



**UDESC**

**UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA – UDESC**

**CENTRO DE EDUCAÇÃO SUPERIOR DO OESTE – CEO**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA**

**USO DE BLEND COMERCIAL À BASE DE EMULSIFICANTE,  
MONOLAURINA, GLICEROL E ÁCIDO BUTÍRICO NA DIETA  
DE FRANGOS DE CORTE**

**AMANDA BRENTANO ALMEIDA**

**Chapecó, 2020**

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

Almeida, Amanda Brentano Almeida

Uso de blend comercial à base de emulsificante, monolaurina, glicerol e ácido butírico na dieta de frangos de corte / Amanda Brentano Almeida Almeida. -- 2020.

58 p.

Orientadora: Denise Nunes Araujo Araujo

Coorientador: Aleksandro Schaffer da Silva Silva

Coorientadora: Lenita de Cássia Moura Stefani Stefani

Dissertação (mestrado) -- Universidade do Estado de Santa Catarina, Centro de Educação Superior do Oeste, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Chapecó, 2020.

1. Ácidos Orgânicos. 2. Estresse Oxidativo. 3. Lecitina Hidrolisada. 4. Monolaurato de Glicerol. I. Araujo, Denise Nunes Araujo. II. Silva, Aleksandro Schaffer da Silva. Stefani, Lenita de Cássia Moura Stefani. III. Universidade do Estado de Santa Catarina, Centro de Educação Superior do Oeste, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia. IV. Título.

**AMANDA BRENTANO ALMEIDA**

**USO DE BLEND COMERCIAL Á BASE DE EMULSIFICANTE,  
MONOLAURINA, GLICEROL E ÁCIDOS BUTÍRICO NA DIETA  
DE FRANGOS DE CORTE**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Área de Concentração Ciência e Produção Animal, da Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC), como requisito parcial para obtenção de grau de **Mestre em Zootecnia**

**Orientadora: Dra. Denise Nunes Araujo**

Co-orientadores: Dr. Aleksandro Schafer da Silva

PhD. Lenita de Cassia Moura Stefani

Chapecó, SC, Brasil  
**Universidade do Estado de Santa Catarina**  
**UDESC Oeste**  
**Programa de Pós-Graduação em Zootecnia**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,  
aprova a Dissertação de Mestrado

**Uso de blend comercial à base de emulsificante, monolaurina, glicerol e  
ácidos butírico na dieta de frangos de corte**

Elaborada por  
**Amanda Brentano Almeida**

como requisito parcial para obtenção do grau de  
**Mestre em Zootecnia**

Comissão Examinadora:



---

Dra. Denise Nunes Araujo (UDESC/CEO)



---

Dra. Lilian Francisco Arantes de Souza (UFRPE)



---

Dr. Marcel Manente Boiago (UDESC/CEO)

Chapecó, 16 de dezembro de 2020.

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente agradeço a Deus, pela dádiva da vida, por ser e estar, por realizar todos os dias, pelo caminho que tracei até hoje, e por me propiciar tudo a mais que sou grata, obrigado por sempre ter a sabedoria de buscá-lo.

Agradeço a minha família por estar ao meu lado em todos os momentos, e sinto muita gratidão pois este momento possuo graças a eles, obrigada meu filho amado, ao meu marido que está comigo nesta caminhada e não menos importante agradeço aos meus pais que me orientam, me auxiliaram e não medem esforços por mim.

Sou grata a minha professora orientadora Dra. Denise Nunes Araujo, por encarar o desafio de chegarmos até aqui juntas, sendo uma orientadora mais que dentro da UDESC, mas na vida.

Agradeço aos meus co-orientadores Aleksandro Schafer da Silva e Lenita de Cassia Moura Stefani, por estarem comigo me passando seus conhecimentos e me auxiliando nesta etapa da vida, me permitindo chegar até aqui. Sou grata também ao professor Dr. Marcel Manente Boiago por nos auxiliar de forma tão importante no estudo.

Tenho imensa gratidão aos meus colegas, que caminharam este percurso ao meu lado, sabendo que me propiciaram, momentos, estudos, conhecimentos, e principalmente amizade.

## RESUMO

Dissertação de Mestrado  
Programa de Pós-Graduação em Zootecnia  
Universidade do Estado de Santa Catarina

### **USO DE BLEND COMERCIAL Á BASE DE EMULSIFICANTE, MONOLAURINA, GLICEROL E ÁCIDOS BUTÍRICO NA DIETA DE FRANGOS DE CORTE**

AUTOR: AMANDA BRENTANO ALMEIDA  
ORIENTADORA: DENISE NUNES ARAUJO  
Chapecó, 16 de dezembro de 2020

O banimento da utilização de melhoradores de desempenho nas dietas pode causar impactos negativos no desempenho dos frangos de corte e a busca por aditivos alternativos é constante. O monolaurato de glicerol (GML) quando adicionado na dieta animal pode exercer funções antimicrobianas e antiparasitárias, o que pode influenciar de maneira positiva índices zootécnicos. A suplementação de ácido butírico é capaz de melhorar parâmetros de desempenho, saúde do trato gastrointestinal, desenvolvimento de vilosidades e qualidade de carcaça de frangos de corte. A utilização de emulsificantes permite melhorar a energia dos óleos, permitindo a redução da inclusão e custo das rações. O objetivo deste trabalho foi avaliar se a inclusão do blend comercial, a base de emulsificante, monolaurina, glicerol, ácidos butíricos na dieta de frangos de corte tem efeitos positivos sobre desempenho zootécnico e saúde das aves. Foram utilizadas 225 aves divididas em três tratamentos, TN controle negativo recebendo uma ração basal, TP sendo o controle positivo que além da dieta basal recebia o antibiótico enramicina e o T-FRA grupo que recebeu na dieta o *blend* e 0,8% de óleo a menos na dieta. O desempenho foi avaliado por meio de ganho de peso, consumo de ração, conversão alimentar (CA) aos 21, 35 e 42 dias; análises de microbiologia da cama e fezes, coleta de sangue para análise de bioquímica sérica, e coleta de intestino foram realizados aos 21 e 42 dias, além da coleta de intestino, aos 42 dias coletou-se fígado e musculo para perfil de oxidantes e antioxidantes; análise estatística utilizada foi teste tukey. Análise de concentração inibitória mínima (MIC) e um exame parasitológico de fezes também foram realizados ao final do experimento. Aos 21 dias houve alteração no consumo de ração e conversão alimentar, sendo o TN a pior conversão, aos 35 dias a pior CA foi do grupo TN; aos 42 dias os grupos não se diferenciaram entre si. Não houve diferença na eficiência produtiva entre os grupos. Verificou-se que o produto apresentou redução na carga de bactérias patogênicas, principalmente aos 21 dias, porém sem diferença estatística. a concentração inibitória mínima encontrada foi de 110mg do produto por mL, quando testada a bactéria *E. coli*. Na análise de bioquímica sérica do sangue o único parâmetro que houve diferença foi no colesterol, sendo o maior valor do grupo T-FRA diferenciando-se do grupo TN. O parâmetro de espécies reativas a oxigênio (ROS) aos 21 dias foi maior no T-FRA que TN e aos 42 inverteu-se sendo TN maior que T-FRA e TP, no musculo TN e TP foram maiores que T-FRA e no fígado T-FRA assemelhou-se dos demais tratamentos. Nas substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (T-BARS) diferiu-se somente aos 42 dias no tecido do intestino onde T-FRA foi menor que os demais grupos. Analisando as enzimas glutathione S-transferase (GST) o grupo T-FRA foi maior aos 21 e 42 dias no intestino e no musculo foi inferior ao TN. Quando analisando Tióis o grupo T-FRA só não foi

superior aos 21 dias onde os grupos não deferiram. Notamos um resultado positivo para uma possível substituição do antimicrobiano pelo *blend* testado, sendo que o mesmo gerou economia de óleo utilizado na dieta.

**Palavras-chave:** Ácidos orgânicos, Estresse Oxidativo, Lecitina hidrolisada, Monolaurato de glicerol.

## **ABSTRACT**

Master's Dissertation  
Programa de Pós-Graduação em Zootecnia  
Universidade do Estado de Santa Catarina

# **USE OF COMMERCIAL BLEND BASED ON EMULSIFIER, MONOLAURIN, GLYCEROL AND BUTYRIC AND IN THE DIET OF CHICKEN BROILER**

AUTHOR: AMANDA BRENTANO ALMEIDA

ADVISER: DENISE NUNES ARAUJO

Chapecó, Dezember 16<sup>th</sup>, 2020

To remove antibiotics from diets, new strategic alternatives are sought to reduce the possible negative effects on the performance of animals that the removal of the antimicrobial would cause on health. Glycerol monolaurate (GML) when added to the animal diet has antimicrobial and antiparasitic functions, positively influencing zootechnical indexes such as weight gain, finishing phase, generating a higher growth than that generated with the use of antibiotics. Butyric acid supplementation can improve performance parameters, gastrointestinal tract health, villus development and broiler carcass quality, making them similar to those obtained with growth-promoting antibiotic. The use of emulsifiers is an alternative that allows to improve the net energy of the oils, allowing the reduction of their inclusion and consequently the cost of the rations. Thus, the objective is to test whether the inclusion of the commercial blend, based on emulsifier, monolaurin, glycerol, butyric acids and silicic in the diet of broilers has positive effects on zootechnical performance and health of birds. Two hundred twenty-five birds were used divided into three treatments, TN negative control receiving a basal ration, TP being the positive control that in addition to the basal diet received the antibiotic enramycin and the T-FRA group that received the blend and 8 kg less oil in the diet. The animals were weighed at 21, 35 and 42 days, in addition to checking their feed intake; microbiology analyzes of bed and feces, blood collection for serum biochemistry analysis, and intestine collection were performed at 21 and 42 days, in addition to intestine collection, at 42 days liver and muscle were collected for oxidant and antioxidant profiles. MIC analysis and a parasitological examination of feces were also performed at the end of the experiment. At 21 days there was a change in feed consumption and feed conversion, with TN being the greatest result and T-FRA was not different from the others, at 35 days the worst FC was of the TN group, whereas T-FRA was not different from the others; at 42 days the groups did not differ from each other. There was no difference in productive efficiency between groups. It was found that the product tended to reduce the load of pathogenic bacteria, especially at 21 days. The minimum inhibitory concentration found was 110mg of the product per mL, when the E. coli bacteria was tested. In the analysis of serum blood biochemistry, the only parameter that showed a difference was cholesterol, with the highest value in the T-FRA group differing from the TN group. The ROS parameter at 21 days was greater in T-FRA than TN and at 42 it was inverted being TN greater than T-FRA and TP, in the TN and TP muscle they were greater than T-FRA and in the liver T-FRA was similar to other treatments. T-BARS differed only at 42 days in the intestinal tissue where T-FRA was lower than the other groups. Analyzing the GST enzyme, the T-FRA group was greater at 21 and 42 days in the intestine and the muscle it was lower than

the TN. When analyzing Tois, the T-FRA group only did not exceed 21 days where the groups did not defer. Comparing the use of the product with antibiotics, we noticed a positive result for a possible replacement of the antimicrobial, given that there were no extreme differences between the treatments, noting that the diet that used the blend had a saving of oil used in the diet.

Keywords: Glycerol monolaurate, Hydrolyzed Lecithin, Organic acid, Oxidative Stress,

**SUMÁRIO**

CAPÍTULO I.....	10
1. REVISÃO DE LITERATURA .....	10
1.1 INTRODUÇÃO .....	10
1.2 ALTERNATIVAS AO USO DE ANTIBIÓTICOS.....	12
1.2.1 Monolaurato de glicerol (mlg).....	13
1.2.2 Ácidos Orgânicos .....	14
1.4 OBJETIVOS.....	17
1.4.1. Objetivo Geral.....	17
1.4.2. Objetivos específicos .....	18
CAPÍTULO II.....	19
MANUSCRITO.....	19
MANUSCRITO.....	20
CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	20
REFERÊNCIAS .....	54
<b>ANEXO</b> .....	57
CERTIFICADO.....	57

## CAPÍTULO I

### 1. REVISÃO DE LITERATURA

#### 1.1 INTRODUÇÃO

Atualmente, a avicultura é uma das principais atividades agropecuárias da economia brasileira. Segundo dados do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), o Brasil exporta carne de frango para aproximadamente 142 países. Além de expressiva exportação, o setor avícola também é de extrema importância para abastecimento interno. No Brasil, a partir da década de 70, houve um salto na produção avícola devido as empresas processadoras do mercado e especialistas no processo de produção de frango. Somente nos últimos anos, a produção de frango brasileira cresceu cerca de 112%, posicionando o Brasil como maior exportador mundial e o terceiro maior produtor mundial (PANDOLFI e MOTA, 2020). Dados da Associação Brasileira de Proteína Animal (2020) destacam que a produção brasileira de aves foi estimada em 13,245 milhões de toneladas em 2019, sendo 32% para a exportação e 68% para o mercado interno.

A nutrição animal pode corresponder até 70% do custo total de produção para qualquer espécie animal de interesse zootécnico; nesse contexto surgiram aditivos na ração animal, dentre eles os melhoradores de desempenho com destaque aos antibióticos como forma de otimização da produção animal (PANDOLFI e MOTA, 2020). Desde a época do início da avicultura industrial, em torno de 1950, os antibióticos tinham o intuito de prevenir enfermidades e com o passar do tempo passaram a ser usados também como promotores de crescimento (MENDES, et al., 2013). Ainda segundo o autor, os antimicrobianos promovem o barateamento do custo do alimento para o consumidor, dado o fato de reduzir a idade de abate dos animais, promovendo mais ciclos produtivos por unidade de tempo para o produtor e redução da incidência de doenças.

Muitos são os benefícios gerados pelo uso de antimicrobianos, como: aumento da produtividade, diminuição da quantidade de alimento consumido pelos animais até o momento do abate, melhorar da eficiência alimentar, bloqueio dos processos microbiológicos ligados à deterioração da ração, prevenção de doenças infecciosas ou parasitárias e diminuição da mortalidade. O uso destes produtos causa manutenção de uma microbiota desejável, deprimindo o crescimento de cepas de microrganismos indesejáveis (SANTOS et al., 2005). Ainda segundo o autor, os antimicrobianos podem

reduzir a fermentação microbiana de glicose produzida por alguns microrganismos, diminuindo a produção de ácido láctico, e conduzindo a aumento do ganho de energia dos animais. Quando em aves saudáveis e criadas sob condições similares, esse fato pode se refletir na melhora do ganho médio de peso diário ou no aumento da eficácia no aproveitamento de nutrientes fornecidos pela ração.

A resistência ocasionada pelo uso dos antimicrobianos, implicou em uma série de restrições ao uso dos antibióticos em diversos países, inclusive o Brasil. A IN nº45 de 22 de novembro de 2016 proibiu, em todo o território nacional, a importação e fabricação da substância antimicrobiana sulfato de colistina com a finalidade de aditivo zootécnico melhorador de desempenho na alimentação animal (BRASIL, 2016). A portaria nº 171 de 13 de dezembro de 2018 do MAPA, informa sobre a intenção de proibição de uso de antimicrobianos com a finalidade de aditivos melhoradores de desempenho zootécnico (BRASIL, 2018). O Brasil, que até então permitia o uso de antimicrobianos importantes para a medicina humana como aditivo zootécnico, estabeleceu a proibição na IN nº1 de 13/01/2020 de tilosina, lincomicina, e tiamulina para fins de melhoradores de desempenho em animais produtores de alimentos (BRASIL, 2020)

O uso de um antibiótico na produção animal estimula a seleção de cepas bacterianas resistentes, ou seja, seleciona bactérias difíceis de eliminar. Isto é grave para qualquer ser, ainda voltado ao cenário da produção de frangos, que possuem a reutilização de cama no aviário, este cenário pode ser mais grave (MENDES, et al. 2013). Segundo Santana et al. (2011), as campanhas de banimento de antimicrobianos na produção de aves e a opinião pública têm prevalecido na restrição dos antimicrobianos na alimentação animal, e diversos aditivos utilizados nas rações avícolas buscam alternativas aos antibióticos. Esses aditivos têm proporcionado condições favoráveis ao desenvolvimento de microrganismos benéficos do trato gastrointestinal, resultando em melhor digestão e absorção de nutrientes, alguns casos melhorando a qualidade dos produtos finais, sem causar riscos ao consumidor.

A retirada dos antibióticos utilizados como promotores de crescimento sempre deve-se ser avaliada com cautela, assim como a busca por alternativas viáveis, pois é necessário ter uma estabilização microbiota intestinal normal, redução da carga bacteriana no trato digestivo, melhoria da vitalidade dos enterócitos e vilos, redução da ingestão de substâncias imunossupressoras como micotoxinas, otimização da digestão, controle efetivo da coccidiose, entre outros (MENDES, et. al., 2013). Dentre as

alternativas devemos considerar também que os produtos substitutivos precisam ser seguros, efetivos, baratos e fáceis de usar.

## 1.2 ALTERNATIVAS AO USO DE ANTIBIÓTICOS

A conscientização da população sobre o uso de antibióticos gerou uma nova demanda de mercado na cadeia de alimentos: a “carne sem antibiótico” (PANDOLFI e MOTA, 2020). Até o momento não se dispõem de dados para a análise de risco relativa ao impacto na saúde pública dos antimicrobianos citados anteriormente. Nesse sentido opta-se pela adoção do princípio de precaução, reduzindo a possibilidade de os antibióticos representarem um risco a saúde do ser humano. Segundo Mendes et al. (2013), a retirada total dos antibióticos promotores de crescimento resultou em uma menor lucratividade com uma redução de 3 a 7% do desempenho das aves, com impacto negativo sobre a saúde animal e a mortalidade; frente a isso, novas estratégias devem ser desenvolvidas a fim de contornar esses efeitos negativos.

A retirada gradual de antibióticos como promotores de crescimento na Europa acarretou, inicialmente, em aumento do uso de antibióticos prescritos por veterinários devido a maior incidência de doenças bacterianas. Com o passar do tempo, novas alternativas foram sendo testadas e os problemas com a retirada foram diminuindo. Atualmente, diversas empresas ao redor do globo desenvolvem e comercializam enzimas, probióticos, ácidos orgânicos, prebióticos, fitoterápicos, vacinas, minerais dentre outras substâncias. Apesar dos avanços, ainda não foi possível a retirada em larga escala, sugerindo a necessidade de aprimoramento destas substâncias (PANDOLFI e MOTA, 2020).

A sociedade científica encontra-se constantemente em busca de alternativas ao uso de antibióticos que possam conferir a saúde e auxílio no desempenho que os antibióticos proporcionam, dada a importância produtiva que este produto tem na cadeia avícola. Diante desse cenário, a mobilização de pesquisadores para a substituição dos antimicrobianos nas dietas dos animais vem aumentando, com finalidade de reduzir problemas econômicos, sanitários e fornecer produtos seguros e de qualidade ao consumidor. Os prováveis substitutos promotores de crescimento devem manter as ações benéficas dos antibióticos e eliminar as indesejáveis, como a resistência bacteriana.

Novas estratégias para ter um melhor aproveitamento de nutrientes da dieta estão sempre sendo buscadas, que visem substituir os antibióticos promotores de crescimento,

produtos que sejam naturais, atóxicos e principalmente que não gerem resistência bacteriana. Estes produtos são utilizados na avicultura de corte com o sentido de manter a microbiota intestinal em condições ideais e que não interfiram de forma negativa na absorção dos nutrientes, desempenho e saúde das aves e consumidores (RAMOS, et al. 2014). Probióticos, prebióticos, bacteriocinas, peptídios com ação antimicrobiana, bacteriófagos, enzimas, ácidos orgânicos, minerais, fitoterápicos, vacinas desenvolvidas baseadas em tecnologias recentes, formulações nanotecnológicas que propiciem o uso controlado de medicamentos e ativos biológicos quando necessários, através da entrega precisa em seus alvos específicos, são alguns dos exemplos de alternativas ao uso de antimicrobianos (PANDOLFI e MOTA, 2020).

### 1.2.1 MONOLAURATO DE GLICEROL (MLG)

Os óleos vegetais são muito utilizados nas indústrias de alimentos e farmacêuticas, pelas propriedades antimicrobianas, hipolipemiante, antioxidante, estimulante digestivo, antiviral, anti-toxigênico, anti-parasítico, inseticida, inibidor de odor e controlador de amônia, atraindo a atenção da comunidade científica como uma alternativa aos antimicrobianos e promotores de desempenho em animais de interesse zootécnico (BASSANETTI et al., 2017). Também estimulam a circulação sanguínea, reduzem os níveis de bactérias patogênicas e melhoram o estado imunitário das aves; atuam como promotor de crescimento, antibacteriano, anti-inflamatório, antiparasitário, antioxidante e imunomodulador, além de melhorar a motilidade intestinal, secreção de enzimas melhorando a digestão e absorção dos nutrientes da alimentação (KALEMBA e KUNICKA, 2003).

O monolaurato de glicerol é considerado um emulsificante e é aprovado pela Food and Drug Administration (EUA), sendo considerado essencialmente não tóxico em altas doses. O MLG é um composto natural que pode ser encontrado em alimentos como leite materno, óleo de coco e óleo de palmiste, este composto tem capacidade e propriedades que inibem o crescimento e a virulência de microrganismos (VALENTINI, et al., 2020); as propriedades físicas do MLG incluem alto ponto de fusão e baixa solubilidade em água, precisando de diluentes, como o glicerol, para que este composto possa ser utilizado.

O MGL é o monoéster mais estudado entre os monoésteres de ácido graxo com propriedades antimicrobianas (KABARA, 1984); A monolaurina é um monoéster

formado a partir do ácido láurico (C12) considerado um ácido graxo de cadeias media, a estrutura deste composto é formada por um monoéster de glicerol e o ácido graxo ácido láurico como pode ser visualizado na Figura 1.

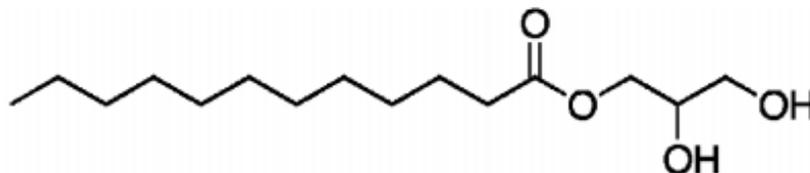


Figura 1- Estrutura química do monolaurato de glicerol.

Segundo Fernandes et al. (2015) é possível melhorar o desempenho produtivo das aves quando utilizado óleos em substituição a promotores de crescimento, pois permite uma melhor qualidade na microbiota. De acordo com Fortuoso et al. (2019), o monolaurato de glicerol (GML) quando adicionados na dieta animal passa a ter funções antimicrobianas e antiparasitárias influenciando de maneira positiva índices zootécnicos como ganho de peso, fase de acabamento, gerando um crescimento superior ao gerado com uso de antibióticos.

A monolaurina é ativa principalmente contra microorganismos patogênicos Gram-positivos pela supressão do crescimento e virulência de diversas bactérias, fungos e vírus in vitro (BATOVSKA et al, 2009); atuando em vários sistemas de sinalização bacteriana, inicialmente interagindo com a membrana plasmática, afetando a transdução do sinal e a captação de aminoácidos (KABARA e MARSHALL, 2005; SCHILEVERT et al., 1992; VETTER , TRIPP e SCHILEVERT, 2005). Também atua impedindo a produção de enzimas e fatores de virulência como proteína A,  $\alpha$ -hemolisina e  $\beta$ -lactamases (TANGWATCHARIN e KHOPAIBOOL, 2012). Além de poder ser utilizado diretamente pelos enterócitos para a produção de energia, auxiliando na manutenção da integridade intestinal em frangos (VAN DER AAR et al., 2017).

### 1.2.2 ÁCIDOS ORGÂNICOS

Os ácidos orgânicos são comumente encontrados na natureza como componentes normais de tecidos vegetais e animais, formados pela fermentação microbiana no trato intestinal ou ruminal (quando for o caso), constituindo parte importante do suprimento

energético dos animais formadores dos ácidos. Os ácidos têm sido utilizados como aditivos na nutrição animal há várias décadas por promover a acidificação da dieta, reduzir a colonização do trato gastrointestinal por patógenos e a produção de metabólitos tóxicos, favorecendo o crescimento da microbiota intestinal normal, aumentando a eficiência das enzimas digestivas, além de melhorar a digestibilidade da proteína e a disponibilidade de cálcio, fósforo, magnésio e zinco (SALAZAR et al., 2008). Os ácidos orgânicos que apresentam ação antimicrobiana são os ácidos graxos de cadeia curta, tanto os monocarboxílicos, como o fórmico, acético, propiônico e butírico, além dos carboxilados que possuem grupo hidroxila, como láctico, málico, tartárico e cítrico (SERPA, 2016).

Existe uma diversidade de ácidos orgânicos disponíveis no mercado, com diferentes propriedades físicas e químicas, para uso via água ou ração, disponíveis individualmente ou em combinações. A indústria moderna tem dado foco ao uso de ácidos orgânicos protegidos (encapsulados) em função dos mesmos apresentarem liberação mais lenta, chegarem ativos às partes mais distantes do trato gastrointestinal, serem de mais fácil manipulação e sem odores; os principais ácidos orgânicos utilizados nas dietas das aves o ácido acético, butírico e propiônico (BELLAVIER & SCHEUERMANN, 2004); Pode-se verificar a estrutura do ácido butírico na figura 2.

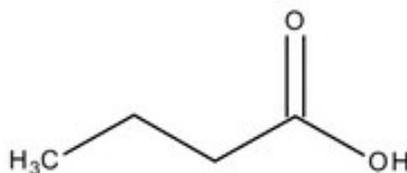


Figura 2. Estrutura química do ácido butírico.

A diminuição do pH na parte inicial do trato digestivo exerce efeito sobre a produção de pepsina e na digestão, bem como atua como bactericida e bacteriostático na microbiota (bactérias, fungos e leveduras) do trato digestivo. A ação antimicrobiana se dá porque o ácido diminui a capacidade de aderência da bactéria com fimbria à parede intestinal, tendo ainda forte capacidade de desnaturação sobre as proteínas (BELLAVIER & SCHEUERMANN, 2004).

Segundo Viola e Vieira (2007) um dos modos de ação dos ácidos nos microrganismos é que os mesmos, em sua forma não dissociada (não ionizada, mais

lipofílica), conseguem penetrar a parede celular destes microrganismos e alterar sua fisiologia; nas bactérias, eles reduzem o pH interno, e como as bactérias não toleram grandes variações de pH entre o meio externo e interno, as obriga a gastarem energia e, eventualmente, pararem seu crescimento ou serem inativadas, tentando recuperar seu pH interno. Segundo o mesmo autor, outro mecanismo, tóxico para os microrganismos, é que eles interferem na estrutura e transporte elétrico da membrana citoplasmática, reduzindo a produção de ATP. A ação antimicrobiana se dá pela combinação da dissipação da força próton-motiva e inabilidade do microrganismo em manter o pH interno seguida pela desnaturação das proteínas sensíveis aos ácidos e do DNA.

De acordo com Adil et al. (2010), a suplementação de ácido butírico é capaz de melhorar parâmetros de desempenho, saúde do trato gastrointestinal, desenvolvimento de vilosidades e qualidade de carcaça de frangos de corte, tornando-os semelhantes aqueles obtidos com antibiótico promotor de crescimento pois o ácido butírico é fonte de energia primordial para os enterócitos e para o correto desenvolvimento do tecido linfóide associado ao intestino (PANDA et al., 2009; ANTONGIOVANNI et al., 2007); ainda segundo os autores causa aumento na proliferação das células epiteliais para uma rápida regeneração do intestino e aumentando a altura das vilosidades, de forma que aumenta a capacidade de absorção. É reconhecido como a mais importante fonte respiratória e de energia para a proliferação das células do epitélio intestinal, e está diretamente e indiretamente envolvido em vários mecanismos regulatórios da diferenciação, crescimento, permeabilidade e expressão gênica celular.

### 1.3 EMULSIFICANTE – LECITINAS HIDROLISADAS

Emulsificantes são agentes ativos de superfície anfílica, de peso molecular médio (Zhao et al.2015), sendo usado em rações de aves como o objetivo de melhorar o aproveitamento dos lipídios, possibilitando a redução da densidade energética das dietas não prejudicando o desempenho e obtendo maiores vantagens econômicas. Segundo San Tan et al. (2016) a utilização de emulsificantes é uma alternativa que permite melhorar a energia líquida dos óleos, permitindo a redução da sua inclusão e conseqüentemente o custo das rações.

Os emulsificantes em geral apresentam moléculas com propriedades hidrofílicas e outro segmento lipofílico, permitindo compatibilizar a mistura de água com óleos,

formando emulsões; esses compostos também são conhecidos como “surfactantes”, “tenso-ativos” ou “hipotensores” (López et al.2017).

Segundo Roy *et al.* (2010) a utilização de um emulsificante alimentar na dieta das aves, provou ser uma ferramenta para melhorar a digestibilidade da gordura, pois tornam os glóbulos desta gordura mais disponíveis, reforçando a formação de micelas. Durante as primeiras semanas de vida, as enzimas digestivas das aves não atuam de forma eficiente sobre a digestão de gorduras, este fato justificaria a utilização de substâncias que possam facilitar estes processos; sendo a emulsificação uma etapa importante na digestão de lipídios para que se possa atingir o máximo de energia metabolizável acrescentado pela fonte de lipídio fornecida.

Com a inclusão de emulsificantes nas rações de aves possibilita a redução de custos de fabricação, devido ao fato que a dieta passa a ser formulada com nível reduzido de energia; significando uma redução do custo com óleos e gorduras (VALENTIM et al., 2020).

A lecitina de soja é um produto derivado do processo de degomagem do óleo de soja; este processo consiste na extração dos fosfolipídios pela adição de água a temperatura de 60 a 90°C e pressão constante (Castejon e Finzer, 2007). A lecitina é uma excelente fonte de fosfatidilcolina; antes de atuar na emulsificação, a fosfatidilcolina sofre a ação da enzima fosfolipase A2 liberada pelo pâncreas e se transforma na lisofosfatidilcolina que é a principal responsável pela manutenção da micela, hidrólise dos lipídios na micela e posterior absorção pelos enterócitos. Seus efeitos fisiológicos estão relacionados com o metabolismo de lipoproteínas, fosfolipídeos, triglicerídeos e colesterol de várias densidades (HDL, LDL, VLDL) como intermediários do transporte de gorduras (BERG & SHMIDT, 2008).

## 1.4 OBJETIVOS

### 1.4.1. Objetivo Geral

Avaliar se a inclusão do *blend* comercial, a base de emulsificante, monolaurina, glicerol, ácidos butíricos e silícico na dieta de frangos de corte tem efeitos positivos sobre desempenho zootécnico e saúde das aves.

#### 1.4.2. Objetivos específicos

- Testar o aditivo sobre o desempenho zootécnico de frangos de corte;
- Avaliar se aditivo tem efeito antimicrobiano;

## CAPÍTULO II

### MANUSCRITO

Os resultados desta dissertação são apresentados na forma de um manuscrito, com suas formatações de acordo com as orientações da revista: *Animal Feed Science and Technology*.

## MANUSCRITO

**Use of antimicrobial blend based on an emulsifier, monolaurin, glycerol, and butyric acid in the diet of broilers: impacts on intestinal health, performance, and meat quality**

Amanda B. Almeida<sup>1</sup>, Denise N. Araújo<sup>2\*</sup>, João V. Strapazzon<sup>1</sup>, Cleiciane Rita<sup>2</sup>,  
Amanda Dilda<sup>2</sup>, Giovana Balen<sup>2</sup>, Guilherme L. Deolindo<sup>1</sup>, Daniela Nesi<sup>2</sup>, Valcenir J.  
M. Furlan<sup>3</sup>, Giovana Pelisser<sup>4</sup>, Ricardo E. Mendes<sup>4</sup>, Mateus Fracasso<sup>4</sup>, Roger Wagner<sup>5</sup>,  
Marcel M. Boiago<sup>2</sup>, Aleksandro S. Da Silva<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup> Programa de Pós-graduação de Zootecnia, Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC), Chapecó, Brasil.

<sup>2</sup> Departamento de Zootecnia, UDESC, Chapecó, Brasil.

<sup>3</sup> Departamento de Ciência de Alimentos, Universidade Federal do PAMPA, Itaqui, Brasil.

<sup>4</sup> Curso de Medicina Veterinária, Instituto Federal Catarinense, Concordia, Brasil.

<sup>5</sup> Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Brasil.

\*Corresponding authors: [aleksandro\\_ss@yahoo.com.br](mailto:aleksandro_ss@yahoo.com.br); [denise.araujo@udesc.br](mailto:denise.araujo@udesc.br)

## ABSTRACT

The study's objective was to evaluate whether the addition of an antimicrobial blend based on  $\alpha$ -monolaurin, mono-, di- and triglycerides of butyric acid, glycerol, and emulsifier is capable of replacing a conventional antibiotic in the diet of broilers without affecting health, performance, or meat quality. We employed a completely randomized design with three treatments, five repetitions/treatment, and 15 birds/repetition: negative control (TN), positive control (TP: enramycin), and antimicrobial blend (T-FRA). Variables related to zootechnical performance, meat quality, metabolism, and intestinal health were measured. At 21 days, the TN obtained the highest feed conversion (CA); at 35 days, T-FRA obtained lower CA than TN. The weight gain did not differ between treatments during the experimental period. The minimum inhibitory concentration was assessed using the antimicrobial blend, and we found that 110 mg/mL was capable of inhibiting the growth of *Escherichia coli*. However, there was only a tendency of the blend to reduce the *E. coli* count on day 21 in the poultry litter and feces in the field test. Cholesterol levels were higher in the blood of T-FRA chickens. Levels of intestinal reactive oxygen species (ROS) at 21 days were higher in T-FRA; however, at 42 levels of ROS, it was lower in the intestine and muscle, and liver. Lower lipid peroxidation in the intestine (day 42) was observed in T-FRA birds, while activities of glutathione S-transferase and total non-enzymatic antioxidants (thiols) were greater at the intestinal and muscular levels; as well as thiols at the liver level. T-FRA chickens had a lower percentage of lipids in the meat, in addition to a lower concentration of total polyunsaturated fatty acids compared to birds from TP. Also, the levels of saturated fatty acids were higher in the meat of T-

FRA. At 21 days, the villus/crypt ratio was higher in T-FRA, different from day 42 when a greater ratio was observed in the TP chickens. We conclude that the consumption of the blend by birds reduced feed conversion during the growth phase, improved intestinal health, stimulated cholesterol metabolism, and had antioxidant effects capable of reducing oxidative reactions at the tissue level. We also conclude that the addition of the blend in the diet reduces lipids in this food, which alters the concentration of fatty acids in the meat. The presence of a coccidiostat in the broiler feed of the three treatments possibly had a performance improvement effect, avoiding delays in developing the birds in the negative control group.

**KEYWORDS:** Organic acids, oxidative stress, hydrolyzed lecithin, glycerol monolaurate

## **INTRODUCTION**

Brazil is currently the second-largest exporter of chicken meat after the US, and it is expected that by 2029, Brazil will have taken the lead. The country is in third place in global production of chicken meat, up to 13.6 million tons; the largest producer state is Paraná (Sindorações, 2019). The technology used in the poultry industry has been exploited to optimize production to improve financial results and produce safer and healthier food. As a result, a campaign called for a total ban on antimicrobials in poultry production as a performance enhancer. Indeed, there have been public calls for restricting antimicrobials in animal feed, and several antibiotics have already been banned in several countries. Due to this need, the industry has produced natural additives and used them in poultry production, providing favorable conditions for developing beneficial microorganisms from the gastrointestinal tract. The aim is to provide better digestion and absorption of nutrients and improve the quality of the final products without risking harm

to the consumer (Fuini, 2001). In particular, functional and enzymatic additives allow the reduction of inclusion of ingredients with similar properties in the feed, and consequently, this reduces the final cost of chicken feed. Products are marketed in Brazil to replace antibiotics or supplement the birds without losing productivity.

Commercial products manufactured to replace antibiotics feature a blend of ingredients with antimicrobial properties, particularly organic, photogenic, phytobiotic acids, and extracts (Galli et al., 2020a; Galli et al., 2020b). Organic short-chain acids can reduce bacterial loads in the digestive tract and improve animal performance (Rocha et al., 2010). Their effects vary with physical-chemical characteristics, buffering capacity of the ingredients that influence intestinal pH, and, consequently, alteration of the heterogeneity of the intestinal microbiota (Dibner and Buttin, 2002); Rick (2003). In the case of organic acids, there is a specific antibacterial effect similar to that of antibiotics, mainly for short-chain organic acids that are particularly effective against *E. coli*, *Salmonella*, and *Campylobacter* (Dibner and Buttin, 2002; Rick, 2003). According to Adams (1999), the functions of organic acids are broad: producing acidity that acts as a flavoring agent, retarding enzymatic degradation, acting as a chelator preventing/reducing oxidation, and acting directly as an antimicrobial and as a growth-promoting additive in the feed.

Monolaurin is a monoester formed from lauric acid (C12); it is considered a medium-chain fatty acid with antimicrobial and antiviral activity; its antimicrobial activity has been studied since 1966 (Freitas et al., 2009). Monolaurin is active mainly against gram-positive pathogenic microorganisms (Batovska et al., 2009) because it exerts a bactericidal and antiviral effect by solubilizing the lipid phospholipid envelope of pathogens, causing this envelope to disintegrate (Lieberman et al., 2006). As a medium-chain fatty acid monoglyceride, glycerol monolaurate (GML) is a glycerol

monoester of lauric acid (C12:0), known to be a safe emulsifier approved by the United States Food and Drug administration (Jiang et al. 2018). It has strong antimicrobial effects, especially against gram-positive bacteria, by suppressing the growth and virulence of various bacteria, fungi, and viruses in vitro (Batovska et al. 2009). A study showed that GML could be used directly by enterocytes for energy production, helping maintain intestinal integrity in chickens (Van Der Aar et al. 2017). Recent studies have shown that GML improved productivity, health, feed efficiency, and poultry quality and is therefore considered a promising food additive in production (Fortuoso et al. 2019; Mustafa et al. 2019).

Emulsifiers are active agents with amphiphilic surfaces (Zhao et al., 2015) that facilitate the mixing of oil and water, reducing the surface tension and the energy required to form the emulsion (Araújo 2011), thereby facilitating digestion processes. According to Fonseca et al. (2018), emulsifiers are responsible for facilitating and increasing the use of fats, as they facilitate the formation of micelles for lipid enzymes to perform digestion. Among the emulsifiers most used by the food industry are proteins (whey, soy, egg), phospholipids, and small surfactant molecules (molecular weight between 500 to 1300 Daltons) such as polysorbates and lecithins (Araújo 2011). The addition of emulsifiers in the diet can increase the net energy provided by oils and consequently reduce their inclusion and the cost of feed; this was also the focus of our study here, given the high cost of soy and its derivatives. The objective of this study was to determine whether the inclusion of a blend based on  $\alpha$ -monolaurin, mono-, di- and triglycerides of butyric acid, glycerol, and emulsifier would substitute for a conventional antibiotic as a performance enhancer. We also measured its effects on zootechnical performance, intestinal health, metabolism, and meat quality.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Blend**

The blend identified as antimicrobial used in this study is a product registered as FRA Digest Health® (Feedis, São Paulo, Brazil). The blend is formulated based on  $\alpha$ -monolaurin, mono-, di- and triglycerides of butyric acid, and glycerol according to the composition described in Supplementary material 1.

### **Formulation of diets**

The diet per phase of the production cycle was formulated based on corn and soy, following the recommendations of the Brazilian Table (Rostagno et al. 2011). We also considered formulating the nutritional matrix of the blend that allowed a reduction of approximately 0.8% of soy oil in the diet. We used enramycin as a conventional growth promoter added to the base diet (10 mg/kg). The antimicrobial blend was also added to the basal diet of its respective treatment group, as detailed in Table 1.

### **Characterization of the experimental environment**

The study was conducted in the experimental poultry shed of the UDESC Oeste poultry sector; the birds were housed in boxes (1.0 x 1.8 m), with beds of reused wood shavings from the 9<sup>th</sup> batch, with food and water ad libitum. The birds were warmed with electric lamps and gas hoods, as needed according to the local temperature. The drinkers were of the nipple type, and feeders were the tubular type. Light management followed the recommendations of the lineage manual.

### **Animals and experimental design**

We purchased 225 1-day-old Ross chicks (1 day old). The experimental design was completely randomized, containing three treatments, with five repetitions each and 15 birds per repetition. The treatments were a) positive control (TP) diet containing conventional basal diet with enramycin; b) negative control (TN) containing basal diet without a promoter; and c) antimicrobial blend (T-FRA) added to the basal diet at a dose of 1 kg/ton.

### **Minimum inhibitory concentration**

We tested the antimicrobial effect of the in vitro blend to determine the minimum inhibitory concentration (MIC) since the product has a performance enhancer recommendation. The analysis was performed according to the CLSI guidelines, in  $10^{-1}$  to  $10^{-5}$  dilutions, in the proportion of 1 g of the blend in 9 mL of Müller Hinton solution for the  $10^{-1}$  dilution; we followed the dilutions successively until achieving  $10^{-5}$  of *Escherichia coli* from poultry litter.

### **Zootechnical performance**

The body weights of the birds were measured on days 1, 21, 35, and 42. Based on this, weight gain and average weight gain were calculated, and the amount of feed consumed by the birds. This information allowed the calculation of feed conversion (FC = consumption/weight gain).

### **Microbiological analysis**

Microbiological analyses were performed at two points, 21 and 42 days of the experiment. Fresh feces were collected from the birds' cloaca and samples of a five-point bed mix from each group. These samples were diluted to colony-forming units (CFU) x

10<sup>6</sup>. They deposited in Petrifilm, following the manufacturer's recommendations, subjected to a 38 °C oven for 24 hours, followed by counting total coliforms and *E. coli*.

### **Serum biochemistry**

Blood was collected from the chickens (n = 8) through the ulnar vein on day 42 of the experiment to measure serum levels of glucose, cholesterol, triglycerides, total proteins, albumin, and urea, using semi-automatic equipment (Bioplus 2000®) with commercial kits (Gold Analisa®). Globulin values were calculated as the difference between total protein and albumin.

### **Oxidant/antioxidant profiles**

Chickens were slaughtered at 42 days of age, and fragments of the muscle (pectoralis major), liver, and intestine (jejunum) were collected. The tissues were homogenized in 10 mmol Tris-HCl (pH 7.2) for measurements of oxidants and antioxidants. The samples were stored in tubes and frozen at -20 °C for later analysis.

The oxidation of 2'-7'-dichlorofluorescein (DCFH) levels was determined in homogeneous tissue as an index of peroxide produced by cells, according to a modified method described by Ali et al. (1992), to determine levels of ROS. The levels of lipid peroxidation were determined by levels of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), measured by the absorbance at 532 nm, according to the method described by Ohkawa et al. (1978). The GST tissue homogenate was based on a spectrophotometer according to Habig et al. (1974), as well as determining total thiol levels (Costa et al., 2006).

### **Fatty acid profile**

Samples of chicken and feed were used for fatty acid profile analysis. According to Bligh and Dyer (1959), the lipid extraction was carried out with some modifications: 4 g of samples, 6.4 mL of water, 16 mL of methanol, and 8 mL of chloroform were added into 50 mL polypropylene tubes, and mechanical shaking was performed for 60 min. After that, 8 mL of chloroform and 8 mL of Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1.5% solution were added to promote a biphasic system. This mixture was shaken for 2 min and then centrifuged for 5 min at 3000 rpm. Lipids obtained from the chloroform phase were subjected to fatty acid analysis before solvent drying by N<sub>2</sub> flow.

FA methylation from the lipid fraction was performed using a transesterification/esterification method proposed by Hartman and Lago (1973). The extracted lipids were added 1 mL of 0.4 M KOH methanolic solution in a test tube and shaken in a vortex for 1 min. Samples were kept in a water bath for 10 min at boiling point. Subsequently, samples were cooled at room temperature, and 3 mL of 1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> methanolic solution was added and shaken in a vortex and maintained in a water bath for 10 min. After cooling, 2 mL of hexane were added and centrifuged at 5000 rpm for 5 min. Finally, hexane with the fatty acid methyl esters (FAME) was subjected to chromatography analysis.

FAME determination was carried out in a gas chromatograph model 3400CX equipped with a flame ionization detector (Varian, Palo Alto, CA). One microliter of samples was injected in a split/splitless injector, operated in split (1:25) mode at 250 °C. Hydrogen was used as carrier gas at a constant pressure of 25 psi. FAMES separation was carried out using an HP-88 chromatography column (100 m × 0.25 mm; 0.20-µm film, Agilent, J & W, Folsom, CA, USA). The initial oven temperature was programmed at 50 °C for 1 min and increase to 185 °C, at 15 °C/min. Then, increasing to 195 °C, at a rate of 0.5 °C/min, and finally until 230 °C, increasing 15

°C/min, and maintained for 10 min in isothermal conditions. The detector temperature was kept constant at 250 °C. The FAME compounds were identified by comparing experimental retention times with those from authentic standards (FAME Mix-37, Sigma Aldrich, St. Louis, MO). The results were presented as a percentage of each FA identified in the lipid fraction, considering the chain size equivalent response factor and a conversion factor of the ester to the respective acid for each FAME applied to FID, according to Visentainer (2012). The results of the fatty acid profile in the feed are presented in Supplementary material 2.

### **Intestinal morphometry**

Intestinal jejunum was collected (days 21 and 42) and maintained in flasks with 10% formaldehyde solution. Slides with histological sections were stained with H&E. Under a light microscope, the morphological structures of the intestinal portions were evaluated. In the jejunum fragment, villus length and crypt depth were measured according to Caruso and Demonte (2005). Histological images of the slides were captured using a Digital micro-camera (Electronic Eyepiece Camera Video), attached to a biological trinocular microscope (model TNB-41T-PL, OPTON) and a specific program for capturing histological images (Images J). Details of the methodology used to measure villus length and crypt depth were described by Galli et al. (2020).

### **Statistical analysis**

The data were first analyzed descriptively. The data were then subjected to normality testing; the bacterial count variables needed to be transformed to logarithms for normalization. Then, a variance analysis test was applied, followed by the Tukey test. Differences were considered significant when  $P < 0.05$ .

## **RESULTS**

### **Minimum inhibitory concentration**

The MIC indicated inhibition of the bacterium only in the  $10^{-1}$  dilution of the antimicrobial blend; that is, 111 mg of the product per mL is needed to have antimicrobial action under the gram-negative bacteria *E. coli*.

### **Zootechnical performance**

Body weights did not differ during the experimental period (Table 2), as did the productive efficiency index (Table 3). At 21 days of age, we found that chickens from the negative control group, that is, birds that did not receive antibiotics as a growth enhancer, consumed more feed than the positive control, which consequently generated greater feed conversion (Table 2). Birds in the T-FRA group at 35 days showed less feed conversion than TN but similar to TP (Table 2). At 42 days, there was no difference between treatments in zootechnical performance variables (Table 2).

### **Microbiological of bedding and feces**

The counts of total coliforms and *E. coli* in the feces and the chickens' litter did not differ between treatments (Table 4). At 21 days, there was a tendency toward lower *E. coli* counts in the litter ( $P = 0.08$ ) and the feces ( $P = 0.06$ ).

### **Serum biochemistry**

There was no effect of treatments on uric acid levels, albumin, cholesterol, glucose, total proteins, or triglycerides; cholesterol levels were higher in the T-FRA group than in the TN group (Table 5).

### **Oxidant/antioxidant profile**

The oxidant and antioxidant profiles in the intestine, muscle, and liver are presented in Table 6. Levels of ROS in the intestine of birds in the T-FRA group were higher on day 21 and lower on day 42 compared to TN. In muscle, T-FRA chickens had lower ROS levels compared to other treatments. In the liver, ROS levels of the T-FRA birds were similar to other treatments; however, the oxidative variable levels were lower in the liver of TN birds compared to TP. In intestine, TBARS levels at 42 days were lower in T-FRA chickens compared to TP and TN. Intestine, TBARS levels (day 21) and also muscle and liver (day 42) did not differ between treatments. GST activity was higher in T-FRA chickens' intestines compared to TN (days 21 and 42), just as it was higher in TP birds compared to TN on day 21.

In contrast, GST activity in the muscle of chickens from T-FRA was lower than TN. At 42, thiol levels (total non-enzymatic antioxidants) were higher in the intestine, muscle, and liver of the T-FRA group than the TN group. The levels of thiols were higher in the intestine and liver of the birds of T-FRA than TP.

### **Fatty acid profile in feed and meat**

In the feed, we observed a lower percentage of total lipids in the meat (Supplementary material 2) but without the effect of the additive in the feed for the profile of total saturated and unsaturated fatty acids. Some specific fatty acids differed between treatments; lauric acid and palmitic acid were found in higher concentrations in the T-

FRA diet; behenic acid, on the other hand, was in a higher concentration in the diet of TN birds compared to other treatments (Supplementary material 2).

In meat, the percentage of total lipids was lower in TN and T-FRA birds compared to TP (Table 7). The total concentration of saturated fatty acids was higher in meat from TN and T-FRA birds compared to TP, and the concentration of polyunsaturated fatty acids was lower in these two treatments. The percentage of monounsaturated fatty acids showed no difference between treatments. Among the specific fatty acids that differed between treatments, there were: 1) higher levels of lauric acid in T-FRA compared to the other groups; 2) lower levels of palmitic acid in TP compared to the other groups; and 3) higher percentages of linoleic acid,  $\alpha$ -linolenic acid, cis-11-eicosenoic acid, C22:5n6, and cis-4,7,10,13,16,19-docosahexaenoic acid in the meat of birds from TP compared to the other two treatments (Table 7).

### **Intestinal morphometry**

No histological changes were observed in the jejunum in the birds of this experiment (Figure 1). At 21 days, we found that the crypt depth was lower in the intestine of chickens from the TN and T-FRA groups than TP; this was consequently reflected in higher values for the villus/crypt ratio (Table 8). At 42 days, villus height was lower in the T-FRA than in the other groups; and the crypt depth was lower in the TP and T-FRA than in TN (Table 8). At the end of the experiment (day 42), the villus/crypt ratio was higher in the TP birds' intestine compared to the other groups.

## **DISCUSSION**

Several studies indicated that medium-chain fatty acids, free or esterified, improved the production and use of birds' nutrients (Van Der Aar et al. 2017; Galli et al.,

2020b). GML supplementation increased body weight, feed intake, carcass yield, and decreased feed conversion in chickens, improving poultry health (Fortuoso et al. 2019; Mustafa et al., 2019). GML has a chemical structure similar to the monolaurin present in the blend used here. High-fat diets containing lauric acid improved feed conversion and breast yield in chickens (Zeitz et al. 2015). However, in our study, birds' zootechnical performance, in general, was similar between treatments; specifically, there was higher feed intake of chickens from TN at 21 days and lower feed conversion of birds from T-FRA, a positive effect economically. We believe that the absence of difference in the body weight of the groups is related to a conventional coccidiostat (salinomycin) in all diets, which allowed control of coccid infections, a frequent gateway for bacteria. Thus, birds in the negative control group were not harmed by growth retardation, suggesting that anticoccidials are more critical in diets than antibiotics.

The main finding in this study is the absence of difference between treatments for the productive efficiency indexes, even though birds consumed a diet with less soy oil and, consequently, a diet with less economic cost due to the high commercial value of soy derivatives with oil. The lower feed conversion observed in the growth phase of the birds that consumed the blend may be directly related to intestinal morphometry; that is, at 21 days, the chicks had a higher villus/crypt ratio, which is interpreted as a positive effect, as it would facilitate the process absorption of nutrients, even in birds consuming less feed.

Supplementation with organic and inorganic acids in the diet of broiler chickens did not affect weight gain and feed consumption, according to researchers (Viola and Vieira 2007), but obtained benefits regarding feed conversion similar to our study. These authors attributed the effect on feed conversion to a possible reduction in intestinal microbial load due to acidifiers, with benefits in terms of intestinal cell nutrition or

enzymatic activation at the intestinal level. The acidification in the poultry litter caused by the addition of organic acids in the diet also reduces the microbial load of *Campylobacter* and decreases the horizontal transmission of pathogens (Line 2002). According to the literature, the excretion of acidic waste by chickens in the litter can reduce the microbial population and consequently improve the chickens' performance (Bellaver and Scheuermann 2014). Since acidification is done naturally in birds from the first day, the strategy is the adequate supply of organic acid to reduce the pathogenic microbiota of the TGI until the end of the production phase (example 42 days). In our study, the *E. coli* count was numerically lower in the phases and the litter of 21-day-old chickens, which suggests the blend's bacterial action, confirmed using in vitro tests (MIC).

The reasons why organic acids have a nutritional influence in chickens may be insufficient HCl production for diets with a high buffering capacity (high protein and macro elements). Eidelsburger (2001) pointed out that organic acids act on two fronts: a) antimicrobial effect (decreases the ability of bacteria with fimbria to adhere to the intestinal wall); and b) decrease in pH in the initial part of the TGI and, consequently, effects on the production of pepsin and digestion. Adams (1999) suggested that the efficiency of acids was due to the decrease in intracellular pH, as they pass through the microorganism's membrane in its non-dissociated state and dissociate inside the cell, changing the membrane permeability with the blocking of the substrate of the electron transport system. In turn, the cells react by eliminating protons, trying to maintain a constant pH, increasing energy expenditure, and reducing microbial growth. Researchers reported antimicrobial activity of short-chain fatty acids and their monoglycerides against gram-positive bacteria and noted that all monoglycerides were more active than their short-chain fatty acids (Batovska et al., 2009). The MICs for monolaurin obtained in the

study against bacteria ranged from 7.8 to 62.5  $\mu\text{g/ml}$ , being active even against methicillin-resistant strains of *Staphylococcus aureus*. In the present study, MIC was 110 mg of the blend per mL against *E. coli*.

Research has shown that the supply of monolaurin (150 mg/kg) to rats for 8 weeks increased serum levels of triglycerides, LDL, and the atherogenic index, as well as reduced HDL levels (Jiang et al. 2018). Liu et al. (2020) found an increase in triglyceride levels, total cholesterol, LDL, and total antioxidant capacity comparing the group that received 300 mg/kg of monolaurin. These authors suggest that the addition of monolaurin may affect serum lipid and carbohydrate metabolism, corroborating the increase in blood cholesterol in the chickens in the present study. A recent study showed that GML consumption by broilers reduces total lipids in chicken meat and reduces the percentage of saturated fatty acids, and increases the profile of unsaturated fatty acids (Valentini et al., 2020). In our study, the reverse occurred; that is, the saturated fatty acid profile increased in the meat, and polyunsaturated fatty acids decreased when the birds consumed the blend (T-FRA). In the birds' diet that consumed the blend, there was 0.8% less soy oil, and the concentration of lauric acid in chicken meat increased, suggesting that the C12 present in the blend was absorbed and still deposited at the tissue level.

According to Galli et al. (2019), one of the characteristics of GML is that it gives cells the ability to fight excess ROS, decreasing free radicals over time in the group that received the blend. According to Valentini et al. (2020), chicken meat enriched with polyunsaturated fatty acids contains more fatty acids with a high number of double bonds, possibly affecting oxidative stability and increasing its susceptibility to oxidation. According to the literature, the lower lipid peroxidation in the intestines of chickens can be characterized initially by high non-enzymatic (thiols) and enzymatic (GST) high responses. Lipid peroxidation in cell membranes increases fluid loss due to increased ion

permeability, with consequent cell disruption, which leads to decreased antioxidant status and decreased degradation of free radicals, which are toxic to cells and tissues (Galli et al. 2019). In the current study, the addition of the blend based on emulsifier, monolaurin, glycerol, and butyric acids minimized oxidative reactions in the intestine, liver, and muscle at 42 days of age; except for the ROS levels that were higher in the jejunum on the 21<sup>st</sup>, which can be a positive effect, since free radicals play an essential role in combating and controlling microorganisms.

Oxidative stress is the imbalance between the production and degradation of ROS, such as superoxide anion, hydrogen peroxide, and lipid peroxides (Delles et al. 2014). The consumption of the blend may have minimized the impacts caused by this biochemical reaction at the tissue. The increase in antioxidants in these tissues is the most likely explanation for reducing ROS and TBARS since antioxidants are essential to balance oxidative reactions and protect tissues. Therefore, tissue oxidant/antioxidant ratios combined with intestinal morphometry suggest that the tested antimicrobial blend had positive effects on intestinal health.

## **CONCLUSION**

The inclusion of the commercial blend based on emulsifier, monolaurin, glycerol, and butyric acids positively influenced feed conversion, increased cholesterol concentrations and balanced the oxidant/antioxidant status at the tissue level. Compared with antibiotics, we noticed a positive result for a possible replacement of the antimicrobial, given that there were no extreme differences between the treatments. The diet that used the blend had oil-sparing effects (loss 0.8%). Regarding the quality of the meat, the blend had positive and negative effects; that is, oxidative reduction and the

antioxidant increase is positive, while the increase in saturated fatty acids associated with a reduction in polyunsaturated fat is an undesirable effect for consumers.

### **Ethics committee**

The ethics committee approved the project on animals' use in research (CEUA nº 7175220620) at the State University of SC.

### **REFERENCES**

- Adams, C. A. Oxidation and antioxidants. *Nutricines: food componentes in health and nutrition*. Nottingham: Nottingham University Press, 1999; 2:11-32
- Araújo, J. M. A. *Química de Alimentos: teoria e prática*. Viçosa, MG. UFV, 2011
- Batovska, D. I.; Todorova, I. T.; Tsvetkova, I. V.; Najdenski, H. M. Antibacterial study of the médium chain fatty acids and their 1-monoglycerides: individual effects and synergistic relationships. *Polish Journal of microbiology*, 2009; 58(1):43-47
- Bellaver, C.; Scheuermann, G. aplicações dos ácidos orgânicos na produção de aves de corte. Disponível em: [http://www.cnpsa.embrapa.br/sgc/sgc\\_publicacoes/publicacao\\_h6n45p3z.pdf](http://www.cnpsa.embrapa.br/sgc/sgc_publicacoes/publicacao_h6n45p3z.pdf) acesso em: 01/11/2020
- Bligh, E. G., & Dyer, W. J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 37 (21), 911–917.
- Caruso, M., and A. Demonte. 2005. Histomorfometria do intestino delgado de ratos submetidos a diferentes fontes protéicas. *Alim. Nutr. Araraquara*. 16:131-136.
- Costa, C.M., Santos, R.C.C., Lima, E.S. 2006. A simple automated procedure for thiol measurement in human serum samples. *J. Bras. Patol. Med. Lab.* 42, 345-350.

Delles, R. M.; Xiong, Y. L.; True, A. D.; Ao, T., Dawson, K. A. Dietary antioxidant supplementation enhances lipid and protein oxidative stability of chicken broiler meat through promotion of antioxidant enzyme activity. *Poultry Science*, 2014.

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*, 2002; 11(4):453-463

Eidelsburger, U. Feeding short-chain organic acids to pigs. Nottingham. Nottingham University Press. 2001:107-121.

Fonseca, S. S., Da Silva, V. C., Valentim, J. K., Geraldo, A. Efeito da adição de diferentes emulsificantes na dieta sobre o rendimento de carcaça de frangos de corte. *Revista Acadêmica Ciência Animal*, 2018; 16:1-13

Fortuoso, B. F., Reis, J. H., Gebert, R. R., et al. Glycerol monolaurate in the diet of broiler chickens replacing conventional antimicrobials: Impact on health, performance and meat quality. *Microbial Pathogenesis*, 2019; 129:161-167

Freitas, L., Santos, J.C., Barcza, M.V., Castro, H.F., 2009. Alternativa potencial para aproveitamento do glicerol gerado na produção de biodiesel: síntese enzimática de monolaurina por esterificação. *Quím. Nova* 32, 2277-2281.

Fuini, M. G. Utilização do cogumelo *Agaricus blazei* como alternativa ao uso de antibióticos em rações para frangos de corte. 2001. 64 p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Federal de Lavras.

Galli, G. M.; Gerbet, R. R.; Griss, L. G.; Fortuoso, B. F.; Petrolli, T. G.; Boiago, M. M.; Souza, C. F.; Baldissera, M. D.; Mesadri, J.; Wagner, R.; Rosa, G.; Mendes, R.; Gris, A.; Silva, A. S. Combination of herbal components (curcumin, carvacrol, thymol, cinnamaldehyde) in broiler chicken feed: Impacts on response parameters, performance,

fatty acid profiles, meat quality and control of coccidia and bacteria. *Microbial Pathogenesis*, 2020; 139

Hartman, L., & Lago, R. C. (1973). Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. *Laboratory Practice*, 22 (494), 475–477.

Jiang, Z.; Zhang, M. Z. H.; Li, Y.; Liu, M.; Feng, F. Antimicrobial Emulsifier–Glycerol Monolaurate Induces Metabolic Syndrome, Gut Microbiota Dysbiosis, and Systemic Low-Grade Inflammation in Low-Fat Diet Fed Mice. *Molecular Nutrition Food Research*, 2018; 62

Lieberman, S.; Enig, M.; Preuss, H. G. A review of monolaurin and lauric acid. *Natural Virucidal and Bactericidal Agents*. 2006.

Line, J. E. *Campylobacter and Salmonella Populations Associated with Chickens Raised on Acidified Litter*. *Poultry Science* 2002; 81:1473-1477

Liu, T.; Li, C.; Zhong, H.; Feng, F. Dietary medium-chain  $\alpha$ -monoglycerides increase BW, feed intake, and carcass yield in broilers with muscle composition alteration. *Poultry Science*, 2020.

Mustafa, N.G. Biochemical trails associated with different doses of alpha-monolaurin in chicks. *Advances in Animal and Veterinary Science.*, 2019; 7:187–192

Oetting, L. L., Utiyama, C. E., Giani, P. A., Ruiz, U. S., Miyada, V. S. Efeitos de extratos vegetais e antimicrobianos sobre a digestibilidade aparente, o desempenho, a morfometria dos órgãos e a histologia intestinal de leitões recém-desmamados. *Revista Brasileira de Zootecnia*. 2006; 35(4):1389–1397

Ricke, S.C. Perspectives on the use of organic acids and short chain fatty acids as antimicrobials. *Poultry Sciences*, 2003; 82(4):632-639

Rocha, A. P.; Abreu, R. D.; Costa, M. C. M. M.; Oliveira, G. J. C.; Albinati, R. C. B.; Paz, A. S.; Queiroz, L. G.; Pedreira, T. M. Prebióticos, ácidos orgânicos e probióticos em

rações para frangos de corte. *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal*, 2010; 11(3):793-801

Valentini, J.; Silva, A. S.; Furtuoso, B. F.; Reis, J. H.; Gebert, R. R.; Griss, L. G.; Boiago, M. M.; Lopes, L. Q. S.; Santos, R. C. V.; Wagner, R.; Tavernari, F. C.; Chemical composition, lipid peroxidation, and fatty acid profile in meat of broilers fed with glycerol monolaurate additive. *Food Chemistry*, 2020; 330

Van Der Aar, P.J.; Molist, F.; Van Der Klis, J.D. The central role of intestinal health on the effect of feed additives on feed intake in swine and poultry. *Animal Feed Science and Technologie*, 2017; 233:64–75

Visentainer, J. V. (2012). Aspectos analíticos da resposta do detector de ionização em chama para ésteres de ácidos graxos em biodiesel e alimentos. *Química Nova*, 35 (2), 274-279.

Viola, E. S.; Vieira, S. L. Suplementação de acidificantes orgânicos e inorgânicos em dietas para frangos de corte: desempenho zootécnico e morfologia intestinal. *Revista Brasileira Zootecnia*. 2007; 36(4)

Zeitz, J. O.; Fennhoff, J.; Kluge, H.; Stang, G. I.; Eder, K. Effects of dietary fats rich in lauric and myristic acid on performance, intestinal morphology, gut microbes, and meat quality in broilers. *Poultry Science*, 2015; 94(10):2404-2413

Zhao, P. Y., Li, H. L., Hossain, M. M., Kim, I. H. Effect of emulsifier (lysophospholipids) on growth performance, nutrient digestibility and blood profile in weanling pigs. *Animal Feed Science and Technology*. 2015; 207:190-195

**Table 1.** Ingredients and basal diet for each phase of the production cycle of the three treatments

<b>POSITIVE CONTROL - GROUP TP</b>			
Ingredients (kg/ton)	age (days)		
	1–21	22–35	36–45
Corn	551.51	580.05	621.35
Soybean meal	373.01	337.00	298.22
Soy oil	39,05	49.19	49.70
Dicalcium phosphate	12.71	13.00	112.25
Calcitic limestone	11.42	9.28	8.00
Ionized salt	4.86	4.23	3.95
DL-methionine – 99%	2.91	2.82	2.50
L-lysine – 78%	2.03	1.95	2.63
L-threonine – 99%	0.50	0.48	0.40
Premix of vitamins and minerals <sup>1</sup>	2.00	2.00	2.00
Enramycin (mg/kg)	10	10	-
Salinomycin (mg/kg)	64	64	-
Calculated chemical composition	100	100	100
Energy (kcal/kg)	3050	3150	3200
Crude protein (%)	21.20	19.80	18.40
Calcium (%)	0.84	0.76	0.66
Available phosphorus (%)	0.40	0.35	0.31
Digestible lysine (%)	1.22	1.13	1.06
Digestible methionine (%)	0.47	0.45	0.42
Methionine + digestible cysteine (%)	0.88	0.83	0.77
Digestible threonine (%)	0.79	0.73	0.69
Digestible tryptophan (%)	0.21	0.20	0.19
Sodium (%)	0.21	0.20	0.19
<b>NEGATIVE CONTROL - GROUP TN</b>			
Ingredients (kg/ton)	Age (days)		
	1–21	22–35	36–45
Corn	551.51	580.05	621.35
Soybean meal	373.01	337.00	298.22
Soy oil	39,05	49.19	49.70
Dicalcium phosphate	12.71	13.00	112,25
Calcite limestone	11.42	9.28	8.00
Ionized salt	4.86	4.23	3.95
DL-Methionine – 99%	2.91	2.82	2.50
L-lysine – 78%	2.03	1.95	2.63
L-threonine – 99%	0.50	0.48	0.40
Premix of vitamins and minerals <sup>1</sup>	2.00	2.00	2.00
Salinomycin (mg/kg)	64	64	-
Calculated chemical composition	100	100	100
Energy (kcal/kg)	3050	3150	3200
Crude protein (%)	21.20	19.80	18.40

Calcium (%)	0.84	0.76	0.66
Available phosphorus (%)	0.40	0.35	0.31
Digestible lysine (%)	1.22	1.13	1.06
Digestible methionine (%)	0.47	0.45	0.42
Methionine + digestible cysteine (%)	0.88	0.83	0.77
Digestible threonine (%)	0.79	0.73	0.69
Digestible tryptophan (%)	0.21	0.20	0.19
Sodium (%)	0.21	0.20	0.19

#### ANTIMICROBIAL BLEND - GROUP T-FRA

Ingredients (kg/ton)	Age (days)		
	1–21	22–35	36–45
Corn	551.51	580.05	621.35
Soybean meal	373.01	337.00	298.22
Soy oil	31.05	41.19	41.70
Kaolin	7.00	7.00	7.00
Digest health	1.00	1.00	1.00
Dicalcium phosphate	12.71	13.00	112.25
Calcite limestone	11.42	9.28	8.00
Ionized salt	4.86	4.23	3.95
DL-methionine – 99%	2.91	2.82	2.50
L-lysine – 78%	2.03	1.95	2.63
L-threonine – 99%	0.50	0.48	0.40
Premix of vitamins and minerals <sup>1</sup>	2.00	2.00	2.00
Salinomycin (mg/kg)	64	64	-
Calculated chemical composition	100	100	100
Energy (kcal/kg)	3050	3150	3200
Brute protein (%)	21.20	19.80	18.40
Calcium (%)	0.84	0.76	0.66
Available phosphorus (%)	0.40	0.35	0.31
Digestible lysine (%)	1.22	1.13	1.06
Digestible methionine (%)	0.47	0.45	0.42
Digestible methionine + cysteine (%)	0.88	0.83	0.77
Digestible threonine (%)	0.79	0.73	0.69
Digestible tryptophan (%)	0.21	0.20	0.19
Sodium (%)	0.21	0.20	0.19

<sup>1</sup> Minimal vitamin and mineral levels per kg of product: vitamin A (5.000.000 UI); vitamin D3 (1.000.000 IU); vitamin E (15.000 UI); vitamin K3 (1.500 mg); vitamin B1 (1.500 mg); vitamin B2 (3.000 mg); vitamin B6 (2.000 mg); vitamin B12 (7.000 mcg); folic acid (500 mg); nicotinic acid (15 g); pantothenic acid (7000 mcg); choline (80 g); biotin (100 mg); Copper (10 g); iron (50 g); iodine (1.000 mg); manganese (80 g); selenium (300 mg); zinc (70 g); minimum humidity (20 g); maximum mineral matter (980 g).

<sup>2</sup>  $\alpha$ -Monolaurin (> 25 %), Mono-, di-, and triglycerides of butyric acid (> 21 %), glycerol (< 5 %), emulsifier hydrolyzed lecithins (180000 mg/kg), Binder Silicic acid, precipitated and dried (260000 mg/kg).

**Table 2.** Performance (mean and standard deviation) of chickens fed an antimicrobial blend to replace antibiotics compared to a positive control group (TP) and a negative control group (TN).

<b>1 to 21 days</b>			
	Body weight (g)	Feed consumption (g)	Food conversion
TN: Negative control	937 ± 24	1281 ± 51A	1.44 ± 0.09A
TP: Positive control	884 ± 43	1138 ± 66B	1.36 ± 0.03B
T-FRA: Antimicrobial blend	898 ± 34	1199 ± 74AB	1.41 ± 0.05AB
P-value	0.092	<b>0.01</b>	<b>0.01</b>
<b>1 a 35 days</b>			
	Body weight (g)	Feed consumption (g)	Food conversion
TN: Negative control	2454 ± 111	3613 ± 141	1.50 ± 0.02A
TP: Positive control	2482 ± 84	3584 ± 216	1.46 ± 0.06AB
T-FRA: Antimicrobial blend	2462 ± 130	3477 ± 242	1.44 ± 0.04B
P-value	0.64	0.57	<b>0.05</b>
<b>1 to 42</b>			
	Body weight (g)	Feed consumption (g)	Food conversion
TN: Negative control	3222 ± 128	5100 ± 335	1.60 ± 0.06
TP: Positive control	3260 ± 74	5357 ± 223	1.66 ± 0.04
T-FRA: Antimicrobial blend	3280 ± 127	5179 ± 182	1.60 ± 0.03
P-value	0.21	0.10	0.25

Note: Different letters in the same column indicate a significant difference between groups using the Tukey test and considering  $P \leq 0.05$ .

**Table 3.** Index of productive efficiency of chickens fed with an antimicrobial blend (T-FRA) replacing antibiotics compared to a positive control (TP) and negative control (TN) group.

	Productive Efficiency Index
TN: Negative control	466.5
TP: Positive control	454.9
T-FRA: Antimicrobial blend	468.5
P-value	<b>0.187</b>

Note: There was no difference between treatments using the Tukey test.

**Table 4.** Counting of total coliforms and colonies of *Escherichia coli* in chicken litter and feces of these birds fed with an antimicrobial blend (T-FRA) at 21 and 42 days of the experiment compared to a positive control (TP) and negative control (TN) group.

	<b>Collection day</b>	<b>TN</b>	<b>TP</b>	<b>T-FRA</b>	<b>P-value</b>
<b>CHICKEN BED</b>					
Total coliforms (CFU x 10 <sup>6</sup> )	21	38.8 ± 27.9	38.4 ± 30	10.2 ± 7.6	0.11
	42	0.0 ± 0.0	0.6 ± 0.8	0.0 ± 0.0	0.92
<i>E. coli</i> (CFU x 10 <sup>6</sup> )	21	9.6 ± 7.1	10.4 ± 6.0	3.6 ± 2.3	0.08
	42	0.0 ± 0.0	0.2 ± 0.4	0.0 ± 0.0	0.94
<b>CHICKEN STOOL</b>					
	<b>Collection day</b>	<b>TN</b>	<b>TP</b>	<b>T-FRA</b>	<b>P-value</b>
Total coliforms (CFU x 10 <sup>6</sup> )	21	65.7 ± 50.1	57.7 ± 53.5	19.1 ± 9.1	0.35
	42	0.4 ± 0.5	2.6 ± 2.4	0.4 ± 0.8	0.89
<i>E. coli</i> (CFU x 10 <sup>6</sup> )	21	36.6 ± 32.0	21.0 ± 22.3	15.0 ± 13.7	0.06
	42	0.2 ± 0.4	1.6 ± 1.2	0.4 ± 0.8	0.56

Note: There was no difference between treatments using the Tukey test.

**Table 5.** Serum metabolic biochemistry of chickens fed antimicrobial bend (T-FRA) at 42 days of the experiment compared to a positive control group (TP) and a negative control group (TN).

	TN	TP	T-FRA	P-value
Total protein (g/dL)	4.62 ± 0.41	4.84 ± 0.14	4.54 ± 0.27	0.61
Albumin (g/dL)	1.38 ± 0.12	1.22 ± 0.17	1.32 ± 0.20	0.24
Globulin (g/dL)	3.24 ± 0.21	3.62 ± 0.17	3.22 ± 0.23	0.07
Uric acid (mg/dL)	3.54 ± 1.05	3.20 ± 1.22	3.42 ± 1.05	0.59
Triglycerides (mg/dL)	89.4 ± 23.2	59.2 ± 32.0	74.2 ± 24.6	0.15
Cholesterol (mg/dL)	115 ± 9.73 <sup>b</sup>	132 ± 24.8 <sup>ab</sup>	147 ± 15.3 <sup>a</sup>	<b>0.05</b>
Glucose (mg/dL)	260 ± 14.1	272 ± 19.7	277 ± 20.2	0.21

Note: Different letters on the same line indicate a significant difference between groups using the Tukey test and considering  $P \leq 0.05$ .

**Table 6.** Oxidizing and antioxidant status in the intestine (day 21 and 42), muscle (day 42), and liver (day 42) of chickens fed with an antimicrobial bend (T-FRA) compared to a positive control (TP) and negative control (TN) group.

	Bird age	TN	TP	T-FRA	P-value
Intestinal ROS (x 10 <sup>3</sup> U DCFH/mg protein)	21	4.58 ± 0.9 <sup>b</sup>	6.59 ± 2.1 <sup>ab</sup>	10.9 ± 4.7 <sup>a</sup>	<b>0.001</b>
Intestinal ROS (x 10 <sup>3</sup> U DCFH/mg protein)	42	39.3 ± 6.4 <sup>a</sup>	25.9 ± 7.2 <sup>b</sup>	26.8 ± 5.7 <sup>b</sup>	<b>0.001</b>
Muscle ROS (x 10 <sup>2</sup> U DCFH/mg protein)	42	11.0 ± 2.4 <sup>a</sup>	10.8 ± 3.2 <sup>a</sup>	5.4 ± 2.0 <sup>b</sup>	<b>0.001</b>
Liver ROS (x 10 <sup>3</sup> U DCFH/mg protein)	42	2.97 ± 1.0 <sup>b</sup>	6.36 ± 1.7 <sup>a</sup>	5.93 ± 2.8 <sup>ab</sup>	<b>0.013</b>
Intestinal TBARS (µmol MDA/mg protein)	21	0.55 ± 0.22	0.64 ± 0.21	0.72 ± 0.25	0.47
Intestinal TBARS (µmol MDA/mg protein)	42	0.92 ± 0.28 <sup>a</sup>	0.99 ± 0.32 <sup>a</sup>	0.45 ± 0.14 <sup>b</sup>	<b>0.011</b>
Muscle TBARS (µmol MDA/mg protein)	42	0.26 ± 0.06	0.38 ± 0.13	0.26 ± 0.05	0.19
Liver TBARS (µmol MDA/mg protein)	42	0.35 ± 0.07	0.40 ± 0.09	0.45 ± 0.13	0.24
Intestinal GST (µmol Cdnb/min/mg protein)	21	399 ± 61 <sup>b</sup>	537 ± 63 <sup>a</sup>	541 ± 72 <sup>a</sup>	<b>0.05</b>
Intestinal GST µmol Cdnb/min/mg protein)	42	416 ± 50 <sup>b</sup>	451 ± 97 <sup>ab</sup>	589 ± 105 <sup>a</sup>	<b>0.013</b>
Muscle GST (µmol Cdnb/min/mg protein)	42	387 ± 32 <sup>a</sup>	334 ± 63 <sup>ab</sup>	278 ± 41 <sup>b</sup>	<b>0.001</b>
Live GST (x 10 <sup>2</sup> µmol MDA/mg protein)	42	10.5 ± 2.4	9.97 ± 1.5	8.96 ± 2.8	0.36
Intestinal thiols (µmol SH/mg protein)	21	1.10 ± 0.46	0.94 ± 0.35	0.76 ± 0.36	0.294
Intestinal thiols (µmol SH/mg protein)	42	1.13 ± 0.48 <sup>b</sup>	0.83 ± 0.36 <sup>b</sup>	2.16 ± 0.63 <sup>a</sup>	<b>0.050</b>
Muscle thiols (µmol SH/mg protein)	42	0.43 ± 0.17 <sup>b</sup>	0.72 ± 0.2 <sup>a</sup>	0.74 ± 0.19 <sup>a</sup>	<b>0.012</b>
Liver thiols (µmol SH/mg protein)	42	0.77 ± 0.18 <sup>b</sup>	0.86 ± 0.28 <sup>b</sup>	1.37 ± 0.29 <sup>a</sup>	<b>0.001</b>

Note: Different letters on the same line indicate a significant difference between groups using the Tukey test and considering  $P \leq 0.05$ .

Table 7: Fatty acid profile and total lipids in the meat of broilers fed with an antimicrobial bend (T-FRA) compared to a positive control (TP) and negative control (TN) group.

Meat fatty acid profile	TN	TP	T-FRA	CV	Valor P
C12:0 - lauric acid	0.051 <sup>b</sup>	0.052 <sup>b</sup>	0.214 <sup>a</sup>	5.01	<0.001*
C14:0 - myristic acid	1.078	0.958	1.226	11.9	0.369
C14:1n5 - myristoleic acid	0.097	0.125	0.133	6.08	0.214
C15:0 - pentadecanoic acid	0.147	0.155	0.157	9.75	0.697
C16:0 - palmitic acid	50.042 <sup>a</sup>	43.641 <sup>b</sup>	51.037 <sup>a</sup>	7.10	0.050*
C16:1n7 - palmitoleic acid	4.042	4.074	4.301	9.06	0.320
C17:0 - heptadecanoic acid	0.225	0.236	0.241	2.75	0.876
C18:1 cis (n11)- vaccenic acid	2.537	2.208	2.367	16.2	0.485
C18:2 n6 9c12c - linoleic acid	35.712 <sup>b</sup>	41.811 <sup>a</sup>	35.018 <sup>b</sup>	5.42	0.017*
C18:3n6 - $\gamma$ -linolenic acid	0.100	0.148	0.108	10.6	0.589
C18:3n3 - $\alpha$ -linolenic acid	1.877 <sup>b</sup>	2.660 <sup>a</sup>	1.734 <sup>b</sup>	7.21	0.041*
C20:1(n9) - cis-11-eicosenoic acid	0.073 <sup>b</sup>	0.224 <sup>a</sup>	0.098 <sup>b</sup>	10.7	0.034*
C20:2n6 - cis-11.14-eicosadienoic acid	0.209	0.393	0.213	17.3	0.183
C20:3n6 - cis-8.11.14-eicosatrienoic acid	0.333	0.349	0.293	12.4	0.285
C22:1n9 - erucic acid	2.975	2.0816	2.3219	11.9	0.097
C20:5n3 (EPA) - cis-5,8,11,14,17-eicosapentaenoic	0.035	0.024	0.026	15.3	0.687
C22:4 n6	0.295	0.430	0.332	8.65	0.075
C22:5 n6	0.000 <sup>c</sup>	0.081 <sup>a</sup>	0.015 <sup>b</sup>	2.87	<0.001*
C22:5(n3) (DPA)	0.111	0.224	0.128	8.39	0.117
C22:6(n3) (DHA) - cis-4,7,10,13,16,19-docosahexaenoic acid	0.060 <sup>b</sup>	0.141 <sup>a</sup>	0.039 <sup>b</sup>	4.52	<0.001*
AGS	51.542 <sup>a</sup>	45.043 <sup>b</sup>	52.874 <sup>a</sup>	6.48	0.015*
AGMI	9.725	8.713	9.221	4.95	0.258
AGPI	38.733 <sup>b</sup>	46.261 <sup>a</sup>	37.905 <sup>b</sup>	6.37	0.010*
Total lipids (%)	1.614 <sup>b</sup>	2.583 <sup>a</sup>	1.657 <sup>b</sup>	4.39	<0.001*

Note: Different letters on the same line indicate a significant difference between groups

using the Tukey test and considering  $P \leq 0.05$ .

**Table 8.** Intestinal morphometry (villus and crypt) and villus/crypt ratio in broilers at two points in the production cycle (days 21 and 42).

	<b>Collection day</b>	<b>TN</b>	<b>TP</b>	<b>T-FRA</b>	<b>P-value</b>
Villus ( $\mu\text{m}$ )	21	1150.7	1317.0	1241.6	0.134
	42	1283.2 <sup>a</sup>	1169.2 <sup>a</sup>	888.4 <sup>b</sup>	< 0.001
Crypt ( $\mu\text{m}$ )	21	190.2 <sup>b</sup>	225.3 <sup>a</sup>	169.3 <sup>b</sup>	< 0.001
	42	357.1 <sup>a</sup>	205.8 <sup>b</sup>	188.2 <sup>b</sup>	<0.001
Villus/crypt ratio	21	6.04 <sup>b</sup>	5.84 <sup>b</sup>	7.33 <sup>a</sup>	0.010
	42	3.59 <sup>c</sup>	5.68 <sup>a</sup>	4.72 <sup>b</sup>	< 0.001

Note: Different letters on the same line indicate a significant difference between groups using the Tukey test and considering  $P \leq 0.05$ .

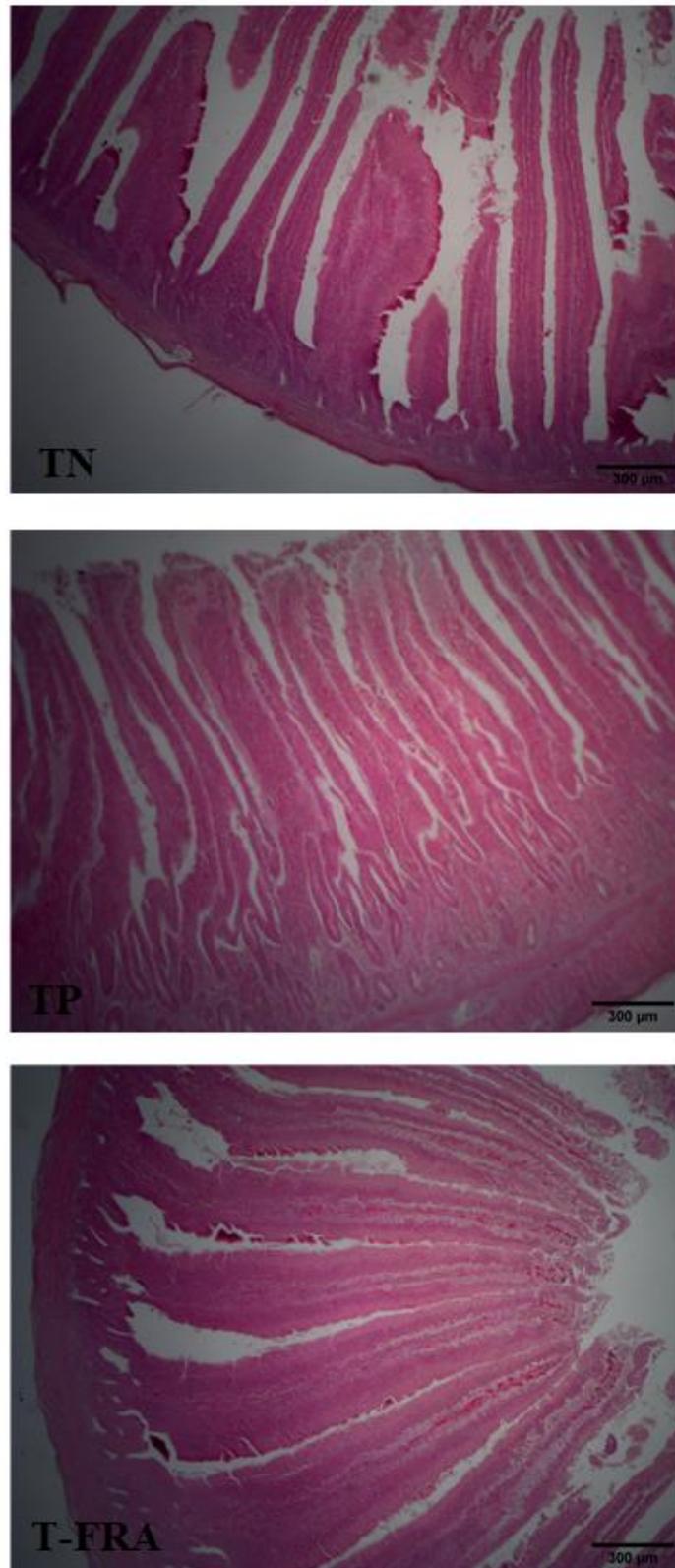


Figure 1: Histological images of chicken intestines from the negative control (TN), positive control (TP), and antimicrobial blend (T-FRA) treatments. No intestinal lesions were observed in birds from the three treatments at 21 and 42 days of life.

**Supplementary material 1.** Composition of the commercial blend FRA Digest Health® from the company Feedis (São Paulo, Brazil).

<b>Ingredients</b>	<b>Quantity</b>
$\alpha$ -monolaurin	> 25%
Butyric acid mono-, di- and triglycerides	> 21%
Glycerol	< 5%
Hydrolyzed lecithins (emulsifier)	180,000 mg/kg (18%)
Precipitated and dry silicic acid (binder)	260,000 mg/kg (26%)

**Supplementary material 2:** Fatty acid profile and total lipids in the feed of broilers with an antimicrobial blend (T-FRA), antibiotic enramycin (TP - positive control), and no performance promoter (TN - negative control)

Feed fatty acid (%)	TN	TP	T-FRA	CV	Valor P
C12:0 - lauric acid	0.008 <sup>b</sup>	0.008 <sup>b</sup>	0.803 <sup>a</sup>	14.1	<0.001*
C14:0 - myristic acid	0.140	0.169	0.155	6.47	0.365
C15:0 - pentadecanoic acid	0.031	0.040	0.036	11.4	0.248
C16:0 - palmitic acid	23.63 <sup>b</sup>	26.264 <sup>a</sup>	25.012 <sup>ab</sup>	10.7	0.036*
C16:1n7 - palmitoleic acid	0.130	0.141	0.136	3.98	0.745
C17:0 - heptadecanoic acid	0.156	0.170	0.159	5.81	0.621
C18:1 cis (n11)- vaccenic acid	1.865	1.848	1.784	3.72	0.854
C18:2 n6 9c12c - linoleic acid	66.48	64.486	65.180	15.4	0.398
C20:0 - arachidic acid	0.659	0.547	0.560	7.12	0.483
C18:3n3 - $\alpha$ -linolenic acid	5.568	5.316	5.259	5.10	0.657
C20:1(n9) - cis-11-eicosenoic acid	0.313	0.256	0.269	4.89	0.098
C20:2n6 - cis-11.14-eicosadienoic acid	0.029	0.026	0.026	21.7	0.752
C22:0 - behenic acid	0.642 <sup>a</sup>	0.486 <sup>b</sup>	0.436 <sup>b</sup>	3.78	0.025*
C23:0 - tricosanoic acid	0.071	0.044	0.031	25.7	0.158
C24:0 - lignoceric acid	0.251	0.176	0.150	14.2	0.075
C22:5 n6	0.010	0.024	0.004	39.1	0.245
AGS	25.59	27.90	27.34	8.46	0.169
AGMI	2.310	2.244	2.189	2.78	0.856
AGPI	72.09	69.85	70.46	10.9	0.685
Total lipids (%)	8.031 <sup>a</sup>	7.657 <sup>a</sup>	6.584 <sup>b</sup>	3.75	<0.001*

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

São esperados que nos próximos anos mais pesquisas envolvendo o uso de aditivos na alimentação de aves sejam desenvolvidas para que dessa forma haja maior interesse do setor avícola em fazer uso desses aditivos, em substituição aos antimicrobianos e promotores de crescimento vigentes. O uso de aditivos na avicultura pode ser viável uma vez que possibilitam melhores resultados de desempenho e digestibilidade, e permite uma melhoria na viabilidade criatória com consequente melhor índice de eficiência produtiva, principalmente quando existem condições de desafio sanitário.

A inclusão do *blend* à base de emulsificante, monolaurina, glicerol e ácidos butírico e silícico influenciou positivamente a CA aos 35 dias, alterou os parâmetros associados ao metabolismo lipídico e o status oxidante avaliado nos diferentes órgãos, como comprovado através do nível de peroxidação lipídica pela adição do produto aos 42 dias. Apesar de não haver diferença significativa quanto redução microbiana pode-se verificar que o produto apresentou uma tendência em reduzir a carga de bactérias patogênicas.

Sendo este um resultado positivo para a utilização de aditivos, pois ele não causou maiores alterações que pudessem prejudicar o desempenho. Comparando a utilização do produto com antibiótico, notamos um resultado positivo para uma possível substituição do antimicrobiano, dado que não houve diferenças extremas entre os tratamentos.

Ressalta-se ainda que a dieta que utilizou o *blend* houve uma economia de óleo na ração, ou seja, a dieta que utilizou este produto possuiu uma economia.

## REFERÊNCIAS

ADIL, S.; et al. Effect of dietary supplementation of organic acids on performance, intestinal histomorphology, and serum biochemistry of broiler chicken. *Veterinary Medicine International*, v. 7, p. 4061-4065, 2010.

ARISTIMUNHA, P. Efeito de diferentes programas de suplementação de um produto á base de ácidos orgânicos e substancia húmica na performance, resposta immune e morfometria intestinal de frangos de corte. 2017. 93f. Tese (doutorado em zootecnia) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2017.

ANTONGIOVANNI, M. et al. Butyric acid glycerides in the diet of broiler chickens: effects on gut histology and carcass composition. *Italian Journal of Animal Science*, v. 6, p. 19-25, 2007.

ARIF, M.; HAYAT, Z.; SOHAIL, S.; ABD EL-HACK, M.E. Impact of increasing crude glycerine levels in diet on growth, carcass traits, body measurements and blood cholesterol in growing Japanese quails. *Journal of Animal and Feed Sciences*, v.26, n.1, p. 44-49, 2017.

BASSANETTI, I.; CARCELLI, M.; BUSCHINI, A. et al. Investigation of antibacterial activity of new classes of essential oils derivatives. *Food Control*, v.73, part B, p.606-612, 2017.

BELLAVER, C.; SCHEUERMANN, G. aplicações dos ácidos orgânicos na produção de aves de corte. Disponível em: [http://www.cnpsa.embrapa.br/sgc/sgc\\_publicacoes/publicacao\\_h6n45p3z.pdf](http://www.cnpsa.embrapa.br/sgc/sgc_publicacoes/publicacao_h6n45p3z.pdf) acesso em: 01/11/2020

CERRATE, S.; YAN, F.; WANG, Z.; COTO, C.; SAKAKLI, P.; WALDROUP, P. W. Evaluation of glycerine from biodiesel production as a feed ingrediente for broilers. *International Journal of Poultry Science*, v.5, n.11, p.1001-1007, 2006.

FERNANDES, R.T.V. Aditivos fitogênicos na alimentação de frangos de corte: óleos essenciais e especiarias. *PubVet. Maringá*, v. 9, n. 12, p. 526-535, Dez., 2015

FORTUOSO, B. F., REIS, J. H., GEBERT, R. R., et al. Glycerol monolaurate in the diet of broiler chickens replacing conventional antimicrobials: Impact on health, performance and meat quality. *Microbial Pathogenesis*, v.129, p. 161-167, 2019.

KALEMBA, D., KUNICKA, A. Antibacterial and antifungal and properfungal properties of essential oils. *Current Medicinal Chemistry*, V. 10, n. 10, 2003.

LAMMERS, P.; KERR, B.J.; HONEYMAN, M.; STALDER, K.; DOZIER, W.A.; WEBER, T.E.; KIDD, M.T.; BREGENDAHL, K. Nitrogen-corrected apparent metabolizable energy value of crude glycerol for laying hens. *Journal of Animal Science*, Champaign, v. 87, n. 1, p. 104-107, 2008.

MENDES, F. R.; LEITE, P. R. S.; FERREIRA, L. L.; LACERDA, M. J. R.; ANDRADE, M. A. Utilização de antimicrobianos na avicultura. *Nutritime*, v.10, n.2, p. 2352-2389, 2013.

PANDA, A. K. et al. Effect of butyric acid on performance, gastrointestinal tract health and carcass characteristics in broiler chickens. *Asian-Australian Journal of Animal Science*, v. 22, n. 7, p. 1026-1031, 2009.

PEISKER, M.; DERSJANT-LI, Y. Glicerol na nutrição animal: coproduto versátil da produção de biodiesel. *Kraftfutter*, v.89, n10, p.16-23, Frankfurt, 2006.

RAMOS, L. S. N.; LOPES, J. B.; RIBEIRO, M. N.; SILVA, F. E. S.; MERVAL, R. R.; ALBUQUERQUE, D. M. N. Aditivos alternativos a antibióticos para frangos de corte no período de 22 a 42 dias de idade. *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal*, v15, n.4, 2014.

ROMANO, G. G.; Efeitos do glicerol no metabolismo de frangos de corte alimentados com dietas contendo níveis crescentes de glicerina. *Dissertação de mestrado Universidade de São Paulo, Piracicaba*, 2012.

SALAZAR, P. C. R.; et al. Efeito dos ácidos láctico e butírico, isolados e associados, sobre o desempenho e morfometria intestinal em frangos de corte. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v. 45, n. 6, p. 463-471, 2008

SANTANA, E. S.; MENDES, F. R.; BARNABÉ, A. C. S.; et al. Uso de produtos alternativos aos antimicrobianos na avicultura. *Enciclopédia biosfera, Centro Científico Conhecer - Goiânia*, vol.7, N.13; Pág. 985-1009, 2011.

SANTOS, E. C.; TEIXEIRA, A. S.; FREITAS, R. T. F.; RODRIGUES, P. B.; DIAS, E. S.; MURGAS, L. D. S. Uso de aditivos promotores de crescimento sobre o desempenho, características de carcaça e bactérias totais do intestino de frangos de corte. *Ciência Agrotecnologia*, v.29, n.1, Lavras, 2005.

SERPA, P. G.; Ácido butírico e betaína na alimentação de frangos de corte. Dissertação mestrado Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 2016.

SOUSA, C. D.; OLIVEIRA, N.L.A.; DOURADO, L.R.B.; FERREIRA, G.J. Sistema digestório das aves e o glicerol na dieta de frangos de corte: Revisão. PUBVET v. 9 n. 08 p. 348 – 399, 2015.

VALENTINI, J.; SILVA, A. S.; FURTUOSO, B. F. et al. Chemical composition, lipid peroxidation, and fatty acid profile in meat of broilers fed with glycerol monolaurate additive. Food Chemistry, v.330, 2020.

VIOLA, E. S.; VIEIRA, S. L. Suplementação de acidificantes orgânicos e inorgânicos em dietas para frangos de corte: desempenho zootécnico e morfologia intestinal. Revista Brasileira Zootecnia. V. 36, n.4, Viçosa, 2007.

## ANEXO



*Comissão de Ética no  
Uso de Animais*

## CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Aditivos alimentares na avicultura de corte: impactos sobre eficiência produtiva, composição e qualidade de carne e saúde das aves", protocolada sob o CEUA nº 7175220620 (ID 001186), sob a responsabilidade de **Aleksandro Schafer da Silva** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade do Estado de Santa Catarina (CEUA/UDESC) na reunião de 24/07/2020.

We certify that the proposal "Food additives in broiler poultry: impacts on production efficiency, meat composition and quality and poultry health", utilizing 750 Birds (750 males), protocol number CEUA 7175220620 (ID 001186), under the responsibility of **Aleksandro Schafer da Silva** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the University of Santa Catarina State (CEUA/UDESC) in the meeting of 07/24/2020.

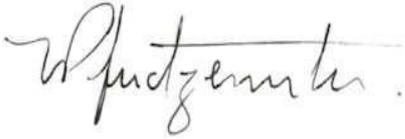
Finalidade da Proposta: [Pesquisa \(Comercial\)](#)

Vigência da Proposta: de [07/2020](#) a [12/2021](#) Área: [Zootecnia](#)

Origem	<a href="#">Animais provenientes de estabelecimentos comerciais</a>	<a href="#">Machos</a>	idade: <a href="#">1 a 42 dias</a>	N <a href="#">750</a>
Espécie	<a href="#">Aves</a>			:
	sexo:			
Linhagem	<a href="#">Coob500</a>		Peso: <a href="#">40 a 3500 g</a>	

Local do experimento: Setor de avicultura da UDESC Oeste

Lages, 11 de setembro de 2020



Ubirajara Maciel da Costa  
aberto

em

Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais    Vice-Coordenador da  
Comissão de Ética no Uso de Animais Universidade do Estado de Santa  
Catarina    Universidade do  
Estado de Santa Catarina