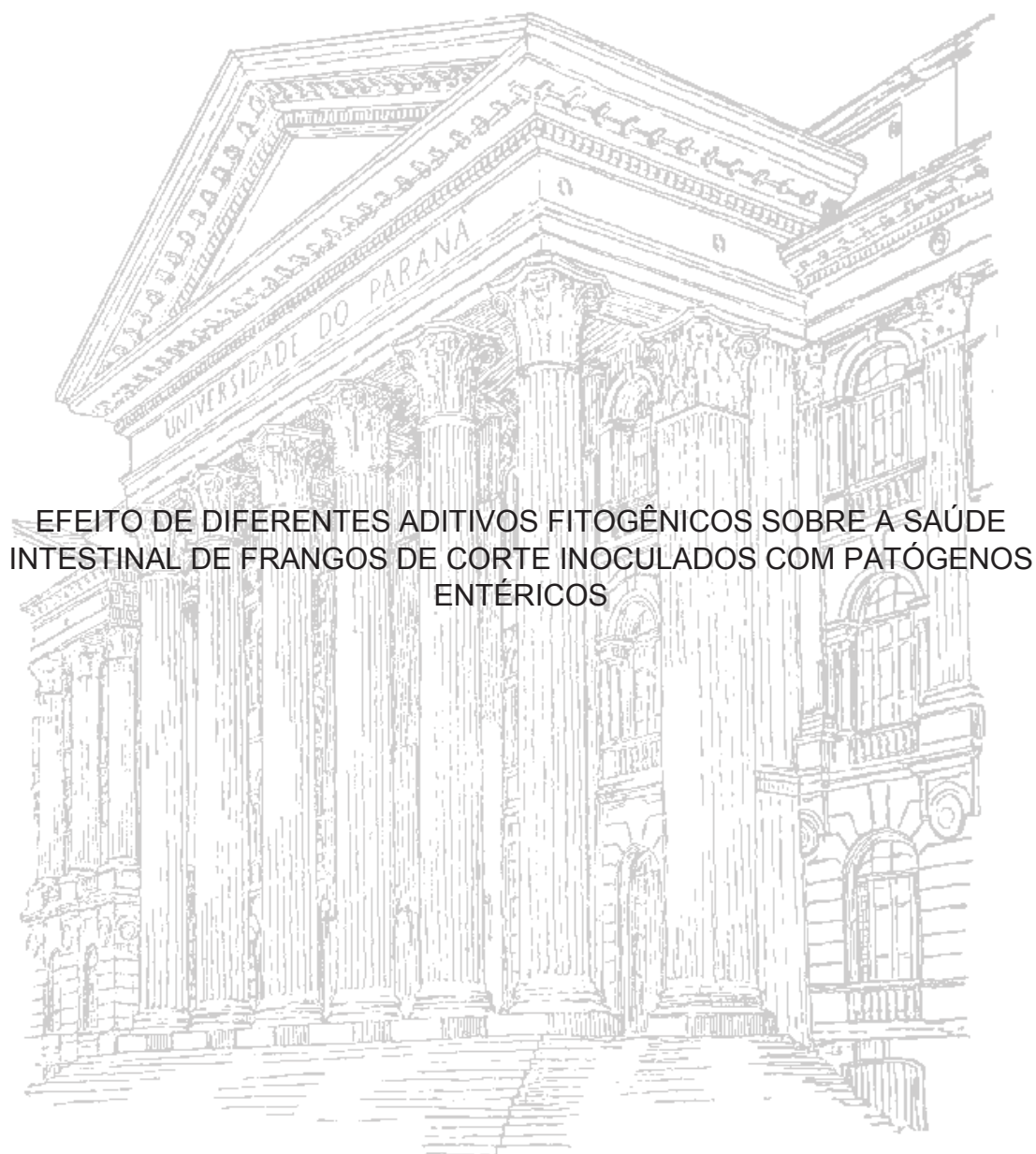


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

LORRAN BAEUMLE GABARDO



EFEITO DE DIFERENTES ADITIVOS FITOGENICOS SOBRE A SAÚDE
INTESTINAL DE FRANGOS DE CORTE INOCULADOS COM PATÓGENOS
ENTÉRICOS

CURITIBA
2019

LORRAN BAEUMLE GABARDO

EFEITO DE DIFERENTES ADITIVOS FITOGÊNICOS SOBRE A SAÚDE
INTESTINAL DE FRANGOS DE CORTE DESAFIADOS COM PATÓGENOS
ENTÉRICOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Área de Concentração: Patologia Veterinária, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná. Como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências Veterinárias.

Orientação: Prof. Fabiano Montiani Ferreira

CURITIBA
2019

Gabardo, Lorrان Baeumle

Efeito de diferentes aditivos fitogênicos sobre a saúde intestinal de frangos de corte inoculados com patógenos entéricos / Lorrان Baeumle Gabardo.

. - Curitiba, 2019.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. Orientador: Fabiano Montiani Ferreira.

1. Avicultura. 2. Disbiose. 3. Fitogênicos. 4. Histologia. I. Ferreira, Fabiano Montiani. II. Título. III. Universidade Federal do Paraná.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIAS
VETERINÁRIAS - 40001016023P3

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS VETERINÁRIAS da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de LORRAN BAEUMLE GABARDO intitulada: EFEITO DE DIFERENTES ADITIVOS FITOGÊNICOS SOBRE A SAÚDE INTESTINAL DE FRANGOS DE CORTE INOCULADOS COM PATÓGENOS ENTÉRICOS, sob orientação do Prof. Dr. FABIANO MONTIANI FERREIRA, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 11 de Dezembro de 2019.

FABIANO MONTIANI FERREIRA

Presidente da Banca Examinadora (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

ALEX MAIORKA

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

ANANDA PORTELLA FÉLIX

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

RESUMO

A busca por alimentos mais saudáveis e seguros para o ser humano traz à indústria animal a necessidade de revisar e evoluir diversas práticas. Na produção de aves a saúde intestinal passou a ter papel de destaque devido à redução do uso de antibióticos promotores de crescimento (APC). Por este motivo diversos aditivos vêm sendo pesquisados como parte integrante de programas para a redução dos APC. Neste contexto, os compostos fitogênicos representam uma classe de aditivos naturais com potencial de modular diversos aspectos orgânicos e promover melhor desempenho dos animais. Portanto, no primeiro capítulo deste trabalho foi feita uma revisão bibliográfica sobre os conceitos de saúde intestinal e aditivos fitogênicos. No segundo capítulo foi realizada uma avaliação experimental para verificar a ação de dois aditivos fitogênicos diferentes (saponinas, óleos essenciais, substâncias pungentes e picantes) sobre o desempenho e o status de saúde intestinal em aves inoculadas com *Eimeria* spp. e *Clostridium perfringens*. Os resultados obtidos não mostraram diferenças significativas ($P > 0,05$) no desempenho das aves, entretanto através da metodologia “I See Inside” (ISI) observou-se o efeito destes compostos em estimular a reconstituição da arquitetura epitelial e a redução dos índices de inflamação intestinal. Desta maneira, foi possível concluir que os dois aditivos fitogênicos auxiliaram na recuperação do intestino após o desafio. Além disso, a presença das substâncias pungentes e picantes na composição do fitogênico 2 parecem ter sido responsáveis pelo maior controle da inflamação deste grupo.

Palavras-chave: Avicultura. Disbiose. Fitogênicos. Histologia.

ABSTRACT

The search for healthier and safer food for humans brings to the animal industry the need to review and evolve various practices. In poultry production, intestinal health has played a prominent role due to the reduction in the usage of antibiotic growth promoters (AGP). Therefore, several researches have been done to integrate feed additives as part of the programs to reduce the AGP. In this context, the phytogetic compounds are considered a class of natural additives with the potential to modulate various organic aspects and promote better animal performance. Thereat in the first chapter of this work, a literature review was made to elucidate the concepts involving intestinal health and phytogetic additives. In the second chapter an in vivo trial was conducted to verify the action of two different phytogetic additives (based on saponins, essential oils, pungent and bitter substances) over performance and intestinal health status in birds inoculated with *Eimeria spp.* and *Clostridium perfringens*. The obtained results showed no significant differences ($P > 0.05$) in the performance of birds. However, the histological evaluation through the "I See Inside" (ISI) methodology it was observed the effect of these compounds in stimulating the epithelial architecture reconstitution and the reduction of inflammation scores in the intestine. Thus, it could be concluded that the two phytogetic additives were able to help in the intestinal recovery after the challenge. Moreover, the presence of pungent and bitter substances in the composition of phytogetic 2 ought may be the responsible for a greater control of inflammation in this group.

Keywords: Poultry. Dysbiosis. Phytogetics. Histology.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

- Figure 1. Effect of the addition of different feed additives on gut histopathological lesions score evaluation of ISI total index of broiler chickens at d28 and d35, challenged with a 15-fold dose of a commercial anti-coccidian vaccine at d14, and contaminated with an inoculum of 10^8 CFU mL⁻¹ bird⁻¹ of *Clostridium perfringens* orally administered at d19, d20 and d2125
- Figure 2. Effect of the addition of different feed additives on gut histopathological lesions score evaluation based on ISI methodology of broiler chickens at d28, challenged with a 15-fold dose of a commercial anti-coccidian vaccine at d14, and contaminated with an inoculum of 10^8 CFU mL⁻¹ bird⁻¹ of *Clostridium perfringens* orally administered at d19, d20 and d2126
- Figure 3. Effect of the addition of different feed additives on gut histopathological lesions score evaluation based on ISI methodology of broiler chickens at d35, challenged with a 15-fold dose of a commercial anti-coccidian vaccine at d14, and contaminated with an inoculum of 10^8 CFU mL⁻¹ bird⁻¹ of *Clostridium perfringens* orally administered at d19, d20 and d2126
- Figure 4. Effect of the addition of different feed additives on gut histopathological lesions score evaluation based on ISI methodology of broiler chickens at d42, challenged with a 15-fold dose of a commercial anti-coccidian vaccine at d14, and contaminated with an inoculum of 10^8 CFU mL⁻¹ bird⁻¹ of *Clostridium perfringens* orally administered at d19, d20 and d2127
- Figure 5. Photomicrographs of chicken ileum sections stained with hematoxylin and eosin. Alcian Blue was used to stain goblet cells (200x). The PC presents higher inflammatory cell infiltration in the lamina propria (1) and tissue congestion (2). AGP shows the presence of *Eimeria* spp. oocyst (3). PFA1 increased inflammatory cell infiltration in the epithelium (4). And PFA2 shows lower ISI scores. These alterations contributed to the highest ISI index ($P < 0.05$) in Challenged Group (PC) compared to the PFA2 at 35 days of age30
- Figure 6. Similarity analysis of different feed additives on the overall performance, and gut histopathological lesions score evaluations broiler chickens from 1 to 42 d,

challenged with a 15-fold dose of a commercial anti-coccidian vaccine at d14 and contaminated with an inoculum of 10^8 CFU mL⁻¹ bird⁻¹ of *Clostridium perfringens* orally administered at d19, d20 and d2131

Tabelas

Tabela 1. Principais propriedades dos ingredientes fitogênicos sobre saúde intestinal de aves.....10

Tabela 2. Effect of the addition of different feed additives on growth performance of broiler chickens from 1 to 42 d, challenged with a 15-fold dose of a commercial anti-coccidian vaccine at d14, and contaminated with an inoculum of 10^8 CFU mL⁻¹ bird⁻¹ of *Clostridium perfringens* orally administered at d19, d20 and d2124

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	1
2. SAÚDE INTESTINAL DAS AVES E ADITIVOS FITOGÊNICOS: UMA REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1. Saúde intestinal	3
2.2. Disbiose em aves	5
2.3. Aditivos fitogênicos.....	8
2.4. Óleos essenciais	10
2.5. Saponinas.....	13
2.6. Substâncias pungentes	14
2.7. Substâncias amargas	16
3. EFFECT OF TWO DIFFERENT PHYTOGENIC ADDITIVES ON PERFORMANCE AND GUT HISTOLOGICAL ALTERATIONS IN BROILERS SUBMITTED TO AN ENTERIC CHALLENGE.....	17
3.1. Description of the problem.....	18
3.2. Material and methods	21
3.3. Results and discussion.....	23
3.4. Conclusion.....	32
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	33
5. REFERÊNCIAS	34

1. INTRODUÇÃO GERAL

A produção de carne de frango no Brasil tem grande destaque no cenário internacional, uma vez que o país é o maior exportador e o segundo maior produtor mundial desta proteína (ABPA, 2017). Para alcançar estes índices e atender as exigências de qualidade do mercado externo, o setor avícola tem incorporado tecnologias avançadas em diversas áreas como nutrição, sanidade e ambiência.

Atualmente um dos temas mais discutidos na avicultura é a redução dos antibióticos promotores de crescimento (APC), devido aos possíveis riscos ao meio ambiente, segurança alimentar e bem-estar dos animais e humanos (ROBERTS et al., 2015; COSTA; TSE; MIYADA, 2007). Entretanto, doenças até então controladas por estes medicamentos voltam a ter papel decisivo nos índices de produtividade animal. É o caso das disbioses como a enterite necrótica (DIBNER; RICHARDS, 2005; CALY et al., 2018; HOFACRE; SMITH; MATHIS, 2018).

Pressupõe-se que para o sucesso de um programa sem o uso de APC é necessária uma visão holística sobre toda a cadeia produtiva, com especial ênfase ao ambiente intestinal, devido à importância deste órgão em digerir e absorver nutrientes e servir como barreira imune contra patógenos (YEGANI; KORVER, 2008). Sob este prisma, o termo “saúde intestinal”, embora frequentemente usado, ainda não é claramente definido devido à sua multidisciplinariedade, envolvendo nutrição, fisiologia, endocrinologia, imunologia e microbiologia (CHOCT, 2009).

Neste cenário, grandes esforços têm sido feitos pela comunidade científica e indústria avícola para encontrar soluções integradas que auxiliem na manutenção do equilíbrio mucosa e microbiota intestinal. Os denominados aditivos alimentares (enzimas, probióticos, prébióticos, óleos essenciais, fitogênicos, ácidos orgânicos)

passaram a ser considerados parte importante desta estratégia por auxiliarem na manutenção de uma microbiota saudável (OVIEDO-RONDÓN, 2018). Por sua vez, os fitogênicos representam uma categoria bastante promissora por serem considerados naturais e seguros, além de apresentar um potencial de melhora no desempenho das aves (HASHEMI et al., 2010; WINDISCH et al., 2008). Entretanto, sabe-se que os efeitos bioativos a ele atribuídos são essencialmente dependentes da sua composição (HUMER et al., 2015). Para isso estudos devem ser conduzidos a fim de elucidar a inter-relação entre seus componentes.

Outro tema bastante relevante é a avaliação da saúde intestinal. Diversos métodos têm sido desenvolvidos para elucidar a relação entre microbiota e mucosa intestinal com o desempenho dos animais (ROBERTS et al., 2015; KUTTAPPAN et al., 2015; GILANI et al., 2016). Contudo, a histologia é considerada uma ferramenta padronizada que pode servir de base comparativa para futuras técnicas (DUCATELLE et al., 2018). A metodologia “*I See Inside*” (ISI) (KRAIESKI et al., 2017; BELOTE et al., 2018) propõe a integração destes dois conceitos através da atribuição de um escore de funcionalidade tecidual para as alterações histológicas.

Portanto, no primeiro capítulo deste trabalho buscou-se fazer uma revisão aprofundada sobre os conceitos de saúde intestinal e sobre a enterite necrótica, bem como a classificação dos aditivos fitogênicos e seus principais mecanismos de ação. No segundo capítulo, aplicou-se a metodologia ISI para estimar a melhora do status de saúde intestinal e dos índices zootécnicos com o uso de duas composições diferentes de aditivos fitogênicos em aves desafiadas experimentalmente com *Clostridium perfringens* e *Eimeria* spp.

2. SAÚDE INTESTINAL DAS AVES E ADITIVOS FITOGÊNICOS: UMA REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Saúde intestinal

O intestino tem um papel vital no organismo, atuando na digestão e absorção seletiva de nutrientes, íons e outros compostos, secretando enzimas e hormônios, além de funcionar como barreira contra substâncias tóxicas presentes no lúmen (FURLAN; MACARI; LUQUETTI, 2004). Devido à sua complexidade macro e microscópica, qualquer alteração no trato gastrointestinal (TGI) pode refletir nos demais sistemas orgânicos (STEWART; PRATT-PHILLIPS; GONZALEZ, 2017).

As pesquisas nesta área se iniciaram por meio de dados provenientes da saúde de seres humanos, após a descoberta do papel das bactérias intestinais na suplementação de nutrientes e seu potencial em provocar sérias doenças sistêmicas como obesidade, doença inflamatória do intestino e até o câncer (ZHANG et al., 2015). A partir disso, intervenções com nutrientes e aditivos passaram a ser realizadas com objetivo de reduzir o impacto das disbioses sobre a saúde geral dos seres humanos (CHOCT, 2009).

Embora os animais de produção de modo geral não apresentem exatamente as mesmas doenças crônicas mais típicas dos seres humanos, principalmente devido ao seu reduzido ciclo de vida, sabe-se que a saúde intestinal tem grande impacto sobre índices produtivos da indústria avícola (YEGANI; KORVER, 2008). Outro aspecto a ser considerado é a busca dos consumidores e dos órgãos governamentais que passaram a exigir produtos de origem animal com menor teor ou livres de antibióticos (ROBERTS et al., 2015). Estes fatores parecem deixar uma questão importante a ser explorada pela ciência: como equilibrar saúde intestinal e a manutenção dos níveis produtivos?

Neste cenário, a “saúde intestinal” passou a ser um dos principais objetos de estudo da avicultura mundial nos últimos anos. Muito embora este termo seja frequentemente usado por pesquisadores e pelo mercado avícola, ainda não existe uma definição científica formal para ele devido à sua complexidade. Alguns autores ponderam que a “saúde intestinal” nas aves é o resultado da prevenção de doenças, possibilitando ao animal desempenhar suas funções fisiológicas e suportar fatores de estresse exógenos e endógenos (OAKLEY; KOGUT, 2016). Outros, consideram ainda que para definir este termo é necessária uma visão integrada de todas as práticas do sistema produtivo, sendo necessário agregar conhecimentos multidisciplinares em fisiologia, microbiologia, imunologia, nutrição e ambiência para melhor compreendê-lo (OVIEDO-RONDÓN, 2018; CHOCT, 2009).

Sob o ponto de vista microbiológico, o lúmen intestinal é composto por uma grande variedade de microrganismos que, embora atuem de forma silenciosa, participam ativamente dos processos imunes e digestivos (KOGUT; ARSENAULT, 2016). Em aves saudáveis, a concorrência direta pelo alimento é limitada, uma vez que grande parte é absorvido no intestino delgado, onde a competição com os microrganismos é suprimida devido ao menor pH e ao tempo de retenção curto (AWAD et al., 2008). Entretanto, em situações que provocam a quebra deste equilíbrio, bactérias comensais podem proliferar, alterando a dinâmica de absorção de nutrientes pelo animal e inclusive veicular pela cadeia alimentícia de produtos de origem animal, como é o caso das salmoneloses (QUINTEIRO-FILHO ET AL., 2012; BELKAID; HAND, 2014).

Paralelamente foi demonstrado também a existência de uma correlação positiva entre a proliferação de bactérias patogênicas e a produção de citocinas pró-inflamatórias, evidenciando a relação do fator imunológico-endógeno (OAKLEY;

KOGUT, 2016). Adicionalmente, indicadores histológicos de inflamação no epitélio intestinal também suportam esta hipótese. Observou-se que aves desafiadas com *Eimeria* spp. e *Clostridium perfringens* tiveram alterações morfológicas na estrutura microscópica do intestino, sugerindo que os fatores predisponentes à inflamação podem comprometer a funcionalidade do órgão e conseqüentemente reduzir o desempenho destes animais (BELOTE et al., 2018). Além disso, as disbioses parecem aumentar a permeabilidade intestinal, resultando em maior risco para o desenvolvimento de doenças infecciosas (QUINTEIRO-FILHO ET AL., 2012). Esse efeito permitiria que bactérias patogênicas migrassem pela mucosa intestinal e resultassem em infiltração inflamatória, diminuindo a absorção de nutrientes.

Ainda que este tema esteja em foco, existe grande dificuldade em estabelecer parâmetros, técnicas e práticas efetivas que permitam a avaliação do “status de saúde intestinal” tanto em ambiente experimental quanto à campo. Novas metodologias que vêm sendo desenvolvidas para avaliar a integridade intestinal através das Câmaras de Ussien, biomarcadores sanguíneos (Lactulose, L-rhamnose, Manitol; FITC-dextrano; DAO e LPS) e avaliação da expressão gênica de proteínas de junção (GILANI et al., 2016). Embora estes métodos avaliativos pareçam bastante promissores ainda é necessária maior padronização, e, segundo DUCATELLE et al. (2018) isso deve ser feito através de análise comparativa com técnicas comprovadas como é o caso da histologia.

2.2. Disbiose em aves

O ambiente intestinal parece estar constantemente sob influência dos processos inflamatórios. Em sua revisão, KOGUT et al. (2018) elucidaram que esta condição

pode ser expressa de quatro maneiras diferentes (fisiológica, patológica, metabólica e estéril), na qual o balanço da população microbiana intestinal parece ser o principal denominador sobre a forma de ativação do sistema imune. Além disso, as disbioses também desempenham um papel bastante relevante pela influência nos índices zootécnicos e por consequência nos índices econômicos da produção.

Neste contexto, a Enterite Necrótica (EN) é considerada uma das principais doenças entéricas das aves, está relacionada à prejuízo de aproximadamente US\$2 bilhões de dólares anuais para esta indústria (LEE et al., 2011). O uso de APC fez com que esta doença fosse controlada durante décadas (PRESCOTT et al., 2016). Entretanto a retirada destas drogas, fez ressurgir o interesse em investigar a patogenia da doença, bem como desenvolver abordagens não antibióticas para sua prevenção.

O *Clostridium perfringens* tipo A é o agente causador da EN, classificada como uma bactéria Gram-positiva, anaeróbia e formadora de esporos e toxinas (VAN IMMERSEEL et al., 2004). Ela é comensal do ceco e em condições normais seus esporos encontram-se em concentração próxima à 10^4 ufc/g de digesta. Porém, distúrbios na microbiota podem provocar uma rápida proliferação aumentando sua população até aproximadamente 10^7 – 10^9 ufc/g de digesta e migrar para porções iniciais do intestino, resultando no quadro clínico da doença (KONDO, 1988).

Existem duas formas principais de apresentação desta patogenia: a aguda e a subclínica (VAN IMMERSEEL et al., 2009). Na aguda, podem ocorrer surtos com alta mortalidade nos lotes, sem sinais clínicos prévios, mas podem ser observadas extensas áreas de necrose na superfície intestinal observadas durante a necropsia. Já na segunda forma, são encontradas lesões crônicas na mucosa intestinal que têm como consequência a piora da conversão alimentar e do desempenho zootécnico dos

lotes. A apresentação subclínica parece ser a mais importante economicamente, devido à silenciosa redução que provoca nos índices produtivos, bem como no aumento da condenação de carcaças observados nos lotes afetados (DAHIYA et al., 2006).

A severidade da infecção desta bactéria parece estar ligada a diversos fatores endógenos e exógenos. Foram elencados como cinco principais a infecção por *Eimeria* spp., retirada de APC e anti-coccidiostáticos, ambiência, imunossupressão e dietas de baixa digestibilidade (DAHIYA et al., 2006). Além disso, a recente descoberta do gene netB passou a considerada como um fator decisivo para o estabelecimento da doença (SHOJADOOST et al., 2012).

Diversos modelos experimentais são utilizados para tentar reproduzir a EN, sendo estabelecidos de acordo com objeto a ser estudado e o conseqüente grau de lesão almejado pelo pesquisador. Devido à íntima relação entre a proliferação do *C. perfringens* e as lesões intestinais, grande parte dos autores defende que o desafio prévio a coccidiose é necessário para mimetizar as condições reais à campo (COLLIER et al., 2008; LEE et al., 2011; PRESCOTT et al., 2016; SHOJADOOST et al., 2012).

A coccidiose é resultante da infecção por protozoários do gênero *Eimeria*, composto por sete espécies, sendo as principais para aves: *E. acervulina*, *E. maxima*, *E. tenella* (VERMEULEN; SCHAAP; SCHETTERS, 2001). Estas são capazes de provocar extensos danos em diferentes porções da mucosa intestinal, promovendo extravasamento de plasma e aumento do muco no lúmen intestinal (VAN IMMERSEEL et al., 2004). A coccidiose e o *C. perfringens* atuam de forma sinérgica, uma vez que o aumento do muco proveniente da inflamação pela *Eimeria* spp. é utilizado como substrato para o crescimento da bactéria (COLLIER et al., 2008).

Uma maneira acessível de mimetizar a infecção pelo protozoário em condições experimentais é através da administração das vacinas contra coccidiose em, pelo menos, 10 vezes a dose recomendada (PRESCOTT et al., 2016). Foi observado que esta dose foi capaz de provocar lesões macroscópicas leves, porém, significativas alterações histológicas e redução de desempenho (BELOTE et al., 2019). Na reprodução experimental da EN, reportou-se que a administração de 15 vezes a dose da vacina de *Eimeria* spp., seguida de inoculação consecutiva de *C. perfringens* foi eficaz em reproduzir experimentalmente a doença (BELOTE et al., 2018).

Observa-se que ainda não existe consenso sobre um modelo único de desafio que seja capaz de reproduzir o quadro de EN e possibilite a comparação entre diferentes experimentos. Além disso a busca por minimizar seus prejuízos sanitários e econômicos é um importante foco da avicultura atual.

2.3. Aditivos fitogênicos

Os produtos alternativos aos APC passaram a ter grande destaque nos últimos anos, sendo que muitos deles são derivados de pesquisas aprofundadas sobre vários mecanismos fisiológicos do animal. Este é o caso dos aditivos fitogênicos, também conhecidos como fitobióticos ou nutracêuticos, originários de metabólitos secundários das plantas que podem ser adicionados às dietas animais (KOIYAMA et al., 2012).

Estima-se que existam mais de 80.000 compostos secundários naturais derivados de plantas; sendo divididos em grandes grupos de produtos químicos, tais como: óleos essenciais, alcalóides, ácidos, esteróides, taninos, saponinas e assim por diante (HASHEMI et al., 2010). Sua classificação também pode ser feita a partir da origem e processamento, como: 1) Ervas (flores, não-lenhosas e não persistentes), 2)

Especiarias (ervas de cheiro ou sabor intensivo comumente adicionadas ao alimento humano), 3) Óleos essenciais (compostos lipofílicos voláteis derivados da extração à frio ou por destilação à vapor ou álcool) e 4) Oleorresinas (extratos derivados de solventes não aquosos) (WINDISCH et al., 2008).

No âmbito da produção animal, a legislação brasileira ainda classifica os compostos fitogênicos como aditivos sensoriais (MAPA, 2004), ou seja, que tem propriedades de alterar as características organolépticas e/ou visuais dos alimentos animais. Entretanto na União Europeia, alguns aditivos fitogênicos já passaram a ser classificados como aditivos zootécnicos por serem consideradas substâncias capazes de influir positivamente na melhoria do desempenho dos animais (EFSA, 2016). Além disso, sua utilização na indústria vem crescendo de forma expressiva por serem considerados seguros para os animais, para os consumidores de produtos de origem animal e para o meio ambiente com resultados comparáveis aos APCs (WATI et al., 2015; WINDISCH et al., 2008).

Diversas revisões demonstram que os compostos fitogênicos têm propriedades bioativas benéficas sobre a digestibilidade e saúde dos animais (WINDISCH et al., 2008; HASHEMI et al., 2010; AMAD et al., 2011; MURUGESAN, G. et al, 2015). Estas características parecem ser resultado das combinações de ingredientes presentes em cada aditivo, cada um deles contribuindo com algumas delas conforme descrito na tabela 1.

Tabela 1. Principais propriedades dos ingredientes fitogênicos sobre saúde intestinal de aves

Classe	Principais representantes	Principal efeito sobre saúde intestinal	Fonte
Saponina	Saponina triterpênica (<i>Quillaja saponaria</i>)	Adjuvante vacinal Antiinflamatório Antiprotozoário	SUN; XIE; YE (2009), ZHAI et al. (2014) SARKHEL (2016) PASARIBU et al. (2014), FRANCIS et al. (2002), WINA et al. (2018)
Óleos essenciais	Carvacrol, timol, cinamaldeído e eugenol	Antimicrobiano	DORMAN; DEANS, 2000, BURT (2004), MITSCH et al. (2004), BRENES; ROURA (2010), ZHAI et al. (2018)
Susbtâncias pungentes	Capsaicina, piperina e geraniol	Antioxidante e antiinflamatório Alteração da morfologia intestinal	MUELLER et al (2012), RAUT; KARUPPAYIL (2014) SRINIVASAN (2016); SURH et al. (2000), LEE et al. (2003)
Susbtâncias amargas	Boldina, Catequina, Isotiocianato e Curcumina	Antioxidante, antiinflamatório e antiteratogênico	KHAJURIA; THUSU; ZUTSHI (2002), PRAKASH; SRINIVASAN (2010). SPEISKY; CASSELS (1994), SCHMEDA-HIRSCHMANN et al. (2003), O'BRIEN; CARRASCO-POZO; SPEISKY (2006), SURH et al. (2008), MUELLER et al. (2012)

Por este motivo, um ponto chave no entendimento dos fitogênicos está na compreensão dos principais mecanismos de ação de cada grupo funcional de ingredientes (óleos essenciais, saponinas, substâncias pungentes e substâncias amargas). Para isso, os tópicos seguintes buscam aprofundá-los evidenciando seus efeitos sob o ponto de vista de saúde intestinal das aves.

2.4. Óleos essenciais

Os Óleos Essenciais (OEs) são os componentes mais conhecidos dos fitogênicos. Nessa classe estão compreendidos os óleos aromáticos líquidos, obtidos

a partir de partes de plantas como: flores, botões, sementes, folhas, galhos, casca, ervas, madeira, frutas e raízes; por meio de diferentes processos de extração à vapor, destilação ou fermentação (GOPI, 2014). Eles representam apenas uma pequena proporção (geralmente menor que 1%) do peso das plantas que são extraídos, porém com destacadas atividades biológicas (ZHAI et al., 2018).

O termo "essencial" surgiu da crença que esses óleos eram essenciais para a vida através da teoria da "quinta essência" na qual foi descrito como um elemento eficaz para uso médico (OYEN; DUNG, 1999). Suas propriedades biológicas fizeram com que estes compostos passassem a ter papel importante na indústria cosmética, farmacêutica e animal, esperando-se que o mercado mundial de OEs atinja 11,67 bilhões de dólares até 2022 (ZHAI et al., 2018).

As plantas produtoras de OEs estão distribuídas em mais de 60 famílias, das quais as Alliaceae, Apiaceae, Asteraceae, Lamiaceae, Myrtaceae, Poaceae and Rutaceae parecem ser as principais (RAUT; KARUPPAYIL, 2014). Alguns de seus representantes mais conhecidos, porém não únicos, incluem: anis (Apiaceae), orégano (Lamiaceae), canela (Lauraceae), alho (Liliaceae), tomilho (Myrtaceae), pimenta preta (Piperaceae), e açafrão (Zingiberaceae).

Sob o ponto de vista químico, os OEs são resultantes da interação de diversas substâncias terpenóides e hidrocarbonetos alifáticos de baixo peso molecular (fenóis e aldeídos aromáticos) (DORMAN; DEANS, 2000). Os componentes presentes em maior quantidade (> 85%) são denominados princípios ativos e normalmente determinam a atividade principal do OE (BURT, 2004).

Devido à diversidade de componentes presentes em um OE, nem todos os mecanismos de ação estão claramente definidos. De maneira geral, são atribuídos a

eles exercer influência sobre processos endógenos oxidativos, digestivos e inflamatórios, além de terem efeitos sobre o desenvolvimento dos protozoários, fungos e bactérias (BRENES; ROURA, 2010). Atualmente os OEs mais conhecidos e utilizados neste setor são os provenientes do orégano, tomilho, cravo e canela, devido à elevada porcentagem de estruturas fenólicas.

Na indústria animal, seu papel passou a ter grande destaque por representar uma alternativa ao uso de antibióticos na produção, proveniente de sua característica lipofílica (BRENES; ROURA, 2010). Os mecanismos de ação antimicrobianos ainda não estão completamente elucidados, porém o principal deles parece ser sua capacidade de interagir e desintegrar a membrana celular das bactérias, alterando a permeabilidade e o metabolismo celular e possivelmente culminando com a lise bacteriana (BURT, 2004). Ainda não existe consenso sobre uma maior efetividade em bactérias Gram positivas ou Gram negativas, sendo dependente da característica estrutural de cada princípio ativo em interagir com a membrana celular das bactérias (DORMAN; DEANS, 2000).

Além disso, os OEs provenientes de plantas do gênero Labiatae (orégano, tomilho, alecrim) tem um alto poder antioxidante, atuando direta e indiretamente sobre a oxidação lipídica nos tecidos. Foi demonstrado que os fenóis presentes nestes princípios ativos são capazes de promover regulação positiva sobre a expressão de genes ARE (*antioxidant-response element*) resultando em maior produção de enzimas antioxidantes (MUELLER et al, 2012). Enquanto isso, os grupos OH de suas estruturas doam o hidrogênio para os peroxi radicais produzidos durante a primeira fase da oxidação lipídica, retardando a formação dos hidroxí peróxidos e diretamente reduzindo a degradação dos tecidos por estes compostos (BRENES; ROURA, 2010). Existem evidências que o efeito antioxidante também podem atuar em aumentar o

tempo de prateleira das carnes em animais alimentados com OE, entretanto estes resultados ainda são preliminares.

2.5. Saponinas

O termo "saponina" deriva da palavra latina sapo, que significa "sabão", pois as moléculas de saponinas formam espumas semelhantes ao sabão quando em meio aquoso (WINA et al., 2018). Existem mais de 11 grupos de saponinas, constituídas por uma estrutura central aglicona (chamada sapogenina) comum a todos os grupos, nela estão ligados açúcares periféricos de diferentes tamanhos que promovem a diferença em classificação (VINCKEN et al., 2007). As estruturas triterpenóide e esteroide, provenientes da *Quillaja saponaria* e *Yucca schidigera* respectivamente, são as mais conhecidas e utilizadas comercialmente (FRANCIS et al., 2002).

A *Quillaja saponária* é uma árvore nativa da região dos Andes, sua casca foi retirada e extraída com água pelos povos indígenas locais para ser utilizada como emulsificante e pelos xamãs como um agente de cura geral (FRANCIS et al., 2002). Ela contém entre 8,5 e 16,4% de saponinas com estrutura triterpenóide, altamente utilizadas pela indústria cosmética e farmacêutica (SARKHEL, 2016).

No âmbito da produção animal, um dos efeitos que dão destaque para as saponinas é sua capacidade de alterar o ciclo de alguns protozoários, como a *Eimeria* spp., bastante relevante na indústria avícola (WINA et al., 2018). A atividade anti-protozoária aparenta estar relacionada à característica anfipática das saponinas, permitindo que elas interajam e desintegram a membrana externa dos parasitas (FRANCIS et al., 2002). Entretanto, segundo um estudo realizado por PASARIBU et al. (2014), revelam que o efeito das saponinas é de penetrar a parede do oocisto de

Eimeriatenella e alterar a conformação dos esporocistos, reduzindo conseqüentemente a viabilidade e interrompendo o ciclo do protozoário.

Além disso, as saponinas também tem efeito sobre sistema imunológico e inflamatório, atuando como importantes adjuvantes de vacinas na indústria farmacêutica animal e de seres humanos. Através de seu poder imunogênico, as diferentes frações contidas nas saponinas estimulam a resposta imune celular por meio do aumento produção de anticorpos e linfócitos T citotóxicos, resultando em melhor apresentação dos antígenos e conseqüentemente melhor eficácia das vacinas (SUN; XIE; YE, 2009). Observou-se que frangos de corte que receberam administração oral de saponinas tiveram maior título de anticorpos específicos, o número de IgA e os linfócitos intra-epiteliais intestinais do que o grupo controle quando vacinados para IBDV (ZHAI et al., 2014).

Há evidências que o poder anti-inflamatório das saponinas provenientes da *Quillaja saponaria* através de testes *in vivo*, no qual elas parecem inibir a enzima ciclo-oxygenase (COX), presente na segunda fase da resposta inflamatória, conseqüentemente reduzindo a cascata da inflamação (SARKHEL, 2016).

2.6. Substâncias pungentes

Substâncias pungentes são consideradas um grupo de especiarias que conferem uma sensação pungente e picante quando adicionadas aos alimentos. Dentre as principais fontes estão a pimenta preta (*Piper nigrum*), pimenta vermelha (*Capsicum annuum*), pimenta da montanha (*Tasmania lanceolata*), ou gengibre (*Zingiber officinalis*) (BELTRAN et al., 2013). As principais substâncias ativas as

responsáveis pelas propriedades de interesse da indústria farmacológica e animal, em especial a piperina derivada da pimenta preta e a capsaicina das pimentas vermelhas.

A Piperina é o principal alcaloide proveniente das pimentas negras das espécies *Piper nigrum L.* e *Piper longum L.* altamente utilizadas na culinária humana devido às suas propriedades picantes (DOGRA.; KHANNA; SHANKER, 2004). Estudos sugerem que a administração oral de piperina induz alterações na conformação estrutural dos enterócitos, através do aumento nos ribossomos livres no citosol e no retículo endoplasmático, que por sua vez promovem maior produção de proteínas citosólicas solúveis (enzimas) e de certas organelas (mitocôndrias) (KHAJURIA; THUSU; ZUTSHI, 2002). Além disso, sua característica de solubilidade a permite interagir com os lipídeos e proteínas da membrana dos enterócitos, modulando a dinâmica desta estrutura e alterando a permeabilidade para promover maior absorção dos nutrientes do lúmen intestinal.

A Capsaicina, por sua vez, é o principal componente ativo extraído das sementes das pimentas vermelhas do gênero *Capsicum*. Suas propriedades biológicas corroboram com as descritas para a piperina, e, ainda propõe uma série de outros efeitos anti-colestermiante, anti-inflamatórios, antitumoral, analgésicos (SRINIVASAN, 2016).

Em relação à saúde intestinal, as propriedades antioxidante e anti-inflamatórias da capsaicina se destacam. Este princípio ativo capsaicina se assemelha ao mecanismo de ação dos anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs), como a aspirina, reduzindo a expressão de mediadores pró-inflamatórios (COX-2, iNOS e PGE) (SURH et al., 2000; LEE et al., 2003).

Além disso, a absorção dos nutrientes parece ser potencializada por estes componentes. Em experimentos realizados com ratos de laboratório foram observados três principais mecanismos de ação envolvidos neste efeito: (1) o aumento na fluidez da membranas dos enterócitos devido à sua característica hidrofóbica, (2) o estímulo à atividade de enzimática intestinal e (3) alteração na morfologia intestinal, promovendo maior capacidade absorptiva (PRAKASH; SRINIVASAN, 2010).

Ressalta-se que altas concentrações de substâncias pungentes, principalmente as piperinas, parecem ter efeitos imuno-toxigênicos como os já observados por diversos autores (DOGRA.; KHANNA; SHANKER, 2004; CARDOSO et al., 2012).

2.7. Substâncias amargas

As substâncias amargas são consideradas substâncias com alto poder antioxidante derivadas principalmente do Boldo do Chile (*Peumusboldus*), Brócolis e Cúrcuma (*Curcuma longa*).

O Boldo do Chile (*Peumus boldus*) é uma planta bastante usada na medicina indígena tradicional nos tratamentos de desordens hepáticas e digestivas. Suas propriedades farmacológicas estão altamente relacionadas à prevenção de vários efeitos farmacológicos relacionados ao estresse oxidativo, incluindo efeitos anti-inflamatórios, antipiréticos, antitumorais, antiplaquetários e anti-teratogênico (O'BRIEN; CARRASCO-POZO; SPEISKY, 2006). Esse efeito está essencialmente relacionado à bioatividade de seus princípios ativos, Boldina e Catequina, em sequestrar hidroxilas dos radicais livres e proteger as células da peroxidação lipídica (SPEISKY; CASSELS, 1994; SCHMEDA-HIRSCHMANN et al., 2003).

Outros extratos considerados neste grupo também são os tióis de cisteína presentes no brócolis (Isotiocianato), na cúrcuma (Curcumin) e no gengibre tropical (Zerumbona). Estas estruturas são capazes de modular indiretamente a peroxidação lipídica e resposta inflamatória. Isso acontece através da alteração na expressão do fator de transcrição sensível ao redox (Nrf2) que por sua vez induz positivamente a transcrição de diversas enzimas: quinona oxidoreductase-1 (NQO1), superóxido dismutase (SOD), glutathione S-transferase (GST), hemeoxigenase-1 (HO-1), e gama-glutamyl-cisteina-ligase (GCL) (SURH et al., 2008).

Além disso, em experimento realizado *in vivo* com frangos de corte, a adição de extratos de brócolis, cúrcuma e outras plantas do gênero Labiatae não demonstrou diferenças significativas em desempenho, porém notou-se que a regulação positiva das enzimas ARE exerceu efeitos antioxidantes sobre jejuno e fígado (MUELLER et al, 2012).

Sob o prisma de saúde intestinal, a inclusão destes compostos parece ser promissora e bastante interessante em oferecer citoproteção aos enterócitos, além de exercer quimioprevenção contra os radicais livres produzidos durante os processos oxidativos luminiais. Desta maneira, auxiliando na manutenção da integridade das mucosas e conseqüentemente no bom funcionamento da barreira imune e absorção dos nutrientes provenientes da dieta.

3. EFFECT OF TWO DIFFERENT PHYTOGENIC ADDITIVES ON PERFORMANCE AND GUT HISTOLOGICAL ALTERATIONS IN BROILERS SUBMITTED TO AN ENTERIC CHALLENGE

Abstract. The present study evaluated the influence of two different phytogetic feed additives on growth performance and histological alterations in the ileum of broiler chickens. A total of 168-day-old chicks were randomly divided into four groups with six replicates with seven birds each. The groups were: positive control (PC), untreated; Enramycin (AGP); Phytogetic 1 (PFA1), blend of saponins and essential oils, 400 ppm; Phytogetic 2 (PFA2), mixture of bitter and pungent substances, saponins, and essential oils, 150 ppm. All treatments were infected by oral gavage with *Eimeria* spp. (commercial vaccine at 15-fold the recommended dose) on d14 and with an inoculum of *Clostridium perfringens* at d19, d20, and d21. Growth performance and histology of ileum by the “I See Inside” (ISI) methodology were evaluated at d28, d35, and d42. No significant differences ($P>0.05$) were observed on growth performance parameters (FI, BWG, and FCR) among treatments during all periods. However, the histological analysis showed that PFA2 had less ($P<0.05$) overall tissue damage for all evaluations periods, and PFA1 at d42, when compared to the PC. On the after-lesion period (d28 and d35), PFA2 showed a reduction in the individual inflammatory parameters and a stimulus on enterocyte turnover, compared to PC. By cluster analysis, were shown a higher similarity between PFA2 and AGP, indicating that this phytogetic alternative can support an AGP-free strategy. The obtained data demonstrates that PFA supports the morphological recovery and inflammation control after an enteric challenge, contributing for a better intestinal health in broilers.

Keywords: gut health, plant extract, morphology, saponins, essential oil

3.1. Description of the problem

The intestinal dynamics are the main concern in poultry production regarding function of the organ on absorbing nutrients and serving as an immune barrier against pathogens. A commonly used term in this area is ‘gut health,’ even though it is considered as a complex theme that requires an integrated view on physiology,

endocrinology, microbiology, immunology, and nutrition (CHOCT, 2009; OVIEDO-RONDÓN, 2019). Through an immunology perspective, gut health is considered as the avoidance of disease that allows the animal to overcome exogenous and endogenous stressors to perform its physiological functions (KOGUT; ARSENAULT, 2016). And the microbiota balance appears to be the common denominator connecting the immune system activation with the systemic health status of the animal (KOGUT et al., 2018).

Many science efforts have been made to set up strategies that can mitigate unnecessary enteric illnesses in poultry flocks. Likewise, a class of feed additives known as the eubiotics (i.e., organic acids, fatty acids, essential oils, phytochemicals, probiotics, prebiotics, etc.) is considered part of this approach (OVIEDO-RONDÓN, 2019). It ought to be highlighted the importance of being in line with the increasing worldwide consumers' concern and government regulations on food safety and animal welfare issues (ROBERTS et al., 2015).

The phytochemical feed additives (PFA) are a group of plant-derived compounds, generally recognized as natural with the potential to promote performance and productivity in livestock (HASHEMI et al., 2010). They are composed of a board variety of substances with different biological activities (WINDISCH et al., 2008). Previous literature reported the PFA formulation seems to be a critical factor in determining its overall business in the animal organism (HUMER et al., 2015; ABUDABOS et al., 2018). Moreover, understanding the primary mechanism of action of each functional group (essential oils, saponins, pungent and bitter substances) may help to position each feed additive in the poultry production.

The essential oils originated from plant extracts, are mostly known for their strong antimicrobial properties (DORMAN; DEANS, 2000). The main mechanisms involved in

this property are due to their hydrophobicity, which enables them to alter the permeability of the bacterial cell membrane, consequently, causes leakage of the bacteria cell content (BURT, 2004). Saponins are another subgroup, extracted from the barks, which contribute with immunostimulant and anti-inflammatory effects (FRANCIS et al., 2002; WINA et al., 2017) although they are even more interesting for the poultry industry regarding their antiprotozoal characteristic. Within the hydrophobic moiety, researches showed that they could penetrate in *Eimeria* spp. oocyst and change its internal conformation and interrupting the protozoal cycle (PASARIBU et al., 2014). Furthermore, the pungent substances, mostly present in red and black peppers, are recognized to enhance the digestibility through increasing the absorptive surface of the intestine the enhancement of endogenous digestive enzymes (KHAJURIA; THUSU; ZUTSHI, 2002; PRAKASH; SRINIVASAN, 2010; SRINIVASAN, 2016). They also interact with the inflammatory cascade inhibiting the enzyme and gene expression (KIM et al., 2003). The subgroup of the bitter substances, like the broccoli and ginger extracts, are mainly responsible for antioxidative properties of the PFA. Their active principles can act directly over the oxidation by donating hydroxyl groups for free radicals and indirectly by altering gene expression of antioxidative and anti-inflammatory enzymes (SURH et al., 2005).

Therefore, this study aims to evaluate the effect of two different commercial phytogetic additives, one mix of saponins and essential oils and other a blend of bitter and pungent substances, saponins and essential oils, over performance and gut histological alterations in comparison with the AGP in broiler chickens exposed to experimentally-induced enteric challenge with coccidiosis and *Clostridium perfringens*.

3.2. Material and methods

A 42-d-trial was carried out, involving 168 male broilers (Cobb 500). Day-old chicks were distributed on a randomized design, divided into four groups with six replicates of seven birds each. The experiment was conducted in a previously disinfected isolated room, containing vertically stacked cages (experimental units), equipped with standard feeders and nipple drinkers. Room temperature was automatically set to promote to comfort conditions for each age, based on lineage recommendations (COBB, 2018 a). Diets were formulated to achieve the nutritional levels for broilers chickens, based on Brazilian industrial standards. Both feed and water were offered *ad libitum*. All the experimental procedures used in this study were approved by the Institutional Animal Use Ethics Committee of the Federal University of Paraná (protocol number 073/2018).

Experimental groups were: Positive Control (PC) - Untreated; Antibiotic Growth Promoter (AGP) -treated with enramycin added at 10 ppm from d1 to d35, and at 5 ppm from d35 to d42; Phytogenic 1 (PFA1) - treated with phytogenic feed additive #1, blend of saponins, and essential oils, added at 400 ppm; Phytogenic 2 (PFA 2) - treated with phytogenic feed additive #2, blend of bitter and pungent substances, saponins, and essential oils, added at 150 ppm. All groups were challenged with the administration by oral gavage of anti-coccidia vaccine (Biovet Vaxxinova, Vargem Grande Paulista, Brazil) at d 14, in a 15-times higher doses than the recommendation [7.1×10^4 oocysts bird⁻¹] with inoculation by gavage of *Clostridium perfringens* [10^8 CFU mL⁻¹ bird⁻¹] at d19, d20, and d21.

To obtain the performance data, the day-old chicks were weighed and randomly distributed into groups, ensuring that each experimental unit had the same average of initial body weight. All birds and feed were weighed at d1 and 42, allowing the

calculation of feed intake (FI), body weight gain (BWG), and feed conversion ratio (FCR) during each feeding phase (initial d1 to d21, grower I d22 to d28, grower II d29 to d35, finisher d36 to d42) .

For histological analysis, one bird per replication was euthanized in the CO₂ chamber at d28, d35, and d42 for the collection of ileum samples. Twenty complete villi per sample through the “I See Inside” (ISI) methodology (KRAIESKI et al., 2017; BELOTE et al., 2018) which is based on a numeric score of morphological alteration for eight parameters in the ileum (tissue congestion; the proliferation of enterocytes; inflammatory cell infiltration in the epithelium and lamina propria, the proliferation of goblet cells; epithelium and lamina propria thickness, and *Eimeria* oocysts presence). A score is given for each one, varying from range 0 to 3: score 0 (absence of lesion or frequency), score 1 (alteration up to 25% of the area or observed frequency), score 2 (alteration ranges from 25 to 50% of the area or observed frequency), and score 3 (alteration extends more than 50% of the area or observed frequency). Thus, based on previous knowledge of literature and background research, an impact factor (IF) is applied for parameter alteration according to the reduction of functional organ capacity. The ISI total score is the result of the sum of all these values.

Data were submitted to statistical analysis using the software Statistica v.12 software package (StatSoft Inc.). Initially, the dependent variables were individually analyzed for their adherence to the normal distribution, with subsequent analyses of comparing treatments being conditioned to this assumption. For normalized variables, the data were submitted to ANOVA and, in case of identification of a significant effect ($P < 0.05$) for the independent variable, groups were compared by the Dunnett test. Otherwise, for those dependent variables that did not present a normalized distribution, groups were compared by the Kruskal-Wallis non-parametric test. Aiming to evaluate

the overall similarity of groups based on the behavior of their results of all analyzed dependent variables, the database was submitted to cluster analysis, and the cluster chart was presented as grouping by the degree of similarity among groups.

3.3. Results and discussion

Different experimental models are used in the literature to induce necrotic enteritis (NE), of which some fail to reproduce the clinical disease making it challenging to compare results between the different trials (SHOJADOOST; VINCE; PRESCOTT, 2012). Nevertheless, it is also pointed that subclinical form of the disease can be even more economically valuable than the clinical one because of the silent impact promoted by this dysbiosis over zootechnical performance and carcass condemnations (DAHIYA et al., 2006). Thus, in this study, we considered the histological lesions in the intestine more accurate to clarify the effect of PFA in the evolution of the disease.

Considering that all groups were challenged, when compared to standard lineage references (COBB, 2018 b), all animals presented lower performance parameters. There was a numerical reduction between 16 to 19% for BWG, 17 to 21% for FI, and 12 to 17% for FCR, indicating that the challenge was successful in influencing the performance. However, it was not possible to observe significant differences ($P < 0.05$) between the treatments on growth performance parameters (FI, BWG, and FCR) during at all periods until 42 d of the experiment (Table 1). Our data corroborates with previous studies with a similar NE challenge and did not find BWG and FCR variation between PC and AGP groups at d28. Beyond it, other two studies with different PFA also reported no significant differences in performance (JAMROZ et al., 2005; SETTLE et al, 2014).

Table 1. Effect of the addition of different feed additives on growth performance of broiler chickens from 1 to 42 d, challenged with a 15-fold dose of a commercial anti-coccidian vaccine at d 14, and contaminated with an inoculum of 10^8 CFU mL⁻¹ bird⁻¹ of *Clostridium perfringens*, orally administered at d19, d20 and d21.

Treatments	BWG d1-42 (g)	FI d1-42 (g)	FCR d1-42
Control	2538	3976	1.568
AGP	2608	3974	1.524
Phytogenic 1	2634	4146	1.576
Phytogenic 2	2624	4049	1.543
	<i>SEM</i>	<i>24.066</i>	<i>33.894</i>
	<i>ANOVA (Prob.)</i>	<i>0.448</i>	<i>0.189</i>
			<i>0.408</i>

* BWG: body weight gain, in g; FI: feed intake, in g; FCR: feed conversion ratio, in g g⁻¹; AGP: Enramycin (10 ppm from 1 to 35 d, and 5 ppm from 35 to 42 d); Phytogenic 1: blend of saponins and essential oils, 400 ppm; Phytogenic 2: blend of pungent and bitter substances, essential oils, and saponins, 150 ppm; Bio-Coccivet R, LaboratórioBiovet, Brazil.

After an investigation of five different phytogenic, it was supposed that the weight gain is mainly dependent on the composition of each feed additive (CROSS et al., 2007). A study conducted by Amad and his co-workers (AMAD; WENDLER; ZENTEK, 2013) demonstrated that gut microbiota appears to reduce nutrients available to the animal by enforcing the intestinal cell turnover and thereby increasing the intestinal requirement for nutrients to maintain tissue integrity.

Despite the zootechnical performance show no significant difference ($P > 0.05$), it was possible to observe statistical differences in histological analysis in the ileum, which suggests the subclinical effect of NE in the host. The ISI total score showed lower values ($P < 0.05$) for AGP and PFA2 when compared with PC and PFA1 groups at the first evaluation at d28. Thus, the PFA2 group continued to present a reduced ($P < 0.05$) level than PC and AGP groups at d35. The third evaluation, at d42, the PFA1 group had the lowest ($P < 0.05$) ISI total score for all groups and PC the highest one

(Figure 1). The ISI total score summarizes all the alterations; however, to better explore the gut health status is necessary to interpret the behavior of each treatment over the evaluated parameters. Results are shown in Figures 2, 3, and 4.

Figure 1. Effect of the addition of different feed additives on gut histopathological lesions score evaluation of ISI total index of broiler chickens at d28 and d35, challenged with a 15-fold dose of a commercial anti-coccidian vaccine at d14, and contaminated with an inoculum of 10^8 CFU mL⁻¹ bird⁻¹ of *Clostridium perfringens* orally administered at d19, d20, and d21 (N=24). Different superscript letters indicate significant difference ($P < 0.05$).

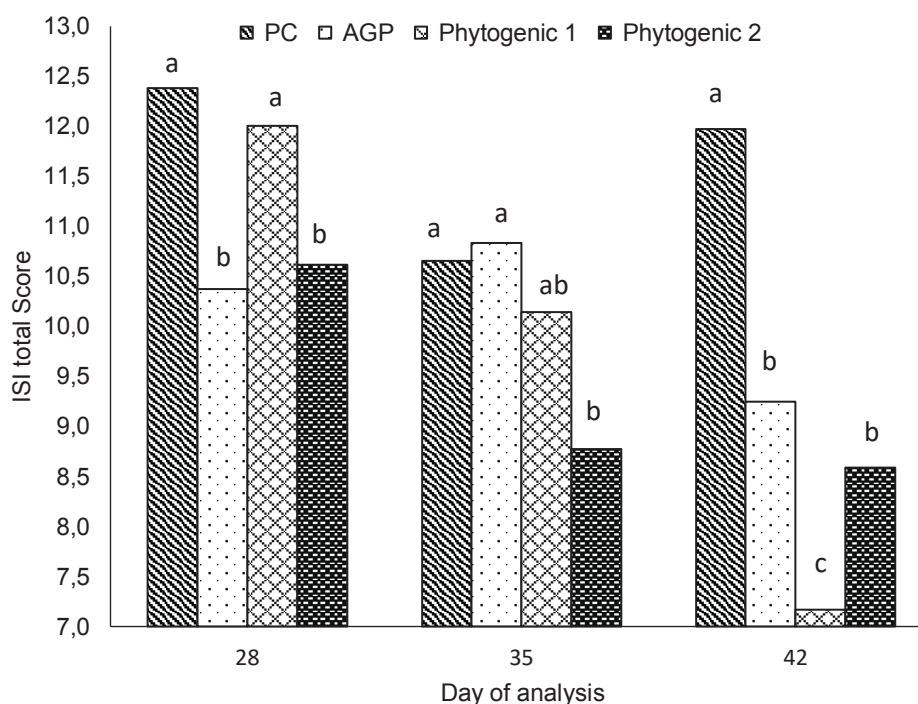


Figure 2. Effect of the addition of different feed additives on gut histopathological lesions score evaluation based on ISI methodology of broiler chickens at d28, challenged with a 15-fold dose of a commercial anti-coccidian vaccine at d14, and contaminated with an inoculum of 10^8 CFU mL⁻¹ bird⁻¹ of *Clostridium perfringens* orally

administered at d19, d20, and d21 (N=24). Different superscript letters indicate significant difference ($P < 0.05$).

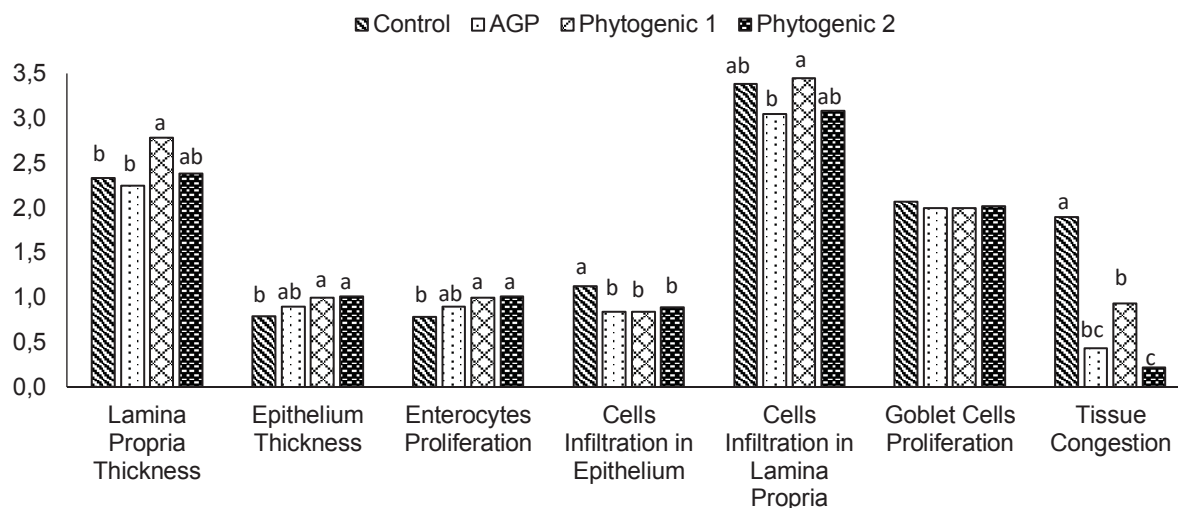


Figure 3. Effect of the addition of different feed additives on gut histopathological lesions score evaluation based on ISI methodology of broiler chickens at d35, challenged with a 15-fold dose of a commercial anti-coccidian vaccine at d14, and contaminated with an inoculum of 10^8 CFU mL⁻¹ bird⁻¹ of *Clostridium perfringens* orally administered at d19, d20, and d21 (N=24). Different superscript letters indicate significant difference ($P < 0.05$).

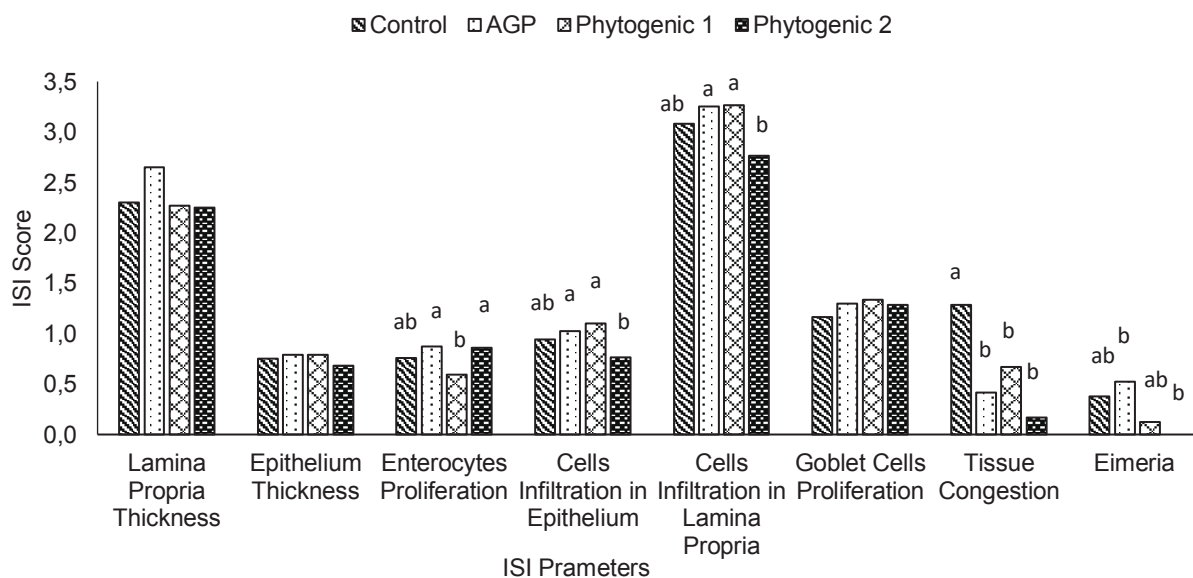
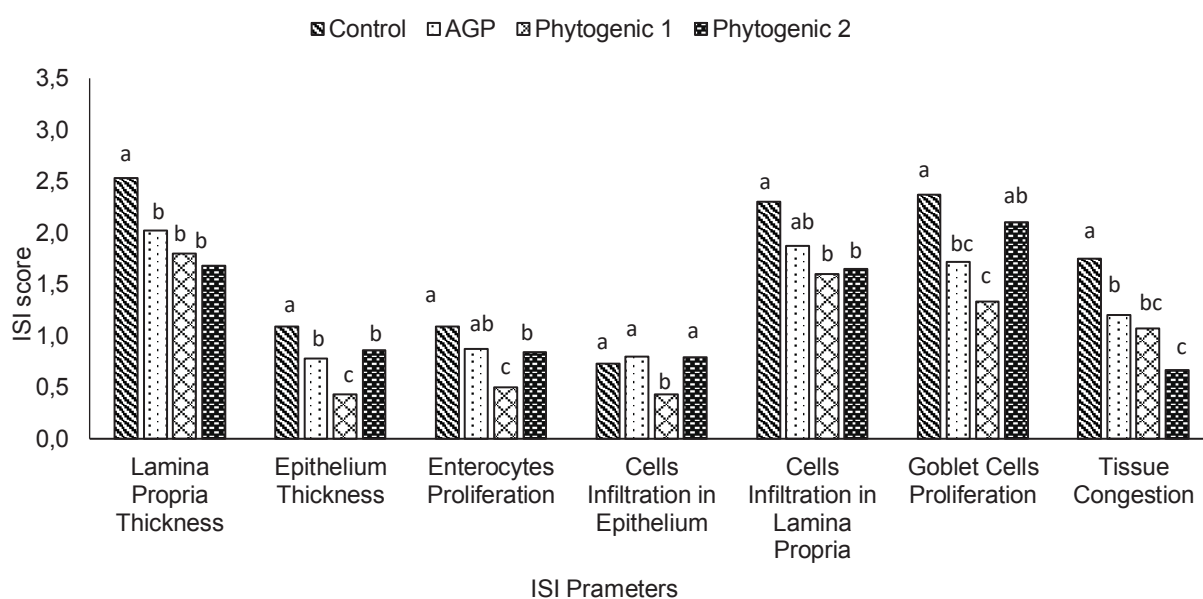


Figure 4. Effect of the addition of different feed additives on gut histopathological lesions score evaluation based on ISI methodology of broiler chickens at d42, challenged with a 15-fold dose of a commercial anti-coccidian vaccine at d14, and contaminated with an inoculum of 10^8 CFU mL⁻¹ bird⁻¹ of *Clostridium perfringens* orally administered at d19, d20, and d21 (N=24). Different superscript letters indicate significant difference ($P < 0.05$).



As expected, the Enramycin (AGP) group significantly reduced ($P < 0.05$) the inflammatory cell infiltration in the epithelium and lamina propria at d28 and decreased tissue congestion in d28, d35 and d42 when compared to PC. These results are in line with the assumption that the AGP, even more than antibacterial effect, is also supposed to attenuate inflammatory response by limiting the accumulation of proinflammatory cells in the brush border (NIEWOLD, 2007). In addition, following previous data of the same laboratory, the AGP did not show influence over the *Eimeria* spp. oocysts presence at d35 (BELOTE et al., 2018).

The group containing only saponins and essential oils (PFA 1) exhibited beneficial effects over inflammation on post-challenge period in comparison to the PC. It was observed lower ($P<0.05$) epithelial cell infiltration at d28 and tissue congestion at d28 and d35, and a stimuli on epithelial turnover and higher ($P<0.05$) epithelium thickness and enterocytes proliferation at d28. Although, at d42 there was a reduction ($P<0.05$) on the inflammatory parameters (cell infiltration in epithelium, in lamina propria and tissue congestion) and stabilization of the brush border architecture (lower epithelium thickness, enterocyte and goblet cell proliferation). The reduction in all parameters contributed to set the lowest ($P<0.05$) ISI total at d42.

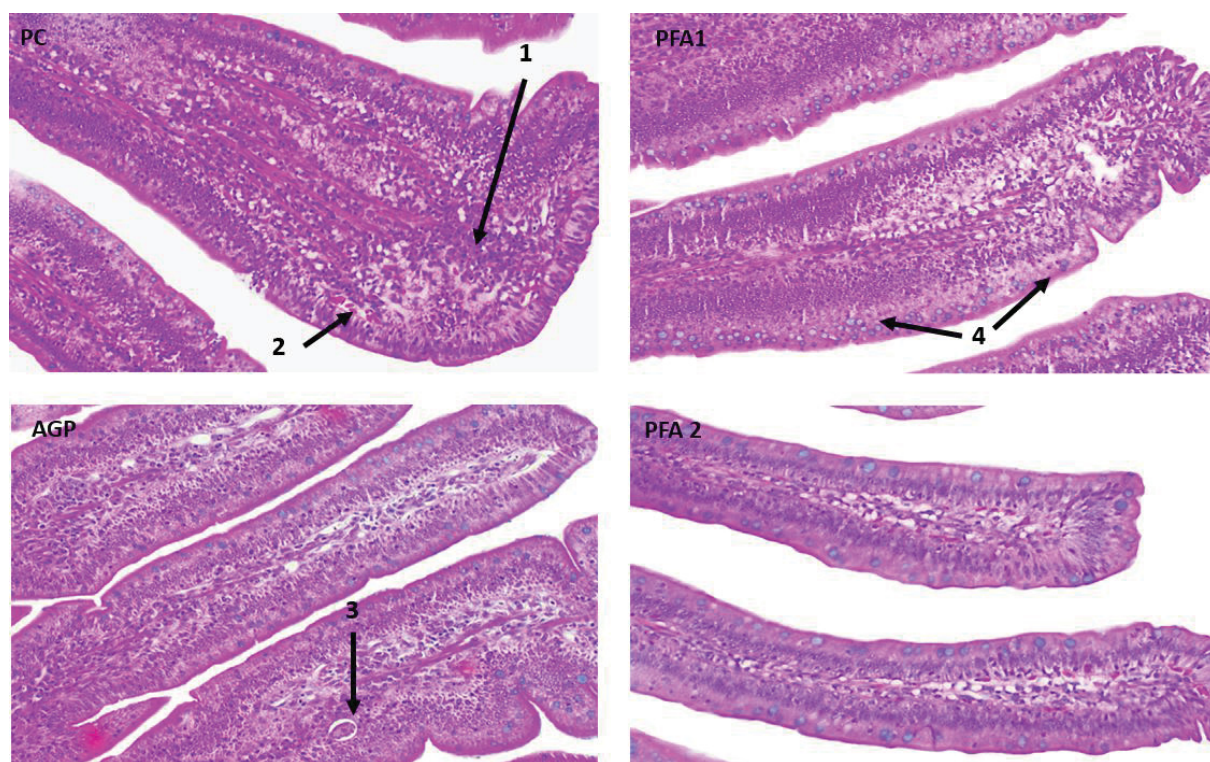
The triterpenic saponins from *Quillaja saponaria* are supposed to exert a direct action over the inflammatory cascade through their ability to inhibit cyclooxygenase enzyme, leading to a reduced of prostaglandin synthesis (SARKHEL, 2016). Moreover, an indirect anti-inflammatory effect could be related to the antimicrobial and antiprotozoal mechanisms of these compounds (BURT, 2004; PASARIBU et al., 2014) on diminishing the pathogenicity of the triggers, and consequently, the damage in intestinal surface.

The PFA 2 group, also containing bitter and pungent substances other than saponins and essential oils, presented the ISI total index statistically lower ($P<0.05$) than PC at d28 and d35. It could be explained by the decreased intestinal inflammation values at d28 and d35, with a reduction ($P<0.05$) on the tissue congestion in all periods. At the same time, it has significantly improved ($P<0.05$) the cell proliferation indexes (epithelium thickness and enterocytes proliferation) in comparison to PC at d28 and d35. Additionally, at d42, it was noted a higher ($P<0.05$) goblet cell proliferation when compared to PFA1 what may have contributed to the second lower ISI total of the period.

One hypothesis for the better inflammation control could be the presence of pungent and bitter substances (red pepper, black pepper, ginger) in its composition. Capsaicin, the main component of the red pepper (*Capsicum annuum*) is recognized as a potent inhibitor of the COX-2 enzyme and iNOS gene expression responsible for the regulation of inflammation cascade (KIM et al., 2003). This assumption is supported by the action of functional groups of Zerumbone and Isothiocyanates, the active compounds of tropical ginger (*Zingiber zerumbet* Smith) and Broccoli extract respectively, in the fine-tuning of transcriptional regulators (NF- κ B and Keap1) of the inflammatory and oxidative genes to maintain cellular homeostasis (SURH et al., 2005; MUELLER et al., 2012).

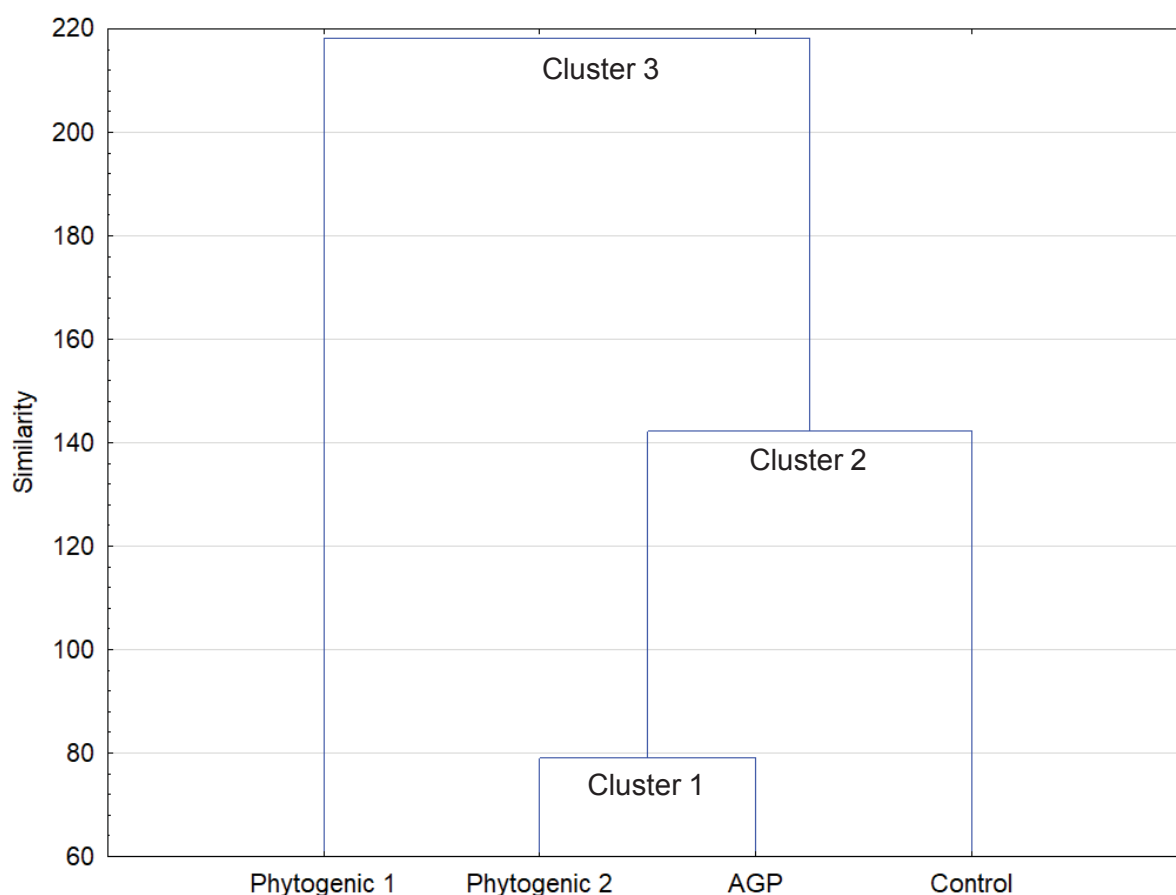
Regarding intestinal morphology (Figure 5), the results demonstrated a significantly higher ($P < 0.05$) enterocyte proliferation and epithelium thickness for PFA2 group in all periods. These findings are in accordance with researches that used the same additive and founded an increased villus height and crypt depth in jejunum and ileum, suggesting it can positively influence epithelial turnover (ABUDABOS et al., 2018; CROSS et al., 2007). Furthermore, the presence of components such as piperine, the principal alkaloid of black pepper (*Piper nigrum* L and *Piper longum* L) that increase the synthesis of proteins associated with cytoskeletal through the increasing free ribosomes and assist an efficient permeation in the intestinal epithelial barrier due to its solubility an ability to interact with the membrane dynamics of the enterocytes (KHAJURIA; THUSU; ZUTSHI, 2002). Nevertheless, a similar histological evaluation with phytogetic containing carvacrol, cinnamaldehyde, and capsaicin significantly increased goblet cells and mucus production in jejunum at d42, suggesting that could be villi protection properties in these ingredients (JAMROZ et al., 2006).

Figure 5. Photomicrographs of chicken ileum sections stained with hematoxylin and eosin. Alcian-Blue was used to stain goblet cells (200x). The PC presents higher inflammatory cell infiltration in the lamina propria (1) and tissue congestion (2). AGP shows the presence of *Eimeria* spp. oocyst (3). PFA1 increased inflammatory cell infiltration in the epithelium (4), and PFA2 shows lower ISI scores. These alterations contributed to the highest ISI index ($P < 0.05$) in Challenged Group (PC) compared to the PFA2 at d35.



One outcome of the present study comes from the overall similarity degree done by Cluster analysis, presented in Figure 6. It was observed three behavior degrees (clusters) among the four treatments. The Cluster 1 expressed the most resemble compartment between AGP and PFA2 results in all the trial. PC results showed to be more like Cluster 1, forming Cluster 2. Moreover, it can be observed that PFA 1 results were the most different from both Cluster 1 and 2, establishing the Cluster 3.

Figure 6. Similarity analysis of different feed additives on the overall performance, and gut histopathological lesions score evaluations broiler chickens from d1 to d42, challenged with a 15-fold dose of a commercial anti-coccidian vaccine at d14 and contaminated with an inoculum of 10^8 CFU mL⁻¹ bird⁻¹ of *Clostridium perfringens* orally administered at d19, d20, and d21.



The clustering reflects a similar behavior of AGP and PFA2 groups in challenged conditions, this observation is in agreement with the assumption that PFAs could present an interesting tool to support poultry industry to set off the AGP (WINDISCH et al., 2008; ABUDABOS et al., 2018; MCREYNOLDS et al., 2009). Moreover, the high distance between the two PFA shows there is a low similarity between their results of both PFAs, reinforcing previous conclusions which suggest the composition of the

additive can influence their biological activity (CROSS et al., 2007; HUMER et al., 2015).

3.4. Conclusion

- I. Both PFA based in saponins and essential oils were able to support the intestinal recovery after enteric challenge, through the modulation of the inflammatory process and support in gut architecture regeneration.
- II. The PFA 2 (composed by essential oils, saponins, bitter and pungent substances) showed similar results as the Enramicin, therefore it may be considered as part of a strategy in the reduction of AGP.
- III. Differences in the composition and concentration of the ingredients can influence the PFA biological activities. Moreover, bitter and pungent substances appear to be positively linked with the of poultry gut health due to their antioxidative and anti-inflammatory properties.

3.5. Study Limitations

- I. There was not a Negative Control (NC) due to the facilities do not permit the isolation in the *Eimeria* spp challenge.
- II. It was not performed a microbiota and digestibility tests

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho revisou a relevância da saúde intestinal e as principais disbioses na produção de aves. Além disso, os aditivos alimentares também desempenham um papel importante nas estratégias da era pós-antibióticos e os fitogênicos podem representar uma ferramenta útil, considerando suas propriedades biológicas. Seus ingredientes funcionais apresentam mecanismos com propriedades de reduzir a oxidação, inflamação e estimular a renovação dos enterócitos. A experimentação in vivo demonstrou que o desafio entérico foi capaz de reduzir os parâmetros zootécnicos para todos os grupos quando comparados aos padrões de linhagem, entretanto não foi possível observar diferenças significativas entre os grupos. Através da análise histológica com a metodologia ISI observaram-se diferenças significativas no ISI total aos 28 dias para PFA2 e AGP, para PFA2 aos 35 dias e PFA1 e 2 aos 42 dias comparados ao PC, sugerindo que ambos os PFA podem ter um efeito benéfico na recuperação intestinal. A análise de cluster apresentou uma semelhança geral entre os grupos AGP e PFA2 e maior diferença entre os grupos PFA1 e PFA2, indicando que o PFA2 tem um comportamento mais semelhante ao AGP e o PFA 1 tem um comportamento diferente. Estes resultados corroboram com a hipótese de que a formulação parece ser um ponto-chave para definir a abordagem de cada produto e que a presença de substâncias amargas e pungentes no PFA2 pode influenciar os efeitos mais pronunciados sobre a inflamação e a renovação celular. Além disso, a maior semelhança entre AGP e PFA2 pode indicar que isso pode ser uma ferramenta auxiliar nos sistemas livres de AGP.

5. REFERÊNCIAS

ABUDABOS, A. M. et al. The effect of phytonics on growth traits, blood biochemical and intestinal histology in broiler chickens exposed to *Clostridium perfringens* challenge. **Journal of Applied Animal Research**, v. 46, n. 1, p. 691-695, 2018.

AMAD, A. A. et al. Effects of a phytogetic feed additive on growth performance and ileal nutrient digestibility in broiler chickens. **Poultry Science**, v. 90, n. 12, p. 2811-2816, 2011.

AMAD, A. A.; WENDLER, K. R.; ZENTEK, J. Effects of a phytogetic feed additive on growth performance, selected blood criteria and jejunal morphology in broiler chickens. **Emirates Journal of Food and Agriculture**, v. 25, n. 7, p. 549-554, 2013.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PROTEÍNA ANIMAL (ABPA). **Relatório Anual ABPA 2018**. 2018. Disponível em: <http://abpa-br.com.br/setores/avicultura/publicacoes/relatorios-anuais/2018>. Acesso em: 20, Novembro, 2019.

AWAD, Wageha; GHAREEB, Khaled; BÖHM, Josef. Intestinal structure and function of broiler chickens on diets supplemented with a symbiotic containing *Enterococcus faecium* and oligosaccharides. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 9, n. 11, p. 2205-2216, 2008.

BELKAID, Y.; HAND, T. W. Role of the microbiota in immunity and inflammation. *Cell*, v. 157, n. 1, p. 121-141, 2014.

BELOTE, B. L. et al. Histological parameters to evaluate intestinal health on broilers challenged with *Eimeria* and *Clostridium perfringens* with or without enramycin as growth promoter. **Poultry science**, v. 97, n. 7, p. 2287-2294, 2018.

BELOTE, Bruna L. et al. Applying I see inside histological methodology to evaluate gut health in broilers challenged with *Eimeria*. **Veterinary Parasitology: X**, v. 1, art. 100004, 2019.

BELTRAN, L. R. et al. The pungent substances piperine, capsaicin, 6-gingerol and polygodial inhibit the human two-pore domain potassium channels TASK-1, TASK-3 and TRESK. **Frontiers in Pharmacology**, v. 4, p. 141, 2013.

BRENES, A.; ROURA, E. Essential oils in poultry nutrition: Main effects and modes of action. **Animal Feed Science and Technology**, v. 158, n. 1-2, p. 1-14, 2010.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 94, n. 3, p. 223-253, 2004.

CALY, D. L. et al. Alternatives to antibiotics to prevent necrotic enteritis in broiler chickens: a microbiologist's perspective. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, p. 1336, 2015.

CARDOSO, V. S. et al. Piperine as a phytogetic additive in broiler diets. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v. 47, n. 4, p. 489-496, 2012.

CHOCT, M. Managing gut health through nutrition. **British Poultry Science**, v. 50, n. 1, p. 9–15, 2009.

- COBB (A). **Broiler Performance & Nutrition 2018**. 2018. Disponível em: <https://cobbstorage.blob.core.windows.net/guides/3914ccf0-6500-11e8-9602-256ac3ce03b1>. Acesso em: 21, Novembro, 2019.
- COBB (B). **Broiler Performance & Nutrition 2018**. 2018. Disponível em: <https://cobbstorage.blob.core.windows.net/guides/3914ccf0-6500-11e8-9602-256ac3ce03b1>. Acesso em: 21, Novembro, 2019.
- COLLIER, C. T. et al. Coccidia-induced mucogenesis promotes the onset of necrotic enteritis by supporting *Clostridium perfringens* growth. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 122, p. 104–115, 2008.
- COSTA, L. B.; TSE, M. P.; MIYADA, V. S. Extratos vegetais como alternativas aos antimicrobianos promotores de crescimento para leitões recém-desmamados. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 36, n. 3, p. 589-595, 2007.
- DAHIYA, J. P. et al. Potential strategies for controlling necrotic enteritis in broiler chickens in post-antibiotic era. **Animal Feed Science and Technology**, v. 129, n. 1-2, p. 60-88, 2006.
- DIBNER, J. J; RICHARDS, J. D. Antibiotic growth promoters in agriculture: history and mode of action. **Poultry Science**, v. 84, n. 4, p. 634-43, 2005.
- DOGRA, R. K.; KHANNA, S.; SHANKER, R. Immunotoxicological effects of piperine in mice. **Toxicology**, v. 196, n. 3, p. 229-236, 2004.
- DORMAN, H. J. D.; DEANS, S. G. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. **Journal of Applied Microbiology**, v. 88, n. 2, p. 308-316, 2000.

DUCATELLE, R. et al. Biomarkers for monitoring intestinal health in poultry: present status and future perspectives. **Veterinary research**, v. 49, n. 1, p. 43, 2018.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA). **Safety and efficacy of BIOSTRONG® 510 (essential oil of thyme and star anise) for chickens and minor avian species for fattening and rearing to point of lay**, 2016. Disponível em: <https://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/4351>. Acesso em: 10 de janeiro, 2020.

FRANCIS, G. et al. The biological action of saponins in animal systems: a review. **British Journal of Nutrition**, v. 88, n. 6, p. 587-605, 2002.

GILANI, S. et al. New biomarkers for intestinal permeability induced by lipopolysaccharide in chickens. **Animal Production Science**, v. 56, n. 12, p. 1984-1997, 2016.

GOPI, M. et al. Essential oils as a feed additive in poultry nutrition. **Advance in Animal and Veterinary Sciences**, v. 2, n. 1, p. 1-7, 2014.

HASHEMI, S. R. et al. Phytochemicals as new class of feed additive in poultry industry. **Journal of Animal and Veterinary Advances**, v. 9, n. 17, p. 2295-2304, 2010.

HOFACRE, C. L.; SMITH, J. A.; MATHIS, G. F. An optimist's view on limiting necrotic enteritis and maintaining broiler gut health and performance in today's marketing, food safety, and regulatory climate. **Poultry Science**, v. 97, n. 6, p. 1929-1933, 2018.

HUMER, E. et al. Gender-specific effects of a phytogetic feed additive on performance, intestinal physiology and morphology in broiler chickens. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 99, n. 4, p. 788-800, 2015.

JAMROZ, D. et al. Influence of diet type on the inclusion of plant origin active substances on morphological and histochemical characteristics of the stomach and jejunum walls in chicken. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 90, n. 5-6, p. 255-268, 2006.

JAMROZ, D. et al. Use of active substances of plant origin in chicken diets based on maize and locally grown cereals. **British Poultry Science**, v. 46, n. 4, p. 485-493, 2005.

JANG, I. S. et al. Effect of a commercial essential oil on growth performance, digestive enzyme activity and intestinal microflora population in broiler chickens. **Animal Feed Science and Technology**, v. 134, n. 3-4, p. 304-315, 2007.

KHAJURIA, A.; THUSU, N.; ZUTSHI, U. Piperine modulates permeability characteristics of intestine by inducing alterations in membrane dynamics: influence on brush border membrane fluidity, ultrastructure and enzyme kinetics. **Phytomedicine**, v. 9, n. 3, p. 224-231, 2002.

KIM, C. et al. Capsaicin exhibits anti-inflammatory property by inhibiting I κ B- α degradation in LPS-stimulated peritoneal macrophages. **Cellular Signaling**, v. 15, n. 3, p. 299-306, 2003.

KOGUT, M. H. et al. Inflammatory phenotypes in the intestine of poultry: not all inflammation is created equal. **Poultry Science**, v. 97, n. 7, p. 2339-2346, 2018.

KOGUT, M. H.; ARSENAULT, R. J. Gut health: The new paradigm in food animal production. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 3, n. 71, p. 71, 2016.

KOIYAMA, N. G. et al. Aditivos fitogênicos na produção de frangos de corte. 2012.

KONDO, F. In vitro lecithinase activity and sensitivity to 22 antimicrobial agents of *Clostridium perfringens* isolated from necrotic enteritis of broiler chickens. **Research in Veterinary Science**, v. 45, n. 3, p. 337-340, 1988.

KRAIESKI, A. L, et al. Effect of aflatoxin experimental ingestion and *Eimeria* vaccine challenges on intestinal histopathology and immune cellular dynamic of broilers: applying an Intestinal Health Index. **Poultry Science**, v. 96, p. 1078-1087, 2017.

KUTTAPPAN, V. A. et al. Evaluation of gastrointestinal leakage in multiple enteric inflammation models in chickens. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 2, p. 66, 2015.

LEE, C. Y. J. et al. Short-term control of capsaicin on blood and oxidative stress of rats in vivo. **Phytotherapy Research**, v. 17, n. 5, p. 454-458, 2003.

LEE, K. W. et al. Avian necrotic enteritis: experimental models, host immunity, pathogenesis, risk factors, and vaccine development. **Poultry Science**, v. 90, p. 1381–1390, 2011.

MNISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (MAPA).

Instrução Normativa 13/2004, 2004. Disponível em:

<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-pecuarios/alimentacao-animal/aditivos>. Acesso em: 10 de janeiro, 2020.

- MITSCH, P. et al. The effect of two different blends of essential oil components on the proliferation of *Clostridium perfringens* in the intestines of broiler chickens. **Poultry science**, v. 83, n. 4, p. 669-675, 2004.
- MUELLER, K. et al. Influence of broccoli extract and various essential oils on performance and expression of xenobiotic-and antioxidant enzymes in broiler chickens. **British Journal of Nutrition**, v. 108, n. 4, p. 588-602, 2012.
- MURUGESAN, G. et al. Phytogetic feed additives as an alternative to antibiotic growth promoters in broiler chickens. **Frontiers in veterinary science**, v. 2, p. 21, 2015.
- NIEWOLD, T. A. The nonantibiotic anti-inflammatory effect of antimicrobial growth promoters, the real mode of action? A hypothesis. **Poultry Science**, v. 86, p. 605–609, 2007.
- O'BRIEN, P.; CARRASCO-POZO, C.; SPEISKY, H. Boldine and its antioxidant or health-promoting properties. **Chemico-Biological Interactions**, v. 159, n. 1, p. 1-17, 2006.
- OAKLEY, B. B.; KOGUT, M. H. Spatial and temporal changes in the broiler chicken cecal and fecal microbiomes and correlations of bacterial taxa with cytokine gene expression. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 3, p. 11, 2016.
- OVIEDO-RONDÓN, E. O. Holistic view of intestinal health in poultry. **Animal Feed Science and Technology**, v. 250, p. 1-8, 2019.
- OYEN, L. P. A.; DUNG, Nguyen Xuan. **Plant resources of South-East Asia**. Backhuys Publ., 1999.

- PASARIBU, T. et al. Saponin content of *Sapindus rarak* pericarp affected by particle size and type of solvent, its biological activity on *Eimeria tenella* oocysts. **International Journal of Poultry Science**, v. 13, p. 347-352, 2014
- PRAKASH, U. N.; SRINIVASAN, K. Beneficial influence of dietary spices on the ultrastructure and fluidity of the intestinal brush border in rats. **British journal of nutrition**, v. 104, n. 1, p. 31-39, 2010.
- PRESCOTT, J. F. et al. Experimental reproduction of necrotic enteritis in chickens: a review. **Avian Pathology**, v. 45, n. 3, p. 317-322, 2016.
- QUINTEIRO-FILHO, W. M. et al. Heat stress impairs performance and induces intestinal inflammation in broiler chickens infected with *Salmonella Enteritidis*. **Avian Pathology**, v. 41, n. 5, p. 421-427, 2012.
- RAUT, J. S.; KARUPPAYIL, S. M. A status review on the medicinal properties of essential oils. **Industrial Crops and Products**, v. 62, p. 250-264, 2014.
- ROBERTS, T. et al. New issues and science in broiler chicken intestinal health: Emerging technology and alternative interventions. **Journal of Applied Poultry Research**, v. 24, n. 2, p. 257-266, 2015.
- SARKHEL, S. Evaluation of the anti-inflammatory activities of *Quillaja saponaria* Mol. saponin extract in mice. **Toxicology Reports**, v. 3, p. 1-3, 2016.
- SCHMEDA-HIRSCHMANN, G. et al. Free-radical scavengers and antioxidants from *Peumus boldus* Mol. **Free radical research**, v. 37, n. 4, p. 447-452, 2003.
- SETTLE, T. et al. Effects of a phytogetic feed additive versus an antibiotic feed additive on oxidative stress in broiler chicks and a possible mechanism

determined by electron spin resonance. **International Journal of Poultry Science**, v. 13, n. 2, p. 62, 2014.

SHOJADOOST, B.; VINCE, A. R.; PRESCOTT, J. F. The successful experimental induction of necrotic enteritis in chickens by *Clostridium perfringens*: A critical review. **Veterinary Research**, v. 26, p. 43-74, 2012.

SPEISKY, H.; CASSELS, B. K. Boldo and boldine: an emerging case of natural drug development. **Pharmacological Research**, v. 29, n. 1, p. 1-12, 1994.

SRINIVASAN, K. Biological activities of red pepper (*Capsicum annuum*) and its pungent principle capsaicin: a review. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 56, n. 9, p. 1488-1500, 2016.

STEWART, A. S.; PRATT-PHILLIPS, S.; GONZALEZ, L. M. Alterations in intestinal permeability: the role of the "Leaky Gut" in health and disease. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 52, p. 10-22, 2017.

SUN, H.; XIE, Y.; YE, Y. Advances in saponin-based adjuvants. **Vaccine**, v. 27, n. 12, p. 1787-1796, 2009.

SURH, Y. et al. Inhibitory effects of curcumin and capsaicin on phorbol ester-induced activation of eukaryotic transcription factors, NF-kappa B and AP-1. **Biofactors**, v. 12, n. 1-4, p. 107-112, 2000.

SURH, Y. et al. Redox-sensitive transcription factors as prime targets for chemoprevention with anti-inflammatory and antioxidative phytochemicals. **The Journal of Nutrition**, v. 135, n. 12, p. 2993S-3001S, 2005.

- VAN IMMERSEEL, F. et al. Clostridium perfringens in poultry: an emerging threat for animal and public health. **Avian Pathology**, v. 33, p. 537–549, 2004.
- VAN IMMERSEEL, F. et al. Rethinking our understanding of the pathogenesis of necrotic enteritis in chickens. **Trends in Microbiology**, v. 17, n. 1, p. 32-36, 2008.
- VERMEULEN, A.N.; SCHAAP, D.C.; SCHETTERS, T.P.M. Control of coccidiosis in chickens by vaccination. **Veterinary Parasitology**, v. 100, p. 13-20, 2001.
- VINCKEN, J. et al. Saponins, classification and occurrence in the plant kingdom. **Phytochemistry**, v. 68, n. 3, p. 275-297, 2007.
- WATI, T. et al. Comparative efficacy of a phytogetic feed additive and an antibiotic growth promoter on production performance, caecal microbial population and humoral immune response of broiler chickens inoculated with enteric pathogens. **Animal Nutrition**, v. 1, n. 3, p. 213-219, 2015.
- WINA, E. et al. The role of saponin as feed additive for sustainable poultry production. **Indonesian Bulletin of Animal and Veterinary Sciences**, v. 27, no. 3, p. 117-124, 2017.
- WINDISCH, W. et al. Use of phytogetic products as feed additives for swine and poultry. **Journal of Animal Science**, v. 86, s. 14, p. E140-E148, 2008.
- YEGANI, M., KORVER, D.R. Factors affecting intestinal health in poultry. **Poultry Science**, v. 87, p. 2052–2063, 2008.
- ZHAI, H. et al. Potential of essential oils for poultry and pigs. **Animal Nutrition**, v. 4, n. 2, p. 179-186, 2018.

ZHAI, L. et al. Enhanced immune responses of chickens to oral vaccination against infectious bursal disease by ginseng stem-leaf saponins. **Poultry Science**, v. 93, n. 10, p. 2473-2481, 2014.