociado, descreve o efeito dos ácidos orgânicos na redução do pH e da atividade antimicrobiana que varia em função do padrão de dissociação de cada ácido, assim como do pH do trato gastrointestinal (KIM *et al.*, 2015). Quanto mais baixo o pKa mais forte o ácido e sua capacidade de reduzir o pH do meio e alterar a dinâmica da população microbiana intestinal. Os ácidos utilizados como aditivos na alimentação animal têm pKa entre 3 e 5, sendo classificados como ácidos fracos. Estes valores podem ser observados para os principais ácidos orgânicos na Tabela 1.

Tabela 1 - Ácidos orgânicos - nomenclatura e propriedades físicas

Estrutura Química	Nome		Ponto Fusão (°C)	Ponto Ebulição (°C)	Solubilidade Água 25°C (g/100mL)	pKa
	Oficial	Comum				
CH ₃ CO ₂ H	Etanoico	Acético	16,6	118	0	4,75
CH ₃ CH ₂ CO ₂ H	Propanoico	Propiônico	-21	141	0	4,87
CH ₃ (CH ₂) ₂ CO ₂ H	Butanoico	Butírico	-6	164	8	4,81
CH ₃ (CH ₂) ₃ CO ₂ H	Pentanoico	Valérico	-34	187	4,97	4,82
CH ₃ (CH ₂) ₄ CO ₂ H	Hexanoico	Caproico	-3	205	1,08	4,84
CH ₃ (CH ₂) ₆ CO ₂ H	Octanoico	Caprílico	16	239	0,07	4,89
CH ₃ (CH ₂) ₈ CO ₂ H	Decanoico	Cáprico	31	269	0,015	4,84
CH ₃ (CH ₂) ₁₀ CO ₂ H	Dodecanoico	Láurico	44	179	-0,006	5,3

Adaptado de Solomons e Fryhle (2002) e Menten *et al.* (2014)

2.5.2. Ácidos orgânicos e seus sais como aditivos na nutrição animal

Os ácidos orgânicos possuem funções diversas no organismo, podendo ter efeito flavorizante, alterando a funcionalidade de algumas enzimas e na motilidade gástrica, podendo gerar a sensação de saciedade (RAVINDRAN; KORNEGAY, 1993); podem ser fontes energéticas e estimulantes de reações metabólicas, aumentando a digestibilidade de nutrientes e alterando positivamente a morfologia intestinal (PARTANEN, 1999); têm ação direta na inibição do crescimento bacteriano, sendo utilizados na conservação de alimentos, sanitizante de alimentos e melhorador de desempenho em dietas animais (MENTEN *et al.*, 2014). Outra característica de suma importância na ação dos ácidos orgânicos é a formação de quelatos, estruturas anelares com íons metálicos que previnem a reação dos íons metálicos e outros nutrientes, aumentando a digestibilidade e retenção dos mesmos (ADAMS *et al.*, 1999)

Os ácidos orgânicos estão entre os principais candidatos para a substituição de antibióticos como promotores de crescimento na nutrição animal com o objetivo de que se tenham resultados semelhantes, porém sem a criação de micro-organismos resistentes. A ação desses acidificantes acontece nas regiões proximais do trato intestinal, especificamente no jejuno e acontece basicamente por duas vias: direta e indireta (MENTEN *et al.*, 2014).

Atualmente o modo de ação principal dos ácidos orgânicos é na sua forma não dissociada, que são lipossolúveis e podem atravessar a membrana celular das bactérias. Internamente na célula o ácido sofre dissociação e causa alteração no pH citoplasmático, alterando negativamente o metabolismo celular, na troca de nutrientes com o meio externo e interferindo no sistema de transporte de aminoácidos e fosfatos, bem como na ação de algumas enzimas (BOOTH, 1985; MENTEN *et al.*, 2014; RUSSELL, 1992; AHSAN, 2016).

Essa alteração pode ser negativa para a célula também do ponto de vista osmótico, pois terá que usar mecanismos de controle osmótico para compensar as cargas elétricas liberadas pela dissociação do ácido, aumentando a pressão osmótica e causando rompimento celular. (HELLWEG, 2006; MENTEN, 2014).

A ocorrência desse modo de ação está relacionada basicamente à ação de ácidos fracos, já que em ácidos fortes a maior parte da substância se dissocia e não consegue penetrar na membrana celular bacteriana, estando também relacionada com o tamanho das moléculas, sendo as moléculas pequenas e lipofílicas mais eficientes (AHSAN *et al.*, 2016).

A capacidade do ácido orgânico não dissociado de inibir o crescimento bacteriano está, primeiramente, relacionada com a capacidade da molécula de atravessar a parede e a membrana celular da bactéria e em seguida com a toxicidade do ânion dissociado no citoplasma para determinado micro-organismo. Essa capacidade recebe o nome de concentração mínima inibitória (CMI) para cada micro-organismo que já é conhecida para alguns ácidos comumente utilizados na alimentação animal e é expressa em mMol, em geral muito abaixo das concentrações mínimas da maioria dos antibióticos (MENTEN *et al.*, 2014; ÖSTLING; LINDGREN, 1993). Na Tabela 2 é possível observar CMI para diferentes ácidos e diferentes micro-organismos normalmente patogênicos para os animais domésticos.

Tabela 2 - Concentração mínima inibitória (mMol) de ácidos orgânicos não dissociados para o crescimento de enterobactérias em condições aeróbias e anaeróbias

	Ácido Láctico		Ácido Acético		Ácido Fórmico	
	Aeróbio	Anaeróbio	Aeróbio	Anaeróbio	Aeróbio	Anaeróbio
<i>Enterobacter agglomerans</i>	7	6	4	2	0,7	0,7
<i>Escherichia coli</i>	7	4	8	6	0,9	1
<i>Rahnella aquatilis</i>	7	5	8	7	1,1	1
<i>Serratia fontiola</i>	8	6	7	3	0,9	0,8
<i>Hafnia Alvei</i>	8	7	9	9	0,9	1,2
<i>Salmonella typhimurium</i>	7	4	9	5	0,8	0,8
<i>Versinia enterocolitica</i>	6	4	6	4	0,7	0,5

Adaptado de (ÖSTLING; LINDGREN, 1993)

Além dos fatores, mencionados anteriormente, a taxa de eliminação bacteriana pelos ácidos depende de aspecto relacionado ao tipo de ácido, tempo de exposição e temperatura do ambiente intestinal. Existem concentrações mínimas definidas para a ação de cada ácido e geralmente bactérias Gram-negativas são sensíveis a ácidos com menos de 8 carbonos enquanto Gram-positivas são sensíveis a ácidos de cadeia longa (MENTEN et al., 2014; PARTANEN, 2001; STRAUSS; HAYLER, 2001).

O efeito dos ácidos orgânicos no controle de proliferação bacteriana pode também acontecer de modo indireto pela redução do pH do meio pela ação da forma dissociada do ácido, assim como fornecer energia para os enterocitos e favorecer o seu desenvolvimento, além de efeitos sobre a melhora da imunidade e diminuição da inflamação intestinal (AHSAN et al., 2016).

A proliferação de micro-organismos patogênicos como *E. coli*, *C. perfringens* e *Salmonella spp.* é reduzida quando se acidifica o meio para pH abaixo de 5, isso também cria uma barreira contra a migração de micro-organismos oportunistas do íleo e do intestino grosso para as porções proximais do intestino, local em que ocorre a maior parte da absorção de nutrientes (MENTEN et al., 2014).

A diminuição da proliferação de bactérias no intestino e a redução da atividade microbiana causada pela ação dos ácidos orgânicos ajuda o metabolismo do animal hospedeiro, reduzindo a concentração de amônia, aminas e toxinas, produzidas por micro-organismos que podem alterar as funções epiteliais ou

produzirem toxinas ao se ligarem a receptores específicos na parede intestinal (MENTEN *et al.*, 2014).

O metabolismo dos ácidos orgânicos pelo animal acontece primeiramente pela difusão passiva para o interior da célula epitelial pelo gradiente eletroquímico favorável. O pH do trato digestivo varia de 2,5 a 8, sendo mais ácido na região da moela e mais alcalino no final do intestino; nessa faixa de pH a maioria dos ácidos de cadeia curta está na forma dissociada e não terá efeito sobre a microbiota, porém próximo à superfície da parede intestinal forma-se um microambiente ácido que torna a difusão possível. Após entrarem na célula os ácidos orgânicos são metabolizados pelo ciclo dos ácidos carboxílicos a CO₂ e água, produzindo cerca de 10 a 27 moles de ATP (MENTEN *et al.*, 2014).

NGUYEN *et al.* (2018) encontraram melhoria linear no ganho de peso e conversão alimentar de frangos de corte criados de 1 a 35 dias quando suplementados com níveis crescentes (0,02%, 0,03%, 0,04%, 0,05% e 0,06%) de um blend de ácidos orgânicos (17% de ácido fumárico, 13% de ácido cítrico, 10% de ácido málico) e 1,2% de ácidos graxos de cadeia média (ácido cáprico e caprílico). Resultados semelhantes foram observados por Bagal *et al.* (2016) com o uso de 1% de ácido cítrico nas dietas, obtendo melhoria significativa no ganho de peso quando comparado ao tratamento controle.

2.6. Mosto de tangerina (*Citrus reticulata*) e seus flavonoides

Conhecida popularmente como tangerina a *Citrus reticulata* é uma fruta cítrica pertencente à família *Rutaceae*, possui alto teor de açúcar, compostos fenólicos, óleos essenciais e baixa acidez. Essa fruta é produzida com facilidade de áreas tropicais e subtropicais. O mosto de tangerina é utilizado para fazer bebidas fermentadas, e é rico em flavonoides e ácidos fenólicos como a hesperidina, nobiletina, rutina, quercetina e narigina, sendo a hesperidina o flavonóide mais abundante na fruta e principalmente na casca (WANG *et al.*, 2019). Utilizado na medicina chinesa, o extrato de tangerina é conhecido pelo seu efeito anti-inflamatório, antioxidante e bactericida, sendo usado como composto natural para tratar diversas doenças (JIANG *et al.*, 2016).

Além disso, em um estudo feito por Jiang *et al.* (2016), o uso da casca seca de tangerina proporcionou um aumento linear no peso vivo de frangos de corte,

aumentando também o consumo de ração durante o período inicial; esses efeitos foram associados ao flavonoide hesperidina presente na casca seca de tangerina.

2.6.1. Flavonoides e suas propriedades

Organismos vegetais produzem compostos secundários com propriedades antimicrobianas para sua própria proteção, em caso de doenças, lesões físicas e até mesmo no caso de predação por animais. Estes compostos são produzidos em condições específicas como a de entrada de micro-organismos patogênicos ou em locais em que é exigida maior proteção, como por exemplo, em frutos e sementes (ERB; KLIEBENSTEIN, 2020)

Os polifenóis são um grupo dessas substâncias protetoras, sendo que mais de 8.000 compostos fenólicos já foram descobertos e estudados pela ciência, sendo categorizados de várias maneiras, mas principalmente pela sua estrutura química. Pode ser feita a classificação dos polifenóis em três principais grupos: ácidos fenólicos, flavonoides e estilbenos; além disso, existem polifenóis fora dessa classificação, que possuem estrutura mais simples e são solúveis em água. (SCICUTELLA *et al.*, 2021; TSAO, 2010)

Enquanto que os ácidos fenólicos são constituídos por um anel benzênico simples e geralmente estão ligados às paredes das células vegetais, os flavonoides possuem a maior diversidade de polifenóis com mais de 5.000 moléculas diferentes (Figura 1), sendo caracterizados por dois anéis aromáticos ligados por uma ponte de três carbonos (BALASUNDRAM; SUNDRAM; SAMMAN, 2006; BASHEER; KEREM, 2015). Os flavonoides podem ser classificados em diversos subgrupos: neoflavonóides, isoflavonóides, flavonas, flavanóis, flavanonas e antocianidinas (SCICUTELLA *et al.*, 2021). Os estilbenos, terceiro grupo de polifenóis, são compostos por dois anéis aromáticos sem pontes de carbono (CROZIER; JAGANATH, INDU B. CLIFFORD, 2006).



Figura 1. Exemplos de polifenóis aplicados como antimicrobianos (SCICUTELLA *et al.*, 2021).

2.6.2. Atividade antimicrobiana dos flavonoides

Os flavonoides são compostos aromáticos que possuem uma cadeia de anéis de benzeno (A e B) ligados por um anel C de pirona, que podem agir como moduladores da microbiota intestinal. A propriedade de modulação da microbiota desses compostos deve-se aos seus metabólitos biologicamente ativos, derivados da clivagem do anel C, desmetilação e desidroxilação realizadas pelas bactérias (IQBAL *et al.*, 2020).

Os compostos fenólicos também podem se ligar a proteínas extracelulares solúveis como hidrolases, oxidoredutases, DNA sintetases, RNA polimerases, fosfatases, proteínas fosfoquinases, oxigenases e aminoácidos oxidases ou paredes celulares de bactérias, destruindo a membrana e também inibindo a replicação do DNA em bactérias Gram+ ou Gram- (SCICUTELLA *et al.*, 2021).

A ação dos flavonoides como aditivos nutricionais pode ser considerada uma via de mão dupla, pois enquanto as bactérias fazem a transformação dos polifenóis em metabólitos mais simples, o mesmo processo interfere no crescimento e a

população da microbiota intestinal, alterando suas atividades metabólicas (IQBAL *et al.*, 2020).

Apesar do efeito bactericida, os flavonoides podem exercer uma função antinutricional no organismo dos animais. Como estes compostos têm a função de proteção contra predação nas plantas, eles podem se ligar a proteínas e enzimas e prejudicar o consumo, digestibilidade e absorção de nutrientes. Por isso o nível correto de inclusão, conhecimento do método de ação e a interação sinérgica desses compostos com outros aditivos devem ser estudados para que o efeito de seu uso seja benéfico para o sistema (SCICUTELLA *et al.*, 2021).

2.6.3. Hesperidina e outros flavonoides como aditivos nutricionais

Classificada como uma flavonona, ou seja, flavonoide que possui um esqueleto 2,3-dihidro-2-fenilcromo-4-ona, a hesperidina (Figura 2) está presente em frutas cítricas, sendo o mais abundante na tangerina (*Citrus reticulata*) e possui ação antimicrobiana. As enzimas bacterianas fazem a liberação de agliconas a partir de flavononas como a hesperidina, que por sua vez são transformadas em ácidos fenólicos como o ácido 3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)propiónico (ácido diidroferúlico) que pode ter efeito bactericida. Micro-organismos como *E. ramulus* e espécies de *Clostridium* são capazes de realizar tais processos (IQBAL *et al.*, 2020).

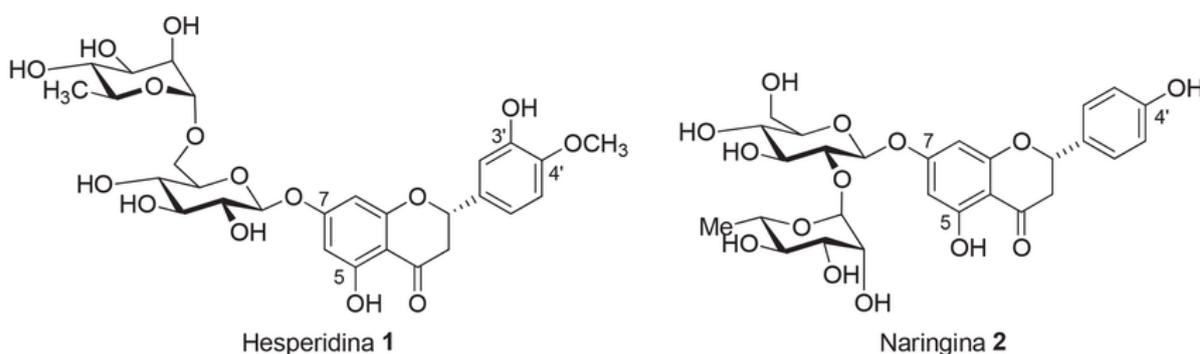


Figura 2. Estrutura molecular das flavononas hesperidina e naringina (VICTOR *et al.*, 2020).

Segundo Goliomytis *et al.* (2015) a suplementação com as flavanonas naringina (0,75 g/kg e 1,5 g/kg) e hesperidina (0,75 g/kg e 1,5 g/kg) na dieta também melhoraram as propriedades antioxidantes da carne, sem prejudicar o desempenho

de frangos de corte. Além disso a inclusão de 2% de casca de laranja desidrata por Vlaicu *et al.* (2020) aumentou significativamente o ganho de peso de frangos de corte, pela alta presença de flavononas nesse subproduto. SIMITZIS *et al.* (2011) não encontraram diferenças de desempenho entre o tratamento controle e a suplementação de hesperidina (0,15 g/kg e 0,30 g/kg) na dieta de frangos de corte.

A inclusão extrato de semente uva (7,2 g/kg) e concentrado de bagaço de uva (60 g/kg), ambos ricos em flavonoides, não melhorou a conversão alimentar e ganho de peso em frangos de corte, mas teve efeitos na morfologia intestinal e funcionalidade do intestino delgado (VIVEROS *et al.*, 2011).

3. MATERIAL E MÉTODOS

Os procedimentos experimentais realizados neste trabalho foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, da Universidade de São Paulo, Piracicaba/SP, Brasil, número do protocolo CEUA nº 5147020222.

3.1. Animais e instalações

O experimento foi realizado no Setor de Avicultura, do Departamento de Zootecnia, da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ/USP) em um galpão convencional de boxes de piso. Cada boxe possuía aquecimento (campânulas elétricas), comedouros tubulares (infantil e adulto), bebedouro tipo nipple e cama reutilizada composta por casca de arroz e maravalha. A ventilação (ventiladores e nebulizadores) era automática. O programa de luz, temperatura do galpão e práticas de manejo foram realizados de acordo com o manual da linhagem.

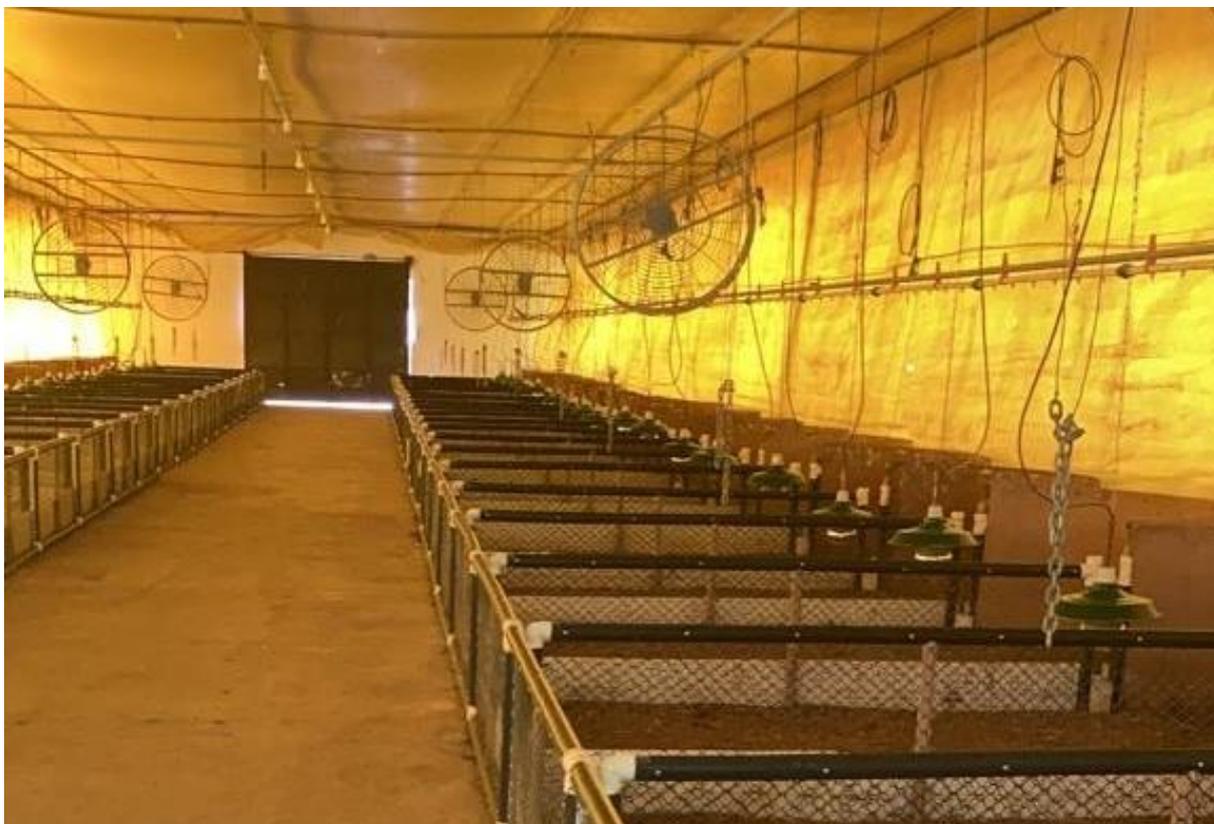


Figura 3. Galpão experimental do Setor de Avicultura da ESALQ/USP

Para a realização do experimento foram utilizados 1400 pintos de corte machos da linhagem Cobb com 1 dia de vida, provenientes de um incubatório comercial e de matrizes com 51 semanas de vida, vacinados no incubatório contra a Doença de Marek e Bronquite Aviária.



Figura 4. Recebimento dos pintos de 1 dia no início do experimento

A formação dos boxes foi realizada com uma padronização dos pintos, pesando-os individualmente e dividindo em 6 classes de peso, eliminando do experimento animais das classes: muito leves ou muito pesados e distribuindo igualmente as classes de peso em cada boxe, com objetivo de padronizar o peso inicial e condições de competição. A formação das classes foi feita através da pesagem individual prévia de uma amostra de 50 aves, determinando o peso médio, mínimo e máximo e realizando a formação de classes de peso. O peso médio inicial individual foi de 47 gramas.

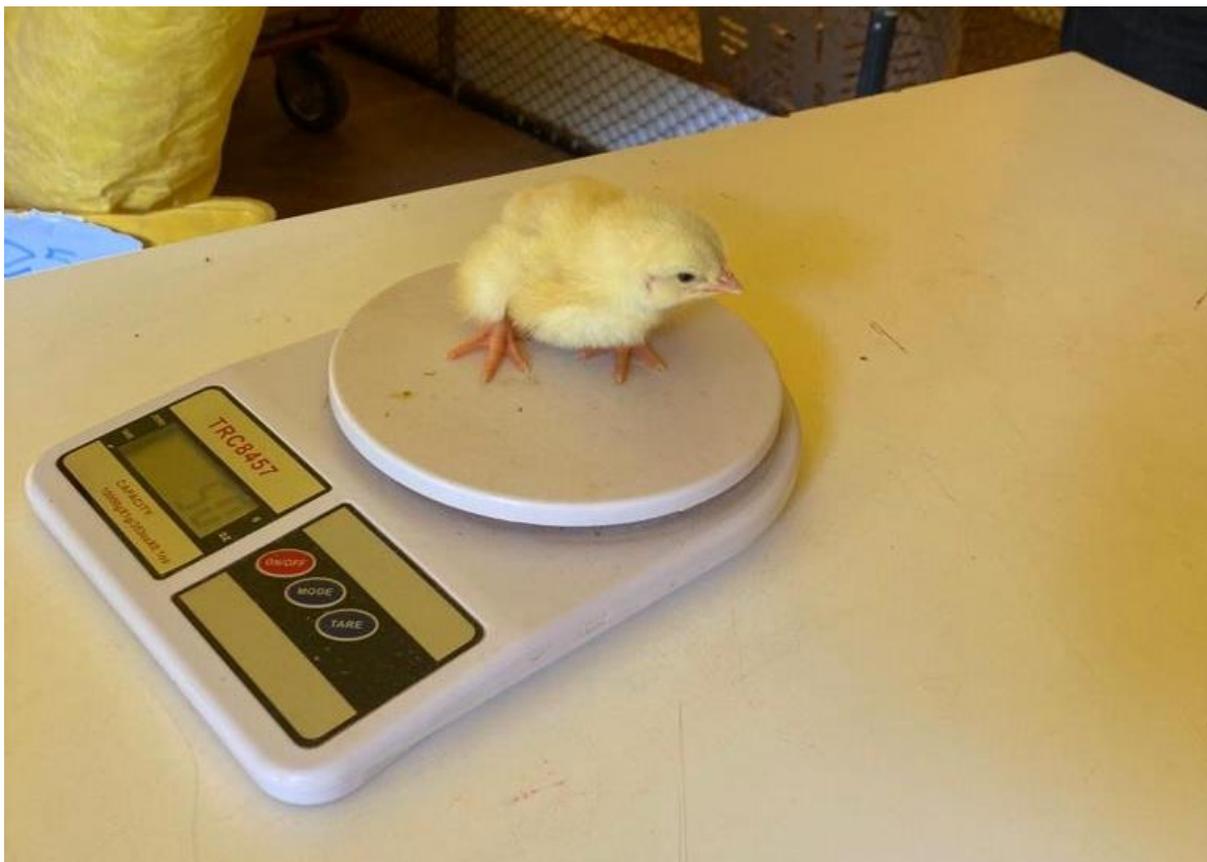


Figura 5: Pesagem individual dos pintos para padronização dos boxes.

As aves foram distribuídas em um delineamento em blocos casualizados considerando cinco tratamentos e sete repetições que foram aleatorizadas dentro dos blocos, totalizando 35 boxes, com 40 aves cada. Os animais de cada boxe foram pesados semanalmente de 1 a 42 dias para obtenção dos dados de ganho de peso semanal, para tanto foi realizada a pesagem conjunta de todos os animais para cálculo posterior da média de peso. Para cálculo do consumo de ração, foi realizada a diferença entre o fornecimento e a sobra em cada semana. Através da razão entre o consumo de ração e ganho de peso calcula-se a conversão alimentar.

A temperatura no galpão foi controlada através do sistema automático de aquecedores elétricos, ventiladores e nebulizadores, além do manejo de cortinas manual de acordo com a temperatura do dia. A temperatura máxima e mínima foi registrada diariamente com o auxílio de um termômetro analógico. A Figura 6 mostra as médias de temperatura registradas. A temperatura média no período inicial (1-21 dias) de 27,6 °C, período de crescimento (22-35 dias) de 26,3 °C e período final (36-42 dias) 26,0 °C.

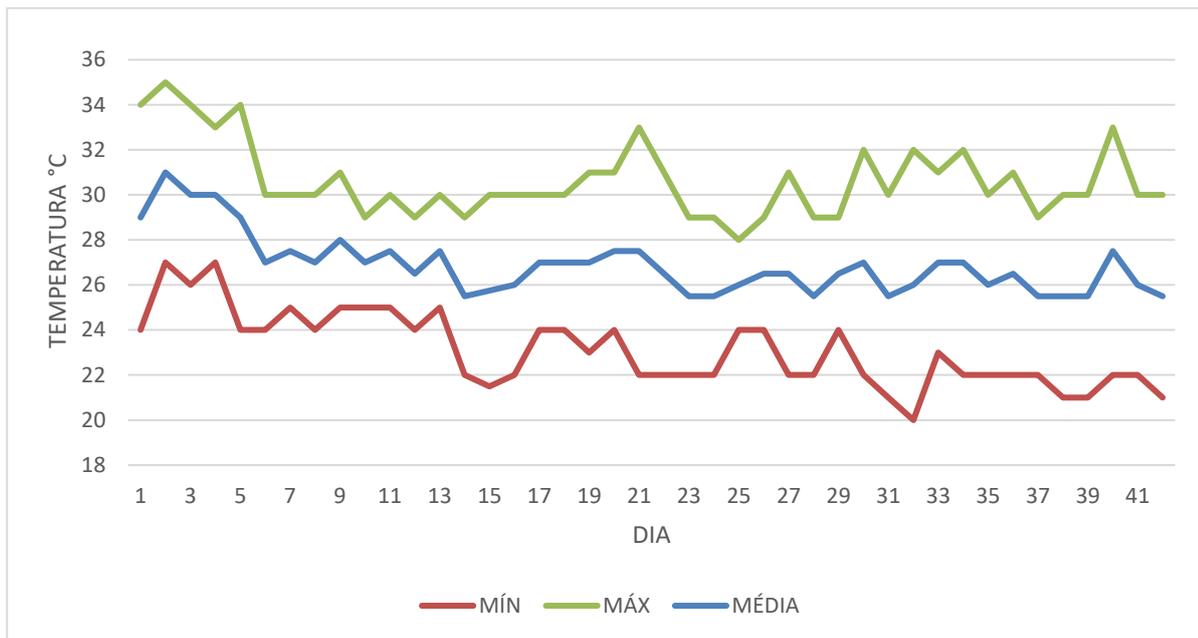


Figura 6. Gráfico de Temperatura durante o Período Experimental.

3.2. Aditivo e dietas experimentais

As dietas foram baseadas em milho e farelo de soja (Tabela 3) e formuladas de acordo com as exigências nutricionais para frangos de corte machos de desempenho regular conforme as Tabelas Brasileiras para Aves e Suínos (ROSTAGNO *et al.*, 2017), todas isonutritivas e isoenergéticas, ou seja, os aditivos foram adicionados a partir de uma dieta basal. As dietas continham fitase, mas eram isentas de anticoccidiano e para completar o espaço deixado pelos diferentes níveis de aditivo foi utilizado um inerte (caulim). A ração foi fornecida *ad-libitum*, consistindo em quatro dietas: de 0 a 7 dias (pré-inicial), 8 a 21 dias (inicial), 22 a 35 dias (crescimento) e 36 a 42 dias (terminação).

Tabela 3. Composição percentual das dietas experimentais, na matéria natural.

Ingredientes	Unid.	0 -7 dias	8 -21 dias	22-35 dias	36-42 dias
Milho moído	%	48,25	50,56	57,28	63,52
Farelo de soja	%	44,35	41,84	35,25	29,95
Óleo de soja	%	3,73	4,35	4,62	4,18
Fosfato bicálcico	%	1,35	1,02	0,83	0,44
Calcário calcítico	%	1,01	0,94	0,81	0,78
Sal comum	%	0,53	0,52	0,49	0,47
DL-metionina	%	0,3325	0,3159	0,2730	0,2320
L-lisina.HCl	%	0,1146	0,1255	0,1547	0,1712
Cloreto de colina	%	0,0800	0,0800	0,0600	0,0400
Suplemento mineral***	%	0,0500	0,0500	0,0500	0,0500
Suplemento vitamínico	%	0,0500*	0,0500*	0,0400**	0,0400**
L-treonina	%	0,0491	0,0466	0,0403	0,0293
Fitase	%	0,0050	0,0050	0,0050	0,0050
Inerte/Aditivo****	%	0,1000	0,1000	0,1000	0,1000
Composição nutricional calculada					
Energia Metabolizável	kcal/kg	2975	3050	3150	3200
Proteína Bruta	%	24,27	23,31	20,84	18,91
Cálcio	%	0,871	0,758	0,638	0,514
Fósforo Disponível	%	0,363	0,299	0,254	0,176
Sódio	%	0,225	0,218	0,208	0,197
Lisina Digestível	%	1,307	1,256	1,124	1,014
Metionina + Cistina Digestível	%	0,967	0,929	0,832	0,750
Treonina Digestível	%	0,863	0,829	0,742	0,669
*Salus Premix de Vitaminas, fornecido por quilograma de dieta: Vitamina A, 8.500 UI; Vitamina D3, 3.000 UI; Vitamina E, 18 UI; Vitamina K3, 2,5 mg; Vitamina B1, 2 mg; Vitamina B2, 6 mg; Vitamina B6, 3 mg; Vitamina B12, 14 µg; Vitamina B5, 14 mg; Ácido Fólico, 1,2 mg; Biotina, 0,08 mg e Selênio, 0,5 mg.					
** Salus Premix de Vitaminas, fornecido por quilograma de dieta: Vitamina A, 6.800 UI; Vitamina D3, 2.400 UI; Vitamina E, 14 UI; Vitamina K3, 2,0 mg; Vitamina B1, 1,6 mg; Vitamina B2, 4,8 G; Vitamina B6, 2,4 mg; Vitamina B12, 11 µg; Vitamina B5, 14 Mg; Ácido Fólico, 1,0 mg; Biotina, 0,06 mg e Selênio, 0,4 mg.					
***Salus Premix de Minerais, fornecido por quilograma de dieta: Manganês, 80 mg; Zinco, 70 mg; Ferro, 50 mg; Cobre, 10 mg e Iodo, 1 mg.					
****De acordo com cada tratamento (Tabela 4)					

O aditivo utilizado é um produto comercial que consiste em um “blend” de ácidos orgânicos: ácido fumárico (0.5%), ácido láctico (5.13%), ácido cítrico (5.44%) e ácido ascórbico (1.2%), além de mosto de tangerina rico em flavonoides (8,36%) e veículo (79,37%). A inclusão do produto foi crescente nas dietas, com três níveis,

partindo de dieta basal + 250 mg/kg (A250), para dieta basal + 500 mg/kg (A500), dose padrão recomendada do produto pelo fabricante, e dieta basal + 1000 mg/kg (A1000); também foram incluídos um tratamento controle positivo, dieta basal + inclusão de 10 mg/kg de enramicina como antibiótico melhorador de desempenho, e um controle negativo sem aditivos (dieta basal).

Tabela 4. Inclusão do Aditivo e Enramicina de acordo com cada tratamento

Ingredientes	Un.	A250	A500	A1000	CP	CN
Inerte	%	0,0750	0,0500	0,0000	0,0875	0,1000
Aditivo	%	0,0250	0,0500	0,1000	0,0000	0,0000
Enramicina 8%	%	0,0000	0,0000	0,0000	0,0125	0,0000

Tabela 5. Inclusão dos componentes do em porcentagem em cada uma das dietas

Componente	%	Inclusão nas Dietas (mg/kg)		
		A250	A500	A1000
Ácido fumárico	0,5	1	3	5
Ácido láctico	5,13	13	26	51
Ácido cítrico	5,44	14	27	54
Ácido ascórbico	1,2	3	6	12
Mosto de tangerina	8,36	21	42	84
Veículo (c. s. p.)	79,37	198	397	794
Total	100	250	500	1000

3.3. Medições e métodos de análise

Para mensurar o desempenho dos animais foram realizadas pesagens semanais das aves de cada boxe de 1 a 42 dias, e obtendo-se o Ganho de Peso (GP) de cada semana, através da média de peso das aves de cada boxe. A ração foi pesada semanalmente antes e depois da oferta para se obter os dados de Consumo Individual de Ração (CR), também através da média de consumo de cada boxe. A conversão alimentar (CA) foi obtida da razão entre o CR e o GP para cada boxe.

As variáveis acumuladas foram calculadas a partir da soma dos valores de GP, CR para cada fase: 1-21 dias, 1-35 dias e 1-42 dias (final). Para CA foi realizado

o cálculo a partir de GP e CR de cada período. A viabilidade em cada período também foi calculada considerando número de animais no começo e no final de cada semana. No 42º de idade das aves um animal de cada boxe foi eutanasiado por meio de deslocamento cervical, sem jejum prévio, para coleta de conteúdo intestinal da região do jejuno para análise da microbiota. Ademais, uma secção da mesma região foi para análise de morfologia e morfometria realizado no laboratório da Avicultura Integral e Patologia Animal (AVIPA) em Campinas-SP.

Para avaliação morfológica e morfométrica do intestino foi adaptada da metodologia ISI em processo de patente (INPI BR 1020150036019) descrita por (KRAIESKI *et al.*, 2017). Foram realizadas pelo laboratório, segundo a metodologia ISI a análise de morfometria em que as amostras foram incluídas em parafina e cortes de 5 µm foram montados em lâminas e corados com hematoxilina e eosina mais Alcian Blue; foi avaliada uma lâmina por ave e as vilosidades foram divididas em fundidas e normais. Dez vilosidades intestinais e dez criptas por lâmina foram avaliadas proporcionalmente à distribuição morfológica (fundida e normal), em objetiva de 10X (ou de 40X, caso houvesse necessidade de conferir alterações) de um microscópio óptico.

Nesta metodologia, é realizada uma avaliação morfologia com base em alterações ou lesões na mucosa intestinal, que recebem um escore de 0 a 3, em que 0 é a ausência de alteração e 3 é a alteração grave. Cada alteração recebe um Fator de Impacto (FI) para a função do órgão que varia de 1 a 3, em que 3 é o mais impactante. Para a avaliação do jejuno foram considerados Infiltrados Inflamatórios (FI=3), Congestão (FI=3), Descamação (FI=2), Coccidiose (FI=3), Grumos bacterianos (FI=3), Bastonetes (FI=3), Criptas Císticas (FI=3), Muco (FI=1), Necrose (FI=3) e Edema (FI=2). A somatória dos escores multiplicados pelos seus FI gerou uma nota geral para a morfologia do intestino.

Para microbiota foram avaliados através de plaqueamento do conteúdo jejunal a contagem de UFC/g (Unidades Formadoras de Colônia) de mesófilos e enterobactérias; após a contagem foi aplicado o logaritmo dos valores observados na base 10 para a realização das análises estatísticas.

3.4. Análise estatística

Os dados de desempenho foram submetidos ao teste de ANOVA pelo PROC MIXED do SAS 9.4 (SAS, 2013) em que o fator bloco foi considerado como efeito aleatório, enquanto os demais foram considerados efeitos fixos no modelo. Quando foi verificado um efeito significativo, as variáveis foram submetidas a uma comparação de médias pelo teste de Tukey-Kramer considerando um alfa de 5% de significância.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Desempenho

Os resultados de desempenho do experimento podem ser observados na Tabela 6. A inclusão do Aditivo (A250, A500, A1000) e do Antibiótico (CP) na primeira semana do experimento (1-7 dias) não acarretou diferenças significativas para nenhum dos parâmetros de desempenho avaliados ($p>0,05$). A média geral de ganho de peso (GP) nesse período foi de 146 g, peso vivo foi de 192 g, o consumo médio (CR) foi de 138 g e a conversão alimentar foi de 0,949.

O ganho de peso (GP) e o peso vivo (PV) das aves nas semanas de 8-14 dias e 15-21 dias para o tratamento CP foi superior ($p<0,0001$) aos demais tratamentos, assim como no período de total de 1-21 dias, indicando um efeito de melhorador de desempenho e um maior peso vivo proporcionado pela presença de enramicina na dieta destas aves.

O tratamento CP foi superior ao CN em 59 g para GP e 63 g em PV durante o período de 8-14 dias. De 15 a 21 dias foi observada uma diferença de 46 g para GP e de 108 g para PV entre CP e CN. Entre os demais tratamentos (A250, A500 e A1000) não houve grandes diferenças para GP e PV nos períodos de 8-14 e 15-21 dias, assim como entre eles e o CN, sendo o CP superior a todos os demais.

No período de 8-14 dias o consumo de ração (CR) pelo tratamento CP foi significativamente superior aos demais tratamentos, com exceção do tratamento A500 que não diferiu estatisticamente dos demais. Nesse mesmo período a conversão alimentar (CA) foi de 1,114 para CP e 1,207, 1,225 e 1,224 para A250, A500 e A1000 respectivamente, enquanto CN não diferiu dos demais com 1,191.

O CR nos períodos de 15-21 e no período total de 1-21 dias foi significativamente maior ($p<0,05$) para o tratamento com adição de enramicina (CP) sobre os demais. Apesar da CA não ter demonstrado diferenças claras entre os tratamentos no período de 15-21 dias, com exceção de A500 e CN que foram significativamente piores ($p<0,05$), o tratamento CP no período total de 1-21 foi melhor que os demais tratamentos, com conversão alimentar de 1,203 ($p<0,05$).

Isso também indica que as 3 doses do Aditivo (A250, A500 e A1000) não favoreceram o desempenho das aves nesse período inicial (1-21 dias), igualando-se

estatisticamente ao desempenho observado no tratamento CN, sem adição de nenhum melhorador de desempenho.

Na semana de 22-28 dias não foram observadas diferenças significativas para ganho de peso (GP), consumo de ração (CR) e conversão alimentar (CA) entre os tratamentos ($p>0,05$), mas para peso vivo (PV) aos 28 dias o tratamento CP foi significativamente superior aos outros tratamentos ($p<0,05$). Como não houve diferenças de desempenho nessa semana, a dependência dessa variável com desempenho obtido nas semanas anteriores se torna claramente observável.

O ganho de peso no período de 29-35 dias foi estatisticamente superior ($p<0,05$) na dieta de 500 mg/kg do Aditivo (A500) contendo ácidos orgânicos e polifenóis, com 811 g, em comparação ao controle negativo (CN), com 750 g, e a dieta de 250 mg/kg do Aditivo (A250), com 757 g. Para GP, nesse período, os tratamentos A1000 e CP não tiveram diferenças estatísticas com os demais tratamentos.

O consumo de ração (CR) do tratamento A500 nesse período também foi superior ao CN em 77 g, e ao A250 em 74 g ($p<0,02$). Na CA não houve diferenças significativas ($p=0,25$) mas houve a melhora de 0,019 na conversão das aves do A500 em comparação com as aves do CN, podendo sugerir que para esse período o produto foi eficaz como melhorador de desempenho e também promoveu uma ligeira diferença na conversão alimentar, porém não significativa. Para GP e CR os tratamentos CP e A1000 não diferiram estatisticamente dos demais ($p>0,05$).

Para o período total de 1-35 dias verifica-se que o tratamento CP resultou em aumento de 202 g no GP, 143 g no CR e melhora de 0,031 na CA comparado ao CN ($p<0,05$). Isto evidencia que as aves estavam submetidas a desafio sanitário, o qual foi superado com a utilização de enramicina. O tratamento A500 se destacou entre as três dosagens do aditivo, resultando em GP e CR que não diferiram do CP ($p>0,05$). Este tratamento resultou em aumento de 54 g no GP e 90 g no CR em relação ao CN, embora a diferença não seja significativa. As aves recebendo o aditivo nas dosagens A250 e A1000 tiveram GP, CR e CA inferiores ($p<0,05$) às aves do tratamento CP.

A semana de 36-42 dias foi marcada por temperaturas máximas acima dos 30°C (Figura 6), o que pode ter afetado o desempenho dos animais e efeito das dietas nesse período, já que segundo Paulino *et al.* (2019) a temperatura de conforto térmico para os frangos de corte de linhagem comercial nessa idade e faixa de peso

é abaixo de 28°C. Não houve diferenças significativas para GP, CR e CA ($p>0,05$) nesta semana, apenas para PV aos 42 dias ($p<0,04$) que é uma variável dependente do desempenho nas semanas anteriores, mas também com diferenças pouco claras entre os tratamentos. Além disso, os erros padrão da média das características observadas durante esse período foram maiores que os observados no restante do experimento.

No período total do experimento (1-42 dias) o GP não diferiu estatisticamente entre CP, CN, A250 e A500 ($p>0,05$), sendo somente A1000 pior que CP em 209 g ($p<0,01$). O peso vivo médio das aves no período total foi de 3443 g, também com exceção da diferença entre CP, com 3586 g, e A1000 com 3376 g, os demais tratamentos (A250, A500 e CN) não diferiram do CP. O CR do período total não diferiu estatisticamente ($p>0,05$), embora se observem maiores consumos para CP e A500 (5114 g e 5084 g, respectivamente), enquanto que a CA foi melhor para CP com 1,447, e pior para A500 com 1,493, os demais tratamentos não diferiram estatisticamente.

dias	GP	962 ^b	989 ^b	968 ^b	1001 ^b	1109 ^a	<,0001	14,58
	PV	1016 ^b	1036 ^b	1015 ^b	1048 ^b	1156 ^a	<,0001	14,36
	CR	1211 ^b	1256 ^b	1213 ^b	1251 ^b	1333 ^a	0,0003	17,35
	CA	1,257 ^b	1,270 ^b	1,253 ^b	1,248 ^b	1,203 ^a	<,0001	0,01
1-35 dias	GP	2498 ^b	2588 ^{ab}	2526 ^b	2535 ^b	2700 ^a	0,0002	28,78
	PV	2547 ^b	2634 ^{ab}	2574 ^b	2577 ^b	2744 ^a	0,0002	28,28
	CR	3437 ^b	3565 ^{ab}	3449 ^b	3475 ^{ab}	3618 ^a	0,0073	37,2
	CA	1,376 ^b	1,381 ^b	1,367 ^b	1,371 ^b	1,338 ^a	<,0001	0,006
1-42 dias	GP	3334 ^{ab}	3407 ^{ab}	3327 ^b	3367 ^{ab}	3536 ^a	0,0003	52,43
	PV	3386 ^{ab}	3452 ^{ab}	3376 ^b	3414 ^{ab}	3586 ^a	0,0385	52,79
	CR	4947	5084	4915	4975	5114	0,0792	56,38
	CA	1,484 ^{ab}	1,493 ^b	1,478 ^{ab}	1,478 ^{ab}	1,447 ^a	0,0274	0,011

¹ Tratamentos: CN= controle negativo; CP= NC + adição de enramicina 10 mg/kg; A250 = NC+ 250 mg/kg Aditivo; A500 = NC+ 500 mg/kg Aditivo; A1000 = NC+ 1000 mg/kg Aditivo;

² EPM: erro padrão da média;

^{a, b} Valores médios dentro de uma coluna com sobrescritos diferentes são estatisticamente diferentes pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Portanto, considerando o período total sugere-se que a dieta contendo a dose padrão do Aditivo promova maior consumo de ração pelos animais, porém isso não diferiu estatisticamente, e também não houve efeito positivo no GP, PV e CA.

Resultados semelhantes foram encontrados por Fascina (2017) com frangos alimentados com dietas contendo fontes naturais de polifenóis e ácidos orgânicos (30% de ácido láctico, 25% de ácido benzóico, 7% de ácido fórmico, 8% de ácido cítrico e 6,5% de ácido acético), que apresentaram menor ganho de peso corporal e pior conversão alimentar em comparação a dieta com o uso do antibiótico avilamicina e não diferiram estatisticamente do tratamento controle. Além disso, no período de 22-35 dias não houve diferenças entre os tratamentos para desempenho.

Em estudos feitos por Isabel (2009) com ácido fórmico e ácido propiônico, por Talebi *et al.* (2010) com ácidos orgânicos (ácidos cítrico, benzóico e tartárico) e por Kopecký *et al.* (2012) com ácido acético e cítrico também não houve diferenças significativas no desempenho dos frangos de corte.

Adil *et al.* (2011), utilizando uma dieta basal suplementada com ácido butírico, ácido fumárico e ácido lático, encontraram que as aves alimentadas com dietas suplementadas com ácidos orgânicos tiveram ganhos de peso corporal significativamente maiores que o tratamento controle e também melhora na conversão alimentar.

Em um estudo realizado por Simitzis *et al.* (2011) não foi observado efeito da suplementação dietética de hesperidina (1,5–3,0 g/kg) no peso corporal final, ganho de peso corporal e conversão alimentar. Em contrapartida, Hassan *et al.* 2018 encontraram efeito positivo do uso de rutina no ganho de peso de frangos alimentados com 0,25, 0,5 ou 1 g/kg de suplementação.

Apesar da cama utilizada no experimento ser reutilizada por diversos lotes o desafio sanitário oferecido por ela talvez não tenha sido suficiente para que o Aditivo demonstrasse efeito significativo sobre o desempenho dos animais, uma vez que as condições de campo muitas vezes são mais desafiadoras.

Considerando isoladamente a semana de 28-35 dias, em que poderia estar havendo um maior desafio sanitário (Figura 7, A e B), a dieta A500 proporcionou um ganho notável estatisticamente, assim como não diferiu do CP em questão de PV aos 35 dias, com um peso de 2634 g, se aproximando do peso de abate comercial, o que pode indicar que o uso desse tipo de produto na substituição dos antibióticos promotores de crescimento pode ter efeito sobre aves que estão em um maior nível de desafio. Também se observa uma promoção do consumo (CR) causada pelo tratamento A500 nesse período ($p < 0,05$). Apesar da CA não diferir estatisticamente entre os tratamentos é notável uma melhora linear nas médias quando se aumenta a dose do produto (Figura 7, D).

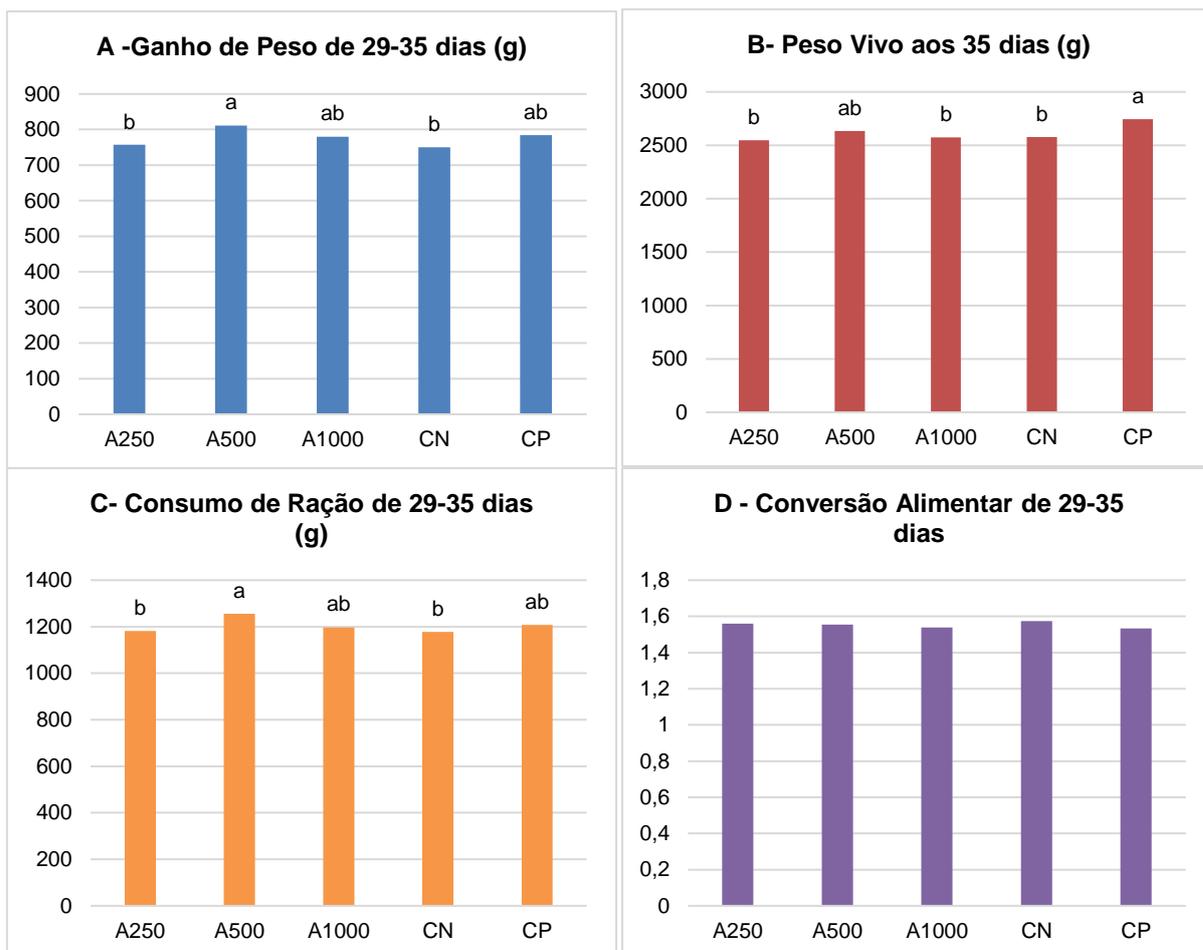


Figura 7. Gráfico de Ganho de Peso (A), Peso Vivo (B), Consumo de Ração (C) e Conversão Alimentar (D) de frangos de corte alimentados com Aditivo no período de 29-35 dias

4.2. Microbiota, morfologia e morfometria do jejuno

As análises laboratoriais de microbiota (Tabela 7), considerando mesófilos e enterobactérias, não demonstraram diferenças muito claras entre os tratamentos embora haja significância estatística, pois, apesar do CP ter demonstrado menores valores de mesófilos em comparação ao CN, essa diferença não foi significativa. Para enterobactérias a estatística não encontrou diferenças entre os tratamentos ($p > 0,05$).

A altura de vilosidades e profundidade de cripta do jejuno também não sofreram alterações estatisticamente significativas devido às diferentes dietas, embora se observem menores valores para o tratamento com enramicina (CP). A razão entre altura de vilosidades e profundidade de cripta não diferiu estatisticamente ($p > 0,05$).

Tabela 7. Análises de Morfologia, Morfometria, e Microbiota do Jejuno de frangos de corte alimentados com Aditivo de 1-42 dias.

Parâmetros	A250	A500	A1000	CN	CP	p-valor	SEM
Mesófilos (\log_{10} *UFC/g)	4,92 ^b	4,32 ^{ab}	4,35 ^{ab}	4,57 ^{ab}	4,11 ^a	0,0457	0,21
Enterobactérias (\log_{10} *UFC/g)	5,19	5,74	6,35	6,07	5,76	0,2944	0,47
Altura de Vilosidades (μm)	1446	1255	1199	1485	1291	0,0936	85,78
Profundidade de Cripta (μm)	150	150	158	163	147	0,8367	11,78
Relação Vilo-Cripta	9,86	8,55	7,66	9,27	9,35	0,3352	0,78
Morfologia do intestino	4	3,71	3,71	6,00	5,29	0,7221	1,26

Tratamentos: CN= controle negativo; CP= NC + adição de enramicina 10 mg/kg; A250 = NC+ 250 mg/kg Aditivo; A500 = NC+ 500 mg/kg Aditivo; A1000 = NC+ 1000 mg/kg Aditivo.

²EPM: erro padrão da média.

^{a, b} Valores médios dentro de uma linha com sobrescritos diferentes são estatisticamente diferentes pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Mustafa *et al.* (2021) também não observaram mudanças na morfologia jejunal em aves suplementadas com ácidos orgânicos em comparação ao tratamento controle. Assim como Polycarpo *et al.* (2016) não encontraram diferenças significativas na microbiota, em especial enterobactérias, do jejuno em aves suplementadas com uma mistura de ácido lático, ácido acético e ácido butírico, bem como não houve diferenças de desempenho.

Em um estudo realizado por Yang *et al.* (2018) utilizando de um grupo controle negativo, sem aditivos, um grupo com antibiótico com 0,15 g/kg de enramicina e um grupo com adição de 0,30 g/kg de ácidos orgânicos encapsulados e óleos essenciais, o grupo com ácidos orgânicos apresentou uma melhor taxa de conversão alimentar, embora a dieta com enramicina tenha sido mais eficiente na diminuição da contagem microbiológica. A suplementação com ácidos orgânicos tendeu a reduzir o pH da digesta jejunal melhorando assim a conversão alimentar.

4.3. Viabilidade

Para viabilidade (Tabela 7) não houve diferenças significativas para nenhum dos cenários avaliados ($p > 0,05$), embora se observe menores médias de viabilidade para o tratamento CP contendo enramicina no período total de 1 a 42 dias. As perdas por mortalidade e refugagem foram superiores a 5% somente para o

tratamento suplementado com enramicina, o que pode estar relacionado ao ganho de peso mais acelerado das aves desse tratamento. O erro padrão da média considerando o período total do experimento também foi maior que nos demais períodos, indicando aumento do erro experimental na última semana experimental.

Tabela 8. Viabilidade de frangos de corte suplementados com Aditivo à base de ácidos orgânicos e polifenóis.

Tratamentos	Período		
	1-21 dias	1-35 dias	1-42 dias
A250	99,29	98,21	97,50
A500	98,93	97,50	96,78
A1000	99,29	98,21	97,50
CN	97,86	97,85	96,78
CP	98,21	96,07	94,64
SEM	0,57	0,90	1,21
p-valor	0,2972	0,4428	0,4626

Tratamentos: CN= controle negativo; CP= NC + adição de enramicina 10 mg/kg; A250 = NC+ 250 mg/kg Aditivo; A500 = NC+ 500 mg/kg Aditivo; A1000 = NC+ 1000 mg/kg Aditivo.

² EPM: erro padrão da média.

^{a, b} Valores médios dentro de uma linha com sobrescritos diferentes são estatisticamente diferentes pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

5. CONCLUSÃO

A inclusão do Aditivo à base de ácidos orgânicos e mosto de tangerina em diferentes níveis (250, 500 e 1000 mg/kg) não demonstrou efeito no desempenho de frangos de corte em comparação à dieta controle negativo e ao controle positivo com inclusão do antibiótico enramicina considerando o período total. O aditivo também não promoveu alterações na contagem de micro-organismos, morfologia e morfometria do jejuno e na viabilidade. Quando observado de forma isolada no período de 29-35 dias o tratamento com 500 mg/kg do Aditivo melhorou o ganho de peso e o consumo de ração dos animais, mas não teve efeito sobre a conversão alimentar.

REFERÊNCIAS

- ABDELLI, N.; SOLÀ-ORIO, D.; PÉREZ, J. F. **Phytogenic feed additives in poultry: Achievements, prospective and challenges***Animals*MDPI, 1 dez. 2021.
- ABPA. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PROTEÍNA ANIMAL. **Relatório anual, 2022**.
- ADAMS, M. A.; CHEN, Z.; LANDMAN, P.; COLMER, T. D. Simultaneous Determination by Capillary Gas Chromatography of Organic Acids, Sugars, and Sugar Alcohols in Plant Tissue Extracts as Their Trimethylsilyl Derivatives. **Analytical Biochemistry**, v. 266, n. 1, p. 77–84, jan. 1999. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003269798929062>>.
- ADIL, S.; BANDAY, M. T.; BHAT, G. A.; QURESHI, S. D.; WANI, S. A. Effect of supplemental organic acids on growth performance and gut microbial population of broiler chicken. **Livestock Research for Rural Development**, v. 23, n. 1, p. 1–8, 2011.
- AHSAN, U.; CENGİZ, Ö.; RAZA, I.; KUTER, E.; CHACHER, M. F. A.; IQBAL, Z.; UMAR, S.; ÇAKIR, S. Sodium butyrate in chicken nutrition: the dynamics of performance, gut microbiota, gut morphology, and immunity. **World's Poultry Science Journal**, v. 72, n. 2, p. 265–275, 1 jun. 2016. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1017/S0043933916000210>>.
- ARTONI, S. M. B.; NAKAGHI, L. S.; BORGES, L. L.; MACARI, M. Sistema Digestório das Aves. *In*: SAKOMURA, N. ET AL. **Nutrição de Não Ruminantes**. Jaboticabal: Funep, 2014. p. 1–17.
- BALASUNDRAM, N.; SUNDRAM, K.; SAMMAN, S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. **Food Chemistry**, v. 99, n. 1, p. 191–203, jan. 2006. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814605006242>>.
- BASHEER, L.; KEREM, Z. Interactions between CYP3A4 and Dietary Polyphenols. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2015, p. 1–15, 2015. Disponível em: <<http://www.hindawi.com/journals/omcl/2015/854015/>>.
- BISCHOFF, K. M. et al. Antimicrobial use in food animals: Potential alternatives. *In*: **Encyclopedia of Animal Science**. [s.l: s.n.]p. 45–47.
- BOOTH, I. R. Regulation of cytoplasmic pH in bacteria. **Microbiological Reviews**, v. 49, n. 4, p. 359–378, 1985.
- BRASIL. **Instrução Normativa no 45, de 22 de Novembro de 2016**Diário Oficial da União, 30 nov. 2016.

BRASIL. **PORTARIA Nº 171, DE 13 DE DEZEMBRO DE 2018. Informa sobre a intensão de proibição de uso de antimicrobianos com a finalidade de aditivos melhoradores de desempenho de alimentos e abre prazo manifestação.** Brasília. Diário Oficial da União, 19 dez. 2018.

BROOM, L. J. The sub-inhibitory theory for antibiotic growth promoters. **Poultry Science**, v. 96, n. 9, p. 3104–3108, set. 2017. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0032579119315159>>.

CELI, P.; COWIESON, A. J.; FRU-NJI, F.; STEINERT, R. E.; KLUENTER, A.-M.; VERLHAC, V. Gastrointestinal functionality in animal nutrition and health: New opportunities for sustainable animal production. **Animal Feed Science and Technology**, v. 234, p. 88–100, dez. 2017.

CROZIER, A.; JAGANATH, INDU B. CLIFFORD, M. N. Phenols, polyphenols and tannins: an overview. *In: Plant secondary metabolites: Occurrence, structure and role in the human diet.* [s.l.: s.n.]p. 1–25.

DIAZ CARRASCO, J. M.; CASANOVA, N. A.; FERNÁNDEZ MIYAKAWA, M. E. Microbiota, Gut Health and Chicken Productivity: What Is the Connection? **Microorganisms**, v. 7, n. 10, p. 374, 20 set. 2019.

DIBNER, J. J.; BUTTIN, P. Use of Organic Acids as a Model to Study the Impact of Gut Microflora on Nutrition and Metabolism. **Journal of Applied Poultry Research**, v. 11, n. 4, p. 453–463, dez. 2002.

DIBNER, J. J.; RICHARDS, J. D. Antibiotic growth promoters in agriculture: history and mode of action. **Poultry Science**, v. 84, n. 4, p. 634–643, abr. 2005.

ERB, M.; KLIEBENSTEIN, D. J. Plant Secondary Metabolites as Defenses, Regulators, and Primary Metabolites: The Blurred Functional Trichotomy. **Plant Physiology**, v. 184, n. 1, p. 39–52, set. 2020. Disponível em: <<https://academic.oup.com/plphys/article/184/1/39-52/6117814>>.

FASCINA, V.; PASQUALI, G.; CARVALHO, F.; MURO, E.; VERCESE, F.; AOYAGI, M.; PEZZATO, A.; GONZALES, E.; SARTORI, J. Effects of Phytogenic Additives and Organic Acids, alone or in combination, on the Performance, Intestinal Quality and Immune Responses of Broiler Chickens. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v. 19, n. 3, p. 497–508, set. 2017. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-635X2017000300497&lng=en&tlng=en>.

FLEMING-DUTRA, K. E.; HERSH, A. L.; SHAPIRO, D. J.; BARTOCES, M.; ENNS, E. A.; FILE, T. M.; FINKELSTEIN, J. A.; GERBER, J. S.; HYUN, D. Y.; LINDER, J. A. Prevalence of inappropriate antibiotic prescriptions among US ambulatory care visits, 2010-2011. **Jama**, v. 315, n. 17, p. 1864–1873, 2016.

GAYNES, R. The Discovery of Penicillin—New Insights After More Than 75 Years of Clinical Use. **Emerging Infectious Diseases**, v. 23, n. 5, p. 849–853, maio 2017.

GRACE, D. **Review of evidence on antimicrobial resistance and animal agriculture in developing countries.** [s.l: s.n.]. Disponível em: <<https://www.gov.uk/dfid-research-outputs/review-of-evidence-on-antimicrobial-resistance-and-animal-agriculture-in-developing-countries-201309>>.

HASSAN, F.; ROUSHDY, E.; KISHAWY, A.; ZAGLOOL, A.; TUKUR, H.; SAADELDIN, I. Growth Performance, Antioxidant Capacity, Lipid-Related Transcript Expression and the Economics of Broiler Chickens Fed Different Levels of Rutin. **Animals**, v. 9, n. 1, p. 7, 22 dez. 2018. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/2076-2615/9/1/7>>.

HELLWEG, P. et al. Impact of potassium diformate on gut flora of weaned piglets. **Proceedings of the Society of Nutritional Physiology**, p. 63, 2006.

HUYGHEBAERT, G.; DUCATELLE, R.; IMMERSEEL, F. Van. An update on alternatives to antimicrobial growth promoters for broilers. **The Veterinary Journal**, v. 187, n. 2, p. 182–188, fev. 2011. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1090023310000869>>.

IQBAL, Y.; COTTRELL, J. J.; SULERIA, H. A. R.; DUNSHEA, F. R. **Gut microbiota-polyphenol interactions in chicken: A review** **Animals** MDPI AG, 1 ago. 2020.

ISABEL, B.; SANTOS, Y. Effects of dietary organic acids and essential oils on growth performance and carcass characteristics of broiler chickens. **Journal of Applied Poultry Research**, v. 18, n. 3, p. 472–476, out. 2009. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S105661711930563X>>.

JIANG, X.-R.; ZHANG, H.-J.; WANG, J.; WU, S.-G.; YUE, H.-Y.; LÜ, H.-Y.; CUI, H.; BONTEMPO, V.; QI, G.-H. Effect of dried tangerine peel extract supplementation on the growth performance and antioxidant status of broiler chicks. **Italian Journal of Animal Science**, v. 15, n. 4, p. 642–648, 30 out. 2016. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/1828051X.2016.1222246>>.

KIM, J. W.; KIM, J. H.; DONG, ; KIL, Y.; KIL, D. Y. **Original articles Literature Reviews Dietary organic acids for broiler chickens: a review** **Ácidos orgánicos en la dieta de pollos de engorde: revisión de literatura Dietas ácidos orgânicos sobre frangos de corte: revisão de literatura** **Rev Colomb Cienc Pecu.** [s.l: s.n.].

KIRCHHELLE, C. **Pyrrhic Progress.** New Brunswick: Rutgers University Press, 2020. 451 p.

KOPECKÝ, J.; HRNČÁR, C.; WEIS, J. Effect of organic acids supplement on performance of broiler chickens. **Animal Sciences and Biotechnologies**, v. 45, n. 1, p. 51–54, 2012.

- KRAIESKI, A. L.; HAYASHI, R. M.; SANCHES, A.; ALMEIDA, G. C.; SANTIN, E. Effect of aflatoxin experimental ingestion and Eimeira vaccine challenges on intestinal histopathology and immune cellular dynamic of broilers: applying an Intestinal Health Index. **Poultry Science**, v. 96, n. 5, p. 1078–1087, maio 2017. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0032579119312763>>.
- LANDERS, T. F.; COHEN, B.; WITTUM, T. E.; LARSON, E. L. A Review of Antibiotic Use in Food Animals: Perspective, Policy, and Potential. **Public Health Reports**, v. 127, n. 1, p. 4–22, 1 jan. 2012.
- LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Principles of Biochemistry**. 2. ed. New York: 33 Irving Place, 1993. 1090 p.
- MENTEN, J. F. M. et al. Antibióticos, ácidos orgânicos e óleos essenciais na nutrição de monogástricos. In: SAKOMURA NK; SILVA JHV; COSTA FGP. **Nutrição de Não-Ruminantes**. Jaboticabal: FUNEP, 2014. p. 511–536.
- MUSTAFA, A.; BAI, S.; ZENG, Q.; DING, X.; WANG, J.; XUAN, Y.; SU, Z.; ZHANG, K. Effect of organic acids on growth performance, intestinal morphology, and immunity of broiler chickens with and without coccidial challenge. **AMB Express**, v. 11, n. 1, p. 1–18, 2021.
- NGUYEN, D. H.; LEE, K. Y.; MOHAMMADIGHEISAR, M.; KIM, I. H. Evaluation of the blend of organic acids and medium-chain fatty acids in matrix coating as antibiotic growth promoter alternative on growth performance, nutrient digestibility, blood profiles, excreta microflora, and carcass quality in broilers. **Poultry Science**, v. 97, n. 12, p. 4351–4358, dez. 2018.
- ÖSTLING, C. E.; LINDGREN, S. E. Inhibition of enterobacteria and Listeria growth by lactic, acetic and formic acids. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 75, n. 1, p. 18–24, jul. 1993. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2672.1993.tb03402.x>>.
- PANDOLFI, J. M. S. O futuro da avicultura comercial no cenário de retirada de antimicrobianos como melhoradores de desempenho. . **Embrapa Suínos e Aves-Artigo em periódico indexado (ALICE)**, 2020.
- PARTANEN, K. Organic acids-their efficacy and modes of action in pigs. **Gut environment in pigs/A. Piva**, 2001.
- PARTANEN, K. H.; MROZ, Z. Organic acids for performance enhancement in pig diets. **Nutrition Research Reviews**, v. 12, n. 1, p. 117–145, 24 jun. 1999. Disponível em: <https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S0954422499000050/type/journal_article>.

PAULINO, M. T. F.; OLIVEIRA, E. M. de; GRIESER, D. de O.; TOLEDO, J. B. Criação de frangos de corte e acondicionamento térmico em suas instalações: Revisão. **Pubvet**, v. 13, n. 2, p. 1–14, fev. 2019. Disponível em: <<http://www.pubvet.com.br/artigo/5731/criaccedilatildeo-de-frangos-de-corte-e-acondicionamento-teacutermico-em-suas-instalaccedilotildees-revisatildeo>>.

POLYCARPO, G. V; BURBARELLI, M. F. C.; CARAO, A. C. P.; MERSEGUEL, C. E. B.; DADALT, J. C.; MAGANHA, S. R. L.; SOUSA, R. L. M.; CRUZ-POLYCARPO, V. C.; ALBUQUERQUE, R. de. Effects of lipid sources, lysophospholipids and organic acids in maize-based broiler diets on nutrient balance, liver concentration of fat-soluble vitamins, jejunal microbiota and performance. **British Poultry Science**, v. 57, n. 6, p. 788–798, 2016.

POOLE, T.; SHEFFIELD, C. Use and misuse of antimicrobial drugs in poultry and livestock: Mechanisms of antimicrobial resistance. 2013.

RAVINDRAN, V.; KORNEGAY, E. T. Acidification of weaner pig diets: A review. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 62, n. 4, p. 313–322, 1993. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jsfa.2740620402>>.

RICKE, S. Perspectives on the use of organic acids and short chain fatty acids as antimicrobials. **Poultry Science**, v. 82, n. 4, p. 632–639, abr. 2003.

ROSTAGNO, H. S.; ALBINO, L. F. T.; HANNAS, M. I.; DONZELE, J. L.; SAKOMURA, N. K.; PERAZZO, F. G.; SARAIVA, A.; TEIXEIRA, M. L.; RODRIGUES, P. B.; OLIVEIRA, R. F. de; BARRETO, S. L. de T.; BRITO, C. O. **Tabelas Brasileiras para Aves e Suínos**. 4. ed. Viçosa : Departamento de Zootecnia: UFV, 2017. 488 p.

RUSSELL, J. B. Another explanation for the toxicity of fermentation acids at low pH: anion accumulation versus uncoupling. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 73, n. 5, p. 363–370, nov. 1992. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2672.1992.tb04990.x>>.

SANTOS, É. C. dos et al. Uso de aditivos promotores de crescimento sobre o desempenho. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 29, n. 1, p. 223–231, 2005.

SAS. **Base SAS® 9.4 Procedures Guide: Statistical Procedures**. 2nd. ed. Cary, NC, USA: SAS Institute Inc., 2013.

SCHMIDT, N. S.; DA SILVA, C. L. Pesquisa e desenvolvimento na cadeia produtiva de frangos de corte no Brasil. **Revista de Economia e Sociologia Rural**, v. 56, n. 3, p. 467–482, 1 jul. 2018.

SCICUTELLA, F.; MANNELLI, F.; DAGHIO, M.; VITI, C.; BUCCIONI, A. Polyphenols and Organic Acids as Alternatives to Antimicrobials in Poultry Rearing: A Review. **Antibiotics**, v. 10, n. 8, p. 1010, 20 ago. 2021. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2079-6382/10/8/1010>>.

- SIMITZIS, P. E.; SYMEON, G. K.; CHARISMIADOU, M. A.; AYOUTANTI, A. G.; DELIGEORGIS, S. G. The effects of dietary hesperidin supplementation on broiler performance and chicken meat characteristics. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 91, n. 2, p. 275–282, jun. 2011. Disponível em: <<http://www.nrcresearchpress.com/doi/10.4141/cjas10094>>.
- SMITH, H. W. Observations on the flora of the alimentary tract of animals and factors affecting its composition. **Journal of Pathology & Bacteriology**, v. 89, p. 95–122, 1965.
- SMITH, J. A. Experiences with drug-free broiler production. **Poultry Science**, v. 90, n. 11, p. 2670–2678, 2011.
- SOLOMONS, G.; FRYHLE, C. **Química Orgânica**. Rio de Janeiro: LTC Livros Técnicos e Científicos, 2002.
- STRAUSS, G.; HAYLER, R. Effects of organic acids on microorganisms. **Kraftfutter**, v. 4, p. 147–151, 2001.
- SUGIHARTO, S. Role of nutraceuticals in gut health and growth performance of poultry. **Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences**, v. 15, n. 2, p. 99–111, jun. 2016.
- TALEBI, E.; ZAREI, A.; ABOLFATHI, M. E. Influence of three different organic acids on broiler performance. **Asian Journal of Poultry Science**, v. 4, n. 1, p. 7–11, 2010.
- TARRADAS, J.; TOUS, N.; ESTEVE-GARCIA, E.; BRUFAU, J. The Control of Intestinal Inflammation: A Major Objective in the Research of Probiotic Strains as Alternatives to Antibiotic Growth Promoters in Poultry. **Microorganisms**, v. 8, n. 2, p. 148, 21 jan. 2020. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2076-2607/8/2/148>>.
- THAKUR, S.; GRAY, G. C. **The Mandate for a Global “One Health” Approach to Antimicrobial Resistance Surveillance**. *The American journal of tropical medicine and hygiene* fev. 2019.
- TOROK, V. A.; ALLISON, G. E.; PERCY, N. J.; OPHEL-KELLER, K.; HUGHES, R. J. Influence of Antimicrobial Feed Additives on Broiler Commensal Posthatch Gut Microbiota Development and Performance. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 10, p. 3380–3390, 15 maio 2011.
- TORRES¹, R. de N. S.; DREHER, A.; SIMIONI, T. A. Uso de antibióticos como promotor de crescimento e seus possíveis substitutos ao seu uso em frangos de corte. **Nutritime Revista Eletrônica(Viçosa)**, v. 12, n. 6, p. 4348–4358, 2015.
- TSAO, R. Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols. **Nutrients**, v. 2, n. 12, p. 1231–1246, 10 dez. 2010. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/2072-6643/2/12/1231>>.

VENTOLA, C. L. The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. **P & T: a peer-reviewed journal for formulary management**, v. 40, n. 4, p. 277–83, abr. 2015.

VICTOR, M.; LEITE, J.; RAMOS, G.; DAVID, J.; CARDOSO, K. UTILIZAÇÃO DE BIOMASSA EM AULAS DE GRADUAÇÃO DE QUÍMICA ORGÂNICA EXPERIMENTAL: EXTRAÇÃO DE FLAVONOIDES A PARTIR DE RESÍDUOS DE CASCAS DE FRUTAS CÍTRICAS. **Química Nova**, 2020. Disponível em: <http://quimicanova.sbq.org.br/audiencia_pdf.asp?aid2=9162&nomeArquivo=ED2020-0141.pdf>.

VIVEROS, A.; CHAMORRO, S.; PIZARRO, M.; ARIJA, I.; CENTENO, C.; BRENES, A. Effects of dietary polyphenol-rich grape products on intestinal microflora and gut morphology in broiler chicks. **Poultry Science**, v. 90, n. 3, p. 566–578, mar. 2011. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0032579119419470>>.

VLAICU, P. A.; UNTEA, A. E.; PANAITI, T. D.; TURCU, R. P. Effect of dietary orange and grapefruit peel on growth performance, health status, meat quality and intestinal microflora of broiler chickens. **Italian Journal of Animal Science**, v. 19, n. 1, p. 1394–1405, 14 dez. 2020. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/1828051X.2020.1845576>>.

WANG, F.; CHEN, L.; CHEN, H.; CHEN, S.; LIU, Y. Analysis of Flavonoid Metabolites in Citrus Peels (*Citrus reticulata* “Dahongpao”) Using UPLC-ESI-MS/MS. **Molecules**, v. 24, n. 15, p. 2680, 24 jul. 2019. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/1420-3049/24/15/2680>>.

YANG, X.; XIN, H.; YANG, C.; YANG, X. Impact of essential oils and organic acids on the growth performance, digestive functions and immunity of broiler chickens. **Animal Nutrition**, v. 4, n. 4, p. 388–393, dez. 2018.