

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

**PERFIL BIOQUÍMICO SÉRICO DE FRANGOS DE
CORTE ALIMENTADOS COM DIETA SUPLEMENTADA
COM ÓLEOS ESSENCIAIS E PIMENTA**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Carolina Kist Traesel

Santa Maria, RS, Brasil

2009

**PERFIL BIOQUÍMICO SÉRICO DE FRANGOS DE CORTE
ALIMENTADOS COM DIETA SUPLEMENTADA COM ÓLEOS
ESSENCIAIS E PIMENTA**

por

Carolina Kist Traesel

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração em Clínica Médica, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do grau de
Mestre em Medicina Veterinária.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Sonia Terezinha dos Anjos Lopes

Santa Maria, RS, Brasil

2009

Traesel, Carolina Kist, 1982-

T764p

Perfil bioquímico sérico de frangos de corte alimentados com dieta suplementada com óleos essenciais e pimenta / por Carolina Kist Traesel ; orientador Sonia Terezinha dos Anjos Lopes. - Santa Maria, 2009.
55 f. ; il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, RS, 2009.

1. Medicina veterinária 2. Extratos vegetais 3. Avicultura
4. Pâncreas 5. Fígado 6. Rim 7. Óleos essenciais I. Raiser, Alceu Gaspar, orient. II. Título

CDU: 619:636.52/.58

Ficha catalográfica elaborada por
Luiz Marchiotti Fernandes – CRB 10/1160
Biblioteca Setorial do Centro de Ciências Rurais/UFSM

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Rurais
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária**

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

**PERFIL BIOQUÍMICO SÉRICO DE FRANGOS DE CORTE
ALIMENTADOS COM DIETA SUPLEMENTADA COM ÓLEOS
ESSENCIAIS E PIMENTA**

elaborada por

Carolina Kist Traesel

como requisito parcial para a obtenção do grau de

Mestre em Medicina Veterinária

COMISSÃO EXAMINADORA:

Sonia Terezinha dos Anjos Lopes, Dr.^a.

(Presidente/Orientadora)

Sydney Hartz Alves, Dr. (UFSM)

Félix Hilario Diaz González, Dr. (UFRGS)

Santa Maria, 03 de março de 2009.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Sonia Terezinha dos Anjos Lopes, pela oportunidade, pela confiança e pela colaboração demonstradas durante todos esses anos de convívio, em especial durante a execução desse trabalho.

Aos professores Janio Morais Santurio e Sydney Hartz Alves, pela orientação, pela disponibilização do material e pelo exemplo profissional, e ao professor Alexandre Pires Rosa, pela concessão dos animais desse experimento.

Aos meus pais João e Nair e ao meu irmão João Eduardo, pela paciência, por sempre me ouvirem e me apoiarem nas minhas decisões, mesmo estando longe.

Ao meu namorado Jerônimo, pelo seu amor, pelo incentivo, pela compreensão e pelo companheirismo.

Aos colegas do Laboratório de Análises Clínicas, pela convivência, pelo apoio e pela disponibilidade. Ao Márcio e à Daniele Rodrigues, pela ajuda na colheita das amostras e nas dosagens bioquímica. À Carina Franciscato pela correção desta dissertação. Em especial, à equipe envolvida diretamente nesse trabalho: à Patrícia Wolkmer, pelos ensinamentos, pelo enorme auxílio prestado e pela amizade; às “gurias” Candice Schmidt, Cássia Bagolin da Silva, Francine Chimelo Paim e Juliana Felipetto Cargnelutti pela grande ajuda, pelo carinho demonstrado e pelos finais de semana dedicados a esse experimento.

Ao Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária da UFSM, pela formação acadêmica e científica.

Ao CNPq, pela concessão da bolsa e suporte financeiro.

A Rogério Ferreira, pelas análises estatísticas.

Ao LAPEMI e a Lucas Siqueira, pelas correções de inglês.

Ao Hospital Veterinário Universitário, seus professores e funcionários, e à Universidade Federal de Santa Maria, pela oportunidade de realização de mais uma grande etapa na minha formação.

À Gita e Nana, por trazerem tantos momentos de alegria à minha vida.

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

PERFIL BIOQUÍMICO SÉRICO DE FRANGOS DE CORTE ALIMENTADOS COM DIETA SUPLEMENTADA COM ÓLEOS ESSENCIAIS E PIMENTA

AUTORA: CAROLINA KIST TRAESEL

ORIENTADORA: SONIA TEREZINHA DOS ANJOS LOPES

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 03 de março de 2009.

Devido às exigências atuais do mercado externo por alimentos de qualidade, custo acessível e de origem natural, os extratos de plantas com atividade antimicrobiana, como os óleos essenciais, são uma alternativa aos promotores de crescimento à base de antibióticos na produção de frangos, podendo aumentar o desempenho dos animais. Essas substâncias possuem rápida metabolização hepática, curta meia vida e eliminação renal e podem produzir efeitos tóxicos em altas doses ou estimular a secreção pancreática. Nesse contexto, avaliaram-se as funções pancreática, renal e hepática de frangos de corte alimentados com ração isonutritiva, antibióticos ou óleos essenciais de orégano, sálvia, alecrim e extrato aquoso de pimenta (OLES) em diferentes concentrações na ração. Novecentos e dez frangos foram alocados em cinco grupos de tratamento, com sete repetições de 26 aves por tratamento. O grupo controle recebeu ração sem aditivos; o tratamento Tatb recebeu ração suplementada com promotor de crescimento à base de antibióticos; os tratamentos T₅₀, T₁₀₀ e T₁₅₀ receberam ração suplementada com OLES nas concentrações de 50, 100 e 150 ppm, respectivamente. Aos 42 dias de idade, 11 aves por grupo foram abatidas e amostras de sangue foram colhidas para realização das mensurações séricas de lipase, amilase, uréia, ácido úrico, aspartato aminotransferase (AST), gama glutamiltransferase, colesterol total, lipoproteína de alta densidade, lipoproteína de baixa densidade, triglicerídeos, proteínas totais, albumina, globulinas e relação albumina:globulinas. Os resultados obtidos demonstraram elevação sérica significativa de lipase, ácido úrico, uréia e AST, sugerindo o comprometimento renal e hepático pelos OLES. Mais estudos são necessários para adequar as doses dos óleos essenciais na ração, que propiciem benefícios sem provocar danos ao animal.

Palavras-chave: Extratos vegetais, avicultura, pâncreas, fígado, rim, óleos essenciais.

ABSTRACT

Master's Dissertation
Post-Graduate Program in Veterinary Medicine
Federal University of Santa Maria

SERUM BIOCHEMICAL PROFILE OF BROILER CHICKENS FED DIET SUPPLEMENTED WITH ESSENTIAL OILS AND PEPPER

AUTHOR: CAROLINA KIST TRAESEL

ADVISOR: SONIA TEREZINHA DOS ANJOS LOPES

Date and place of defense: Santa Maria, March, 3rd, 2009.

Essential oils of natural origin and low cost have antimicrobial properties and can increase broilers performance, constituting an alternative to growth promoters based on antibiotics for poultry production; however, they can produce toxic effects. Serum biochemical parameters regarding to pancreatic, renal and hepatic functions of broiler chickens fed diets supplemented with antibiotics or essential oils of oregano, sage, rosemary and pepper aqueous crude extract (OLES) were evaluated. Animals (n=910) were distributed within five treatment groups with seven replicates of 26 birds each. Control group received a diet without additives; treatment T_{atb} received an antibiotic growth promoter diet; treatments T₅₀, T₁₀₀ and T₁₅₀ received feed supplemented with 50, 100 and 150 ppm of OLES, respectively. At 42 days, 11 animals per group were slaughtered and blood samples were collected for serum biochemical profile analysis (lipase, amylase, urea, uric acid, aspartate aminotransferase - AST, gama glutamyltransferase, total cholesterol, high-density lipoprotein, low-density lipoprotein, triglycerides, total protein, albumin, globulins and albumin:globulins ratio). The results showed elevated serum lipase, uric acid, urea and AST, suggesting the impairment of kidney and liver functions caused by OLES. More studies are needed for essential oils dose adjustment in the diet, providing benefits without being harmful to the animal.

Key words: plants extract, poultry, serum biochemical profile, pancreas, liver, kidney.

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1 – Orégano (*Origanum vulgare L.*). A) Planta que dá origem ao óleo essencial. B) Estrutura química dos principais compostos ativos (carvacrol e timol) do orégano. 14
- FIGURA 2 – Sálvia (*Salvia officinalis L.*). A) Planta que dá origem ao óleo essencial. B) Estrutura química dos principais compostos ativos (borneol, cineol e carnosol) da sálvia..... 14
- FIGURA 3 – Alecrim (*Rosmarinus officinalis L.*). A) Planta que dá origem ao óleo essencial. B) Estrutura química dos principais compostos ativos (borneol, pineno, cineol e canfeno) do alecrim. 14
- FIGURA 4 – Pimenta (*Capsicum frutescens L.*). A) Planta que dá origem ao extrato aquoso. B) Estrutura química dos principais compostos ativos (capsaicenóides ou capsaicina) da pimenta.. 94
- FIGURA 5 – Mean values and standard errors of serum lipase (A), urea (B), uric acid (C) and AST (aspartate aminotransferase; D) of 42-day-old broilers (n=11) fed an iso-nutritive diet (Tc) supplemented with antibiotics (Tatb) and with essential oils of oregano, sage, rosemary and hot chili pepper in the proportion of 50 (T50), 100 (T100) and 150 (T150) ppm..... 38

LISTA DE APÊNDICES

APÊNDICE A – Composição estimada e perfil nutricional das dietas basais utilizadas na fase pré-inicial, inicial, crescimento e final de frangos de corte que receberam ração sem aditivos (Cont. Negativo), ração com promotores de crescimento antibióticos (Cont. Positivo) ou com óleos essenciais de orégano, sálvia, alecrim e extrato aquoso de pimenta malagueta, nas doses de 50 (0,005% Activo), 100 (0,010% Activo) e 150 ppm (0,015% Activo).....	48
APÊNDICE B – Delineamento experimental	51
APÊNDICE C – Perfil bioquímico sérico	52
APÊNDICE D – Efeito dos tratamentos sobre o peso corporal	53
APÊNDICE E – Efeito dos tratamentos sobre o consumo alimentar.....	54

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
2 REVISÃO DE LITERATURA	11
2.1 Óleos essenciais	12
2.2 Bioquímica sérica	15
2.2.1 Função pancreática	15
2.2.2 Função renal	16
2.2.3 Função hepática	18
2.2.4 Lipídeos	20
2.2.5. Proteínas	21
3 CAPÍTULO 1	22
Serum biochemistry pattern of broiler chickens fed diets containing essential oils and pepper	22
Summary	23
Introduction	24
Materials and methods	25
Animals and location	25
Experimental groups and feeding.....	25
Collection of blood samples	26
Biochemical assay	26
Statistical analysis	27
Results	27
Discussion	28
Acknowledgements	32
References	33
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS	39
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41

1 INTRODUÇÃO

O crescimento da população humana mundial gera uma demanda cada vez maior por alimentos. No Brasil, a produção de carne de frango no ano de 2008 ficou acima de 11 milhões de toneladas, o que representa um crescimento de mais de 7% em relação ao registrado em 2007. A avicultura brasileira além de ser, hoje, a maior fornecedora de carne de frango para o mundo, tem no mercado externo 35% de seus consumidores, um índice que nenhum país do mundo jamais registrou. Encerrando o ano com novo recorde, as exportações de carne de frango em 2008 atingiram aproximadamente 3,6 milhões de toneladas, representando uma expansão de cerca de 11% sobre 2007 (AVISITE, 2009).

Devido às exigências atuais do mercado externo por alimentos de qualidade, econômicos e sem a presença residual de antibióticos, busca-se a substituição de promotores de crescimento à base de antibacterianos por agentes efetivos de origem natural na produção de frangos (MILTEMBERG, 2000; BUTAYE et al., 2003). Uma alternativa é a utilização de extratos de plantas, como os óleos essenciais, que possuem potencial antimicrobiano significativo (LEE et al., 2004a; COSTA et al., 2007; SANTURIO et al., 2007), por exemplo, produtos extraídos de orégano (*Origanum vulgare L.*), sálvia (*Salvia officinalis L.*), alecrim (*Rosmarinus officinalis L.*) e pimenta (*Capsicum frutescens L.*).

Os óleos essenciais são uma mistura complexa de substâncias ativas obtidas por destilação por arraste de vapor. A concentração e a atividade biológica dos princípios ativos nos óleos essenciais variam de acordo com a parte, espécie e condições ambientais de cultivo da planta. Um mesmo princípio ativo pode ser encontrado em diversas plantas em concentrações diferentes e uma mesma planta pode conter mais de um princípio ativo (KAMEL, 2000; LEE et al., 2004a; ZHANG et al., 2005). Sinergismo entre óleos essenciais e/ou seus princípios ativos pode ocorrer, potencializando seus efeitos (BURT, 2004; ZHANG et al., 2005).

Além de possuir atividade antibacteriana (MITSCH et al., 2004; SANTURIO et al., 2007), os óleos essenciais também podem estimular as enzimas digestivas e pancreáticas (LEE et al., 2003; JANG et al., 2007), aumentando assim a digestibilidade e absorção de nutrientes (HERNÁNDEZ et al., 2004; OETTING et al., 2006), e podem levar a uma hipocolesterolemia (LEE et al., 2004a). Outros possíveis mecanismos de ação desses óleos no organismo do animal

parecem melhorar a resposta imune (MELLOR, 2000; GHAZALAH; ALI, 2008) e ter ação antioxidante e de conservação de alimentos (LEE et al., 2004a; JANG et al., 2008). Assim, os óleos essenciais podem aumentar o desempenho zootécnico e a produtividade de frangos de corte (BOZKURT et al., 2004; WINDISH et al., 2008), incrementando a produção de alimentos sem a presença residual de antibióticos e com menor custo econômico e ambiental. No entanto, possuem rápida metabolização hepática e curta meia vida (HOOD et al., 1978; KOHLERT et al., 2000), podendo produzir efeitos tóxicos em frangos quando aplicados em altas dosagens (LEE et al., 2004a).

Portanto, é de fundamental importância investigar as atividades de misturas de óleos essenciais sobre o metabolismo de frangos de corte. Com esta perspectiva, foram avaliados os efeitos da suplementação na dieta de três doses de uma mistura de óleos essenciais de orégano, sálvia, alecrim e extrato aquoso de pimenta sobre as funções pancreática, renal e hepática de frangos de corte, pela análise do perfil bioquímico sérico, comparados a dietas acrescidas ou não de antibióticos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Em consequência da ampla distribuição bacteriana no intestino das aves, desde a década de 1950, agentes antibacterianos têm sido incorporados à ração animal. O uso de antimicrobianos como promotores de crescimento nas dietas de animais propicia maior desempenho produtivo e eficiência alimentar (BUTAYE et al., 2003; UTIYAMA et al., 2006). Estes reduzem a morbidade e a mortalidade causadas por doenças clínicas e subclínicas, incrementam a conversão alimentar, favorecendo o crescimento. No entanto, nos últimos anos, o uso de promotores de crescimento vem sofrendo restrições devido à possibilidade de seleção de microorganismos resistentes, desenvolvimento de resistência bacteriana cruzada em humanos e à exigência de produtos livres de resíduos de antibióticos pelo mercado consumidor (SILVA, 2000; BUTAYE et al., 2003; SALEHA et al., 2009).

A utilização de antibióticos como aditivos alimentares deve ser feita de forma prudente e com critério, de acordo com a legislação vigente em cada país (BUTAYE et al., 2003; SALEHA et al., 2009). No Brasil, muitos produtos já foram proibidos como promotores de crescimento ou estão em processo de proibição, como a clortetraciclina, a penicilina, a nitrofurazona e o cloranfenicol (BRUGALLI, 2003). Desde 1997, vários quimioterápicos promotores de crescimento utilizados na produção animal estão sendo banidos na União Européia, e acredita-se que os microingredientes antimicrobianos ainda liberados deverão ser suprimidos progressivamente (BRUGALLI, 2003; BUTAYE et al., 2003)

Portanto, atualmente, as exigências do mercado internacional por produtos alimentícios de qualidade, custo acessível e com maior segurança alimentar geram uma preocupação com a substituição de promotores de crescimento à base de antibacterianos por agentes efetivos de origem natural nas rações destinadas à avicultura (MILTEMBERG, 2000; BUTAYE et al., 2003) Como alternativa, tem-se utilizado óleos essenciais extraídos de plantas, já que os mesmos possuem potencial antimicrobiano significativo (LEE et al., 2004a; COSTA et al., 2007; SANTURIO et al., 2007).

2.1 Óleos essenciais

A utilização de plantas e extratos vegetais para o tratamento de doenças que acometem os seres humanos é uma prática milenar e ainda hoje aparece como recurso terapêutico. Muitos extratos vegetais naturais têm fornecido a base para modernos medicamentos, como a digoxina. Os óleos essenciais de plantas, tradicionalmente utilizadas como condimentos ou temperos, podem ser utilizados na alimentação animal, porém, com renovado interesse. A inclusão de extratos vegetais às rações animais requer ausência de toxicidade (KAMEL, 2000; BRUGALLI, 2003). Muitas espécies de plantas como o orégano e a pimenta vermelha têm despertado o interesse de pesquisadores da área animal por seus princípios ativos proporcionarem benefícios aos animais (KAMEL, 2000).

Os óleos essenciais são compostos por uma mistura complexa de substâncias ativas, voláteis, geralmente lipofílicas, obtidas por processo de destilação por arraste de vapor, cujos componentes incluem hidrocarbonetos terpênicos, álcoois, ésteres, aldeídos, cetonas e óxidos em diferentes concentrações (KAMEL, 2000; LEE et al., 2004a; ZHANG et al., 2005). Esses princípios ativos podem ser extraídos de plantas ou produzidos sinteticamente (ZHANG et al., 2005).

A concentração dos princípios ativos nos óleos essenciais e a eficiência de sua atividade biológica podem variar (LEE et al., 2004a) de acordo com a espécie de planta, parte utilizada (caule, folha e sementes), solo, condições ambientais de cultivo e hora da colheita (KAMEL, 2000; ZHANG et al., 2005). Uma mesma planta pode conter mais de um princípio ativo, ou seja, o princípio ativo primário e os secundários, encontrados em menores quantidades. Os componentes secundários atuam sinergicamente como potencializadores dos primários. No orégano, tem-se mais de 30 compostos químicos antibacterianos, sendo que poucos atuam isoladamente nas concentrações encontradas (KAMEL, 2000). Assim como uma mesma substância ativa pode ser encontrada em diversas plantas em concentrações diferentes, por exemplo, o extrato de orégano contém 10% de timol e o de tomilho, 41% (KAMEL, 2000; ZHANG et al., 2005). Sinergismo entre óleos essenciais e/ou seus princípios ativos pode ocorrer, potencializando seus efeitos. Portanto, os produtos à base de extratos vegetais devem ser compostos por diferentes plantas/princípios ativos (LANGHOUT, 2000; BRUGALLI, 2003;

BURT, 2004; ZHANG et al., 2005). Ainda, efeitos benéficos podem ser obtidos usando-se óleos essenciais misturados a outros promotores de crescimento naturais, como os ácidos orgânicos (ZHANG et al., 2005).

No óleo essencial de orégano (*Origanum vulgare L.*) têm-se o carvacrol e o timol como princípios ativos principais (Figura 1). No de sálvia (*Salvia officinalis L.*), estão presentes borneol, cineol, carnosol entre outros (Figura 2). Os principais compostos ativos do óleo de alecrim (*Rosmarinus officinalis L.*) são pineno, canfeno, cineol e borneol (MARTINS et al., 2002; GHAZALAH; ALI, 2008), como demonstrado na Figura 3. Os princípios ativos da pimenta (*Capsicum frutescens L.*) são os capsaicênóides ou a capsaicina (CARVALHO et al., 2005), como pode ser observado na Figura 4.

Os possíveis mecanismos de ação dos óleos essenciais no organismo de frangos e suínos, além da atividade antimicrobiana (MITSCH et al., 2004; SANTURIO et al., 2007), podem influenciar na palatabilidade e no consumo, além de aumentar a salivação (produção de amilase salivar; HORTON et al., 1991; PLATEL; SRINIVASAN, 1996; WINDISH et al., 2008). Além disso, podem provocar modificações morfo-histológicas do trato gastrointestinal (JAMROZ et al., 2006) e estimular a produção de enzimas digestivas e pancreáticas (LEE et al., 2003; JANG et al., 2007), aumentando assim a digestibilidade e absorção de nutrientes (HERNÁNDEZ et al., 2004; OETTING et al., 2006). O uso de óleos essenciais na alimentação também pode modular a resposta imune do animal (MELLOR, 2000; GHAZALAH; ALI, 2008) e levar a hipocolesterolemia, pela inibição da enzima regulatória da síntese de colesterol (CASE et al., 1995; LEE et al., 2004a). É comprovado que essas substâncias têm potencial antioxidante e de conservação de alimentos, muito efetivo na estabilização oxidativa da carne e gordura (LEE et al., 2004a; JANG et al., 2008). Além dessas propriedades, os óleos essenciais também podem ter ação antifúngica (TAMPIERI et al., 2005), antihelmíntica (GUARRERA, 1999), anti-inflamatória e estimuladora da circulação periférica (ADER et al., 2000), entre outras.

Dessa forma, os óleos essenciais poderiam aumentar o desempenho zootécnico e a produtividade de frangos de corte (BOZKURT et al., 2004; WINDISH et al., 2008). Segundo Lima et al. (2001), os extratos vegetais promovem ganho de peso e melhora na conversão alimentar, bem como maior rendimento da carcaça gerando um incremento na produção. No entanto, os extratos vegetais podem aumentar o desempenho dos animais em menor proporção que os antibióticos (LANGHOUT, 2000).

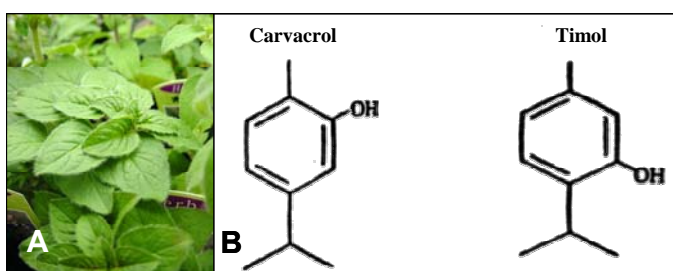


Figura 1 – Orégano (*Origanum vulgare* L.). A) Planta que dá origem ao óleo essencial. B) Estrutura química dos principais compostos ativos (carvacrol e timol) do orégano.

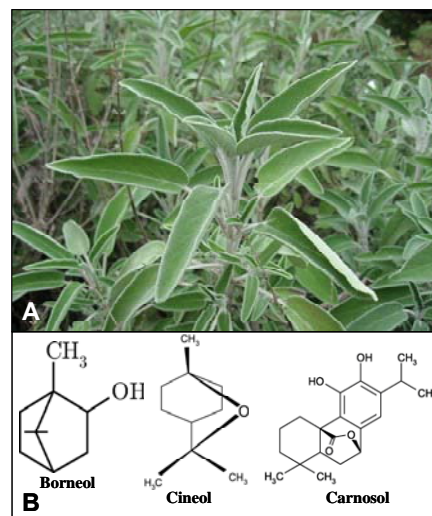


Figura 2 – Sálvia (*Salvia officinalis* L.). A) Planta que dá origem ao óleo essencial. B) Estrutura química dos principais compostos ativos (borneol, cineol e carnosol) da sálvia.

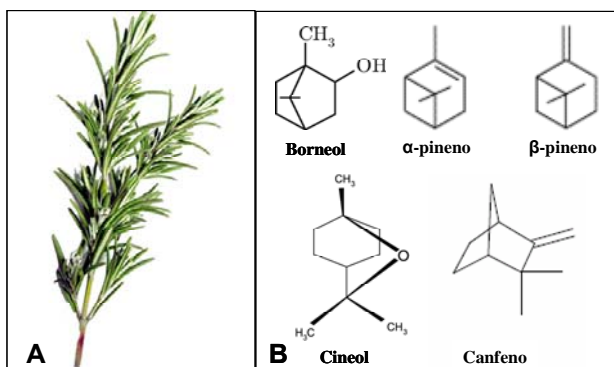


Figura 3 – Alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.). A) Planta que dá origem ao óleo essencial. B) Estrutura química dos principais compostos ativos (borneol, pineno, cineol e canfeno) do alecrim.

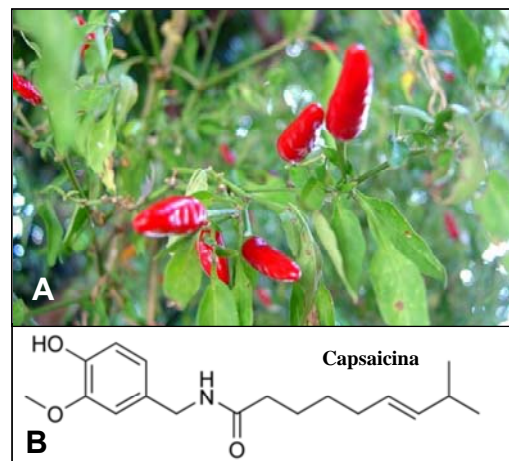


Figura 4 – Pimenta (*Capsicum frutescens* L.). A) Planta que dá origem ao extrato aquoso. B) Estrutura química dos principais compostos ativos (capsaicenóides ou capsaicina) da pimenta.

Entretanto, os efeitos dos óleos essenciais sobre o desempenho animal podem ou não ser benéficos, dependendo do princípio ativo e das doses utilizadas (LEE et al., 2004a; UTIYAMA et al., 2006). Ainda, a resposta aos efeitos dos óleos essenciais parece ser dose-dependente

(ZHANG et al., 2005). Efeitos negativos podem ser decorrentes das propriedades alergênicas desses óleos, da queda no consumo devido ao cheiro ou sabor, do desequilíbrio da microbiota intestinal que esses óleos poderiam causar e do seu possível acúmulo nos tecidos (KOHLERT et al., 2000; MARTINS et al., 2002; LEE et al., 2004a). Por exemplo, foi detectado, em suínos, diminuição no consumo de ração suplementada com extrato de alho (HORTON et al., 1991).

Os efeitos dos óleos essenciais *in vitro* são bastante pesquisados, no entanto, o mecanismo de ação *in vivo* deve ser mais investigado, a fim de estabelecer níveis de inclusão e escolha de princípios ativos para determinadas situações de desafio (TURNER et al., 2001; HERNÁNDEZ et al., 2004). Sabe-se que os princípios ativos dos extratos vegetais são absorvidos no intestino pelos enterócitos, metabolizados rapidamente no organismo do animal e excretados, em sua maioria, pela urina (apesar de alguns poderem ser eliminados na respiração, como CO₂), possuindo rápida metabolização hepática e curta meia vida (HOOD et al., 1978; KOHLERT et al., 2000). Adicionalmente, os óleos essenciais podem ter efeitos tóxicos em frangos quando administrados em doses muito altas. A dose letal (DL₅₀), em ratos, é de 810 e 980 mg/kg para o carvacrol e para o timol, respectivamente (LEE et al., 2004a), cerca de oito vezes mais alta que a maior dose da mistura utilizada neste experimento. Entre os efeitos toxicológicos de plantas medicinais de uso condimentar em humanos, consta que a sálvia poderia causar insuficiência renal e que o alecrim, em doses altas, pode intoxicar e ocasionar nefrite (STRALLO'S, 2008).

2.2 Bioquímica sérica

2.2.1 Função pancreática

Mais de 99% do tecido pancreático das aves está envolvido na produção e secreção de enzimas digestivas (FUDGE, 2000). O pâncreas secreta precursores inativos, incluindo tripsinogênio, quimiotripsinogênio e procarboxipeptidase, que somente são ativados pela enteroquinase intestinal ao entrarem no duodeno, prevenindo a autodigestão. O pâncreas exócrino também sintetiza lipase e amilase. No duodeno das aves, estão presentes as enzimas pancreáticas na sua forma ativa, como tripsina, quimiotripsina e carboxipeptidase, as quais degradam

proteínas; lipase, que hidrolisa triglicerídeos até ácidos graxos e monoglicerídeos; e amilase, responsável pela degradação de amido (LUMEIJ, 1997; FUDGE, 2000).

Sabe-se que extratos de plantas, como o de pimenta, têm a propriedade de estimular a produção de saliva, bem como o aumento da enzima amilase salivar, além de aumentar a secreção de enzimas digestivas, por estímulo ao sistema nervoso central pelo cheiro e sabor (PLATEL; SRINIVASAN, 1996; WINDISH et al., 2008). Em frangos de corte, os óleos essenciais também podem estimular a atividade de certas enzimas digestivas e pancreáticas (JANG et al., 2007), sendo que o timol tem efeito estimulante sobre as enzimas pancreáticas (LEE et al., 2003). Segundo Mellor (2000), extratos vegetais na dieta podem aumentar a secreção das enzimas pancreáticas pelo aumento na produção de pepsina e ácido gástrico, proporcionando uma queda no pH estomacal e do intestino delgado, o que estimularia a secreção pancreática. Outra explicação para o aumento da atividade enzimática e da secreção pancreática seria o aumento do peso relativo do pâncreas que esses óleos poderiam produzir (OETTING et al., 2006; JANG et al., 2007). O estímulo da produção de enzimas e secreções do trato digestivo é a condição mais estudada para explicar a melhora na digestibilidade produzida por esses óleos (HERNÁNDEZ et al., 2004; OETTING et al., 2006).

No entanto, o aumento nos níveis séricos de lipase e amilase pode ocorrer em decorrência de uma lesão pancreática, como na pancreatite aguda e nos casos de necrose, inflamação ou neoplasia pancreática (LUMEIJ, 1997; GONZÁLEZ; SILVA, 2006). Como grande parte dessas enzimas sanguíneas é removida do organismo pela filtração renal e eliminada na urina, um dano renal com diminuição da filtração glomerular pode produzir um aumento no nível sérico. No entanto, se a causa renal for descartada, a amilase tem alta especificidade para lesão pancreática. Além disso, hiperamilasemia pode ocorrer em distúrbios gastrointestinais, como obstrução intestinal, hiperadrenocorticismo, obstrução das glândulas salivares e administração de drogas, como cortisol e opiáceos (GONZÁLEZ; SILVA, 2006)

2.2.2 Função renal

A função renal das aves pode ser avaliada pela mensuração sérica de ácido úrico e uréia, sendo o primeiro, um parâmetro mais confiável. Seu aumento sérico acontece quando menos de 30% do rim está funcional (LUMEIJ, 1997; CAMPBELL, 2007). A concentração sanguínea de

creatinina é baixa em aves (FUDGE, 2000) e tem pouco valor diagnóstico, pois a creatina é excretada pelos rins das aves antes de ser convertida em creatinina (CAMPBELL, 2007).

O ácido úrico é o produto final do metabolismo do nitrogênio mais importante nas aves. Este é um composto não tóxico quando comparado com a amônia, e é essencial para o desenvolvimento do embrião nos ovos de répteis e aves (LUMEIJ, 1997). É sintetizado no fígado e nos rins e cerca de 90% é excretado via secreção tubular renal, principalmente nos túbulos proximais dos néfrons corticais, ou seja, é praticamente independente da reabsorção tubular de água (LUMEIJ, 1997; CAMPBELL, 2007). Como sua eliminação é pouco influenciada pelo fluxo da urina e estado de hidratação do paciente, o ácido úrico sanguíneo aumenta somente quando existem causas pré-renais muito severas ou quando o dano tubular é extenso (LUMEIJ, 1997; FUDGE, 2000). Em geral, o seu aumento sérico indica alteração da função renal, devido a diversas causas. Portanto, a determinação do conteúdo sérico desse ácido tem sido amplamente utilizada para diagnóstico de doença renal em aves (CAMPBELL, 2007).

No entanto, a concentração de ácido úrico no sangue varia conforme a espécie, a idade e a dieta: aves jovens tendem a apresentar teores menores de ácido úrico sanguíneo que as adultas; aves carnívoras apresentam maior concentração que as granívoras (CAMPBELL, 2007). Como esse ácido é o principal produto final do metabolismo do nitrogênio nas aves, aumenta imediatamente após consumo de alimento com alto teor de ácidos nucléicos, podendo aumentar também em necrose tecidual severa ou inanição, devido ao aumento do metabolismo de compostos nitrogenados (proteínas e ácidos nucléicos; CAMPBELL, 2007; SCHMIDT et al., 2007).

Dessa forma, o ácido úrico é um teste pouco sensível e específico para doença renal nas aves, pois sua concentração sanguínea aumenta somente quando há perda de aproximadamente 75% da função renal e há possibilidade de sua elevação após alta ingestão de proteínas, grave necrose tecidual ou períodos de inanição (CAMPBELL, 2007). Apesar disso, níveis séricos de ácido úrico podem ser utilizados como indicador de função renal nas aves, sendo que sua elevação constitui forte indicativo de doença renal. Porém, não definem ou excluem o diagnóstico, e nem mesmo valores normais asseguram ausência de doença renal, exceto em dosagens sucessivas (CAMPBELL, 2007; SCHMIDT et al., 2007).

Como as aves são uricotélicas, há baixa concentração de uréia no seu plasma. A uréia é formada no fígado como subproduto do metabolismo das proteínas. É excretada por filtração

glomerular, que depende da condição de hidratação da ave, sendo um teste sensível para detecção de azotemia pré-renal (LUMEIJ, 1997; CAMPBELL, 2007). Um decréscimo na taxa de filtração glomerular e o conseqüente aumento nos níveis séricos de uréia pode indicar tanto uma doença renal quanto uma resposta fisiológica à restrição hídrica em aves (FUDGE, 2000). Assim como o ácido úrico, há maior quantidade plasmática de uréia nas aves carnívoras que nas granívoras e após consumo de alimento com alto teor protéico (CAMPBELL, 2007). As concentrações séricas de ácido úrico e uréia também podem estar elevadas em obstruções pós-renais (KANEKO et al., 1997). Portanto, a mensuração da concentração de uréia é um indicador diagnóstico limitado de doença renal em aves e menos confiável que o ácido úrico, que é excretado independente do estado de hidratação (CAMPBELL, 2007; SCHMIDT et al., 2007).

Sabe-se que plantas medicinais como sálvia e alecrim, em doses altas, podem causar insuficiência renal e nefrite/intoxicação em humanos, respectivamente (STRALLO'S, 2008). Diminuição na excreção de uréia e ácido úrico e seu acúmulo sanguíneo, associados à doença renal, podem induzir implicações terapêuticas importantes (KANEKO et al., 1997). Frente à possibilidade dos óleos essenciais produzirem efeitos tóxicos em frangos quando administrados em doses muito altas (LEE et al., 2004a) e devido à sua rápida metabolização, curta meia vida e eliminação renal (KOHLETT et al., 2000), alterações nos parâmetros bioquímicos que avaliam a função renal devem ser investigados.

2.2.3 Função hepática

Nas aves, as provas de função hepática estão divididas em testes de enzimas hepáticas que refletem lesão hepatocelular (como aspartato aminotransferase - AST), aumento na produção enzimática conseqüente à colestase (como no caso da gama glutamiltransferase - GGT) e testes funcionais do fígado ou metabólitos, como o colesterol e as proteínas (SCHMIDT et al., 2007). A AST é uma enzima citoplasmática e mitocondrial presente em vários tecidos como fígado, músculo esquelético, músculo cardíaco, cérebro e rim, sendo que em todas as espécies domésticas, inclusive nas aves, a sua atividade é alta no fígado. Portanto, na injúria hepática aguda ou crônica, a atividade sérica de AST está elevada (TENNANT, 1997; CAMPBELL, 2007). Entretanto, Fudge (2000) explica que o fígado em estágio final, como na severa fibrose ou lipidose, pode produzir pouco extravasamento hepatocelular, resultando em níveis de AST normais ou, em alguns casos, diminuídos. Portanto, a elevação dos níveis sérico-enzimáticos da

AST é decorrente de lesão dos hepatócitos, resultante de necrose ou de alterações na permeabilidade da membrana celular, e pode ser atribuída à disfunção hepática recente (KANEKO et al., 1997).

Porém, esta não é uma enzima específica de lesão hepática, podendo estar aumentada em lesões musculares, juntamente com aumento da creatina quinase (CK; KANEKO et al., 1997; CAMPBELL, 2007; SCHMIDT et al., 2007). A CK é uma enzima músculo-específica e o aumento da sua atividade plasmática pode se originar de lesão de célula muscular ou de esforço físico exagerado (LUMEIJ, 1997; CAMPBELL, 2007). A mensuração da atividade plasmática da CK pode ser útil para determinar se o aumento da atividade da AST decorre de lesão muscular ou hepatocelular: elevação na atividade sérica da AST não acompanhada de CK aumentada sugere a existência de doença hepática. No entanto, a meia vida da CK no soro após dano muscular localizado parece ser menor e pode retornar a níveis normais antes que a AST, o que pode ser erroneamente interpretado como doença hepática (FUDGE, 2000; CAMPBELL, 2007). Os procedimentos de captura, contenção e abate não aumentam significativamente os níveis séricos de AST, exceto na presença de doença hepatocelular pré-existente, ao contrário do que acontece com a CK (CAMPBELL, 2007).

A GGT é uma enzima que está relacionada ao processo de colestase biliar e hiperplasia de ductos (KANEKO et al., 1997). Em aves, a maior atividade da GGT é nos rins, além de ser mensurável também no cérebro e no intestino, porém sua atividade plasmática não se eleva em distúrbios nesses tecidos, nem na doença renal, pois a enzima é excretada na urina (CAMPBELL, 2007). No entanto, a elevação da atividade sérica de GGT em aves com doença hepatobiliar não é previsível, ou seja, depende da natureza da lesão hepática e da espécie de ave, podendo ou não ocorrer (CAMPBELL, 2007; SCHMIDT et al., 2007).

A atividade da alanina aminotransferase (ALT) tem valor limitado como teste para avaliar distúrbios hepatocelulares em aves (CAMPBELL, 2007; SCHMIDT et al., 2007). Mesmo com altos níveis de atividade de ALT no tecido hepático das aves, elevações plasmáticas não são comuns na doença hepatocelular nesta espécie (FUDGE, 2000) e tal elevação pode ser observada também em lesão de músculo esquelético, não havendo vantagens nesse teste em comparação com a mensuração de AST para diagnóstico de doença hepatocelular (CAMPBELL, 2007). A atividade da fosfatase alcalina é baixa no fígado das aves e seu aumento plasmático deve-se

principalmente à atividade osteoblástica, não sendo útil para detecção de doença hepatobiliar nessa espécie na maioria dos casos (CAMPBELL, 2007; SCHMIDT et al., 2007).

2.2.4 Lipídeos

Os lipídeos normalmente presentes e mensuráveis no sangue são os triglicerídeos e o colesterol (fracionado em lipoproteína de baixa densidade - LDL e lipoproteína de alta densidade - HDL), transportados ligados a proteínas e denominados lipoproteínas. Os triglicerídeos são os principais lipídeos do tecido adiposo, sendo a forma de estocagem de gordura corporal. A concentração de triglicerídeos circulantes reflete o equilíbrio entre sua absorção intestinal, sua síntese/secreção nos hepatócitos e sua absorção no tecido adiposo, influenciados pelo teor de gordura na dieta e pela produção de hormônios (LASSEN; FETTMAN, 2007).

O colesterol é um precursor importante dos ésteres de colesterol, dos ácidos biliares e dos hormônios esteróides. Pode ser sintetizado por vários tecidos do organismo, mas o fígado é o órgão principal de síntese endógena de colesterol. A hipercolesterolemia pode ser causada pela dieta com alto teor de gordura e lipemia ou também por injúria hepática (KANEKO et al., 1997). Como o colesterol é eliminado na forma de ácidos biliares, o aumento da sua concentração no plasma pode estar associado com obstrução biliar extra-hepática, fibrose hepática e hiperplasia de ductos biliares nas aves. Pode-se observar hipocolesterolemia na fase final da doença hepática e em casos de má digestão, má absorção e inanição (CAMPBELL, 2007).

Estudos revelam que o uso de diversos óleos essenciais na alimentação humana pode levar a hipocolesterolemia, pela inibição da enzima regulatória da síntese de colesterol, a 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A (HMG-CoA) redutase, produzida no fígado (ELSON et al., 1989; CROWELL, 1999). Princípios ativos como timol, carvacrol e borneol poderiam causar hipocolesterolemia, também em frangos (CASE et al., 1995; LEE et al., 2004a). A inibição da síntese do colesterol requer dois reguladores que modulam a atividade da HMG-CoA redutase, o colesterol derivado do LDL e produtos não esteroidais derivados do mevalonato (GOLDSTEIN; BROWN, 1990). O timol e o carvacrol podem induzir produtos regulatórios não esteroidais (CASE et al., 1995; ELSON, 1996) similares ao mevalonato que inibem a HMG-CoA redutase. Em frangos, uma inibição de 5% da HMG-CoA redutase induz uma queda de 2% da concentração normal do colesterol (CASE et al., 1995). Parece haver uma correlação entre a atividade da HMG-CoA redutase e colesterol total ou LDL em frangos, mas não com o colesterol

HDL (QURESHI et al., 1983). Não são relatadas alterações em outros lipídeos plasmáticos, como triglicerídeos (COOKE et al., 1998).

2.2.5. Proteínas

A concentração sérica normal de proteínas nas aves é menor que a de mamíferos, sendo constituída de 40 a 50% por albumina, além de proteínas de transporte, de coagulação, enzimas e hormônios produzidos no fígado. As imunoglobulinas sintetizadas por linfócitos B e plasmócitos também representam importantes componentes da proteína total (CAMPBELL, 2007). Como o principal local de produção de proteínas é o fígado, importantes alterações nas funções hepáticas afetam o metabolismo das proteínas, evidenciado por inibição da síntese protéica (KANEKO et al., 1997). Doença renal com proteinúria crônica também pode interferir no nível sérico por grave perda de proteínas (KANEKO, 1997; CAMPBELL, 2007). Além disso, hipoproteinemia também pode decorrer de desnutrição e má absorção. Já hiperproteinemia acontece basicamente em casos de desidratação e inflamação (CAMPBELL, 2007).

Com o uso de óleos essenciais na dieta, a absorção de proteínas poderia sofrer incremento devido ao estímulo da secreção de certas enzimas digestivas e pancreáticas (JANG et al., 2007), como tripsina, quimiotripsina e carboxipeptidase, que degradam proteínas (FUDGE, 2000). Além disso, modificações morfohistológicas e a modulação da microbiota do intestino pelos extratos vegetais poderiam exercer uma ação protetora do epitélio, melhorando a absorção de nutrientes (JAMROZ et al., 2006; OETTING et al., 2006; UTIYAMA et al., 2006), inclusive de proteínas. Adicionalmente, os óleos essenciais podem ter efeito imunomodulador (MELLOR, 2000). Segundo a literatura, ervas que são ricas em flavonóides, vitamina C ou carotenóides, como alecrim e sálvia, podem incrementar a função imunológica. No entanto, esses compostos nem sempre permanecem nos óleos essenciais após sua extração (MARTINS et al., 2002; CRAIG, 1999; GHAZALAH; ALI, 2008; STRALLO'S, 2008). Um estímulo ao sistema imune pode aumentar a capacidade da ave em sintetizar anticorpos, representados pelas imunoglobulinas (KANEKO et al., 1997; FUDGE, 2000), o que levaria a um aumento nos níveis séricos de globulinas. Os efeitos dos óleos essenciais sobre as proteínas séricas de frangos de corte ainda podem ser investigados pelo fracionamento eletroforético, técnica muito confiável na determinação das frações protéicas pré-albumina (em alguns casos), albumina, alfa globulinas (1 e 2), beta globulinas e gama globulinas (KANEKO, 1997; CAMPBELL, 2007).

3 CAPÍTULO 1

Os resultados desta dissertação são apresentados na forma de artigo científico, com sua formatação de acordo com as normas de publicação do *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*.

Serum biochemistry pattern of broiler chickens fed diets containing essential oils and pepper

C. K. Traesel*, P. Wolkmer, C. Schmidt, C. B. Silva, F. C. Paim, A. P. Rosa, S. H. Alves, J. M. Santurio, S. T. A. Lopes

Laboratory of Veterinary Clinical Analysis - LACVet, Federal University of Santa Maria, 97105-900 Santa Maria, RS, Brazil.

*Correspondence to: Carolina Kist Traesel

Address: Laboratory of Veterinary Clinical Analysis - LACVet, Federal University of Santa Maria, Department of Small Animal Clinical Sciences, 97105-900 Santa Maria, RS, Brazil.

Phone number: +55-55-3220-8814

Fax number: +55-55-3220-8460

E-mail address: ninak131@yahoo.com.br

Summary

Broiler chickens were fed diets supplemented with antibiotics or essential oils from oregano, sage, rosemary and pepper aqueous crude extract (OLES) and serum biochemical parameters involving pancreatic, renal and hepatic functions were evaluated. Animals (910) were distributed into five treatment groups, with seven replicates of 26 birds in each group. The control group received a diet without additives. Another group received an antibiotic growth promoter diet. Treatment groups T₅₀, T₁₀₀ and T₁₅₀ received animal feed supplemented with 50, 100 and 150 mg/kg of OLES, respectively. At 42 days old, 55 animals were slaughtered and blood samples were collected for serum biochemical profile analysis (lipase, amylase, urea, uric acid, aspartate aminotransferase (AST), gamma glutamyltransferase, total cholesterol, high-density lipoprotein, triglycerides, total protein, albumin, globulins and albumin:globulins ratio). The results demonstrated increase in serum levels of lipase, uric acid, urea and AST examined by least squares means test ($P < 0.05$), suggesting that OLES can cause kidney and liver functions impairment.

Key words: plants extract, poultry, serum biochemical profile, pancreas, liver, kidney.

Introduction

Growth promoters based on antibiotics have been used in animal diets to improve animal performance (Butaye et al., 2003; Utiyama et al., 2006). Recently, the use of these growth promoters has been restricted because of the possibility of selecting antibiotic-resistant microorganisms, the development of bacterial resistance in humans and the growing demand for antibiotic residue-free food products (Butaye et al., 2003; Saleha et al., 2009). Alternatively, the use of essential oils that possess antimicrobial potential has been studied (Lee et al., 2004a; Mitsch et al., 2004; Costa et al., 2007; Santurio et al., 2007). Essential oils are composed of a complex mixture of active substances extracted from plants through a steam distillation process or generated via chemical synthesis (Lee et al., 2004a; Zhang et al., 2005).

The concentration of the biologically active ingredient's in essential oils are variable and depend on the species, the part of the plant used, soil, environmental conditions and time of harvest (Kamel, 2000; Lee et al., 2004a). In the essential oil derived from oregano (*Origanum vulgare* L.), carvacrol and thymol are the major active compounds. In sage (*Salvia officinalis* L.), borneol, cineole and carnosol are present in high quantities. In rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) oil, the main active compounds are pinene, canfeno, cineole and borneol (Martins et al., 2002; Ghazalah and Ali, 2008). The active constituents of pepper (*Capsicum frutescens* L.) are capsaicoids, or capsaicin (Carvalho et al., 2005).

These substances can produce several beneficial effects and synergistic effect may occur when a combination of essential oils and/or their active compounds are used together (Burt, 2004; Zhang et al., 2005). However, essential oils can produce toxic effects in chickens when used in high doses (Lee et al., 2004a). The response to essential oils may be dose-dependent (Zhang et al., 2005).

The aim of this study was to evaluate the effect of three different doses of oregano, sage, rosemary essential oils and pepper aqueous crude extract as dietary supplements on pancreatic, renal and hepatic functions of broilers by analyzing their serum biochemical profile. We also aimed to compare this treatment effect with that of animals fed diets containing antibiotic supplements or antibiotic-free diets.

Materials and methods

Animals and location

One-day-old male Cobb chicks (n=910) with an average weight of 42 g were housed at appropriate temperature, according to the birds' age, remaining at room temperature after the first week of life and under natural light cycles. The animals were distributed in boxes containing wood shaving litter and allowed free access to food and drinking water.

Experimental groups and feeding

The birds were randomly allocated to receive one of five diets (seven replications of 26 birds per treatment group). Animals from the control treatment group (Tc) received a diet based on corn, soy bean meal and microelements necessary for the animal's maintenance; no growth promoter additives were included in this group. The second treatment group (Tatb) was fed with the same diet as the Tc group, but included supplements containing antibiotic growth promoters, at the dose suggested by the manufacturer (Colistin sulphate + Oxytetracycline 0.005%). In treatment groups T₅₀, T₁₀₀ and T₁₅₀, an encapsulated essential oils derived from oregano, sage, rosemary and hot chili pepper aqueous crude extract (OLES) was added to the antibiotic-free feed

at proportions of 50 mg/kg, 100 mg/kg and 150 mg/kg, respectively. OLES were produced by Mycological Research Laboratory and oregano oil was the major component.

Collection of blood samples

This study was approved by the Committee on Ethics and Animal Welfare of the Rural Science Center of the Federal University of Santa Maria (CCR / UFSM, no. 23081.014222/2007-37) in accordance with existing legislation and Ethical Principles, as published by the Brazilian College of Animal Experiments (COBEA). At 42 days, eleven animals were randomly selected from each group and slaughtered after electrical stunning. Approximately 6 mL of blood was collected by cardiac puncture and stored in tubes without anticoagulant. Serum was obtained by centrifugation and stored at -20°C for serum biochemical profile analysis.

Biochemical assay

Serum lipase concentration was measured using a commercial kit (Human do Brazil[®], Núcleo Diagnóstico Produtos Especializados Ltda – Itabira – MG – Brazil) and the absorbance was evaluated by spectrophotometry at 412nm. The levels of serum amylase, urea, uric acid, aspartate aminotransferase (AST), creatine kinase (CK), gama glutamyltransferase (GGT), total cholesterol, high density lipoprotein (HDL-cholesterol), triglycerides, total protein (TP) and albumin measurements were done in a semi-automatic analyzer (TP Analyzer Plus[®], Thermoplate – China), using commercial kits (Labtest[®] Diagnóstica S.A. – Lagoa Santa – MG – Brazil). All tests were carried out in duplicates. Globulins values were obtained from the difference between serum TP and serum albumin concentrations; the albumin/globulins ratio was also calculated.

Statistical analysis

Each treatment effect was evaluated by analyzing the factor variance using PROC GLM (General Linear Models Procedure). When a treatment effect was found on the dependent variable, the difference between each group was examined by the least squares means test. All dependent variables were tested for normality using the Shapiro-Wilk Test, and if necessary, they were normalized according to data distribution. The analyses were performed using the statistical package, SAS (SAS Institute, Cary, NC, USA), with a significance level of 5% ($P < 0.05$). The values are reported as the mean \pm standard error.

Results

The serum lipase concentration was higher in animals that received OLES in groups T₅₀, T₁₅₀ ($P < 0.05$) and T₁₀₀ ($P < 0.01$) than in the control animals (T_c; Fig. 1A). There was no significant difference in serum amylase levels.

The serum levels of urea were higher than control in the groups T₅₀ ($P < 0.01$) and T₁₅₀ ($P < 0.05$; Fig. 1B). The serum levels of uric acid increased gradually from groups T₅₀ to T₁₅₀. The uric acid showed a significant increase in groups T₅₀ ($P < 0.01$), T₁₀₀ ($P < 0.05$) and T₁₅₀ ($P < 0.001$) compared to T_c. Moreover, the values of uric acid in T₁₅₀ were significantly higher than in animals treated with antibiotics (Fig. 1C).

The values of AST were higher in T₁₅₀ than in the T_c ($P < 0.01$), T_{atb} and T₅₀ ($P < 0.05$) groups. The average measurements of AST were also higher in the T₁₀₀ group than in T_c ($P < 0.05$; Fig. 1D). There was no significant difference between treatment groups in serum levels of CK and GGT.

Total serum cholesterol, HDL-cholesterol and triglycerides showed no significant difference between treatment groups. No significant difference was detected in serum TP, albumin, globulins and albumin/globulins ratio in the biochemical analysis.

Discussion

As expected, the control group demonstrated results that are in agreement with previous findings (González et al., 2001; Batina et al., 2005; Franciscato et al., 2006; Maciel et al., 2007). In broilers, essential oils can cause morphological changes in the gastrointestinal tract (Jamroz et al., 2006) and stimulate the production of certain digestive and pancreatic enzymes (Lee et al., 2003; Jang et al., 2007), since the thymol, for example, has stimulatory effects on pancreatic enzyme secretion in broiler chickens (Lee et al., 2003). According to Mellor (2000), plant extracts in the diet may increase the secretion of pancreatic enzymes by causing an increase in gastric acid and pepsin production and providing a reduction in pH in the stomach and small intestine. Another explanation for the high enzymatic activity and pancreatic secretion, in pigs, might result from the pancreas relative weight gain that these oils could cause. This elevated production of digestive tract enzymes and secretory activity may explain the digestibility improvement caused by essential oils (Oetting et al., 2006).

Pancreatic secretion can be evaluated measuring the enzymes directly from pancreatic tissue (Lima et al., 2002; Jang et al., 2007) and the intestinal digesta (Lee et al., 2003). However, in the present study, the serum concentrations of amylase and lipase in broilers fed OLES were measured. An increase in these parameters in the serum might be related to a pancreatic injury, as acute pancreatitis or pancreatic necrosis (Lumeij, 1997), which lead secretion of enzymes into blood. Additionally, the changes of enzyme activity hyperamylasemia and hyperlipasemia, can

also occur in renal injury, when their excretion is reduced by a decrease in glomerular filtration (González and Silva, 2006). In animals from groups T₅₀, T₁₀₀ and T₁₅₀, the increase in serum levels of lipase is probably related to a renal injury, as indicated by the renal function evaluation.

Avian renal function can be evaluated by serum urea and uric acid measurements, the latter being a more reliable parameter. The elevation of these parameters in serum occurs when 30% or less of the kidneys are functional (Lumeij, 1997; Campbell, 2007). In birds, an increase in serum urea levels occurs after a decrease in glomerular filtration rate and may indicate a kidney disease or a physiological response to fluid restriction. However, uric acid excretion occurs via tubular secretion, which is influenced little by urine flow and hydration state, increasing only when there are very severe pre-renal causes and extensive tubular damage (Lumeij, 1997; Fudge, 2000). Besides, these serum parameters can also be elevated after high protein intake, because they are involved in nitrogen metabolism, since uric acid is the major final product in a bird's nitrogen metabolism (Campbell, 2007; Schmidt et al., 2007).

In this study, the observed increases in both serum uric acid and urea were probably due to an initial kidney function impairment caused by OLES, since the animals were fed a balanced diet, according to the birds' age, with crude protein levels between 19.5 and 22%, and were allowed free access to food and drinking water throughout the treatment; therefore, there was no observed significant alteration in feed intake in broilers fed OLES. Additionally, continuous OLES supplementation and kidney damage could increase the serum levels of these parameters over time if the birds live more than 42 days. The level of kidney damage seems to correlate with the OLES dose, because the levels of uric acid gradually elevated with an increase in the OLES dose, suggesting a dose-dependent effect. Conversely, Ghazalah and Ali (2008) found reduced serum uric acid levels in broilers fed diet with 0.5% dried rosemary leaf meal.

Moreover, essential oils can produce toxic effects in chickens when administered in high doses; however, the lethal dose (LD₅₀) in rats is about eight times higher than the highest dose used in this experiment (Lee et al., 2004a). The negative effects of the essential oils can include the oils allergenic properties, drop in consumption (due to bad smell or taste), intestinal microflora imbalance and possible tissue accumulation (Kohlert et al., 2000; Martins et al., 2002; Lee et al., 2004a). However, the decrease in urea and uric acid excretion associated with kidney disease in birds (Kaneko et al., 1997) could also be related to OLES toxicity. In humans, sage and rosemary at high doses can cause renal failure and nephritis, respectively (Strallo's, 2008).

Serum concentrations of the liver enzyme, AST, increased concomitantly with OLES doses, suggesting a dose-dependent effect. The increase in serum levels of AST is caused by hepatocyte injury, resulting from necrosis or changes in cell membrane permeability and can be attributed to recent liver dysfunction (Kaneko et al., 1997). However, it is not a specific liver injury enzyme and may also be altered by muscle injuries, as indicated by a concurrent increase in CK levels (Kaneko et al., 1997; Campbell, 2007; Schmidt et al., 2007). In our study, there was no significant increase in serum levels of CK and no evidence of muscle injury, therefore, it is more likely that the increased AST levels (in OLES doses greater than 100 mg/kg) originated in the liver and not the muscle, since elevation in plasma AST activities without an increase in CK levels suggests hepatocellular disease (Campbell, 2007). Besides, essential oils are quickly metabolized in the liver (Hood et al., 1978; Kohlert et al., 2000) and this can overload the liver causing damage, indicating that the increased serum AST observed was due to an initial hepatic injury. Ghazalah and Ali (2008) also observed low serum AST levels in control groups compared to groups of broilers fed 0.5% of dried rosemary leaf meal in the diet.

No significant difference in GGT serum concentration was observed among treatment groups. This enzyme is related to biliar cholestasis and duct hyperplasia (Kaneko et al., 1997),

which probably did not occur in this experiment. Moreover, serum GGT elevation in birds with hepatobiliary disease is not predictable, which may or may not occur, depending on the nature of the hepatic injury and the species of bird (Campbell, 2007; Schmidt et al., 2007).

The liver relative weight gain can also be related to the increase in serum AST, suggesting that heavier livers are a consequence of hepatomegaly, which occurs when there is a damage in the liver (Freitas Neto et al., 2007). Lee et al. (2003) and Oetting et al. (2006) observed an increase in the liver relative weight in female broiler chickens and pigs that received essential oils. This hypothesis could not be confirmed in our study, because organ weight and morphometry were not evaluated. However, Hernández et al. (2004) did not find differences in organ weight of 42-day-old broilers with diets containing antibiotic or mixtures of plant extracts. Additionally, Barreto et al. (2008) observed that birds fed diets with red pepper extract presented the lowest liver relative weight compared to those fed the control diet.

Total serum cholesterol, HDL-cholesterol and triglycerides levels showed no significant differences between groups. These results were similar to those found by Lee et al. (2003), Lee et al. (2004b) and Bambidis et al. (2005) in studies with broiler chickens and turkeys using different active compounds (Cinnamaldehyde, thymol) and essential oils (oregano and CRINA[®]Poultry). However, several active compounds such as thymol, carvacrol and borneol can cause hypocholesterolemia by inhibiting the regulatory enzyme of cholesterol synthesis, 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) reductase (Case et al., 1995; Lee et al., 2004a). In the present study, changes in serum cholesterol were not observed, probably because the essential oils selected (OLES) do not inhibit HMG-CoA reductase activity.

No significant difference was observed between groups in the serum levels of TP, albumin, globulins and albumin/globulins ratio. The obtained results, as normal serum albumin levels and albumin/globulins ratio, exclude the presence of hepatic insufficiency in our study,

since albumin synthesis occurs in the liver (González and Silva, 2006). Similar results were found in a study by Abd El-Hakim et al. (2009) with broilers fed herbs and/or organic acid. These authors also suggested that the effects of plant extracts on plasma proteins are species-specific. The results obtained by Ghazalah and Ali (2008) showed significant increases in total protein and globulins fractions serum values when broilers were fed diets with 0.5% rosemary dried leaf meal. In our study, OLES did not interfere with serum protein concentrations.

Our findings indicate that OLES cause kidney and liver impairment. High doses of OLES can be nephrotoxic and hepatotoxic, at levels as high as 150 mg/kg. More studies are necessary to optimize the essential oil combinations that will provide benefits to the animal without being harmful. Moreover, the effect of continuous OLES use on the pancreatic, renal and hepatic functions of birds and other animal with longer lives should be investigated, because further damage can occur with frequent and repeated exposure.

Acknowledgements

This study was supported by Brazilian *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico* (CNPq, nº 476507/2007-3) and *Ministério da Ciência e Tecnologia* (MCT/CNPq, 15/2007-Universal). We are grateful to Rogério Ferreira for assisting with statistical analysis and Daniele Rodrigues for help with the biochemical assays.

References

- Abd El-Hakim, A.S.; Cherian, G.; Ali, M.N., 2009: Use of organic acid, herbs and their combination to improve the utilization of commercial low protein broiler diets. *International Journal of Poultry Science* **8**, 14-20.
- Bambidis, V.A.; Christodoulou, V.; Florou-Paneri, P.; Christaki, E.; Chatzopoulou, P.S.; Tsiligianni, T.; Spais., A.B., 2005: Effect of dietary dried oregano leaves on growth performance, carcass characteristics and serum cholesterol of female early maturing turkeys. *British Poultry Science* **46**, 595-601.
- Barreto, M.S.R.; Menten, J.F.M.; Racanicci, A.M.C.; Pereira, P.W.Z.; Rizzo, P.V., 2008: Plant extracts used as growth promoters in broilers. *Brazilian Journal of Poultry Science* **10**, 109-115.
- Batina, P.N.; Lopes, S.T.A.; Santurio, J.M.; Souza, C. de; Martins, D.B., 2005: Efeitos da adição de montmorilonita sódica na dieta sobre o perfil bioquímico de frangos de corte intoxicados com aflatoxina. *Ciência Rural* **35**, 826-831.
- Burt, S., 2004: Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - a review. *International Journal of Food Microbiology* **94**, 223-253.
- Butaye, P.; Devriese, L.A.; Haesebrouck, F., 2003: Antimicrobial growth promoters used in animal feed: effects of less well know antibiotics on gram-positive bacteria. *Clinical Microbiology Reviews* **16**, 175-188.
- Campbell, T.W. Bioquímica clínica de aves. In: Thrall, M.A.; Baker, D.C.; Campbell, T.W.; DeNicola, D.; Fettman, M.J.; Lassen, E.D.; Rebar, A.; Weiser, G., 2007: *Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária*, Roca, São Paulo, Brazil.

- Carvalho, H.H.C.; Cruz, F.T.; Wiest, J.M., 2005: Atividade antibacteriana em plantas com indicativo etnográfico condimentar em Porto Alegre, RS/Brasil. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais* **7**, 25-32.
- Case, G.L.; He, L.; Mo, H.; Elson, C.E., 1995: Induction of geranyl pyrophosphate pyrophosphatase activity by cholesterol-suppressive isoprenoids. *Lipids* **30**, 357-359.
- Costa, L.B.; Tse, M.L.P.; Miyada, V.S., 2007: Extratos vegetais como alternativas aos antimicrobianos promotores de crescimento para leitões recém-desmamados. *Revista Brasileira de Zootecnia* **36**, 589-595.
- Franciscato, C.; Lopes, S.T.A.; Santurio, J.M.; Wolkmer, P.; Maciel, R.M.; Paula, M.T. de; Garmatz, B.C.; Costa, M.M., 2006: Concentrações séricas de minerais e funções hepática e renal de frangos intoxicados com aflatoxina e tratados com montmorilonita sódica. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* **41**, 1573-1577.
- Freitas Neto, O.C.; Arroyave, W.; Alessi, A.C.; Fagliari, J.J.; Berchieri, A., 2007: Infection of commercial laying hens with *Salmonella gallinarum*: clinical, anatomopathological and haematological studies. *Brazilian Journal of Poultry Science* **9**, 133-141.
- Fudge, A.M., 2000: *Laboratory Medicine Avian and Exotic Pets*, W.B. Saunders Company, Philadelphia, USA.
- Ghazalah, A.A; Ali, A.M., 2008: Rosemary leaves as a dietary supplement for growth in broiler chickens. *International Journal of Poultry Science* **7**, 234-239.
- González, F.H.D.; Haida, K.S.; Mahl, D.; Giannesi, G.; Kronbauer, E., 2001: Incidência de doenças metabólicas em frangos de corte no sul do Brasil e uso do perfil bioquímico sanguíneo para o seu estudo. *Revista Brasileira de Ciência Avícola* **3**, 141-147.
- González, F.H.D.; Silva, S.C. da, 2006: *Introdução à bioquímica clínica veterinária*, 2nd edn. UFRGS, Porto Alegre, Brazil.

- Hernández, F.; Madrid, J.; García, V.; Orengo, J.; Megías, M. D., 2004: Influence of two plant extracts on broilers performance, digestibility, and digestive organ size. *Poultry Science* **83**, 169–174.
- Hood, R.L.; Bailey, W.M.; Svoronos, D., 1978: The effect of dietary monoterpenes on the cholesterol level of eggs. *Poultry Science* **57**, 304-306.
- Jamroz, D.; Wertelecki, T.; Houszka, M.; Kamel, C., 2006: 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* **90**, 255-268.
- Jang, I.S.; Ko, Y.H.; Kang, S.Y.; Lee, C.Y., 2007: Effect of a commercial essential oil on growth performance, digestive enzyme activity and intestinal microflora population in broiler chickens. *Animal Feed Science and Technology* **134**, 304–315.
- Kamel, C., 2000: A novel look at a classic approach of plant extracts. *Feed Mix – The International Journal on Feed, Nutrition and Technology* **9** (Special number), 19-24.
- Kaneko, J.J.; Harvey, J.W.; Bruss, M.L., 1997: *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*, 5rd edn. Academic Press, London, England.
- Kohlert, C.; van Rensen, I.; März, R.; Schindler, G.; Graefe, E.U.; Veit, M., 2000: Bioavailability and pharmacokinetics of natural volatile terpenes in animals and humans. *Planta Medica* **66**, 495-505.
- Lee, K.W.; Everts, H.; Beynen, A.C., 2004a: Essential oils in broiler nutrition. *International Journal of Poultry Science* **12**, 738-752.
- Lee, K.W.; Everts, H.; Kappert, H. J.; Frehner, M.; Losa, R.; Beynen A. C., 2003: Effects of dietary essential oil components on growth performance, digestive enzymes and lipid metabolism in female broiler chickens. *British Poultry Science* **44**, 450-457.

- Lee, K.W.; Everts, H.; Kappert, H.J.; Van Der Kuilen, J.; Lemmens, A.G.; Frehner, M.; Beynen, A.C., 2004b: Growth performance, intestinal viscosity, fat digestibility and plasma cholesterol in broiler chickens fed a rye-containing diet without or with essential oil components. *International Journal of Poultry Science* **9**, 613-618.
- Lima, A.C.F.; Macari, M.; Pizauro Júnior, J.M.; Malheiros, E.B., 2002: Atividade enzimática pancreática de frangos de corte alimentados com dietas contendo enzima ou probiótico. *Revista Brasileira de Ciência Avícola* **4**, 187-193.
- Lumeij, J.T. Avian clinical biochemistry. In: Kaneko, J.J.; Harvey, J.W.; Bruss, M.L., 1997: *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*, 5rd edn. Academic Press, London, England.
- Maciel, R.M.; Lopes, S.T.A.; Santurio, J.M.; Martins, D.B.; Rosa, A.P.; Emanuelli, M.P., 2007: Função hepática e renal de frangos de corte alimentados com dietas com aflatoxinas e clinoptilolita natural. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* **42**, 1221-1225.
- Martins, E.R.; Castro, D.M.; Castellani, D.C.; Dias, J.E., 2002: *Plantas Mediciniais*, UFV, Viçosa, Brasil.
- Mellor, S., 2000: Herbs and spices promote health and growth. *Pig Progress* **16**, 18-21.
- Mitsch, P.; Zitterl-Eglseer, K.; Köhler, B.; Gabler, C.; Losa, R.; Zimpernik, I., 2004: The effect of two different blends of essential oil components on the proliferation of *Clostridium perfringens* in the intestines of broiler chickens. *Poultry Science* **83**, 669-675.
- Oetting, L.L.; Utiyama, C.E.; Giani, P.A.; Ruiz, U.S.; Miyada, V.S., 2006: 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* **35**, 1389-1397.

- Saleha, A.A.; Myaing, T.T.; Ganapathy, K.K.; Zulkifli, I.; Raha, R.; Arifah, K., 2009: Possible effect of antibiotic-supplemented feed and environment on the occurrence of multiple antibiotic resistant *Escherichia coli* in chickens. *International Journal of Poultry Science* **8**, 28-31.
- Santurio, J.M.; Santurio, D.F.; Pozzatti, P.; Moraes, C.; Franchin, P.R.; Alves, S.H., 2007: Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de orégano, tomilho e canela frente a sorovares de *Salmonella enterica* de origem avícola. *Ciência Rural* **37**, 803-808.
- Schmidt, E.M.S.; Locatelli-Dittrich, R.; Santin, E.; Paulillo, A.C., 2007: Patologia clínica em aves de produção – uma ferramenta para monitorar a sanidade avícola – revisão. *Archives of Veterinary Science* **12**, 9-20.
- Strallos'S. Plantas que curam, o maior cadastro de plantas medicinais da internet brasileira. Captured at Jun. 1st 2008. Online. Available in internet: <http://celtic.bighost.com.br/>.
- Utiyama, C.E.; Oetting, L.L.; Giani, P.A.; Ruiz, U.S.; Miyada, V.S., 2006: Efeitos de antimicrobianos, prebióticos, probióticos e extratos vegetais sobre a microbiota intestinal, a frequência de diarreia e o desempenho de leitões recém desmamados. *Revista Brasileira de Zootecnia* **35**, 2359-2367.
- Zhang, K.Y.; Yan, F.; Keen, C.A.; Waldroup, P.W., 2005: Evaluation of microencapsulated essential oils and organic acids in diets for broiler chickens. *International Journal of Poultry Science* **9**, 612-619.

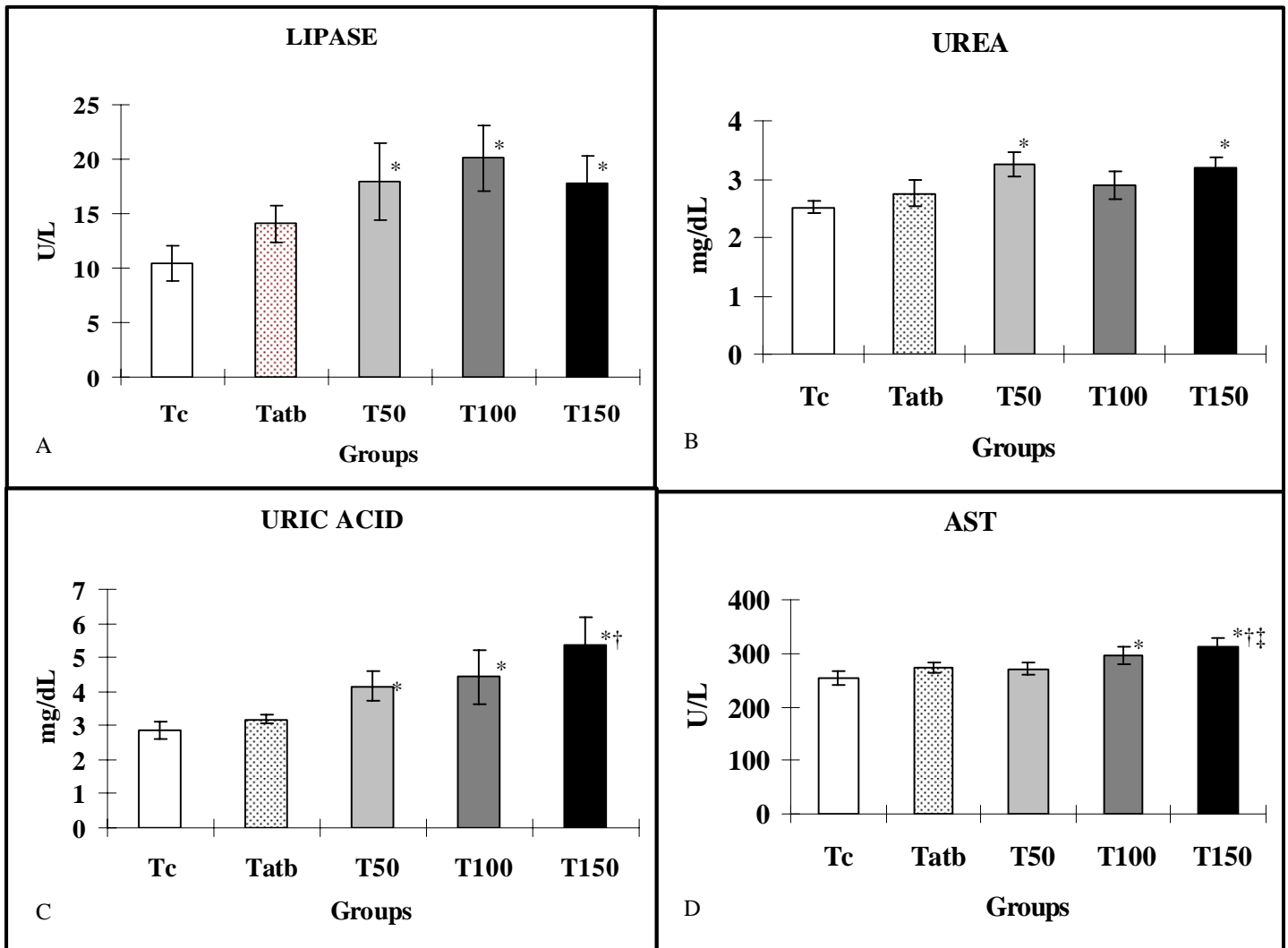


Fig. 5 Mean values and standard errors of serum lipase (A), urea (B), uric acid (C) and AST (aspartate aminotransferase; D) of 42-day-old broilers (n=11) fed an iso-nutritive diet (Tc) supplemented with antibiotics (Tatb) and with essential oils of oregano, sage, rosemary and hot chili pepper aqueous crude extract in the proportion of 50 (T50), 100 (T100) and 150 (T150) mg/kg.

A * represents statistical difference ($P < 0.05$) when compared to Tc;

A † indicates a statistically significant difference ($P < 0.05$) when compared to Tatb.

A ‡ represents a statistical difference ($P < 0.05$) when compared to T50.

The difference between each group was examined by the least squares means test, using the statistical package SAS (SAS Institute, Cary, NC, USA). Attempt to different graph scales.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Frente às exigências atuais do mercado externo por alimentos sem a presença residual de antibióticos e devido à possibilidade de incremento da produção com menor custo econômico e ambiental, extratos de plantas com propriedades antibacterianas, como os óleos essenciais, têm sido incorporados à alimentação animal. No entanto, esses produtos extraídos de plantas podem produzir diversos efeitos, benéficos ou deletérios, justificando a necessidade de investigação de suas atividades sobre o metabolismo animal. Portanto, possíveis alterações nas funções pancreática, hepática e renal devem ser pesquisadas em animais que recebem rações suplementadas com essas substâncias. Propriedades de estimulação da secreção pancreática em frangos de corte podem influenciar o nível sérico das enzimas pancreáticas. Além disso, a rápida metabolização hepática, curta meia vida e eliminação renal desses produtos, além da possibilidade de produzirem efeitos tóxicos em frangos, podem provocar alterações em suas enzimas hepáticas e indicadores de função renal.

No presente estudo, foi comprovado que os óleos essenciais de orégano, sálvia, alecrim e extrato aquoso de pimenta (OLES) podem causar comprometimento renal nas concentrações de 50, 100 e 150 ppm (mg/kg) e comprometimento hepático nas doses de 100 e 150 ppm. No entanto, essas alterações foram observadas em comparação ao grupo controle, que não recebeu qualquer aditivo alimentar. Já ao se comparar os resultados com o grupo que recebeu o que é rotineiramente empregado (ração com promotores de crescimento à base de antibióticos), que é de real importância, pois reproduz a realidade, foi constatado que somente a dose de 150 ppm de OLES provoca comprometimento renal e hepático, sugerindo a existência de nefrotoxicidade e hepatotoxicidade dos OLES quando administrados nesta dosagem. Já outros parâmetros séricos analisados, como colesterol total, lipoproteína de alta densidade, triglicerídeos, proteínas totais, albumina, globulinas e relação albumina:globulinas, não apresentaram diferença significativa entre os grupos.

Além disso, um estudo paralelo que avaliou dados de desempenho, como ganho de peso e consumo alimentar, demonstrou que os OLES na dose de 100 ppm provocam resultados semelhantes aos obtidos no grupo que recebeu promotores de crescimento antibióticos em relação ao peso corporal. Entretanto, o consumo de alimento não variou significativamente entre os tratamentos.

Mais estudos ainda são necessários para adequar as doses de óleos essenciais na ração, a fim de propiciar benefícios sem provocar danos ao animal. Além disso, o efeito do uso contínuo de OLES sob as funções pancreática, renal e hepática de aves ou outros animais de vida mais longa deve ser investigado, devido à possibilidade de causar maiores alterações com a exposição freqüente e repetida.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABD EL-HAKIM, A. S.; CHERIAN, G.; ALI, M. N. Use of organic acid, herbs and their combination to improve the utilization of commercial low protein broiler diets. **International Journal of Poultry Science**, v. 8, n. 1, p. 14-20, 2009.

ADER, P.; WESSMANN, A.; WOLFFRAM, S. Bioavailability and metabolism of the flavonol quercetin in the pig. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 28, p. 1056-1067, 2000.

AVISITE. **Avisite estatísticas e preços – produção, exportação e disponibilidade interna de carne de frango.** Disponível em:<<http://www.avisite.com.br/economia/prodfran.asp>>. Acesso em: 22 jan. 2009.

BAMBIDIS, V. A. et al. Effect of dietary dried oregano leaves on growth performance, carcass characteristics and serum cholesterol of female early maturing turkeys. **British Poultry Science**, v. 46, n. 5, p. 595-601, 2005.

BARRETO, M. S. R. et al. Plant extracts used as growth promoters in broilers. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v. 10, n. 2, p. 109-115, 2008.

BATINA, P. N. et al. Efeitos da adição de montmorilonita sódica na dieta sobre o perfil bioquímico de frangos de corte intoxicados com aflatoxina. **Ciência Rural**, v. 35, n. 4, p. 826-831, 2005.

BOZKURT, M. et al. The effect of a mixture of herbal essential oils, an organic acid or a probiotic on broiler performance. **South African Journal of Animal Science**, v. 34, n. 4, p. 217-222, 2004.

BRUGALLI, I. Alimentação alternativa: a utilização de fitoterápicos ou nutracêuticos como moduladores da imunidade e desempenho animal. In: SIMPÓSIO SOBRE MANEJO E NUTRIÇÃO DE AVES E SUÍNOS, 2003 Campinas. **Anais...** Campinas : CBNA, 2003. v.1, p. 167-182.

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

BUTAYE, P. et al. Antimicrobial growth promoters used in animal feed: effects of less well know antibiotics on gram-positive bacteria. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 16, n. 2, p. 175-188, 2003.

CAMPBELL, T. W. Bioquímica clínica de aves. In: THRALL, M. A. et al. **Hematologia e bioquímica clínica veterinária**. São Paulo : Roca, 2007. cap. 32, p. 448-460.

CARVALHO, H. H. C. et al. Atividade antibacteriana em plantas com indicativo etnográfico condimentar em Porto Alegre, RS/Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 7, n. 3, p. 25-32, 2005.

CASE, G .L. et al. Induction of geranyl pyrophosphate pyrophosphatase activity by cholesterol-suppressive isoprenoids. **Lipids**, v. 30, p. 357-359, 1995.

COOKE, C. J. et al. Plant monoterpenes do not raise plasma high-density-lipoprotein concentrations in humans. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 68, p. 1042-1045, 1998.

COSTA, L. B. et al. 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.

CRAIG, W. J. Health-promoting properties of common herbs. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 70, suppl., p. 491S-499S, 1999.

CROWELL, P. L. Prevention and therapy of cancer by dietary monoterpenes. **Journal of Nutrition**, v. 129, p. 775S-778S, 1999.

ELSON, C. E. et al. Impact of lemongrass oil, an essential oil, on serum cholesterol. **Lipids**, v. 24, p. 677-679, 1989.

ELSON, C. E. Novel lipids and cancer. Isoprenoids and other phytochemicals. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 399, p. 71-86, 1996.

FRANCISCATO, C. et al. Concentrações séricas de minerais e funções hepática e renal de frangos intoxicados com aflatoxina e tratados com montmorilonita sódica. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, n. 11, p. 1573-1577, 2006.

FREITAS NETO, O. C. et al. Infection of commercial laying hens with *Salmonella gallinarum*: clinical, anatomopathological and haematological studies. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v. 9, n. 2, p. 133-141, 2007.

FUDGE, A. M. **Laboratory medicine - avian and exotic pets**. Philadelphia : W. B. Saunders Company, 2000. 467 p.

GHAZALAH, A. A; ALI, A. M. Rosemary leaves as a dietary supplement for growth in broiler chickens. **International Journal of Poultry Science**, v. 7, n. 3, p. 234-239, 2008.

GOLDSTEIN, J. L.; BROWN, M. S. Regulation of the mevalonate pathway. **Nature**, v. 343, p. 425-430, 1990.

GONZÁLEZ, F. H. D. et al. Incidência de doenças metabólicas em frangos de corte no sul do Brasil e uso do perfil bioquímico sanguíneo para o seu estudo. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v. 3, n. 2, p. 141-147, 2001.

GONZÁLEZ, F. H. D.; SILVA, S. C. da. **Introdução à bioquímica clínica veterinária**. 2 ed. Porto Alegre : UFRGS, 2006. 358 p.

GUARRERA, P. M. Traditional antihelmintic, antiparasitic and repellent uses of plants in Central Italy. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 68, p. 183-192, 1999.

HERNÁNDEZ, F. et al. Influence of two plant extracts on broilers performance, digestibility and digestive organ size. **Poultry Science**, v. 83, p. 169-174, 2004.

HOOD, R. L. et al. The effect of dietary monoterpenes on the cholesterol level of eggs. **Poultry Science**, v. 57, p. 304-306, 1978.

HORTON, G. M. J.; BLETHEN, D. B.; PRASAD, B. M. The effect of garlic (*Allium sativum*) on feed palatability of horses and feed consumption, selected performance and blood parameters in sheep and swine. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 71, p. 607-610, 1991.

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, p. 255-268, 2006.

JANG, A. et al. Antioxidative potential of raw breast meat from broiler chicks fed a dietary medicinal herb extract mix. **Poultry Science**, v. 87, p. 2382-2389, 2008.

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, p. 304–315, 2007.

KAMEL, C. A novel look at a classic approach of plant extracts. **Feed Mix – The International Journal on Feed, Nutrition and Technology**, v. 9, n. 6, p. 19-24, 2000. Número especial.

KANEKO, J. J. Serum proteins and the dysproteinemias. In: KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. **Clinical biochemistry of domestic animals**. 5 ed. London : Academic Press, 1997. cap. 5, p. 117-138.

KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. **Clinical biochemistry of domestic animals**. 5 ed. London : Academic Press, 1997. 932 p.

KOHLERT, C. I. et al. Bioavailability and pharmacokinetics of natural volatile terpenes in animals and humans. **Planta Medica**, v. 66, p. 495-505, 2000.

LANGHOUT, P. New additives for broiler chickens. **World Poultry**, v. 16, p. 22-27, 2000.

LASSEN, E. D.; FETTMAN, M. J. Avaliação laboratorial dos lipídeos. In: THRALL, M. A. et al. **Hematologia e bioquímica clínica veterinária**. São Paulo : Roca, 2007. cap. 28, p. 394-402.

LEE, K. W. et al. Effects of dietary essential oil components on growth performance, digestive enzymes and lipid metabolism in female broiler chickens. **British Poultry Science**, v. 44, p. 450-457, 2003.

LEE, K. W. et al. Essential oils in broiler nutrition. **International Journal of Poultry Science**, v. 12, n. 3, p. 738-752, 2004a.

LEE, K. W. et al. Growth performance, intestinal viscosity, fat digestibility and plasma cholesterol in broiler chickens fed a rye-containing diet without or with essential oil components. **International Journal of Poultry Science**, v. 9, n. 3, p. 613-618, 2004b.

LIMA, A. C. F. et al. Atividade enzimática pancreática de frangos de corte alimentados com dietas contendo enzima ou probiótico. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v. 4, n. 3, p. 187-193, 2002.

LIMA, G. J. M. M. et al. Efeito da adição de um composto de ervas naturais como promotor de crescimento de dietas de suínos em crescimento e terminação. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, 10., 2004, Foz do Iguaçu. **Resumos**. Foz do Iguaçu : ABRAVES, 2001. p. 323-324.

LUMEIJ, J. T. Avian clinical biochemistry. In: KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. **Clinical biochemistry of domestic animals**. 5 ed. London : Academic Press, 1997. cap. 30, p. 857-883.

MACIEL, R. M. et al. Função hepática e renal de frangos de corte alimentados com dietas com aflatoxinas e clinoptilolita natural. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, n. 9, p. 1221-1225, 2007.

MARTINS, E. R. et al. **Plantas Medicinais**. Viçosa : UFV, 2002. 220 p.

MELLOR, S. Herbs and spices promote health and growth. **Pig Progress**, v. 16, n. 4, p. 18-21. 2000.

MILTEMBERG, G. Extratos herbais como substitutos de antimicrobianos na alimentação animal. In: SIMPÓSIO SOBRE ADITIVOS ALTERNATIVOS NA NUTRIÇÃO ANIMAL, 2000, Campinas. **Anais...** Campinas : IAC, 2000. p. 87-100.

MITSCHE, 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, p. 669-675, 2004.

OETTING, L. L. et al. 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**, v. 35, n. 4, p. 1389-1397, 2006.

PLATEL, K.; SRINIVASAN, K. Influence of dietary spices or their active principles on digestive enzymes of small intestinal mucosa in rats. **International Journal of Food Sciences & Nutrition**, v. 47, p. 55-59, 1996.

QURESHI, A. A. et al. Suppression of avian hepatic lipid metabolism by solvent extracts of garlic: Impact on serum lipids. **Journal of Nutrition**, v. 113, p. 1746-1755, 1983.

SALEHA, A. A. et al. Possible effect of antibiotic-supplemented feed and environment on the occurrence of multiple antibiotic resistant *Escherichia coli* in chickens. **International Journal of Poultry Science**, v. 8, n. 1, p. 28-31, 2009.

SANTURIO, J. M. et al. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de orégano, tomilho e canela frente a sorovares de *Salmonella enterica* de origem avícola. **Ciência Rural**, v. 37, n. 3, p. 803-808, 2007.

SCHMIDT, E. M. S. et al. Patologia clínica em aves de produção – uma ferramenta para monitorar a sanidade avícola – revisão. **Archives of Veterinary Science**, v. 12, n. 3, p. 9-20, 2007.

SILVA, E. N. Antibióticos intestinais naturais: bacteriocinas. In: SIMPÓSIO SOBRE ADITIVOS ALTERNATIVOS NA NUTRIÇÃO ANIMAL, 2000, Campinas. **Anais...** Campinas : CBNA, 2000. p. 15-24.

STRALLO'S. **Plantas que curam, o maior cadastro de plantas medicinais da internet brasileira**. Disponível em: <<http://celtic.bighost.com.br/>>. Acesso em: 1 jun. 2008.

TAMPIERI, M. P. et al. The inhibition of *Candida albicans* by selected essential oils and their major components. **Mycopathologia**, v. 159, p. 339–345, 2005.

TENNANT, B. C. Hepatic function. In: KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. **Clinical biochemistry of domestic animals**. 5. ed. San Diego : Academic Press, 1997. cap. 13, p. 327-352.

TURNER, J. L.; DRITZ, P. S. S; MINTON, J. E. Review: Alternatives to conventional antimicrobials in swine diets. **The Professional Animal Scientist**, v. 17, p. 217-226, 2001.

UTIYAMA, C. E. et al. Efeitos de antimicrobianos, prebióticos, probióticos e extratos vegetais sobre a microbiota intestinal, a frequência de diarréia e o desempenho de leitões recém desmamados. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 35, n. 6, p. 2359-2367, 2006.

WINDISCH, W. et al. Use of phytogetic products as feed additives for swine and poultry. **Journal of Animal Science**, v. 86, p. E140-E148, 2008.

ZHANG, K. Y. et al. Evaluation of microencapsulated essential oils and organic acids in diets for broiler chickens. **International Journal of Poultry Science**, v. 9, n. 4, p. 612-619, 2005.

APÊNDICE A – Composição estimada e perfil nutricional das dietas basais utilizadas na fase pré-inicial, inicial, crescimento e final de frangos de corte que receberam ração sem aditivos (Cont. Negativo), ração com promotores de crescimento antibióticos (Cont. Positivo) ou com óleos essenciais de orégano, sálvia, alecrim e extrato aquoso de pimenta malagueta, nas doses de 50 (0,005% Activo), 100 (0,010% Activo) e 150 ppm (0,015% Activo)

TABELA 1. Composição e perfil nutricional das dietas utilizadas na fase pré-inicial (1-7dias)

INGREDIENTES	Cont. Negativo	Cont. Positivo	0,005% Activo	0,010% Activo	0,015% Activo
Milho Grão	56,54	56,54	56,54	56,54	56,54
Farelo de Soja (45,27%PB)	36,85	36,85	36,85	36,85	36,85
Óleo Vegetal	2,57	2,57	2,57	2,57	2,57
Fosfato Bicálcico	1,81	1,81	1,81	1,81	1,81
Calcário	1,04	1,04	1,04	1,04	1,04
Sal (NaCl)	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40
Premix Vit/Min sem APC	0,50	0,00	0,50	0,50	0,50
Premix Vit/Min com APC	0,00	0,50	0,00	0,00	0,00
L-Lisina	0,079	0,079	0,079	0,079	0,079
DL-Metionina	0,109	0,109	0,109	0,109	0,109
Activo	0,000	0,000	0,005	0,010	0,015
Caulim	0,100	0,100	0,095	0,090	0,085
NUTRIENTES					
Proteína Bruta (%)	22,00	22,00	22,00	22,00	22,00
Energia Metabolizável (kcal/kg)	2970	2970	2970	2970	2970
Cálcio (%)	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
Fósforo Disponível (%)	0,45	0,45	0,45	0,45	0,45
Lisina (%)	1,30	1,30	1,30	1,30	1,30
TSAA (%)	0,92	0,92	0,92	0,92	0,92
Treonina (%)	0,842	0,842	0,842	0,842	0,842
Triptofano (%)	0,231	0,231	0,231	0,231	0,231

TABELA 2. Composição e perfil nutricional das dietas utilizadas na fase inicial (8-21 dias)

INGREDIENTES	Cont.	Cont.	0,005%	0,010%	0,015%
	Negativo	Positivo	Activo	Activo	Activo
Milho Grão	57,70	57,70	57,70	57,70	57,70
Farelo de Soja (45,27%PB)	35,64	35,64	35,64	35,64	35,64
Óleo Vegetal	2,81	2,81	2,81	2,81	2,81
Fosfato Bicálcico	1,76	1,76	1,76	1,76	1,76
Calcário	0,95	0,95	0,95	0,95	0,95
Sal (NaCl)	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40
Premix Vit/Min sem APC	0,50	0,00	0,50	0,50	0,50
Premix Vit/Min com APC	0,00	0,50	0,00	0,00	0,00
L-Lisina	0,061	0,061	0,061	0,061	0,061
DL-Metionina	0,081	0,081	0,081	0,081	0,081
Activo	0,000	0,000	0,005	0,010	0,015
Caulim	0,100	0,100	0,095	0,090	0,085
NUTRIENTES					
Proteína Bruta (%)	21,00	21,00	21,00	21,00	21,00
Energia Metabolizável (kcal/kg)	3000	3000	3000	3000	3000
Cálcio (%)	0,95	0,95	0,95	0,95	0,95
Fósforo Disponível (%)	0,44	0,44	0,44	0,44	0,44
Lisina (%)	1,250	1,250	1,250	1,250	1,250
TSAA (%)	0,880	0,880	0,880	0,880	0,880
Treonina (%)	0,824	0,824	0,824	0,824	0,824
Triptofano (%)	0,224	0,224	0,224	0,224	0,224

TABELA 3. Composição e perfil das dietas utilizadas na fase de crescimento (22-35 dias)

INGREDIENTES	Cont.	Cont.	0,005%	0,010%	0,015%
	Negativo	Positivo	Activo	Activo	Activo
Milho Grão	59,70	59,70	59,70	59,70	59,70
Farelo de Soja (45,27%PB)	33,21	33,21	33,21	33,21	33,21
Óleo Vegetal	3,26	3,26	3,26	3,26	3,26
Fosfato Bicálcico	1,78	1,78	1,78	1,78	1,78
Calcário	0,96	0,96	0,96	0,96	0,96
Sal (NaCl)	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40
Premix Vit/Min sem APC	0,50	0,00	0,50	0,50	0,50
Premix Vit/Min com APC	0,00	0,50	0,00	0,00	0,00
L-Lisina	0,037	0,037	0,037	0,037	0,037
DL-Metionina	0,056	0,056	0,056	0,056	0,056
Activo	0,000	0,000	0,005	0,010	0,015
Caulim	0,100	0,100	0,095	0,090	0,085
NUTRIENTES					
Proteína Bruta (%)	20,50	20,50	20,50	20,50	20,50
Energia Metabolizável (kcal/kg)	3050	3050	3050	3050	3050
Cálcio (%)	0,95	0,95	0,95	0,95	0,95
Fósforo Disponível (%)	0,44	0,44	0,44	0,44	0,44
Lisina (%)	1,160	1,160	1,160	1,160	1,160
TSAA (%)	0,830	0,830	0,830	0,830	0,830
Treonina (%)	0,788	0,788	0,788	0,788	0,788
Triptofano (%)	0,210	0,210	0,210	0,210	0,210

TABELA 4. Composição e perfil nutricional das dietas utilizadas na fase final (36-42dias)

INGREDIENTES	Cont.	Cont.	0,005%	0,010%	0,015%
	Negativo	Positivo	Activo	Activo	Activo
Milho Grão	61,99	61,99	61,99	61,99	61,99
Farelo de Soja (45,27%PB)	30,80	30,80	30,80	30,80	30,80
Óleo Vegetal	3,62	3,62	3,62	3,62	3,62
Fosfato Bicálcico	1,69	1,69	1,69	1,69	1,69
Calcário	0,90	0,90	0,90	0,90	0,90
Sal (NaCl)	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40
Premix Vit/Min sem APC	0,50	0,00	0,50	0,50	0,50
Premix Vit/Min com APC	0,00	0,50	0,00	0,00	0,00
L-Lisina	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
DL-Metionina	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Activo	0,000	0,000	0,005	0,010	0,015
Caulim	0,100	0,100	0,095	0,090	0,085
NUTRIENTES					
Proteína Bruta (%)	19,50	19,50	19,50	19,50	19,50
Energia Metabolizável (kcal/kg)	3100	3100	3100	3100	3100
Cálcio (%)	0,90	0,90	0,90	0,90	0,90
Fósforo Disponível (%)	0,42	0,42	0,42	0,42	0,42
Lisina (%)	1,059	1,059	1,059	1,059	1,059
TSAA (%)	0,750	0,750	0,750	0,750	0,750
Treonina (%)	0,753	0,753	0,753	0,753	0,753
Triptofano (%)	0,197	0,197	0,197	0,197	0,197

APÊNDICE B – Delineamento experimental

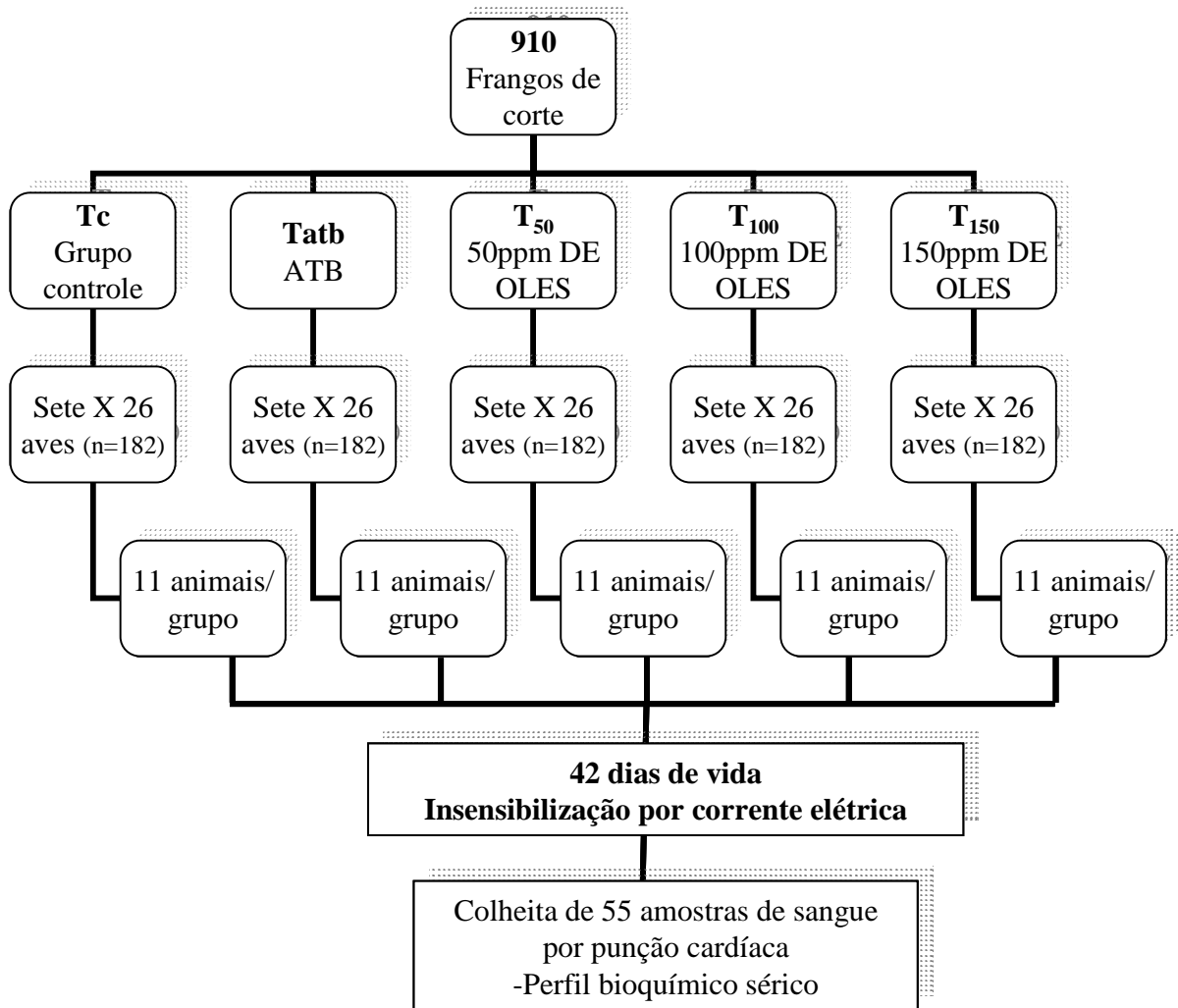


Figura 6 – Delineamento experimental: frangos de corte (n=910) que receberam ração isonutritiva (Tc), suplementada com Sulfato de colistina e Oxitetraciclina 0,005% (Tatb) e com óleos essenciais de orégano, sálvia, alecrim e extrato aquoso de pimenta malagueta (OLES), nas doses de 50 (T₅₀), 100 (T₁₀₀) e 150 ppm (T₁₅₀). Aos 42 dias de idade, os animais foram insensibilizados por corrente elétrica e foi realizada a colheita de sangue por punção cardíaca para a análise do perfil bioquímico sérico (função pancreática, hepática e renal).

APÊNDICE C – Perfil bioquímico sérico

Tabela 5 – Perfil bioquímico sérico de frangos de corte de 42 dias de idade que receberam ração isonutritiva (Tc), suplementada com antibióticos (Tatb) e com óleos essenciais de orégano, sálvia, alecrim e extrato aquoso de pimenta malagueta, nas doses de 50 (T₅₀), 100 (T₁₀₀) e 150 ppm (T₁₅₀)

	Tc	Tatb	T ₅₀	T ₁₀₀	T ₁₅₀
Lipase (U/L)	10,46±1,62	14,09±1,68	17,96±3,56*	20,10±2,99*	17,78±2,59*
Amilase (U/L)	1133,74±96,30	1126,28±124,83	1150,68±216,17	920,22±90,53	1350,33±294,15
Uréia (mg/dL)	2,51±0,11	2,75±0,22	3,26±0,20*	2,90±0,23	3,19±0,17*
Ácido úrico (mg/dL)	2,86±0,27	3,19±0,14	4,15±0,43*	4,42±0,78*	5,34±0,83* [†]
AST (U/L)	253,58±12,98	273,48±10,27	270,01±11,37	296,51±16,45*	312,90±14,99* [‡]
CK (U/L)	4998,04±537,48	5371,12±801,41	5445,39±691,98	5293,65±1034,98	5227,71±927,27
Colesterol (mg/dL)	104,56±4,01	115,01±4,40	111,50±5,03	114,97±5,15	118,23±8,60
HDL (mg/dL)	61,47±3,16	71,28±4,45	70,20±3,84	73,02±3,47	64,25±4,12
Triglicerídeos (mg/dL)	39,81±1,82	32,75±3,38	33,05±2,35	30,35±3,14	29,37±2,74
PT (g/dL)	3,36±0,11	3,42±0,07	3,70±0,18	3,36±0,13	3,53±0,33
Albumina (g/dL)	1,57±0,04	1,56±0,05	1,57±0,10	1,56±0,07	1,52±0,06
Globulinas (g/dL)	1,80±0,11	1,86±0,08	2,12±0,13	1,79±0,11	2,00±0,36
A/G	0,90±0,06	0,86±0,06	0,77±0,06	0,91±0,07	0,98±0,17

Os resultados estão expressos em média±erro padrão, n=11, a diferença entre cada grupo foi analisada pelo teste *least squares means*, utilizando-se o pacote estatístico SAS (SAS Institute, Cary, NC, USA).

* representa diferença estatística (P<0,05), quando comparado ao Tc;

[†] representa diferença estatística (P<0,05), quando comparado ao Tatb;

[‡] representa diferença estatística (P<0,05), quando comparado ao T₅₀.

AST - aspartato aminotransferase; GGT - gama glutamiltransferase; HDL – lipoproteína de alta densidade; PT - proteínas totais; A/G - relação albumina/globulinas.

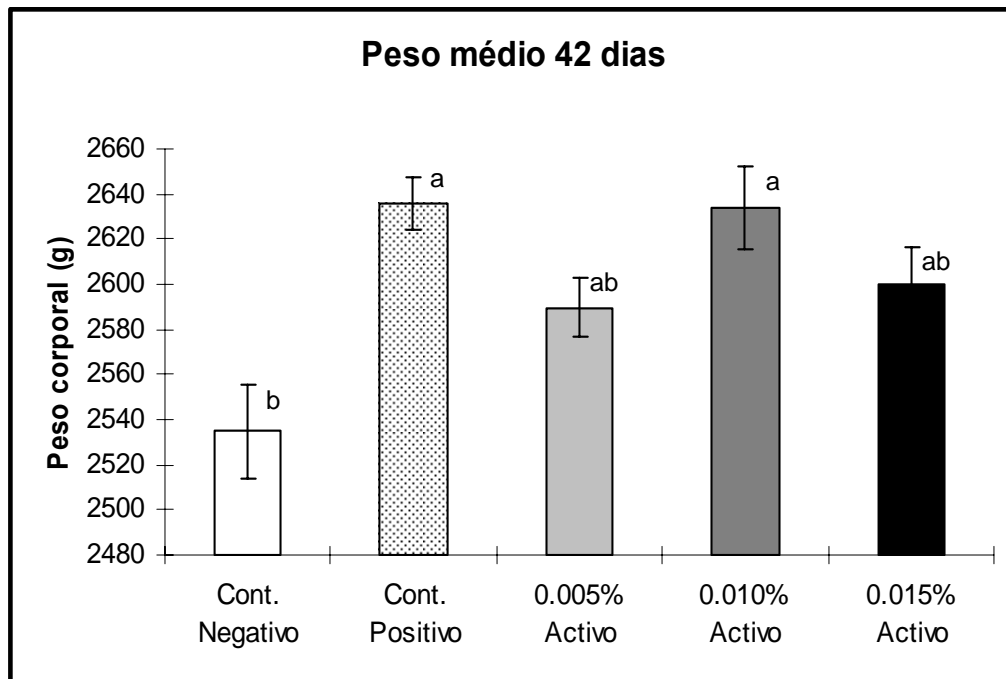
APÊNDICE D – Efeito dos tratamentos sobre o peso corporal

Figura 7 – Peso corporal de frangos de corte, aos 42 dias de idade, que receberam ração sem aditivos (Cont. Negativo), ração com promotores de crescimento antibióticos (Cont. Positivo) ou com óleos essenciais de orégano, sálvia, alecrim e extrato aquoso de pimenta malagueta, nas doses de 50 (0.005% Activo), 100 (0.010% Activo) e 150 ppm (0.015% Activo). Letras diferentes acima das barras representam diferença estatística; a>b – Teste de Tukey ($P < 0,05$).

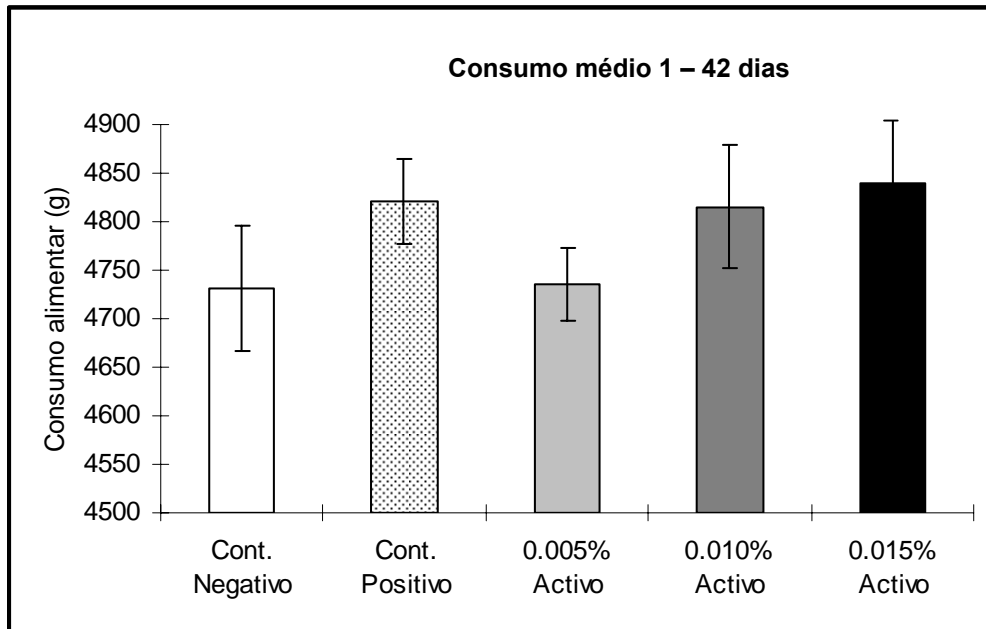
APÊNDICE E – Efeito dos tratamentos sobre o consumo alimentar

Figura 8 – Consumo alimentar médio de frangos de corte, durante os 42 dias de vida, que receberam ração sem aditivos (Cont. Negativo), ração com promotores de crescimento antibióticos (Cont. Positivo) ou com óleos essenciais de orégano, sálvia, alecrim e extrato aquoso de pimenta malagueta, nas doses de 50 (0.005% Activo), 100 (0.010% Activo) e 150 ppm (0.015% Activo).