



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA
SALUD ANIMAL

**“USO DE UNA COMBINACIÓN DE ÁCIDOS ORGÁNICOS Y
CURCUMINA EN PREMEZCLAS COMO REEMPLAZO A LOS
ANTIBIÓTICOS EN POLLOS DE ENGORDA”**

T E S I S

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO ACADÉMICO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS**

PRESENTA:

DANIEL HERNÁNDEZ PATLÁN

TUTOR PRINCIPAL:

**DRA. RAQUEL LÓPEZ ARELLANO
UNAM, FES-CUAUTITLÁN**

COMITÉ TUTORAL:

**PhD. GUILLERMO TÉLLEZ ISAÍAS
UNIVERSITY OF ARKANSAS, DEP. OF POULTRY SCIENCE**

**DR. JESÚS ABRAHAM MÉNDEZ ALBORES
UNAM, FES-CUAUTITLÁN**

CUAUTITLÁN IZCALLI,

AGOSTO

ESTADO DE MÉXICO 2019





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

ÍNDICE

RESUMEN	IV
ABSTRACT	VII
LISTA DE TABLAS	X
LISTA DE FIGURAS	X
LISTA DE ABREVIATURAS	XI
I. INTRODUCCIÓN	1
1.1. ANTIBIÓTICOS	2
1.2. USO DE ANTIBIÓTICOS COMO PROMOTORES DE CRECIMIENTO	4
1.2.1. MECANISMO DE ACCIÓN	5
1.2.2. RIESGOS POR EL USO DE ANTIBIÓTICOS PROMOTORES DE CRECIMIENTO	7
1.2.3. USO TERAPÉUTICO DE LOS ANTIBIÓTICOS	8
1.3. USO PROFILÁCTICO Y METAFILÁCTICO DE LOS ANTIBIÓTICOS	9
1.4. RESISTENCIA BACTERIANA	10
1.4.1. MECANISMOS DE RESISTENCIA A LOS ANTIBIÓTICOS	11
1.5. RUTAS DE TRANSMISIÓN DE RESISTENCIA A LOS ANTIBIÓTICOS	14
1.6. BACTERIAS DE IMPORTANCIA EN AVICULTURA	15
1.6.1. <i>SALMONELLA</i>	16
1.6.2. <i>CLOSTRIDIUM</i>	17
1.7. ALTERNATIVA AL USO DE ANTIBIÓTICOS	18
1.7.1. ÁCIDO ASCÓRBICO	20
1.7.2. CURCUMINA	23

1.7.3. ÁCIDO BÓRICO.....	25
II. JUSTIFICACIÓN.....	27
III. HIPÓTESIS.....	29
IV. OBJETIVOS	30
4.1. OBJETIVO GENERAL.....	30
4.2. OBJETIVOS PARTICULARES	30
V. PRODUCTIVIDAD: PUBLICACIONES GENERADAS	31
VI. ARTÍCULO 1.....	32
“COMPARISON OF PRESTOBLUE® AND PLATING METHOD TO EVALUATE ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF ASCORBIC ACID, BORIC ACID AND CURCUMIN IN AN IN VITRO GASTROINTESTINAL MODEL”	32
VII. ARTÍCULO 2.....	41
“EVALUATION OF A SOLID DISPERSION OF CURCUMIN WITH POLYVINYLPIRROLIDONE AND BORIC ACID AGAINST <i>SALMONELLA</i> ENTERITIDIS INFECTION AND INTESTINAL PERMEABILITY IN BROILER CHICKENS: A PILOT STUDY”	41
VIII. ARTÍCULO 3.....	52
“EVALUATION OF THE ANTIMICROBIAL AND INTESTINAL INTEGRITY PROPERTIES OF BORIC ACID IN BROILER CHICKENS INFECTED WITH <i>SALMONELLA</i> ENTERITIDIS: PROOF OF CONCEPT”	52
IX. ARTÍCULO 4.....	60
“EVALUATION OF THE DIETARY SUPPLEMENTATION OF A FORMULATION CONTAINING ASCORBIC ACID AND A SOLID DISPERSION OF CURCUMIN WITH BORIC ACID AGAINST <i>SALMONELLA</i> ENTERITIDIS AND NECROTIC ENTERITIS IN BROILER CHICKENS”	60
X. ARTÍCULO 5.....	74

“COMPARISON OF THE EFFECT OF ASCORBIC ACID AND CURCUMIN FORMULATED IN A SOLID DISPERSION ON THE PREVENTION AND TREATMENT OF SALMONELLA ENTERITIDIS INFECTION IN BROILER CHICKENS”	74
XI. DISCUSIÓN	95
11.1. ARTÍCULO 1: “COMPARISON OF PRESTOBLUE® AND PLATING METHOD TO EVALUATE ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF ASCORBIC ACID, BORIC ACID AND CURCUMIN IN AN IN VITRO GASTROINTESTINAL MODEL”	96
1.2. ARTÍCULO 2: “EVALUATION OF A SOLID DISPERSION OF CURCUMIN WITH POLYVINYLPIRROLIDONE AND BORIC ACID AGAINST <i>SALMONELLA</i> ENTERITIDIS INFECTION AND INTESTINAL PERMEABILITY IN BROILER CHICKENS: A PILOT STUDY”	98
1.3. ARTÍCULO 3: “EVALUATION OF THE ANTIMICROBIAL AND INTESTINAL INTEGRITY PROPERTIES OF BORIC ACID IN BROILER CHICKENS INFECTED WITH <i>SALMONELLA</i> ENTERITIDIS: PROOF OF CONCEPT”	100
1.4. ARTÍCULO 4: “EVALUATION OF THE DIETARY SUPPLEMENTATION OF A FORMULATION CONTAINING ASCORBIC ACID AND A SOLID DISPERSION OF CURCUMIN WITH BORIC ACID AGAINST <i>SALMONELLA</i> ENTERITIDIS AND NECROTIC ENTERITIS IN BROILER CHICKENS”	102
1.5. ARTÍCULO 5: “COMPARISON OF THE EFFECT OF ASCORBIC ACID AND CURCUMIN FORMULATED IN A SOLID DISPERSION ON THE PREVENTION AND TREATMENT OF SALMONELLA ENTERITIDIS INFECTION IN BROILER CHICKENS”	105
XII. CONCLUSIONES	108
XIII. REFERENCIAS	110
ANEXO	127

RESUMEN

En el presente estudio se investigó la actividad antimicrobiana del ácido ascórbico (AA), ácido bórico (BA), curcumina (CUR), y sus combinaciones como reemplazo de los antibióticos en pollos de engorda. En primer lugar, se desarrolló un método fluorométrico utilizando PrestoBlue® como colorante y se comparó con un método convencional para determinar la actividad antimicrobiana de AA, BA, CUR, y sus combinaciones a una concentración del 1% (p/p) en el alimento contra *Salmonella* Enteritidis (SE) en un modelo de digestión aviar *in vitro* que simula el buche, proventrículo e intestino (Hernandez-Patlan et al., 2018a). Los resultados de este estudio mostraron que el AA fue el tratamiento más efectivo en el compartimiento que simula el buche, mientras que el BA en el compartimiento intestinal. Además, se observó que podría haber un efecto bactericida antagonista entre AA-CUR y AA-BA, así como un efecto bactericida sinérgico entre CUR-BA. Estas interacciones se confirmaron posteriormente mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC) y espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR).

Posteriormente, se preparó una dispersión sólida de CUR con polivinilpirrolidona K30 (CUR/PVP) en una proporción 1:9 para aumentar la solubilidad de la CUR, así como sus posibles efectos. Aunque la CUR/PVP aumentó significativamente la solubilidad de la CUR con respecto a la CUR materia prima, los ensayos de permeabilidad en células Caco-2 mostraron un aumento significativo en la permeabilidad, lo que sugiere una mejora en los efectos locales y sistémicos. Por lo tanto, considerando el aumento en la solubilidad de la CUR y sus interacciones con los otros compuestos, se realizaron experimentos *in vivo* para evaluar el efecto profiláctico del BA, CUR/PVP y BA-CUR/PVP a concentraciones de 0.1% (p/p) en la alimentación contra infecciones de SE en pollos de engorda, así como la evaluación de la salud intestinal mediante la determinación de inmunoglobulina A (IgA), superóxido dismutasa (SOD) y la absorción de dextran marcado con isotiocianato de fluoresceína (FITC-d, 3-5 kDa). En este estudio, la administración de BA-CUR/PVP fue el

único tratamiento que disminuyó significativamente la concentración de SE tanto en el buche como en los ciegos, mientras que CUR/PVP solo en los ciegos. Además, CUR/PVP redujo significativamente la permeabilidad intestinal de FITC-d, y la IgA intestinal total en comparación con los pollos no tratados y BA-CUR/PVP mostró una reducción significativa de la superóxido (SOD) dismutasa sérica (Hernandez-Patlan et al., 2018b).

Además, se evaluó el efecto antimicrobiano del BA sobre la colonización de SE, la permeabilidad intestinal, los niveles de IgA intestinal total y la composición de la microbiota cecal en pollos de engorda (Hernandez-Patlan et al., 2019a). Los resultados mostraron que en el día 10 posterior al desafío con SE, la concentración de SE en el buche y los ciegos disminuyó significativamente en el grupo de BA en comparación con el grupo control. Además, los pollos tratados con 0.1% de BA tuvieron una reducción significativa en la concentración de FITC-d y menores niveles de IgA intestinal total en comparación con el grupo control. En el análisis de la microbiota, sólo la abundancia del filo Actinobacteria fue significativamente menor en el grupo de BA en comparación con el grupo control y también se observó diferencia significativa en la diversidad beta entre los grupos. Estos resultados sugieren que el BA podría mantener la homeostasis intestinal, así como el equilibrio en la microbiota debido a su efectividad en el control de infecciones por SE.

Con base en los resultados anteriores, también se evaluó el efecto de la administración profiláctica o terapéutica de una mezcla de AA y una dispersión sólida de CUR con PVP y BA (AA-CUR/PVP-BA) al 0.1% en pollos de engorda infectados con SE o en un modelo de desafío de laboratorio de enteritis necrótica (NE) (Hernandez-Patlan et al., 2019b). La administración profiláctica o terapéutica de 0.1% de AA-CUR/PVP-BA redujo significativamente la concentración de SE en pollos de engorda, así como la concentración sérica de FITC-d y los niveles totales de IgA intestinal fueron significativamente más bajos cuando se administró terapéuticamente 0.1% de AA-CUR/PVP-BA. Además, la administración de 0.1% AA-CUR/PVP-BA disminuyó ligeramente del impacto negativo de NE. Sin embargo, 0.1% de AA-CUR/PVP-BA mostró un mejor efecto en la reducción de la concentración de SE en comparación con el modelo de NE.

Finalmente, se evaluó y comparó el efecto de dos antioxidantes naturales, AA o CUR/PVP, en la prevención o tratamiento de infecciones por SE en pollos de engorda (datos aún no publicado). La suplementación dietética con AA en el experimento de prevención de infección por SE demostró ser más efectiva para reducir los recuentos de SE en el buche que en los sacos ciegos. En contraste, CUR/PVP redujo significativamente los recuentos de SE sólo en los ciegos. Por otro lado, sólo la administración de AA durante 10 días para tratar infecciones de SE en pollos de engorda fue capaz de reducir los recuentos de SE. Por lo tanto, los resultados de este estudio sugieren que mientras la CUR fue más efectiva en la prevención de infecciones por SE en los pollos de engorda, mientras que el AA fue mejor para el control de SE.

Los resultados generales del presente estudio sugieren que el uso de aditivos como el AA, BA, CUR y especialmente la combinación de CUR con BA pueden ser alternativas potenciales y viables al uso de antibióticos en la producción avícola con el propósito de prevenir y tratar infecciones bacterianas y de esta manera reducir el uso irracional de ciertos antibióticos.

ABSTRACT

The present study was conducted to investigate the antimicrobial activity of ascorbic acid (AA), boric acid (BA), curcumin (CUR), and their combinations as a replacement to antibiotics in broiler chickens. Firstly, a fluorometric method was developed using PrestoBlue® as a dye and compared with a conventional method to determine the antimicrobial activity of AA, BA, CUR, and their combinations at a concentration of 1% into the feed against *Salmonella* Enteritidis (SE) in an avian *in vitro* digestion model that simulates the crop, proventriculus and intestine (Hernandez-Patlan et al., 2018a). The results of this study showed that AA was the most effective treatment in the crop compartment and BA in the intestinal compartment. Furthermore, it was observed that there could be an antagonistic bactericidal effect between AA-CUR and AA-BA and a synergistic bactericidal effect between CUR-BA. These interactions were subsequently confirmed by differential scanning calorimetry (DSC) and Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR).

Afterward, a solid dispersion of CUR with polyvinylpyrrolidone K30 (CUR/PVP) at a 1:9 ratio was prepared in order to increase the solubility of CUR, as well as its possible effects. Although CUR/PVP significantly increased the solubility of CUR with respect to CUR alone, the permeability assays in Caco-2 cells showed a slight but significant increase in the permeability, suggesting an improvement in the local and systemic effects. Therefore, considering the increase in solubility of CUR and its interactions with the other compounds, *in vivo* experiments were conducted to evaluate the prophylactic effect of BA, CUR/PVP, and BA-CUR/PVP at concentrations of 0.1% into the feed against SE infections in broiler chickens as well as intestinal health through the determination of IgA, SOD and serum fluorescein isothiocyanate dextran (FITC-d, 3-5 kDa) concentration. In this study, BA-CUR/PVP administration was the only treatment that significantly decreased the concentration of SE in crop whereas in cecal tonsils (CT) CUR/PVP and BA-CUR/PVP. Furthermore, CUR/PVP significantly reduced the intestinal permeability of FITC-d, and total

intestinal IgA when compared to the control non-treated chickens and CUR/PVP-BA showed significant reduction of serum superoxide (SOD) dismutase (Hernandez-Patlan et al., 2018b).

Furthermore, the antimicrobial effect of BA on SE colonization, intestinal permeability, total intestinal IgA levels, and cecal microbiota composition in broiler chickens was evaluated (Hernandez-Patlan et al., 2019a). The results showed that on day 10 post-SE challenge, the concentration of SE in crop and CT significantly decreased in the BA group compared to the control group. Furthermore, chickens treated with 0.1% BA had a significant reduction in serum FITC-d concentration and lower total intestinal IgA levels when compared to the control group. Interestingly, in the microbiota analysis, only the abundance of Actinobacteria phylum was significantly lower in the BA group in comparison with the control group and significant differences in beta diversity were also observed between comparing groups. These results suggest that BA could maintain intestinal homeostasis, as well as the balance in the microbiota due to its effectiveness in controlling *S. Enteritidis* infection.

Considering the previous results, the effect of the prophylactic or therapeutic administration of a 0.1% mixture containing AA and a solid dispersion of CUR with PVP and BA (AA-CUR/PVP-BA) in broiler chickens infected with *S. Enteritidis*, as well as the impact of the dietary administration of 0.1% AA-CUR/PVP-BA in broilers using a laboratory necrotic enteritis (NE) challenge model were also evaluated (Hernandez-Patlan et al., 2019b). The prophylactic or therapeutic administration of 0.1% AA-CUR/PVP-BA significantly reduced the concentration of *S. Enteritidis* in broiler chickens. Likewise, the serum FITC-d concentration and total intestinal IgA levels were significantly lower when 0.1% AA-CUR/PVP-BA was therapeutically administrated. Furthermore, dietary administration of 0.1% AA-CUR/PVP-BA had a positive effect in slightly diminishing the negative impact of NE. However, 0.1% AA-CUR/PVP-BA showed a better effect in reducing the concentration of SE when compared to the NE model.

Finally, in the fifth research paper, the effect of two natural antioxidants, AA or a solid dispersion of CUR (SD-CUR), in preventing or treating SE infection in broiler chickens was

evaluated and compared (data not yet published). Dietary AA supplementation in the SE infection prevention experiment demonstrated to be more effective in reducing the SE counts in crop than CT. In contrast, SD-CUR significantly reduced SE counts only in CT. On the other hand, only the administration of AA for 10 days to treat SE infections in broiler chickens was capable to reduce SE counts. Therefore, the results of this study suggest that while CUR was to more effective in preventing SE infections in broilers, AA was better in the SE control.

The overall results of the present study suggest that the use of additives such as ascorbic AA, BA, CUR and especially the combination of CUR with BA can be potential and viable alternatives to the use of antibiotics in poultry production with the purpose of preventing and treating bacterial infections and thus reduce the irrational use of certain antibiotics.

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Clases de antibióticos, mecanismos de acción, espectro de actividad y algunas características.....	3
Tabla 2. Acumulación intrafagocítica de antibióticos que pueden conducir a la inhibición del proceso inflamatorio y su relación con el uso de los antibióticos como promotores de crecimiento.....	6
Tabla 3. Mecanismos de resistencia a los antibióticos	11
Tabla 4. Alternativas al uso de antibióticos en producción animal.	19

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Desarrollo de la resistencia microbiana a los antibióticos.	7
Figura 2. Escenarios que pueden presentarse durante el transporte genético que se produce cuando las bacterias migran de los animales a los humanos.	13
Figura 3. Vías de transmisión de resistencia a los antibióticos.	14
Figura 4. Estructura del ácido ascórbico (AA) y reacción de oxidación en la que se convierte en dehidroascórbico (AD).....	20
Figura 5. Estructura química de la curcumina.	23
Figura 6. Estructura del ácido bórico.....	25

LISTA DE ABREVIATURAS

AA	Ácido ascórbico
AD	Ácido deshidroascórbico
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AI	Ácidos Inorgánicos
AI-2	Autoinductor-2
AO	Ácidos orgánicos
APC	Antibióticos promotores de crecimiento
BA	Ácido bórico
BA	Ácido bórico
BT	Translocación bacteriana
BW	Peso corporal
BWG	Ganancia de Peso corporal
CFU	Unidades formadoras de colonias
CO ₂	Dióxido de carbono
CP	Clostridium perfringens
CT o CCT	Ciegos
CUR	Curcumina
CUR/PVP	Dispersión sólida de CUR con polivinilpirrolidona K30
DSC	Calorimetría diferencial de barrido
EM	Eimeria maxima
EUA	Estados Unidos de América
FITC-d	Dextran marcado con isotiocianato de Fluoresceína

FTIR	Espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier
IFN- γ	Interferón-gamma
IgA	Inmunoglobulina A
IL	Interleucinas
ILS	Lesiones en íleon
LPS	Lipopolisacáridos
NC	Control negativo
NE	Enteritis necrótica
PC	Control positivo
PVP	Polivinilpirrolidona K30
RNS	Especies reactivas de nitrógeno
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SAGARPA	Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación
SD-CUR	Dispersión sólida de curcumina
SE	<i>Salmonella</i> Enteritidis
SENASICA	Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria
SOD	Superóxido dismutasa
ST	<i>Salmonella</i> Typhimurium
TAB	Bacterias aerobias totales
TNF- α	Factor de necrosis tumoral alfa
TNF- α	Factor de necrosis tumoral alfa
UE	Unión Europea
UI	Unidades internacionales

I. INTRODUCCIÓN

Desde el descubrimiento y aplicación de la penicilina en 1940, los antibióticos han desempeñado un papel sin precedentes en la prevención, control y tratamiento de enfermedades infecciosas tanto en humanos como en animales (Cheng et al., 2014). Sin embargo, en producción animal también han sido utilizados a dosis subterapéuticas. Se estima que el consumo de antibióticos en producción animal es de 100 a 1000 veces mayor que el usado en medicina humana, y aproximadamente el 90% se utilizan a dosis subterapéuticas y con fines profilácticos, mientras que el 10% restante a dosis terapéuticas (Mehndiratta and Bhalla, 2014).

La inclusión de los antibióticos a dosis subterapéuticas en el alimento se generalizó a principios de la década de 1950, tanto en la Unión Europea (UE) como en los Estados Unidos de América (EUA) puesto que podían ser utilizados para prevenir enfermedades e influir positivamente en la promoción de crecimiento y la eficiencia alimenticia de los animales (Allen et al., 2013; Huyghebaert et al., 2011; Van Boeckel et al., 2015).

No obstante, en las últimas décadas, estas prácticas han cambiado considerablemente debido principalmente a la preocupación del incremento de bacterias resistentes a los antibióticos, las cuales pueden transmitirse zoonóticamente de los animales a los humanos, y provocar serios problemas en salud pública e incluso la muerte a causa del fracaso del antibiótico a dosis terapéuticas (Zaman et al., 2017).

Por consiguiente, una de las medidas que se tomaron derivadas de los problemas de resistencia bacteriana fue la restricción de los antibióticos a dosis subterapéuticas en la UE en 2006 (EPC, 2005), EUA en 2017 (Editors, 2017), y aunque en México no se han prohibido oficialmente, la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA), a través de su órgano administrativo desconcentrado, el Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA) ha

promovido iniciativas para evitar su uso desde 2012 (DOF, 2013, 2018; SENASICA, 2015; Zaidi et al., 2015). Sin embargo, como consecuencia de esta medida se ha incrementado significativamente el uso de los antibióticos, pero a dosis terapéuticas para controlar y prevenir enfermedades, lo cual pudiera provocar un escenario más serio de resistencia bacteriana (Borck Høg et al., 2016; Founou et al., 2016; Hao et al., 2014; Marshall and Levy, 2011). En este contexto, en el plan de acción europeo de salud contra la resistencia a los antimicrobianos se pide eliminar gradualmente el uso profiláctico (preventivo) y metafiláctico (controlar) de rutina de los antimicrobianos en producción animal e invertir en investigación de nuevas alternativas (European Parliament, 2018), ya que pudieran llegar a regularse en los próximos años.

En este sentido, la industria avícola se ha visto presionada para buscar e investigar nuevas alternativas para reducir los problemas de resistencia bacteriana, prevenir y controlar enfermedades, disminuir la tasa de mortalidad, y por último promover el crecimiento de los animales. Entre estas alternativas, las más populares son los probióticos (levaduras o bacterias), derivados de plantas como aceites esenciales o extractos, ácidos orgánicos (AO) e inorgánicos (AI), enzimas, lisozimas y moléculas de origen microbiano como extractos de levadura y péptidos antimicrobianos (Caly et al., 2015). Por lo tanto, el uso del ácido ascórbico, ácido bórico, curcumina y sus combinaciones administrados en conjunto con el alimento pueden ser una opción al reemplazo de los antibióticos en pollos de engorda principalmente para el tratamiento y la prevención de enfermedades, así como la promoción de crecimiento en segundo término.

1.1. ANTIBIÓTICOS

Los antibióticos son compuestos químicos producidos por diferentes microorganismos (bacterias y hongos, entre otros) o sintetizados en el laboratorio. Éstos difieren en cuanto a sus propiedades físicas, químicas y farmacológicas, así como en su mecanismo de acción y espectro antimicrobiano (**Tabla 1**).

Tabla 1. Clases de antibióticos, mecanismos de acción, espectro de actividad y algunas características.

Clase de antibiótico	Síntesis	Mecanismo bactericida	Espectro de actividad	Características
Aminoglucósidos	<i>Streptomyces</i> spp.	(1)	Gram (-)	Niveles nulos o bajos en sangre, pero inhiben el recrecimiento bacteriano debido a la unión fuerte e irreversible al ribosoma.
Bambermicina	<i>Streptomyces bambergiensis</i>	(2)	Gram (+), excepto <i>Lactobacillus</i> y <i>Bifidobacterium</i>	Se utiliza como aditivo en el alimento para promover el crecimiento.
Betalactámicos	Origen fúngico	(2)	Gram (-) / Gram (+)	Inestable en condiciones ácidas. Muchas bacterias producen lactamasas que rompen el enlace cíclico de la estructura química.
Cefalosporinas	Hongos <i>Acremonium</i>	(2)	Gram (-) / Gram (+)	Menos susceptible a la penicilina que a los betalactámicos. Estable en condiciones ácidas.
Glicopéptidos	Sintetizados químicamente	(3)	Enterococos Gram (+)	En 1997, la FDA prohibió el uso de todos los glucopéptidos en animales de consumo.
Ionóforos	Sintetizados químicamente	(6)	<i>Parasitic coccidia</i>	Algunos coccidiostatos son convertidos por las bacterias en arsénico inorgánico.
Lincosamidas	<i>Streptomyces lincolnensis</i>	(1)	Cocos Gram (+)	Pueden difundirse a los tejidos, por lo que son útiles para el tratamiento de infecciones óseas y articulares. Además, son eficaces para tratar la enteritis necrótica.
Macrólidos	Producido por bacterias	(1)	Gram (+)	Eficaz contra micoplasma.
Polipéptidos	Hongos, bacterias y plantas	(5)	Bacilos, incluyendo <i>E. coli</i> y <i>Pasteurella</i>	Incluyendo a la Bacitracina, ya no están aprobado para su uso en dosis subterapéuticas.
Quinolonas	Sintetizados químicamente	(7)	Gram (-) / Gram (+)	FDA prohibió su uso en aves de corral en 2005 como profilácticos.
Sulfonamidas	Sintetizados químicamente	(4)	Gram (-) / Gram (+)	Utilizado para el tratamiento de tifoidea aviar.
Estreptograminas	<i>Streptomyces</i> spp.	(1 y 2)	Bacterias anaeróbicas	Promotores de crecimiento (virginiamicina)
Tetraciclinas	<i>Streptomyces</i> spp.	(1)	Gram (-) / Gram (+)	Se pueden usar para tratar enfermedades causadas por bacterias resistentes a la vancomicina

Dentro de los mecanismos de acción bactericidas se incluye la inhibición de (1) la síntesis de proteínas; (2) síntesis de la pared celular; (3) Síntesis de peptidoglicano; (4) enrollamiento de ADN, así como la síntesis de ADN y ARN; o (5) síntesis de la membrana citoplásmica. Además, (6) alteración en la permeabilidad, y (7) daño a DNA (Díaz-Sánchez et al., 2015).

Los antibióticos se utilizan en producción avícola no sólo para controlar, tratar y prevenir enfermedades; sino también para promover el crecimiento y/o eficiencia alimenticia en los animales. Mientras que el uso de los antibióticos a dosis terapéuticas está asociado con el control y tratamiento de enfermedades en animales de consumo humano, la promoción de crecimiento se logra con dosis subterapéuticas administradas durante tiempos prolongados. Aunque se ha visto que el uso de los antibióticos a dosis subterapéuticas produce cierta profilaxis (prevención), para la prevención de enfermedades es muy importante que las dosis sean adecuadas (generalmente terapéuticas) y administradas por periodos de tiempo limitado pero generalmente largos; sin embargo, no más que para la promoción de crecimiento (Codex Alimentarius, 2005; Mund et al., 2017).

1.2. USO DE ANTIBIÓTICOS COMO PROMOTORES DE CRECIMIENTO

Los antibióticos promotores de crecimiento (APC) son antibióticos que se han asociado en conjunto con el alimento de las aves de forma continua a dosis subterapéuticas (10-100 veces menores a las terapéuticas) con la finalidad de mejorar la producción de carne a través de una mayor conversión alimenticia, promoción de la tasa de crecimiento y prevención de enfermedades (Mehdi et al., 2018). Además, se ha reportado que mejoran el estado inmunológico de los pollos de engorda, controlan las infecciones gastrointestinales y modifican la microbiota intestinal (Lee et al., 2012). Algunos de los antibióticos más frecuentemente utilizados con el propósito de promover el crecimiento en aves incluyen: bacitracina, penicilina, virginiamicina, flavomicina, clortetraciclina, oxitetraciclina, sulfato de colistina, doxiciclina, eritromicina, aureomicina, avilamicina, tiamulina, furazolidona, lincomicina, enrofloxacina y sulfato de neomicina (Dhama et al., 2014).

1.2.1. MECANISMO DE ACCIÓN

El mecanismo de cómo los APC favorecen el crecimiento de las aves aún sigue sin estar claro. Sin embargo, las siguientes hipótesis son las más concurridas y están basadas principalmente en las interacciones entre los antibióticos y la microbiota intestinal (Butaye et al., 2003; Dibner and Richards, 2005; Gaskins et al., 2002):

1. Mejoran la absorción de nutrientes por el adelgazamiento de la pared intestinal y vellosidades, así como la reducción del tamaño del intestino a causa de la disminución de la proliferación celular de la mucosa debido a la falta de ácidos grasos de cadena corta en el lumen, los cuales son producidos a través de la fermentación microbiana.
2. Limitan el uso de nutrientes por las bacterias.
3. Disminuyen el número de bacterias y toxinas bacterianas.
4. Modifican la microflora intestinal de las aves, pero mantienen el equilibrio óptimo entre las bacterias Gram (-) y Gram (+).
5. Reducen la incidencia de infecciones subclínicas por la modulación directa del sistema inmunológico.

Aunque las hipótesis anteriores son válidas, se ha demostrado en diversos estudios que el principal mecanismo de acción de los APC está relacionado con su efecto antiinflamatorio antes que su actividad antimicrobiana y los cambios de la microbiota serían una consecuencia de los cambios a nivel intestinal (Menconi et al., 2014), los cuales también tienen un efecto favorable en la prevención de ciertas enfermedades.

Muchos antibióticos han demostrado que ejercen efecto sobre los leucocitos específicamente neutrófilos y se ha comprobado que algunos de estos agentes alteran los procesos inflamatorios por acumulación en células inflamatorias e inhibición de células fagocitarias (macrófagos y polimorfonucleares), ya que la concentración extracelular de los antibióticos administrados a dosis subterapéuticas es muy baja para ejercer un efecto antimicrobiano. La

mayoría de los antibióticos acumulados aumentan su efectividad intracelular contra bacterias y pueden inhibir una parte de la respuesta inmune innata. Las células fagocíticas pueden acumular concentraciones de antibióticos de 10 a 100 veces más altas que a nivel extracelular pudiendo atenuar la respuesta inflamatoria y como consecuencia, los niveles de citocinas proinflamatorias son bajos. El mecanismo de acumulación intracelular no es claro, pero exhibe características de un proceso activo (mediado por una proteína). La acumulación de los antibióticos se presenta en el citoplasma y en los neutrófilos, lo cual favorece la liberación de éstos en las bacterias fagocitadas por los leucocitos (Niewold, 2007; Rubin and Tamaoki, 2005).

Se ha descrito que los APC pueden dividirse en tres grupos en función de su interacción con las células inflamatorias: 1) Antibióticos no acumulados en células encargadas de los procesos inflamatorios, 2) Antibióticos que se acumulan, pero no inhiben los procesos inflamatorios y 3) Antibióticos que se acumulan e inhiben los procesos inflamatorios (**Tabla 2**). Se han demostrado que los APC inhiben una o más de varias funciones de las células inflamatorias, el quimiotaxis, la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y la producción de citocinas proinflamatorias (Niewold, 2007).

Tabla 2. Acumulación intrafagocítica de antibióticos que pueden conducir a la inhibición del proceso inflamatorio y su relación con el uso de los antibióticos como promotores de crecimiento.

Antibiótico	Acumulación intracelular (C:E)*	Inhibición de función Fagocítica	Uso de APC (Pasado y presente)
Cloranfenicol	4	No	No
β-Lactámicos	<1	No/Algunos/Limitados	No/Algunos/Limitados
Ciclinas	2	Si	Si
Quinolonas	5	No	No
Macrólidos	10-100	Si	Si
Estreptograminas (péptidos)	40	Si	Si
Otros (Bacitracina)	-	Si	Si

* *Proporción C:E = concentración celular: extracelular*

1.2.2. RIESGOS POR EL USO DE ANTIBIÓTICOS PROMOTORES DE CRECIMIENTO

El uso de APC para la prevención de enfermedades y promoción del crecimiento en los animales de consumo ha provocado el desarrollo y propagación de la resistencia bacteriana. Aunque varios factores son responsables de este problema, el más importante es el proceso de selección de bacterias resistentes debido al uso irracional de los antibióticos (Mehndiratta and Bhalla, 2014).

Cada vez que se consume un antibiótico, éste elimina las bacterias susceptibles, sobreviviendo solamente aquellas resistentes. Posteriormente, las bacterias resistentes se multiplican y transmiten sus características genéticas a la descendencia (**Figura 1**) (Founou et al., 2016). Se ha demostrado que las granjas avícolas que utilizan APC principalmente con fines de crecimiento tienen bacterias más resistentes en la flora intestinal que aquellas en las que no se utilizan (Marshall and Levy, 2011).

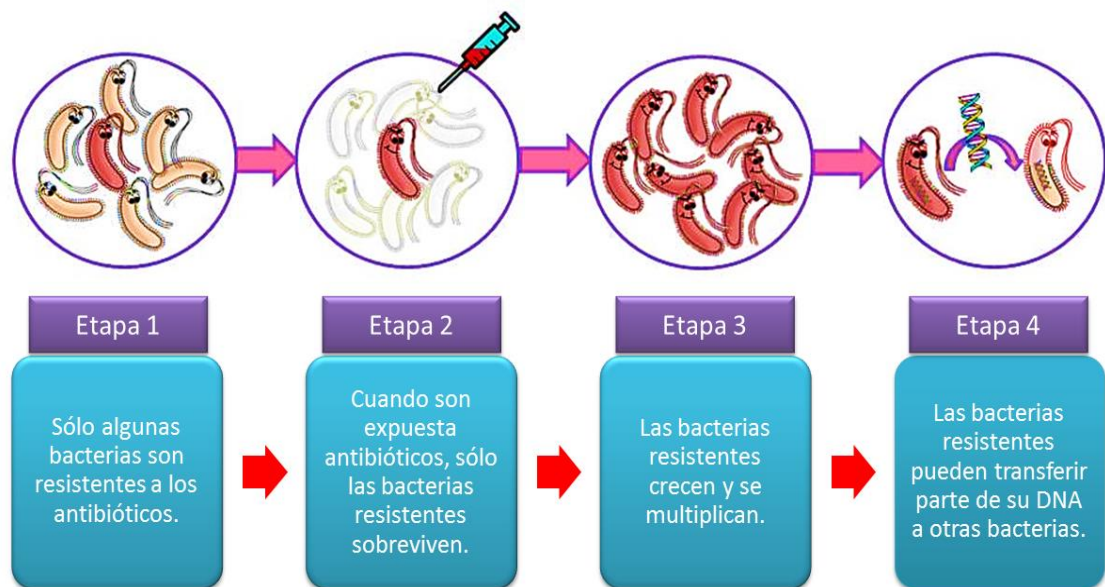


Figura 1. Desarrollo de la resistencia microbiana a los antibióticos.

Además, los largos periodos de administración de los antibióticos a dosis subterapéuticas a través del alimento o agua de bebida también han conducido a niveles altos de residuos en productos avícolas como en la carne y el huevo (Jaiswal et al., 2017), provocando diversos efectos adversos en la salud humana, tales como reacciones de hipersensibilidad, efectos tóxicos, hepatotoxicidad, nefropatía, mutagenicidad, carcinogenicidad y resistencia bacteriana (Founou et al., 2016). Si bien la preocupación asociada con la presencia de residuos de antibióticos en animales y sus derivados se ha mitigado principalmente en la UE debido a la legislación vigente, sigue siendo una amenaza importante para la salud pública en países subdesarrollados, con prevalencias que van del 4 al 90% (Mensah et al., 2014).

Otro de los riesgos derivados de la aplicación continua de los antibióticos a dosis subterapéuticas o promotores de crecimiento (APC) es la supresión de la microbiota normal sensible en el tracto gastrointestinal como los saprofitos, comensales, bacterias no patógenas, hongos y levaduras, lo que puede provocar la deficiencia de vitaminas B y K. Contrariamente, también se podría promover el crecimiento de algunas bacterias del género *Proteus* y *Pseudomona*; así como de *Aspergillus* y *Candida albicans*, aumentando su patogenicidad (Dhama et al., 2014).

1.2.3. USO TERAPÉUTICO DE LOS ANTIBIÓTICOS

La producción intensiva de animales dada la creciente demanda de alimentos ha provocado que las enfermedades bacterianas y parasitarias sean cada vez más frecuentes. Además, con la restricción del uso de los antibióticos a dosis subterapéuticas se ha incrementado la incidencia de patógenos como *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp., *Clostridium* spp., y *E. coli* O157:H7 en el intestino animal, así como en productos alimenticios y medio ambiente, aumentando la posibilidad de que los humanos sean infectados por estos patógenos (Hao et al., 2014).

En este sentido, otro de los problemas derivado de la restricción del uso de los antibióticos a dosis subterapéuticas es el incremento significativo del uso de los antibióticos a dosis terapéuticas con el propósito de controlar enfermedades y mantener sanos a los animales (Borck Høg et al., 2016). Sin embargo, esta práctica puede contribuir a un peor escenario de resistencia a los antibióticos tanto en humanos como en animales ya que se ha reportado que hasta antes de la restricción de los APC, los casos de bacterias resistentes de algunos géneros como *Enterococcus* no eran comunes (Hao et al., 2014).

1.3. USO PROFILÁCTICO Y METAFILÁCTICO DE LOS ANTIBIÓTICOS

Originalmente, la metafilaxis (control de enfermedades) fue definida de la misma manera que la profilaxis (prevención de enfermedades) con la única diferencia de que la profilaxis se aplicaba a los individuos y la metafilaxis en grupos completos (Urban-Chmiel and Grooms, 2012). Sin embargo, estos conceptos fueron redefinidos, de tal manera que la metafilaxis es la medicación de un grupo de animales, en el cual una parte del grupo fue diagnosticado con alguna enfermedad infecciosa, con el objetivo de prevenir la propagación de la enfermedad a los animales sanos del mismo grupo. El criterio de metafilaxis antimicrobiana ocurre cuando la morbilidad (tasa de animales infectados) supera el 10% durante dos a tres días consecutivos (Baptiste and Kyvsgaard, 2017). En cuanto a la profilaxis, ésta es la medicación de un animal o un grupo de animales, antes de que se presenten los signos clínicos de una enfermedad infecciosa, con el fin de prevenir la aparición de una enfermedad o infección (Baptiste and Kyvsgaard, 2017).

Para el control de enfermedades, las dosis de los antibióticos que se utilizan son terapéuticas y se administran por tiempos relativamente cortos. Contrariamente, la prevención involucra la administración de dosis moderadas del antibiótico durante tiempos largos y específicos, pero no mayores que para la promoción de crecimiento (Mund et al., 2017). Algunas de las razones por las cuales los antibióticos son utilizados para prevenir enfermedades son: 1)

historiales previos de infecciones, 2) altas densidades de población, y 3) cambios en la dieta (Baptiste and Kyvsgaard, 2017).

Sin embargo, el uso excesivo de antibióticos para prevenir enfermedades en los animales se ha convertido en una preocupación creciente, ya que existen pruebas sólidas de que han contribuido significativamente al aumento del desarrollo de bacterias resistentes a los antibióticos. Por tal motivo, la organización mundial de la salud (OMS) recomendó en 2017 dejar de utilizar a los antibióticos con fines de prevención de enfermedades en animales de producción (OMS, 2017). Posteriormente, el Consejo de Ministros de la UE y los representantes del Parlamento Europeo en 2018 acordaron la redacción de un nuevo Reglamento sobre medicamentos veterinarios que pondrá fin a la medicación preventiva de antibióticos en la producción animal. Aunque esta nueva legislación debe ser aprobada formalmente por el Consejo de Ministros, se le ha otorgado ya una aprobación provisional por parte del Consejo y se espera que entre en vigencia a fines de 2021 o principios del 2022 (Parlamento Europeo, 2018).

1.4. RESISTENCIA BACTERIANA

La resistencia a los antibióticos es un problema de salud mundial, derivado principalmente por el uso excesivo de los antibióticos en producción animal. La resistencia a los antibióticos en los sistemas de producción animal se relaciona con bacterias que no son comensales tales como *Escherichia coli*, *Enterococcus* spp., y *Staphylococcus aureus*, así como con patógenos zoonóticos transmitidos por los alimentos como *Salmonella* no tifoidea y *Campylobacter* spp. (Nhung et al., 2017).

El impacto negativo de las bacterias resistentes a los antibióticos no sólo tiene efectos en la salud pública sino que también tiene implicaciones en la producción avícola ya que provoca pérdidas económicas, derivadas del gasto en antibióticos ineficaces y a la disminución de los parámetros productivos (Okuneye et al., 2016).

1.4.1. MECANISMOS DE RESISTENCIA A LOS ANTIBIÓTICOS

La resistencia a los antibióticos se puede facilitar a través de mecanismos como la reducción de la permeabilidad de la membrana externa a través de la disminución de la producción de porinas, la modificación genética del sitio blanco por mutación, la metilación del sitio blanco para evitar la unión de los antibióticos, la inactivación enzimática del fármaco y la sobreexpresión de las bombas de flujo de salida para eliminar el fármaco (**Tabla 3**) (Atterbury et al., 2011).

Tabla 3. Mecanismos de resistencia a los antibióticos

Clase de Antibiótico	Ejemplos	Mecanismos de resistencia
β-Lactámicos	Penicilinas, Cefalosporinas	Hidrólisis, eflujo, alteración del sitio blanco
Aminoglucósidos	Gentamicina, Estreptomina, Epectinomicina	Fosforilación, acetilación, nucleotidilación, eflujo, alteración del sitio blanco
Glicopéptidos	Vancomicina, Teicoplanina	Reprogramación de la biosíntesis de peptidoglicanos.
Tetraciclinas	Minociclina, Tigeciclina	Monooxigenación, eflujo, alteración del sitio blanco
Macrólidos	Eritromicina, Azitromicina	Hidrólisis, glicosilación, fosforilación, eflujo, alteración del sitio blanco
Lincosamidas	Clindamicina	Nucleotidilación, eflujo, alteración del sitio blanco
Estreptograminas	Synercid	Liasa de carbono-oxígeno, acetilación, eflujo, alteración del sitio blanco
Oxazolidinonas	Linezolid	Eflujo, alteración del sitio blanco
Fenicoles	Cloranfenicol	Acetilación, eflujo, alteración del sitio blanco
Quinolones	Ciprofloxacina	Acetilación, eflujo, alteración del sitio blanco
Pirimidinas	Trimetoprima	Eflujo, alteración del sitio blanco

Tabla 3. Mecanismos de resistencia a los antibióticos (Continuación)

Clase de Antibiótico	Ejemplos	Mecanismos de resistencia
Sulfonamidas	Sulfametoxazol	Eflujo, alteración del sitio blanco
Rifamicinas	Rifampicina	ADP-ribosilación, eflujo, alteración del sitio blanco
Lipopéptidos	Daptomicina	Alteración del sitio blanco
Péptidos catiónicos	Colistina	Eflujo, alteración del sitio blanco

Desde el punto de vista molecular que la resistencia bacteriana puede ser intrínseca o adquirida. Mientras que la resistencia intrínseca se produce debido a mutaciones aleatorias en el cromosoma bacteriano y se transmite verticalmente a la progenie, la resistencia extrínseca o adquirida se puede atribuir a mecanismos bacterianos de transferencia horizontal de genes resistentes a los antibióticos (Diarra and Malouin, 2014; Toutain et al., 2016). La propagación de los genes de resistencia a los antibióticos mediante transferencia horizontal de genes se puede llevar a cabo a partir de tres mecanismos: 1) transformación, el ácido desoxirribonucleico (ADN) extracelular es absorbido por células competentes; 2) transducción, la transferencia de genes se facilita a través de bacteriófagos; y 3) conjugación, el ADN se transfiere a través de un contacto físico entre un donante y una célula receptora (von Wintersdorff et al., 2016).

La diseminación de los genes de resistencia mediada por plásmidos a través de la conjugación es la causa principal de la magnitud de esta problemática. Los plásmidos son moléculas de ADN extracromosómico que se replican de manera autónoma y que, de manera inherente, llevan genes que codifican la resistencia a los antibióticos o movilizan estos genes de los cromosomas bacterianos mediante recombinación. Además, el agrupamiento de varios genes de resistencia en un único plásmido puede llevar a la selección de cepas resistentes a múltiples antibióticos a través de un sólo "evento de transferencia horizontal" (Barlow, 2009). Los plásmidos conjugados tienen genes que codifican la formación del pilus del

donante y el lipopolisacárido y las proteínas de la membrana externa de la célula receptora para formar una unión entre ambas con la finalidad de transportar y facilitar la entrada del ADN (Thomas and Nielsen, 2005). Finalmente, los transposones también son elementos genéticos móviles que pueden transferirse a través de la conjugación y están implicados en la propagación de la resistencia antimicrobiana. Varios escenarios pueden presentarse durante el transporte genético que se produce cuando las bacterias migran de los animales a los humanos. A) Los genes endógenos de las bacterias presentes en los animales son transportados a los humanos sin cambios; B) Transmisión de genes determinantes resistentes codificados en cromosomas o plásmidos; C) Elementos genéticos móviles (plásmidos) que transportan y diseminan genes de resistencia y D) Transmisión de resistencia a través de transposones con transferencia alta o baja de DNA, pero el plásmido sigue siendo el mismo (Figura 2) (von Wintersdorff et al., 2016).

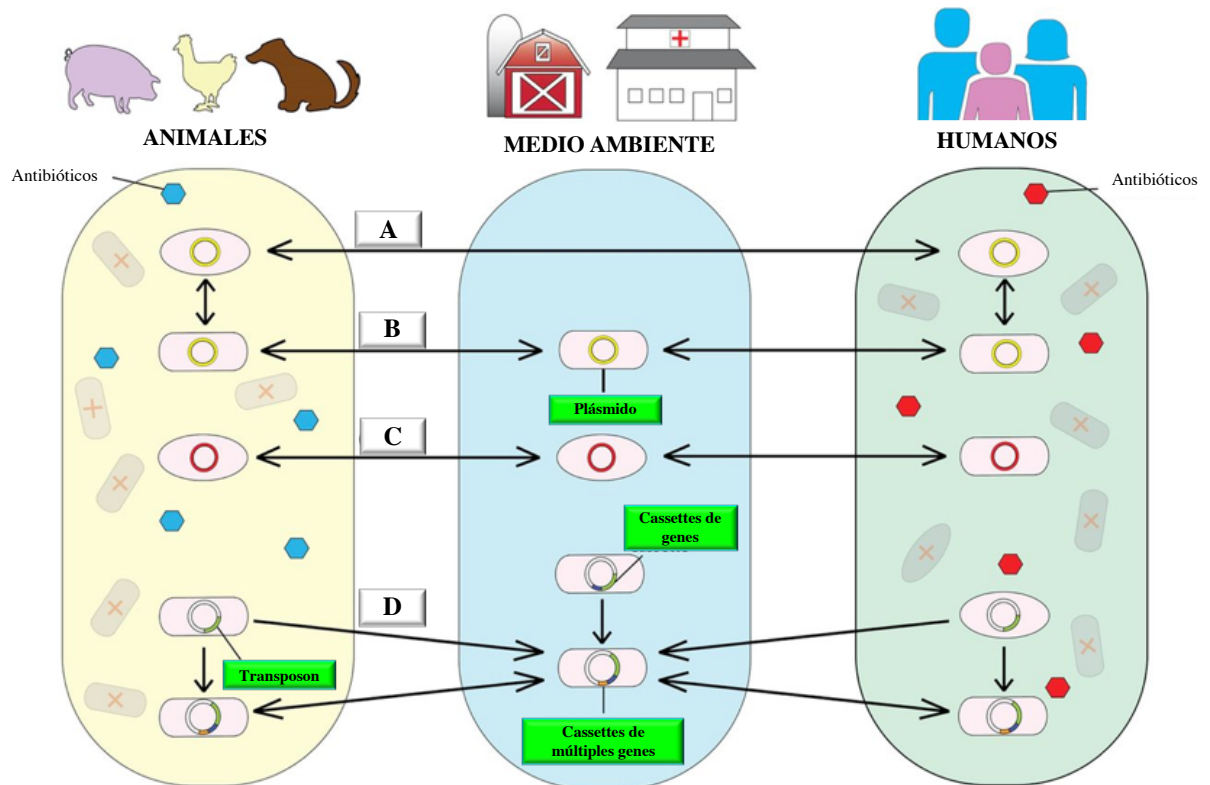


Figura 2. Escenarios que pueden presentarse durante el transporte genético que se produce cuando las bacterias migran de los animales a los humanos.

1.5. RUTAS DE TRANSMISIÓN DE RESISTENCIA A LOS ANTIBIÓTICOS

Las bacterias resistentes a los antibióticos pueden transmitirse a los humanos de manera directa a partir del contacto con animales infectados o sustancias biológicas como sangre, orina, heces, saliva y semen, entre otras; así como indirectamente, a través del consumo de alimentos contaminados (Founou et al., 2016). Sin embargo, la transmisión directa a través de la cadena alimenticia es considerada la más importante ya que es una vía de largo alcance (Figura 3).

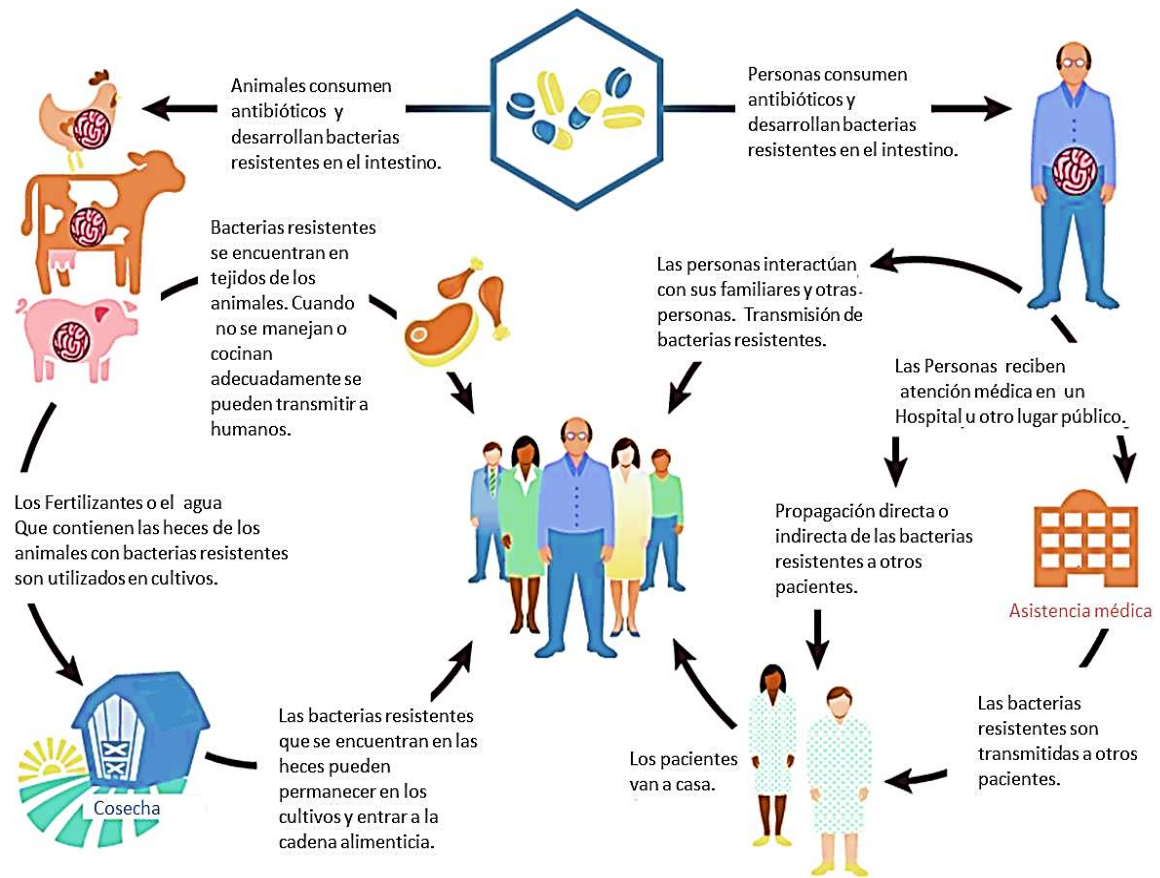


Figura 3. Vías de transmisión de resistencia a los antibióticos.

En países en vía de desarrollo, donde las medidas de bioseguridad y seguridad alimenticia están limitadas en las granjas de producción y los humanos interactúan íntimamente con los animales y el medio ambiente, es probable que el riesgo en la salud pública esté asociado con la propagación de la resistencia a los antibióticos tanto por contacto directo como indirecto (Padungtod et al., 2008). En contraste, en los países desarrollados, la vía de transmisión indirecta (a través de la cadena alimenticia) parece ser la más frecuente para la propagación de resistencia a los antibióticos (ECDC, 2018)

Debido a que una gran proporción de los antibióticos no se transforman en compuestos inactivos y conservan sus actividades después de la excreción renal o biliar (Thanner et al., 2016), la diseminación de antibióticos activos excretados a través de los desechos de los animales de producción al medio ambiente, han sido considerado como otra fuente de resistencia a los antibióticos (da Costa et al., 2013; Thanner et al., 2016; Woolhouse et al., 2015; Zhu et al., 2013). Además, los suelos agrícolas y las aguas residuales se han identificado como "puntos importantes" para el desarrollo de resistencia a los antibióticos (Thanner et al., 2016; Wu et al., 2014; Zhu et al., 2013).

Por lo tanto, la contaminación ambiental puede conducir al desarrollo y propagación de nuevas bacterias y genes resistentes a los antibióticos en productos alimenticios como pescados, mariscos, vegetales, alimento para animales y agua, pudiéndose transmitir y colonizar o infectar a los animales y los humanos, aumentando los riesgos en la salud.

1.6. BACTERIAS DE IMPORTANCIA EN LA AVICULTURA

En la industria avícola, las aves son susceptibles a una gran cantidad de patógenos como *Salmonella* ssp y *Clostridium* spp. Estos patógenos están presentes en el intestino delgado de las aves y compiten con el huésped por los nutrientes. Además, reducen la digestión de las grasas y las vitaminas liposolubles debido al efecto desconjugante de los ácidos biliares,

provocando una depresión en los parámetros productivos y mayor incidencia de enfermedades (Sohail et al., 2015).

1.6.1. *SALMONELLA*

Salmonella, una bacteria anaerobia facultativa Gram (-) en forma de varilla perteneciente a la familia Enterobacteriaceae, es la principal causa de infección transmitida por los alimentos en todo el mundo y está relacionada con importantes problemas en la salud pública (Eng et al., 2015). La salmonelosis es causada por serotipos de *Salmonella enterica* no tifoidea y se caracteriza típicamente por un síndrome de gastroenteritis autolimitada (que se manifiesta como diarrea, fiebre y dolor abdominal), con un período de incubación entre 4 y 72 h y la mortalidad es rara (Antunes et al., 2016). Además, las infecciones por *Salmonella* están asociadas con pérdidas económicas en los países industrializados y subdesarrollados derivadas de los costos asociados con su vigilancia, prevención y tratamiento, los cuales ascienden a más de 51 billones de dólares (Scharff, 2012). Cada año, se reportan millones de casos de salmonelosis transmitida por alimentos, lo que resulta en un estimado de 155,000 muertes (Majowicz et al., 2010), siendo la ruta de transmisión más común de los animales a los humanos a través de alimentos contaminados. También se ha reportado que la presencia de salmonelosis ha causado pérdidas económicas significativas en la producción avícola debido a la reducción en los parámetros productivos (Okunye et al., 2016).

Sin embargo, la importancia de esta bacteria ha incrementado debido a la aparición y diseminación de resistencia antimicrobiana en las cepas de *Salmonella*, ocasionando problemas más graves de salud en todo el mundo (Eng et al., 2015). Estos problemas de resistencia antimicrobiana se atribuyen principalmente al uso de antibióticos en la alimentación de los animales para promover el crecimiento, así como para tratar las infecciones bacterianas (Hyeon et al., 2011). El mecanismo de resistencia antimicrobiana en *Salmonella* es a través de plásmidos conjugativos, los cuales facilitan la transferencia de genes entre diferentes aislados (Gad et al., 2018).

1.6.2. *CLOSTRIDIUM*

En avicultura, la especie de *Clostridium* más importantes es *Clostridium perfringens* (CP). CP es un organismo comensal que coloniza el tracto intestinal de las aves en la fase temprana de vida de los animales, se encuentra en niveles menores a 10^5 cfu/g de contenido intestinal bajo condiciones saludables (Caly et al., 2015). Es una bacteria anaerobia Gram (+) formadora de esporas, capaz de producir varias toxinas y enzimas responsables de las lesiones en el intestino. *Clostridium* puede clasificarse en cinco tipos (A, B, C, D y E), siendo el tipo A la causa más predominante de infecciones por *Clostridium* en avicultura. Se sabe que las cepas patógenas de CP producen toxinas como la α -toxina y/o la toxina NetB, las cuales están relacionadas con la forma causante de enteritis necrótica y el aumento de la permeabilidad intestinal (Sakurai et al., 2004; Van Immerseel et al., 2009). Los animales desafiados solamente con CP no desarrollan enteritis necrótica, puesto que se requieren de uno o varios factores predisponentes para provocar los signos clínicos y las lesiones de enteritis necrótica (Van Immerseel et al., 2004).

La enteritis necrótica se presenta en dos formas: aguda o crónica (subclínica). La forma aguda se asocia con altas tasas de mortalidad. Mientras tanto, la forma subclínica se caracteriza por una reducción en los parámetros de rendimiento, lo que provoca una grave pérdida económica (Van Immerseel et al., 2009). Se estima que el impacto económico por enteritis necrótica en la industria avícola es de más de 5-6 mil millones de dólares por año. Hoy en día, la incidencia de esta enfermedad ha incrementado debido a la restricción del uso de los antibióticos y anticoccidianos en el alimento como consecuencia de los problemas de resistencia antimicrobiana. Por lo tanto, el control de esta enfermedad es esencial para mantener una producción eficiente.

1.7. ALTERNATIVAS AL USO DE ANTIBIÓTICOS





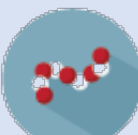
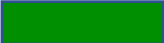


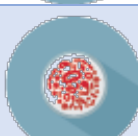



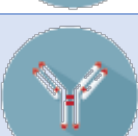



Las alternativas ideales al uso de los antibióticos deberían: 1) ser seguras, es decir no presentar efectos secundarios en los animales; 2) ser fáciles de eliminar del cuerpo para que no se acumulen en el organismo; 3) no inducir resistencia bacteriana; 4) ser estable en el alimento y en el tracto gastrointestinal de los animales; 5) ser descompuestos fácilmente para no afectar el medio ambiente; 6) no afectar la palatabilidad; 7) no destruir la biota intestinal normal de los animales; 8) controlar y/o inhibir el crecimiento de bacterias patógenas; 9) evitar que el microorganismo sea más resistente; 10) mejorar la eficiencia alimenticia y promover el crecimiento del animal; 11) ser compatible; y 12) mantener una baja tasa de mortalidad en la parvada (Cheng et al., 2014; Gadde et al., 2017; Mehdi et al., 2018).

Aunque se han propuesto y probado diversas alternativas en producción avícola (**Tabla 4**), dos de los grupos de aditivos que más se ha estudiado es el de los probióticos y AO, teniendo mayor importancia los últimos debido a que estos no son solamente empleados con fines de promoción de crecimiento sino también para controlar bacterias patógenas de importancia en salud pública como *Salmonella* spp. Se ha descrito que la manera en que los AO mejoran los parámetros productivos en los pollos de engorda está relacionada con su habilidad para reducir el pH y aumentar la actividad de la pepsina, provocando una mejora en la digestibilidad de las proteínas (Sohail et al., 2015). Además, los AO también reducen la pérdida de nitrógeno endógeno mediante la reducción de la producción de amoníaco y otros metabolitos microbianos (Khan and Iqbal, 2016).

No obstante, otro de los grupos que han crecido considerablemente en los últimos años es el de los fitogénicos (extracto de plantas y aceites esenciales) debido a su capacidad para mejorar el rendimiento, la digestibilidad de nutrientes, mejoramiento del sistema inmune, modulación de la microbiota intestinal, actividad antimicrobiana, antiviral, anticoccidiana, fungicida y al efecto antioxidante (Murugesan et al., 2015; Suresh et al., 2018). Sin embargo, se ha descrito que como la composición de los extractos de plantas es compleja de igual

forma que los probióticos, la calidad en términos de estabilidad y solubilidad es deficiente, resultando en diferentes efectos y riesgos para la salud (Cheng et al., 2014).

Tabla 4. Alternativas al uso de antibióticos en producción animal.

	Tipo de producto	Mecanismo de acción	Prevención mucho antes de la infección.	Prevención poco antes de la infección.	Tratamiento después de la infección
	Hidrolasas Bacteriófagos	Antibacteriano	<i>Ventana estrecha para la infección inicial</i> 		
	Fitoquímicos		<i>Puede ser aplicado continuamente</i> 		
	Péptidos antimicrobianos		<i>Ventana estrecha para la infección inicial</i> 		
	Ácidos orgánicos		<i>Puede ser aplicado continuamente</i> 		
	Probióticos	Mejora la salud intestinal	<i>Puede ser aplicado continuamente</i> 		
	Prebióticos		<i>Puede ser aplicado continuamente</i> 		
	Inmunomoduladores	Estimula o mejora la respuesta inmune	<i>Ventana estrecha para la infección inicial</i> 		
	Vacunas	Estimula la respuesta inmune	<i>Aplicar antes de la infección</i> 		

Finalmente, a pesar de que no son una clase de alternativa importante, también se han utilizado ácidos inorgánicos como el ácido clorhídrico y ácido fosfórico en el alimento de pollos de engorda con fines bactericidas. Aunque estos ácidos reducen el pH, se ha demostrado que no son efectivos (Krishan and Narang, 2014). Además, se ha utilizado el bisulfato de sodio (NaHSO_4), una sal ácida, como agente para reducir principalmente el pH de una variedad de matrices. Sin embargo, se ha demostrado que no tiene efecto significativo para reducir la concentración de *Salmonella* Enteritidis en pollos infectados cuando se incluye como aditivo en el alimento (Kassem et al., 2012). En cambio, otros ácidos inorgánicos como el ácido bórico han demostrado tener buena actividad antimicrobiana y mejorar los parámetros productivos en pollos de engorda (Yildiz et al., 2013), así como aumentar la calidad del huevo y parámetros bioquímicos en gallinas de postura (Yeşilbağ and Eren, 2008).

1.7.1. ÁCIDO ASCÓRBICO

La vitamina C se puede encontrar en dos formas: ácido ascórbico (AA, forma reducida) y ácido deshidroascórbico (AD, forma oxidada) (**Figura 4**). Aunque en la naturaleza la vitamina C está presente principalmente como AA, ambas formas son biológicamente activas (Al-Niaimi and Chiang, 2017).

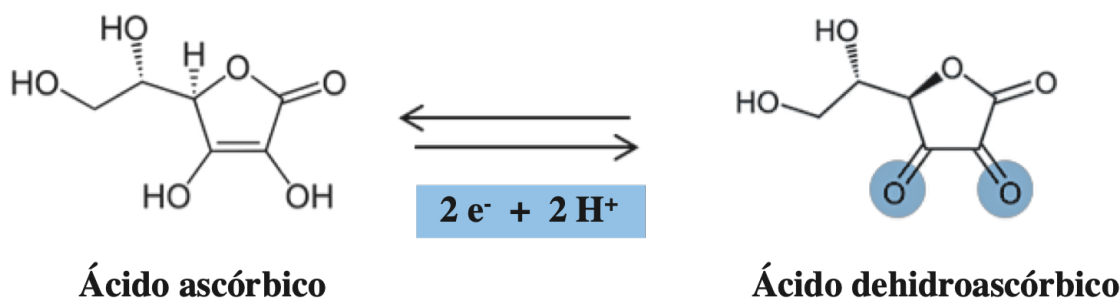


Figura 4. Estructura del ácido ascórbico (AA) y reacción de oxidación en la que se convierte en deshidroascórbico (AD).

El AA es un ácido débil diprótico ($pK_{a1}= 4.2$ y $pK_{a2}= 11.6$) soluble en agua. Es muy sensible al calor, la luz, la acción de los agentes oxidantes y los iones metálicos. Es muy inestable en soluciones acuosas ya que se oxida fácilmente al reaccionar con el oxígeno atmosférico y conforme el pH aumenta (Jaiswal et al., 2017). Sin embargo, se ha reportado que es más estable en medio ácido (Golubitskii et al., 2007). Una solución de AA al 0.5% en agua es fuertemente ácida con un pH alrededor de 3.

Además, el AA es considerado como un nutriente esencial en las dietas humanas. Sin embargo, en las aves y reptiles es sintetizado en el riñón. Aunque las aves tienen esta habilidad de sintetizar el AA, se ha reportado que su producción es insuficiente bajo condiciones de estrés como alta o baja temperatura y/o humedad (Ahmadu et al., 2016).

Se ha reportado que todas las funciones biológicas conocidas del AA se originan a partir de su propiedad química como agente reductor. Juega un papel importante en el mantenimiento del colágeno, desempeñando un papel crítico en la reparación y curación de heridas, es un cofactor en la conversión de dopamina a norepinefrina, participa en la síntesis de catecolaminas y cataliza reacciones enzimáticas necesarias para la actividad de ciertas hormonas (Naidu, 2003). Sin embargo, una de sus propiedades más importante es la capacidad antioxidante, la cual está relacionada principalmente con la formación de deshidroascorbilo, un radical inerte (Ahmadu et al., 2016).

Algunos estudios también han demostrado que el AA presenta actividad antimicrobiana tanto en bacterias Gram (+) como Gram (-), así como capacidad antifúngica (Isela et al., 2013; Verghese et al., 2017). Aunque no está claro el mecanismo de acción antimicrobiano del AA, hay diferentes explicaciones: 1) efecto directo sobre la membrana de las bacterias, el cual fue observado mediante microscopía de contraste de fase y microscopía electrónica de barrido (El-Gebaly et al., 2012; Zhang et al., 1997); 2) inhibición en la producción de biopelículas debido a su capacidad “anti-quorum sensing”, dado que tiene una inhibición competitiva con el autoinductor-2 (AI-2) (Novak and Fratamico, 2004); y 3) capacidad de disminuir el pH y

efecto antioxidante (Verghese et al., 2017). Las concentraciones de AA probadas en cada uno de los estudios se encuentran entre 20 y 100 mg/ml.

En avicultura, el AA se ha utilizado principalmente para combatir los efectos del estrés por calor. Se ha reportado que la suplementación con AA en la dieta ha mejorado el rendimiento y la respuesta inmune de aves bajo condiciones de estrés por calor (Lohakare et al., 2005). Además, ha promovido la resistencia hacia algunas enfermedades infecciosas y contagiosas, así como reducido la temperatura corporal y de la piel tanto en pollos de engorda como en gallinas de postura. Otros beneficios de la suplementación con AA incluyen: la mejora en la producción de huevos, mayor resistencia y grosor de la cáscara de huevo, y aumento en la producción de espermatozoides y fertilidad, al utilizar dosis de 100 mg/Kg (Ahmadu et al., 2016). Sin embargo, considerando diversos estudios, se podría inferir que la dosis de AA requerida para reducir los efectos del estrés varía entre 100 y 200 mg/Kg de alimento.

A pesar de que se ha evaluado *in vitro* la actividad antimicrobiana del AA contra algunas bacterias de importancia en avicultura, se ha demostrado que la dosis es muy importante sugiriendo que debe ser mayor a 2 g/Kg de alimento y en algunos casos hasta superior a 32g/kg de alimento (Sangcharoen et al., 2017). El AA ha mostrado buena actividad antimicrobiana contra bacterias Gram (+) como *Clostridium perfringens* y *Micrococcus luteus* (Novak and Fratamico, 2004; Sangcharoen et al., 2017). Igualmente ha tenido buena actividad antimicrobiana contra *E. coli*, una bacteria Gram (-), pero su efecto ha sido nulo contra *Salmonella* Enteritidis (Sangcharoen et al., 2017; Tajkarimi and Ibrahim, 2011). En general, el AA es más efectivo como antimicrobiano cuando está en su forma no disociada, es decir, a un pH por debajo de su primer pKa= 4.2.

1.7.2. CURCUMINA

La curcumina (CUR) o el diferuloilmetano (**Figura 5**), una sustancia polifenólica amarilla y el principal curcuminoide de la cúrcuma (*Curcuma longa*), se ha utilizado ampliamente en la industria alimentaria y química como colorante, saborizante y conservador. Además, se sabe que la CUR es un potente antioxidante natural (Ak and Gülçin, 2008; Priyadarsini, 2014), agente antiinflamatorio (Began et al., 1998; Chan et al., 1998; Menon and Sudheer, 2007) y tiene un potencial terapéutico en enfermedades metabólicas y autoinmunes, como la diabetes tipo II, la esclerosis múltiple, la enfermedad de Alzheimer, Parkinson y aterosclerosis (Hamaguchi et al., 2010; Maradana et al., 2013; Mythri and Bharath, 2012; Sahebkar, 2015; Wanninger et al., 2015; Wongcharoen and Phrommintikul, 2009). Además, la CUR tiene actividad quimiopreventiva y anticancerígena (López-Lázaro, 2008; Tuorkey, 2014).

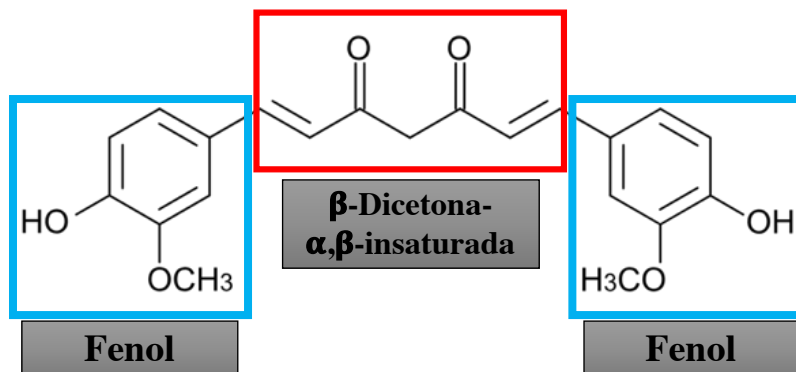


Figura 5. Estructura química de la curcumina.

En producción avícola, la CUR también ha sido utilizada con fines de promoción de crecimiento. Se ha visto que la suplementación con 0.2 kg CUR/Ton alimento y entre 7.5 y 10 Kg/Ton mejoró en general los parámetros productivos en pollos de engorda (Khan et al., 2012; Rajput et al., 2013). Además, la CUR ha mostrado buenas propiedades antimicrobianas *in vitro* contra algunas bacterias patógenas de importancia en avicultura (Lawhavit et al., 2010).

A pesar de todas las propiedades farmacológicas mencionadas anteriormente de la CUR y su buen efecto como promotor de crecimiento en avicultura, este fitofármaco presenta una solubilidad en agua extremadamente pobre, resultando en una baja absorción a lo largo del tracto gastrointestinal (Mazzarino et al., 2010) y, por lo tanto, una deficiente biodisponibilidad, incluso cuando se administra a dosis de 12 g/día (Anand et al., 2007).

Estudios *in vivo* han demostrado que después de la administración oral de CUR, la mayor parte era excretada en las heces y, aunque no se detectó en la orina, se observaron varios de sus derivados como glucurónido de curcumina y sulfatos, lo que indica que este fitofármaco sufre una metabolización rápida en el hígado y se elimina rápidamente de la circulación sistémica (Mazzarino et al., 2010). Además, también se sabe que la CUR es inestable a valores de pH neutro-básico, degradándose a vainillina, ácido ferúlico, feruloil metano y trans-6- (40-hidroxi-30-metoxi). fenil)-2,4-dioxo-5-hexenal, pero cuando los medios son suplementados con suero, es más estable (Lin et al., 2009).

En este sentido, diferentes técnicas han sido utilizadas para aumentar la solubilidad y, por tanto, la biodisponibilidad, así como la estabilidad de la CUR en algunos casos. Dentro de estas técnicas se incluyen: complejos de inclusión, micronización, dispersiones sólidas, nanosuspensiones, nanopartículas sólidas lipídicas, vehículos lipídicos nanoestructurados, liposomas, sistemas de administración de fármacos autoemulsionantes y sistemas basados en geles (Kaur and Kaur, 2014).

1.7.3. ÁCIDO BÓRICO

El ácido bórico (BA) es un ácido monobásico muy débil con un pKa de 9.1 (**Figura 6**), es decir, a pH= 9.1 se encuentra el 50% disociado en forma del anión borato (H_4BO_4^-) (Winzer et al., 2003). Es muy soluble en agua (0.75 mol/L a 20 °C) y tiene una alta solubilidad en lípidos del mismo orden que la urea (Hunt, 2003).

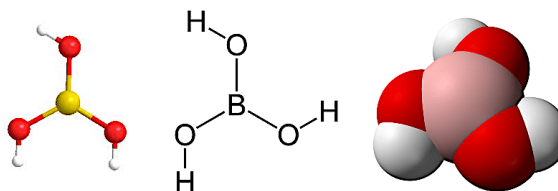


Figura 6. Estructura del ácido bórico

El boro es un elemento químico presente en el BA y es un nutriente esencial para los animales y las plantas. Se usa ampliamente en la agricultura como fertilizante y plaguicida, así como en la fabricación de varios productos básicos como vidrio, cerámica, componentes automotrices, pintura y cosméticos, entre otros.

Además, el boro se ingiere diariamente en los alimentos y el agua y, como nutriente esencial, está involucrado en muchos procesos metabólicos y fisiológicos. En los eucariotas, el boro desempeña un papel clave en el metabolismo mineral (Hunt, 1989, 1994), la respuesta inmune (Hunt, 2003), el sistema endocrino (Hunt, 1996) y la estructura celular (Kobayashi et al., 1996), mientras que en procariontes, participa como un autoinductor (AI-2) en las respuestas de detección de quórum (Chen et al., 2002; Hunt, 2003), las cuales están relacionadas con la producción de biopelículas, un mecanismo bien documentado de resistencia microbiana. En este sentido, el boro juega un papel esencial en la biología homeostática de los organismos vivos (Kabu and Akosman, 2013).

En medicina, el BA se utiliza como un tratamiento alternativo para las infecciones vaginales por hongos y protozoos (Sobel and Chaim, 1997), así como para infecciones bacterianas del

oído (Amani and Moeini, 2016). Sin embargo, a altas concentraciones, el BA puede llegar a ser un veneno empleado para el control de organismos que se extienden desde procariotas a vertebrados e invertebrados (Hunt, 1996; Program, 1987; Schmidt et al., 2010).

En avicultura, el BA se coloca en la cama de las aves para el control de escarabajos a dosis entre 0.4 y 0.9 Kg por 9.3 m². También se ha reportado que el BA tiene una DL₅₀ oral aguda relativamente alta de 2.95 g/kg de peso corporal en pollos de 1 día de edad (Poppenga, 2007). No obstante, concentraciones en la cama de las aves de 3.6 y 7.2 Kg de BA por cada 9.3 m² de espacio de piso durante 15 días de exposición disminuyeron y aumentaron significativamente el peso corporal y la conversión alimenticia en aves, respectivamente. Además, concentraciones mayores a 2.5 g de BA/Kg de peso corporal administradas durante 2 semanas tiene efectos negativos en el peso corporal y conversión alimenticia, y cuando es administrado durante 3 semanas se han encontrado niveles altos de residuos de boro en el cerebro, riñón, hígado y músculo (Dufour et al., 1992; Sander et al., 1991).

Aunque el BA no se ha probado como antimicrobiano contra patógenos de importancia en avicultura, se ha utilizado con fines de promoción de crecimiento, encontrándose una relación importante entre la dosis de boro administrada y la cantidad de vitamina D. Un adecuado contenido de vitamina D (2500 UI/Kg) en la dieta con respecto a la del boro es capaz de mejorar la ganancia de peso en pollos de engorda y aumentar las cenizas del hueso, así como el contenido de calcio y fósforo en la tibia. Por el contrario, inadecuadas concentraciones de vitamina D (125 UI/Kg) tienen efectos negativos en parámetros productivos y niveles de minerales. Además, se ha reportado que las aves suplementadas con 60 mg de BA/Kg de peso corporal durante la semana 3 y 6 de crianza (engorda y finalización, respectivamente) presentaron una mejora en los parámetros productivos (Yildiz et al., 2013). En el caso de gallinas ponedoras, la suplementación con BA (25, 50, y 100 mg BA/kg peso corporal) influyó positivamente en el balance mineral, reduciendo así el porcentaje de huevo roto al mejorar el grosor y resistencia de la cáscara. Asimismo, se mejoró el consumo de alimento y el peso promedio de los huevos (Yeşilbağ and Eren, 2008).

II. JUSTIFICACIÓN

En la época actual, en la que se viven tiempos de globalización de mercados, la competencia nacional e internacional en la producción de proteína animal se ha vuelto cada día más demandante. En particular, la avicultura en México ha tenido un repunte muy importante al grado tal que la producción de carne de pollo es mayor en comparación con la de carne de cerdo y bovino. En este sentido, el dinamismo de la avicultura presentado en los últimos años ha consolidado a México como el séptimo país productor de carne de pollo a nivel mundial (USDA, 2018).

Sin embargo, en la producción avícola intensiva, frecuentemente son empleados un gran número de antibióticos son frecuentemente empleado para prevenir (uso profiláctico), tratar, y controlar (uso terapéutico) ciertas enfermedades, sin dejar a un lado el efecto de promoción de crecimiento (uso subterapéutico) con la finalidad de aumentar la productividad. No obstante, una gran parte de los antibióticos han sido utilizados principalmente a dosis subterapéuticas, provocando, no sólo el aumento de la resistencia a los antibióticos en bacterias de importancia en avicultura como *Salmonella* sino también la presencia de residuos en productos animales debido a los ineficientes períodos de retiro, incrementando en ambos casos los riesgos en cuanto a salud pública se refiere. En consecuencia, los antibióticos a dosis subterapéuticas fueron prohibidos en la UE en 2006 (EPC, 2005) y EUA en 2017 (Editors, 2017), provocando un aumento en la incidencia de algunas enfermedades como enteritis necrótica y el incremento significativo en el uso de los antibióticos, pero a dosis terapéuticas para controlar y prevenir enfermedades (Borck Høg et al., 2016), derivando este último en problemas más serios de resistencia bacteriana y posteriormente, a su prohibición provisional como agentes preventivos de enfermedades, limitando su uso sólo para el tratamiento y control de enfermedades (Parlamento Europeo, 2018).

Dado que *Salmonella* sigue siendo uno de los patógenos transmitidos por los alimentos más importantes a partir de productos de origen avícola y la incidencia de enteritis necrótica

causada por *Clostridium perfringens* ha aumentado debido a la restricción de los antibióticos como consecuencia de los problemas de resistencia bacteriana, la industria avícola se ha visto presionada para buscar e investigar nuevas alternativas que brinden beneficios de rendimiento, así como disminuyan la tasa de mortalidad y los problemas de resistencia bacteriana. Entre estas alternativas se encuentran: los probióticos, derivados de plantas como aceites esenciales o extractos, ácidos orgánicos (AO) e inorgánicos (AI), enzimas, lisozimas y moléculas de origen microbiano como extractos de levadura y péptidos antimicrobianos (Caly et al., 2015). En este contexto, el uso del AA, BA, CUR y sus combinaciones administrados en conjunto con el alimento será una excelente opción al reemplazo de los antibióticos en pollos de engorda principalmente para el tratamiento y prevención de enfermedades, así como la promoción de crecimiento en segundo término.

III. HIPÓTESIS

1. Las posibles combinaciones entre dos o más aditivos como el ácido ascórbico, ácido bórico y curcumina evaluadas en un modelo *in vitro* que simula las condiciones del tracto gastrointestinal del pollo de engorda tienen mejor efecto para reducir la concentración de *Salmonella* Enteritidis que por sí solos.
2. Si se incrementa la solubilidad de la curcumina utilizando como estrategia la preparación de dispersiones sólidas con polivinilpolipirrolidona K30 (PVP) entonces presentará mejor actividad antimicrobiana contra *Salmonella* Enteritidis, y su combinación con ácido bórico potenciará el efecto antimicrobiano sobre *Salmonella* Enteritidis en pollos de engorda.
3. Si la adición de ácido bórico en las dietas de pollos de engorda tiene un efecto positivo sobre la homeostasis y el balance de la microbiota intestinal, entonces será efectivo para controlar infecciones por *Salmonella* Enteritidis.
4. La administración profiláctica o terapéutica de una formulación a base de ácido ascórbico y una dispersión sólida de curcumina con polivinilpolipirrolidona K30 (PVP) y ácido bórico mostrará un efecto antimicrobiano combinado debido a la reducción en la concentración de *Salmonella* Enteritidis, y la disminución del impacto negativo de la enteritis necrótica.
5. La inclusión de antioxidantes naturales como ácido ascórbico y curcumina en la alimentación será capaz de prevenir y tratar infecciones por *Salmonella* Enteritidis, manteniendo así una mejor salud e integridad intestinal en pollos de engorda.

IV. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de la suplementación del ácido ascórbico, ácido bórico, curcumina y la combinación de éstos en la dieta como reemplazo a los antibióticos, sobre la efectividad en contra de patógenos de importancia en avicultura, así como su impacto en la salud intestinal.

4.2. OBJETIVOS PARTICULARES

1. Comparar el método convencional de siembra en placa con un método fluorométrico que utiliza PrestoBlue® como colorante en la determinación de la actividad antimicrobiana del ácido ascórbico, ácido bórico y curcumina contra *Salmonella* Enteritidis en un modelo de digestión aviar *in vitro* que simula el buche, proventrículo e intestino.
2. Evaluar el efecto de la administración profiláctica de una dispersión sólida de curcumina con polivinilpirrolidona K30, ácido bórico y la combinación de éstos en la colonización de *Salmonella* Enteritidis e integridad intestinal en pollos de engorda.
3. Evaluar la actividad antimicrobiana del ácido bórico (BA) en la colonización por *Salmonella* Enteritidis, así como su efecto en la integridad intestinal y microbiota cecal en pollos de engorda.
4. Evaluar el efecto de la administración profiláctica o terapéutica de una mezcla de ácido ascórbico y una dispersión sólida de curcumina con polivinilpirrolidona k30 y ácido bórico en pollos de engorda infectados con *Salmonella* Enteritidis, así como su impacto en un modelo de laboratorio de desafío de enteritis necrótica.
5. Evaluar y comparar el efecto de dos antioxidantes naturales, ácido ascórbico o curcumina formulada en una dispersión sólida, para prevenir o tratar la infección por *Salmonella* Enteritidis en pollos de engorda.

V. PRODUCTIVIDAD: PUBLICACIONES GENERADAS

El presente proyecto doctoral generó 5 artículos de investigación científica, de los cuales 4 ya están publicados en diferentes *revistas* indexadas en el Journal Citation Reports (JCR) y el último se encuentra en fase de revisión.

1. “Comparison of PrestoBlue® and plating method to evaluate antimicrobial activity of ascorbic acid, boric acid and curcumin in an *in vitro* gastrointestinal model”
“Journal of Applied Microbiology, Impact factor: 2.683”
2. “Evaluation of a solid dispersion of curcumin with polyvinylpyrrolidone and boric acid against *Salmonella* Enteritidis infection and intestinal permeability in broiler chickens: A pilot study”
“Frontiers in Microbiology, Impact factor: 4.259”
3. “Evaluation of the antimicrobial and intestinal integrity properties of boric acid in broiler chickens infected with *Salmonella* Enteritidis: Proof of concept”
“Research in Veterinary Science, Impact factor: 1.751”
4. “Evaluation of the dietary supplementation of a formulation containing ascorbic acid and a solid dispersion of curcumin with boric acid against *Salmonella* Enteritidis and necrotic Enteritis in broiler chickens”
“Animals, Impact factor: 1.832”
5. “Comparison of the effect of ascorbic acid and curcumin formulated in a solid dispersion on the prevention and treatment of *Salmonella* Enteritidis infection in broiler chickens”
“Molecules, Impact factor: 3.060”

VI. ARTÍCULO 1

“Comparison of Prestoblue® and plating method to evaluate antimicrobial activity of ascorbic acid, boric acid and curcumin in an *in vitro* gastrointestinal model”

Daniel Hernandez-Patlan¹, B. Solis-Cruz¹, A. Méndez-Albores², J.D. Latorre³, X. Hernandez-Velasco⁴, G. Tellez³ and R. López-Arellano¹

¹Laboratorio 5: LEDEFAR, Unidad de Investigación Multidisciplinaria, Facultad de Estudios Superiores (FES) Cuautitlan, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Cuautitlan Izcalli, Estado de México, México

²Laboratorio 14: Alimentos, Micotoxinas y Micotoxicosis, Unidad de Investigación Multidisciplinaria, FES Cuautitlan, UNAM, Cuautitlan Izcalli, Estado de México, México

³Department of Poultry Science, University of Arkansas, Fayetteville, AR, USA

⁴Departamento de Medicina y Zootecnia de Aves, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM, Mexico City, México

Correspondence:

Guillermo Tellez, Department of Poultry Science, Center of Excellence for Poultry Science, University of Arkansas, 1260 W. Maple, POSC 0-114, Fayetteville, AR 72701, USA. E-mail: gtellez@uark.edu

VII. ARTÍCULO 2

“Evaluation of a solid dispersion of curcumin with polyvinylpyrrolidone and boric acid against *Salmonella* Enteritidis infection and intestinal permeability in broiler chickens: A pilot study”

Daniel Hernandez-Patlan¹, Bruno Solis-Cruz¹, Karine Patrin Pontin², Juan D. Latorre³, Mikayla F. A. Baxter³, Xochitl Hernandez-Velasco⁴, Ruben Merino-Guzman⁴, Abraham Méndez-Albores⁵, Billy M. Hargis³, Raquel Lopez-Arellano¹ and Guillermo Tellez³

¹Laboratorio 5: LEDEFAR, Unidad de Investigacion Multidisciplinaria, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlan, Universidad Nacional Autonoma de México, Cuautitlan Izcalli, Mexico.

²Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Aviária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

³Department of Poultry Science, University of Arkansas, Fayetteville, AR, United States.

⁴Departamento de Medicina y Zootecnia de Aves, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico.

⁵Laboratorio 14: Alimentos, Micotoxinas y Micotoxicosis, Unidad de Investigacion Multidisciplinaria, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlan, Universidad Nacional Autonoma de México, Cuautitlan Izcalli, Mexico.

Correspondence:

Guillermo Tellez, Department of Poultry Science, Center of Excellence for Poultry Science, University of Arkansas, 1260 W. Maple, POSC 0-114, Fayetteville, AR 72701, USA. E-mail: gtellez@uark.edu

VIII. ARTÍCULO 3

“Evaluation of the antimicrobial and intestinal integrity properties of boric acid in broiler chickens infected with *Salmonella* Enteritidis: Proof of concept”

Daniel Hernandez-Patlan^a, Bruno Solis-Cruz^a, Bishnu Adhikari^b, Karine P. Pontin^c, Juan D. Latorre^b, Mikayla F.A. Baxter^b, Xochitl Hernandez-Velasco^d, Ruben Merino-Guzman^d, Abraham Méndez-Albores^e, Young Min Kwon^b, Billy M. Hargis^b, Raquel López-Arellano^a, Margarita A. Arreguin-Nava^f, Guillermo Tellez-Isaias^b

^aUnidad de Investigación Multidisciplinaria, FES Cuautitlan, Universidad Nacional Autónoma de Mexico, Cuautitlan Izcalli 54714, Estado de Mexico, Mexico

^bDepartment of Poultry Science, University of Arkansas, Fayetteville, AR 72701, USA

^cDepartamento de Medicina Veterinária Preventiva, Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Aviária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul-UFRGS, Porto Alegre, RS 97105-900, Brazil

^dDepartamento de Medicina y Zootecnia de Aves, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de Mexico, Mexico City 04510, Mexico

^eLaboratorio 14: Alimentos, Micotoxinas y Micotoxicosis, Unidad de Investigación Multidisciplinaria, FES Cuautitlan, UNAM, Cuautitlan Izcalli 54714, Estado de Mexico, Mexico

^fEco-Bio LLC, Fayetteville, AR 72701, USA

Correspondence:

Guillermo Tellez, Department of Poultry Science, Center of Excellence for Poultry Science, University of Arkansas, 1260 W. Maple, POSC 0-114, Fayetteville, AR 72701, USA. E-mail: gtellez@uark.edu

I.

IX. ARTÍCULO 4

“Evaluation of the dietary supplementation of a formulation containing ascorbic acid and a solid dispersion of curcumin with boric acid against *Salmonella* Enteritidis and necrotic enteritis in broiler chickens”

Daniel Hernandez-Patlan¹, Bruno Solis-Cruz¹, Karine Patrin Pontin², Juan D. Latorre³, Mikayla F. A. Baxter³, Xochitl Hernandez-Velasco⁴, Ruben Merino-Guzman⁴, Abraham Méndez-Albores⁵, Billy M. Hargis³, Raquel López-Arellano¹ and Guillermo Tellez-Isaias³

¹Laboratorio 5: LEDEFAR, Unidad de Investigacion Multidisciplinaria, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlan, Universidad Nacional Autonoma de México, Cuautitlan Izcalli 54714, Mexico.

²Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Aviária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre RS 97105 900, Brazil.

³Department of Poultry Science, University of Arkansas, Fayetteville, AR 72704, USA.

⁴Departamento de Medicina y Zootecnia de Aves, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City 04510, Mexico.

⁵Laboratorio 14: Alimentos, Micotoxinas y Micotoxicosis, Unidad de Investigacion Multidisciplinaria, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlan, Universidad Nacional Autonoma de Mexico, Cuautitlan Izcalli 54714, Mexico; albores@unam.mx

Correspondence:

Guillermo Tellez, Department of Poultry Science, Center of Excellence for Poultry Science, University of Arkansas, 1260 W. Maple, POSC 0-114, Fayetteville, AR 72701, USA. E-mail: gtellez@uark.edu

X. ARTÍCULO 5

“Comparison of the effect of ascorbic acid and curcumin formulated in a solid dispersion on the prevention and treatment of *Salmonella* Enteritidis infection in broiler chickens”

Daniel Hernandez-Patlan¹, Bruno Solis-Cruz¹, Karine Patrin Pontin², Juan D. Latorre³,
Xochitl Hernandez-Velasco⁴, Ruben Merino-Guzman⁴, Abraham Méndez-Albores⁵, Billy
M. Hargis³, Raquel Lopez-Arellano¹ and Guillermo Tellez^{3*}

¹Laboratorio 5: LEDEFAR, Unidad de Investigación Multidisciplinaria, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlan, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuautitlan Izcalli, Mexico

²Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Aviária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

³Department of Poultry Science, University of Arkansas, Fayetteville, AR, United States

⁴Departamento de Medicina y Zootecnia de Aves, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico

⁵Laboratorio 14: Alimentos, Micotoxinas y Micotoxicosis, Unidad de Investigación Multidisciplinaria, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlan, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuautitlan Izcalli, Mexico

Correspondence:

Guillermo Tellez, Department of Poultry Science, Center of Excellence for Poultry Science, University of Arkansas, 1260 W. Maple, POSC 0-114, Fayetteville, AR 72701, USA. E-mail: gtellez@uark.edu

ABSTRACT

The present study was evaluated and compared the effect of two natural antioxidants, ascorbic acid (AA) and curcumin formulated in a solid dispersion (SD-CUR), in preventing or treating *Salmonella* Enteritidis infection (SE) in broiler chickens. The results of the dietary administration of AA and SD-CUR as preventive agents on SE counts showed that AA significantly reduce 1.2 log SE counts in crop compared to positive control (PC) group ($P<0.05$), whereas in cecal tonsils (CT), SD-CUR significantly decrease the counts and incidence of *Salmonella* ($P<0.05$) in comparison with PC group. Furthermore, superoxide dismutase (SOD) activity was significantly higher in chickens supplemented with AA and SD-CUR, but total intestinal immunoglobulin A (IgA) levels were significantly lower when compared to PC group. However, only SD-CUR group showed significantly lower serum fluorescein isothiocyanate-dextran (FITC-d) concentration, while AA presented significantly lower total aerobic bacteria compared to the other groups in both cases. Meanwhile, in the *Salmonella* infection treatment model, only the dietary administration of AA significantly decreased the counts and incidence of SE in both the crop and CT on days 3 and 10 post-SE challenge ($P<0.05$). However, serum FITC-d concentrations were significantly lower in AA and SD-CUR groups in comparison with PC group, but total intestinal IgA levels were statistically lower only in AA group compared to PC group. Interestingly, no significant differences in SOD activity were found between the groups. The present study also suggests that SD-CUR supplementation has a better effect as a preventive of *Salmonella* infection, while AA could be used to treat *Salmonella* infection considering all the determinations evaluated.

Keywords: ascorbic acid, curcumin, prevention, treatment, *Salmonella*

INTRODUCTION

Since the restriction of the use of antibiotics at subtherapeutic doses in animal production because of the problems of bacterial resistance (V. T. Nair et al., 2018), the incidence of infections has been increasing (Cheng et al., 2014). Furthermore, the use of antibiotics, but at therapeutic doses has also increased, which could lead to a worse scenario of bacterial resistance (Borck Høg et al., 2016; Founou et al., 2016; Hao et al., 2014; Marshall and Levy, 2011). Thus, interest in finding viable alternatives with similar benefits to antibiotics has increased in recent years (Lillehoj et al., 2018), mainly to prevent, control and treat infections associated with *Salmonella*, a foodborne pathogen that remains a major concern in public health (WHO, 2018). In recent years, the investigation of alternatives to antibiotics is focused on improving intestinal health through the use of feed additives as probiotics, prebiotics, in-feed enzymes, essential oils, herbal extracts and antioxidants (Johannah et al., 2018).

Despite poultry diet contains antioxidants, these are included mainly to protect it from deterioration during storage and for nutritional purposes as vitamin E (Luna et al., 2017). However, these additives play an important role in health aspects and prevention of several diseases in poultry due to their different mechanisms of action (Surai, 2007).

Ascorbic acid (AA) is a water-soluble organic compound of natural origin, obtained from different sources with potent antioxidant properties due to its ability to readily donate electrons to protect the host of oxidative stress (Carr and Maggini, 2017; Chakraborty et al., 2014). Furthermore, AA has immunomodulatory effect and can improve the microbial diversity and function (Carr and Maggini, 2017; Traber et al., 2018). It has been reported that dietary supplementation with AA has had positive effects in reducing stress caused by the rapid growth rate and the ever-changing environmental conditions in poultry production (Lohakare et al., 2005).

Meanwhile Curcumin (CUR), a polyphenolic compound derived from turmeric, a product of the plant *Curcuma longa* (Malik and Mukherjee, 2014), has been widely used in the poultry industry as anticoccidial, anti-inflammatory, immunomodulatory, antimicrobial, antioxidant and to promote growth (Guil-Guerrero et al., 2017; Hernandez-Patlan et al., 2018b; Khan et al., 2012). However, some limitations of CUR are its poor aqueous solubility and intestinal permeability (Paolino et al., 2016). Despite this, the preparation of solid dispersions of

curcumin (SD-CUR) has achieved increases both the solubility and permeability of CUR given that the crystalline structure of CUR since it has been reported that the crystalline structure of CUR changes to amorphous form (Tran et al., 2015). Therefore, in the present study was evaluated and compared the effect of two natural antioxidants, AA and CUR formulated in a SD-CUR, in preventing or treating SE infection in broiler chickens.

MATERIALS AND METHODS

Preparation of treatments and diets

In the present study, two treatments were evaluated: 1) AA (99 – 100%, Food grade, Drogeria Cosmopolitan, Naucalpan, Edo. Mex., México) and 2) a solid dispersion of CUR (SD-CUR). The first treatment was prepared by granulating 90% AA with 10% microcrystalline cellulose (MCC) pH 102, followed by a drying step and subsequent sieving. Treatment 2 was prepared by dissolving 1 part of CUR in 9 parts of a polyvinylpyrrolidone (PVP) K30 solution, followed by the solvent evaporation at 40 °C and sieving. In both treatments, the sieving was done using a No. 25 mesh to obtain particles of around 700 µm. These treatments were included in starter basal diets without antibiotics, coccidiostats or enzymes (Table 1) at a concentration of 0.1% (1 Kg/Ton of feed). Starter diet was formulated to approximate the nutritional requirements of broiler chickens as recommended by the National Research Council (Council, 1994) and adjusted to breeder's recommendations (Cobb-Vantress, 2015). All animal handling procedures complied with the Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) at the University of Arkansas, Fayetteville (protocol #15006).

Salmonella strain and culture conditions

A primary poultry isolate of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis (SE) bacteriophage type 13A, was obtained from the USDA National Veterinary Services Laboratory (Ames, IA, United States). This strain is resistant to 25 µg/mL of novobiocin (NO, catalog no. N-1628, Sigma) and was selected due to its resistance to 20 µg/mL of nalidixic acid (NA, catalog no. N-4382, Sigma) in our laboratory. SE culture was performed according to previous publications (Hernandez-Patlan et al., 2018b) in order to obtain an approximate bacterial concentration of 4×10^4 and 4×10^7 cfu/mL. Concentrations of SE were further verified by

serial dilutions and plated on brilliant green agar (BGA, Catalog No. 70134, Sigma) with NO and NA for enumeration of actual cfu used in the experiment.

Experimental design

Two experiments were conducted to determine the effect of AA or SD-CUR at 0.1% in the feed in preventing or treating *Salmonella* infections in broiler chickens, as well as their influence on intestinal integrity:

- ***Salmonella infection prevention model***

Preventive model consisted of two independent trials with 45 day-of-hatch male Cobb-Vantress broiler chickens (Fayetteville, AR, USA) each. Chickens were randomly assigned to one of three groups (n = 15 chickens/group): 1) positive control group (PC), 2) 0.1% (w/w) AA, and 3) 0.1% (w/w) SD-CUR. Chicks were housed in brooder battery cages, provided with their respective diet and water ad libitum, as well as maintained at an age-appropriate temperature during the experiment. On day 6 of age, all chicks were orally challenged with 1×10^7 cfu of SE per bird and weighed to calculate the concentration of fluorescein isothiocyanate-dextran (FITC-d) to be administered according to the group body weight. Subsequently, 24 h post-SE challenge (7 day-old), chicks were euthanized by CO₂ inhalation, and blood samples were collected from the femoral vein and centrifuged ($1000 \times g$ for 15 min) to separate the serum for the determination of FITC-d concentration. Furthermore, samples of crop and cecal tonsils (CT) for SE and total aerobic bacteria (TAB) counts, as well as intestinal samples for total intestinal IgA levels were also collected.

- ***Salmonella infection treatment model***

This model involved the SE counts on day 3 and 10 post-SE challenge. For this, 90 one-day-old male Cobb-Vantress broiler chickens (Fayetteville, AR, USA) were challenged with 1×10^4 SE cfu per bird and randomly allocated to one of three groups (n=30 chickens): 1) positive control group (PC), 2) 0.1% (w/w) AA, and 3) 0.1% (w/w) SD-CUR. On day 3 and 10 post-SE challenge, 15 chicks from each group were humanely euthanized by CO₂ inhalation, respectively, but only the crop and CT from 12 birds per group were aseptically

collected for SE count. Blood samples were also collected from the femoral vein and centrifuged ($1000\times g$ for 15 min) to separate the serum for the determination of FITC-d concentration on day 10. The concentration of FITC-d administered was calculated based on group body weight at day 9 post-SE challenge. Furthermore, intestinal samples for total intestinal IgA levels were collected.

Salmonella and total aerobic bacteria (TAB) counts

In both experiments, the crop and CT were homogenized and diluted with saline (1:4 w/v), and 10-fold dilutions were plated on BGA with NO and NA for SE or Tryptic Soy Agar (TSA, catalog no. 211822, Becton Dickinson, Sparks, MD) for TAB (only in *Salmonella* infection prevention model). Plates were incubated at 37°C for 24 h to enumerate total SE or TAB colony forming units. Subsequently, the crop and CT samples were enriched in $2\times$ concentrated tetrathionate enrichment broth and further incubated at 37°C for 24 h. Enrichment samples were streaked onto Xylose Lysine Tergitol-4 (XLT-4, Catalog No. 223410, BD DifcoTM) selective media for confirmation of *Salmonella* incidence.

Serum FITC-d Determination

FITC-d (MW 3–5 kDa; Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) was given oral gavage to 12 broiler chickens from each group at a dose of 8.32 mg/kg of body weight one hour before the chicks were euthanized by CO₂ inhalation in order to evaluate the paracellular transport and mucosal barrier dysfunction (Vicuña et al., 2015a, 2015b). The 3 remaining broiler chickens of each group were used as controls. Then, the serum samples obtained from blood samples were properly diluted (1:5) and measured fluorometrically at an excitation wavelength of 485 nm and an emission wavelength of 528 nm (Synergy HT, Multi-mode microplate reader, BioTek Instruments, Inc., VT, USA) to determine the serum FITC-d concentration (Baxter et al., 2017).

Total intestinal immunoglobulin A (IgA) levels

In each experiment, an intestinal section of 5 cm from the Meckel's diverticulum to the ileocecal junction of 12 chickens from each group were taken to quantify total IgA levels as

previously described (Merino-Guzmán et al., 2017). Briefly, intestinal sections were rinsed three times with 5 mL of 0.9% saline; then the rinse was collected in a tube and centrifuged at $1864 \times g$ at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 10 min. Subsequently, the supernatants were separated and stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ until tested. A commercial indirect ELISA set was used to quantify IgA according to the manufacturer's instructions (Catalog No. E30-103, Bethyl Laboratories Inc., Montgomery, TX 77356). For this, supernatants were diluted (1:100), placed in 96-well plates (Catalog No. 439454, Nunc MaxiSorp, Thermo Fisher Scientific, Rochester, NY), and measured at 450 nm using an ELISA plate reader (Synergy HT, multi-mode microplate reader, BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA).

DATA AND STATISTICAL ANALYSIS

Data from SE and TAB counts (Log cfu/g), serum FITC-d concentration, and total intestinal IgA levels were subjected to analysis of variance (ANOVA) as a completely randomized design, using the General Linear Models procedure of SAS (SAS Institute, 2002). Significant differences among the means were determined by Duncan's multiple range test at $P < 0.05$. Enrichment data were expressed as positive/total chickens (%), and the percentage of SE positive samples was compared by chi-squared test of independence (Zar, 1984), testing all possible combinations to determine the significance ($P < 0.05$).

RESULTS

The results of the dietary administration of AA and SD-CUR at 0.1% in the feed as preventive agents on SE counts are shown in Table 1. In both independent trials, SE counts in crop were statistically 1.2 log lower in AA group compared to PC group ($P < 0.05$), whereas in CT, chickens supplemented with SD-CUR presented significantly lower SE counts and SE incidence ($P < 0.05$) in comparison with PC group. Furthermore, SOD activity was significantly higher in chickens supplemented with AA and SD-CUR in comparison with PC group, whereas total intestinal IgA levels were significantly lower in AA and SD-CUR groups compared to PC group (Table 2). However, serum FITC-d concentration was only significantly lower in SD-CUR group when compared to PC group (Table 2). Finally, TAB were significantly lower in chickens treated with AA compared to the other two groups and

chickens treated with SD-CUR tended to increase the counts of TAB ($P= 0.07$) compared to PC group.

Table 3 shows the counts and incidence of SE after 3 and 10 days of treatment with AA or SD-CUR at 0.1% in the feed post-SE challenge (therapeutic administration experiment). On day 3 post-SE challenge, SE counts in the crop and CT significantly decreased by 2.05 log and 3.54 log respectively, resulting in a significant decrease in the incidence of SE in both crop ($P<0.01$) and CT ($P<0.005$) when comparing AA group with PC group. Interestingly, although not significant, SE counts in the crop and CT was reduced by 1.02 log and 1.59 log, respectively in SD-CUR group compared to PC group. Meanwhile, on day 10 post-SE challenge, although the SE counts in crop were significantly lower in AA and SD-CUR groups when compared to PC group, only AA group significantly decreased the SE counts in CT by 4.71 log, as well as the incidence of SE ($P<0.001$) compared to PC group. Furthermore, serum FITC-d concentrations were significantly lower in AA and SD-CUR groups in comparison with PC group (Table 4). However, only total intestinal IgA levels were statistically lower in AA group compared to PC group. Finally, no significant differences in SOD activity were found between the groups (Table 4).

DISCUSSION

The production of antibiotic-free poultry is a worldwide trend (Cervantes, 2015) derived from the restriction of the use of antibiotics as a measure to reduce the problems of bacterial resistance and maintain the safety of food (Founou et al., 2016). However, this trend has increased the incidence of bacterial infections (Cheng et al., 2014), as well as the use of antibiotics, but at therapeutic doses (Borck Høg et al., 2016), which could cause a worse scenario of bacterial resistance. Then, the interest in finding viable alternatives with similar benefits to antibiotics has increased in recent years (Lillehoj et al., 2018), mainly for the purpose of reducing bacterial resistance problems and controlling foodborne pathogens such as *Salmonella* since both are important in public health (WHO, 2018). Therefore, in the present study was evaluated and compared the effect of two natural antioxidants, AA and CUR formulated in a SD-CUR, in preventing or treating SE infection in broiler chickens.

In the present study, dietary AA supplementation into the feed at 0.1% (w/w) in the *Salmonella* infection prevention model (Table 1) proved to be more effective in reducing the SE counts in crop that CT, in both trials. It could be explained because of the capability of AA, a weak acid ($pK_a=4.1$ and 11.6), to reduce the pH in crop by the release of protons (Mani-López et al., 2012; Verghese et al., 2017). However, it is known that AA begins to degrade as the pH increases (Wechtersbach and Cigić, 2007), which could have affected its acidifying capacity and other effects such as the stimulation of growth of beneficial bacteria as *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* due to its oxygen scavenging effect (Akin and Dasnik, 2015), thus justifying our findings in CT. Furthermore, it has been reported that even the inclusion of 1% AA in the feed had no effect in reducing the intestinal pH in chicks (Brown and Southern, 1985). In contrast, SD-CUR significantly reduced SE counts in CT by $\square 1.5$ log in both independent trials (Table 1). This reduction could be related to the increase in the solubility and permeability of CUR when formulated in a solid dispersion using PVP-K30 (Patlán et al., 2018; Xu et al., 2006; Zhang et al., 2018) and, therefore, to the possible improvement of its antimicrobial and immunoregulatory-immunostimulatory effects (Catanzaro et al., 2018; Hernandez-Patlan et al., 2018b; Zorofchian Moghadamtousi et al., 2014). Furthermore, it has been described that CUR supplementation promote changes in the composition and diversity of the gut microbiome since the relative abundance of *Lactobacillus* genus could be increased (Peterson et al., 2018; Varmuzova et al., 2015), having a beneficial effect since these have an important role in suppressing the growth of pathogenic bacteria in the intestine of chickens (Samarasinghe et al., 2003), according to their different antimicrobial mechanisms (Alagawany et al., 2018; Vieco-Saiz et al., 2019) and therefore, the maintenance of the gut homeostasis. Although lactic acid bacteria were not determined in the present study, it can be observed in Table 2 that only chickens treated with SD-CUR tended to increase the total anaerobic bacteria counts ($P= 0.07$), which would be consistent with other studies.

Previous studies have demonstrated that *Salmonella* can disrupt intercellular junctions, causing the increase of paracellular permeability and bacterial translocation to facilitate its pathogenicity (Brufau et al., 2016). In this sense, a way to evaluate the intestinal integrity is the determination of the serum FITC-d concentration, a molecule that under normal intestinal

conditions is impermeable due to its size (3–5 kDa) (Baxter et al., 2017; Tellez et al., 2014). The results showed that the group supplemented with SD-CUR presented significantly lower serum FITC-d concentrations compared to the control group and chickens supplemented with AA, which suggests that the intestinal integrity is maintained, possibly due to the reduction of *Salmonella* counts and the ability of CUR to restore the intestinal barrier function and expression of tight junction proteins, as well as the proliferation/regeneration of intestinal epithelium (Bereswill et al., 2010; Peterson et al., 2018; Wang et al., 2017).

Mucosal immunity provides the first line of defense against an oral exposure to pathogens in order to avoid their adherence and invasion (Sheela et al., 2003). It has been described that oral infection with *Salmonella* Enteritidis can induce a rapid and strong local inflammatory response in intestinal epithelium, leading to the secretion of pro-inflammatory cytokines (IL-1, IL-6, IL-23, IL-12, and IL-18, these last two lead to the production of interferon-gamma (IFN- γ)) and tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) followed by the production of IgA and antimicrobial peptides (defensins, cathelicidins, histatins, and lactoferrins) as a mechanism to limit the mucosal colonization of pathogens (Fasina et al., 2008; Kogut, 2000; Park et al., 2013; Patel and McCormick, 2014; Sheela et al., 2003). Despite the production of intestinal IgA is not immediate since it requires a period for its production (Penha Filho et al., 2012; Sheela et al., 2003), this immunoglobulin was measured in the present study to determine the effect of AA and CUR supplementation in broiler chickens. In both treatment groups, total intestinal IgA levels were significantly lower compared to PC group. This could be because both antioxidants have anti-inflammatory capacity. In the case of CUR, it has been reported that CUR does not only down-regulate pro-inflammatory cytokines to reduce local inflammation in the intestine, but also reduce systemic inflammation triggered by the release of lipopolysaccharide (LPS) into circulation (Ghosh et al., 2018; Gupta et al., 2012; Wang et al., 2017). Similar than CUR, AA is capable to decrease the expression of proinflammatory cytokines (IL-1, IL-6, IL-12), TNF- α and IFN- γ (El-Senousey et al., 2017; Kong et al., 2015). Therefore, this suggests a better intestinal health.

The results obtained of total intestinal IgA levels in the groups treated with AA and CUR are also supported by the significant increase in the antioxidant activity of SOD in the same groups compared to PC group since the increase in antioxidant capacity can lead to the

reduction of oxidative stress and inflammation (Johannah et al., 2018). SOD is one of the most important antioxidant enzymes involved in the protection of tissues from oxidative damage by regulating various reactive oxygen and nitrogen species (ROS/RNS), the first line of defense against microbial invasion and replication (Break et al., 2012). However, the increase in SOD activity in the groups treated with AA and CUR is due to the fact that these two antioxidants have the ability to stimulate the production of this antioxidant enzyme to protect the host against oxidative stress and lipid peroxidation (Al-Rubaei et al., 2014; Hu et al., 2019; Ismail et al., 2013).

Unlike the *Salmonella* infection prevention model, in the *Salmonella* infection treatment model, only the dietary administration of AA significantly decreased the counts and incidence of SE in both the crop and CT on days 3 and 10 post-SE challenge. This could be due to the fact that AA decreased the concentration of SE in crop due to its acidifying capacity as explained above (Mani-López et al., 2012; Verghese et al., 2017), thus the concentration of SE that reached the intestinal epithelium was much lower. Furthermore, these results are supported by those previously published by our laboratory where AA was able to reduce the concentration of SE in the compartment that simulates the crop in an *in vitro* avian digestion model (Hernandez-Patlan et al., 2018a). Although not significant, SE counts in CT at day 3 and 10 were reduced in chickens treated with SD-CUR by 1.59 log and 1.80 log, respectively. This was probably because the dose of SD-CUR was low to exert an efficient antimicrobial activity in this *Salmonella* infection model, which suggests that SD-CUR has a better effect in preventing SE infections. Despite these results, serum FITC-d concentration was reduced in both groups treated with antioxidants. In the case of the group treated with SD-CUR, this decrease in the serum FITC-d concentration could be due to the ability of CUR to restore the intestinal barrier function and expression of tight junction proteins, thereby reducing paracellular permeability (Ghosh et al., 2018; Peterson et al., 2018), while in the treatment with AA, the reduction of this permeability marker could be mainly due to the decrease in the severity of SE infection, which was also reflected in the lower total intestinal IgA levels compared to the group treated with SD-CUR and PC group. However, the group treated with SD-CUR also had lower IgA values compared to PC group, but not significant. In this *Salmonella* infection treatment model, it can be affirmed that the difference in total intestinal

IgA levels was due to the SE infection process since it has been reported that the production of these immunoglobulins are detected one-week post-infection (Wigley, 2014), therefore, it was expected that PC group would present higher levels. Finally, there are no significant differences in SOD activity when comparing groups. The high activity of SOD in the treated groups could be related to the capability of these two antioxidants to stimulate the production of antioxidant enzymes. However, the increase in SOD in PC group was because this antioxidant enzyme protects the tissues from the oxidative damage of ROS/RNS, a defense mechanism against microbial invasion and replication (Break et al., 2012).

In conclusion, the inclusion of AA and SD-CUR in the diets can be an alternative in the production of antibiotic-free poultry to reduce bacterial resistance problems and maintain food safety, which are extremely important in public health. The present study also suggests that SD-CUR supplementation has a better effect as a preventive of *Salmonella* infection, while AA could be used to treat *Salmonella* infection considering all the determinations evaluated. Further studies to confirm these results and know the mechanism of antimicrobial action of these antioxidants are currently being evaluated.

FUNDING

This research was supported by the Arkansas Bioscience Institute under the project: development of an avian model for evaluation early enteric microbial colonization on the gastrointestinal tract and immune function.

AUTHOR'S CONTRIBUTIONS

DH., BS., and GT. contributed to the overall study design and supervised all research. KP., JL., MB., carried out the experiments, DH. GT., XH., RM., AM., analyzed the data and drafted and revised the first version of the manuscript. DH., BS., prepared figures, BH., RL., GT., contributed partly to writing and finally revising the manuscript and data analysis, and were also responsible for the final editing of the manuscript. All the authors reviewed, edited, and approved the manuscript.

ACKNOWLEDGEMENT

The authors thank the CONACyT for the doctoral scholarship number 270728 and the financial support obtained through the program PAPIIT IN218115 of DGAPA-UNAM.

REFERENCES

1. Akın, M. B., and Dasnik, F. (2015). Effects of ascorbic acid and glucose oxidase levels on the viability of probiotic bacteria and the physical and sensory characteristics in symbiotic ice-cream. *Mljekarstvo časopis za unaprjeđenje Proizv. i prerade mlijeka* 65, 121–129.
2. Al-Rubaei, Z. M., Mohammad, T. U., and Ali, L. K. (2014). Effects of local curcumin on oxidative stress and total antioxidant capacity *in vivo* study. *Pak J Biol Sci* 17, 1237–1241.
3. Alagawany, M., El-Hack, M. E. A., Farag, M. R., Sachan, S., Karthik, K., and Dhama, K. (2018). The use of probiotics as eco-friendly alternatives for antibiotics in poultry nutrition. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 25, 10611–10618.
4. Baxter, M. F. A., Merino-Guzman, R., Latorre, J. D., Mahaffey, B. D., Yang, Y., Teague, K. D., et al. (2017). Optimizing Fluorescein Isothiocyanate Dextran Measurement As a Biomarker in a 24-h Feed Restriction Model to Induce Gut Permeability in Broiler Chickens. *Front. Vet. Sci.* 4, 56.
5. Bereswill, S., Muñoz, M., Fischer, A., Plickert, R., Haag, L.-M., Otto, B., et al. (2010). Anti-Inflammatory Effects of Resveratrol, Curcumin and Simvastatin in Acute Small Intestinal Inflammation. *PLoS One* 5, e15099. doi:10.1371/journal.pone.0015099.
6. Borck Høg, B., Korsgaard, H. B., Wolff Sönksen, U., Bager, F., Bortolaia, V., Ellis-Iversen, J., et al. (2016). DANMAP 2016-Use of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from food animals, food and humans in Denmark. Available at: http://orbit.dtu.dk/files/140535625/DANMAP_2016_LOW_241017.pdf.

7. Break, T. J., Jun, S., Indramohan, M., Carr, K. D., Sieve, A. N., Dory, L., et al. (2012). Extracellular superoxide dismutase inhibits innate immune responses and clearance of an intracellular bacterial infection. *J. Immunol.* 188, 3342–3350.
8. Brown, D. R., and Southern, L. L. (1985). Effect of citric and ascorbic acids on performance and intestinal pH of chicks. *Poult. Sci.* 64, 1399–1401.
9. Brufau, M. T., Campo-Sabariz, J., Bou, R., Carné, S., Brufau, J., Vila, B., et al. (2016). Salmosan, a β -galactomannan-rich product, protects epithelial barrier function in Caco-2 cells infected by *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. *J. Nutr.* 146, 1492–1498.
10. Carr, A., and Maggini, S. (2017). Vitamin C and immune function. *Nutrients* 9, 1211.
11. Catanzaro, M., Corsini, E., Rosini, M., Racchi, M., and Lanni, C. (2018). Immunomodulators inspired by nature: A review on curcumin and echinacea. *Molecules* 23, 2778.
12. Cervantes, H. M. (2015). Antibiotic-free poultry production: is it sustainable? *J. Appl. Poult. Res.* 24, 91–97.
13. Chakraborty, A., Ramani, P., Sherlin, H. J., Premkumar, P., and Natesan, A. (2014). Antioxidant and pro-oxidant activity of Vitamin C in oral environment. *Indian J. Dent. Res.* 25, 499.
14. Cheng, G., Hao, H., Xie, S., Wang, X., Dai, M., Huang, L., et al. (2014). Antibiotic alternatives: the substitution of antibiotics in animal husbandry? *Front. Microbiol.* 5, 217.
15. Cobb-Vantress, I. (2015). Cobb 500 broiler performance and nutrition supplement.
16. Council, N. R. (1994). Understanding and preventing violence, volume 3: social influences. National Academies Press.
17. El-Senousey, H. K., Chen, B., Wang, J. Y., Atta, A. M., Mohamed, F. R., and Nie, Q. H. (2017). Effects of dietary vitamin C, vitamin E, and alpha-lipoic acid supplementation on the antioxidant defense system and immune-related gene expression in broilers exposed to oxidative stress by dexamethasone. *Poult. Sci.* 97, 30–38.

18. Fasina, Y. O., Holt, P. S., Moran, E. T., Moore, R. W., Conner, D. E., and McKee, S. R. (2008). Intestinal cytokine response of commercial source broiler chicks to *Salmonella* Typhimurium infection. *Poult. Sci.* 87, 1335–1346.
19. Founou, L. L., Founou, R. C., and Essack, S. Y. (2016). Antibiotic Resistance in the Food Chain: A Developing Country-Perspective. *Front. Microbiol.* 7, 1881. doi:10.3389/fmicb.2016.01881.
20. Ghosh, S. S., He, H., Wang, J., Gehr, T. W., and Ghosh, S. (2018). Curcumin-mediated regulation of intestinal barrier function: the mechanism underlying its beneficial effects. *Tissue barriers* 6, e1425085.
21. Guil-Guerrero, J. L., Ramos, L., Paredes, J. C. Z., Carlosama-Yépez, M., Moreno, C., and Ruales, P. (2017). Effects of turmeric rhizome powder and curcumin in poultry production. A review. *J. Anim. Feed Sci* 26, 293–302.
22. Gupta, S. C., Patchva, S., Koh, W., and Aggarwal, B. B. (2012). Discovery of curcumin, a component of golden spice, and its miraculous biological activities. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 39, 283–299.
23. Hao, H., Cheng, G., Iqbal, Z., Ai, X., Hussain, H. I., Huang, L., et al. (2014). Benefits and risks of antimicrobial use in food-producing animals. *Front. Microbiol.* 5, 288.
24. Hernandez-Patlan, D., Solis-Cruz, B., Méndez-Albores, A., Latorre, J. D., Hernandez-Velasco, X., Tellez, G., et al. (2018a). Comparison of PrestoBlue® and plating method to evaluate antimicrobial activity of ascorbic acid, boric acid and curcumin in an *in vitro* gastrointestinal model. *J. Appl. Microbiol.* 124. doi:10.1111/jam.13659.
25. Hernandez-Patlan, D., Solis-Cruz, B., Pontin, K. P., Latorre, J. D., Baxter, M. F. A., Hernandez-Velasco, X., et al. (2018b). Evaluation of a Solid Dispersion of Curcumin With Polyvinylpyrrolidone and Boric Acid Against *Salmonella* Enteritidis Infection and Intestinal Permeability in Broiler Chickens: A Pilot Study. *Front. Microbiol.* 9, 1289. doi:10.3389/fmicb.2018.01289.
26. Hu, R., He, Y., Arowolo, M. A., Wu, S., and He, J. (2019). Polyphenols as Potential Attenuators of Heat Stress in Poultry Production. *Antioxidants* 8, 67.

27. Ismail, I. B., Al-Busadah, K. A., and El-Bahr, S. M. (2013). Oxidative stress biomarkers and biochemical profile in broilers chicken fed zinc bacitracin and ascorbic acid under hot climate. *Am J Biochem Mol Biol* 3, 202–214.
28. Johannah, N. M., Joseph, A., Maliakel, B., and Krishnakumar, I. M. (2018). Dietary addition of a standardized extract of turmeric (TurmaFEED TM) improves growth performance and carcass quality of broilers. *J. Anim. Sci. Technol.* 60, 8.
29. Khan, R. U., Naz, S., Javdani, M., Nikousefat, Z., Selvaggi, M., Tufarelli, V., et al. (2012). The use of Turmeric (*Curcuma longa*) in poultry feed. *Worlds. Poult. Sci. J.* 68, 97–103.
30. Kogut, M. H. (2000). Cytokines and prevention of infectious diseases in poultry: a review. *Avian Pathol.* 29, 395–404.
31. Kong, E. H., Ma, S. Y., Jeong, J. Y., and Kim, K. H. (2015). Effects of L-ascorbic acid on the production of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines in C57BL/6 mouse splenocytes. *Kosin Med. J.* 30, 41–49.
32. Lillehoj, H., Liu, Y., Calsamiglia, S., Fernandez-Miyakawa, M. E., Chi, F., Cravens, R. L., et al. (2018). Phytochemicals as antibiotic alternatives to promote growth and enhance host health. *Vet. Res.* 49, 76.
33. Lohakare, J. D., Ryu, M. H., Hahn, T.-W., Lee, J. K., and Chae, B. J. (2005). Effects of supplemental ascorbic acid on the performance and immunity of commercial broilers. *J. Appl. Poult. Res.* 14, 10–19.
34. Luna, A., Lema-Alba, R. C., Dambolena, J. S., Zygadlo, J. A., Lábaque, M. C., and Marin, R. H. (2017). Thymol as natural antioxidant additive for poultry feed: oxidative stability improvement. *Poult. Sci.* 96, 3214–3220.
35. Malik, P., and Mukherjee, T. K. (2014). Structure-function elucidation of antioxidative and prooxidative activities of the polyphenolic compound curcumin. *Chinese J. Biol.* 2014.
36. Mani-López, E., García, H. S., and López-Malo, A. (2012). Organic acids as antimicrobials to control *Salmonella* in meat and poultry products. *Food Res. Int.* 45, 713–721. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.04.043>.

37. Marshall, B. M., and Levy, S. B. (2011). Food animals and antimicrobials: impacts on human health. *Clin. Microbiol. Rev.* 24, 718–733.
38. Merino-Guzmán, R., Latorre, J. D., Delgado, R., Hernandez-Velasco, X., Wolfenden, A. D., Teague, K. D., et al. (2017). Comparison of total immunoglobulin A levels in different samples in Leghorn and broiler chickens. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* 7, 116–120.
39. Paolino, D., Vero, A., Cosco, D., Pecora, T. M. G., Cianciolo, S., Fresta, M., et al. (2016). Improvement of oral bioavailability of curcumin upon microencapsulation with methacrylic copolymers. *Front. Pharmacol.* 7, 485.
40. Park, S. H., Biswas, D., Lingbeck, J., Koo, O. K., and Ricke, S. C. (2013). Enhancement of chicken macrophage cytokine response to *Salmonella* Typhimurium when combined with bacteriophage P22. *FEMS Microbiol. Lett.* 339, 137–144.
41. Patel, S., and McCormick, B. A. (2014). Mucosal Inflammatory Response to *Salmonella* Typhimurium Infection. *Front. Immunol.* 5, 311. doi:10.3389/fimmu.2014.00311.
42. Patlán, D., SOLIS, B., Pontin, K. P., Latorre, J. D., Baxter, M. F. A., Hernandez-Velasco, X., et al. (2018). Evaluation of a solid dispersion of curcumin with polyvinylpyrrolidone and boric acid against *Salmonella* Enteritidis infection and intestinal permeability in broiler chickens: a pilot study. *Front. Microbiol.* 9, 1289.
43. Penha Filho, R. A. C., Moura, B. S., de Almeida, A. M., Montassier, H. J., Barrow, P. A., and Junior, A. B. (2012). Humoral and cellular immune response generated by different vaccine programs before and after *Salmonella* Enteritidis challenge in chickens. *Vaccine* 30, 7637–7643.
44. Peterson, C. T., Vaughn, A. R., Sharma, V., Chopra, D., Mills, P. J., Peterson, S. N., et al. (2018). Effects of turmeric and curcumin dietary supplementation on human gut microbiota: A double-blind, randomized, placebo-controlled pilot study.
45. Samarasinghe, K., Wenk, C., Silva, K., and Gunasekera, J. (2003). Turmeric (*Curcuma longa*) root powder and mannanoligosaccharides as alternatives to antibiotics in broiler chicken diets. *ASIAN Australas. J. Anim. Sci.* 16, 1495–1500.
46. SAS Institute (2002). STAT software for PC.

47. Sheela, R. R., Babu, U., Mu, J., Elankumaran, S., Bautista, D. A., Raybourne, R. B., et al. (2003). Immune responses against *Salmonella* enterica serovar Enteritidis infection in virally immunosuppressed chickens. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 10, 670–679.
48. Surai, P. F. (2007). Natural antioxidants in poultry nutrition: new developments. in *Proceedings of the 16th European symposium on poultry nutrition (World Poultry Science Association)*, 26–30.
49. Tellez, G., Latorre, J. D., Kuttappan, V. A., Kogut, M. H., Wolfenden, A., Hernandez-Velasco, X., et al. (2014). Utilization of rye as energy source affects bacterial translocation, intestinal viscosity, microbiota composition, and bone mineralization in broiler chickens. *Front. Genet.* 5, 339.
50. Traber, M. G., Buettner, G. R., and Bruno, R. S. (2018). The relationship between vitamin C status, the gut-liver axis, and metabolic syndrome. *Redox Biol.*, 101091.
51. Tran, K. A., Tran, T. T.-D., Van Vo, T., Van Tran, T., and Tran, P. H.-L. (2015). Investigation of Solid Dispersion Methods to Improve the Dissolution Rate of Curcumin. in *5th International Conference on Biomedical Engineering in Vietnam (Springer)*, 293–297.
52. V. T. Nair, D., Venkitanarayanan, K., and Kollanoor Johny, A. (2018). Antibiotic-Resistant *Salmonella* in the Food Supply and the Potential Role of Antibiotic Alternatives for Control. *Foods* 7. doi:10.3390/foods7100167.
53. Varmuzova, K., Matulova, M. E., Gerzova, L., Cejkova, D., Gardan-Salmon, D., Panhéleux, M., et al. (2015). Curcuma and Scutellaria plant extracts protect chickens against inflammation and *Salmonella* Enteritidis infection. *Poult. Sci.* 94, 2049–2058.
54. Verghese, R. J., Mathew, S. K., and David, A. (2017). Antimicrobial activity of vitamin c demonstrated on uropathogenic *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *J. Curr. Res. Sci. Med.* 3, 88.
55. Vicuña, E. A., Kuttappan, V. A., Galarza-Seeber, R., Latorre, J. D., Faulkner, O. B., Hargis, B. M., et al. (2015a). Effect of dexamethasone in feed on intestinal permeability, differential white blood cell counts, and immune organs in broiler chicks. *Poult. Sci.* 94, 2075–2080.

56. Vicuña, E. A., Kuttappan, V. A., Tellez, G., Hernandez-Velasco, X., Seeber-Galarza, R., Latorre, J. D., et al. (2015b). Dose titration of FITC-D for optimal measurement of enteric inflammation in broiler chicks. *Poult. Sci.* 94, 1353–1359.
57. Vieco-Saiz, N., Belguesmia, Y., Raspoet, R., Auclair, E., Gancel, F., Kempf, I., et al. (2019). Benefits and Inputs From Lactic Acid Bacteria and Their Bacteriocins as Alternatives to Antibiotic Growth Promoters During Food-Animal Production. *Front. Microbiol.* 10, 57.
58. Wang, J., Ghosh, S. S., and Ghosh, S. (2017). Curcumin improves intestinal barrier function: modulation of intracellular signaling, and organization of tight junctions. *Am. J. Physiol. Physiol.* 312, C438–C445.
59. Wechtersbach, L., and Cigić, B. (2007). Reduction of dehydroascorbic acid at low pH. *J. Biochem. Biophys. Methods* 70, 767–772.
60. WHO (2018). *Salmonella* (non-typhoidal). Available at: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs139/en/>.
61. Wigley, P. (2014). *Salmonella* enterica in the chicken: how it has helped our understanding of immunology in a non-biomedical model species. *Front. Immunol.* 5, 482.
62. Xu, D.-H., Wang, S., Jin, J., Mei, X.-T., and Xu, S.-B. (2006). Dissolution and absorption researches of curcumin in solid dispersions with the polymers PVP. *Asian J Pharmacodyn Pharmacokinet* 6, 343–349.
63. Zar, J. H. (1984). *Biostatistical analysis*. 2nd. Prentice Hall USA.
64. Zhang, Q., Polyakov, N. E., Chistyachenko, Y. S., Khvostov, M. V, Frolova, T. S., Tolstikova, T. G., et al. (2018). Preparation of curcumin self-micelle solid dispersion with enhanced bioavailability and cytotoxic activity by mechanochemistry. *Drug Deliv.* 25, 198–209.
65. Zorofchian Moghadamtousi, S., Abdul Kadir, H., Hassandarvish, P., Tajik, H., Abubakar, S., and Zandi, K. (2014). A review on antibacterial, antiviral, and antifungal activity of curcumin. *Biomed Res. Int.* 2014.

Table 1. *Salmonella* Enteritidis (SE) counts¹ and incidence³ in crop and cecal-toncils (CT) in broiler chickens supplemented with or without ascorbic acid (AA) and a solid dispersion of curcumin (SD-CUR) to prevent *Salmonella* infection².

Treatments	Crop Log ₁₀ cfu/gr	Crop + / - (%) ³	CT Log ₁₀ cfu/gr	CT + / - (%)
		Trial	1	
Ctrl	2.68 ± 0.47 ^{ab}	9/12 (75%)	4.01 ± 0.29 ^a	12/12 (100%)
AA	1.48 ± 0.53 ^b	5/12 (42%)	3.69 ± 0.17 ^a	12/12 (100%)
SD-CUR	3.08 ± 0.57 ^a	9/12 (75%)	2.42 ± 0.54 ^b	8/12 (67%)*
		Trial	2	
Ctrl	2.69 ± 0.48 ^a	9/12 (75%)	3.94 ± 0.22 ^a	12/12 (100%)
AA	1.49 ± 0.54 ^b	5/12 (42%)	3.80 ± 0.28 ^{ab}	12/12 (100%)
SD-CUR	3.19 ± 0.47 ^a	9/12 (75%)	2.34 ± 0.50 ^b	8/12 (67%)*

¹Data expressed in Log₁₀ cfu /g of tissue. Mean ± standard error from 12 chickens (P<0.05). ²Chickens were orally gavaged with 10⁷ cfu of *S. Enteritidis* per chicken at 6-d old, samples were collected 24 h later. ³Data expressed as positive/total chickens (%). * P<0.05. ^{a-b}Values within treatment columns for each treatment with different superscripts differ significantly (P<0.05).

Table 2. Determination of total aerobic bacteria (TAB), serum fluorescein isothiocyanate-dextran (FITC-d) concentration, superoxide dismutase (SOD) activity and total intestinal immunoglobulin A (IgA) levels in broiler chickens treated with or without ascorbic acid (AA) and a solid dispersion of curcumin (SD-CUR) to prevent *Salmonella* infection¹.

Treatments	TAB Log ₁₀ cfu/gr	FITC-d (µg/mL)	SOD (U/mL)	IgA (µg/mL)
Ctrl	7.96 ± 0.10 ^{ab}	0.591 ± 0.055 ^a	3.58 ± 0.31 ^b	14.21 ± 0.83 ^a
AA	7.92 ± 0.11 ^b	0.533 ± 0.034 ^{ab}	4.50 ± 0.35 ^a	11.51 ± 0.71 ^b
SD-CUR	8.27 ± 0.13 ^a	0.432 ± 0.037 ^b	4.48 ± 0.20 ^a	11.20 ± 0.53 ^b

¹Data are presented as mean ± standard error from 12 chickens (P<0.05). ^{a-b}Values within treatment columns for each treatment with different superscripts differ significantly (P<0.05).

Table 3. *Salmonella* Enteritidis (SE) counts¹ and incidence³ in crop and cecal-tonsils (CT) in broiler chickens supplemented with or without ascorbic acid (AA) and a solid dispersion of curcumin (SD-CUR) to treat *Salmonella* infection².

Treatments	Crop Log ₁₀ cfu/gr	Crop + / - (%)	CT Log ₁₀ cfu/gr	CT + / - (%)
Trial 3-d				
Ctrl	3.18 ± 0.46 ^a	10/12 (83%)	6.44 ± 0.15 ^a	12/12 (100%)
AA	1.13 ± 0.48 ^b	4/12 (33%) [*]	2.90 ± 0.91 ^b	6/12 (50%) ^{**}
SD-CUR	2.16 ± 0.46 ^{ab}	8/12 (67%)	4.85 ± 0.86 ^{ab}	9/12 (75%)
Trial 10-d				
Ctrl	2.93 ± 0.65 ^a	7/12 (58%)	6.61 ± 0.21 ^a	12/12 (100%)
AA	1.26 ± 0.54 ^b	4/12 (33%)	1.89 ± 0.81 ^b	4/12 (33%) ^φ
SD-CUR	0.97 ± 0.51 ^b	3/12 (25%)	4.81 ± 0.85 ^{ab}	9/12 (75%)

¹Data expressed in Log₁₀ cfu /g of tissue. Mean ± standard error from 12 chickens (P<0.05). ²Chickens were orally gavaged with 10⁷ cfu of *S. Enteritidis* per chicken at 6-d old, samples were collected 24 h later. ³Data expressed as positive/total chickens (%). ^{*} P<0.01; ^{**} P<0.005; ^φ P<0.001. ^{a-b}Values within treatment columns for each treatment with different superscripts differ significantly (P<0.05).

Table 4. Determination of total aerobic bacteria (TAB)serum fluorescein isothiocyanate–dextran (FITC-d) concentration, superoxide dismutase (SOD) activity and total intestinal immunoglobulin A (IgA) levels in broiler chickens treated with or without ascorbic acid (AA) and a solid dispersion of curcumin (SD-CUR) to treat *Salmonella* infection¹.

Treatments	FITC-d (μg/mL)	SOD (U/mL)	IgA (μg/mL)
Ctrl	0.700 ± 0.020 ^a	10.34 ± 0.67 ^a	14.34 ± 2.81 ^a
AA	0.457 ± 0.039 ^b	10.22 ± 0.72 ^a	9.18 ± 2.95 ^b
SD-CUR	0.489 ± 0.020 ^b	9.72 ± 0.82 ^a	11.26 ± 3.39 ^{ab}

¹Data are presented as mean ± standard error from 12 chickens (P<0.05). ^{a-b}Values within treatment columns for each treatment with different superscripts differ significantly (P<0.05).

XI. DISCUSIÓN

En la industria avícola, los patógenos entéricos bacterianos representan una seria amenaza ya que pueden contribuir a la transmisión de enfermedades zoonóticas (Anderson et al., 2016), así como incrementar la mortalidad en las parvadas de aves de corral, y afectar los parámetros productivos, los cuales están relacionados con pérdidas económicas y aumento en los costos totales de producción (Cervantes, 2015; Okuneye et al., 2016). Las infecciones por *Salmonella* y la enteritis necrótica (NE) producida por *Clostridium perfringens* (CP) son dos enfermedades bacterianas importantes en avicultura (Hossain et al., 2015; Majowicz et al., 2010). Cada año, se reportan millones de casos de salmonelosis a causa del consumo de alimentos contaminados como carne, huevo y/o productos a base de carne, lo que resulta en un estimado de 155,000 muertes (Bertelloni et al., 2017; Majowicz et al., 2010; Mani-López et al., 2012). También se ha reportado que *Salmonella* ha provocado pérdidas económicas significativas en avicultura debido a la reducción en parámetros productivos y la alta mortalidad en las parvadas (Biloni et al., 2013; Okuneye et al., 2016). Otra enfermedad económicamente importante que afecta la producción en avicultura es la NE inducida por CP y ocurre en dos formas. En su forma clínicamente aguda, la NE produce erosiones intestinales que involucran una destrucción severa de la mucosa intestinal lo cual aumenta marcadamente la mortalidad dentro de la parvada (Kaldhusdal and Løvland, 2000; McDevitt et al., 2006), mientras que la forma subclínica y crónica puede afectar significativamente los parámetros productivos (Skinner et al., 2010; Van Immerseel et al., 2009). El impacto económico de la NE en la industria avícola mundial se estima en más de 5-6 mil millones de dólares por año.

Sin embargo, con la restricción del uso de antibióticos en la producción animal (Hao et al., 2014) como medida para reducir los problemas de resistencia bacteriana, la incidencia de enfermedades como NE ha incrementado, por lo que la industria avícola se ha visto presionada para investigar y probar alternativas viables para reducir estos problemas y continuar brindando efectos positivos en los parámetros productivos. Algunas de estas

alternativas incluyen el uso de probióticos (levaduras o bacterias), derivados de plantas como aceites o extractos esenciales, acidificantes (ácidos orgánicos e inorgánicos), enzimas y lisozimas (Caly et al., 2015; Dahiya et al., 2006).

En este contexto, en el presente trabajo se plantearon diferentes experimentos con la finalidad de evaluar el efecto de la administración de aditivos como ácido ascórbico, ácido bórico, curcumina y sus combinaciones en la dieta para prevenir y controlar enfermedades bacterianas provocadas por *Salmonella* Enteritidis y *Clostridium perfringens* en pollos de engorda.

Por lo tanto, la discusión general se ha dividido en cinco secciones basadas en los artículos científicos publicados, con el propósito de ahondar en el objetivo de cada uno de estos.

11.1. ARTÍCULO 1: “Comparison of Prestoblue® and plating method to evaluate antimicrobial activity of ascorbic acid, boric acid and curcumin in an *in vitro* gastrointestinal model”

El objetivo de este estudio fue comparar el método convencional de siembra en placa con un método fluorométrico que utiliza PrestoBlue® como colorante para determinar la actividad antimicrobiana del ácido ascórbico (AA), ácido bórico (BA), curcumina (CUR) y sus combinaciones contra *Salmonella* Enteritidis (SE) en un modelo de digestión *in vitro* aviar que simula el buche, proventrículo e intestino.

Los resultados mostraron que los tratamientos con la mayor concentración de AA tenían la mejor actividad antimicrobiana en el primer compartimento que simulaba el buche, seguido de todos aquellos tratamientos con una alta proporción de AA en las mezclas probadas. Sin embargo, los tratamientos mencionados anteriormente no mostraron ningún efecto antimicrobiano en el compartimento que simulaba el intestino porque el AA comienza a degradarse. Esta degradación aeróbica es más rápida a medida que el pH aumenta, y los

compuestos formados aparentemente no tienen actividad antimicrobiana (Corvis et al., 2013; Tikekar et al., 2011). Por otro lado, aunque el tratamiento con solamente BA no tuvo efecto antimicrobiano en el compartimento que simula el buche, éste disminuyó completamente SE en el compartimento que simula el intestino cuando se probó a altas concentraciones. Esto puede deberse a la capacidad que tiene el BA para atravesar las membranas celulares de los microorganismos y afectar los procesos enzimáticos y no enzimáticos de las bacterias, como la supresión de la oxidación de NADH, la cual está relacionada con la disminución del metabolismo y, posterior muerte del microorganismo (Kabu and Akosman, 2013; Schmidt et al., 2010), ya que bajo las condiciones de pH del tracto gastrointestinal, el BA se encuentra en su forma no disociada, dado su $pK_a = 9.24$.

A pesar de que la CUR no tuvo efecto antimicrobiano en ninguno de los compartimentos del modelo digestivo debido a que la cantidad disuelta de CUR es muy baja dada su baja solubilidad en agua y a su pobre estabilidad conforme el pH aumenta (Priyadarsini, 2014), cuando BA y CUR estaban en una mezcla 1:1, la concentración de SE disminuyó significativamente más de $5 \log_{10}$ unidades formadoras de colonias (CFU) por ml en el compartimento que simulaba el intestino. Esto podría ser indicativo de un efecto sinérgico entre BA y CUR debido a la posible formación de rosocianina y rubrocurcumina, dos complejos muy estables (Halim et al., 2012; Wanninger et al., 2015). La formación de estos complejos pudo haber sido favorecida por el microentorno ácido presente en el compartimento que simulaba el buche y una fuente de oxalato que podría haber provenido del alimento (Tokusoglu et al., 2015). En contraste, la mezcla 1:1 de AA y CUR no mostró ningún efecto en los diferentes compartimentos del modelo digestivo, lo cual podría deberse a un efecto antagónico. Se ha descrito que durante la oxidación del AA a deshidroascórbico se produce peróxido de hidrógeno como subproducto, el cual afecta negativamente a los compuestos fenólicos, ya que se producen radicales fenoxi en la CUR, los cuales son menos reactivos (Naksuriya and Okonogi, 2015; Priyadarsini, 2014; Samad et al., 2016; Shrivastava et al., 2014). Por otra parte, cuando el AA y el BA están en contacto, reaccionan para formar dos complejos: monoésteres de boro y diésteres bicíclicos de boro (Hunt, 2003). Sin embargo, estos complejos no tienen efecto antimicrobiano contra SE.

Los resultados del presente estudio sugieren que existe un efecto antimicrobiano antagonista entre AA-CUR y AA-BA, así como un efecto antimicrobiano sinérgico entre BA-CUR.

Aunque no se incluyeron en el presente artículo los estudios de calorimetría diferencial de barrido (DSC) y espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR), los termogramas y espectros de infrarrojo obtenidos muestran que hay interacciones entre los componentes (**Anexo 1**).

1.2. ARTÍCULO 2: “Evaluation of a solid dispersion of curcumin with polyvinylpyrrolidone and boric acid against *Salmonella* Enteritidis infection and intestinal permeability in broiler chickens: A pilot study”

En el presente estudio se evaluó el efecto de la administración profiláctica de una dispersión sólida de curcumina (CUR) con polivinilpirrolidona K30 (PVP), ácido bórico (BA) y la combinación de éstos en la colonización de *Salmonella* Enteritidis (SE) e integridad intestinal en pollos de engorda.

Para esto se preparó una dispersión sólida de CUR con PVP, la cual resultó ser mas efectiva para reducir la concentración de SE en un modelo *in vitro*. Este resultado contrasta con los obtenidos en un estudio anterior, en donde CUR sin PVP no tuvo actividad antimicrobiana *in vitro* contra SE. Estos resultados se justifican dado el aumento de la solubilidad y la permeabilidad del CUR cuando se asocia con PVP como se muestra en los estudios *in vitro*. El aumento de la solubilidad podría deberse a la formación de complejos solubles entre CUR y PVP (Kaewnopparat et al., 2009). Además, la combinación 1:1 de CUR/PVP con BA confirmó el efecto antimicrobiano sinérgico descrito en publicaciones anteriores (Hernandez-Patlan et al., 2018a).

Este efecto sinérgico fue más evidente en los ensayos *in vivo* ya que la administración de CUR/PVP con BA redujo significativamente la colonización de SE en el buche y ciegos en

comparación con los pollos no tratados. Estudios anteriores demostraron que el efecto sinérgico entre CUR y BA podría deberse a su interacción para formar complejos más estables, como rosocianina y rubrocurcumina (Halim et al., 2012; Hernandez-Patlan et al., 2018a; Wanninger et al., 2015). Estos complejos podrían modificar las propiedades de la CUR, y consecuentemente mejorar la actividad antimicrobiana (Priyadarsini, 2014). Interesantemente, CUR/PVP también fue eficaz de reducir la colonización de SE, pero esta reducción ocurrió sólo en ciegos en ambos experimentos *in vivo*. Esto se debe probablemente a que la solubilidad de la CUR con PVP es casi dos veces mayor a pH 6.4 que a 1.2, y también debido al mayor tiempo de tránsito en el intestino. Varios estudios han demostrado que la solubilidad de la CUR aumenta más de 25 veces a pH 6.8 cuando se compara a pH 1.2 (Song et al., 2016). Se sabe que, a pH fisiológico, la CUR se degrada rápidamente a vainillina y ácido ferúlico (Kharat et al., 2017). Sin embargo, es probable que el uso de dispersiones sólidas entre CUR y PVP mejore la estabilidad del CUR a pH alcalino y, por lo tanto, evite o retarde su degradación. En contraste, en ambos ensayos *in vivo*, el BA no logró reducir significativamente la colonización de SE en buche y ciegos.

Además, el grupo tratado con CUR/PVP disminuyó significativamente los niveles séricos de fluoresceína isotiocianato dextran (FITC-d) en comparación con el grupo control no tratado. La reducción en los niveles séricos de FITC-d podría deberse al control de SE por la CUR/PVP y la capacidad de CUR para aumentar la proliferación-regeneración de las células del epitelio intestinal (Bereswill et al., 2010). Sin embargo, no hubo reducción del FITC-d en suero cuando se asoció la CUR/PVP con el BA (CUR/PVP-BA), lo que indica que CUR / PVP no debe estar asociado con BA para permitir la regeneración celular.

A pesar de que no es significativo, en los grupos tratados con el BA y CUR/PVP-BA los niveles de IgA fueron menores en comparación con el grupo control, pudiendo ser justificado por los menores conteos de SE obtenidos. No obstante, el grupo tratado con CUR/PVP mostró niveles más bajos de IgA intestinal dada la disminución en el recobro de SE y posiblemente a la actividad antiinflamatoria de la curcumina (Gupta et al., 2012). Interesantemente, la actividad de la superóxido dismutasa (SOD) se encontró elevada en los

grupos tratados con CUR/PVP y BA. Algunos estudios han demostrado que la suplementación con boro y CUR aumenta la actividad de SOD (Bhasker et al., 2016; Pizzorno, 2015; Shen et al., 2013).

Los resultados sugieren que el aumento en la solubilidad y estabilidad de CUR cuando se asocia con PVP podría estar involucrado en la mejora de la actividad antimicrobiana de CUR contra SE tanto *in vitro* como *in vivo*. Además, se confirmó en los ensayos *in vivo* que la combinación entre CUR/PVP y BA tiene un efecto sinérgico. Por otro lado, el grupo tratado con CUR/PVP fue capaz de reducir la permeabilidad intestinal de FITC-d y la IgA intestinal total, pero aumentó la actividad de SOD en comparación con el grupo control, mientras que CUR/PVP-BA solamente disminuyó la actividad de SOD.

1.3. ARTÍCULO 3: “Evaluation of the antimicrobial and intestinal integrity properties of boric acid in broiler chickens infected with *Salmonella* Enteritidis: Proof of concept”

En este trabajo se evaluó la actividad antimicrobiana del ácido bórico (BA) en la colonización por *Salmonella* Enteritidis (SE), así como su efecto en la integridad intestinal y microbiota cecal en pollos de engorda.

Los resultados de este estudio demostraron que, aunque no es significativo, la actividad antimicrobiana del BA, en el día 3 después del desafío con SE, permitió reducir la colonización por SE tanto en el buche como en los ciegos en comparación con el grupo control. Sin embargo, en el día 10 posterior al desafío con SE, BA redujo significativamente la colonización por SE en buche y ciegos. A pesar de que el BA es un ácido débil, no se disocia a un pH fisiológico o ácido dado su pKa de 9.1 (Kabu and Akosman, 2013). Entonces, el mecanismo antimicrobiano del BA se relaciona con su capacidad de difusión a través de la membrana celular de los microorganismos y su efecto posterior sobre los procesos enzimáticos y no enzimáticos (Hunt, 1998). Además, se ha descrito que el BA inhibe las

moléculas de señalización extracelular llamadas autoinductores en *Salmonella*, las cuales son moléculas sensibles al quórum (Chen et al., 2002) y algunas de ellas están relacionadas con la producción de biopelículas, un mecanismo bien documentado de resistencia microbiana. Aunque la suplementación con BA en la alimentación disminuyó significativamente la colonización intestinal de SE en pollos de engorda, el recuento total de bacterias aeróbicas o ácido láctico no se vio afectado.

Además, los pollos tratados con BA tuvieron una reducción significativa en la concentración de fluoresceína isotiocianato dextran (FITC-d) en suero y menores niveles de IgA intestinal total en comparación con el grupo control, lo cual está relacionado con una mejor salud intestinal ya que la FITC-d es impermeable debido a su peso molecular (3-5 kDa) (Baxter et al., 2017; Tellez et al., 2014) y la mayor producción de IgA intestinal está relacionada con la severidad de la infección por *Salmonella*.

En el análisis de la microbiota sólo las Actinobacterias fueron significativamente más bajas en el grupo de BA en comparación con el grupo control. Esto podría estar relacionado con la efectividad del BA reduciendo SE, ya que tanto los filos Actinobacteria como Proteobacteria aumentan en pollos infectados con SE (Mon et al., 2015). Además, varios estudios también han informado que SE aumenta la abundancia de la familia de las Enterobacteriaceae pero reduce la abundancia de bacterias productoras de ácidos grasos de cadena corta, particularmente de las tres familias principales, Clostridiaceae, Lachnospiraceae y Ruminococcaceae para favorecer su colonización en el intestino (Mon et al., 2015). Estos hallazgos concuerdan con nuestros resultados. Sin embargo, a pesar de que no se observaron diferencias estadísticas significativas, la abundancia en la familia de estas bacterias fue opuesta en el grupo de BA, lo que sugiere que BA podría mantener la homeostasis intestinal, así como el equilibrio en la microbiota debido a la efectividad del BA para controlar la infección por SE y por lo tanto, proporcionar una mejor salud intestinal.

Los resultados del presente estudio respaldan nuestros hallazgos previos en modelos *in vitro* (Hernandez-Patlan et al., 2018a) y sugieren que el BA funciona mejor como agente

terapéutico que como profiláctico en infecciones por SE en pollos de engorda (Hernandez-Patlan et al., 2018b). Además, la administración de BA en la dieta tuvo una reducción significativa en los niveles séricos de FITC-d y niveles más bajos de IgA intestinal, que están relacionados con una mejor salud intestinal. Aunque en el análisis de microbiota sólo la abundancia del filo Actinobacteria y la diversidad beta fueron significativamente diferentes al comparar los grupos, los resultados sugieren que el BA podría mantener la homeostasis intestinal, así como el equilibrio en la microbiota debido a su efectividad para controlar infecciones por SE.

1.4. ARTÍCULO 4: “Evaluation of the dietary supplementation of a formulation containing ascorbic acid and a solid dispersion of curcumin with boric acid against *Salmonella* Enteritidis and necrotic enteritis in broiler chickens”

Los objetivos de este trabajo fueron evaluar el efecto de la administración profiláctica o terapéutica de una mezcla de ácido ascórbico (AA) y una dispersión sólida de curcumina (CUR) con polivinilpirrolidona K30 (PVP) y ácido bórico (BA) (AA-CUR/PVP-BA) en pollos de engorda infectados con *Salmonella* Enteritidis (SE), así como su impacto en un modelo de laboratorio de desafío de enteritis necrótica (NE) en pollos de engorda.

La administración de AA-CUR/PVP-BA (1:1:1) con fines profilácticos en pollos de engorda fue capaz de reducir significativamente la concentración de SE en ciegos, pero no en el buche. Estudios previos *in vitro* e *in vivo* realizados con anterioridad mostraron que el AA tenía las mejores propiedades antimicrobianas contra SE en el compartimento que simulaba el buche, pero no en el compartimento intestinal (Hernandez-Patlan et al., 2018a), mientras que la administración de CUR/PVP-BA disminuyó significativamente la concentración de SE en pollos de engorda (Hernandez-Patlan et al., 2018b). Por lo tanto, la reducción en la concentración de SE en los ciegos solo podría estar relacionada con el efecto antimicrobiano de CUR/PVP-BA derivado del efecto sinérgico entre CUR/PVP y BA.

Además, la administración de AA-CUR/PVP-BA durante 10 días después del desafío con SE en pollos de engorda redujo los conteos de SE tanto en el buche como en los ciegos. Probablemente, la disminución en los conteos de SE en el buche se debió a la combinación del efecto acidificante del AA, dada la liberación de protones en el medio ($pK_a = 4.1$ y 11.6) (Mani-López et al., 2012) y al efecto antimicrobiano de CUR/PVP-BA. Sin embargo, la disminución de SE en los ciegos estuvo estrechamente relacionada con el efecto antimicrobiano de CUR/PVP-BA, ya que se ha informado de que el AA no es capaz de acidificar el intestino de los pollitos, incluso cuando se administra al 1% en la alimentación (Brown and Southern, 1985) y también es inestable a un pH neutro (Wechtersbach and Cigić, 2007). La efectividad de CUR/PVP-BA contra SE puede deberse a la mejora en la solubilidad y estabilidad de CUR por su asociación con PVP en comparación con solamente CUR y su interacción con BA para formar complejos con mejores propiedades antimicrobianas (Hernandez-Patlan et al., 2018a; Priyadarsini, 2014), así como al mayor tiempo de residencia en el intestino. Así mismo, los pollos tratados con AA-CUR/PVP-BA tuvieron concentraciones séricas de fluoresceína isotiocianato dextran (FITC-d) y niveles de IgA intestinal total más bajos en comparación con el grupo control no tratado en el día 10 después del desafío con SE.

Considerando que la administración profiláctica o terapéutica de AA-CUR / PVP-BA redujo significativamente la concentración de SE en pollos de engorda, también se evaluó su impacto en un modelo de NE de 21 días en pollos de engorda. Durante los primeros siete días después del desafío con *Salmonella* Typhimurium (ST), el peso (BW) en el control positivo (PC) y el grupo tratado con AA-CUR/PVP-BA se redujeron significativamente ($p < 0.05$) en comparación con el grupo negativo (NC), lo que confirma que ST tuvo un impacto negativo en BW (Shivaramaiah et al., 2011). Sin embargo, en la segunda semana, no hubo diferencias significativas en BW y peso ganado (BWG) al comparar los grupos NC y AA-CUR/PVP-BA. Probablemente, la concentración de ST disminuyó debido al efecto acidificante de AA y el efecto antimicrobiano de CUR/PVP-BA.

Aunque los desafíos de *Eimeria máxima* (EM) y *Clostridium perfringens* (CP) tuvieron efectos adversos en los parámetros productivos en PC y en los pollos tratados con AA-CUR/PVP-BA en comparación con NC, la administración en a dieta de AA-CUR/PVP-BA mejoró numéricamente la conversión alimenticia (FCR, 0–21 d) en comparación con PC. Además, los pollos suplementados con AA-CUR/PVP-BA no mostraron reducción en el peso corporal después del desafío con CP como lo hizo el grupo PC, y presentaron una reducción numérica en las lesiones en íleon (ILS), translocación bacteriana (BT) y concentración de FITC-d en suero, en comparación con el grupo PC ($p = 0.07$). Este comportamiento puede ser debido a las propiedades anticoccidiales de la CUR (Abbas et al., 2010; Allen et al., 1998; Galli et al., 2018; Kim et al., 2013). Por lo tanto, los resultados obtenidos en este experimento sugieren que la suplementación con AA-CUR/PVP-BA en la alimentación tuvo un efecto positivo disminuyendo ligeramente los efectos de la coccidia, un factor predisponente bien documentado en la NE.

Interesantemente, los pollos del grupo PC mostraron un aumento significativo en los niveles de IgA intestinal total en comparación con los grupos NC y AA-CUR/PVP-BA. Esta disminución significativa de los niveles de IgA en el grupo suplementado con AA-CUR/PVP-BA podría estar relacionada con las propiedades antiinflamatorias de CUR y BA. Mientras que la CUR reduce las respuestas inflamatorias al regular la producción de algunas citocinas proinflamatorias (Gupta et al., 2012; Kim et al., 2013), el BA tiene la capacidad de reducir los niveles de biomarcadores inflamatorios como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) e Interleucina-6 (IL-6) (Jonker et al., 2010; Naghii et al., 2011).

En conclusión, la administración profiláctica o terapéutica de AA-CUR/PVP-BA redujo significativamente la concentración de SE en pollos de engorda. Además, la administración dietética de AA-CUR/PVP-BA tuvo un efecto positivo en la disminución leve del impacto negativo de la NE. Sin embargo, es evidente que AA-CUR/PVP-BA mostró un mejor efecto en la reducción de la concentración de SE que en el modelo NE.

1.5. ARTÍCULO 5: “Comparison of the effect of ascorbic acid and curcumin formulated in a solid dispersion on the prevention and treatment of *Salmonella* Enteritidis infection in broiler chickens”

En el presente estudio se evaluó y comparó el efecto de dos antioxidantes naturales, ácido ascórbico (AA) y curcumina (CUR) formulada en una dispersión sólida (SD-CUR), para prevenir o tratar la infección por *Salmonella* Enteritidis (SE) en pollos de engorda.

La suplementación dietética con AA en el alimento al 0.1% (p/p) en el modelo de prevención de la infección por *Salmonella* demostró ser más eficaz para reducir los recuentos de SE en el buche que en los ciegos. Esto podría explicarse debido a la capacidad del AA, un ácido débil ($pK_a = 4.1$ y 11.6), para reducir el pH en el buche mediante la liberación de protones (Mani-López et al., 2012; Verghese et al., 2017). Sin embargo, se sabe que el AA comienza a degradarse a medida que aumenta el pH (Wechtersbach and Cigić, 2007), lo cual pudo haber afectado su capacidad acidificante y otros efectos, como la estimulación del crecimiento de bacterias beneficiosas como *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* debido a su efecto captador de oxígeno (Akın and Dasnik, 2015), por lo que justificaría nuestros hallazgos en los ciegos. Además, se ha reportado que incluso la suplementación con 1% (p/p) de AA en el alimento no tuvo efecto en la reducción del pH intestinal en los pollos (Brown and Southern, 1985). En contraste, SD-CUR redujo significativamente los recuentos de SE en los ciegos aproximadamente $1.5 \log_{10}$. Esta reducción podría estar relacionada con el aumento de la solubilidad y la permeabilidad de la CUR cuando se formula en dispersiones sólidas utilizando PVP-K30 (Hernandez-Patlan et al., 2018b; Xu et al., 2006; Zhang et al., 2018) y, por lo tanto, a la posible mejora de sus efectos antimicrobianos e inmunorreguladores-inmunoestimulantes (Catanzaro et al., 2018; Hernandez-Patlan et al., 2018b; Zorofchian Moghadamtousi et al., 2014). Además, se ha descrito que la suplementación con CUR promueve cambios en la composición y diversidad de la microbiota intestinal ya que la abundancia relativa del género *Lactobacillus* podría aumentar (Peterson et al., 2018; Varmuzova et al., 2015), teniendo un efecto beneficioso ya que estos tienen un

papel importante en la supresión del crecimiento de bacterias patógenas en el intestino de los pollos (Samarasinghe et al., 2003) debido a sus diferentes mecanismos antimicrobianos (Alagawany et al., 2018; Vieco-Saiz et al., 2019); y por lo tanto, el mantenimiento de la homeostasis intestinal. Aunque las bacterias del ácido lácticas no se determinaron en el presente estudio, los pollos tratados con SD-CUR tendieron a aumentar el recuento total de bacterias anaeróbicas ($P = 0.07$), lo cual sería consistente con otros estudios.

La integridad intestinal fue medida indirectamente a partir de la determinación de la concentración sérica de la fluoresceína isotiocianato dextran (FITC-d), una molécula que en condiciones intestinales normales es impermeable debido a su tamaño (3–5 kDa) (Baxter et al., 2017; Tellez et al., 2014). Los resultados mostraron que el grupo suplementado con SD-CUR presentó concentraciones séricas de FITC-d significativamente más bajas en comparación con el grupo control y los pollos suplementados con el AA, lo que sugiere que la integridad intestinal se mantiene, posiblemente debido a la reducción de los recuentos de *Salmonella* y la capacidad de CUR para restaurar la función de la barrera intestinal y la expresión de las proteínas de unión “tight junction”, así como la proliferación/regeneración del epitelio intestinal (Bereswill et al., 2010; Peterson et al., 2018; Wang et al., 2017).

Los resultados obtenidos de los niveles de IgA intestinal total en los grupos tratados con el AA y la SD-CUR están respaldados por el aumento significativo de la actividad antioxidante de la superóxido dismutasa (SOD) en estos grupos en comparación con el grupo control positivo, ya que el aumento de la capacidad antioxidante puede conducir a la reducción del estrés oxidativo e inflamación (Johannah et al., 2018). La SOD es una de las enzimas antioxidantes más importantes involucradas en la protección de los tejidos por el daño oxidativo mediante la regulación de las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (ROS/RNS), la primera línea de defensa contra la invasión y replicación microbiana (Break et al., 2012). Sin embargo, el aumento en la actividad de SOD en los grupos tratados con el AA y la SD-CUR se debe al hecho de que estos dos antioxidantes tienen la capacidad de estimular la producción de esta enzima antioxidante para proteger al huésped contra el estrés

oxidativo y la peroxidación de lípidos (Al-Rubaei et al., 2014; Hu et al., 2019; Ismail et al., 2013).

A diferencia del modelo de prevención de la infección por *Salmonella*, en el modelo de tratamiento de la infección por *Salmonella*, sólo la administración dietética del AA redujo significativamente los recuentos y la incidencia de SE tanto en el buche como en los ciegos a los días 3 y 10 después del desafío con SE. Esto podría deberse al hecho de que el AA disminuyó la concentración de SE en el buche debido a su capacidad acidificante como se explicó anteriormente (Mani-López et al., 2012; Verghese et al., 2017), por lo tanto la concentración de SE que alcanzó el epitelio intestinal fue mucho menor. Además, estos resultados están respaldados por los publicados previamente por nuestro laboratorio donde el AA pudo reducir la concentración de SE en el compartimento que simula el buche en un modelo de digestión aviar *in vitro* (Hernandez-Patlan et al., 2018a). Aunque no fue significativo, los recuentos de SE en los ciegos al día 3 y 10 se redujeron en los pollos tratados con la SD-CUR en 1.59 log y 1.80 log, respectivamente. Esto probablemente se debió a que la dosis de la SD-CUR fue baja para ejercer una actividad antimicrobiana eficiente en este modelo de infección por *Salmonella*, lo que sugiere que la SD-CUR tiene un mejor efecto en la prevención de infecciones por SE.

En conclusión, la inclusión del AA y la SD-CUR en las dietas puede ser una alternativa en producción avícola libre de antibióticos para reducir los problemas de resistencia bacteriana y mantener la seguridad alimentaria, las cuales son extremadamente importantes para la salud pública. El presente estudio también sugiere que la suplementación con la SD-CUR tiene un mejor efecto previniendo la infección por *Salmonella*, mientras que el AA podría usarse para tratar la infección por *Salmonella* al considerar todas las determinaciones evaluadas.

XII. CONCLUSIONES

- Los resultados del presente trabajo sugieren que el uso de aditivos tales como el ácido ascórbico (AA), el ácido bórico (BA), la curcumina (CUR) y sus combinaciones pueden ser alternativas potenciales y viables al reemplazo de los antibióticos en producción avícola con la finalidad de prevenir y/o controlar infecciones bacterianas.
- A pesar de la baja estabilidad del AA tanto a condiciones ambientales como fisiológicas, este aditivo podría ser administrado en conjunto con el alimento para el control de *Salmonella* Enteritidis (SE) principalmente en la parte superior del tracto gastrointestinal (buche) de los pollos de engorda debido a su capacidad acidificante.
- A diferencia del AA, el BA demostró ser más efectivo controlando que previniendo infecciones por SE en pollos de engorda. Además, de que podría mantener la homeostasis intestinal, así como el equilibrio en la microbiota, lo cual está relacionado con una mejor salud intestinal
- La preparación de dispersiones sólidas de CUR con polivinilpirrolidona K30 (PVP) como estrategia para incrementar la solubilidad y estabilidad de la CUR favoreció su efecto antimicrobiano contra SE tanto en el modelo *in vitro* que simula los tres compartimientos principales del pollo de engorda (buche, proventrículo e intestino) así como en pollos de engorda infectados con SE. Sin embargo, es un hecho de que ésta es más eficaz previniendo infecciones por SE.

- Mientras la combinación entre CUR/PVP y BA mostró un efecto antimicrobiano sinérgico contra SE en modelos *in vitro* e *in vivo*, la combinación entre AA-CUR y AA-BA presentó un efecto antagónico. Por lo tanto, la combinación de aditivos puede ser una estrategia para potencializar efectos; pudiendo ser una alternativa bastante viable al uso de los antibióticos en producción avícola.
- La administración profiláctica o terapéutica de AA-CUR/PVP-BA redujo significativamente la concentración de SE en pollos de engorda. Además, tuvo un efecto positivo disminuyendo ligeramente el impacto negativo de la enteritis necrótica (NE). Sin embargo, es evidente que presentó mejor actividad contra SE.

XIII. REFERENCIAS

- Abbas, R. Z., Iqbal, Z., Khan, M. N., Zafar, M. A., and Zia, M. A. (2010). Anticoccidial activity of *Curcuma longa* L. in broilers. *Brazilian Arch. Biol. Technol.* 53, 63–67.
- Ahmadu, S., Mohammed, A. A., Buhari, H., and Auwal, A. (2016). An overview of vitamin C as an antistress in poultry. *Malays J Vet Res* 7, 9–22.
- Ak, T., and Gülçin, İ. (2008). Antioxidant and radical scavenging properties of curcumin. *Chem. Biol. Interact.* 174, 27–37. doi:<https://doi.org/10.1016/j.cbi.2008.05.003>.
- Akın, M. B., and Dasnik, F. (2015). Effects of ascorbic acid and glucose oxidase levels on the viability of probiotic bacteria and the physical and sensory characteristics in symbiotic ice-cream. *Mljekarstvo časopis za unaprjeđenje Proizv. i prerade mlijeka* 65, 121–129.
- Al-Niaimi, F., and Chiang, N. Y. Z. (2017). Topical vitamin C and the skin: mechanisms of action and clinical applications. *J. Clin. Aesthet. Dermatol.* 10, 14.
- Al-Rubaei, Z. M., Mohammad, T. U., and Ali, L. K. (2014). Effects of local curcumin on oxidative stress and total antioxidant capacity in vivo study. *Pak J Biol Sci* 17, 1237–1241.
- Alagawany, M., El-Hack, M. E. A., Farag, M. R., Sachan, S., Karthik, K., and Dhama, K. (2018). The use of probiotics as eco-friendly alternatives for antibiotics in poultry nutrition. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 25, 10611–10618.
- Allen, H. K., Levine, U. Y., Looft, T., Bandrick, M., and Casey, T. A. (2013). Treatment, promotion, commotion: antibiotic alternatives in food-producing animals. *Trends Microbiol.* 21, 114–119.
- Allen, P. C., Danforth, H. D., and Augustine, P. C. (1998). Dietary modulation of avian coccidiosis. *Int. J. Parasitol.* 28, 1131–1140.
- Amani, S., and Moeini, M. (2016). Comparison of boric acid and combination drug of polymyxin, neomycin and hydrocortisone (Polymyxin NH) in the treatment of acute otitis externa. *J. Clin. diagnostic Res. JCDR* 10, MC01.

- Anand, P., Kunnumakkara, A. B., Newman, R. A., and Aggarwal, B. B. (2007). Bioavailability of curcumin: problems and promises. *Mol. Pharm.* 4, 807–818.
- Anderson, T. C., Nguyen, T.-A., Adams, J. K., Garrett, N. M., Bopp, C. A., Baker, J. B., et al. (2016). Multistate outbreak of human *Salmonella* Typhimurium infections linked to live poultry from agricultural feed stores and mail-order hatcheries, United States 2013. *One Heal.* 2, 144–149.
- Antunes, P., Mourão, J., Campos, J., and Peixe, L. (2016). Salmonellosis: the role of poultry meat. *Clin. Microbiol. Infect.* 22, 110–121.
- Atterbury, R. J., Hobley, L., Till, R., Lambert, C., Capeness, M. J., Lerner, T. R., et al. (2011). Effects of orally administered *Bdellovibrio bacteriovorus* on the well-being and *Salmonella* colonization of young chicks. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 5794–5803.
- Baptiste, K. E., and Kyvsgaard, N. C. (2017). Do antimicrobial mass medications work? A systematic review and meta-analysis of randomised clinical trials investigating antimicrobial prophylaxis or metaphylaxis against naturally occurring bovine respiratory disease. *Pathog. Dis.* 75.
- Barlow, M. (2009). “What antimicrobial resistance has taught us about horizontal gene transfer,” in *Horizontal Gene Transfer* (Springer), 397–411.
- Baxter, M. F. A., Merino-Guzman, R., Latorre, J. D., Mahaffey, B. D., Yang, Y., Teague, K. D., et al. (2017). Optimizing Fluorescein Isothiocyanate Dextran Measurement As a Biomarker in a 24-h Feed Restriction Model to Induce Gut Permeability in Broiler Chickens. *Front. Vet. Sci.* 4, 56.
- Began, G., Sudharshan, E., and Appu Rao, A. G. (1998). Inhibition of lipoxygenase 1 by phosphatidylcholine micelles-bound curcumin. *Lipids* 33, 1223–1228.
- Bereswill, S., Muñoz, M., Fischer, A., Plickert, R., Haag, L.-M., Otto, B., et al. (2010). Anti-Inflammatory Effects of Resveratrol, Curcumin and Simvastatin in Acute Small Intestinal Inflammation. *PLoS One* 5, e15099. doi:10.1371/journal.pone.0015099.
- Bertelloni, F., Tosi, G., Massi, P., Fiorentini, L., Parigi, M., Cerri, D., et al. (2017). Some pathogenic characters of paratyphoid *Salmonella* enterica strains isolated from poultry. *Asian Pac. J. Trop. Med.* 10, 1161–1166. doi:https://doi.org/10.1016/j.apjtm.2017.10.023.

- Bhasker, T. V., Gowda, N. K. S., Mondal, S., Krishnamoorthy, P., Pal, D. T., Mor, A., et al. (2016). Boron influences immune and antioxidant responses by modulating hepatic superoxide dismutase activity under calcium deficit abiotic stress in Wistar rats. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 36, 73–79.
- Biloni, A., Quintana, C. F., Menconi, A., Kallapura, G., Latorre, J., Pixley, C., et al. (2013). Evaluation of effects of EarlyBird associated with FloraMax-B11 on *Salmonella* Enteritidis, intestinal morphology, and performance of broiler chickens. *Poult. Sci.* 92, 2337–2346.
- Borck Høg, B., Korsgaard, H. B., Wolff Sönksen, U., Bager, F., Bortolaia, V., Ellis-Iversen, J., et al. (2016). DANMAP 2016-Use of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from food animals, food and humans in Denmark. Available at: http://orbit.dtu.dk/files/140535625/DANMAP_2016_LOW_241017.pdf.
- Break, T. J., Jun, S., Indramohan, M., Carr, K. D., Sieve, A. N., Dory, L., et al. (2012). Extracellular superoxide dismutase inhibits innate immune responses and clearance of an intracellular bacterial infection. *J. Immunol.* 188, 3342–3350.
- Brown, D. R., and Southern, L. L. (1985). Effect of citric and ascorbic acids on performance and intestinal pH of chicks. *Poult. Sci.* 64, 1399–1401.
- Butaye, P., Devriese, L. A., and Haesebrouck, F. (2003). Antimicrobial growth promoters used in animal feed: effects of less well known antibiotics on gram-positive bacteria. *Clin. Microbiol. Rev.* 16, 175–188.
- Caly, D. L., D’Inca, R., Auclair, E., and Drider, D. (2015). Alternatives to antibiotics to prevent necrotic enteritis in broiler chickens: a microbiologist’s perspective. *Front. Microbiol.* 6, 1336.
- Catanzaro, M., Corsini, E., Rosini, M., Racchi, M., and Lanni, C. (2018). Immunomodulators inspired by nature: A review on curcumin and echinacea. *Molecules* 23, 2778.
- Cervantes, H. M. (2015). Antibiotic-free poultry production: is it sustainable? *J. Appl. Poult. Res.* 24, 91–97.
- Chan, M. M.-Y., Huang, H.-I., Fenton, M. R., and Fong, D. (1998). In Vivo Inhibition of Nitric Oxide Synthase Gene Expression by Curcumin, a Cancer Preventive Natural Product with Anti-Inflammatory Properties. *Biochem. Pharmacol.* 55, 1955–1962.

- doi:[https://doi.org/10.1016/S0006-2952\(98\)00114-2](https://doi.org/10.1016/S0006-2952(98)00114-2).
- Chen, X., Schauder, S., Potier, N., Van Dorsselaer, A., Pelczer, I., Bassler, B. L., et al. (2002). Structural identification of a bacterial quorum-sensing signal containing boron. *Nature* 415, 545.
- Cheng, G., Hao, H., Xie, S., Wang, X., Dai, M., Huang, L., et al. (2014). Antibiotic alternatives: the substitution of antibiotics in animal husbandry? *Front. Microbiol.* 5, 217.
- Codex Alimentarius (2005). Code of practice to minimize and contain antimicrobial resistance. *CAC/RCP 61-2005*. www.codexalimentarius.net/download/standards/10213/CXP_061e.pdf.
- Corvis, Y., Menet, M.-C., Négrier, P., Lazerges, M., and Espeau, P. (2013). The role of stearic acid in ascorbic acid protection from degradation: a heterogeneous system for homogeneous thermodynamic data. *New J. Chem.* 37, 761–768.
- da Costa, P., Loureiro, L., and Matos, A. (2013). Transfer of multidrug-resistant bacteria between intermingled ecological niches: the interface between humans, animals and the environment. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 10, 278–294.
- Dahiya, J. P., Wilkie, D. C., Van Kessel, A. G., and Drew, M. D. (2006). Potential strategies for controlling necrotic enteritis in broiler chickens in post-antibiotic era. *Anim. Feed Sci. Technol.* 129, 60–88.
- Dhama, K., Tiwari, R., Khan, R. U., Chakraborty, S., Gopi, M., Karthik, K., et al. (2014). Growth Promoters and Novel Feed Additives Improving Poultry Production and Health, Bioactive Principles and Beneficial Applications: The Trends and Advances-A Review. *Pharmacology* 10, 129–159.
- Diarra, M. S., and Malouin, F. (2014). Antibiotics in Canadian poultry productions and anticipated alternatives. *Front. Microbiol.* 5, 282.
- Diaz-Sanchez, S., Moscoso, S., Solis de los Santos, F., Andino, A., and Hanning, I. (2015). Antibiotic use in poultry: A driving force for organic poultry production. *Food Prot. Trends* 35, 440–447.
- Dibner, J. J., and Richards, J. D. (2005). Antibiotic growth promoters in agriculture: history and mode of action. *Poult. Sci.* 84, 634–643.

- DOF (2013). ACUERDO por el que se dan a conocer los Lineamientos para la Operación Orgánica de las actividades agropecuarias. *México*.
- DOF (2018). ACUERDO por el que se declara la obligatoriedad de la Estrategia Nacional de Acción contra la Resistencia a los Antimicrobianos. *México*.
- Dufour, L., Sander, J. E., Wyatt, R. D., Rowland, G. N., and Page, R. K. (1992). Experimental exposure of broiler chickens to boric acid to assess clinical signs and lesions of toxicosis. *Avian Dis.*, 1007–1011.
- ECDC, E. F. S. A. and E. C. for D. P. and C. (EFSA and (2018). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2017. *EFSA J.* 16, e05500.
- Editors, A. (2017). U.S. bans antibiotics use for enhancing growth in livestock. doi:10.1036/1097-8542.BR0125171.
- El-Gebaly, E., Essam, T., Hashem, S., and El-Baky, R. A. (2012). Effect of levofloxacin and vitamin C on bacterial adherence and preformed biofilm on urethral catheter surfaces. *J. Microb. Biochem. Technol* 4, 131–136.
- Eng, S.-K., Pusparajah, P., Ab Mutalib, N.-S., Ser, H.-L., Chan, K.-G., and Lee, L.-H. (2015). *Salmonella*: a review on pathogenesis, epidemiology and antibiotic resistance. *Front. Life Sci.* 8, 284–293.
- EPC (2005). Ban on antibiotics as growth promoters in animal feed enters into effect, European Commission – IP/05/1687. Available at: http://europa.eu/rapid/press-release_IP-05-1687_en.htm.
- European Parliament (2018). European Parliament resolution of 13 September 2018 on a European One Health Action Plan against Antimicrobial Resistance (AMR) (2017/2254(INI)). Available at: http://www.europarl.europa.eu/doceo/document/TA-8-2018-0354_EN.pdf.
- Founou, L. L., Founou, R. C., and Essack, S. Y. (2016). Antibiotic Resistance in the Food Chain: A Developing Country-Perspective. *Front. Microbiol.* 7, 1881. doi:10.3389/fmicb.2016.01881.
- Gad, A. H., Abo-Shama, U. H., Harclerode, K. K., and Fakhr, M. K. (2018). Prevalence, Serotyping, Molecular Typing, and Antimicrobial Resistance of *Salmonella* Isolated

- From Conventional and Organic Retail Ground Poultry. *Front. Microbiol.* 9, 2653.
- Gadde, U., Kim, W. H., Oh, S. T., and Lillehoj, H. S. (2017). Alternatives to antibiotics for maximizing growth performance and feed efficiency in poultry: a review. *Anim. Heal. Res. Rev.* 18, 26–45.
- Galli, G. M., Da Silva, A. S., Biazus, A. H., Reis, J. H., Boiago, M. M., Topazio, J. P., et al. (2018). Feed addition of curcumin to laying hens showed anticoccidial effect, and improved egg quality and animal health. *Res. Vet. Sci.* 118, 101–106.
- Gaskins, H. R., Collier, C. T., and Anderson, D. B. (2002). Antibiotics as growth promotants: mode of action. *Anim. Biotechnol.* 13, 29–42.
- Golubitskii, G. B., Budko, E. V, Basova, E. M., Kostarnoi, A. V, and Ivanov, V. M. (2007). Stability of ascorbic acid in aqueous and aqueous-organic solutions for quantitative determination. *J. Anal. Chem.* 62, 742–747. doi:10.1134/S1061934807080096.
- Gupta, S. C., Patchva, S., Koh, W., and Aggarwal, B. B. (2012). Discovery of curcumin, a component of golden spice, and its miraculous biological activities. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 39, 283–299.
- Halim, A. A., Bakar, A. A., Hanafiah, M. M., and Zakaria, H. (2012). Boron removal from aqueous solutions using curcumin-aided electrocoagulation. *Middle-East J. Sci. Res.* 11, 583–588.
- Hamaguchi, T., Ono, K., and Yamada, M. (2010). REVIEW: Curcumin and Alzheimer's disease. *CNS Neurosci. Ther.* 16, 285–297. doi:10.1111/j.1755-5949.2010.00147.x.
- Hao, H., Cheng, G., Iqbal, Z., Ai, X., Hussain, H. I., Huang, L., et al. (2014). Benefits and risks of antimicrobial use in food-producing animals. *Front. Microbiol.* 5, 288.
- Hernandez-Patlan, D., Solis-Cruz, B., Adhikari, B., Pontin, K. P., Latorre, J. D., Baxter, M. F. A., et al. (2019a). Evaluation of the antimicrobial and intestinal integrity properties of boric acid in broiler chickens infected with *Salmonella* Enteritidis: Proof of concept. *Res. Vet. Sci.* 123. doi:10.1016/j.rvsc.2018.12.004.
- Hernandez-Patlan, D., Solis-Cruz, B., Méndez-Albores, A., Latorre, J. D., Hernandez-Velasco, X., Tellez, G., et al. (2018a). Comparison of PrestoBlue® and plating method to evaluate antimicrobial activity of ascorbic acid, boric acid and curcumin in an in vitro gastrointestinal model. *J. Appl. Microbiol.* 124, 423–430. doi:10.1111/jam.13659.

- Hernandez-Patlan, D., Solís-Cruz, B., Patrin Pontin, K., Latorre, J. D., Baxter, M. F. A., Hernandez-Velasco, X., et al. (2019b). Evaluation of the Dietary Supplementation of a Formulation Containing Ascorbic Acid and a Solid Dispersion of Curcumin with Boric Acid against *Salmonella* Enteritidis and Necrotic Enteritis in Broiler Chickens. *Animals* 9, 184.
- Hernandez-Patlan, D., Solis-Cruz, B., Pontin, K. P., Latorre, J. D., Baxter, M. F. A., Hernandez-Velasco, X., et al. (2018b). Evaluation of a Solid Dispersion of Curcumin With Polyvinylpyrrolidone and Boric Acid Against *Salmonella* Enteritidis Infection and Intestinal Permeability in Broiler Chickens: A Pilot Study. *Front. Microbiol.* 9, 1289. doi:10.3389/fmicb.2018.01289.
- Hossain, M. B., Shovon, C., and Abdullah, A.-N. (2015). Prevalence of infectious and non-infectious diseases in different age groups of commercial layer chicken in Feni district, Bangladesh. *Van Vet. J.* 26, 35–38.
- Hu, R., He, Y., Arowolo, M. A., Wu, S., and He, J. (2019). Polyphenols as Potential Attenuators of Heat Stress in Poultry Production. *Antioxidants* 8, 67.
- Hunt, C. D. (1989). Dietary boron modified the effects of magnesium and molybdenum on mineral metabolism in the cholecalciferol-deficient chick. *Biol. Trace Elem. Res.* 22, 201.
- Hunt, C. D. (1994). The biochemical effects of physiologic amounts of dietary boron in animal nutrition models. *Environ. Health Perspect.* 102, 35.
- Hunt, C. D. (1996). Main content area Biochemical effects of physiological amounts of dietary boron. *J. trace Elem. Exp. Med.* 9, 185–213.
- Hunt, C. D. (1998). Regulation of enzymatic activity. *Biol. Trace Elem. Res.* 66, 205–225.
- Hunt, C. D. (2003). Dietary boron: an overview of the evidence for its role in immune function. *J. Trace Elem. Exp. Med.* 16, 291–306.
- Huyghebaert, G., Ducatelle, R., and Immerseel, F. Van (2011). An update on alternatives to antimicrobial growth promoters for broilers. *Vet. J.* 187, 182–188. doi:https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2010.03.003.
- Hyeon, J.-Y., Chon, J.-W., Hwang, I.-G., Kwak, H.-S., Kim, M.-S., Kim, S.-K., et al. (2011). Prevalence, Antibiotic Resistance, and Molecular Characterization of *Salmonella*

- Serovars in Retail Meat Products. *J. Food Prot.* 74, 161–166. doi:10.4315/0362-028X.JFP-10-327.
- Isela, N.-N. R., Sergio, N.-C., José, M.-S. J., Rene, H.-D., and Claudio, C.-R. (2013). Ascorbic acid on oral microbial growth and biofilm formation. *Pharma Innov.* 2.
- Ismail, I. B., Al-Busadah, K. A., and El-Bahr, S. M. (2013). Oxidative stress biomarkers and biochemical profile in broilers chicken fed zinc bacitracin and ascorbic acid under hot climate. *Am J Biochem Mol Biol* 3, 202–214.
- Jaiswal, S. K., Chaturvedani, A. K., Raza, M., Dilliwar, L., Dhruw, K., and Sahu, V. (2017). Review: Natural Growth Promoters, Alternative To Antibiotic Growth Promoters on Poultry. *Int J Sci Env Technol* 6, 254–259.
- Johannah, N. M., Joseph, A., Maliakel, B., and Krishnakumar, I. M. (2018). Dietary addition of a standardized extract of turmeric (TurmaFEED TM) improves growth performance and carcass quality of broilers. *J. Anim. Sci. Technol.* 60, 8.
- Jonker, M. A., Sano, Y., Hermsen, J. L., Lan, J., and Kudsk, K. A. (2010). Pro-Inflammatory Cytokine Surge After Injury Stimulates An Airway Immunoglobulin A Increase. *J. Trauma* 69, 843.
- Kabu, M., and Akosman, M. S. (2013). “Biological Effects of Boron BT - Reviews of Environmental Contamination and Toxicology,” in, ed. D. M. Whitacre (New York, NY: Springer New York), 57–75. doi:10.1007/978-1-4614-6470-9_2.
- Kaewnopparat, N., Kaewnopparat, S., Jangwang, A., Maneenaun, D., Chuchoe, T., and Panichayupakaranant, P. (2009). Increased solubility, dissolution and physicochemical studies of curcumin-polyvinylpyrrolidone K-30 solid dispersions. *World Acad. Sci. Eng. Technol.* 55, 229–234.
- Kaldhusdal, M., and Løvland, A. (2000). The economical impact of *Clostridium perfringens* is greater than anticipated. *World Poult.* 16, 50–51.
- Kassem, I. I., Sanad, Y. M., Stonerock, R., and Rajashekara, G. (2012). An evaluation of the effect of sodium bisulfate as a feed additive on *Salmonella enterica* serotype Enteritidis in experimentally infected broilers. *Poult. Sci.* 91, 1032–1037.
- Kaur, H., and Kaur, G. (2014). A critical appraisal of solubility enhancement techniques of polyphenols. *J. Pharm.* 2014.

- Khan, R. U., Naz, S., Javdani, M., Nikousefat, Z., Selvaggi, M., Tufarelli, V., et al. (2012). The use of Turmeric (*Curcuma longa*) in poultry feed. *Worlds. Poult. Sci. J.* 68, 97–103.
- Khan, S. H., and Iqbal, J. (2016). Recent advances in the role of organic acids in poultry nutrition. *J. Appl. Anim. Res.* 44, 359–369.
- Kharat, M., Du, Z., Zhang, G., and McClements, D. J. (2017). Physical and chemical stability of curcumin in aqueous solutions and emulsions: Impact of pH, temperature, and molecular environment. *J. Agric. Food Chem.* 65, 1525–1532.
- Kim, D. K., Lillehoj, H. S., Lee, S. H., Jang, S. I., Lillehoj, E. P., and Bravo, D. (2013). Dietary *Curcuma longa* enhances resistance against *Eimeria maxima* and *Eimeria tenella* infections in chickens. *Poult. Sci.* 92, 2635–2643.
- Kobayashi, M., Matoh, T., and Azuma, J. I. (1996). Two chains of rhamnogalacturonan II are cross-linked by borate-diol ester bonds in higher plant cell walls. *Plant Physiol.* 110, 1017–1020.
- Krishan, G., and Narang, A. (2014). Feed acidifiers as natural growth promoters in poultry feed. *Int. J. Livest. Res.* 4, 57–60.
- Lawhavinit, O., Kongkathip, N., and Kongkathip, B. (2010). Antimicrobial activity of curcuminoids from *Curcuma longa* L. on pathogenic bacteria of shrimp and chicken. *Kasetsart Journal—Natural Sci.* 44, 364–371.
- Lee, K.-W., Hong, Y. H., Lee, S.-H., Jang, S. I., Park, M.-S., Bautista, D. A., et al. (2012). Effects of anticoccidial and antibiotic growth promoter programs on broiler performance and immune status. *Res. Vet. Sci.* 93, 721–728.
- Lin, C.-C., Lin, H.-Y., Chen, H.-C., Yu, M.-W., and Lee, M.-H. (2009). Stability and characterisation of phospholipid-based curcumin-encapsulated microemulsions. *Food Chem.* 116, 923–928.
- Lohakare, J. D., Ryu, M. H., Hahn, T.-W., Lee, J. K., and Chae, B. J. (2005). Effects of supplemental ascorbic acid on the performance and immunity of commercial broilers. *J. Appl. Poult. Res.* 14, 10–19.
- López-Lázaro, M. (2008). Anticancer and carcinogenic properties of curcumin: considerations for its clinical development as a cancer chemopreventive and chemotherapeutic agent. *Mol. Nutr. Food Res.* 52.

- Majowicz, S. E., Musto, J., Scallan, E., Angulo, F. J., Kirk, M., O'Brien, S. J., et al. (2010). The global burden of nontyphoidal *Salmonella* gastroenteritis. *Clin. Infect. Dis.* 50, 882–889.
- Mani-López, E., García, H. S., and López-Malo, A. (2012). Organic acids as antimicrobials to control *Salmonella* in meat and poultry products. *Food Res. Int.* 45, 713–721. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.04.043>.
- Maradana, M. R., Thomas, R., and O'Sullivan, B. J. (2013). Targeted delivery of curcumin for treating type 2 diabetes. *Mol. Nutr. Food Res.* 57, 1550–1556. doi:[10.1002/mnfr.201200791](https://doi.org/10.1002/mnfr.201200791).
- Marshall, B. M., and Levy, S. B. (2011). Food animals and antimicrobials: impacts on human health. *Clin. Microbiol. Rev.* 24, 718–733.
- Mazzarino, L., Dora, C. L., Bellettini, I. C., Minatti, E., Cardoso, S. G., and Lemos-Senna, E. (2010). Curcumin-loaded polymeric and lipid nanocapsules: preparation, characterization and chemical stability evaluation. *Lat Am J Pharm* 29, 933–940.
- McDevitt, R. M., Brooker, J. D., Acamovic, T., and Sparks, N. H. C. (2006). Necrotic enteritis; a continuing challenge for the poultry industry. *Worlds. Poult. Sci. J.* 62, 221–247.
- Mehdi, Y., Létourneau-Montminy, M. P., Gaucher, M. L., Chorfi, Y., Gayatri, S., Rouissi, T., et al. (2018). Use of antibiotics in broiler production: Global impacts and alternatives. *Anim. Nutr.*
- Mehndiratta, P. L., and Bhalla, P. (2014). Use of antibiotics in animal agriculture & emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) clones: Need to assess the impact on public health. *Indian J. Med. Res.* 140, 339.
- Menconi, A., Bielke, L. R., Hargis, B. M., and Tellez, G. (2014). Immuno-modulation and anti-inflammatory effects of antibiotic growth promoters versus probiotics in the intestinal tract. *J Microbiol Res Rev* 2, 62–67.
- Menon, V. P., and Sudheer, A. R. (2007). “ANTIOXIDANT AND ANTI-INFLAMMATORY PROPERTIES OF CURCUMIN BT - The Molecular Targets and Therapeutic Uses of Curcumin in Health and Disease,” in, eds. B. B. Aggarwal, Y.-J. Surh, and S. Shishodia (Boston, MA: Springer US), 105–125. doi:[10.1007/978-0-387-](https://doi.org/10.1007/978-0-387-)

46401-5_3.

- Mensah, S. E., Koudande, O. D., Sanders, P., Laurentie, M., Mensah, G. A., and Abiola, F. A. (2014). Antimicrobial residues in foods of animal origin in Africa: public health risks. *Rev. Sci. Tech* 33, 987–996.
- Mon, K. K. Z., Saelao, P., Halstead, M. M., Chanthavixay, G., Chang, H.-C., Garas, L., et al. (2015). *Salmonella* enterica serovars Enteritidis infection alters the indigenous microbiota diversity in young layer chicks. *Front. Vet. Sci.* 2, 61.
- Mund, M. D., Khan, U. H., Tahir, U., Mustafa, B.-E.-, and Fayyaz, A. (2017). Antimicrobial drug residues in poultry products and implications on public health: A review. *Int. J. Food Prop.* 20, 1433–1446.
- Murugesan, G. R., Syed, B., Haldar, S., and Pender, C. (2015). Phytogetic feed additives as an alternative to antibiotic growth promoters in broiler chickens. *Front. Vet. Sci.* 2, 21.
- Mythri, R. B., and Bharath, M. M. S. (2012). Curcumin: a potential neuroprotective agent in Parkinson's disease. *Curr. Pharm. Des.* 18, 91–99.
- Naghii, M. R., Mofid, M., Asgari, A. R., Hedayati, M., and Daneshpour, M.-S. (2011). Comparative effects of daily and weekly boron supplementation on plasma steroid hormones and proinflammatory cytokines. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 25, 54–58. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2010.10.001>.
- Naidu, K. A. (2003). Vitamin C in human health and disease is still a mystery? An overview. *Nutr. J.* 2, 7.
- Naksuriya, O., and Okonogi, S. (2015). Comparison and combination effects on antioxidant power of curcumin with gallic acid, ascorbic acid, and xanthone. *Drug Discov. Ther.* 9, 136–141.
- Nhung, N. T., Chansiripornchai, N., and Carrique-Mas, J. J. (2017). Antimicrobial resistance in bacterial poultry pathogens: a review. *Front. Vet. Sci.* 4, 126.
- Niewold, T. A. (2007). The nonantibiotic anti-inflammatory effect of antimicrobial growth promoters, the real mode of action? A hypothesis. *Poult. Sci.* 86, 605–609.
- Novak, J. S., and Fratamico, P. M. (2004). Evaluation of ascorbic acid as a quorum-sensing analogue to control growth, sporulation, and enterotoxin production in *Clostridium perfringens*. *J. Food Sci.* 69, FMS72–FMS78.

- Okuneye, O. J., Ogunfolabo, L. A., Fasanmi, O. G., Adekunle, O. F., and Oloso, N. O. (2016). Performance and physiological responses of *Salmonella* Enteritidis challenged broilers fed diets containing antibiotic, probiotic and aromabiotic. *J. Dairy Vet. Anim. Res.* 3, 81.
- OMS (2017). Guidelines on use of medically important antimicrobials in food-producing animals.
- Padungtod, P., Kadohira, M., and Hill, G. (2008). Livestock production and foodborne diseases from food animals in Thailand. *J. Vet. Med. Sci.* 70, 873–879.
- Parlamento Europeo (2018). MEPs back plans to halt spread of drug resistance from animals to humans. Available at: <http://www.europarl.europa.eu/news/en/press-room/20181018IPR16526/meps-back-plans-to-halt-spread-of-drug-resistance-from-animals-to-humans>.
- Peterson, C. T., Vaughn, A. R., Sharma, V., Chopra, D., Mills, P. J., Peterson, S. N., et al. (2018). Effects of turmeric and curcumin dietary supplementation on human gut microbiota: A double-blind, randomized, placebo-controlled pilot study.
- Pizzorno, L. (2015). Nothing boring about boron. *Integr. Med. A Clin. J.* 14, 35.
- Poppenga, R. H. (2007). “CHAPTER 56 - Avian toxicology,” in, ed. R. C. B. T.-V. T. GUPTA (Oxford: Academic Press), 663–688. doi:<https://doi.org/10.1016/B978-012370467-2/50153-X>.
- Priyadarsini, I. K. (2014). The Chemistry of Curcumin: From Extraction to Therapeutic Agent. *Mol.* 19. doi:10.3390/molecules191220091.
- Program, N. T. (1987). Toxicology and carcinogenesis studies of boric acid in B6C3F1 mice. Tech. Report Ser.
- Rajput, N., Muhammad, N., Yan, R., Zhong, X., and Wang, T. (2013). Effect of dietary supplementation of curcumin on growth performance, intestinal morphology and nutrients utilization of broiler chicks. *J. Poult. Sci.* 50, 44–52.
- Rubin, B. K., and Tamaoki, J. (2005). *Antibiotics as anti-inflammatory and immunomodulatory agents*. Springer Science & Business Media.
- Sahebkar, A. (2015). Dual effect of curcumin in preventing atherosclerosis: the potential role of pro-oxidant–antioxidant mechanisms. *Nat. Prod. Res.* 29, 491–492.

doi:10.1080/14786419.2014.956212.

- Sakurai, J., Nagahama, M., and Oda, M. (2004). Clostridium perfringens alpha-toxin: characterization and mode of action. *J. Biochem.* 136, 569–574.
- Samad, M. A., Hashim, S. H., Simarani, K., and Yaacob, J. S. (2016). Antibacterial properties and effects of fruit chilling and extract storage on antioxidant activity, total phenolic and anthocyanin content of four date palm (*Phoenix dactylifera*) cultivars. *Molecules* 21, 419.
- Samarasinghe, K., Wenk, C., Silva, K., and Gunasekera, J. (2003). Turmeric (*Curcuma longa*) root powder and mannanoligosaccharides as alternatives to antibiotics in broiler chicken diets. *ASIAN Australas. J. Anim. Sci.* 16, 1495–1500.
- Sander, J. E., Dufour, L., Wyatt, R. D., Bush, P. B., and Page, R. K. (1991). Acute toxicity of boric acid and boron tissue residues after chronic exposure in broiler chickens. *Avian Dis.*, 745–749.
- Sangcharoen, N., Klaypradit, W., and Wilaipun, P. (2017). Antimicrobial activity optimization of nisin, ascorbic acid and ethylenediamine tetraacetic acid disodium salt (EDTA) against *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076 using response surface methodology. *Agric. Nat. Resour.* 51, 355–364.
- Scharff, R. L. (2012). Economic burden from health losses due to foodborne illness in the United States. *J. Food Prot.* 75, 123–131.
- Schmidt, M., Schaumberg, J. Z., Steen, C. M., and Boyer, M. P. (2010). Boric acid disturbs cell wall synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Int. J. Microbiol.* 2010.
- SENASICA (2015). Guía para la presentación e integración de los documentos para la autorización o registro de los productos y aditivos alimenticios para consumo por animales. Available at: <http://analav.com.mx/wp-content/uploads/2016/08/Guía-regulación-ALIMENTICIOS-oct15.pdf>.
- Shen, L.-R., Xiao, F., Yuan, P., Chen, Y., Gao, Q.-K., Parnell, L. D., et al. (2013). Curcumin-supplemented diets increase superoxide dismutase activity and mean lifespan in *Drosophila*. *Age (Omaha)*. 35, 1133–1142.
- Shivaramaiah, S., Wolfenden, R. E., Barta, J. R., Morgan, M. J., Wolfenden, A. D., Hargis, B. M., et al. (2011). The role of an early *Salmonella* Typhimurium infection as a

- predisposing factor for necrotic enteritis in a laboratory challenge model. *Avian Dis.* 55, 319–323.
- Shrivastava, A., Sharma, J., Jain, S., and Aggrawal, K. L. (2014). Incompatibility studies by high performance thin-layer chromatography: In case of curcumin. *Asian J. Pharm. Free full text Artic. from Asian J Pharm* 7.
- Skinner, J. T., Bauer, S., Young, V., Pauling, G., and Wilson, J. (2010). An economic analysis of the impact of subclinical (mild) necrotic enteritis in broiler chickens. *Avian Dis.* 54, 1237–1240.
- Sobel, J. D., and Chaim, W. (1997). Treatment of *Torulopsis glabrata* vaginitis: retrospective review of boric acid therapy. *Clin. Infect. Dis.* 24, 649–652.
- Sohail, R., Saeed, M., Chao, S., Soomro, R. N., Arain, M. A., Abbasi, I. H. R., et al. (2015). Comparative effect of different organic acids (Benzoic, Acetic and Formic) on growth performance, immune response and Carcass traits of broilers. *J. Anim. Pro. Adv* 5, 757–764.
- Song, I.-S., Cha, J.-S., and Choi, M.-K. (2016). Characterization, in vivo and in vitro evaluation of solid dispersion of curcumin containing d- α -Tocopheryl polyethylene glycol 1000 succinate and mannitol. *Molecules* 21, 1386.
- Suresh, G., Das, R. K., Kaur Brar, S., Rouissi, T., Avalos Ramirez, A., Chorfi, Y., et al. (2018). Alternatives to antibiotics in poultry feed: molecular perspectives. *Crit. Rev. Microbiol.* 44, 318–335.
- Tajkarimi, M., and Ibrahim, S. A. (2011). Antimicrobial activity of ascorbic acid alone or in combination with lactic acid on *Escherichia coli* O157: H7 in laboratory medium and carrot juice. *Food Control* 22, 801–804.
- Tellez, G., Latorre, J. D., Kuttappan, V. A., Kogut, M. H., Wolfenden, A., Hernandez-Velasco, X., et al. (2014). Utilization of rye as energy source affects bacterial translocation, intestinal viscosity, microbiota composition, and bone mineralization in broiler chickens. *Front. Genet.* 5, 339.
- Thanner, S., Drissner, D., and Walsh, F. (2016). Antimicrobial resistance in agriculture. *MBio* 7, e02227-15.
- Thomas, C. M., and Nielsen, K. M. (2005). Mechanisms of, and barriers to, horizontal gene

- transfer between bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* 3, 711.
- Tikekar, R. V, Anantheswaran, R. C., and LaBorde, L. F. (2011). Ascorbic acid degradation in a model apple juice system and in apple juice during ultraviolet processing and storage. *J. Food Sci.* 76.
- Tokusoglu, O., Simsek, A., Parvizi, M., and Eymen, D. (2015). Turmeric curcuminoid polyphenolics as antioxidant and anticarcinogenic agents. *Nat. Sci. Discov.* 1, 56–61.
- Toutain, P.-L., Ferran, A. A., Bousquet-Melou, A., Pelligand, L., and Lees, P. (2016). Veterinary medicine needs new green antimicrobial drugs. *Front. Microbiol.* 7, 1196.
- Tuorkey, M. (2014). Curcumin a potent cancer preventive agent: Mechanisms of cancer cell killing. *Interv. Med. Appl. Sci.* 6, 139–146.
- Urban-Chmiel, R., and Grooms, D. L. (2012). Prevention and control of bovine respiratory disease. *J Livest. Sci* 3, 27–36.
- USDA (2018). Livestock and Poultry: World Markets and Trade. Available at: https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/livestock_poultry.pdf.
- Van Boeckel, T. P., Brower, C., Gilbert, M., Grenfell, B. T., Levin, S. A., Robinson, T. P., et al. (2015). Global trends in antimicrobial use in food animals. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 112, 5649–5654.
- Van Immerseel, F., De Buck, J., Pasmans, F., Huyghebaert, G., Haesebrouck, F., and Ducatelle, R. (2004). Clostridium perfringens in poultry: an emerging threat for animal and public health. *Avian Pathol.* 33, 537–549. doi:10.1080/03079450400013162.
- Van Immerseel, F., Rood, J. I., Moore, R. J., and Titball, R. W. (2009). Rethinking our understanding of the pathogenesis of necrotic enteritis in chickens. *Trends Microbiol.* 17, 32–36.
- Varmuzova, K., Matulova, M. E., Gerzova, L., Cejkova, D., Gardan-Salmon, D., Panhéleux, M., et al. (2015). Curcuma and Scutellaria plant extracts protect chickens against inflammation and *Salmonella* Enteritidis infection. *Poult. Sci.* 94, 2049–2058.
- Verghese, R. J., Mathew, S. K., and David, A. (2017). Antimicrobial activity of vitamin c demonstrated on uropathogenic *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *J. Curr. Res. Sci. Med.* 3, 88.
- Vieco-Saiz, N., Belguesmia, Y., Raspoet, R., Auclair, E., Gancel, F., Kempf, I., et al. (2019).

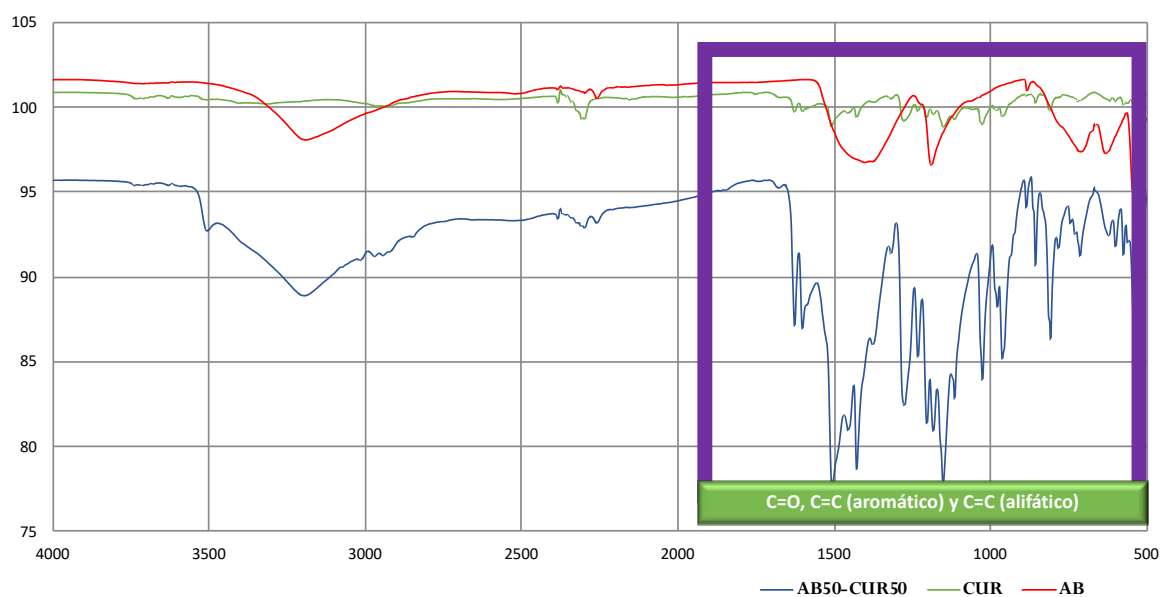
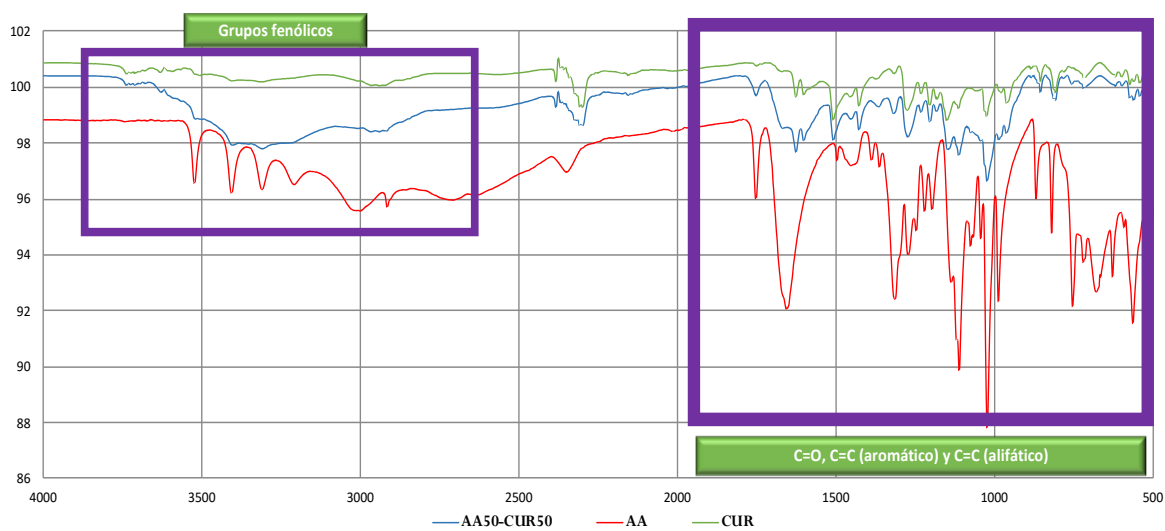
- Benefits and Inputs From Lactic Acid Bacteria and Their Bacteriocins as Alternatives to Antibiotic Growth Promoters During Food-Animal Production. *Front. Microbiol.* 10, 57.
- von Wintersdorff, C. J. H., Penders, J., van Niekerk, J. M., Mills, N. D., Majumder, S., van Alphen, L. B., et al. (2016). Dissemination of antimicrobial resistance in microbial ecosystems through horizontal gene transfer. *Front. Microbiol.* 7, 173.
- Wang, J., Ghosh, S. S., and Ghosh, S. (2017). Curcumin improves intestinal barrier function: modulation of intracellular signaling, and organization of tight junctions. *Am. J. Physiol. Physiol.* 312, C438–C445.
- Wanninger, S., Lorenz, V., Subhan, A., and Edelman, F. T. (2015). Metal complexes of curcumin - synthetic strategies, structures and medicinal applications. *Chem. Soc. Rev.* 44, 4986–5002. doi:10.1039/C5CS00088B.
- Wechtersbach, L., and Cigić, B. (2007). Reduction of dehydroascorbic acid at low pH. *J. Biochem. Biophys. Methods* 70, 767–772.
- Winzer, K., Hardie, K. R., and Williams, P. B. T.-A. in A. M. (2003). “LuxS and Autoinducer-2: Their Contribution to Quorum Sensing and Metabolism in Bacteria,” in (Academic Press), 291–396. doi:https://doi.org/10.1016/S0065-2164(03)53009-X.
- Wongcharoen, W., and Phrommintikul, A. (2009). The protective role of curcumin in cardiovascular diseases. *Int. J. Cardiol.* 133, 145–151. doi:https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2009.01.073.
- Woolhouse, M., Ward, M., van Bunnik, B., and Farrar, J. (2015). Antimicrobial resistance in humans, livestock and the wider environment. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 370, 20140083.
- Wu, X.-L., Xiang, L., Yan, Q.-Y., Jiang, Y.-N., Li, Y.-W., Huang, X.-P., et al. (2014). Distribution and risk assessment of quinolone antibiotics in the soils from organic vegetable farms of a subtropical city, Southern China. *Sci. Total Environ.* 487, 399–406.
- Xu, D.-H., Wang, S., Jin, J., Mei, X.-T., and Xu, S.-B. (2006). Dissolution and absorption researches of curcumin in solid dispersions with the polymers PVP. *Asian J Pharmacodyn Pharmacokinet* 6, 343–349.
- Yeşilbağ, D., and Eren, M. (2008). Effects of dietary boric acid supplementation on

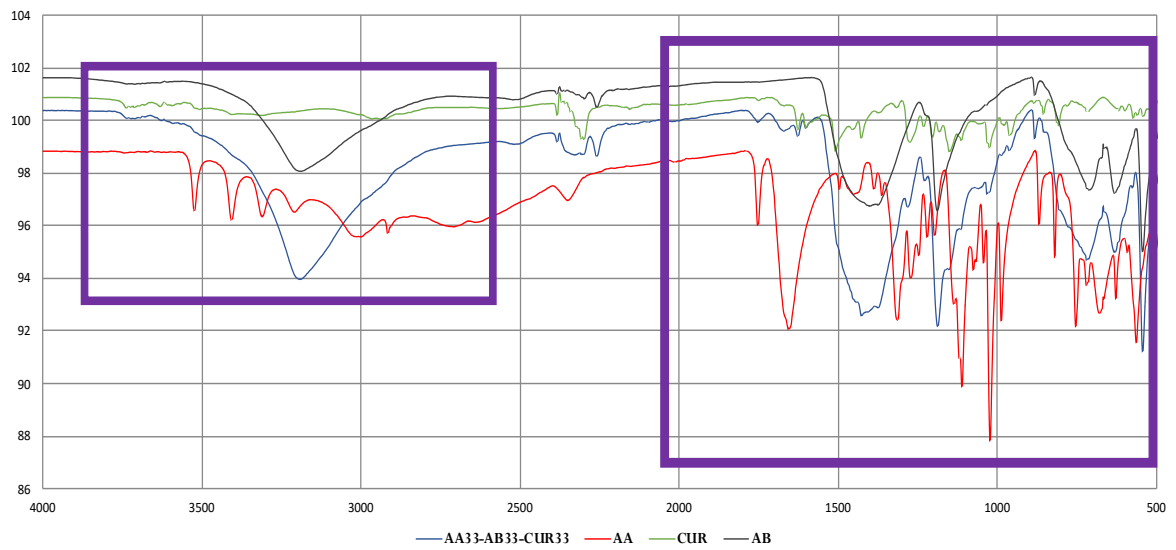
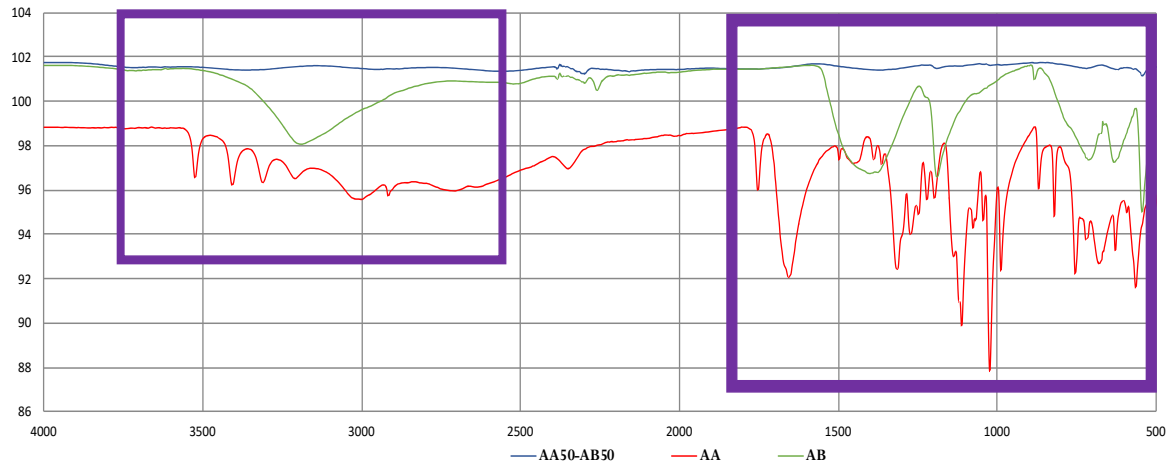
- performance, eggshell quality and some serum parameters in aged laying hens. *Turkish J. Vet. Anim. Sci.* 32, 113–117.
- Yildiz, G., Koksall, B. H., and Sizmaz, O. (2013). Effects of dietary boric acid addition on growth performance, cholesterolemia, some carcass and tibia characteristics in different rearing periods in broiler chickens. *Rev. Med Vet* 164, 219–224.
- Zaidi, M. B., Dreser, A., and Figueroa, I. M. (2015). A collaborative initiative for the containment of antimicrobial resistance in Mexico. *Zoonoses Public Health* 62, 52–57.
- Zaman, S. Bin, Hussain, M. A., Nye, R., Mehta, V., Mamun, K. T., and Hossain, N. (2017). A review on antibiotic resistance: alarm bells are ringing. *Cureus* 9.
- Zhang, H., Wakisaka, N., Maeda, O., and Yamamoto, T. (1997). Vitamin C inhibits the growth of a bacterial risk factor for gastric carcinoma: *Helicobacter pylori*. *Cancer Interdiscip. Int. J. Am. Cancer Soc.* 80, 1897–1903.
- Zhang, Q., Polyakov, N. E., Chistyachenko, Y. S., Khvostov, M. V, Frolova, T. S., Tolstikova, T. G., et al. (2018). Preparation of curcumin self-micelle solid dispersion with enhanced bioavailability and cytotoxic activity by mechanochemistry. *Drug Deliv.* 25, 198–209.
- Zhu, Y.-G., Johnson, T. A., Su, J.-Q., Qiao, M., Guo, G.-X., Stedtfeld, R. D., et al. (2013). Diverse and abundant antibiotic resistance genes in Chinese swine farms. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110, 3435–3440.
- Zorofchian Moghadamtousi, S., Abdul Kadir, H., Hassandarvish, P., Tajik, H., Abubakar, S., and Zandi, K. (2014). A review on antibacterial, antiviral, and antifungal activity of curcumin. *Biomed Res. Int.* 2014.

ANEXO

ESTUDIOS DE INTERACCIONES

- Espectrometría Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR)





AA: Ácido ascórbico, AB: Ácido bórico, y CUR: Curcumina
 AA50-CUR50: mezcla física 1:1 entre AA y CUR
 AB50-CUR50: mezcla física 1:1 entre AB y CUR
 AA50-AB50: mezcla física 1:1 entre AA y AB
 AA33-AB33-CUR33: mezcla física 1:1:1 entre AA, AB y CUR

• Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

