



UNIVERSIDAD DE MURCIA

FACULTAD DE VETERINARIA

Efecto de los Aceites Esenciales de Plantas
Aromático-Medicinales en la Fase de Transición de
Animales Monogástricos

María del Pilar de Haro González
2015



Universidad de Murcia
Facultad de Veterinaria
Departamento de Tecnología de los
Alimentos, Nutrición y Bromatología.



Instituto Murciano de Investigación y
Desarrollo Agrario y Alimentario
Departamento de Recursos Naturales.
Plantas Aromático-Medicinales y de
Extractos

EFFECTO DE LOS ACEITES ESENCIALES DE PLANTAS AROMÁTICO-MEDICINALES EN LA FASE DE TRANSICIÓN DE ANIMALES MONOGÁSTRICOS

**Memoria de Tesis presentada por María del Pilar De Haro González
para optar al grado de Doctor**

Murcia, 2015

Dña. Cristina Martínez Conesa y **D. José Antonio Sotomayor Sánchez**
Doctores Investigadores pertenecientes al Instituto Murciano de Investigación y Desarrollo Agrario y Alimentario (IMIDA) del Departamento de Recursos Naturales, y **Dña. María Rosa Caro Vergara** Catedrática del Departamento de Sanidad Animal de la Universidad de Murcia.

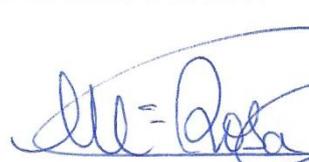
AUTORIZAN:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada "**Efecto de los aceites esenciales de plantas aromático-medicinales en la fase de transición de animales monogástricos**" realizada en el Departamento de Recursos Naturales del Instituto Murciano de Investigación Agrario y Alimentario (IMIDA) y en la Unidad Docente de Microbiología del Departamento de Sanidad Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Murcia, bajo nuestra inmediata dirección y supervisión, y que presenta la Doctoranda **Dña. María del Pilar de Haro** para la obtención del grado de Doctora por la Universidad de Murcia con mención de "Doctorado Europeo".

En La Alberca-Murcia, a 3 de Noviembre de 2014



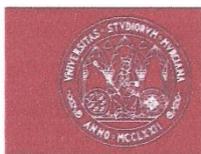
Dra. Cristina Martínez Conesa



Dra. María Rosa Caro Vergara



Dr. José Antonio Sotomayor



UNIVERSIDAD DE
MURCIA

D^a M^a Dolores Garrido Fernández, Catedrática de Universidad del área de Tecnología de los Alimentos del Dpto. de Tecnología de los Alimentos, Nutrición y Bromatología,
AUTORIZA:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada “Efecto de los Aceites Esenciales de Plantas Aromático-Medicinales en la Fase de Transición de Animales Monogástricos” realizada por D^a. María Pilar de Haro González bajo mi autorización y que presenta para la obtención del grado de doctor por la Universidad de Murcia.

En Murcia a 27 de Octubre de 2014

Firmante: MARIA DOLORES GARRIDO FERNANDEZ. Fecha-hora: 27/10/2014 11:38:08. Emisor del certificado: OU=FNMT Cites 2 CA,O=FNMT,C=ES



Facultad de Veterinaria
Departamento de Tecnología de los Alimentos
Nutrición y Bromatología

Campus Universitario de Espinardo. 30100 Murcia



Código seguro de verificación: UE9SMhNU-y2bwjhcx-7f2e4SgU-FcSsJRTv

COPIA ELECTRÓNICA - Página 1 de 1

Esta es una copia auténtica imprimible de un documento administrativo electrónico archivado por la Universidad de Murcia, según el artículo 30.5 de la Ley 11/2007, de 22 de junio. Su autenticidad puede ser contrastada a través de la siguiente dirección: <https://sede.um.es/validador/>

Agradecimientos

A Cristina y José Antonio, directores de esta tesis, por todo vuestro apoyo y paciencia, y por haberme dado la oportunidad de vivir esta magnífica experiencia junto a vosotros.

A Rosa, directora de esta tesis, por toda la ayuda prestada para que este trabajo haya sido posible.

Al IMIDA, por la concesión de la beca-contrato predoctoral, financiada por el Fondo Social Europeo, gracias a la cual ha sido posible la realización de esta tesis.

A todos los compañeros con los que he compartido esta larga temporada en el IMIDA, donde he tenido la oportunidad de conocer y reencontrarme con gente realmente especial. A los que habéis compartido vuestro tiempo conmigo, gracias por ofrecerme vuestra ayuda siempre que la he necesitado y por tantos buenos momentos que hemos pasado tanto dentro como fuera del centro.

Voglio ringraziare tutti i colleghi dell'Istituto Zooprofilattico di Pavia, e in particolare modo Massimo Fabbi e Nadia per la loro dedizione a questo progetto e per offrirmi l'opportunità di imparare insieme a loro un piccolo pezzo di quello che fanno. Ringrazio Massimo e Dario per condividere quei mesi con me.

A todos los que de una manera u otra han contribuido a que este proyecto salga adelante: a todo el personal del CIFEA de Lorca, al departamento de Anatomía Patológica de la Facultad de Medicina, a la sección de Análisis de Imagen del SAI, al departamento de Tecnología de Alimentos, al personal del animalario, a los trabajadores de la granja Las Nubes, al personal del matadero La Comarca de Lorca, y a otros tantos que con sus consejos y su ayuda han hecho más fácil este trabajo.

A mi familia, y especialmente a mis padres, a los que les debo todo. Gracias por ser un ejemplo para mí.

A Víctor. Simplemente por estar ahí me haces un mundo.

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	1
I.1 SITUACIÓN ACTUAL DEL GANADO PORCINO.....	3
I.1.1 Ganadería porcina	4
I.1.2 Consumo de carne de cerdo y fases críticas de su producción	9
I.1.2.1 Consumo de carne de cerdo.....	10
I.1.2.2 Fases críticas de la producción porcina.....	11
I.1.3 Antibióticos promotores del crecimiento y su prohibición	13
I.2 DESTETE EN ANIMALES MONOGÁSTRICOS: ADAPTACIÓN A LA ALIMENTACIÓN SÓLIDA	17
I.2.1 Cambios fisiológicos y estructurales del epitelio intestinal.....	17
I.2.1.1 Descripción del epitelio intestinal	17
I.2.1.2 Aspectos dinámicos.....	22
I.2.1.3 Cambios en el destete	24
I.2.2 Microbiota intestinal.....	27
I.2.2.1 Colonización microbiana.....	27
I.2.2.2 Cambios en la microbiota intestinal en el período post- destete y en la edad adulta.....	29
I.2.3 Moduladores actuales del equilibrio intestinal	31
I.2.3.1 Fibra dietética	32
I.2.3.2 Prebióticos	35
I.2.3.3 Probióticos.....	38

ÍNDICE

I.2.3.4 Simbióticos	40
I.2.3.5 Acidificantes.....	41
I.2.3.6 Aditivos vegetales	45
I.3 PLANTAS AROMÁTICAS	48
I.3.1 Flora de la Región de Murcia	49
I.3.2 Aceite esencial de tomillo	53
I.3.2.1 Componentes principales	55
I.3.2.1.1 Estructura de los fenoles	56
I.3.2.1.2 Acción microbiológica y biosaludable	57
II. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	61
II.1 JUSTIFICACIÓN.....	63
II.2 OBJETIVOS.....	67
III. MATERIAL Y MÉTODOS	69
III.1 ACEITE ESENCIAL	71
III.2 MODELO EXPERIMENTAL EN RATAS	75
III.2.1 Animales y alimentación.....	75
III.2.2 Recogida de muestras: intestino y vísceras	78
III.2.3 Estudio histológico	78
III.2.3.1 Reactivos	84
III.2.4 Análisis estadístico.....	84
III.3 MODELO EXPERIMENTAL EN CERDOS	85

III.3.1 Ensayo preliminar.....	85
III.3.2 Animales y alimentación.....	86
III.3.3 Recogida muestras	91
III.3.3.1 Recogida de sangre.....	91
III.3.3.2 Recogida de contenido intestinal y vísceras	91
III.3.3.3 Recogida de muestras de carne	92
III.3.4 Efecto de la alimentación sobre la carne de cerdo	92
III.3.4.1 Parámetros físico-químicos de la carne.....	92
III.3.4.1.1 pH	92
III.3.4.1.2 Capacidad de retención de agua.....	94
III.3.4.1.3 Color CIELab.....	94
III.3.4.2 Análisis sensorial	95
III.3.5 Estudio del sistema digestivo	96
III.3.5.1 pH intestinal	96
III.3.5.2 Microbiota intestinal	96
III.3.5.2.1 Cuantificación bacteriana por métodos tradicional es dependientes de cultivo	96
III.3.5.2.2 Cuantificación bacteriana mediante PCR en tiempo real	98
III.3.5.2.2.1 Extracción de ADN	98
III.3.5.2.2.2 PCR cuantitativa	99
III.3.5.3 Reactivos	101

III.3.6	Análisis de fenoles	101
III.3.6.1	Extracción de compuestos fenólicos	101
III.3.6.1.1	Extracción de fenoles en carne	101
III.3.6.1.2	Extracción de fenoles en plasma.....	103
III.3.6.2	Cromatografía líquida de alta resolución.....	104
III.3.6.2.1	Análisis cualitativo y cuantitativo de timol y carvacrol	104
III.3.6.2.2	Recuperación de componentes fenólicos	106
III.3.6.2.3	Límite de detección	106
III.3.6.2.4	Límite de cuantificación	107
III.3.6.3	Reactivos	107
III.3.7	Análisis estadístico	108
IV.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	109
IV.1	EFFECTO DEL ACEITE ESENCIAL SOBRE CRECIMIENTO Y MORFOLOGÍA INTESTINAL DE RATAS	111
IV.1.1	Parámetros productivos y fisiológicos	111
IV.1.2	Análisis histológico intestinal.....	117
IV.1.2.1	Longitud de las vellosidades intestinales.....	117
IV.1.2.2	Profundidad de las criptas de Lieberkühn.....	119
IV.1.2.3	Relación entre la longitud de las vellosidades y la profundidad de las criptas.....	122
IV.1.2.4	Grosor de la mucosa	125

IV.2 EFECTO DEL ACEITE ESENCIAL SOBRE LA PRODUCCIÓN DE CERDOS DESTETADOS PRECOZMENTE	128
IV.2.1 Parámetros productivos y fisiológicos	128
IV.2.2 Estudio del pH y microbiota intestinal	140
IV.2.2.1 pH intestinal	140
IV.2.2.2 Microbiota intestinal.....	145
IV.2.2.2.1 Cuantificación bacteriana por métodos tradicionales dependientes de cultivo	145
IV.2.2.2.2 Cuantificación bacteriana por PCR en tiempo real.....	161
IV.2.3 Transferencia de fenoles a la carne y al plasma de cerdos alimentados con aceites esenciales	170
IV.2.3.1 Técnica de extracción de fenoles	170
IV.2.3.1.1 Límite de detección y cuantificación	170
IV.2.3.1.2 Recuperaciones.....	171
IV.2.3.2 Cantidad de fenoles ingeridos en la dieta.....	172
IV.2.3.3 Transferencia de fenoles terpénicos de aceite esencial a la carne de cerdo.....	173
IV.2.3.4 Detección de fenoles en plasma de cerdo.....	182
IV.2.4 Efecto de la alimentación sobre la carne de cerdo.....	183
IV.2.4.1 Parámetros físico-químicos de la carne	183
IV.2.4.1.1 pH.....	183
IV.2.4.1.2 Capacidad de retención de agua	186

IV.2.4.1.3 Color CIELab	189
IV.2.4.2 Evaluación sensorial de carne cocinada mediante un panel de consumidores.....	193
IV.2.4.2.1 Encuesta de consumo	193
IV.2.4.2.2 Prueba discriminatoria y de preferencia.....	205
IV.3 RESUMEN DE LA DISCUSIÓN.....	210
V.CONCLUSIONES.....	215
VI. MENCIÓN EUROPEA DEL TÍTULO DE DOCTOR.....	219
VI.1 SUMMARY	223
VI.2 CONCLUSIONS.....	242
VII. RESUMEN.....	243
VIII. BIBLIOGRAFÍA.....	249
IX. ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS.....	295
X. ABREVIATURAS	305
XI. ANEXOS	311

I. INTRODUCCIÓN

I.1 SITUACIÓN ACTUAL DEL GANADO PORCINO

La creciente aparición de bacterias resistentes a antibióticos involucradas en la salud humana y animal, ha generado una alarma a nivel científico que ha provocado la supresión del uso de los antibióticos como promotores del crecimiento en alimentación animal en la Unión Europea desde el año 2006. Este hecho ha alentado la investigación de sustancias naturales sustitutivas de estos antimicrobianos para hacer frente a los problemas clínicos y de crecimiento que tienen lugar en el momento del destete de los lechones y durante la fase de adaptación a la alimentación sólida, en la que los animales sufren un descenso de la ingesta de alimento, y por tanto de crecimiento, y una mayor vulnerabilidad a enfermedades causantes, principalmente, de diarrea.

A continuación se expone la situación en la que se encuentra el sector ganadero porcino y su implicación con los antibióticos promotores del crecimiento en la producción intensiva de cerdos.

I.1.1 Ganadería porcina.

La ganadería porcina tiene una gran importancia a nivel mundial como demuestran las estadísticas de producción de carne. En los últimos datos que recoge Faostat en 2012, la carne de cerdo representa alrededor de un 37% de la producción total de carne en el mundo, lo que la sitúa en el primer puesto, seguida de la producción de carne de pollo, la cual supone un 30% del total, y de la de bovino, que representa el 21% (**Figura I.1**).

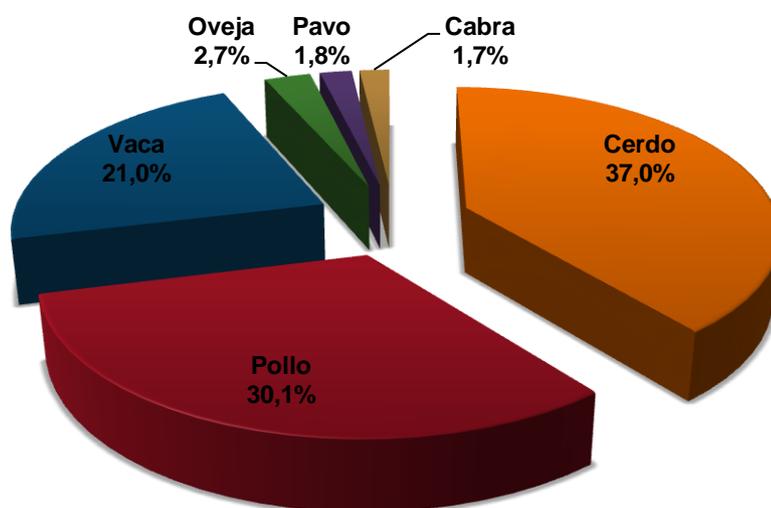


Figura I.1. Distribución de la producción mundial de distintos tipos de carne (Faostat, 2012).

Por países, China domina el mercado mundial de porcino con una producción anual, en 2012, de 49 millones de toneladas, lo que supone casi la mitad de la producción global. Le siguen en importancia, con una clara diferencia respecto al resto de productores, la UE, con unas 23 millones de toneladas de carne de cerdo y los Estados Unidos de América, con 10,5 millones de toneladas producidas. En la **Figura I.2** se puede apreciar las cifras de los principales productores a nivel mundial.

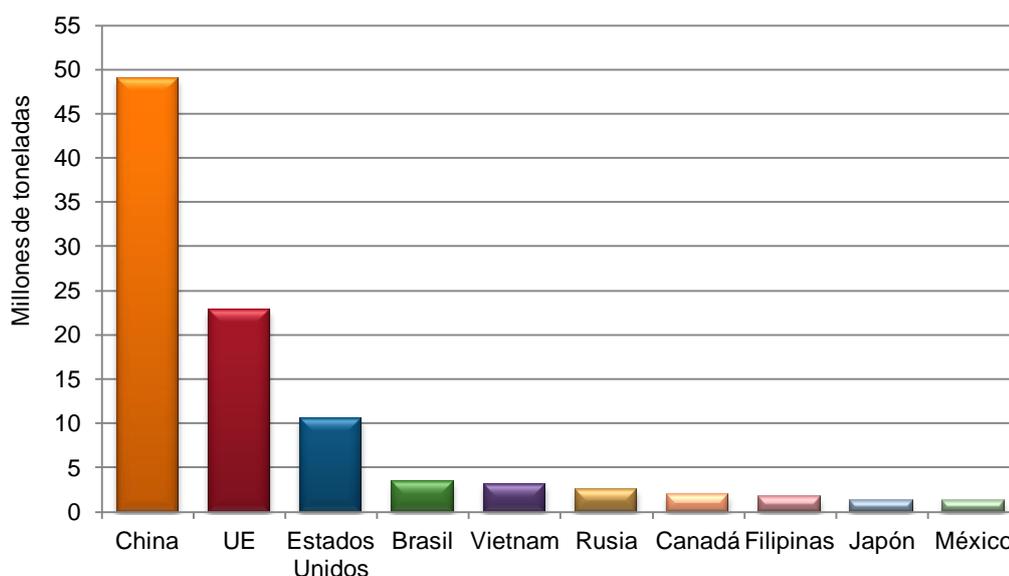


Figura I.2. Cantidad de carne de cerdo producida (millones de toneladas) en el año 2012 por los principales países productores (Faostat, 2012).

Según los datos de 2014 del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA, por sus siglas en inglés), la producción mundial de porcino se mantiene para este año mientras que la producción de China aumenta, a pesar de los bajos precios, debido a los programas de intervención adoptados por el gobierno. Por otro lado, algunos países productores de Asia y Estados Unidos han visto mermadas sus producciones debido al impacto de la diarrea epidémica porcina. En el caso de la Unión Europea, el riesgo de fiebre porcina africana ha llevado a Rusia a restringir las importaciones provenientes de la Unión Europea, con el consiguiente perjuicio para su producción y tasas de exportación, teniendo en cuenta, además, que Rusia es su principal mercado.

En la Unión Europea existe en el año 2012 un censo aproximado de 149 millones de animales, de los cuales, el 18,9% se encuentra en Alemania, el principal país productor europeo de porcino. Muy cerca se sitúa España, que con más de 25 millones de cabezas de porcino, es el segundo productor, representando el 17% del censo total de la Unión Europea. A estos les siguen países como Francia, Dinamarca, Holanda y Polonia, con entre un 8% y un 9%

de la producción europea. En la **Tabla I.1** se muestra el número de cabezas de porcino de todos los países miembros de la Unión Europea de los 28.

Tabla I.1. Censo por países de ganado porcino en la Unión Europea en el año 2012.

País	Número de animales
Alemania	28.131.700
España	25.250.400
Francia	13.759.913
Dinamarca	12.330.879
Holanda	12.233.650
Polonia	11.581.298
Italia	9.350.800
Bélgica	6.633.613
Rumanía	5.363.797
Reino Unido	4.481.000
Hungría	3.044.000
Austria	3.004.907
Portugal	1.984.000
República Checa	1.578.827
Irlanda	1.570.600
Suecia	1.363.364
Finlandia	1.290.363
Croacia	1.182.347
Grecia	1.099.000
Lituania	790.300
Bulgaria	608.266
Eslovaquia	580.393
Chipre	394.706
Estonia	375.100
Letonia	375.000
Eslovenia	347.310
Luxemburgo	90.023
Malta	45.209

Fuente: Faostat, 2012

En España, las cifras de producción anual y la evolución del número de cabezas, según la especie, sitúan al porcino al frente del mercado ganadero, suponiendo, en el año 2012, más del 50% del total de los efectivos ganaderos del país (MAGRAMA, 2012).

España exporta gran cantidad del cerdo producido ya que la tasa de autoabastecimiento es elevada. Existe un gran potencial productivo y una gran capacidad para abrir nuevos mercados en este sector, sin embargo, por el mismo motivo, hay una fuerte dependencia del exterior, por lo que es necesario un control riguroso de la producción en todos sus aspectos para evitar pérdida de mercados, ya de por sí volubles. Según datos del MAGRAMA, en 2011 se exportaron en España 1.369.527 millones de toneladas de carne de porcino, lo que supone alrededor del 40% de la producción total. Los principales destinatarios de estos productos son países de la Unión Europea -Francia, Portugal e Italia, principalmente-. Fuera de la UE se envía en torno a un 30% del total exportado, con países como Rusia, China, Hong Kong y Japón como principales destinatarios, aunque como se ha comentado, las restricciones de importación de Rusia al porcino europeo han podido variar estas cifras.

En la **Figura I.3** se observa el censo que cada una de las Comunidades Autónomas aporta al conjunto del sector porcino del país. Las Comunidades con mayor cantidad de animales son, por orden de importancia, Cataluña, Aragón y Castilla y León, las cuales representan aproximadamente el 64% de la cabaña de porcino en España. En cuanto a número de cabezas le siguen Andalucía, Murcia y Castilla La Mancha con casi un 21% del total.

De estos datos se desprende la importancia que representa el sector porcino para la Región de Murcia, que ocupando solo el 2,2% del territorio nacional, es el quinto productor del país con 1.949.255 animales producidos. Las principales áreas porcinas dentro de la región se sitúan en los municipios de Lorca –primer productor regional-, Puerto Lumbreras y Fuente Álamo. La producción de ganado porcino está muy extendida en Murcia gracias a empresas que distribuyen productos del cerdo a nivel internacional.

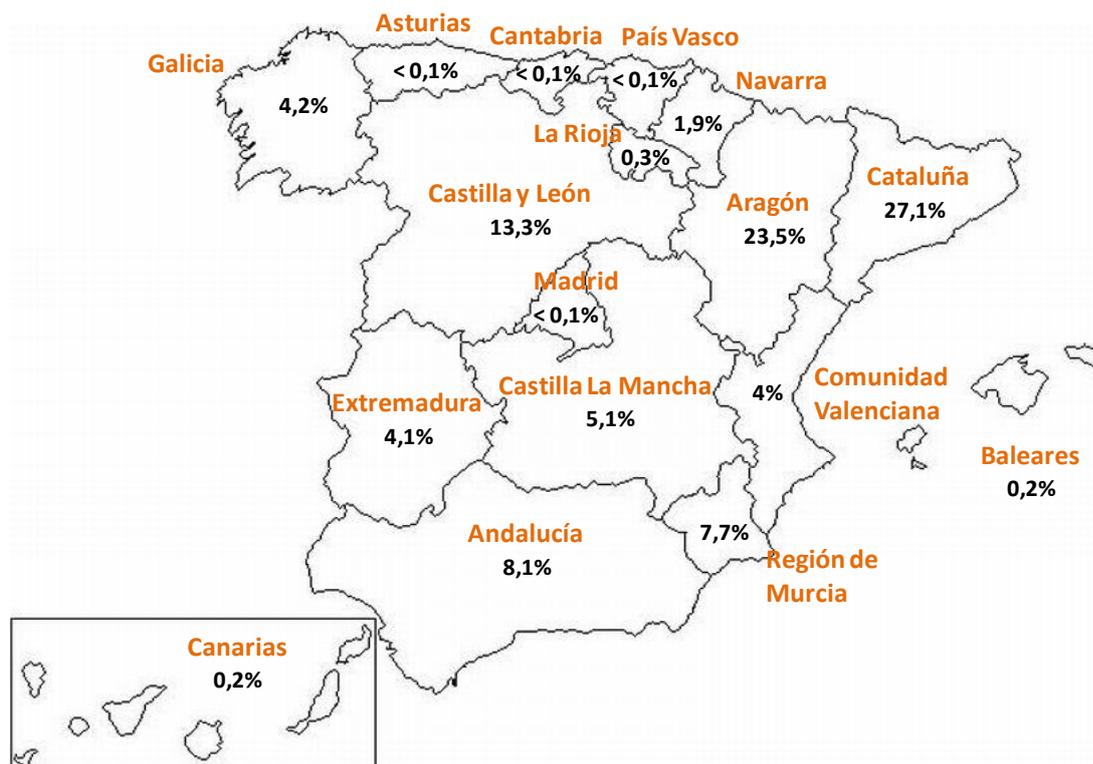
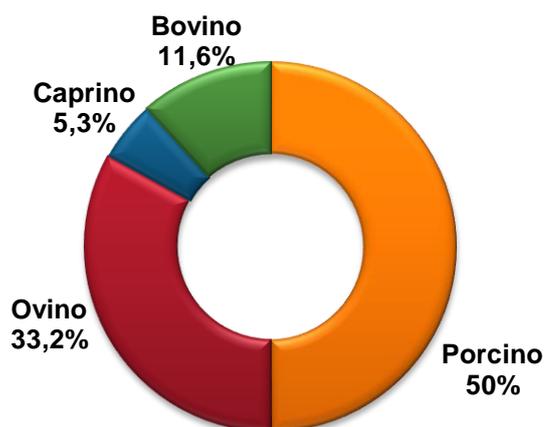


Figura I.3. Distribución del censo de porcino en España, por Comunidades Autónomas (MAGRAMA, 2012).

De los últimos datos oficiales de la CARM (2009), se extrae que la producción de carne de porcino supone en torno al 82% del total de carne producida, lo que explica la importancia, a nivel económico, que esta actividad representa en la región. En este sentido, atendiendo al número de animales producidos de las distintas especies, cabe destacar el predominio del ganado porcino en la Región de Murcia, con un 70,4% respecto al 50% de la media nacional (**Figura I.4**).

También existen pequeñas producciones de Chato Murciano, raza autóctona de la región, del que se obtienen también productos muy apreciados que se elaboran mediante métodos tradicionales.

España



Murcia

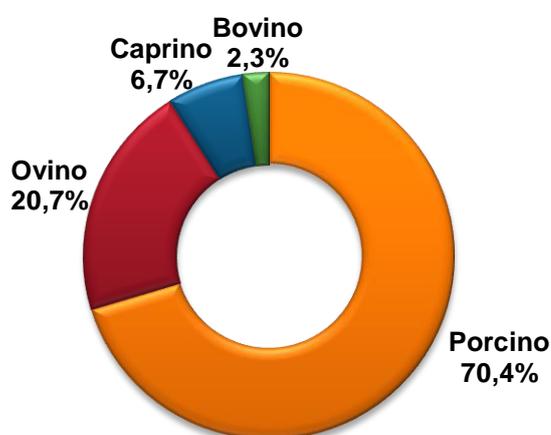


Figura I.4. Estructura de la cabaña ganadera en España y la Región de Murcia, datos de 2012 y 2011, respectivamente (CARM, 2011; MAGRAMA, 2012).

I.1.2 Consumo de carne de cerdo y fases críticas de su producción.

La carne de cerdo es la más consumida en el mundo (Faostat, 2011), y sin embargo, también es una importante fuente de transmisión de patógenos y enfermedades a humanos a través de la alimentación, por lo que un cuidadoso manejo desde la producción de los animales hasta la transformación y empaquetado de la carne es crucial para evitar la contaminación de estos productos (Baer *et al.*, 2013).

I.1.2.1 Consumo de carne de cerdo.

Los cerdos son animales con una gran eficiencia biológica, solo superada por las aves de corral, es decir, el alimento que ingieren se transforma de una manera eficiente en proteína. Además, la producción comercial y las técnicas de manejo y nutrición han conseguido aumentar esa eficiencia, obteniendo también carnes con un menor perfil graso o más saludable, más acorde con las exigencias del mercado actual (López-Bote *et al.*, 1999). Aunque existen variaciones entre razas, los cerdos son en general animales prolíficos y presentan un alto rendimiento de la canal, lo que convierte al porcino en una actividad interesante dentro de las producciones ganaderas, teniendo además en cuenta su papel como fuente de proteína de alto valor biológico, aspecto importante tanto en países desarrollados como en vía de desarrollo.

La carne de cerdo ha sido un alimento denostado, cuyos beneficios y perjuicios para la salud humana son habitualmente cuestionados. Según la base de datos española de composición de alimentos (BEDCA), las partes magras del cerdo aportan, por cada 100 g, unas 131 Kcal y poseen 74,4 g de agua, 21 g de proteína y 5,1 g de grasa total. La carne de cerdo posee ácidos grasos saturados, aunque también su contenido en grasas monoinsaturadas, con características beneficiosas para la salud, es elevado, y en una proporción superior al resto de carnes. También su contenido en colesterol es moderado, entre 65-75 mg, y se debe tener en cuenta que tiene un porcentaje bajo de grasa infiltrada, por lo que puede ser fácilmente retirada. De los minerales que se pueden encontrar destacan el calcio, potasio, magnesio, sodio, fósforo, zinc y hierro. Además, aporta vitaminas como la vitamina E, niacina, riboflavina, vitamina B12, vitamina B6 y sobre todo tiamina o vitamina B1, cuya cantidad es unas ocho veces mayor a la del resto de carnes, importante para el correcto funcionamiento del sistema nervioso y corazón.

De los últimos datos aportados por Faostat en 2011 se obtiene que en el mundo hay un consumo de carne de cerdo de unos 15,5 kg/habitante/año, mientras que en el conjunto de la Unión Europea ese dato se eleva a 40,4 kg/habitante/año. En España, el consumo de esta carne ha sufrido un descenso importante, ya que en el año 2000 la cifra se situaba cerca de los 64

kg/habitante/año y en el año 2011 el consumo per cápita ronda los 48,5 kg/año. No obstante, nuestro consumo se sitúa por encima de la media europea y de otros países consumidores como China (35,8 kg/habitante/año) y Estados Unidos (27,9 kg/habitante/año). Dentro de Europa, los países con un mayor consumo son Austria (67,6 kg/habitante/año) y Alemania (53,5 kg/habitante/año), mientras que Dinamarca (18,3 kg/habitante/año) y Estonia (26,10 kg/habitante/año) son los países menos consumidores de carne de porcino.

En España hay un gran mercado tanto de producto fresco como transformado, así, según las estadísticas del MAGRAMA referentes al año 2013, desde el año 2009 el consumo de carne de cerdo elaborada supera en aproximadamente 2 kg al de carne fresca. Esta diferencia parece ampliarse ligeramente ya que el consumo de transformados cárnicos aumentó un 2% respecto al año 2012, mientras que la carne fresca solo aumentó un 1,2% ese mismo año. Entre los consumidores murcianos la brecha entre estos dos tipos de producto es aún mayor, con una diferencia de casi 4,5 kg por habitante y año a favor de la carne transformada.

I.1.2.2 Fases críticas de la producción porcina.

En la producción porcina se diferencian básicamente dos tipos de sistema productivo, por un lado la porcicultura intensiva y por otro la extensiva o semiextensiva, de carácter minoritario y con el cerdo ibérico como principal representante. La producción intensiva se caracteriza por una optimización del rendimiento de los animales para ofrecer productos de calidad al menor coste y tiempo posible. Este tipo de manejo conlleva la aparición de momentos o etapas críticas a lo largo de la producción.

Al cerdo utilizado en ganadería intensiva en nuestro país se le denomina, de forma genérica, cerdo blanco, híbridos comerciales fruto de una cuidada selección genética en función de las características que se pretendan conseguir (prolificidad, rendimiento de la canal, etc.). La vida productiva de estos animales se diferencia, a su vez, en dos ciclos. Por un lado está el ciclo de las reproductoras, cuyo objetivo es la producción de lechones, y el ciclo de los

lechones, cuyo fin es la obtención de animales engordados con destino al matadero. Este último ciclo consta de tres etapas consecutivas:

- 1) Período de lactancia con la madre, que dura entre 3 y 4 semanas y en el que los animales alcanzan entre 5 y 7 kg de peso.
- 2) Fase de destete o transición, con una duración entre 35 y 50 días, en la que se obtienen animales de entre 17 y 22 kg de peso.
- 3) Fase de crecimiento o cebo, con una duración aproximada de 15 semanas, que variará en función del peso de sacrificio que se pretenda obtener.

Uno de los puntos críticos de la producción porcina aparece durante las primeras 48 horas de vida. El primer día tras el nacimiento, para aumentar la supervivencia, se asegura la toma de calostro por parte de los lechones y se procede a la homogeneización de camadas en función del número de animales nacidos vivos, de la capacidad lechera de la madre y del número de mamas funcionales. No obstante, durante estos dos días se produce la mayoría de muertes en lactación, debido principalmente a la debilidad de los animales y a los aplastamientos que causan las madres. Cabe diferenciar entre los lechones nacidos ya muertos, cuyo porcentaje promedio es de un 8%, y los muertos durante los primeros días después del parto, que son entre un 11 y un 12% (van Kempen y Tibble, 2006).

El momento del destete y la entrada en transición se considera el punto más crítico en la producción intensiva porcina. Con el fin de obtener mejores resultados reproductivos, en España el destete se produce de manera abrupta y precoz a los 21-28 días de edad. Esta práctica provoca serios problemas al animal, comprometiendo su salud y supervivencia. Una de las consecuencias más importantes es el estrés generado en los animales debido a la separación de la madre, a la reorganización de camadas en las que aparecen nuevas jerarquías y al cambio de alimentación y alojamiento. A esto se suma la inmadurez del aparato digestivo que no está totalmente preparado para la nueva alimentación, produciéndose un estrés nutricional y un descenso brusco en el consumo de alimento. Se considera que a partir de los 35 días el animal está maduro para adaptarse a la nueva situación. Además, el desarrollo del

sistema inmunológico en animales destetados precozmente es escaso y su capacidad para resistir a enfermedades es débil. Durante el destete aparecen distintas enfermedades que cursan con diarrea en la mayoría de los casos. La colibacilosis post-destete, debida a cepas enterotoxigénicas de *Escherichia coli*, es la principal causa de diarrea en esta etapa, pero existen también enfermedades subclínicas como la salmonelosis, causada por *Salmonella typhimurium*, en la que los signos clínicos son variables y en ocasiones imperceptibles, con lo que es difícil su detección y pueden llevar a una propagación rápida (Pérez y Nofrarías, 2008). Así, pese a que todo el manejo de este período está enfocado a la reducción del estrés y al aumento de la supervivencia, la mortalidad en esta etapa en la UE osciló en 2010 entre el 3,8 y el 8,9 % (BPEX, 2011).

I.1.3 Antibióticos promotores del crecimiento y su prohibición.

En la producción animal ha sido práctica habitual el uso de medicamentos antimicrobianos. Estos antibióticos se usan con fines terapéuticos, para tratar al animal que ya está enfermo, para lo que se requiere el control de un veterinario que actuará según la normativa vigente. Sin embargo, estos medicamentos también se han venido utilizando desde los años 50 con fines profilácticos, para prevenir la aparición de enfermedades, en dosis subclínicas como promotores del crecimiento animal, considerándolos como aditivos del pienso, y por tanto, excluidos de la inspección ordinaria veterinaria de control de la administración de antibióticos. Para estos aditivos antimicrobianos existía una lista positiva legislada, respetándose además los períodos de supresión del antibiótico antes del sacrificio.

La inclusión de antibióticos promotores del crecimiento (APC) a la dieta de cerdos disminuye el coste de las producciones, puede mejorar la ganancia de peso y el índice de conversión de alimento, así como disminuir la morbilidad, mortalidad y las enfermedades subclínicas, mejorando el estado general de salud de los animales (Cromwell, 2002). Estos efectos se observan con más claridad en la fase de destete, donde los animales se enfrentan a multitud de cambios. La mejora en la ganancia de peso que experimentan los animales se estima en un 5-6%, mientras que la eficiencia en la conversión de alimento

puede mejorar entre un 3 y un 4% (Jensen y Engberg, 2004). Otros estudios con cerdos en la fase de destete muestran también una mejora en el rendimiento cuando el pienso se suplementa con antibióticos simples, o una mezcla de ellos, comparado con una dieta sin suplementar, aunque no se observan beneficios adicionales (Yun *et al.*, 2007).

Según la revisión de Dibner y Richards (2005), los antibióticos administrados oralmente en monogástricos como promotores del crecimiento intervienen directamente sobre la microbiota intestinal, interactuando con ella y modificándola. Esto explica el descenso en la competición por los nutrientes y la reducción de los metabolitos generados por la microbiota, incrementando así la disponibilidad de nutrientes y la energía en el animal. Por otro lado, la ingesta de estos antibióticos parece reducir la renovación celular del intestino y, por tanto, el grosor de la pared intestinal, lo que estos autores asocian a una mejora en la digestibilidad de los nutrientes. Ya que estos aditivos muestran su máxima eficacia en granjas con niveles bajos de higiene se cree que otro de sus beneficios reside en la mejora del control de patologías (Corpet, 2000).

A pesar de los beneficios que el uso de los APC puede suponer a los animales en este aspecto, son numerosos los estudios que informan sobre la aparición de resistencias a antibióticos en bacterias de interés humano y veterinario, que el uso prolongado de estos aditivos puede provocar (Torres y Zarazaga, 1998; Shea, 2003). Ya a finales de los años 60 el gobierno británico publicó un informe sobre el uso de antibióticos promotores del crecimiento (Swann *et al.*, 1969), donde se recomendaba la supresión de estos aditivos advirtiendo de la posible aparición de bacterias resistentes en animales que podrían pasar posteriormente a los humanos a través de su carne, con especial atención en aquellos antimicrobianos empleados también en medicina humana. Así, en el entorno europeo se ha ido limitando el uso en alimentación animal de antibióticos usados en humanos y se ha ido escogiendo aquellos con mínima o nula absorción intestinal, para evitar los residuos en la carne, y con un efecto demostrado sobre el crecimiento animal. En el año 2003 el Parlamento Europeo aprueba el Reglamento CE 1831/2003 sobre los aditivos en alimentación animal, en el que se establece la retirada de los antibióticos promotores del

crecimiento en producción animal a partir del 1 de Enero del año 2006, a excepción de los coccidiostáticos y los histomonóstatos, de uso en la cría de conejos, pollos de engorde y pavos. El anuncio de esta prohibición ha promovido en Europa la inversión en la investigación de aditivos naturales sustitutos de los antibióticos.

Los microorganismos tienen la capacidad intrínseca de evolucionar, mutando y adaptándose a los agentes estresantes del ambiente, lo que les permite en ocasiones sobrevivir a pesar de las condiciones letales. Existe una enorme preocupación sobre este tema ya que genes resistentes a antibióticos pueden ser encontrados en multitud de medios y ubicaciones del planeta. Los animales son una de las fuentes de genes resistentes. Así, en un ensayo realizado con cerdos en Portugal (Pena *et al.*, 2004) se encuentra que cepas de *E. coli* aislada de heces presentan resistencia a amoxicilina, tetraciclinas y sulfonamidas. También en granjas de la República checa se encuentran cepas de *Escherichia coli* multiresistentes en cerdos y roedores (Literak *et al.*, 2009). Otros autores asocian el uso de la avoparcina como promotor del crecimiento en producción porcina y aviar con la aparición de *Enterococcus faecium* resistente a la vancomicina en los animales (Bager *et al.*, 1997). También en España, Saenz *et al.* (2000) informan de los posibles riesgos del uso de antibióticos en producción animal al encontrar en cerdos, pollos y humanos cepas de *Campylobacter* resistentes a distintos antibióticos, en pruebas realizadas a final de la década de los 90, mientras que más recientemente, en granjas porcinas holandesas se aísla una elevada proporción de cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina y a otros antibióticos como tetraciclinas (de Neeling *et al.*, 2007), incrementándose estas cepas resistentes con rapidez entre los años 2003 y 2008 (van der Wolf *et al.*, 2012). Comparando granjas de producción porcina libres de antibióticos frente a granjas convencionales, Thakur y Grebeyes (2005) encuentran una frecuencia de *Campylobacter coli* multiresistente significativamente más alta en animales tratados habitualmente con antibióticos. Estos y otros estudios ponen de manifiesto que la aparición y propagación de resistencias a los antibióticos es un gran problema de salud pública, tanto en la Comunidad Europea como en todo el mundo y destaca la importancia de establecer un control exhaustivo y un

uso racional de este tipo de sustancias. No obstante, otros autores (Martínez y Rojo, 2011) subrayan la complejidad de la situación, rechazando la idea de que la aparición de resistencias sea simple consecuencia del uso de antibióticos y relacionando la susceptibilidad a los antibióticos al propio metabolismo bacteriano.

La importante decisión de prohibir este tipo de sustancias en alimentación animal en la Unión Europea ha generado controversia y algunos autores como Casewell *et al.* (2003) advierten de las consecuencias negativas de esta prohibición como puede ser el incremento de las diarreas, la pérdida de peso y la mortalidad en lechones destetados precozmente, debido a bacterias como *Escherichia coli* y *Lawsonia intracellularis*. Sin embargo, poniendo atención en el caso de Suecia, donde los antibióticos promotores del crecimiento se prohibieron en el año 1986, se observa que los antimicrobianos no son la única solución a los problemas clínicos de la producción animal, y que el uso de sustancias de sustitución junto con unas buenas condiciones de producción pueden ofrecer los resultados deseados (Wierup, 2001).

I.2 DESTETE EN ANIMALES MONOGÁSTRICOS: ADAPTACIÓN A LA ALIMENTACIÓN SÓLIDA

I.2.1 Cambios fisiológicos y estructurales del epitelio intestinal.

El epitelio intestinal es la mayor superficie del cuerpo de los mamíferos en contacto con el ambiente externo, hecho que convierte a esta fina capa de células que recubren el tracto gastrointestinal en una importante parte del organismo. Además de ser el aparato digestivo el encargado de la digestión eficiente del alimento en nutrientes, el epitelio del intestino se encarga de asegurar la óptima absorción de estos nutrientes, así como de excluir y neutralizar componentes dañinos del contenido intestinal, incluidos ciertos microorganismos.

I.2.1.1 Descripción del epitelio intestinal.

El aparato digestivo está formado por el tracto digestivo, una serie de órganos huecos con una función concreta que forman un largo y tortuoso tubo que va desde la boca al ano, y las glándulas anejas que ayudan al cuerpo a transformar y absorber los alimentos. Las partes de las que se compone son el esófago, estómago, intestino delgado, intestino grueso (colon) y el ano. Las glándulas salivares, hígado y páncreas, vierten sus secreciones al tubo digestivo, cumpliendo así, entre todos, la función de extraer de los alimentos las materias primas necesarias tanto para la producción de energía como para fabricar y generar los elementos que conforman los distintos órganos y sistemas del organismo.

La estructura de la pared del tubo digestivo es similar a lo largo de los diferentes segmentos que lo forman, con algunas modificaciones que les permite realizar sus diferentes funciones de transporte, secreción, absorción y excreción. Según la definición de Young *et al.* (2000) y Martínez de Victoria *et al.* (2005), desde la luz hacia el exterior, nos encontramos las cuatro capas concéntricas que la forman, que son: mucosa, submucosa, muscular y serosa o adventicia (**Figura I.5**).

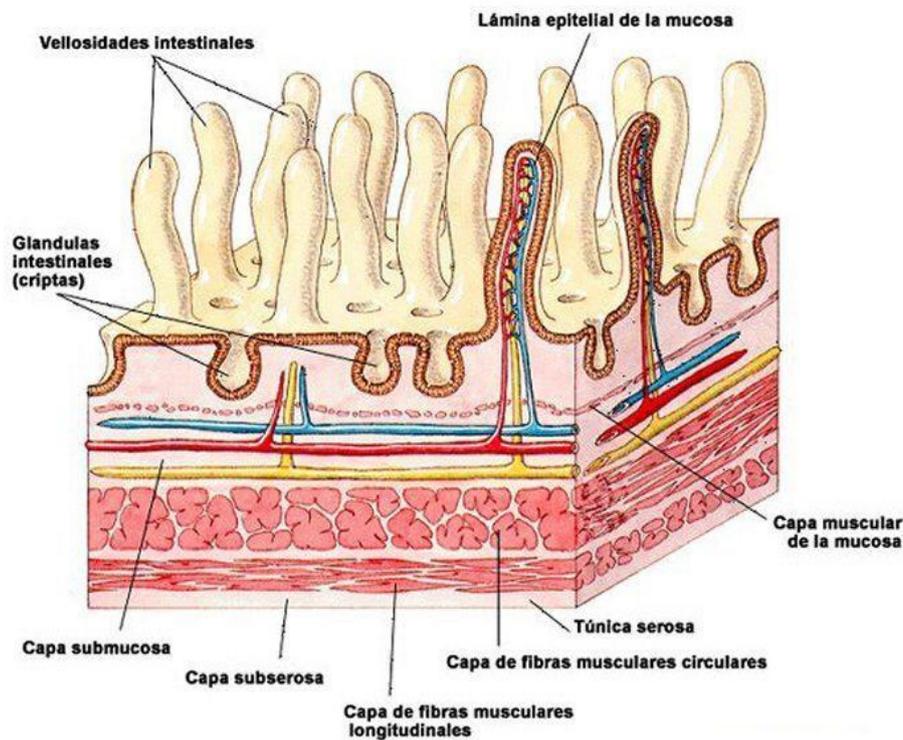


Figura I.5. Estructura general de las distintas capas de la pared del tracto gastrointestinal (Fuente: www.lookfordiagnosis.com).

Mucosa. Es la capa más interna, asociada a glándulas secretoras de moco y de electrolitos, así como a células secretoras de hormonas y enzimas necesarias para la digestión terminal y la absorción. Consta de tres componentes: el epitelio, capa simple de células epiteliales especializadas, una lámina propia de sostén y una fina capa de músculo liso, la *muscularis mucosae*, que permite los movimientos locales y los plegamientos de la mucosa. La capa mucosa es la que más variaciones sufre a lo largo de las distintas regiones del aparato digestivo.

Submucosa. Capa de tejido conjuntivo laxo que sostiene a la mucosa y que incluye vasos sanguíneos, linfáticos y haces de fibras nerviosas.

Muscular externa. Es la capa responsable de las funciones motoras del tracto digestivo. Se compone de una capa interna de células musculares lisas

de disposición circular y una capa externa de las mismas células distribuidas en sentido longitudinal.

Adventicia o serosa. Esta capa externa de tejido de sostén laxo conduce a los vasos y nervios principales.

Debido a su continuidad con el ambiente externo, el aparato gastrointestinal es una puerta de entrada potencial para microorganismos patógenos. Por esta razón, el sistema dispone de varios mecanismos de defensa como el sistema linfoide asociado al intestino. Los nódulos de tejido linfático que actúan en la defensa del organismo son particularmente grandes y abundantes en el ileon, donde forman lo que se denomina conglomerados linfonodulares ileales o placas de Peyer.

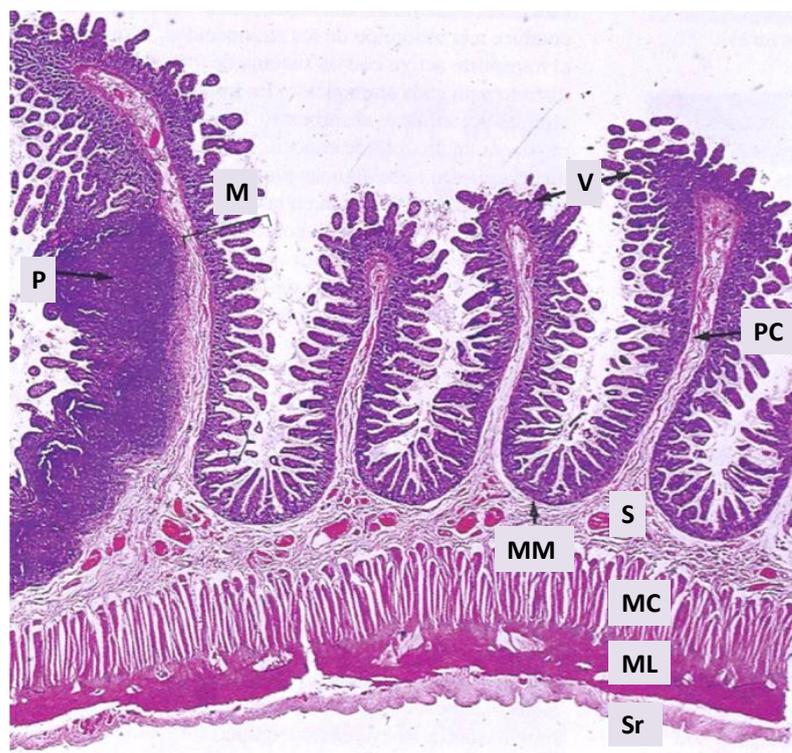


Figura I.6. Estructuras básicas del intestino delgado.

M- Mucosa; **MC-** Muscular circular; **ML-** Muscular longitudinal; **MM-** *Muscularis mucosae*;

P- Placas de Peyer; **PC-** Plicas circulares; **S-** Submucosa vascular; **Sr-** Serosa;

V- Velloidades.

La mucosa desempeña distintas funciones según el segmento intestinal en el que nos encontremos. En el intestino delgado su función principal es absorbiva, mientras que en el intestino grueso también desempeña una función protectora. La extensión de la superficie absorbiva del intestino delgado se amplifica por especializaciones de las células y los tejidos de la mucosa y la submucosa. Estas dos capas se disponen en pliegues circulares llamados plicas circulares, válvulas de Kerckring o válvulas conniventes (**Figura 1.6**), formando repliegues transversales permanentes. Los pliegues comienzan a aparecer alrededor de 5 a 6 cm después del píloro, siendo muy abundantes en la porción distal del duodeno y en el inicio del yeyuno, y disminuyendo su frecuencia en el tercio medio del íleon (Ross y Wojciech, 2007).

Además, en la mucosa del intestino delgado nos encontramos evaginaciones digitiformes o foliáceas llamadas vellosidades que se extienden dentro de la luz intestinal y que cubren por completo la superficie del intestino delgado. En la superficie luminal del intestino, a la altura de la base de las vellosidades, encontramos las glándulas intestinales o criptas de Lieberkühn que se extienden desde la muscular de la mucosa a través de todo el espesor de la lámina propia. Las glándulas están compuestas por un epitelio simple que es continuo con la superficie de las vellosidades. Asimismo, las células del epitelio de la mucosa aumentan la superficie de contacto mediante microvellosidades en la superficie apical de las mismas. El epitelio de la mucosa del intestino que recubre tanto las vellosidades como las criptas está formado por cinco tipos celulares (Ross y Wojciech, 2007):

Enterocitos. El tipo de células más abundante en el intestino delgado, son células cilíndricas altas que tienen un núcleo de posición basal, y su principal función es absorbiva ya que son células especializadas en el transporte de sustancias desde la luz del intestino hacia el torrente circulatorio. Las microvellosidades de los enterocitos producen la principal amplificación de la superficie luminal. En el extremo de las microvellosidades se observan unas proteínas mucilaginosas que forman un borde en cepillo, continuo y filamentoso, denominado glicocalix (Maury *et al.*, 1995), que le confiere a los enterocitos la capacidad secretora de enzimas glucoproteicas responsables de la digestión

terminal. Estas células también producen agua y electrolitos, principalmente en las células de las glándulas intestinales.

Células calciformes. Son glándulas unicelulares mucosecretoras dispersas entre las otras células del epitelio intestinal. La acumulación de gránulos de mucina produce la dilatación apical de la célula, manteniendo la región basal muy estrecha, dándole forma de copa o cáliz. El número de células va en aumento desde el duodeno hasta la región distal del colon y el recto con el fin de que las heces se compacten (Sancho *et al.*, 2003).

Células de Paneth. Estas células poseen un citoplasma basal basófilo, un aparato de Golgi supranuclear y grandes gránulos de secreción apicales que son muy acidófilos y retráctiles. Estos gránulos permiten la fácil identificación de la célula en los cortes histológicos de rutina. Son células que se encuentran presentes solo en el intestino delgado en la base de las glándulas intestinales y que trabajan en la regulación de la microbiota normal del intestino mediante la secreción de sustancias de acción antimicrobiana y con capacidad para fagocitar ciertas bacterias y protozoos.

Células enteroendocrinas. Estas células representan menos del 1 % de las células del epitelio (Sancho *et al.*, 2003) y producen diversas hormonas endocrinas y paracrinas parecidas a las presentes en el estómago que regulan la fisiología gastrointestinal.

Células M. Estas células cubren las placas de Peyer y los nódulos linfáticos. Poseen micropliegues superficiales en lugar de microvellosidades en su superficie apical y conducen microorganismos y macromoléculas desde la luz intestinal hacia las placas de Peyer, estimulando la respuesta del sistema inmunitario (Kucharzik *et al.*, 2000).

Además de estas células se pueden encontrar linfocitos intraepiteliales inmediatamente por encima de la membrana basal, que son sobre todo del tipo T y proporcionan defensa contra microorganismos invasores (Young *et al.*, 2000).

Distintos elementos del epitelio intestinal como son la capa mucosa, el estrecho empaquetamiento de las microvellosidades y el glicocalix, previenen del contacto directo de la mayoría de macromoléculas con la superficie apical del epitelio, mientras que las uniones estrechas entre células restringen el transporte paracelular de pequeñas moléculas, formando así, el epitelio, una barrera activa (Snoeck *et al.*, 2005).

I.2.1.2 Aspectos dinámicos.

El buen mantenimiento del epitelio del intestino es de gran importancia para la supervivencia del organismo ya que el paso por la barrera intestinal de algunas sustancias químicas y microorganismos puede suponer una amenaza. La rápida renovación celular permite mantener en buen estado el epitelio, siendo reemplazado cada 5 días en la familia *Muridae*, que incluye al género *Rattus* (Barker *et al.*, 2008), y cada 3-5 días en mamíferos en general (Moore y Lemischka, 2006).

Las células maduras del epitelio derivan de una sola población de células madre. La zona de replicación celular está restringida a la mitad basal de las glándulas intestinales, donde cada cripta contiene de 1 a 6 células madre que están en continua división (Sancho *et al.*, 2003). Las células hijas derivadas de éstas se dividen cada 12-16 horas mientras se mueven a lo largo de las criptas hacia el extremo de las vellosidades, generando unas 300 células por cripta cada día (Marshman *et al.*, 2002). En realidad, la migración celular es bidireccional, ya que las células mucossecretoras, absortivas y enteroendocrinas migran a lo largo de las vellosidades hacia el lumen, mientras que las células de Paneth migran en sentido opuesto, localizándose en la base de las criptas (**Figura I.7**) (Sancho *et al.*, 2003). Las células que migran en sentido ascendente se diferencian rápida e irreversiblemente en el punto de unión entre la cripta y la vellosidad (Barker *et al.*, 2008), en cambio, las células de Paneth se diferencian durante su migración a la base de la cripta, donde permanecen una media de 23 días antes de ser eliminadas por fagocitosis para su renovación (Cheng, 1974).

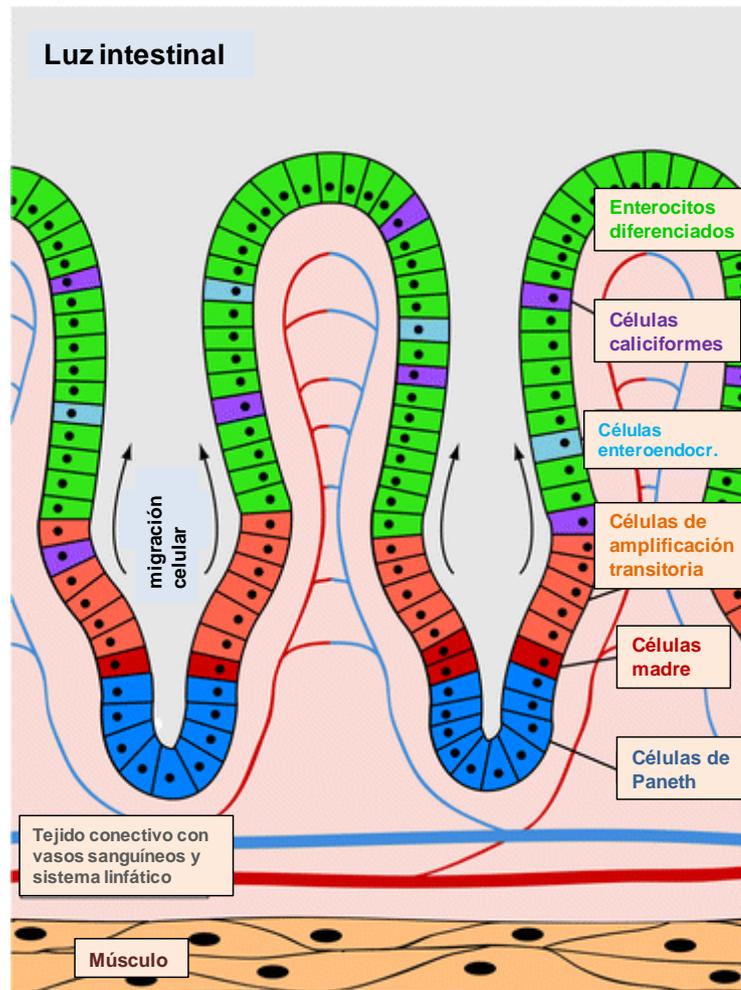


Figura I.7. Tipos de células del epitelio intestinal y movimiento de migración de las mismas (Näthke, 2004).

La muda o renovación celular tiene lugar en la zona de extrusión celular, en la parte superior de las vellosidades, donde la apoptosis -muerte celular programada- asegura la renovación celular. En general, la vida de organismos multicelulares se prolonga por un equilibrio entre mitosis y apoptosis, crecimiento e involución. Este proceso se considera la forma regulada de eliminar células viejas y usadas de las vellosidades intestinales (Godlewski *et al.*, 2005), aunque también otros factores como fuerzas mecánicas, bilis, enzimas pancreáticas, agresiones bacterianas, etc., pueden llevar a la eliminación de enterocitos (Clarke, 1973). Sin embargo, estudios realizados por Godlewski *et al.* (2004) demuestran que, al contrario de lo que ocurre en

animales adultos, en lechones recién nacidos las células apoptóticas se encuentran a lo largo de toda la vellosidad, incluyendo la mitad inferior y las criptas, mientras que en la parte superior de las vellosidades es donde se produce la muda.

Además, como recogen Cliffe *et al.* (2005), el dinamismo del epitelio puede actuar también como un mecanismo de respuesta inmune ante la infección por parásitos intestinales. El aumento del ritmo de la renovación celular favorecería la expulsión de nematodos gastrointestinales del intestino grueso.

I.2.1.3 Cambios en el destete.

El tracto gastrointestinal (TGI) en cerdos neonatos se encuentra con numerosos retos y diversos factores de estrés durante el periodo postnatal, particularmente los primeros días inmediatos al nacimiento y tras el destete.

Las primeras 24 horas tras el nacimiento son de vital importancia para el lechón, tanto para la supervivencia temprana como para la posterior resistencia a enfermedades debido al consumo de calostro. En la revisión realizada por Le Dividich *et al.* (2005) se recogen diversos factores que afectan tanto al consumo de calostro como a la concentración de IgG contenida en el mismo. Así, la concentración de IgG es menor en primíparas y varía según la posición de las mamas, pero, sin embargo, esta concentración no depende del número de animales por parto, por lo que a mayor número de animales menor disponibilidad de calostro. Otros factores que pueden ocasionar variaciones dentro de animales de la misma camada son la exposición al frío, extremidades rotas, hipoxia y el orden de nacimiento, que condicionarán el consumo de calostro y la adquisición de un buen nivel de inmunidad que repercutirá en la salud y el rendimiento durante el destete.

En el primer día, tras el nacimiento, se produce un incremento del 72% en el peso del intestino delgado, debido principalmente, a un aumento del peso de la mucosa (115%). Relacionado con este cambio en el peso de los tejidos, nos encontramos también un incremento del 24% en la longitud y un aumento del 15% en el diámetro del intestino delgado, y un incremento del 33 al 90% de

la altura y de un 14 al 51% del diámetro de las vellosidades intestinales (Xu *et al.*, 1992). Antes del destete, las vellosidades son muy largas debido a que la descamación de los enterocitos es mínima durante la lactancia y así, las células de las criptas son capaces de reemplazar las células de las vellosidades a la misma velocidad a la que se eliminan (Allee y Touchette, 1999).

En la Unión Europea, la mayoría de lechones se destetan a las 3 o 4 semanas de edad, lo que conlleva el cambio a la alimentación sólida, la mezcla de animales de diferentes camadas y, en ocasiones, el transporte a granjas especializadas para el crecimiento de lechones (Hendriks *et al.*, 1998). Teniendo además en cuenta que la producción de enzimas capaces de degradar materias primas de origen vegetal sufre un descenso brusco en el momento del destete, y que hasta las ocho semanas no se produce un desarrollo completo (Jensen *et al.* 1997), podemos considerar la fase de destete la más crítica en producción porcina.

En respuesta a esto, el tracto gastrointestinal sufre profundos cambios que aceleran el crecimiento de los tejidos y la maduración celular (Xu *et al.*, 2000; Godlewski *et al.*, 2005). El significativo incremento de peso de la mucosa de la primera a la novena semana de vida indica que, durante este periodo, el intestino sufre un aumento sustancial de su tamaño para adaptarse a la ingesta de nutrientes (Adeola y King, 2006). En cerdos destetados a los 21 días de vida, el peso total del intestino y el peso de la mucosa intestinal incrementan más rápidamente las dos semanas posteriores al destete, mientras que de la quinta semana hasta el final de la transición ese incremento se hace más lento (Adeola y King, 2006). Sin embargo, mientras que el peso del intestino de cerdos aumenta en proporción directa a su peso corporal (Adeola y King, 2006), en ratas, el incremento de peso intestinal es desproporcionadamente rápido en relación a su peso (Tolozza y Diamond, 1992). Otros estudios observan una pérdida de peso del intestino de cerdos y su mucosa de un 20-30% durante los dos primeros días tras el destete y una recuperación completa entre cinco y diez días después (Spreeuwenberg, 2002).

En cuanto a la relación entre la altura de las vellosidades y la profundidad de las criptas, consideramos que es óptima durante la lactancia, sin embargo,

este equilibrio se pierde tras del destete, ya que las vellosidades disminuyen su altura y las criptas aumentan su profundidad (Budiño *et al.*, 2005; Spreeuwenberg *et al.*, 2001). La altura de las vellosidades disminuye considerablemente en los dos primeros días y no empiezan su recuperación hasta al menos cuatro días después. La profundidad de las criptas permanece invariable al inicio y después aumenta para ayudar a crear más células que migren hacia las vellosidades con el fin de facilitar la digestión y absorción (Allee y Touchette, 1999; Boudry *et al.*, 2004). Otros autores (Skrzype *et al.*, 2005) observaron, además, una disminución en la longitud de las vellosidades y un cambio en la forma de las mismas. Las vellosidades pasan de ser digitiformes durante la lactancia a presentar formas más achatadas (de hoja, de lengua, etc.) y con una base ancha tras el destete. Durante la lactación en ratas se produce una fisión de las criptas intestinales, lo cual se asocia a un incremento en el número de criptas. Este fenómeno precede al de la hiperplasia de las criptas, que se produce principalmente durante el destete y que parece ser una reacción inmunológica a este proceso (Cummins *et al.*, 2006).

A su vez, el proceso de destete conlleva una disminución de la ingesta debido al cambio de alimentación y al estrés. En ratas adultas el ayuno provoca un descenso en la altura de las vellosidades del yeyuno y un incremento en la permeabilidad de la mucosa del yeyuno y del íleon (Wirén *et al.*, 1999), lo que supone una disminución de la función de barrera de la mucosa del intestino delgado y una posible entrada de infecciones, que también se ha descrito a los cuatro o cinco días tras el destete en cerdos (Spreeuwenberg *et al.*, 2001; Boudry *et al.*, 2004). En episodios asociados al estrés, Boudry *et al.* (2007) describieron también en ratas una modificación en la renovación celular debida a un aumento inicial de la apoptosis en las criptas, seguida de un incremento en la proliferación de enterocitos migrando hacia las vellosidades para restablecer la homeostasis. Ambos hechos se traducen en un epitelio inmaduro y, por lo tanto, en una alteración en la función de barrera de la mucosa. La mucosa deteriorada por un ayuno agudo puede permitir el paso de antígenos presentes en el lumen hacia la lámina propia donde ya se ha iniciado una respuesta inflamatoria. Sin embargo, tanto la inflamación intestinal como la morfología del epitelio mejoran cuando la ingesta normal se reanuda (McCracken *et al.*, 1999).

I.2.2 Microbiota intestinal.

La microbiota intestinal en mamíferos juega un papel importante en la salud general del animal, estableciéndose mediante un proceso que pasa por varias etapas y que se produce de forma distinta en cada una de las secciones del intestino. Este proceso puede influir en la mortalidad temprana de los lechones, ya que ayuda a incrementar la habilidad de los animales a sobrevivir al contacto con patógenos, influyendo, además, en el desarrollo del sistema inmune y la posterior susceptibilidad a enfermedades. Como regla general, e independientemente de la edad del animal, existe un aumento de la carga bacteriana y de la complejidad de la microbiota desde el estómago hacia el recto (Konstantinov *et al.*, 2004).

I.2.2.1 Colonización microbiana.

El establecimiento de la microbiota intestinal es un proceso complejo que conlleva una primera fase de colonización durante la cual el tracto gastrointestinal de los recién nacidos es rápidamente invadido por bacterias, y tras sucesivos procesos ciertos grupos bacterianos se vuelven predominantes. Este proceso continúa con la madurez del animal hasta el establecimiento de una comunidad bacteriana dinámica y característica de cada individuo (Zoetendal *et al.*, 2001)

En el momento del nacimiento el tracto gastrointestinal es estéril, hasta que se produce la ruptura de la membrana fetal y el lechón entra en contacto con una gran variedad de microbios. El animal entra en contacto con el canal del parto, las heces y la piel de la madre, así como con el ambiente de la granja, dando comienzo a la colonización del tracto gastrointestinal de los lechones (Conway, 1997). A pesar de la gran variedad de poblaciones microbianas a las que están expuestos los neonatos, no todas ellas colonizarán el tracto digestivo, ya que este proceso estará influenciado por la dieta, factores ambientales y por el propio individuo (Mackie *et al.*, 1999). En el primer paso de la colonización el 80% del total de bacterias son aerobios y anaerobios facultativos, alcanzándose, tras doce horas de vida, una carga bacteriana en el contenido del colon distal de $10^9 - 10^{10}$ UFC/g (Swords *et al.*, 1993). Debido a la gran

cantidad de bacterias aerobias se consume el oxígeno disponible y se reduce el potencial redox, consiguiendo a las 48 horas tras el nacimiento una comunidad bacteriana formada por un 90% de anaerobios estrictos, principalmente *Lactobacillus* spp. y *Streptococcus* spp. (Swords *et al.*, 1993). Sin embargo, las técnicas microbiológicas dependientes de cultivo utilizadas tradicionalmente, pueden dar una visión sesgada de la diversidad microbiana del intestino, y así, en ensayos realizados por Inoue *et al.* (2005) usando electroforesis en gel con gradiente de temperatura (TGGE, por sus siglas en inglés), los organismos anaerobios estrictos empiezan a dominar en el contenido fecal a partir del quinto día del nacimiento, colonizando el tracto gastrointestinal al finalizar la primera semana de vida y desplazando gradualmente a los organismos aerobios (Morelli *et al.*, 2008).

Mediante el estudio de la microbiota con análisis dependientes de cultivo se encontró que las bacterias más importantes en colonizar el intestino son bacterias lácticas, enterobacterias y streptococos (Stewart, 1997), organismos acostumbrados, en general, a utilizar el sustrato lácteo disponible. Usando técnicas basadas en el 16S ARNr, Konstantinov *et al.* (2006), encontraron que los primeros colonizadores del íleon a los dos días del nacimiento son *Escherichia coli*, *Shigella flexneri*, *Lactobacillus sobrius*, *Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus reuteri*.

Aunque la diversidad de bacterias anaerobias presentes en el intestino va incrementando con el tiempo Inoue *et al.* (2005), durante el proceso de lactación la microbiota permanece relativamente estable, y no es hasta la introducción del alimento sólido en la dieta del lechón cuando se producen los principales cambios en la comunidad bacteriana. Así, mediante el análisis del rRNA 16S, se observa que inmediatamente antes del destete especies del género *Lactobacillus* como *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus sobrius* y *Lactobacillus acidophilus* son aún los organismos dominantes tanto en estómago como en yeyuno e íleon (Konstantinov *et al.*, 2006; Su *et al.*, 2008), lo cual fue confirmado también por Pieper *et al.* (2006) mediante métodos tradicionales dependientes de cultivo.

I.2.2.2 Cambios en la microbiota intestinal en el período post-destete y en la edad adulta.

En el período inmediatamente posterior al destete se producen cambios tanto en la composición como en la estabilidad de la microbiota, dejando al lechón más susceptible a una proliferación de bacterias patógenas y potencialmente causante de enfermedad. El período breve de ayuno que ocurre generalmente tras el destete y el posterior consumo de una dieta sólida, conlleva una alteración de la cantidad y tipo de sustrato disponible para los microorganismos en todos los segmentos del tracto digestivo (Pluske *et al.*, 2003b). Los perfiles bacterianos encontrados por Inoue *et al.* (2005) en las heces de cerdos destetados son diferentes de aquellos encontrados en cerdos lactantes debido, principalmente, al cambio de alimento.

En el contenido digestivo del íleon se observa un aumento de enterobacterias, que pueden incluir a especies potencialmente patógenas como *E. coli* o *Salmonella* spp., a los cinco días del destete, aunque estos niveles descienden seis días después a niveles próximos a los de la lactación (Jensen, 1998). También otros autores observaron mediante técnicas de cultivo tradicionales (Pieper *et al.*, 2006) y técnicas moleculares (Konstantinov *et al.*, 2006), un aumento de enterobacterias inmediatamente después el destete, disminuyendo tras pocos días en algunos casos, a niveles incluso inferiores a los encontrados al final de la lactación. Tras el destete la microbiota intestinal se vuelve más compleja (Konstantinov *et al.*, 2004), aumentando los niveles de otras especies potencialmente patógenas como *Clostridium* sp. (Konstantinov *et al.*, 2006) o *Streptococcus suis* (Su *et al.*, 2008).

De modo inverso, las bacterias del género *Lactobacillus* experimentan un descenso en el tracto digestivo cuando los lechones son separados de sus madres y se produce el cambio de alimentación. Pieper *et al.* (2006) observó este descenso el primer día post-destete, principalmente en íleon, produciéndose posteriormente una recuperación en los niveles de estas bacterias, llegando a superar en número, tras once días, a las encontradas durante el período de lactación. Otros ensayos realizados utilizando técnicas moleculares de análisis constatan el descenso de *Lactobacillus* spp. después

del destete en distintos segmentos del tracto gastrointestinal (Konstantinov *et al.*, 2006; Su *et al.*, 2008).

Una vez que los animales se acostumbran a la nueva alimentación y su sistema inmune se desarrolla, la microbiota se vuelve más estable y compleja. En análisis realizados sobre secuencias 16S ARNr obtenidas del íleon y heces de cerdos cercanos a la edad adulta (Mulder *et al.*, 2009), el Phylum *Firmicutes* fue el más abundante (70%), siendo las familias *Lactobacillaceae*, con el filotipo *L. amylovorus* como mayoritario (Leser *et al.*, 2002), *Peptostreptococcaceae* y *Clostridiaceae* las predominantes dentro de este Phylum. El Phylum *Proteobacteria* supone cerca del 18% de la microbiota, siendo las clases predominantes la *Gammaproteobacteria*, que incluye a *E. coli*, y la *Epsilonproteobacteria*, cuyas principales familias son *Helicobacteraceae* y *Campylobacteraceae*. El otro Phylum mayoritario es *Bacteroidetes*, siendo la familia *Prevotellaceae* la más abundante.

Sin embargo, incluso durante la edad adulta, se siguen produciendo cambios en la microbiota del intestino, aunque la mayor variación de poblaciones bacterianas es principalmente el resultado de cambios en las especies menos dominantes de cada individuo (Kim *et al.*, 2011). Estos mismos autores también encontraron que los Phyla *Firmicutes* y *Bacteroidetes* son los predominantes en las heces de cerdos adultos y que dentro de ellos se producen variaciones con la edad, como el aumento de las clases *Clostridia* y *Erysipelotrichi* o el descenso en *Bacilli* y *Bacteroidia*, aunque la tendencia observada es una convergencia hacia un estado más homogéneo conforme los animales crecen. Una comunidad bacteriana comensal estable y compleja previene la invasión de patógenos, requisito fundamental para conseguir un ecosistema gastrointestinal sano (Konstantinov *et al.*, 2004).

No obstante, como ya se ha dicho, diversos factores como la dieta (Montagne *et al.*, 2004; Manzanilla *et al.*, 2004; Janczyk *et al.*, 2010), la edad a la que se produce el destete (Risley *et al.*, 1992; Franklin *et al.*, 2002), el estrés, la higiene y el ambiente de cría durante la edad temprana (Mulder *et al.*, 2009; Schmidt *et al.*, 2011) o factores intrínsecos al propio individuo (Zoetendal *et al.*, 1998; Simpson *et al.* 2000), influyen en gran medida en la colonización y

composición de la microbiota, datos que hay que tener muy en cuenta a la hora de comparar tratamientos y por lo que es difícil hablar de una microbiota gastrointestinal normal en la edad adulta.

I.2.3 Moduladores actuales del equilibrio intestinal.

Uno de los mayores problemas a los que se enfrenta la producción comercial porcina es el control de la diarrea que se produce en los animales tras el destete, la cual conlleva grandes pérdidas económicas. Una de las principales enfermedades que tiene lugar en este período es la colibacilosis post-destete, causada por cepas enterotoxigénicas de *Escherichia coli*. Sin embargo, no es el único agente causante de diarrea en porcino, ya que especies de los géneros *Brachyspira*, *Lawsonia*, *Clostridium* y *Salmonella*; y algunos virus como coronavirus y rotavirus, pueden ser el origen de patologías digestivas de diversa gravedad que sufren los animales durante la etapa de transición (Pluske *et al.*, 2003b; Pérez y Nofrarías, 2008).

Con la prohibición total en el año 2006 del uso de antibióticos promotores del crecimiento en alimentación animal, se abre una nueva vía de investigación de posibles alternativas al uso de estas sustancias, poniendo especial atención en la fase crítica del destete. Las distintas estrategias y aditivos alimentarios que se han venido utilizando en alimentación porcina en los últimos años, persiguen mejorar la microbiota intestinal, estimular la respuesta inmune y mejorar la capacidad digestiva y absorbente del intestino, para conseguir, en última instancia, un aumento de la productividad.

Para establecer un equilibrio entre los distintos componentes del ecosistema, principalmente la mucosa y la microbiota, el uso de una adecuada estrategia nutricional tras el destete permite crear las condiciones idóneas en el tracto gastrointestinal, minimizando así alteraciones en la estructura y función del intestino y reduciendo las probabilidades de sufrir alguna patología de tipo entérico (Montagne *et al.*, 2004).

Cualquier componente de la dieta es susceptible de ser modificado con el fin de obtener el equilibrio deseado. Así, los distintos elementos de la dieta - principalmente proteína, carbohidratos y fibra- se incorporan a la alimentación

variando tanto sus niveles como la fuente de la que se obtienen (Pluske *et al.*, 2003d). Otras estrategias se basan en un cambio en la presentación del alimento, aportando adicionalmente otras características, como ocurre con el alimento líquido fermentado (Canibe y Jensen, 2012). Diferentes ingredientes incorporados al alimento en pequeña proporción han demostrado ser aditivos suficientemente potentes para modular el equilibrio intestinal de animales monogástricos (Ravindran, 2010).

En este apartado se pretende hacer una revisión de las principales estrategias alimentarias y aditivos ensayados en alimentación porcina con el objetivo de ofrecer una solución al bajo rendimiento productivo de los animales con motivo de los desequilibrios presentados durante el destete.

I.2.3.1 Fibra dietética.

La fibra dietética (FD) o alimentaria ha sido definida históricamente como la suma de polisacáridos vegetales y lignina, que son resistentes a la hidrólisis por los enzimas digestivos del ser humano (Trowel *et al.*, 1976). Años más tarde, la American Association of Cereal Chemist (2001) la definía como la parte comestible de las plantas o hidratos de carbono análogos que son resistentes a la digestión y absorción en el intestino delgado, con fermentación completa o parcial en el intestino grueso en función de su estructura, excluyendo la lignina que no es fermentable por las bacterias del colon. Debido a la heterogeneidad de los compuestos que forman la FD aún hoy no existe una definición completamente aceptada. Algunos autores como Ha *et al.* (2000) sugieren incluso eliminar la FD del grupo de nutrientes de los carbohidratos ya que algunos componentes definidos como FD no son químicamente tales, como la lignina, cutina, suberina o ceras. Según la clasificación hecha por estos autores la FD incluye polisacáridos no amiláceos (PNA) (celulosa, β -glucanos, hemicelulosas, pectinas y análogos, gomas y mucílagos), ligninas, almidones resistentes, oligosacáridos resistentes (fructooligosacáridos e inulina, galactooligosacáridos, xigooligosacáridos y isomaltooligosacáridos), hidratos de carbono sintéticos y fibras de origen animal. Cabe destacar, que los oligosacáridos resistentes son generalmente incluidos en la definición de

prebióticos y como tales se expondrán dentro de ese grupo de aditivos alimentarios.

Gran cantidad de dietas “starter” diseñadas para la etapa posterior al destete se basan en cereales, la mayoría de ellos con elevada cantidad de PNA, y en proteínas procedentes de distintas fuentes, obteniéndose resultados contradictorios en cuanto a la ganancia de peso con alguna de estas dietas. En ensayos llevado a cabo por Pluske *et al.* (2003a) evaluando el efecto de diferentes fuentes y niveles de fibra dietética se observó que con una dieta mezcla de arroz cocido y proteína animal se producía un crecimiento más rápido destinado a la ganancia de peso de la canal en vez de al crecimiento del tracto gastrointestinal. También con una dieta mezcla de la anterior con almidón de maíz con elevada amilosa se encontraron semejantes mejoras en el peso. Sin embargo, las ensayos realizados por Montagne *et al.* (2012), ponen de manifiesto un descenso en el rendimiento productivo de aquellos animales alimentados con fibra dietética tras el destete, principalmente en ambientes de cría con unas condiciones sanitarias deficientes.

En cuanto a la repercusión sobre la acidez del contenido intestinal, se observó que una dieta con proteína aislada de altramuz y almidón de maíz, con elevadas cantidades de amilosa, disminuía el pH de ciego y colon a través de las heces, indicando mediante la fermentación de la fibra alimentaria una producción continua de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) en el intestino grueso, que dependiendo de su pK_a , ratio de producción, absorción y utilización, generarán un pH determinado (Pluske *et al.*, 2003a). La naturaleza de la fibra influirá en gran medida en la velocidad de producción de AGCC y en su composición (Freire *et al.*, 2000). En este sentido Metzler *et al.* (2008) encontraron una mayor concentración de AGCC en el íleon de cerdos adultos alimentados con almidón –fuente de carbohidratos fácilmente fermentables en el intestino delgado-, comparado con dietas control y ricas en pectina y celulosa. Sin embargo, la fermentación de pectinas y celulosa predomina en el intestino grueso. Así, en los animales alimentados con pectina se encontraron en heces las concentraciones más elevadas de AGCC y el menor valor de pH, no siendo así con la celulosa, que al ser fibra insoluble es fermentada con menor facilidad

que la pectina en el intestino grueso (Wang *et al.*, 2002). Sin embargo, durante la fase de destete, una alimentación rica en fibra insoluble promueve un ambiente beneficioso en el intestino debido a que favorece la producción de ácido láctico en el estómago e intestino delgado, y la producción de ácido butírico en intestino grueso, encontrándose, en general, menores valores de pH a lo largo del tracto gastrointestinal, comparado con otro tipo de fibras (Högberg y Lindberg, 2006). También Carneiro *et al.* (2008) observaron un incremento en la concentración de ácido butírico en ciego y colon de cerdos en la fase de destete alimentados con una dieta rica en fibra insoluble. Además, los AGCC que se producen en el intestino grueso por la fermentación de nutrientes no digeribles pueden ser absorbidos en esta porción del intestino y metabolizados, contribuyendo al suministro de energía del animal (Wenk, 2001).

También se ha relacionado el contenido de fibra dietética soluble de la dieta con un aumento del volumen y la viscosidad aparente del contenido digestivo del íleon, ralentizando así su evacuación (Pluske *et al.*, 2003a; Hedemann *et al.*, 2006). La disminución de la velocidad del tránsito facilita el sobrecrecimiento de bacterias en los segmentos superiores del intestino que produce la desconjugación de las sales biliares necesarias para la emulsión de las grasas (Ravindran, 2010). Además, el aumento de la viscosidad aparente del contenido intestinal incrementa la sensación de saciedad en los animales, disminuyendo en consecuencia la ingesta de alimento, lo cual se relaciona con una reducción en la longitud de las vellosidades intestinales (Marion *et al.*, 2002).

La fibra dietética influye también sobre la composición microbiana del colon. Así, dietas ricas en fibra insoluble provocan un descenso en la diversidad del ecosistema, dando lugar a comunidades más homogéneas (Högberg *et al.*, 2004; Castillo *et al.*, 2007), lo cual puede indicar un descenso de la resistencia a microbios invasores. Sin embargo, en los ensayos llevados a cabo por Petterson *et al.* (2010), la adición a la dieta de fibra insoluble no influyó en el recuento de bacterias totales, *Lactobacillus* spp. y *Bifidobacterium* spp. en cerdos durante el destete. Por el contrario, una dieta rica en fibra soluble, principalmente pectinas, conduce a una estabilización más rápida de la

comunidad bacteriana en el momento crítico del destete y a una mayor diversidad microbiana (Konstantinov *et al.*, 2003). Este tipo de fibra parece aportar la energía necesaria para el desarrollo de la comunidad bacteriana comensal en el intestino grueso.

Pero además de estos efectos beneficiosos, se ha descrito que una alta cantidad de fibra en la dieta afecta a la hidrolización y digestión en el intestino delgado de ciertos nutrientes (glucosa, colesterol, algunos minerales como el Zn, Fe, Ca, Cu, Mg, Si y vitamina B12) ya que hay una mayor dificultad para ponerse en contacto los nutrientes con las secreciones digestivas, lo cual interfiere en su absorción. Esto es en parte debido al incremento en la secreción de mucus por parte de la mucosa, lo que perjudica el transporte de los nutrientes hasta la superficie epitelial, quedándose estos compuestos “encapsulados” en la fibra y llevados al intestino grueso (Rodríguez-Palenzuela *et al.*, 1998; Bach Knudsen, 2010).

I.2.3.2. Prebióticos.

El concepto de prebiótico fue definido por Gibson y Roberfroid en 1995 como un ingrediente no digerible que afecta beneficiosamente al individuo mediante el estímulo selectivo del crecimiento y/o la actividad de uno o de un limitado número de bacterias en el colon, repercutiendo en su salud.

Aunque la fibra dietética y los prebióticos comparten muchas propiedades y en algunos casos se usen indistintamente, no son lo mismo. Ambos son ingredientes no digeribles, ya que son resistentes a la hidrólisis de los enzimas digestivos humanos, pero los prebióticos son fermentados selectivamente por microorganismos beneficiosos del colon (bifidobacterias y lactobacilos) mientras que la fibra dietética engloba un conjunto heterogéneo de moléculas distintas que son fermentadas total o parcialmente por un amplio rango de microbios colónicos (Manning y Gibson, 2004; Ouwehand *et al.*, 2005).

En este apartado se hará una revisión de los ingredientes más comúnmente usados como prebióticos, los cuales son mezclas de oligosacáridos no digeribles, excepto la inulina, que es una mezcla de fruto-oligosacáridos y fructo-polisacáridos (Saad *et al.*, 2012).

Uno de los efectos más destacados de los prebióticos es el aumento en la producción de ácidos grasos de cadena corta (AGCC), principalmente ácido acético, propiónico y butírico, debido a la fermentación de los oligosacáridos por parte de la microbiota intestinal, lo que conllevaría un aumento en la diversidad de la misma (Konstantinov *et al.*, 2003; Zhu *et al.*, 2003). Sin embargo, Marinho *et al.* (2007) no observaron un aumento intestinal significativo de AGCC en lechones recién destetados con una dieta suplementada con xilo-oligosacáridos (XOS), mientras que la inclusión de inulina en la dieta de lechones recién destetados provocó un descenso significativo del ácido acético en colon, pero un aumento del ácido láctico (Mair *et al.*, 2010). Un aumento en la producción de AGCC debido a la fermentación de ciertos prebióticos se relaciona con un descenso del pH cecal y del colon proximal (Shim, 2005). Sin embargo, debido a que los AGCC se absorben rápidamente en el intestino grueso en ocasiones las concentraciones encontradas en colon distal y heces no se corresponden con los ratios de producción, y por tanto se obtienen datos de pH sin variaciones entre tratamientos (Cummings *et al.*, 1987; Houdijk *et al.*, 1998).

También ciertos prebióticos ejercen un efecto antioxidante, bien a través de algunos productos de su fermentación como los AGCC, o directamente actuando como captadores de especies reactivas al oxígeno, hecho que puede ser estimulante del sistema inmune y producir un efecto beneficioso ante un brote bacteriano (Van den Ende *et al.*, 2011). Un efecto sobre el sistema inmune ha sido visto por Niewold *et al.* (2012), ya que los arabinoxilano-oligosacáridos (AXOS) parecen regular la respuesta inmune innata de la mucosa del intestino delgado en lechones infectados con *E. coli* enterotoxigénico.

Otro de los efectos que se atribuye a los prebióticos es su poder para modular la microbiota del intestino de forma beneficiosa. Mair *et al.* (2010) observaron, en lechones suplementados con inulina tras el destete, un aumento de microorganismos aerobios totales en estómago y yeyuno, mientras que se produjo un descenso de *Enterococcus spp.* en colon. Ensayos *in vitro* realizados por Hang y Zhu (2012) mostraron un efecto beneficiosos de los manano-oligosacáridos (MOS) sobre la diversidad y la estabilidad de la comunidad bacteriana de cerdos recién destetados, mientras que en cerdos adultos, la

adición de MOS en la dieta parece reducir la cantidad de salmonellas excretadas en heces de animales previamente infectados (Calveyra *et al.*, 2012). También los fructo-oligosacáridos (FOS) han demostrado ejercer un efecto beneficioso respecto a un control sobre la microbiota cecal de ratas, reduciendo el número de coliformes, de bacterias de la clase *Clostridia* y de *Bacteroides* spp., e incrementando la presencia de bifidobacterias (Montesi *et al.*, 2005). Además, algunos oligosacáridos, principalmente Xilo-oligosacáridos (XOS), reducen *in vitro* la adhesión de *Listeria monocytogenes* a las células epiteliales, lo cual explicaría el efecto de algunos de estos prebióticos contra este tipo de infecciones (Ebersbach *et al.*, 2012).

Aunque se atribuye a los prebióticos un efecto sobre el crecimiento de los animales estos resultados variarán dependiendo del compuesto elegido. El rendimiento general de los lechones no se vio afectado por la suplementación de la dieta con inulina (Mair *et al.*, 2010), aunque sin embargo, la suplementación con MOS provocó la mayor ganancia de peso en cerdos durante la fase de destete, respecto a una dieta basal (Zhao *et al.*, 2012).

En lo que se refiere a la morfología intestinal, Marinho *et al.* (2007) observaron, respecto al grupo control, un pequeño efecto positivo de los XOS sobre la longitud de las vellosidades del intestino en lechones sometidos a una anastomosis ileo-rectal, lo cual podría mejorar la absorción de nutrientes y, en última instancia, el rendimiento productivo de los animales en situaciones críticas. También se ha descrito un efecto beneficioso de los FOS sobre la densidad de las vellosidades del duodeno y el íleon de cerdos después del destete (Budiño *et al.*, 2005).

Un aspecto importante a tener en cuenta es la dosis utilizada de los prebióticos a incluir en la dieta, según la cual los efectos conseguidos pueden ser distintos. En los ensayos llevados a cabo por Nochta *et al.* (2010) la inclusión de 2 g/kg de manano-oligosacáridos en la dieta de cerdos, en la fase de destete, mostró una mejora en la digestibilidad de diversos nutrientes respecto a antibióticos promotores del crecimiento, pero la introducción de dosis mayores en la dieta no supuso ningún beneficio. Tampoco en cerdos en cebo alimentados con isomalto-oligosacáridos (IMO) se encontró una mejora de la

digestibilidad de materia seca y calcio con el aumento de la dosis en la dieta (Li *et al.*, 2009).

I.2.3.3 Probióticos.

Los aditivos usados como probióticos en alimentación han sido definidos por la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura y la Organización Mundial de la Salud (2002) (FAO y OMS) como aquellos organismos vivos que administrados en las cantidades adecuadas ejercen un beneficio sobre la salud del individuo.

La mayoría de los efectos que se atribuyen a los probióticos están relacionados, directa o indirectamente con el tracto gastrointestinal. El mecanismo y la eficacia de un efecto probiótico puede depender de las interacciones con la microbiota específica del huésped, de la inhibición de patógenos intestinales, de la reducción de metabolitos dañinos en el intestino y/o de los efectos sobre el sistema linfático asociado al intestino (de Vrese y Offick, 2010).

Los organismos vivos usados como probióticos influyen de diferentes maneras en la salud gastrointestinal de los animales y en su microbiota. Muchos de los probióticos utilizados en alimentación animal estimulan la microbiota intestinal beneficiosa e inhiben microorganismos patógenos a través de la acidificación del medio y la producción de ácidos orgánicos y sustancias antibacterianas (Mantere-Alhonen, 1995; Marinho *et al.*, 2007), como algunas especies del género *Bifidobacterium* administradas con la dieta, las cuales provocan un incremento en el número de bifidobacterias viables en el ciego de cerdos tras el destete (Modesto *et al.*, 2009). Además, también se ha probado la eficacia de los probióticos contra la diarrea post-destete ocasionada por cepas enterotoxigénicas de *Escherichia coli* (Kyriakis *et al.*, 1999; Bhandari *et al.*, 2008), lo cual puede deberse a una limitación en la adhesión de las fimbrias de *E. coli* enterotoxigénica a la mucosa del íleon, evitando o minimizando un posible efecto patógeno de estos organismos, como se ha señalado con otros probióticos (Daudelin *et al.*, 2011).

Por otro lado, como modo de mejorar la función de barrera del intestino y hacer frente al potencial ataque de patógenos durante el destete, algunos probióticos como *Pediococcus acidilactici* (Daudelin *et al.*, 2011) o cepas apatógenas de *Escherichia coli* (Trebichavsky *et al.*, 2010), estimulan la función inmune intestinal a través de la expresión de citoquinas, mecanismo que ha sido también propuesto por Kreuzer *et al.* (2012) para explicar el descenso en la cantidad de rotavirus excretada en heces de cerdos alimentados con *Enterococcus faecium*.

Además, los probióticos pueden ejercer un efecto, no solo sobre la microbiota, sino también sobre la morfología intestinal, encontrándose estructuras intestinales en mejor estado en aquellos animales suplementados con organismos vivos beneficiosos que en animales sin suplementar (Ross *et al.*, 2010). Otros autores sugieren que la administración de probióticos como suplemento de la leche materna en lechones afecta a la colonización temprana y al buen desarrollo y mantenimiento de la estructura intestinal durante el destete (Gebert *et al.*, 2011).

Los efectos sobre el rendimiento productivo de los animales son dispares, ya que algunas especies ejercen un efecto promotor del crecimiento de lechones tras el destete mientras que otras no muestran tal efecto (Modesto *et al.*, 2009). Animales suplementados con *Saccharomyces cerevisiae* ssp. *boulardii* y *Pediococcus acidilactici* mostraron una mejora significativa del índice de conversión de cerdos durante la etapa de transición, en relación a un control (Le Bon *et al.*, 2010). También en los ensayos llevados a cabo por Ross *et al.* (2010), la alimentación con *Lactobacillus amylovorus* y *Enterococcus faecium* mostraron una mejor eficiencia en la conversión de alimento de cerdos durante el destete respecto al control, aunque no se encontraron diferencias en el peso final de los animales. En trabajos recientes, otros autores (Kreuzer *et al.*, 2012) exponen sin embargo, que algunas cepas de *Enterococcus faecium* no presentan beneficios sobre el rendimiento de lechones infectados con *Salmonella typhimurium*, llegando incluso a aconsejar la reconsideración de este organismo como probiótico.

De los distintos ensayos llevados a cabo con la administración de organismos vivos en cerdos en la fase de destete, se deduce que el efecto probiótico podría ser el resultado de su influencia positiva sobre el equilibrio de la microbiota intestinal (Metzler *et al.*, 2005). Sin embargo, como ocurre con otros aditivos utilizados en la dieta, la efectividad de los probióticos dependerá del organismo o mezcla de organismos seleccionados, las cepas, la dosis administrada, las interacciones con medicamentos o con otras sustancias de la dieta, la tecnología utilizada para la fabricación del alimento, las condiciones de almacenamiento y la duración del experimento (Kyriakis *et al.*, 1999; Chen *et al.*, 2005, Kenny *et al.*, 2011), además de tener en cuenta la alta variabilidad encontrada entre individuos en respuesta a probióticos (Fuller, 1995; Chen *et al.*, 2005; Jacela *et al.*, 2010).

I.2.3.4 Simbióticos.

La unión de probióticos y prebióticos administrados en la dieta se conoce con el nombre de simbióticos, y juntos pueden incrementar la tasa y el tiempo de supervivencia de los organismos beneficiosos durante su paso por el tracto gastrointestinal, contribuyendo así a la mejora de los efectos probióticos (Zimmerman *et al.*, 2001).

Algunos ensayos realizados sobre cerdos en la fase de destete muestran una mejora de los efectos de organismos probióticos cuando se administran en unión de prebióticos, afectando de forma beneficiosa a la microbiota intestinal (Nemcová *et al.*, 2002), o a la prevención de la diarrea ocasionada en el destete por cepas virulentas de *Escherichia coli* (Krause *et al.*, 2010), aumentando por consiguiente, el rendimiento de los animales en esta etapa. Sin embargo, en otras pruebas realizadas con simbióticos los resultados no han sido los esperados, y la unión de probiótico y prebiótico no ha supuesto una mejora de los efectos evaluados (Juśkiewicz *et al.*, 2007).

Es por tanto necesario señalar la gran importancia que tiene una correcta selección de las especies y cepas a utilizar así como el tipo de prebiótico, ya que no todos los organismos probióticos verán mejorados sus efectos con la administración de un prebiótico, y el efecto que se pretende potenciar será

diverso dependiendo de la mezcla realizada. De manera *in vitro* ha sido validado el aumento de la supervivencia de algunos probióticos en combinación con prebióticos (Martínez *et al.*, 2011), observándose además en otros ensayos (Hernández-Hernández *et al.*, 2012) que la resistencia a las condiciones gastrointestinales y el carácter hidrofóbico (asociado al potencial de adhesión del organismo probiótico) dependen enormemente de los prebióticos usados como fuente de carbono y de la cepa utilizada. Otros autores (Ogawa *et al.*, 2005), tras probar diferentes especies de bacterias lácticas y entéricas junto con dextranos, observaron que solo dos cepas de *Lactobacillus casei* subsp. *casei* son capaces de usar ese dextrano y que su administración conjunta por vía oral mejora la inmunidad en ratones. Del mismo modo, Modesto *et al.* (2009, 2011) seleccionaron una fórmula simbiótica mejorada compuesta por una cepa de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*, FOS de remolacha y nitrato, con efecto positivo sobre la ganancia de peso, el índice de conversión de alimento y el estado sanitario de los cerdos durante el destete.

1.2.3.5 Acidificantes.

Desde hace años, los ácidos orgánicos y sus sales han sido la alternativa más prometedora y que más interés ha suscitado en la comunidad científica al uso de antibióticos (Jensen, 1998). Antes incluso del anuncio de la prohibición de los antibióticos en alimentación animal, se han venido usando los ácidos orgánicos principalmente como conservante del pienso, y sus efectos en porcino han sido ampliamente estudiados (Risley *et al.*, 1991, 1992; Gabert y Sauer, 1994, 1995; Roth y Kirchgessner, 1998).

Según la lista de aditivos aprobados por la Unión Europea en 2003, algunos de los ácidos orgánicos y las sales de estos que se utilizan en alimentación animal son: ácido sórbico, sorbato potásico, ácido fórmico, formiato sódico, formiato cálcico, diformiato potásico, acetato cálcico, diacetato sódico, ácido propiónico, propionato sódico, propionato cálcico, lactato cálcico, ácido benzoico, benzoato sódico; así como mezclas comerciales de algunas de estas sustancias, también aprobadas para su uso en nutrición animal. Aunque el mecanismo de acción de los acidificantes no está del todo claro, así, Mroz (2005) sugiere en su revisión distintas formas de actuación, que en gran parte

dependerán del pK_a de la sustancia utilizada. Las formas no disociadas pueden atravesar por difusión la membrana celular de los patógenos, destruyendo así su citoplasma e inhibiendo su crecimiento. Una de las acciones más conocidas de los ácidos orgánicos es su capacidad de reducción del pH gástrico, ya que en el destete se produce un aumento del pH por la reducción del ácido láctico y la incorporación a la dieta de proteínas y minerales, hecho desfavorable para la proliferación de bacterias acidolácticas y favorable para otros organismos, como coliformes. La reducción del pH promovida por los ácidos orgánicos favorece la activación del pepsinógeno, potenciándose su actividad hidrolítica y la liberación de iones H^+ , formando una barrera contra la colonización de patógenos. Además, estos aditivos pueden actuar como sustrato energético para el crecimiento de las células epiteliales y el desarrollo de la mucosa, así como funcionar como precursores para la síntesis de aminoácidos no esenciales, ADN y gran cantidad de lípidos necesarios para el crecimiento intestinal.

Uno de los efectos directos de la suplementación de ácidos orgánicos es la acidificación de la dieta (Risley *et al.*, 1992; Castro, 2005; Kluge *et al.*, 2006), inhibiendo así el crecimiento de muchas bacterias y algunas levaduras y hongos, y ayudando a la conservación de los piensos antes de su consumo. En algunas ocasiones la disminución del pH también se extiende al contenido gastrointestinal con determinados ácidos, como el fórmico (Franco *et al.*, 2004) o la combinación de este con ácido láctico (Hansen *et al.*, 2007). Sin embargo, el descenso del pH gástrico parece no ser su principal consecuencia, ya que en otras ocasiones no se observa el esperado efecto acidificador del estómago ni del intestino de los animales alimentados con este tipo de aditivos (Risley *et al.*, 1992; Franco *et al.*, 2004; Halas *et al.*, 2007).

En relación a la acidez del estómago, Gerritsen *et al.* (2010) atribuyen al descenso del pH gástrico debido a la ingesta de ácido fórmico y otros ácidos orgánicos, el incremento significativo, frente a un control, de la digestibilidad fecal de la fibra cruda en cerdos en la fase de destete. Otros autores (Guggenbuhl *et al.*, 2007) observan además, una mejora de la digestibilidad del nitrógeno total y la energía con una preparación comercial de ácido benzoico al 0,5%.

En cuanto a la modificación del perfil de ácidos grasos volátiles producidos en los diferentes segmentos del tracto gastrointestinal también se observan datos contradictorios. Mientras que en algunos casos la adición de sales y ácidos orgánicos puede modificar positivamente la actividad bacteriana en lo que a producción de AGCC y amonio se refiere (Kasproicz-Potocka *et al.*, 2009), en otras ocasiones, la suplementación de la dieta con estos aditivos no produce diferencias respecto a un control, tanto en la fase post-destete (Risley *et al.*, 1992) como en cerdos adultos (Øverland *et al.*, 2008).

Asimismo, aunque estas sustancias han sido propuestas como potenciadores del rendimiento en lechones destetados precozmente, los resultados obtenidos son variables. Se observa un efecto beneficioso de ciertos ácidos orgánicos sobre el rendimiento productivo de los animales durante la fase posterior al destete, siendo el ácido benzoico uno de los más efectivos (Kluge *et al.*, 2006; Guggenbuhl *et al.*, 2007; Halas *et al.*, 2010), y en animales adultos, ácidos como el fórmico, benzoico o sórbico ejercen también una ligera mejora en el índice de conversión de alimento (Øverland *et al.*, 2007). En otras ocasiones, sales como el diformiato de potasio (Canibe *et al.*, 2001), o mezclas de ácidos benzoico, fumárico, cítrico y fosfórico (Chiquieri *et al.*, 2009) no suponen una diferencia en el rendimiento de los animales frente a dietas control.

La consecuencia más importante de la adición de ácidos orgánicos a la dieta es su efecto antimicrobiano y su capacidad para modificar la microbiota gastrointestinal, observándose en este aspecto mayor consistencia en los resultados de los estudios realizados. A nivel *in vitro*, Knarreborg *et al.* (2002) desarrollaron un sistema para la evaluación de los efectos de los ácidos orgánicos sobre la microbiota (principalmente, bacterias coliformes y bacterias lácticas) de las partes más proximales del tracto gastrointestinal de cerdos, como paso preliminar a estudios *in vivo*, observándose una fuerte influencia del pH en el ratio de crecimiento de las bacterias, especialmente coliformes. Otros estudios *in vitro* evidencian que los ácidos orgánicos pueden ejercer un efecto inhibitor o estimulante sobre la microbiota del ciego dependiendo del ácido y de la dosis empleada, y muchos de ellos pueden influir de manera beneficiosa en

las fermentaciones bacterianas, reduciendo la concentración de amoníaco (Biagi y Piva, 2007). En cuanto a los efectos *in vivo*, dosis adecuadas de ácidos orgánicos pueden tanto reducir la población de enterobacterias en el estómago de cerdos recién destetados (Hansen *et al.*, 2007), como ejercer un efecto inhibidor de hongos (Calvo *et al.*, 2006). También estas sustancias parecen ser útiles y efectivas para tratar la diarrea post-destete ocasionada por cepas enterotoxigénicas de *Escherichia coli* (Tsiloyiannis *et al.*, 2001; De Busser *et al.*, 2011). Otros acidificantes como el diformiato de potasio afectan de forma positiva disminuyendo la carga total de bacterias anaerobias, bacterias acidolácticas, coliformes y levaduras tanto de las heces como de distintos segmentos del tracto gastrointestinal de lechones (Canibe *et al.*, 2001), mientras que el ácido benzoico estimula una mayor diversidad bacteriana (Halas *et al.*, 2010), y mezclas comerciales de ácidos orgánicos ejercen un efecto modificador muy significativo al aumentar la cantidad de bacterias lácticas beneficiosas en íleon, en relación a una dieta control (Gong *et al.*, 2008). Sin embargo, en otros estudios (Martín-Peláez *et al.*, 2010), la adición de ácidos orgánicos a la dieta tras el destete no influyó en la cantidad de *Salmonella typhimurium* encontrada en el íleon y en el ciego de cerdos infectados, debido, probablemente, a las inadecuadas dosis empleadas.

En cuanto a los efectos observados en la morfología intestinal, algunas mezclas de ácidos no han aportado ningún beneficio (Chiquieri *et al.*, 2009), mientras que otros aditivos, como el ácido benzoico parecen ejercer una mejora mediante el aumento de la longitud de las vellosidades intestinales (Halas *et al.*, 2010).

Como se ha señalado para otros aditivos, la dosis y el tipo de ácido o sal utilizada es esencial para optimizar los resultados. La utilización de dosis bajas puede ser insuficiente a la hora de observar un claro efecto positivo, pero por otro lado, un exceso en las dosis puede ser contraproducente al reducirse la palatabilidad del pienso y provocar un descenso en el consumo (Medel *et al.*, 1999). En este sentido, características particulares de cada sustancia como su acción específica sobre bacterias, levaduras o mohos, su estado (líquido, sólido, etc.), su olor o color, se deberán tener muy en cuenta a la hora de formular el

alimento para mantener una ingesta continua y adecuada alrededor del momento del destete y conseguir el objetivo deseado.

I.2.3.6 Aditivos vegetales.

El uso de aceites esenciales (AE) y extractos vegetales en la dieta ha sido ampliamente estudiado en pollo (Botsoglou *et al.*, 2002), ternera (O'Grady *et al.*, 2006), cordero (Simitzis *et al.*, 2008; Nieto *et al.*, 2010a; 2010b), cerdo (Hanczakowska *et al.*, 2007; Simitzis *et al.*, 2010) y pavo (Botsoglou *et al.*, 2003), principalmente, por su papel antioxidante sobre la carne de estos animales, así como sobre la composición de ácidos grasos, tanto de la carne como de la grasa, encontrándose un aumento en la proporción de ácidos grasos poliinsaturados omega 3 y omega 6 (Hanczakowska *et al.*, 2007; Liotta *et al.*, 2007). En estudios con extractos de romero en alimentación de rumiantes, se comprobó la transmisión de componentes bioactivos que mejoran la estabilidad oxidativa de la carne (Moñino *et al.*, 2008), ejerciendo un efecto protector sobre la oxidación de lípidos e inhibiendo el desarrollo de la microbiota alterante en carnes envasadas en atmósfera modificada, incrementando la vida comercial de la carne de cordero (Nieto *et al.*, 2010a).

Además, debido a que las plantas y sus extractos se han usado tradicionalmente por sus distintas acciones biosaludables, después de la prohibición de los antibióticos promotores del crecimiento ha ido aumentando el interés de su uso en alimentación animal como alternativa natural a estos aditivos. Existen numerosos estudios *in vitro* que han demostrado la capacidad antimicrobiana de diferentes extractos de plantas y aceites esenciales (Gutiérrez-Lugo *et al.*, 1996; Martínez *et al.*, 1996; Hammer *et al.*, 1999; Rauha *et al.*, 2000; Rawani *et al.*, 2011), incluidas especies potencialmente patógenas a nivel gastrointestinal (Tekwu *et al.*, 2012), así como su potencial antioxidante (Lee y Shibamoto, 2002). Por ello, y debido al aumento de la resistencia a antibióticos de muchas bacterias, se han propuesto estos productos como suplemento a la dieta de cerdos para la prevención de infecciones intestinales de elevada incidencia durante la fase crítica de destete. Algunos de estos aditivos vegetales en la dieta ejercen también un efecto beneficioso sobre el apetito y la digestión (Platel y Srinivasan, 1996; Ramakrishna *et al.*, 2003), por

lo que actuarían como promotores del crecimiento, mejorando el rendimiento de la camada. Este tipo de aditivos han sido ensayados con efectos positivos sobre la salud intestinal en pollos de engorde (Jang *et al.*, 2007; Naidoo, *et al.*, 2008; Hashemi *et al.*, 2012) y la fermentación ruminal (Chaves *et al.*, 2008; Jami *et al.*, 2012).

En ganadería porcina, algunos ensayos realizados sobre lechones tras el destete muestran un aumento de la digestibilidad total aparente de materia seca y nitrógeno, en relación a un control, cuando se suplementa la dieta con una mezcla de extractos secos de plantas como trigo sarraceno, cúrcuma, tomillo, pimienta negra y jengibre (Yan *et al.*, 2012). Asimismo, se ha observado como incrementa la digestibilidad aparente de aminoácidos en íleon y su cantidad en sangre, lo cual indica una mejora en la digestión y absorción de aminoácidos en cerdos recién destetados (Kong *et al.*, 2009), lo que podría traducirse en un mecanismo para la promoción del crecimiento. En este aspecto, las respuestas son variables y dependen en gran medida del tipo de sustancia utilizada. Algunos ensayos muestran una mejora en los parámetros de crecimiento y de conversión de alimento similares a los obtenidos con antibióticos, tanto en la fase de destete (Guerra *et al.*, 2008; Ding *et al.*, 2011) como en animales adultos (Yan *et al.*, 2011). También parece ser interesante la suplementación de la dieta de las madres lactantes con extractos de plantas para aumentar el rendimiento de estas y de los lechones durante la lactancia (Ilsley *et al.*, 2003; Matysiak *et al.*, 2012), llegando así al momento del destete con un mejor estado de salud general. Sin embargo, en algunas ocasiones, y aunque otros parámetros se vean afectados positivamente, los efectos promotores del crecimiento esperados no se han observado con la utilización de ciertos aditivos vegetales en lechones en la fase de transición (Namkung *et al.*, 2004; Yan *et al.*, 2012). Este supuesto efecto promotor del crecimiento se relaciona también con una mejora en la morfología intestinal que propicie una correcta absorción de nutrientes (Ding *et al.*, 2011; Hanczakowska y Swiatkiewicz, 2012).

En cuanto al efecto antimicrobiano *in vivo* que poseen gran cantidad de extractos vegetales, también se ha observado a nivel gastrointestinal, suponiendo una prevención de la diarrea post-destete. Los ensayos llevados a

cabo por Yan *et al.* (2012) muestran un descenso de la concentración de *E. coli* expulsada en las heces al final de la fase de transición. Además, el uso de estos aditivos parece afectar a la relación de especies y a la diversidad de la comunidad microbiana intestinal (Castillo *et al.*, 2006), variando positivamente, respecto a dietas control, la relación de lactobacilos, coliformes y enterobacterias en distintos segmentos del intestino y en heces (Manzanilla *et al.*, 2004; Namkung *et al.*, 2004).

También se ha descrito un efecto beneficioso de algunos de estos extractos sobre la respuesta inmune y la proliferación de linfocitos (Kong *et al.*, 2007; Yan *et al.*, 2012), jugando así una papel protector frente a infecciones por determinados patógenos durante la fase de destete, en la que los lechones ven normalmente deprimida su inmunidad.

Conviene tener en cuenta la heterogeneidad de sustancias que forman este grupo de aditivos: planta fresca o deshidratada, extractos, aceites esenciales, componentes aislados de estos aceites, componentes sintéticos y otros productos procedentes de plantas aromáticas, etc. El efecto conseguido dependerá en gran medida del tipo de extracto utilizado, de su composición, combinación y dosis empleada (Oetting *et al.*, 2006). Así, una de las mayores desventajas del uso de estos aditivos reside en la inestabilidad en su composición (Bomba *et al.*, 2006), debido a la influencia de diversos factores como el clima, la estación y las condiciones de cultivo y recolección, entre otros (Waterman y Mole, 1994; Jordán *et al.*, 2009). Este aspecto es a menudo descuidado en estudios microbiológicos y animales, dando lugar a resultados contradictorios, por lo que es necesaria una selección efectiva del material a utilizar y una estandarización del mismo para la optimización de resultados.

I.3 PLANTAS AROMÁTICAS

Se denominan plantas aromáticas a toda especie vegetal que en su composición presenten componentes volátiles. Como el resto de organismos vegetales, las plantas aromáticas desarrollan procesos metabólicos que son esenciales para la vida celular y de la planta en general. El conjunto de reacciones químicas comunes a todas las plantas se conoce como metabolismo primario. Sin embargo, es el metabolismo secundario y sus productos, no esenciales para la vida del organismo vegetal, los que confieren a las plantas aromático-medicinales sus características especiales. En un principio se pensó que estos productos eran sustancias de desecho sin función específica, sin embargo, hoy se sabe que los metabolitos secundarios no son producidos al azar, ya que han sido modelados y optimizados durante la evolución (Jarvis, 2000), y por su diversidad y la complejidad de sus estructuras, parecen ser sintetizados por la planta como parte de su sistema de defensa para el mantenimiento de su supervivencia (Williams *et al.*, 1989).

Algunos de los metabolitos secundarios sintetizados por la planta pueden ser repelentes o resultar tóxicos para insectos (Zhang *et al.*, 1999), hongos, bacterias y virus (Edreva *et al.*, 2008), y distintas especies de nematodos (Ntalli y Caboni, 2012), o bien actuar como atrayentes gracias a sus pigmentos y esencias (Hadacek, 2002). Otros metabolitos, como ciertas poliaminas, permiten interacciones electrostáticas con macromoléculas o estructuras celulares que contribuyen al mantenimiento de la integridad funcional y estructural de la planta (Berta *et al.*, 1997), mientras que pigmentos, como los carotenoides, desarrollan un papel fotoprotector que influye en la resistencia de las plantas a ciertos hábitats y condiciones (Young, 1991).

En otras ocasiones, las plantas liberan al ambiente productos, como los compuestos fenólicos, que pueden actuar de forma beneficiosa o adversa sobre otras plantas (Li *et al.*, 2010). Esta interacción entre plantas a través de los productos de su metabolismo secundario se conoce como alelopatía.

En función del uso que se haga de ellas en el campo de la medicina, la industria aromática y la alimentaria se denominarán medicinales, aromáticas o

condimentarias. En lo referente a plantas aromáticas, tradicionalmente, se consideran principios activos tanto el aceite esencial como el componente fundamental y característico, en estado puro, extraído de dicho aceite. Estos productos, por sus propiedades, se han usado desde la antigüedad con diversos fines, y hoy en día constituyen una fuerte alternativa de producción comercial, habiendo aumentado en los últimos años el interés por su uso en alimentación animal. Sin embargo, su creciente demanda puede mermar las poblaciones naturales de algunas especies de plantas aromáticas y medicinales (PAM), por lo que se debe impulsar su selección y cultivo, con el fin de obtener productos más seguros y homogéneos, una vez que se ha regulado su recolección mediante el Decreto de la C.A. nº 50/2003, de 30 de mayo por el que se crea el Catálogo Regional de la Flora Silvestre Protegida de la Región de Murcia y se dictan las normas para el aprovechamiento de diversas especies forestales.

I.3.1 Flora de la Región de Murcia.

La distribución mundial de plantas aromáticas y medicinales está sujeta a factores ecológicos como las condiciones del suelo y el clima, siendo este último factor el más condicionante. A su vez, el clima depende de distintos elementos como la temperatura, la humedad y la insolación, que pueden ser modificados por el régimen de vientos.

Cuanto más diversa sea la climatología y geografía de un territorio, más variada y abundante será la flora medicinal y aromática del mismo. Es por ello que en España, debido a su localización geográfica y su característica ecología, se encuentra una gran heterogeneidad de este tipo de plantas. En la zona norte y occidental predominan las plantas medicinales debido a la influencia atlántica y los suelos ácidos con granito, gneis y pizarra. Sin embargo, en la zona que comprende Andalucía oriental, Región de Murcia, Comunidad Valenciana y sur de Cataluña prevalecen las plantas aromáticas y condimentarias debido al predominio de suelos básicos y calizos y la influencia mediterránea (Muñoz, 1987). En la **Tabla I.2** se muestran los principales géneros de plantas medicinales, no aromáticas, y las principales familias de plantas aromáticas encontradas en España.

Cabe señalar, además, que las distintas especies de plantas aromáticas y medicinales pueden tener un buen desarrollo vegetativo en entornos diferentes a los de su hábitat, sin embargo, la elevada sensibilidad a las condiciones del medio puede provocar modificaciones en el rendimiento y la composición cuantitativa de sus principios activos.

Tabla I.2. Principales géneros y familias de plantas medicinales y aromáticas en España.

Plantas medicinales, no aromáticas (Géneros)		
<i>Aconitum</i>	<i>Hieracium</i>	<i>Rhus</i>
<i>Arnica</i>	<i>Hyoscyamus</i>	<i>Ruscus</i>
<i>Atropa</i>	<i>Hypericum</i>	<i>Silybum</i>
<i>Calendula</i>	<i>Mercurialis</i>	<i>Solanum</i>
<i>Colchicum</i>	<i>Papaver</i>	<i>Ulmaria</i>
<i>Crataegus</i>	<i>Plantago</i>	<i>Urginea</i>
<i>Datura</i>	<i>Potentilla</i>	<i>Taraxacum</i>
<i>Digitalis</i>	<i>Ricinus</i>	<i>Tilia</i>
<i>Drosera</i>	<i>Rhamnus</i>	<i>Vaccinum</i>
<i>Gentiana</i>	<i>Ranunculus</i>	<i>Vinca</i>
Plantas medicinales, aromáticas (Familias)		
<i>Compuestas</i>	<i>Leguminosas</i>	<i>Rosáceas</i>
<i>Crucíferas</i>	<i>Liliáceas</i>	<i>Rutáceas</i>
<i>Cupresáceas</i>	<i>Mirtáceas</i>	<i>Umbelíferas</i>
<i>Iridáceas</i>	<i>Oleáceas</i>	<i>Verbenáceas</i>
<i>Labiadas</i>	<i>Pináceas</i>	<i>Violáceas</i>

Fuente: Muñoz (1987).

Dentro de España, la zona del sudeste está considerada como uno de los territorios europeos con mayor número de plantas aromáticas nativas, destacando las provincias de Murcia y Almería. De especial importancia son distintos géneros de la familia de las Labiadas (*Lamiaceae*), muy conocidos y extendidos tanto en el uso popular como en la industria aromática, farmacéutica y alimentaria.

Centrando la atención en la considerable variedad climática de la Región de Murcia, podemos encontrar distintos pisos bioclimáticos según la clasificación de Rivas-Martínez (1987). Así, en esta región, atendiendo a la temperatura, se pueden reconocer cuatro de los cinco termotipos establecidos en la península Ibérica. En función de la precipitación, se encuentran tres de los seis ombrotipos posibles en España (semiárido, seco y subhúmedo), en los que se pueden distinguir diversos tipos de vegetación.

A continuación, se exponen los géneros y especies de plantas de la familia de las Labiadas mayoritarios en la Región de Murcia y la zona geográfica, dentro de esta, donde principalmente se encuentran de forma espontánea (Alcaraz *et al.*, 1989).

En las comarcas del Noroeste y Altiplano y en el Campo de Murcia (Sierra de Carrascoy-El Valle) se encuentra *Lavandula latifolia* (espliego) que es la única lavanda cultivada, precisamente en base a material recolectado de estos montes; las otras especies de lavandas espontáneas se dan en la mitad meridional de la región. Algunas especies de orégano, como el *Origanum virens* crecen en la zona de Moratalla y otros sectores del oeste de la región que lindan con la provincia de Almería. La *Salvia lavandulifolia* subsp. *vellerea*, la que se cultiva en la comarca del N.O. predomina de forma espontánea en los montes de Moratalla, en Sierra Espuña, y en áreas de Calasparra se encuentra la *Melissa officinalis* (melisa o toronjil). También el género *Mentha* se encuentra en el noroeste de la región y Sierra Espuña, mientras que la *Mentha pulegium* (poleo) se da de forma espontánea en las zonas húmedas de la falda meridional de Sierra Espuña, y se cultiva en las huertas de Totana y Murcia. Otra especie muy extendida en la región es *Satureja obovata* (ajedrea), que puede encontrarse prácticamente en toda la región, aunque con subespecies distintas.

Además, existen otras especies vegetales de la familia de las labiadas que se encuentran por toda la región, como *Rosmarinus officinalis* (romero), *Ballota hirsuta* (marrubillo), *Salvia verbenaca* (gallocresta), *Mentha suaveolens* (mastranzo), *Thymus vulgaris* (tomillo) y *Thymus zygis* (tomillo rojo).

El género *Thymus* tiene una amplia representación en esta zona, ya que los tomillos son plantas que no toleran la excesiva humedad ambiental ni edáfica, por lo que están adaptados perfectamente a las condiciones semiáridas del Sudeste Ibérico (Sotomayor, 1998). Además de las especies ya citadas, podemos encontrar otras especies apreciadas de tomillo como *Thymus mastichina* (mejorana española), en zonas de montaña del noroeste de Murcia, *Thymus hyemalis* (tomillo de invierno), principalmente en zonas costeras y del interior y *Thymbra capitata* (tomillo carrasqueño o andaluz), especie de un género muy próximo al de los tomillos, en áreas del Mar Menor y Lorca.

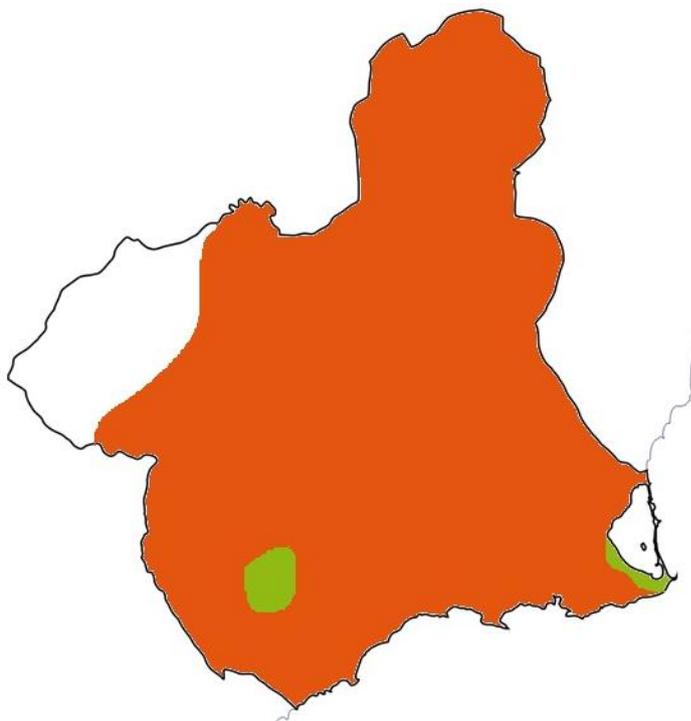


Figura I.8. Distribución de (■) *Thymus zygis* subsp. *gracilis* y (■) *Thymbra capitata* en la Región de Murcia (Fuente: Alcaraz *et al.* 1989).

Las dos especies tratadas en este trabajo, *Thymus zygis* subsp. *gracilis* y *Thymbra capitata*, cuya distribución en la Región de Murcia se observa en la **Figura I.8**, son valoradas, principalmente, por su aceite esencial rico en fenoles.

En el caso de *Thymus zygis* subsp. *gracilis*, los trabajos realizados por Jordán *et al.* (2009) ponen de manifiesto la importancia de las condiciones de cultivo, principalmente el nivel de riego, a la hora de producir plantas con mayor rendimiento en aceite esencial o con una mejor calidad del mismo, en lo que a contenido de compuestos fenólicos se refiere.

Ya que estas dos especies presentan una buena adaptación al cultivo (Sánchez *et al.*, 1992), sería interesante incidir en este tipo de agricultura en la Región de Murcia con el fin de obtener productos diferenciados, y cuyo cultivo y transformación repercuta en la economía de zonas rurales de la región.

I.3.2 Aceite esencial de tomillo.

Los aceites esenciales son las fracciones líquidas volátiles, generalmente destilables por arrastre con vapor de agua, que contienen las sustancias responsables del aroma de las plantas y que son importantes en la industria alimentaria, farmacéutica y cosmética.

En general, estos productos presentan una composición química compleja, fruto del metabolismo secundario de las plantas. Los aceites esenciales son lípidos simples, compuestos por sustancias volátiles y sin ácidos grasos, en contraste con los aceites fijos, que presentan los ácidos grasos como estructura fundamental, y carecen de volatilidad (Sotomayor, 1998).

Además, la mayoría de aceites esenciales muestran unas características comunes. Como se ha dicho, son sustancias volátiles que se presentan en forma líquida a temperatura ambiente. Tras la destilación su color es transparente, incoloro o ligeramente amarillo y, salvo alguna excepción, su densidad es inferior a la del agua. Son liposolubles y solubles en alcoholes y disolventes orgánicos apolares y, aunque el vapor de agua permite su arrastre, son muy poco solubles en agua. También se oxidan con facilidad y polimerizan

dando lugar a productos resinosos. Estos aceites tienen índices de refracción elevados y poseen actividad óptica.

Las plantas aromáticas son las que concentran mayor cantidad de esencias y para la obtención de las mismas puede ser empleada toda la planta, solo sus hojas, flores, frutos o raíces, dependiendo de la especie de la que se trate.

El aceite esencial de tomillo se extrae por destilación de sus partes aéreas, sin embargo, la calidad y composición del mismo está influenciada por diversos factores. Dentro de cada género se encuentran gran variedad de especies, por ejemplo, se conocen unas 220 especies del género *Thymus* y 4 del género *Thymbra* que se distribuyen por la región mediterránea, el suroeste de Asia, Anatolia, Siria y el norte de Iraq, siendo la *Thymbra capitata* la especie que se encuentra en la Península Ibérica (Morales, 2010). De la especie *Thymus zygis* se diferencian, según Morales (1986), tres subespecies: *Thymus zygis* subsp. *silvestris*, *Thymus zygis* subsp. *zygis* y *Thymus zygis* subsp. *gracilis*. Esta última, denominada como tomillo rojo, es la que se cultiva en la Región de Murcia para aprovechar su aceite esencial, que es, por su riqueza en timol, el equivalente al *Thymus vulgaris* de procedencia francesa, también rico en timol.

En los tomillos, además de las diferencias morfológicas que determinan su separación como especies distintas, nos encontramos con que la composición química también puede variar, y no solo de forma inter-específica, que es lo natural, sino que también se producen variaciones en su composición química de forma intra-específica. Así, en el tomillo común o *Thymus vulgaris*, se le encuentran hasta 6 composiciones químicas distintas, atendiendo a los componentes mayoritarios de su aceite, por lo que se ha establecido la denominación de “quimiotipos” para designar a una de estas distintas composiciones.

Lo mismo ocurre con el tomillo de invierno (*Thymus hyemalis*) e incluso con el tomillo rojo (*Thymus zygis*), el cual, a pesar tener por componente mayoritario el timol de forma casi exclusiva, también encontramos en la Sierra

de Filabres, que aún siendo de la subsp. *gracilis* presenta un quimiotipo de linalol.

El quimiotipo viene marcado genéticamente, y determina de forma fija el componente o componentes que se encuentran de forma mayoritaria en un aceite esencial. Sin embargo, además de por factores genéticos, la composición de un aceite también se puede ver influida en cierta medida por factores ambientales, estacionales y de manejo. Las condiciones edafoclimáticas (Martínez *et al.*, 2005), la variación estacional o el estado fenológico de la planta (Jordán *et al.*, 2006; Golparvar y Bahari, 2011), la cantidad de riego empleada en su cultivo Sotomayor *et al.* (2004) y el método de extracción (Scheffer, 1993; Moldão-Martins *et al.*, 2002), entre otros, pueden influir, en algunos casos significativamente, sobre el rendimiento en aceite esencial de la planta y la calidad composicional del mismo, aunque nunca estos factores pueden cambiar el quimiotipo, que, como ya se ha comentado, viene marcado genéticamente.

I.3.2.1 Componentes principales.

Los compuestos derivados del metabolismo secundario de plantas (**Figura I.9**) se dividen, en función de su origen biosintético, en tres grandes grupos: terpenoides, compuestos fenólicos y alcaloides o compuestos nitrogenados (Croteau *et al.*, 2000).

Una vez extraído el aceite esencial de la planta por el arrastre de vapor de agua, las moléculas que lo forman están constituidas por una estructura base formada por una cadena carbonada de entre 7-20 átomos de carbono, hidrógeno y oxígeno (Romero, 2004). Los compuestos terpénicos, que incluyen hidrocarburos terpénicos y sus derivados oxigenados, tales como alcoholes, aldehídos, cetonas, ésteres, éteres o peróxidos, constituyen el grupo mayoritario de compuestos encontrados en los aceites esenciales. Los terpenos son polímeros del isopreno, estructura cíclica formada por cinco carbonos (C₅), y su nomenclatura expresa el número de unidades de isopreno presentes. Los terpenos más comúnmente encontrados en los aceites esenciales son los monoterpenos (C₁₀) y los sesquiterpenos (C₂₀).

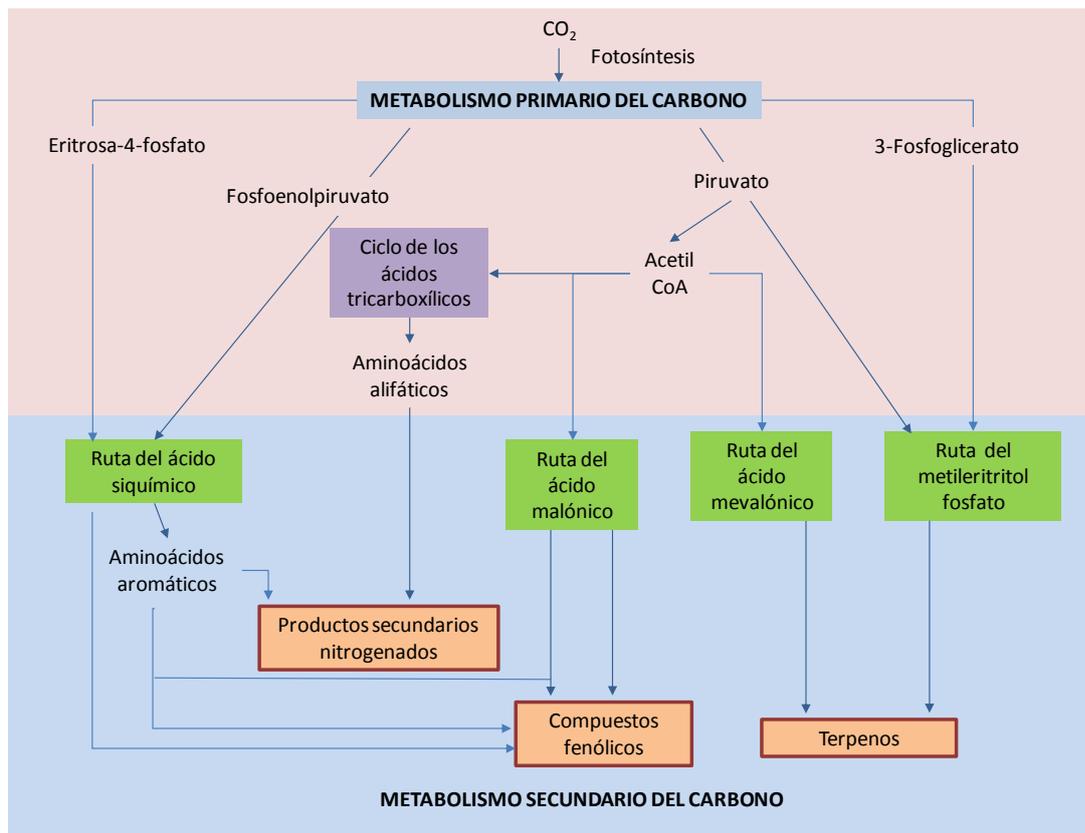


Figura I.9. Vista general de las principales rutas de biosíntesis de metabolitos secundarios (Taiz y Zeiger, 2010).

Los compuestos fenólicos constituyen el otro conjunto de sustancias que pueden encontrarse de forma importante en los aceites esenciales. Los fenoles son compuestos químicos con al menos un anillo aromático que contienen uno o más grupos hidroxilos. En el aceite esencial extraído de plantas de los géneros *Thymbra* y *Thymus* se encuentran dos fenoles predominantes, el timol y su isómero carvacrol.

I.3.2.1.1 Estructura de los fenoles.

En las plantas de tomillo los fenoles timol y carvacrol se forman, principalmente, a partir de su monoterpene precursor p-cimeno, y en menor medida, del γ -terpineno, por lo que se tratarían de alcoholes terpénicos (Cosentino *et al.*, 1999; Abu-Lafi *et al.*, 2008).

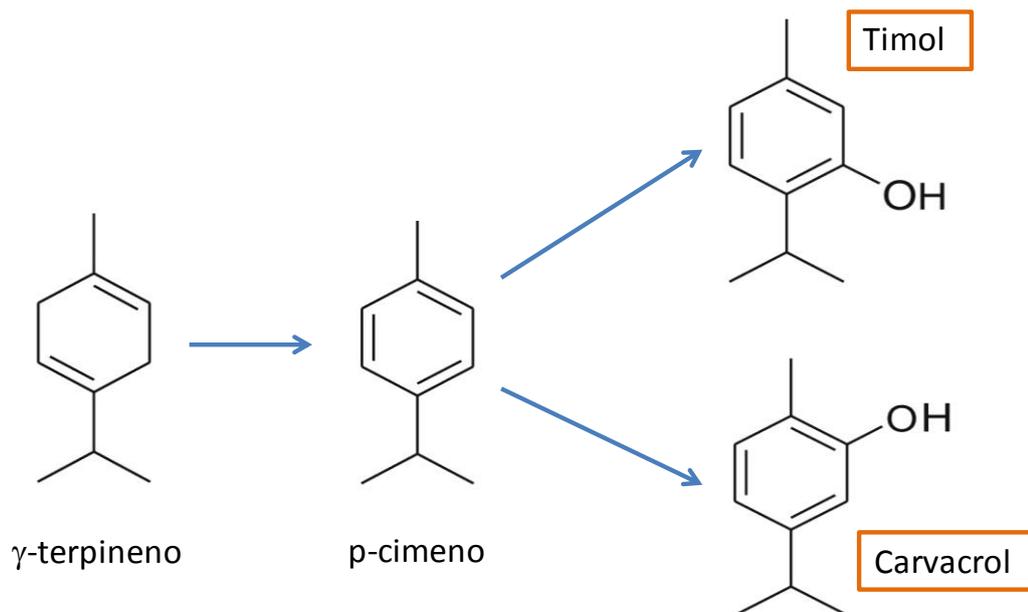


Figura I.10. Estructura química de timol y carvacrol, y de sus precursores p-cimeno y γ -terpineno.

La ruta metabólica seguida (**Figura I.10**) comprendería la conversión autooxidativa del γ -terpineno a p-cimeno, seguida de la hidroxilación del p-cimeno a timol –fenol cristalizable- y a carvacrol –fenol no cristalizable- (Poulose y Crouteau, 1978; Russo *et al.*, 1998).

La estructura del fenol es fuertemente electropositiva, y por lo tanto, muy activa químicamente (Lavabre, 1995). El grupo hidroxilo en la estructura fenólica, así como la posición de dicho grupo en el anillo bencénico, son de gran importancia en la actividad química que poseen estos compuestos (Dorman y Deans, 2000).

I.3.2.1.2 Acción microbiológica y biosaludable.

Generalmente, la acción y efecto de los aceites esenciales se debe tanto a cada uno de los compuestos terpénicos y fenólicos contenidos en él como a la combinación de todos sus constituyentes, que en algunos aceites de tomillo puede rondar los 100 componentes (Jordán *et al.*, 2006).

El tomillo es tradicionalmente una planta muy apreciada por sus usos terapéuticos y farmacológicos. Cañigueral y Vanaclocha (2000) recogen algunos de los usos que se hacen habitualmente de esta planta. Entre ellos, se destaca su actividad antiespasmódica y expectorante, por lo que es utilizado como antitusivo, así como su actividad antiséptica, antiinflamatoria, su acción antioxidante y su uso como digestivo, carminativo y antidiarreico.

A continuación, se hace un repaso de las principales actividades del tomillo, su aceite esencial y los componentes principales que lo forman, haciendo hincapié en su acción microbiológica.

Diversos aceites volátiles extraídos de plantas aromático-medicinales han demostrado su efectividad contra un amplio rango de bacterias (Dorman y Deans, 2000). Muchos aceites esenciales muestran una marcada actividad contra bacterias de transmisión alimentaria como *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium* o *Escherichia coli*. Los compuestos fenólicos que componen estos aceites, entre los que destacan carvacrol y timol, parecen ser los más activos, actuando como permeabilizadores de membrana, y su efectividad parece ser ligeramente mayor en bacterias gram-positivas (Burt, 2004). Así, Ultee *et al.* (2002) proponen que la causa de que estos compuestos posean una fuerte actividad antimicrobiana se debe al grupo hidroxilo del anillo fenólico y a la presencia de electrones deslocalizados, que actuarían dañando la membrana y comprometiendo el pH homeostático y el equilibrio de iones a través de la misma. Como resultado se produciría el colapso del almacenaje de energía a través de membrana y el agotamiento del ATP del microbio, lo que supondría la muerte celular. Sin embargo, en algunos microorganismos ensayados, una mayor concentración de fenoles en el aceite esencial no supone necesariamente un mayor efecto bactericida, por lo que Rota *et al.* (2008) sugieren que podría darse un efecto sinérgico entre compuestos fenólicos y otros componentes del aceite. Asimismo, los experimentos *in vitro* realizados por Peñalver *et al.* (2005) confirman la actividad antimicrobiana de algunos aceites esenciales de tomillo y orégano, ricos en timol y carvacrol, respectivamente, contra distintas cepas de enterobacterias habitualmente causantes de enfermedades en ganadería porcina y aviar. Igualmente, estos

aceites y sus constituyentes fenólicos inhiben el crecimiento de bacterias del género *Shigella* (Bagamboula *et al.*, 2004), organismos que suponen, según la Organización Mundial de la Salud (OMS) la mayor causa de diarrea y disentería a nivel mundial. Por las cualidades comentadas, los aceites esenciales podrían suponer un efectivo bacteriostático natural en su uso en la conservación de alimentos, tanto un solo aceite como la mezcla de ellos, con el fin de minimizar el fuerte aroma de cada componente individual (Lis-Balchin y Deans, 1998); así como actuar como un aditivo potenciador de la salud sustituto de antibióticos promotores del crecimiento en su uso en alimentación animal (Franz *et al.*, 2010).

El aceite esencial de especies de *Thymbra* y *Thymus* ha demostrado su eficacia contra protozoos, parásitos potencialmente causantes de infecciones y fuertes alteraciones intestinales en humanos (Santoro *et al.*, 2007; Machado *et al.*, 2010).

Presentan también actividad antifúngica contra *Candida* y *Aspergillus*, y su modo de acción se debe, principalmente, a lesiones directas de la membrana (Pina-Vaz *et al.*, 2004; Salgueiro *et al.*, 2004). Así, por su elevada eficacia contra un amplio espectro de hongos y por su actividad antiaflatoxigénica, otros autores recomiendan el uso de aceite esencial de *Thymus vulgaris* como conservante alimentario durante el almacenamiento de materias primas (Kumar *et al.*, 2008).

Asimismo, las plantas aromáticas y sus aceites son una fuente natural de sustancias antioxidantes, cuya actividad es comparable a aquella mostrada por reconocidos antioxidantes como α -tocoferol o hidroxitolueno butilado (BHT, por sus siglas en inglés) (Lee *et al.*, 2005). En organismo vivos se forman continuamente radicales libres, debido al propio metabolismo o a factores externos (Loft y Poulsen, 1996), que afectan negativamente a la salud humana y animal. Del mismo modo, la oxidación afecta de manera importante a la estabilidad de los alimentos y es causa de deterioro de su calidad, tanto nutricional como organoléptica (Donnelly y Robinson, 1995; German, 1999). Los ensayos llevados a cabo por Bozin *et al.* (2006) revelan un efecto antioxidante de aceites esenciales de tomillo, orégano y albahaca. Estos aceites muestran

una fuerte actividad protectora contra radicales libres e inhibidora de la oxidación lipídica, que es tanto más marcada cuanto mayor es la cantidad de monoterpenos fenólicos oxigenados, especialmente carvacrol y timol, presentes en dicho aceite. Esta teoría se ve corroborada por otros autores (El Bouzidi *et al.*, 2013) que atribuyen el elevado potencial antioxidante del aceite esencial de tomillo a la alta cantidad de timol y/o carvacrol en su composición. No obstante, en el trabajo realizado por Youdim *et al.* (2002) se pone de manifiesto el fuerte poder antioxidante de carvacrol y timol, entre otros componentes aislados, aunque ninguno de ellos es tan efectivo como el aceite esencial en su totalidad.

Se propone también el uso del aceite esencial de tomillo y sus componentes en la lucha contra bacterias fitopatógenas, como *Erwinia carotovora* (Horváth *et al.*, 2009), y contra un amplio rango de insectos, plagas de ácaros, nematodos (Isman, 2000) y hongos (Pérez-Sánchez *et al.*, 2007), que afectan de manera importante a los cultivos y a sus productos tras la recolección. También ha sido probada la eficacia de algunos aceites esenciales, especialmente aquellos que contienen timol en elevadas proporciones, contra el ácaro *Varroa jacobsoni* que afecta a las colonias de abejas (Imdorf *et al.*, 1999). Algunos estudios advierten de que la efectividad de estos compuestos puede estar supeditada a factores tales como la edad de las abejas (Mondet *et al.*, 2011) y que pueden provocar la acumulación de residuos en la miel. No obstante, con el empleo de dosis adecuadas los residuos acumulados no representan ningún riesgo sanitario para la salud humana (Adamczyk *et al.*, 2005).

Por tanto, se debe tener en cuenta, a la hora de su uso terapéutico en animales y humanos, la potencial toxicidad del aceite esencial, dosificando el producto adecuadamente. El timol se absorbe en el tracto gastrointestinal y se metaboliza y excreta por vía renal rápidamente, por lo que es improbable la acumulación de residuos en cantidades tóxicas que puedan comprometer la salud humana (EMEA, 1998). Asimismo, la OMS (2009) considera como seguro el uso de timol en la producción animal destinada al consumo humano.

II. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

II.1. JUSTIFICACIÓN

La producción ganadera porcina es de vital importancia para la humanidad por su papel como alimento de calidad en un mundo con más de 7000 millones de habitantes (indexmundi, 2012). La producción de cerdos se ha ido intensificando y tecnificando con el tiempo con el objetivo de optimizar la productividad, lo que ha provocado la aparición de nuevos riesgos clínicos a lo largo de la producción. Una de las etapas más problemáticas se da durante el destete de los lechones y la etapa de transición al cebo, ya que para maximizar beneficios, la producción intensiva realiza el destete a una edad temprana (21 días de vida) en la que los animales presentan un sistema digestivo inmaduro adaptado a una alimentación líquida y altamente digestible. Durante el destete el animal deberá cambiar de una alimentación líquida a una sólida, además de ser separados de sus madres y juntados con otros lechones con los que tiene que establecer la jerarquía. Todos estos cambios producen un estrés nutricional, por lo que pueden reducir la ingestión y la digestión de alimentos,

siendo especialmente sensibles a las infecciones microbiológicas intestinales, lo que provoca diarreas, descenso de peso e incluso la muerte de los cerdos. Los antibióticos adicionados al pienso en pequeñas cantidades se han utilizado en la producción ganadera para solucionar estos y otros problemas, promoviendo el crecimiento de los animales y reduciendo su mortalidad.

Sin embargo, el uso continuado de estos antibióticos en la alimentación para promover el crecimiento de los animales, ha provocado un aumento de cepas resistentes que afectan a la salud del hombre, por lo que desde hace ya algún tiempo, se consideran un importante problema de salud pública a nivel mundial (Witte, 1998). La preocupación por este hecho ha llevado a la Unión Europea a la prohibición de este tipo de aditivos, que se hizo efectiva el 1 de enero de 2006. No obstante, la producción intensiva de cerdos requiere de soluciones a los problemas que surgen durante la cría y por ello se ha venido investigando desde hace aproximadamente una década sobre alternativas naturales a estos antimicrobianos.

Una alternativa muy interesante sería el uso de los aceites esenciales de plantas aromático-medicinales que han mostrado tener distintas actividades beneficiosas para la salud intestinal del lechón; actividad antimicrobiana, estimuladora de las secreciones digestivas y de la renovación epitelial, lo que produce un efecto estabilizador en la microbiota intestinal, incrementando así la absorción de nutrientes y la salud del lechón Windisch *et al.* 2008. Concretamente, el carvacrol y el timol presentan un alto poder inhibitorio sobre distintos tipos de bacterias (Lambert *et al.*, 2001; Faleiro *et al.*, 2005), siendo estos los compuestos mayoritarios del aceite esencial de *Thymus zygis* subsp. *gracilis* y de *Thymbra capitata*. Por todo esto, el uso de estos aceites en alimentación porcina puede suponer una alternativa al uso de antibióticos, controlando las patologías intestinales y promoviendo el crecimiento, principalmente en la etapa de destete.

Además, para la Región de Murcia el sector porcino es de gran interés ya que representa alrededor del 70% de la producción final ganadera, y esto unido al asentamiento en la región de un considerable número de empresas

destinadas a la destilación de aceite, convierte el uso de estos productos en la alimentación porcina en una buena forma de impulsar la economía regional.

En este sentido, dado que los aprovechamientos de plantas aromático-medicinales de los montes están regulados por la legislación medioambiental mediante decretos conservacionistas en todas las CC.AA., la posible incorporación de aceites esenciales de plantas aromáticas en los piensos de cerdos representaría un notable incremento de las necesidades de producción, que para su abastecimiento necesitaría del aumento de las superficies cultivadas de estas especies, lo que supondría una mejora de la actividad económica en el medio rural, y la conservación del medio natural.

Los objetivos que se plantean en esta Tesis Doctoral se engloban dentro de los tres ámbitos temáticos en los que se agrupan las líneas estratégicas acordadas por la Comisión Coordinadora de Investigación Agraria. En este sentido:

a) Mejora de la producción y transformación en el ámbito agroalimentario.

La aplicación de derivados de plantas aromático medicinales (PAM) en la alimentación animal supone una mejora y optimización de la producción agroalimentaria, ya que puede aportar un valor añadido al producto final.

b) Obtención y elaboración de productos agroalimentarios seguros, saludables y de calidad.

A través de la alimentación animal con productos naturales se pretende conseguir un buen crecimiento animal y una mejora de su salud intestinal, obteniendo además productos cárnicos libres de antibióticos que eviten la aparición de nuevas resistencias a estos fármacos en humanos. Asimismo, los principios activos del aceite esencial pueden transferirse a la carne y aportar beneficios en relación a su conservación y estabilidad microbiológica.

c) Producción agroalimentaria desde la perspectiva de la conservación del medio ambiente y el uso integral del territorio.

La utilización de conservantes naturales como alternativa a los productos sintéticos usados habitualmente conduce a un proceso productivo más respetuoso con el medio ambiente. La posibilidad de cultivar plantas aromáticas, en concreto el tomillo rojo y tomillo carrasqueño, supondría una mejora para la conservación ambiental, pues, la recolección de los tomillos no está exenta de cierto riesgo al dejar los montes libres de vegetación en épocas en que las lluvias torrenciales pueden causar graves daños de erosión del suelo. Además de inducir un aumento en el cultivo del Tomillo y la Thymbra, para favorecer la conservación del medio natural y la economía de los sectores agrícolas más desfavorecidos como consecuencia de la progresiva desertización del sureste español.

II.2. OBJETIVOS

Objetivo general:

Evaluar el empleo de aceites esenciales procedentes de *Thymus zygis* subsp. *gracilis* y *Thymbra capitata* como promotores de crecimiento, y fuente de principios activos que potencien la calidad de las producciones ganaderas y los productos derivados de ellas.

Objetivos específicos:

1- Determinar la acción del aceite esencial de *Thymus zygis* subsp. *gracilis*, *Thymbra capitata* y la mezcla de ellos, sobre el rendimiento animal y el crecimiento morfológico intestinal sobre ratas en la época de destete.

2- Evaluar los efectos de la adición en el pienso de estos potenciales promotores naturales sobre el rendimiento productivo del ganado porcino, desde el destete precoz hasta la entrada al cebo, en comparación con ácidos orgánicos aprobados por la Unión Europea como promotores del crecimiento.

3- Determinar el efecto de los aceites esenciales sobre el pH y la microbiota intestinal de cerdos destetados precozmente, en comparación con ácidos orgánicos.

4- Estudiar la transmisión de principios activos de los aceites esenciales (carvacrol y timol) y su efecto sobre la calidad de la carne de cerdo y la aceptación por el consumidor.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

III.1 ACEITE ESENCIAL

Para conocer los efectos *in vivo* de los aceites esenciales de plantas aromático-medicinales se llevan a cabo dos ensayos, uno sobre ratas y otro sobre cerdos, comenzando ambos en el momento posterior al destete. En los dos ensayos se utilizan aceites comerciales de *Thymus zygis* subsp. *gracilis* quimiotipo “timol” y *Thymbra capitata* quimiotipo “carvacrol”, obtenidos mediante hidrodestilación en la empresa Blas Lorente González S.L. (**Figura III.1**).

La determinación del perfil volátil de los aceites esenciales ensayados se realiza mediante cromatografía de gases y espectrometría de masas empleando el método desarrollado por Jordán *et al.* (2009). Para el desarrollo de los análisis, 0.1 µl de aceite esencial se inyectan en un cromatógrafo de gases Agilent (Waldbrom, Alemania) modelo HP 6890. La fase estacionaria empleada para la separación cromatográfica es HP-5MSI (5% fenil metil siloxano

entrecruzado) de 30 m de longitud, 0,25 mm de diámetro interno y 0,25 μm de espesor, suministrada por Agilent Technologies (Palo Alto, CA, USA).



Figura III.1. Plantación de *Thymus zygis*.

Las temperaturas de inyección y detección programadas son 250 °C y 280 °C respectivamente. El gas portador es He, y se trabaja bajo condiciones de presión constante, ajustada a 27,6 minutos para β -ionona. La división de flujo en el inyector es de 100:1, y el programa de temperaturas de elución se corresponde con una temperatura inicial: 60 °C, seguida de un incremento de 2,5 °C/min hasta 155 °C, para finalizar con una rampa de 10 °C/min hasta alcanzar los 250 °C.

El espectrómetro de masas opera en modo de ionización por impacto electrónico, aplicando una energía de ionización de 70 eV y realizando 3,21 scan/s en un rango de m/z de 50 a 500. La temperatura del cuadrupolo es de 150 °C y el voltaje del electromultiplicador se mantiene a 1300 V.

La identificación de los componentes volátiles se realiza por comparación de los tiempos de retención de los componentes a identificar con los de los compuestos puros empleados como patrones de referencia, así como, cotejando los espectros de masas de los compuestos problema con los existentes en la librería comercial instalada en el equipo NBS 75K (United States, National Bureau of Standards, 2002).

El análisis cuantitativo se realiza considerando el porcentaje de área asignado a cada pico cromatográfico, cuyos resultados se observan en la **Tabla III.1.**

Tabla III.1. Composición porcentual de los aceites esenciales de *Thymus zygis* subsp. *gracilis* y *Thymbra capitata*.

Componentes	TR	<i>Thymus zygis</i>	<i>Thymbra capitata</i>
Triciclono	3,93	0,01	0,01
α -Tujeno	4,01	0,36	1,28
α -Pino	4,16	0,58	0,63
Canfeno	4,49	0,19	0,08
β -Pino	5,16	0,09	0,15
1-Octen-3-ol	5,23	0,02	0,11
β -Mirceno	5,68	0,76	1,18
α -Felandreno	5,92	0,15	0,26
Δ_3 -Careno	6,09	0,06	0,08
α -Terpineno	6,30	1,18	1,43
p-Cimeno	6,58	14,48	5,84
Limoneno	6,69	0,45	0,44
Eucaliptol	6,75	0,04	0,36
(Z)- β -Ocimeno	7,36	0,01	0,05
γ -Terpineno	7,75	3,48	5,52
Terpinoleno	8,80	0,11	0,13
Nonanal	9,20	0,05	0,11
Linalol	9,33	2,13	1,01
Borneol	12,06	0,51	0,20
Terpinen-4-ol	12,59	0,50	0,64
α -Terpineol	13,24	0,03	0,08
m-mentha-1,8-dieno	13,39	0,09	0,11

Componentes	TR	<i>Thymus zygis</i>	<i>Thymbra capitata</i>
Neral	15,99	n.d.	0,06
Carvona	16,09	0,01	0,10
2,4-dimetil fenetil alcohol	17,47	0,18	n.d.
Geranial	17,64	n.d.	0,10
Timol	18,54	65,50	0,35
Carvacrol	19,38	4,43	72,90
o-Cimen-5-ol	19,50	0,09	0,27
Eugenol	21,52	0,02	0,03
β -Cariofileno	24,35	1,53	3,87
Alloaromadendreno	25,26	0,15	0,05
α -Humuleno	25,98	0,05	0,13
Ledeno	28,07	0,12	0,03
(Z)- β -Bisaboleno	28,91	0,05	0,28
δ -Cadineno	29,52	0,14	0,025
Espatulanol	31,99	0,07	0,02
Óxido de cariofileno	32,18	0,19	0,25
Total identificado		97,81	98,16

TR: Tiempo de retención

n.d.: No detectado

III.2 MODELO EXPERIMENTAL EN RATAS

III.2.1 Animales y alimentación.

Se utilizan un total de 32 ratas macho Sprague Dawley (**Figura III.2**) de 28 días de edad, destetadas a los 21 días, con un peso aproximado de 60-79 g al comienzo del estudio. El experimento se realiza en dos réplicas (2x16), asignando las ratas al azar en 4 grupos de 4 animales, un grupo control y tres grupos en los que se estudia el efecto de la administración de los dos aceites esenciales por separado y de su mezcla.



Figura III.2. Rata Sprague Dawley.

Los animales proceden del Servicio de Animales de Laboratorio de la Universidad de Murcia, inscrito como centro usuario y actividad de cría, en la Dirección General de Ganadería y Pesca de la CARM, (Consejería de Agricultura y Agua), con el registro: nº REGA ES300305440012.

En todos los casos, los animales empleados en esta investigación se han mantenido, sacrificado y utilizado siguiendo la guía establecida por la Unión

Europea sobre la protección de los animales utilizados en experimentación (Directiva 86/609/CEE) y el Real Decreto 1201/2005, de 10 de octubre, sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos. (BOE nº 252, de 21.10.05). Todos los experimentos fueron aprobados por la Comisión de Ética de Investigación de la Universidad de Murcia (**Anexo 1**).



Figura III.3. Jaulas metabólicas utilizadas en el estudio.

Los animales de cada una de las series se mantienen unidos durante 3 días de adaptación, en los que se les administra una dieta basal y agua *ad libitum*. Pasado este tiempo, se introducen individualmente en jaulas metabólicas (**Figura III.3**) durante otros 3 días con la misma dieta. Las jaulas metabólicas permiten el control del consumo de agua y alimento y la recogida separada de heces y orina. Los animales se mantienen en salas cerradas sin ventanas, con un fotoperiodo de 12 horas de luz/12 horas de oscuridad, una temperatura entre 20 y 24 °C y un nivel de humedad relativa del 55% ± 10%, variando la posición relativa de las jaulas durante las dos series.

El alimento se prepara en días alternos utilizando pienso de mantenimiento para rata compuesto por un 14,5% de proteína, 63,9% de carbohidratos y 4% de grasa, y una energía digestible de 3,2 Kcal/g (Teklad Global Diets, Harlan Laboratories Inc., Madison WI). Este pienso, en forma de pellet, se muele hasta polvo en trituradora y se le añade el aceite esencial, calculando un 0,06% del consumo semanal estimado. El aceite se disuelve en una mezcla hidroalcohólica (0,05:1) para mejorar su distribución, homogeneizándose hasta obtener una masa consistente. El alimento control se prepara con la misma solución hidroalcohólica sin la adición de aceite. La masa se moldea en forma de pellet y se seca en estufa a 35 °C.

Los 4 grupos de estudio se organizan de la siguiente manera:

Grupo Control (C): Alimentado con pienso de mantenimiento para rata.

Grupo Thymbra (T): se alimenta con un pienso con un 0,06% de aceite esencial de *Thymbra capitata*.

Grupo Zygis (Z): con un 0,06% de aceite esencial de *Thymus zygis* subsp. *gracilis*.

Grupo Mezcla (M): al que se le administra con el pienso un 0,06% de la mezcla a partes iguales de los aceites esenciales de las dos especies de tomillo.

El tiempo de tratamiento es de 10 días, evaluándose diariamente la ingesta de alimento y agua, el peso de las heces y el volumen de orina. El peso corporal se mide al principio, a mitad y al final del ensayo. El índice de conversión (IC), parámetro que relaciona la ganancia de peso corporal y la ingesta de alimento, es también calculado.

Conociendo el consumo medio diario de alimento por animal y el porcentaje de aceite esencial en el pienso, se obtiene que a los animales se les administra, como promedio de todo el experimento, una dosis de aceite esencial de 7,3 mg/animal/día.

III.2.2 Recogida de muestras: intestino y vísceras.

Al finalizar el experimento, las ratas son aturdidas por CO₂ y sacrificadas mediante dislocación cervical. Tras el sacrificio se coloca al animal en posición de decúbito supino y se realiza un corte longitudinal desde la región pubiana hasta el cartílago xifoides.

El paquete intestinal se lava con PBS, se desdobra y separa hasta obtener el intestino delgado y el intestino grueso. Del intestino delgado se toma muestra de 3 partes: duodeno (se desechan 0,5 cm desde el píloro y se toman los 5 cm siguientes), yeyuno (5 cm de la mitad del intestino) e íleon (se toman 5 cm empezando un 1 cm anterior a la unión íleo-cecal). Del intestino grueso se toman 5 cm del colon ascendente, medido desde el ciego. Las muestras se bañan con PBS y se fijan en formol para posterior estudio histológico mediante análisis de imagen.

A continuación, el bazo, el hígado y los riñones se extraen, se limpian con PBS y se pesan. La mitad de uno de los riñones y uno de los lóbulos del hígado se almacenan en formol para posterior estudio histológico.

III.2.3 Estudio histológico.

Tras la fijación en formol de las muestras se realizan secciones transversales de duodeno, yeyuno, íleon y colon de aproximadamente 1 cm de longitud, así como de las partes de riñón e hígado reservadas para examen histológico. Posteriormente, las muestras se procesan por el método habitual (García del Moral, 1993) para su inclusión en parafina, disponiendo los segmentos de intestino con su eje principal de forma perpendicular a la base del cassette. Se realizan cortes de 5 micras de espesor, a distintas profundidades, que se tiñen con la técnica de hematoxilina-eosina.

La captura de la imagen de las muestras intestinales se lleva a cabo mediante un microscopio óptico de luz transmitida Axioskop, Carl Zeiss. S.A. conectado a una cámara de video Sony DXC 151-Ap. Posteriormente se realiza el estudio con un analizador de imagen (Sistema MIP-4,5 Digital Image System,

Barcelona) mediante el que se seleccionan interactivamente las zonas de estudio.

Los parámetros a evaluar son los siguientes:

1- Intestino delgado

- Longitud de las vellosidades intestinales.
- Profundidad de las criptas de Lieberkühn.
- Grosor total de la mucosa.

2- Intestino grueso

- Grosor total de la mucosa del colon.

Se toman un mínimo de 15 medidas por parámetro de cada parte del sistema digestivo del animal (duodeno, yeyuno, íleon y colon) por dos observadores distintos y bajo condiciones “ciegas”.

1- Intestino delgado.

La sección histológica se captura a 4 aumentos para su visualización a color en el monitor. Una vez elegida la zona a medir y capturada la imagen se realiza la calibración de la misma a $2,59 \mu$ (X, Y) y la medida de la longitud se efectúa de forma manual. En las medidas hechas a 4 aumentos la magnificación –relación entre el tamaño real de la muestra y lo observado al medir- es de 114.

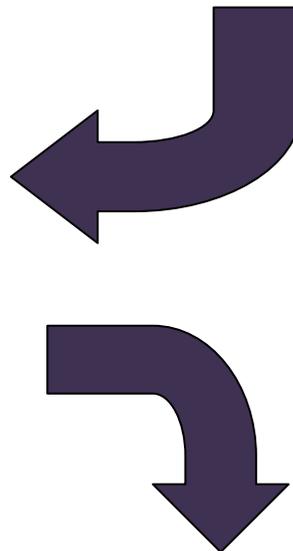
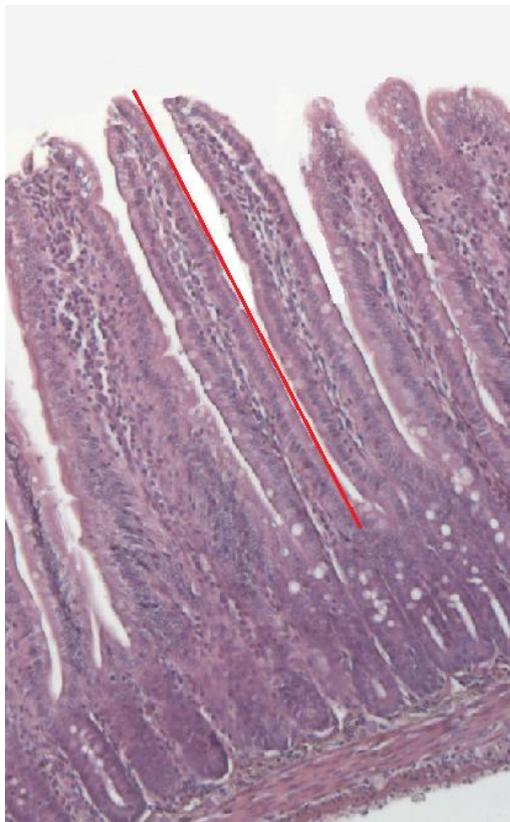
Se toma medida de los 3 parámetros de estudio en cada uno de los tramos de intestino delgado: duodeno, yeyuno e íleon. La longitud de las vellosidades se mide desde la punta de la vellosidad hasta la base de unión con las criptas de Lieberkühn (**Figura III.4**). Desde este punto hasta la base de la cripta se toma la medida de la profundidad de la misma (**Figura III.5**). El grosor total de la mucosa se mide desde la punta de la vellosidad hasta la *muscularis mucosae*, situada inmediatamente por debajo de la base de las criptas (**Figura III.6**) (Van Dijk *et al.*, 2001; Wayhs *et al.*, 2004).

Fichero de Calibración:
C:\MIP4\MIPTOOLS\CALIBR^1\CALX4.CAL

Unidades: micrometros

Eje X: Eje Y:

Factor de Transformación: 2.59740 2.59740



Medidas de Líneas (674 – 330)		
Num	Distancia	Recorrido
1	345.80554	345.80554

Figura III.4. Calibración y medida de la longitud de una vellosidad intestinal.

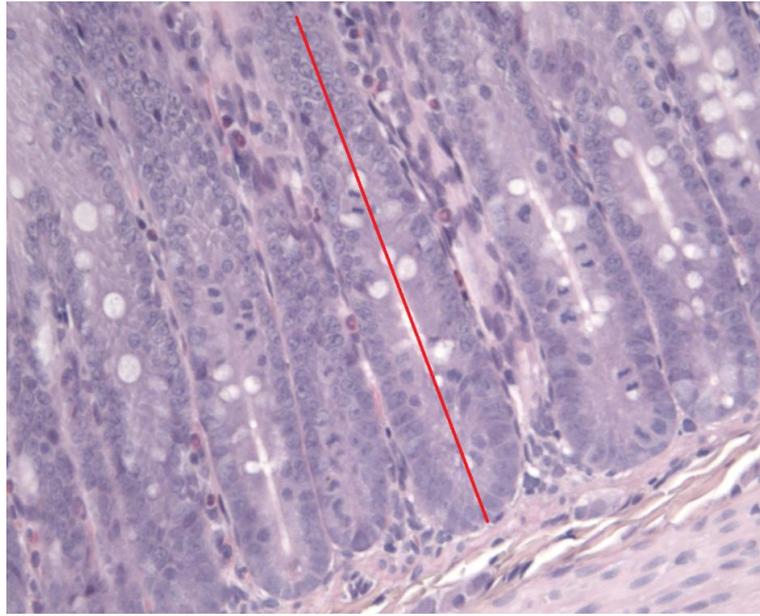


Figura III.5. Medida de la profundidad de las criptas del intestino delgado.

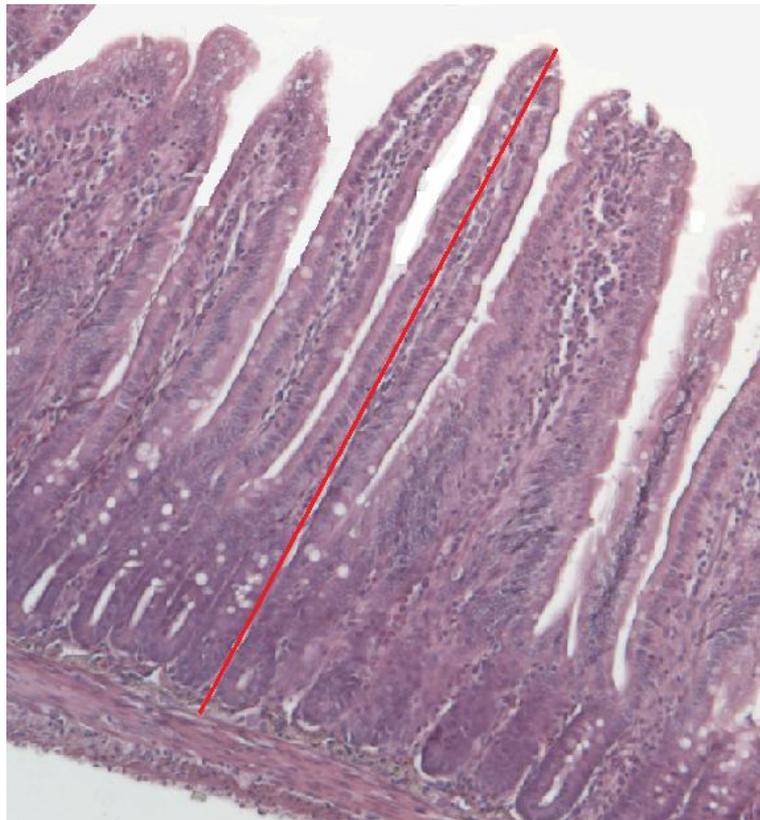


Figura III.6. Medida del grosor de la mucosa del intestino delgado.

2- Intestino grueso

La sección histológica de colon se captura a 10 aumentos para su visualización en el monitor. La medida del grosor se toma de forma manual en zonas bien orientadas carentes de pliegues, desde el borde interior de la mucosa hasta la *muscularis mucosae* (**Figura III.7**). La imagen capturada se calibra a 1,04 μ (X, Y). La magnificación de las medidas realizadas a 10 aumentos es de 280.

Las muestras de hígado y riñón se examinan visualmente al microscopio para comprobar la normalidad de las estructuras y así descartar cualquier tipo de toxicidad de los compuestos de estudio (**Figura III.8 y III.9**).

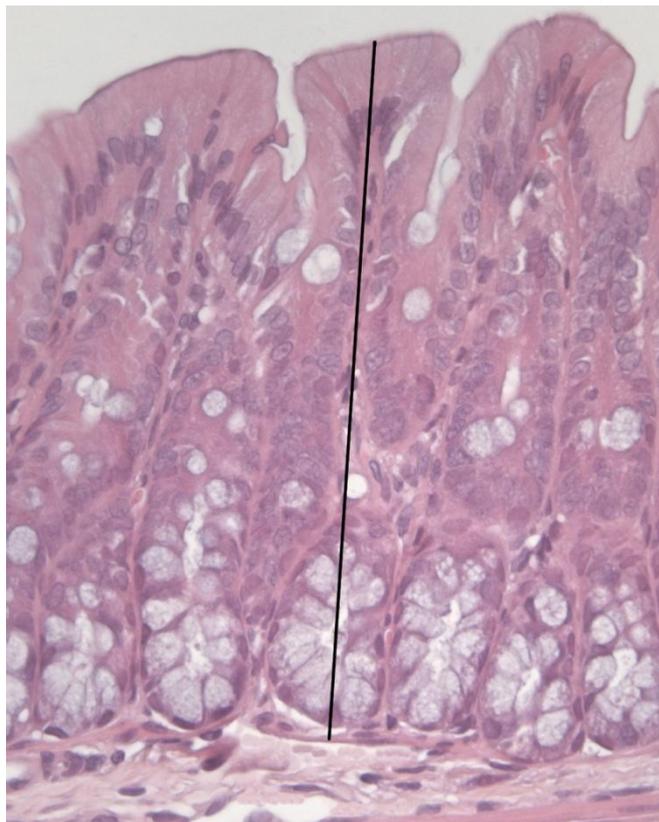


Figura III.7. Medida del grosor de la mucosa del intestino grueso.

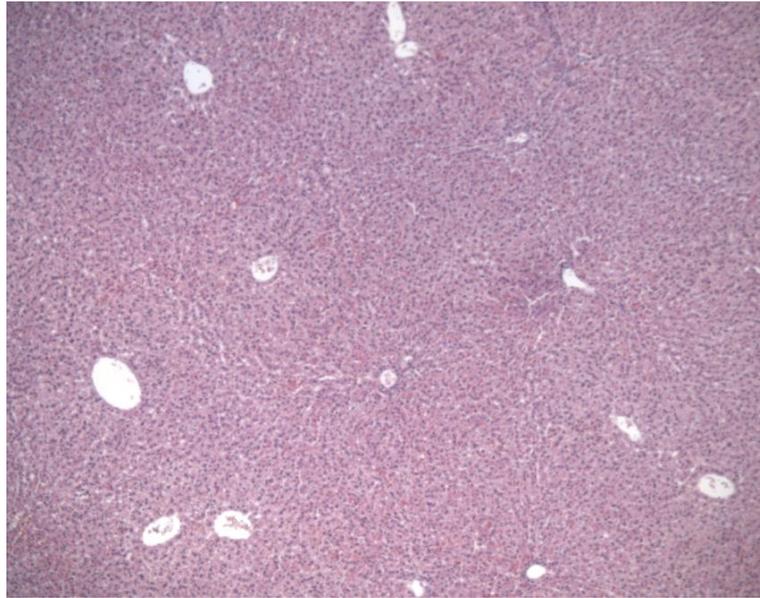


Figura III.8. Imagen microscópica de hígado de rata.

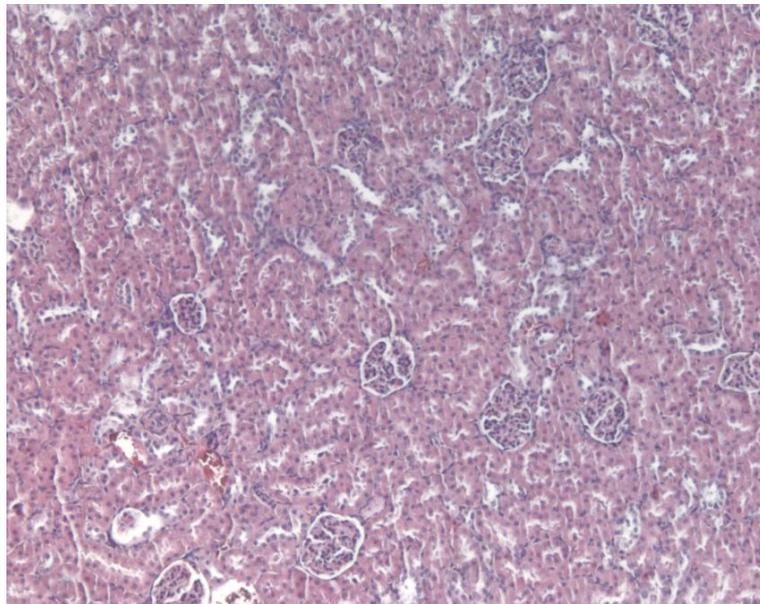


Figura III.9. Imagen microscópica de riñón de rata.

III.2.3.1 Reactivos.

- Formaldehído (Formol) 3,7-4% tamponado a pH=7 y estabilizado con metanol, suministrado por Panreac Química S.A.U. (Barcelona-España).
- Parafina de uso histológico, para inclusión de tejidos de Guinama S.L.U. (Valencia-España).
- Etanol absoluto parcialmente desnaturalizado químicamente puro de Panreac Química S.A. (Barcelona-España).
- Hematoxilina, suministrada por Panreac Química S.A.U. (Barcelona-España) eosina y Eosina, suministrada por Sigma-Aldrich Inc. (St. Louis, MO).
- PBS (Phosphate Buffer Saline), cuya composición se observa en **Tabla III.2.**

Tabla III.2- Composición del PBS.

CINa	8 g
KCl	0,20 g
KH ₂ PO ₄	0,12 g
Na ₂ HPO ₄	0,91 g
Agua desionizada	1000 ml

III.2.4 Análisis estadístico.

Para todos los factores estudiados, y tras verificar la homocedasticidad de las varianzas mediante el estadístico de Levene, se realiza la comparación entre los valores medios de cada uno de los cuatro grupos ensayados, mediante el análisis de la varianza (ANOVA) con un nivel de confianza del 95%. Siempre y cuando el test ANOVA indique diferencias significativas entre lotes, y para conocer cuáles de los tratamientos son significativamente diferentes entre sí, se realiza el test de rango múltiple, comparando las medias obtenidas mediante el test de Tukey HSD.

III.3 MODELO EXPERIMENTAL EN CERDOS

II.3.1 Ensayo preliminar.

Para la elección del porcentaje de aceite esencial que se adiciona a la alimentación de los animales se realiza un ensayo preliminar durante 35 días en explotación intensiva, en las instalaciones del CIFEA de Lorca. Se utilizan 20 lechones (Pietrain*Large white x Large white*Landrace) de ambos sexos, recién destetados y con un peso medio al inicio del experimento de $8,28 \pm 0,90$ kg, que son divididos al azar en 4 grupos homogéneos:

Grupo I: Control. Alimentado con un pienso de arranque para cerdos.

Grupo II: se administra un 0,06% de la mezcla de los dos aceites esenciales (*Thymus zygis* subsp. *gracilis* y *Thymbra capitata*), calculado según la ingesta semanal estimada.

Grupo III: se administra un 0,09% de la mezcla de los dos aceites esenciales.

Grupo IV: se administra un 0,12% de la mezcla de aceites.

El aceite esencial se prepara semanalmente dentro de cápsulas de gelatina que se dosifican a diario a los animales junto con el pienso. El alimento y el agua se ofrecen *ad libitum* durante todo el experimento.

El peso de los animales y el consumo de pienso se controlan semanalmente, calculando así la ganancia media diaria de peso, el consumo medio diario de alimento y el índice de conversión alimenticia. Con los datos del consumo total de alimento (grupo I 23,65 kg; grupo II 26 kg; grupo III 23,29 kg; grupo IV 22,95 kg) y del incremento de peso de los animales durante el periodo de estudio (grupo I 15,13 kg; grupo II 14,73 kg; grupo III 14,75 kg; grupo IV 14,90 kg) se obtienen los valores del índice de conversión (grupo I 1,56; grupo II 1,77; grupo III 1,58; grupo IV 1,54).

Tras comprobar visualmente la ausencia de diarreas o de otros signos clínicos que pudieran indicar una posible toxicidad de los aceites, se considera que la inclusión de un porcentaje de AE en la dieta del 0,12% o superior puede ejercer unos mayores efectos biológicos sobre los animales, además de obtener un buen rendimiento productivo, como se desprende de los datos calculados en este ensayo preliminar.

III.3.2 Animales y alimentación.

La fase experimental se realiza en la granja porcina “Las Nubes”, perteneciente a José Reverte Navarro S.L. (**Figura III.10**), y situada en el municipio de Lorca. Durante el desarrollo del experimento se han tenido en cuenta las normas marcadas por el Reglamento Comunitario (852/2004; 853/2004; 854/2004), la Ley española 32/2007, de 7 de noviembre de 2007, “para el cuidado de los animales, su explotación, transporte, experimentación y sacrificio” y el Real Decreto 1135/2002, relativo a las normas mínimas para la protección de cerdos.



Figura III.10. Granja porcina “Las Nubes” para la explotación intensiva de lechones en fase de transición.

Para el estudio se cuenta con un total de 80 lechones de cerdo blanco de ambos sexos, con machos castrados, (Pietrain*Large white x Large white*Landrace) recién destetados, de 21 días de edad, distribuidos al azar en cuatro lotes homogéneos. El experimento se realiza en dos series de 40 animales, con un peso medio al inicio del experimento de $6,831 \pm 1,685$ Kg. El peso de los animales se controla semanalmente, así como el consumo de pienso. Alimento y agua se ofrecen *ad libitum* durante todo el experimento.

El pienso “Starter” completo para lechones que constituye la dieta basal es suministrado por Alimentos del Mediterráneo, S. Coop. (Lorca, Murcia). Las materias primas utilizadas para la realización del pienso y la composición analítica del mismo se muestran en las **Tablas III.3 y III.4.**

Tabla III.3. Composición analítica de la dieta basal.

Constituyentes analíticos	Cantidad (%)
Proteína bruta	18
Materias grasas	6,91
Celulosa bruta	3,50
Cenizas brutas	5,70
Lisina	1,25

Tabla III.4. Composición porcentual de la dieta basal.

Componentes de la dieta basal	Cantidad (%)
Maíz (O.G.M.)	34,87
Cebada	25
Harina extracción soja tostada (O.G.M.)	21,72
Trigo	6,48
Aceite vegetal de soja (O.G.M.)	3,7
Concentrado proteico vegetal	2,5
Carbonato de calcio	1,08
Fosfato monocálcico	1,07
Aceite de pescado	1
Cloruro de sodio	0,4

O.G.M.: Organismo Genéticamente Modificado.

El enriquecimiento del pienso molido con aceite esencial se realiza mediante pulverización del aceite en la tolva mezcladora de ingredientes. Previendo entre un 20% y un 50% de pérdidas de aceite esencial en el proceso de fabricación, se agrega un 0,2% de producto al pienso. El alimento terminado se analiza en laboratorio para conocer la cantidad real de aceite que contiene, suplementando posteriormente el pienso del grupo control con la misma cantidad de ácidos orgánicos.

Los animales son alimentados, tras el destete, durante los 42 días correspondientes a la fase de transición, introduciendo los piensos objeto de ensayo de forma gradual. La primera semana se alimenta íntegramente a los animales con un pienso medicamentoso de leche suplementado con Zinc (Óxido de zinc calier 2500 mg/kg), suministrado por Alimentos del Mediterráneo, S. Coop. (Lorca, Murcia), y cuya composición analítica y porcentual se observa en las **Tablas III.5** y **III.6**. En la segunda semana, los 3 primeros días se ofrece a los animales una mezcla del 75% del pienso de leche y un 25% del pienso en ensayo. Los siguientes cuatro días el alimento se compone de esta misma mezcla al 50%. Las cuatro semanas sucesivas se alimenta a los cerdos con el 100% del pienso tratado.

Tabla III.5. Composición analítica del pienso de leche.

Constituyente analítico	Cantidad (%)
Proteína bruta	20,80
Materias grasas brutas	5,70
Cenizas brutas	5,30
Celulosa bruta	2,40
Lisina	1,52

Tabla III.6. Composición porcentual del pienso de leche.

Materias primas	Cantidad (%)
Copos de maíz (O.G.M.)	15
Copos de arroz	15
Trigo	12,6
Habas de soja tostada (O.G.M.)	12,5
Suero de leche en polvo	12,5
Copos de trigo	10
Harina de pescado	8,5
Copos de avena	5
Proteína de plasma	2
Harinillas de trigo	1,87
Aceite vegetal de soja (O.G.M.)	1
Proteínas de patata	0,75
Carbonato cálcico	0,3
Fosfato bicálcico	0,2
Gluten de trigo	0,2

O.G.M.: Organismo Genéticamente Modificado.

Los grupos experimentales se organizan, por tanto, como se describe a continuación:

Grupo Control positivo (C-DFK): Alimentado con un pienso completo tipo “Starter” suplementado con un 0,16% de una mezcla comercial de ácidos orgánicos (diformiato de potasio-Formi®).

Grupo Thymbra: (T) que es alimentado con un pienso “Starter” con adición de un 0,16% de aceite esencial de *Thymbra capitata*.

Grupo Zygis: (Z) al que se le administra un pienso “Starter” enriquecido con un 0,16% de aceite esencial de *Thymus zygis* subsp. *gracilis*.

Grupo Mezcla: (M) alimentado con un 0,16% de mezcla, a partes iguales, de los aceites esenciales de las dos especies de tomillo, incluidos en el pienso.



Figura III.11. Cerdos utilizados en el ensayo.

III.3.3 Recogida de muestras.

Al final del ensayo se sacrifican, al azar, 8 de los animales de cada grupo, en el matadero “La Comarca” (Lorca, Murcia), de acuerdo con los Reglamentos CE 1774/2002, 852/2004 y 853/2004.

III.3.3.1 Recogida de sangre.

En el momento del sacrificio, durante la fase de sangrado del animal, se recoge muestra de la sangre en tubos con heparina sódica 5000 UI/ml (Chiesi, Barcelona, España). Las muestras se mantienen a 4°C hasta la llegada a laboratorio. El plasma de las muestras se separa por centrifugación (3500 rpm, 4°C, 10 min) en un sistema Eppendorf modelo 5810R (Hamburgo, Alemania). Para la estabilización de fenoles se acidifica el plasma con tampón acetato 0,01 M en proporción 1:11 (Manach *et al.*, 1997) y se almacena a -80 °C para posteriores análisis.

III.3.3.2 Recogida de contenido intestinal y vísceras.

Antes del traslado al matadero no se limita a los animales el acceso a los comederos pudiendo acceder de forma voluntaria al alimento, transcurriendo un tiempo aproximado de dos horas hasta el sacrificio. En el momento de la evisceración, de cada animal se retira el tracto gastrointestinal en su totalidad, sellando, mediante *clamps* intestinales, las secciones de interés para mantener la esterilidad. Se recogen muestras de contenido intestinal de:

- Yeyuno: dos segmentos contiguos de 15 cm, medido 1 metro antes de la válvula ileocecal.
- Íleon: últimos 15 cm antes de la válvula ileocecal.
- Colon: segmento de 10 cm de colon medio.

Las muestras de contenido intestinal se introducen en botes estériles y se conservan en hielo a 4°C hasta la llegada al laboratorio. Parte del contenido intestinal de yeyuno se cultiva, el mismo día, para análisis microbiológico. El

resto de muestras se recogen en condiciones de esterilidad, se homogeneizan, liofilizan y almacenan para posteriores análisis.

También se retiran el hígado, los riñones y el bazo de cada animal. Los órganos se limpian con PBS y se pesan.

III.3.3.3 Recogida de muestras de carne.

Tras el sacrificio, las canales ya limpias se introducen en un túnel de oreo durante 2 horas, aproximadamente, para el rápido enfriamiento de las piezas, y posteriormente se almacenan en refrigeración a una temperatura de estabilización de 0,5 °C, durante aproximadamente 24 horas. Pasado este tiempo se despiezan las canales y se toma muestra de lomo (*Longissimus dorsi*) y del músculo semitendinoso (*M. semitendinosus*) y semimembranoso (*M. semimembranosus*) de las dos patas traseras. Los lomos de cada animal se dividen en secciones para las distintas pruebas y análisis a realizar, mientras que los dos músculos de la pierna se homogeneizan y almacenan en condiciones de vacío a -80°C, para su posterior análisis.

III.3.4 Efecto de la alimentación sobre la carne de cerdo.

III.3.4.1 Parámetros físico-químicos de la carne.

Los atributos de pH, capacidad de retención de agua y color están fuertemente interrelacionados entre sí. El color y capacidad de retención de agua dependen básicamente de las condiciones en que se realizan los cambios de pH durante la transformación *post mortem* de músculo a carne.

III.3.4.1.1 pH.

Se toma medida del pH de la carne en dos tiempos distintos:

- pH a los 45 minutos *post mortem*. Se determina sobre el músculo *Longissimus dorsi* mediante pH-metro (Crison Instruments, S.A. modelo 507) acoplado a un electrodo de penetración (Crison, 52-33), calibrado

adecuadamente con patrones de cloruro de potasio de pH 4,0 y 7,0 (**Figura III.12**).

- pH a las 24 horas *post mortem*. Se determina por homogenización, de acuerdo a la Norma ISO 2917:1999. Se pesan 5 gramos de lomo (músculo *Longissimus dorsi*) a los que se añaden 5 ml de agua destilada y con agitación durante 5 minutos se lleva a cabo su completa homogeneización. Posteriormente, se deja reposar la muestra durante otros 5 min antes de proceder a la medida del *pH* en un pHmetro (Crison Instruments, S.A. modelo GLP 21) con electrodo combinado (Crison, 52-02), calibrado con patrones de cloruro de potasio de pH 4,0 y 7,0.

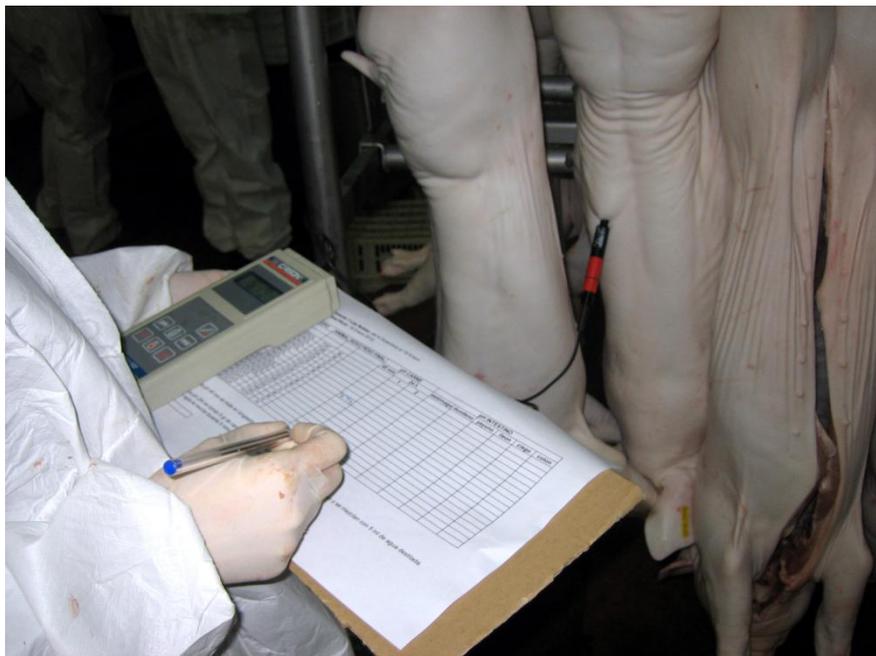


Figura III.12. Medida del pH de la carne a los 45 minutos *post mortem*.

III.3.4.1.2 Capacidad de retención de agua.

La capacidad de retención de agua se mide mediante el método de pérdidas por goteo en carne fresca. Estas pérdidas se definen como la pérdida de peso sufrida en la carne, según los métodos de referencia publicados por Honikel (1998). Tras 24 horas del sacrificio, se corta, de forma perpendicular a la orientación de las fibras, filetes de 2 cm de grosor de la región central del músculo *Longissimus dorsi*. Estos filetes se pesan y se colocan en contenedores impermeables con un soporte perforado en su interior para permitir el goteo del agua. Las muestras se mantienen en refrigeración a 2 °C y se toma medida del peso a las 24, 48, 72 y 96 horas.

El porcentaje de pérdidas por goteo se calcula respecto al peso inicial de los filetes, mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Pérdidas por goteo} = (\text{Peso inicial} - \text{Peso final}) \times 100 / \text{Peso inicial}$$

III.3.4.1.3 Color CIELab.

Para valorar objetivamente el color de la carne se utiliza un colorímetro Chroma Meter CR-300 (Minolta Camera, Osaka, Japón). Las medidas de color se toman sobre tres puntos distintos de la superficie de los filetes de lomo en fresco, de 2 cm de grosor, y sobre fondo blanco. Se usa D65 como iluminante estándar y se utiliza, en calibración de blanco y medidas en carne, el cono de proyección de luz con vidrio CR-A33a. El resultado de las medidas se expresa a través del sistema de coordenadas CIELab (CIE, 1978). A partir de las coordenadas a^* (rojo-verde) y b^* (amarillo-azul), se calculan los valores de C^*_{ab} (Croma) y h_{ab} (Ángulo de tono) mediante las expresiones:

$$C^*_{ab} = (a^{*2} + b^{*2})^{1/2}$$

$$h_{ab} = \arctg (b^*/a^*) \times [360^\circ / (2 \times 3,14)]$$

III.3.4.2 Análisis sensorial.

Con el fin de conocer si la alimentación suministrada a los animales influye en el sabor de la carne, se realiza, sobre un panel de consumidores sin entrenar, una prueba discriminativa triangular, comparando cada uno de los tres tratamientos con el control.

Las pruebas se realizan sobre un total de 302 panelistas, que realizan un cuestionario inicial (**Anexo 2**) que permite conocer las características del panel, y posteriormente se les presentan las 3 muestras (dos iguales y una diferente) junto con la ficha de cata (**Anexo 3**).

Asimismo, se realiza una prueba de preferencia en la que se pide a los miembros del panel señalar la muestra que más les gusta entre las tres ofrecidas.

Para la preparación de las muestras se deshuesan los jamones del cerdo y posteriormente, siguiendo lo descrito por Bañón *et al.* (2007), con una picadora de carne (MG510, 1600 w, Kenwood, Barcelona, España) se pica y homogeneiza la carne, añadiendo 20 gr de sal por cada kg de esta mezcla, y se preparan hamburguesas de 80 g con un molde manual de 10 cm de diámetro. Las hamburguesas se envasan al vacío y se mantienen en refrigeración a 4 °C unas 18 horas. Antes del análisis sensorial se sacan del envoltorio y se mantienen expuestas al aire durante 10 min para recuperar su color natural y temperatura ambiente. Para evitar el tostado superficial de la carne, cada pieza se envuelve en papel de aluminio y se cocina en plancha eléctrica doble (Media Liscia, Silanos, Milan, Italy) a 150 °C hasta que las muestras alcanzan en su interior una temperatura de 72 °C mantenida durante 2 min, controlado por un termómetro portátil T200 (Digitron Instrumentation Ltd., Merd Lane, Hertford, United Kingdom). Inmediatamente después, se introducen las muestras en un baño termostático por agua a 60°C, por un tiempo máximo de 5 minutos, hasta que se ofrecen al consumidor.

La carne de los cuatro tratamientos -Control, Mezcla, Thymbra y Zygis- se identifica con un código de tres dígitos para su evaluación.

III.3.5 Estudio del sistema digestivo.

III.3.5.1 pH intestinal.

Para conocer el efecto que la alimentación con aceite esencial ejerce sobre la acidez del contenido del tracto gastrointestinal, se mide, inmediatamente tras el sacrificio, el pH del estómago, duodeno, yeyuno, íleon, y colon, utilizando un electrodo de penetración (modelo 52-33) acoplado a un pHmetro Crison (modelo GLP 21).

III.3.5.2 Microbiota intestinal.

III.3.5.2.1 Cuantificación bacteriana por métodos tradicionales dependientes de cultivo.

Se realiza una dilución inicial con PBS estéril de 10^{-1} , a partir de 4 gramos de contenido intestinal fresco de yeyuno de la cual se continúa con diluciones decimales seriadas, en nuestro caso hasta la 10^{-10} , de las que se siembra en los diferentes medios selectivos utilizados en el estudio. Todas las siembras se llevan a cabo por triplicado. Se utiliza el método de siembra en placa (para *Clostridium* sulfito-reductores en tubo) por homogeneización en masa, que consiste en poner 1 ml de las diferentes diluciones de la muestra problema en placas de Petri estériles. Se añade 10-15 ml de agar a cada una de las placas, atemperado a 45°C. A continuación se realizan movimientos circulares y de vaivén para que el inóculo se distribuya uniformemente en la placa. Se deja solidificar y posteriormente se incuban las placas invertidas a 37°C durante 48 horas. Se cuentan las placas que tienen entre 30-300 colonias y se multiplica por el factor de dilución de la placa correspondiente, expresándose los resultados en unidades formadoras de colonias por gramo de muestra (ufc/gr).

Mediante este método se realiza el recuento de los siguientes grupos de bacterias:

- **Aerobios mesófilos totales**; mediante siembra en agar para recuento en placa (PCA) (OXOID). El uso de este medio sólido permite cuantificar la población de bacterias aerobias mesófilas viables en una muestra tras la

siembra de un volumen conocido de la misma y posterior incubación en condiciones de aerobiosis (37 °C durante 48 horas).

- **Enterobacterias totales;** mediante siembra en agar MacConkey (OXOID), medio utilizado para el recuento y aislamiento selectivo de enterobacterias totales. Las sales biliares y el cristal violeta de su composición le dan el carácter selectivo al medio, inhibiendo así, la mayor parte de las bacterias Gram positivas. La presencia de lactosa y rojo neutro en el medio le confieren capacidad diferenciadora entre bacterias fermentadoras (coliformes) y no fermentadoras de la lactosa (salmonellas). La fermentación de la lactosa por parte de los microorganismos entéricos conlleva un descenso del pH en las inmediaciones de la colonia, lo que provoca la absorción del colorante rojo por parte de las bacterias y su coloración.

- ***Escherichia coli*;** mediante siembra realizada en agar cromogénico ID-F (BioMerieux), cuyo carácter selectivo y diferenciador reside en la utilización de una mezcla de sustratos cromogénicos y de activadores. A pesar de que todos los coliformes son fermentadores de lactosa, *E. coli* es una bacteria β D-glucuronidasa positiva formadora de colonias de color rosa a violeta, de 0,5 a 2 mm de diámetro, mientras que otros coliformes distintos de *E. coli* son bacterias β D-glucuronidasa negativas, pero β -galactosidasa positivas formadoras de colonias de un color azul a gris.

Este medio se considera altamente selectivo para la detección y enumeración de *E. coli* en aguas, así como más fácil y rápido en comparación a los métodos de referencia, como el agar lactosa TTC Tergitol, según describe Sueiro *et al.*, (2001). En base a los resultados expuestos por estos autores en el estudio se optó por la utilización del agar cromogénico para el recuento de *E. coli* y el agar McConkey para el recuento total de enterobacterias.

- ***Clostridium* sulfito-reductores;** mediante siembra en agar SPS (Merck) realizada en tubo, con sellado de los mismos con parafina líquida estéril, con el fin de proporcionar una atmósfera anaerobia. La reducción del sulfito a sulfuro por parte de la mayoría de *Clostridium* se manifiesta en este medio por la aparición de sulfuro ferroso, coloreando de negro las colonias

bacterianas. La presencia de polimixina y sulfadiazina en la composición inhibe el crecimiento de otros agentes.

- ***Lactobacillus spp.***; mediante siembra en agar MRS (Merck). El medio de cultivo permite un abundante desarrollo de todas las especies de lactobacilos. La peptona y glucosa constituyen la fuente de nitrógeno, carbono y de otros elementos necesarios para el crecimiento bacteriano. El monoleato de sorbitán, magnesio, manganeso y acetato, aportan cofactores y pueden inhibir el desarrollo de algunos microorganismos. El citrato de amonio actúa como agente inhibitorio del crecimiento de bacterias Gram negativas. Las colonias en el medio aparecen generalmente pequeñas, blanco-grisáceas, lisas o rugosas.

Todas las siembras se hacen por triplicado en placas de Petri, salvo la determinación de *Clostridium* sulfito-reductores, que se hace en tubo. Las incubaciones se realizan en condiciones de aerobiosis a 37° C, durante 48 h, a excepción, como se ha descrito previamente, de los recuentos de clostridios sulfito-reductores, y en el caso de *Lactobacillus*, a 35-37 °C hasta 3 días en atmósfera aeróbica con un 5-10% de CO₂.

La composición de los medios se presenta en Anexos (**Anexo 4**).

III.3.5.2.2 Cuantificación bacteriana mediante PCR en tiempo real.

III.3.5.2.2.1 Extracción de ADN.

Para el análisis de las muestras se procede inicialmente a la extracción del ADN presente en el contenido intestinal liofilizado de yeyuno, íleon y colon. Para ello se utiliza el kit comercial QIAamp DNA Stool Mini Kit (QIAGEN), desarrollado específicamente para el análisis fecal, ya que las heces contienen contaminantes que pueden inhibir los análisis moleculares posteriores (Vanderberg y van Oorschot, 2002). Se realiza un pre-tratamiento adicional de las columnas Qiagen para eliminar las trazas de ADN bacteriano contaminante mediante un doble lavado con agua DEPC (dietil pirocarbonato), libre de ADN Y ARN, a 72°C. Además, se realiza cada 15 muestras un control de extracción (sin muestra) para determinar la contaminación residual de columna y reactivos.

Atendiendo a la proporción de agua de cada una de las muestras se pesa un equivalente a 200 mg de contenido intestinal. La temperatura de lisis se eleva a 95°C durante 5 minutos. Además, se añade un paso de incubación con 200 µl de solución tampón lisozima (20 mg/ml, 37°C, 30 minutos) para mejorar la ruptura de la pared celular de las bacterias Gram-positivas. El ADN obtenido se almacena a -25°C.

III.3.5.2.2.2 PCR cuantitativa.

Mediante PCR en tiempo real se realiza la cuantificación de bacterias totales y enterobacterias usando diferentes primers o cebadores:

Bacterias totales: Dar *et al.* (2005) y Handschur *et al.* (2009).

- 314F (forward) 5'-CCTACGGGAGGCAGCAG-3'
- 518R (reverse) 5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3'

Enterobacterias: Bartosch *et al.* (2004).

- Eco1457F (forward) 5'-CATTGACGTTACCCGCAGAAGAAGC-3'
- Eco1652R (reverse) 5'-CTCTACGAGACTCAAGCTTGC-3'

La especificidad de los diferentes primers se revisa con una base de datos de similitud de nucleótidos BLAST <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. Para comprobar que los primers seleccionados no amplifican ADN del animal se realiza la extracción de ADN porcino a partir de sangre estéril y se lleva a cabo una PCR con los primers utilizados.

La curva estándar necesaria para la cuantificación de bacterias totales y enterobacterias se realiza a partir de un cultivo puro de *Escherichia coli*, del cual se extrae el ADN con el kit comercial DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN). El ADN extraído se cuantifica mediante biofotómetro (Biophotometer Plus, Eppendorf), así como la pureza de la extracción mediante el ratio de medida 260/280 nm. Para la construcción de la curva estándar se toman 8 puntos de medida con diluciones seriadas 1:5, obteniendo para la realización de los

cálculos las siguientes ecuaciones de regresión lineal que describen la relación entre el ciclo umbral (Ct, por sus siglas en inglés) y el logaritmo del número de copias (**Tabla III.7**):

Tabla III.7. Ecuaciones de regresión lineal para la cuantificación de bacterias totales y enterobacterias presentes en el contenido intestinal de cerdos.

	Recta de regresión	Valor de R²
Bacterias Totales	$y = -0,2706 x + 11,32$	0,9967
Enterobacterias	$y = -0,296 x + 11,52$	0,9989

El ADN de nuestras muestras es igualmente cuantificado y comprobada la pureza de extracción. Todas ellas se diluyen hasta una misma cantidad de ADN (100 ng/μl) para el inicio de los análisis.

Para la amplificación mediante la técnica de PCR en tiempo real y la toma de datos de la fluorescencia se usa el termociclador StepOne Plus (applied Biosystem) con placa óptica de 96 platos. El mastermix utilizado se compone de 12,5 μl de SYBR Green Mastermix 2X, 1,25 μl de cada primer (10 μM) y 8 μl de agua DEPC. A esto se añaden 200 ng/μl de ADN de muestra antes de la amplificación. Las muestras fueron analizadas por duplicado.

Todos los programas de amplificación incluyen un paso inicial a 95°C durante 10 minutos para la activación de la polimerasa, seguido de 42 ciclos de desnaturalización a 95°C durante 30 segundos, unión de los cebadores a la temperatura óptima (60°C Bacterias totales y 62°C Enterobacterias) durante 1 minuto, procedimiento modificado a partir de la descripción de Castillo *et al.* (2006) y Guo *et al.* (2008). Para determinar la especificidad de la amplificación se añade un paso a 95°C durante 15 segundos para el análisis de la curva de fusión del producto (curva de melting) después del último ciclo de cada amplificación.

III.3.5.3 Reactivos.

- Agar para recuento en placa (PCA) y Agar MacConkey suministrados por OXOID Ltd (Cambridge, UK). Agar cromogénico ID-F suministrado por bioMérieux (Madrid, España). Agar MRS y Agar SPS suministrados por Merck (Madrid, España).
- PBS (Phosphate Buffer Saline), cuya composición se observa en Tabla II.2.
- kit comercial QIAamp DNA Stool Mini Kit y DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN).
- SYBR[®] Green Master mix (Applied biosystems).

III.3.6 Análisis de fenoles.

III.3.6.1 Extracción de compuestos fenólicos.

La puesta a punto de una técnica de extracción, requiere el conocimiento previo del porcentaje de recuperación de los componentes a determinar en cada una de las matrices en ensayo.

Para ello se desarrollan los protocolos más adecuados de extracción y purificación en los análisis de cada una de las muestras.

III.3.6.1.1 Extracción de fenoles en carne.

Se realiza por duplicado la extracción de fenoles de muestras de *Longissimus dorsi* y de la mezcla de *Musculus semitendinosus* y *semimembranosus*.

Cada una de las partes se homogeneiza y una porción de ese homogeneizado se liofiliza directamente (sistema Virtis modelo 6K BTEL-85), mientras que el resto se somete a un tratamiento enzimático, previo a la liofilización, partiendo siempre de una cantidad de 7 g de muestra fresca de carne.

Para la hidrólisis enzimática las muestras de carne son tratadas con 860 UI de enzima β -glucuronidasa tipo H5 de *Helix pomatia* por cada gramo de muestra disuelta en tampón acetato pH 5. Las muestras se mantienen a 37° C, en oscuridad y ligero movimiento en incubadora (Binder APT Line™ KB 240-UL) durante 18 horas (Nakamura y Tonogai, 2003). Posteriormente son liofilizadas (sistema Virtis modelo 6K BTEL-85).



Figura III.13. Extractor tipo Soxhlet utilizado para el proceso de extracción de fenoles en carne.

Tras la liofilización, los fenoles presentes en 1,5 g de esta matriz se extraen con 150 ml de metanol en un sistema tipo Soxhlet Büchi B-811 (**Figura III.13**), durante 2 horas en atmósfera de nitrógeno. Los extractos metanólicos se llevan a sequedad en un sistema evaporador Büchi modelo Syncore Polyvap R-96 (Q-101), bajo condiciones de presión y temperatura controladas (350 mbar y 37 °C). El residuo obtenido se redisuelve en 2 ml de metanol y se hace pasar a

través de un filtro Puradisc™ 25 NYL de 0,2 µm de poro y 25 mm de diámetro (Whatman), para ser almacenados en viales silanizados de 2 ml a -80 °C hasta su posterior análisis mediante HPLC.

Para determinar la recuperación de los compuestos en cada una de las matrices, lomo (*Longissimus dorsi*) y patas traseras (músculo semimembranoso y semitendinoso), se realiza el mismo método de preparación y extracción con muestras de carne control, enriquecidas con 1 ml de una solución metanólica de patrones (carvacrol y timol) a concentración conocida.

III.3.6.1.2 Extracción de fenoles en plasma.

Las muestras de plasma almacenadas a -80 °C se descongelan y preparan para la extracción de fenoles, con y sin tratamiento enzimático, y por duplicado, con el fin de valorar el porcentaje de compuesto libre y conjugado presente en la sangre.

En cada extracción se parte de una cantidad inicial de 5ml de plasma. A las muestras con tratamiento enzimático se les añade 606 UI/ml de enzima β-glucuronidasa H5 de *Helix pomatia* disuelta en un tampón acetato de pH 5, y se mantienen en oscuridad y movimiento, a 37 °C durante 2 horas (Piskula y Terao, 1998). Una vez transcurrido este tiempo, la totalidad de las muestras, con o sin tratamiento enzimático, se trata con 5 ml de acetonitrilo para favorecer la precipitación de la proteína, y posteriormente se introducen durante 10 minutos en baño de ultrasonido (Ultrasons-H, JP Selecta S.A.). Tras esto, la fracción proteica se separa por centrifugación (9000 rpm, -2 °C, 5 min) y el sobrenadante se hace pasar a través de un filtro de nylon de 0,22 µm de poro y 13 mm de diámetro (MS®), que se almacena en viales silanizados de 2 ml a -80 °C hasta su posterior análisis mediante HPLC.

Para determinar la recuperación de los compuestos en el plasma de cerdo, se realiza el mismo método de preparación y extracción con muestras de plasma control, enriquecidas con 500 µl de una solución metanólica de patrones (carvacrol y timol) a concentración conocida.

III.3.6.2 Cromatografía líquida de alta resolución.

III.3.6.2.1 Análisis cualitativo y cuantitativo de timol y carvacrol.

Una vez extraídos los compuestos fenólicos, timol y carvacrol son identificados y valorados cuantitativamente mediante cromatografía líquida de alta resolución.

El equipo utilizado es un cromatógrafo líquido de alta resolución (HPLC, Agilent Technologies; Waldbronn, Alemania) compuesto de una bomba binaria (G1312A), un inyector automático (G1329A), un desgasificador (G1379B), y un detector de diodos en serie (G1316B) controlado por un programa de Agilent Technologies (V.B02.01).

La fase estacionaria usada en el análisis de fenoles extraídos de carne y plasma consiste en una columna en fase reversa Eclipse XDB-C18 (Agilent Technologies; Waldbronn, Alemania) de 15 cm de longitud, 0,46 cm de diámetro y 5 μm de tamaño de partícula, acoplada a una pre-columna del mismo material y de 12,5 cm de longitud (Zorbax SB-C18, Agilent Technologies).

La fase móvil utilizada consta de un disolvente A: agua acidificada al 5% con ácido fórmico, y un disolvente B: acetonitrilo. La velocidad de flujo en columna es de 1 ml/min y el programa de elución de la fase móvil para cada una de las matrices se esquematiza en la **Figura III.14**. El volumen inyectado es de 95 μl para ambos tipos de muestra.

La longitud de onda de detección usada es de 280 nm. La identificación de los componentes fenólicos, timol y carvacrol, se realiza por comparación de los espectros de absorción UV, y los tiempos de retención cromatográficos de los componentes a identificar, con estándares puros de referencia.

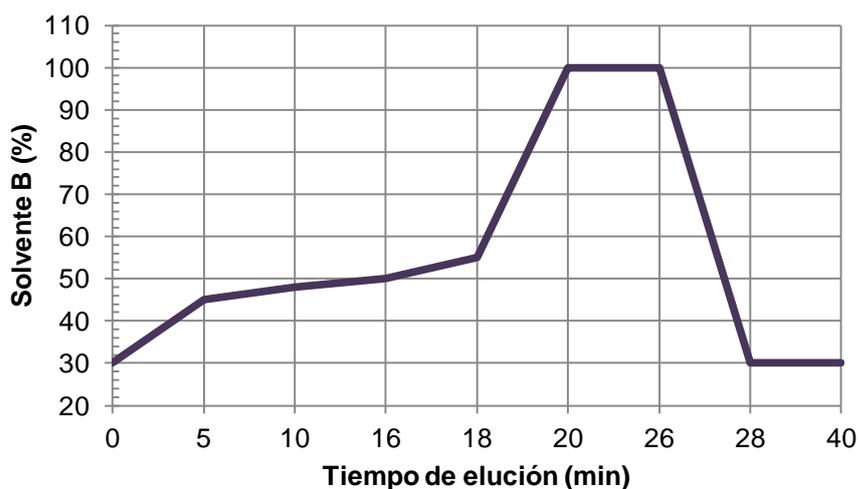


Figura III.14. Programa de elución de la fase móvil para el análisis de carvacrol y timol en carne y plasma de cerdo mediante HPLC.

El análisis cuantitativo se lleva a cabo mediante la aplicación de modelos lineales de regresión, de sucesivas diluciones de los estándares de referencia utilizados. Las ecuaciones para la cuantificación de los componentes fenólicos se muestran en la **Tabla III.8**.

Tabla III.8. Ecuaciones de regresión lineal para la cuantificación de fenoles en carne y plasma de cerdo.

	Recta de regresión de carne	Recta de regresión de plasma
Carvacrol	$y = 18,25 x + 4,0402$ $R^2 = 0,9971$	$y = 24,205 x - 0,601$ $R^2 = 0,9999$
Timol	$y = 18,436 x + 0,905$ $R^2 = 0,9999$	$y = 16,161 x + 0,1792$ $R^2 = 1$

III.3.6.2.2 Recuperación de componentes fenólicos.

Se calcula el porcentaje de recuperación de los compuestos fenólicos, timol y carvacrol, de cada una de las matrices en estudio, con y sin enzima, (n=6), en plasma, carne del músculo *Longissimus dorsi* y carne de los músculos semitendinoso y semimembranoso. Los valores de la recuperación de los componentes en ensayo se obtienen a partir de muestras control (carentes de los fenoles en estudio) enriquecidas con una solución metanólica de patrones (timol y carvacrol) a concentración conocida, a las que se somete a los mismos procesos que al resto de muestras, y se comparan con muestras del grupo control sin enriquecer.

Los cálculos de la recuperación absoluta de cada componente se realizan teniendo en cuenta la concentración de cada estándar puro agregado, el área que representa dicho estándar una vez extraído y la ecuación de ajuste lineal de cada componente.

III.3.6.2.3 Límite de detección.

Algunas técnicas instrumentales llaman “ruido de fondo” a la dispersión de la señal del blanco, y la ISO lo define como el valor mínimo del mesurando detectable con un cierto grado de confianza (normalmente el 95%). Se establece, por tanto, como límite de detección la cantidad más pequeña que el método puede detectar con fiabilidad por encima del ruido de fondo, para determinar la presencia o ausencia de un analito. Se calcula generalmente como tres veces la desviación estándar del área obtenida en muestras sin el compuesto de estudio, distintas al blanco.

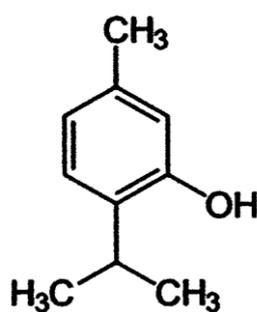
Para ello, a las distintas matrices en estudio se les realiza tres procesos de extracción con el objetivo de conseguir muestras con ausencia de compuestos fenólicos. Cada matriz -plasma, músculo *Longissimus dorsi* y los músculos semitendinoso y semimembranoso, con y sin enzima (n=6)- se procesa y analiza por triplicado, y se calcula la desviación estándar de las áreas correspondientes a las interferencias procedentes de la matriz de las muestras.

III.3.6.2.4 Límite de cuantificación.

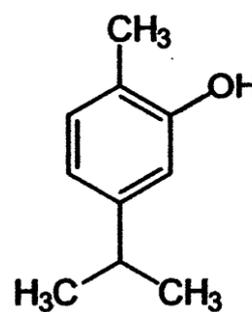
El límite de cuantificación es un parámetro de análisis cuantitativo para niveles bajos de concentración, y se define como la cantidad más pequeña que el método puede medir cuantitativamente con fiabilidad. Su valor se calcula a partir de los valores de desviación estándar obtenidos en el cálculo del límite de detección y, generalmente, su valor equivale a diez veces la desviación estándar del área obtenida en muestras sin el compuesto de estudio.

III.3.6.3 Reactivos.

- Metanol de grado HPLC (CH₃OH); ácido acético grado HPLC (CH₃COOH); ácido fórmico grado HPLC (HCOOH), acetonitrilo grado HPLC (CH₃CN) y sodio acetato anhidro para análisis ACS (CH₃COONa), suministrados por Scharlau Chemie SA (Barcelona, España).
- Enzima β-glucoronidasa-sulfatasa tipo H5 de *Helix pomatia* de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Con actividad glucuronidasa 606200 unit/g sólido y con actividad sulfatasa menor o igual a 60620 unit/g sólido.
- Timol y carvacrol, son suministrados por Sigma-Aldrich Inc.



Timol



Carvacrol

III.3.7 Análisis estadístico.

Para todos los factores estudiados, y tras verificar la homocedasticidad de las varianzas mediante el estadístico de Levene, se realiza la comparación entre los valores medios de cada uno de los cuatro grupos ensayados, mediante el análisis de la varianza (ANOVA) con un nivel de confianza del 95%. Siempre y cuando el test ANOVA indique diferencias significativas entre lotes, y para conocer cuáles de los tratamientos son significativamente diferentes entre sí, se realiza el test de rango múltiple, comparando las medias obtenidas mediante el test de Tukey HSD.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

IV.1 EFECTO DEL ACEITE ESENCIAL SOBRE CRECIMIENTO Y MORFOLOGÍA INTESTINAL DE RATAS

IV.1.1 Parámetros productivos y fisiológicos.

Los efectos de la adición de aceite esencial en la dieta se observan en primer lugar sobre los siguientes parámetros productivos: a) consumo de pienso y agua, b) incremento de peso y c) índice de conversión.

En la **Figura IV.1a** se muestran los valores del consumo de pienso en los cuatro lotes ensayados, y aunque las diferencias no son estadísticamente significativas, sí parece que existe una tendencia a ser superior en los animales que consumen aceites esenciales, siendo el consumo medio de los cuatro grupos experimentales de 119,7 g/animal, durante todo el tiempo de experimentación.

En cuanto al consumo de agua, se puede ver en la **Figura IV.1b** que los grupos alimentados con aceites esenciales presentan valores inferiores a los del grupo Control, suponiendo una diferencia del 9,5%. Sin embargo, el análisis ANOVA no muestra diferencias significativas, lo que nos lleva a descartar que la adición del aceite esencial pueda producir una alteración en el consumo de agua.

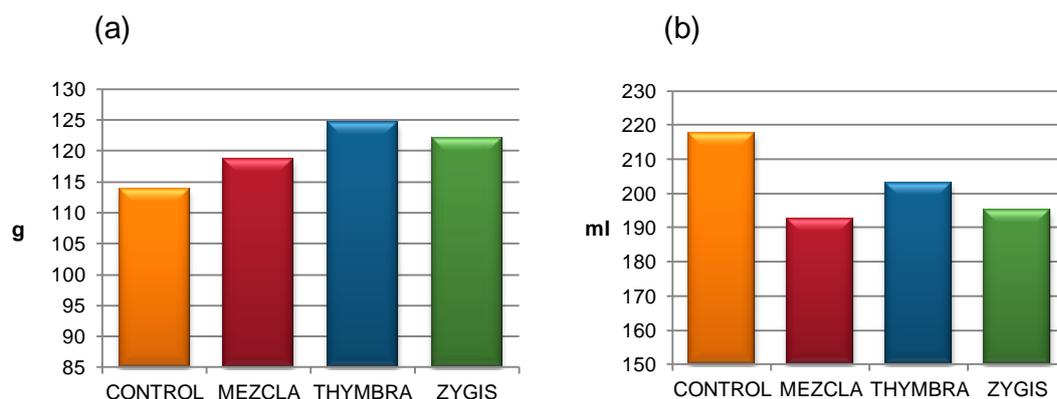
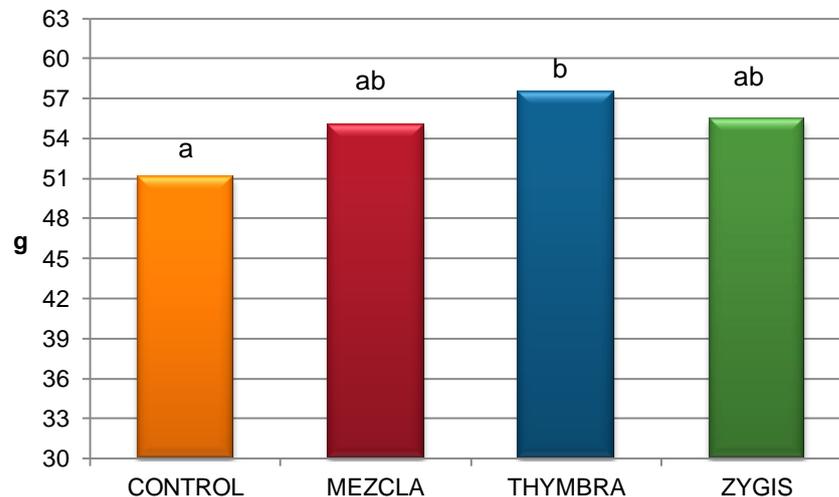


Figura IV.1. Consumo de alimento (a) y agua (b) de ratas recién destetadas, alimentadas con aceites esenciales de plantas aromático-medicinales.

Las ratas alcanzan al final del experimento un peso medio de $118,38 \pm 8,551$ g (C), $122,63 \pm 7,671$ g (M), $124,63 \pm 7,763$ g (T) y $122,63 \pm 5,927$ g (Z). En la **Figura IV.2** se muestran los valores del incremento de peso de los animales a lo largo del estudio. Para este parámetro el grupo Control muestra valores inferiores a los animales alimentados con aceites esenciales, aunque solo en el caso de la Thymbra resultan ser estadísticamente significativos con un aumento del 12,5% respecto al grupo Control. Otros compuestos procedentes de plantas como el polifenol curcumina, han mostrado también un efecto promotor de la ganancia de peso en ratas (Ciftci *et al.*, 2010). En nuestro caso, el aumento del peso corporal parece estar relacionado con el incremento en la ingesta de alimento, como se observa en la **Figura IV.1a**. Además, en otros ensayos realizados con ratas Sprague-Dawley con una edad y condiciones similares a las de nuestro estudio los rangos de incremento de

peso que se obtienen son afines (Gur y Waner, 1993), por lo que se considera que su desarrollo se produce de forma normal.



Distintas letras en minúscula muestran diferencias significativas ($p < 0,05$).

Figura IV.2. Incremento de peso (g) de ratas recién destetadas durante su alimentación con aceites esenciales de plantas aromático-medicinales.

El índice de conversión (IC), parámetro que relaciona el consumo de alimento con el incremento de peso (**Figura IV.3**), no muestra diferencias estadísticas entre los tratamientos, aunque sí una leve mejora del índice de los grupos con aceites esenciales, en relación al grupo Control.

Otro parámetro estudiado para poder descartar un posible aumento de la diuresis y un efecto laxante o astringente de los aceites ensayados, es el volumen de orina y la cantidad de heces excretadas. Durante el ensayo se intentó determinar el volumen de orina excretada, pero debido a los atascos producidos en los canales recolectores por la introducción de pienso, los datos no se han podido valorar.

En cuanto a la excreción de heces, se observa que se produce una mayor cantidad de deposiciones en los animales alimentados con aceite

esencial de *Thymus zygis*, y una menor cantidad en los alimentados con mezcla de aceites, aunque estas diferencias no son significativas estadísticamente (Figura IV.4).

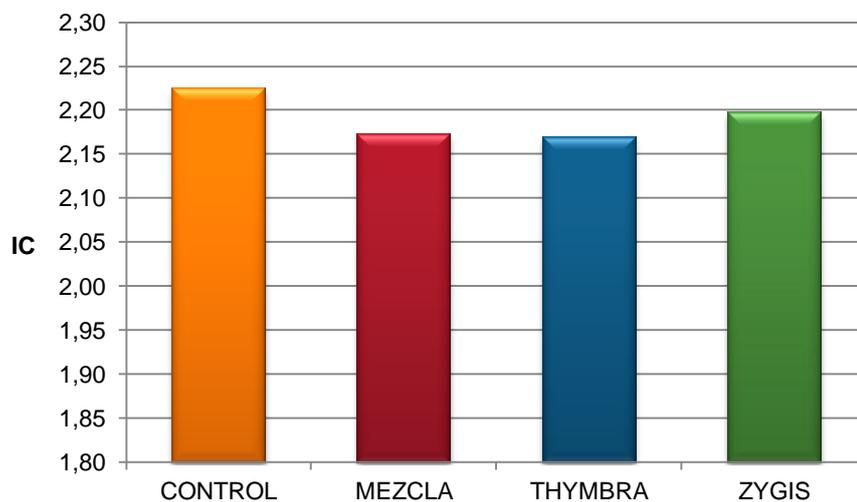


Figura IV.3. Índice de conversión de alimento de ratas alimentadas con aceites esenciales de PAM frente a un pienso base.

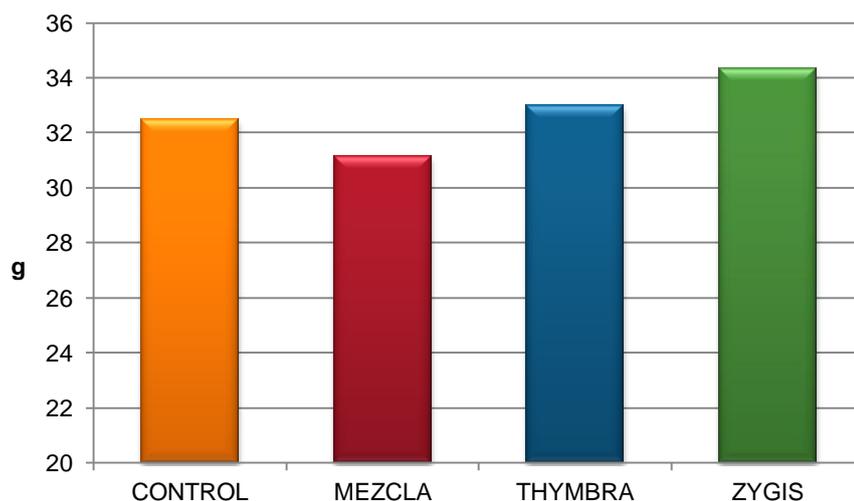


Figura IV.4. Cantidad de heces excretadas por ratas recién destetadas durante la alimentación con aceites esenciales de plantas aromáticas.

El papel más importante del hígado es el de filtrar sustancias tóxicas del organismo como medicamentos, antibióticos y toxinas. Si la acumulación de toxinas es más rápida que la capacidad del hígado para metabolizarlas, se puede producir daño hepático (Bigoniya *et al.*, 2009). Así, para descartar una posible inflamación o enfermedad de depósito causada por acumulación intracelular de sustratos no degradables, se estudia el peso de los órganos de detoxificación –hígado y riñón- y del bazo, en comparación con el peso corporal de cada animal (**Tabla IV.1**). La comparación en el peso de los órganos entre animales tratados y no tratados ha sido utilizada tradicionalmente para evaluar una posible toxicidad o efectos adversos de diversos compuestos (Peters y Boyd, 1966; Heywood, 1981; Butenhoff *et al.*, 2012), y es considerada una herramienta interesante debido a la sensibilidad que presentan ciertos órganos para predecir toxicidad (Michael *et al.*, 2007), siendo necesario en multitud de casos identificar si el cambio en el peso de los órganos se relaciona con una evidencia de daño histopatológico (Jarvis *et al.*, 2011) La Sociedad de Patología Toxicológica (STP, por sus siglas en inglés) recomienda que hígado y riñones, entre otros órganos, se deben pesar en todas las especies en estudios generales de toxicidad de entre 7 días y 1 año de duración, así como se debe incorporar el peso de órganos linfoides como el bazo a estudios de toxicidad realizados en roedores y con una duración superior a 7 días (Sellers *et al.*, 2007). El análisis estadístico de los valores obtenidos no revela diferencias significativas entre tratamientos para ninguno de los órganos.

Tabla IV.1. Valores medios, en porcentaje, que representan el peso del hígado, riñón y bazo de ratas en relación al peso corporal.

Tratamientos	Hígado	Riñón	Bazo
Control	6,271±0,5223	1,440±0,0846	0,565±0,0713
Mezcla	6,316±0,9503	1,428±0,1230	0,541±0,0632
Thymbra	6,243±0,7892	1,465±0,2741	0,553±0,0751
Zygis	6,156±0,5917	1,498±0,2274	0,563±0,0808

En la relación del hígado con el peso del animal, se puede ver que no existen diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos, cuyos valores oscilan entre 6,16% y 6,32%, aunque se ha visto que otros aditivos vegetales como el extracto acuoso de romero, pueden mejorar el metabolismo hepático e incrementar el peso del hígado en ratas (Debersac *et al.*, 2001). En el caso del riñón, aunque las diferencias observadas no son significativas, el porcentaje que éste representa respecto al peso del animal en el grupo Zygis es mayor al de los otros grupos, representando un 4% de aumento respecto al grupo Control. Del mismo modo, en el bazo no existen diferencias significativas entre los valores observados, aunque la variación más notable se observa en el grupo Mezcla con una disminución del 4,1% respecto al grupo Control. En la misma línea, la suplementación de la dieta con diferentes mezclas vegetales compuestas, entre otros, por orégano y tomillo, no mostraron ningún efecto sobre el peso de distintos órganos en aves (Hernández *et al.*, 2004). Ya que los animales tratados con aceites esenciales de plantas presentan un mayor incremento del peso corporal que los no tratados, estas pequeñas diferencias pueden estar relacionadas con el peso corporal y no con el tratamiento ensayado (Sellers *et al.*, 2007), descartando así un efecto desfavorable de estos compuestos.

IV.1.2 Análisis histológico intestinal.

En el momento del sacrificio, y tras 10 días de ensayo con una alimentación enriquecida con aceites esenciales, se retiran distintas porciones del intestino, delgado y grueso, de las ratas implicadas en el estudio. De las tres partes de intestino delgado -duodeno, yeyuno e íleon- se toma medida, mediante análisis de imagen, de la longitud de las vellosidades intestinales, la profundidad de las criptas de Lieberkühn y el grosor total de la mucosa. De la porción correspondiente al intestino grueso se toma medida únicamente del grosor de la mucosa intestinal en este tramo.

IV.1.2.1 Longitud de las vellosidades intestinales.

La medida de la longitud de las vellosidades, entendida como la distancia que existe entre el borde apical de las mismas y la base de unión con las criptas de Lieberkühn, nos permite valorar daños o modificaciones en la arquitectura del intestino provocadas por la alimentación ensayada, y que pueden suponer alteraciones en la absorción de nutrientes u otro tipo de trastornos.

El cambio de una alimentación líquida a sólida, la disminución del consumo y el estrés sufrido por los animales durante el destete produce alteraciones en la morfología intestinal (Pluske *et al.*, 1996). Las principales modificaciones que se observan en el intestino delgado de cerdos son una reducción de la altura de las vellosidades y un incremento de la profundidad de las criptas (Hedemann *et al.*, 2003). En ratas, sin embargo, es más acusado el aumento de la anchura de las vellosidades durante el destete (Cummins *et al.*, 1988; 2006), aunque una reducción abrupta del consumo de alimento conduce a una atrofia de la mucosa, incluidas las vellosidades intestinales (Papavramidis *et al.*, 2009). También situaciones de estrés pueden provocar en ratas un aumento de la apoptosis de las células de las criptas, que llevaría a un descenso inicial de su profundidad y a una posterior reducción de la longitud de las vellosidades (Boudry *et al.*, 2007).

Como se observa en la **Figura IV.5**, las vellosidades significativamente más largas las encontramos en la porción duodenal del intestino, con una longitud media de $487,22 \pm 71,923$ μm . Las vellosidades de yeyuno

($293,96 \pm 46,765 \mu\text{m}$) e íleon ($276,49 \pm 38,170 \mu\text{m}$) presentan una longitud similar, aunque ligeramente superiores en el yeyuno, excepto en el grupo Control, que ocurre al contrario. Estos resultados están en concordancia con las tendencias observadas por Hosoyamada y Sakai (2005) en ratas, en las cuales la longitud de las vellosidades intestinales va disminuyendo conforme se avanza por el intestino delgado.

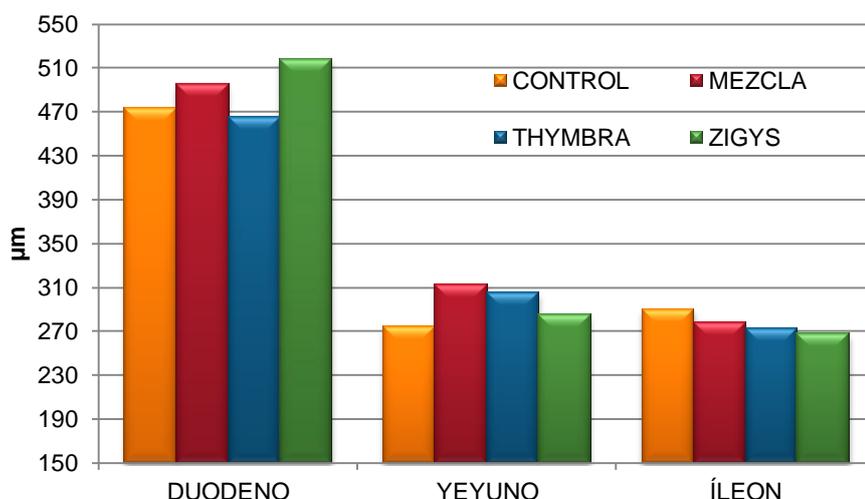


Figura IV.5. Longitud (μm) de las vellosidades del intestino delgado de ratas destetadas precozmente y alimentadas con aceites esenciales de plantas aromáticas.

Aunque el análisis ANOVA descarta la existencia de diferencias estadísticamente significativas para cualquiera de las secciones y tratamientos, en el análisis de cada una de las secciones por separado se observa que en el duodeno, el vello intestinal más largo se da en los animales alimentados con *Thymus zigys*, con una longitud media de $517,88 \pm 83,305 \mu\text{m}$, y el más corto en aquellos alimentados con *Thymbra capitata*, ($464,27 \pm 81,565 \mu\text{m}$). En la porción correspondiente al yeyuno, las vellosidades de los animales tratados con aceites esenciales presentan una mayor longitud que las vellosidades del grupo Control ($273,38 \pm 61,926 \mu\text{m}$), siendo el vello intestinal más largo el del grupo

tratado con la mezcla de aceites ($312,30 \pm 54,251 \mu\text{m}$). En el segmento final del intestino delgado el grupo Control muestra las vellosidades ligeramente mayores al resto de tratamientos. Aunque las propiedades antimicrobianas (Reichling *et al.*, 2009; Bassolé y Juliani, 2012) y antioxidantes (Miguel, 2010; Viuda-Martos *et al.*, 2010) de los aceites esenciales de plantas aromático-medicinales, y de algunos de sus componentes como carvacrol y timol, son de sobra conocidas, los efectos de estos sobre la morfología intestinal aún no están del todo claros. De acuerdo con nuestros resultados, tras la infección experimental con *Eimeri tenella*, la suplementación de la dieta de pollos con aceite esencial de orégano tampoco mostró diferencias significativas en la altura de las vellosidades intestinales, respecto a un control negativo y una dieta con antibióticos (Silva *et al.*, 2009). En contraposición, los experimentos realizados por Bona *et al.* (2012) con pollos de carne reflejan que la adición a la dieta de compuestos vegetales con presencia de carvacrol aumenta las vellosidades intestinales en duodeno e íleon, en comparación con una dieta sin suplementar y otra con antibióticos. En general, después de dieciséis días desde el destete, se observa una gran similitud en la altura de las vellosidades de todos los grupos, descartando así una atrofia de las mismas debida a la suplementación con aceites esenciales, lo cual reduciría la capacidad absorbente del intestino produciendo una eventual pérdida de peso (Dilworth *et al.*, 2012).

IV.1.2.2 Profundidad de las criptas de Lieberkühn.

Con el fin de descartar daños producidos por los aceites esenciales, que se pueden manifestar en una hiperplasia o hipertrofia de las criptas, se controlan las glándulas o criptas intestinales midiendo la distancia desde el punto de unión entre éstas y la vellosidad intestinal hasta la base misma de la glándula.

En la **Figura IV.6** se observa que en el duodeno se encuentran aquellas glándulas significativamente más profundas ($196,61 \pm 28,787 \mu\text{m}$), seguidas de las de íleon ($145,23 \pm 16,307 \mu\text{m}$) y las de yeyuno ($128,46 \pm 16,613 \mu\text{m}$). No obstante, en el grupo de animales alimentados con pienso control las criptas en duodeno presentan una profundidad similar a las del íleon.

Estudios *in vitro* han mostrado que compuestos como timol y carvacrol se degradan principalmente en los segmentos más distales del intestino, sin embargo, en pruebas *in vivo* sobre el tracto gastrointestinal de lechones los aceites esenciales que contienen estos compuestos se absorben principalmente en el estómago y en las secciones proximales del intestino (Michiels *et al.*, 2008). En nuestro estudio, los cambios más significativos en la profundidad de las criptas los observamos en el duodeno y el íleon, lo que hace pensar que los aceites esenciales utilizados en la alimentación alcanzan el segmento final del intestino delgado de ratas, produciendo así un efecto sobre la mucosa intestinal.

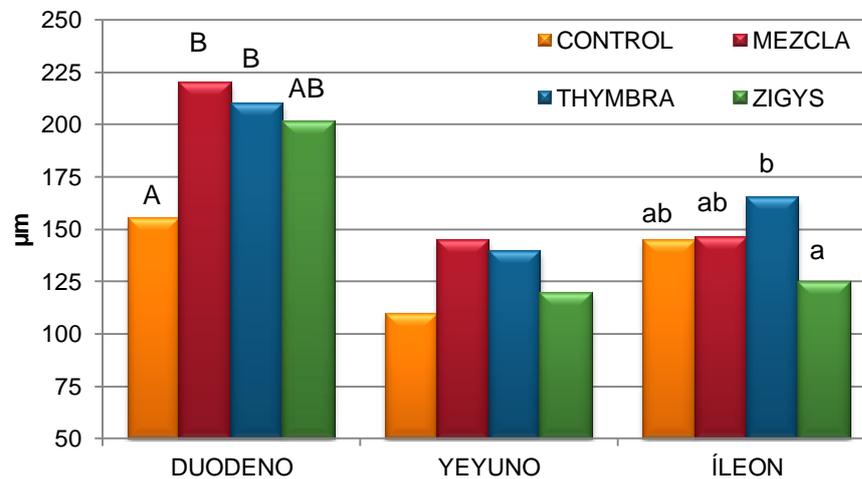
El análisis de cada una de las secciones por separado muestra que en el segmento duodenal, las glándulas de los grupos Thymbra y Mezcla son, con una longitud media de $209,80 \pm 38,133 \mu\text{m}$ y $220,02 \pm 30,647 \mu\text{m}$, respectivamente, significativamente mayores a las criptas del tratamiento Control ($154,92 \pm 31,832 \mu\text{m}$), siendo, en general, las criptas de los animales alimentados con aceites esenciales un 35,9% mayores a las de los animales del grupo Control.

En yeyuno, aunque el análisis ANOVA no señala diferencias estadísticas, el valor de probabilidad obtenido de 0,0688, muestra una fuerte tendencia entre grupos, siendo las criptas de los animales alimentados con aceites esenciales mayores a las glándulas del grupo Control; especialmente las del grupo Mezcla, las cuales muestran una diferencia del 32,2 % respecto a éste.

En la porción final del intestino, las glándulas más profundas se encuentran en el grupo Thymbra, con una longitud media de $164,89 \pm 28,780 \mu\text{m}$, siendo mayores estadísticamente a las encontradas en el grupo Zigys ($124,98 \pm 20,930 \mu\text{m}$).

El aceite esencial de orégano rico en carvacrol, junto a otros compuestos vegetales, parece aumentar también la profundidad de las criptas en algunos segmentos del intestino de pollos de carne (Bona *et al.*, 2012). También Hanczakowska y Swiatkiewicz (2012) observaron que una mezcla de extractos vegetales en la dieta de lechones después del destete aumenta la profundidad

de las criptas intestinales respecto a una dieta control y una suplementación con ácidos orgánicos.



Distintas letras en minúscula indican diferencias significativas ($p < 0,05$).
 Distintas letras en mayúscula indican diferencias significativas ($p < 0,01$).

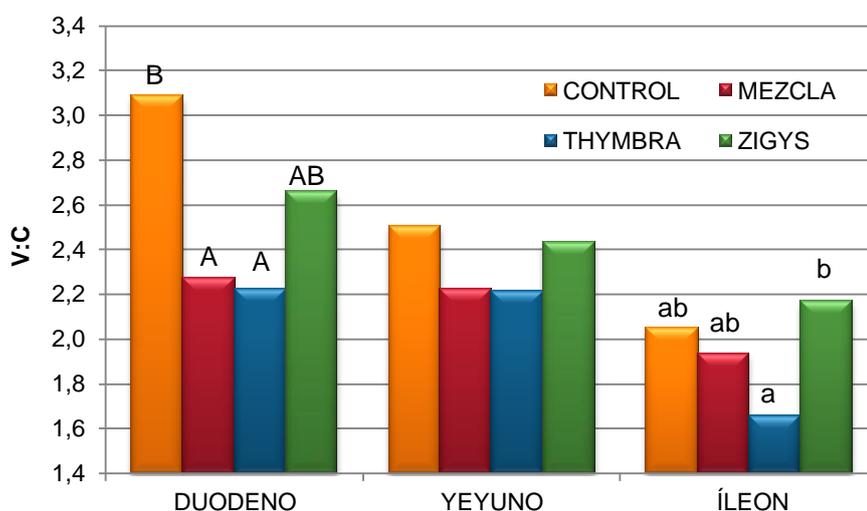
Figura IV.6. Profundidad (μm) de las criptas de Lieberkühn del intestino delgado de ratas destetadas precozmente y alimentas con aceites esenciales de plantas aromáticas.

Algunos autores relacionan el incremento en la profundidad de las criptas intestinales con un aumento de la proliferación celular en las mismas (Troncone *et al.*, 1994; Pluske *et al.*, 1996). Experimentos llevados a cabo en ratas para comprobar la adaptación del intestino tras un daño, muestran que los cambios morfológicos que se producen incluyen un incremento en la profundidad de las criptas, un posterior aumento de la longitud y anchura de las vellosidades, y un aumento de la proliferación celular en las criptas (O'connor *et al.*, 1999). Por ello, Domeneghini *et al.* (2006) sugieren en su revisión, que aditivos con capacidad para aumentar la proliferación celular, como la L-glutamina, poseen una facultad potencial para restaurar la mucosa tras los daños producidos en el destete.

IV.1.2.3 Relación entre la longitud de las vellosidades y la profundidad de las criptas.

La relación que se encuentra entre la longitud de las vellosidades intestinales y la profundidad de sus criptas (V/C) es utilizada por muchos autores como un índice para medir alteraciones estructurales en la mucosa intestinal (Spreeuwenberg *et al.*, 2001; Awad *et al.*, 2009; Shebab, 2013).

Entre las distintas partes del intestino delgado, el duodeno muestra la relación entre vellosidades y criptas más elevada ($2,56 \pm 0,40$). Este índice es menor conforme avanzamos en el intestino, siendo de $2,34 \pm 0,147$ en yeyuno y de $1,95 \pm 0,219$ en íleon (**Figura IV.7**).



Distintas letras en minúscula indican diferencias significativas ($p < 0,05$).
Distintas letras en mayúscula indican diferencias significativas ($p < 0,01$).

Figura IV.7. Relación entre la altura de las vellosidades y la profundidad de las criptas intestinales.

También se observa la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre las distintas alimentaciones ensayadas, en duodeno ($p < 0,01$) e íleon ($p < 0,05$), donde el incremento significativo de la profundidad de las

criptas y el mantenimiento en la longitud de las vellosidades conduce a un descenso del índice V/C.

En la porción duodenal del intestino esta relación V/C es significativamente mayor en el grupo Control ($3,08 \pm 0,330$) respecto a los animales tratados con mezcla de aceites esenciales ($2,27 \pm 0,251$) y con *Thymbra capitata* ($2,22 \pm 0,185$), debido principalmente a la diferencia en la profundidad de sus criptas intestinales.

La relación entre grupos es similar en yeyuno, donde los tratamientos Control y *Zigys* presentan una relación V/C en torno a 2,46 mientras que la alimentación Mezcla y *Thymbra* se sitúan por debajo de este valor (2,22). Las diferencias observadas, sin embargo, no son estadísticamente significativas en este segmento del intestino delgado.

En íleon, el índice más alto se encuentra en los animales tratados con *Thymus zigys*, con un valor medio de $2,17 \pm 0,299$, siendo estadísticamente distinto del grupo *Thymbra* que presenta una relación entre vellosidades y criptas de $1,66 \pm 0,189$. En esta porción del intestino el aceite rico en timol muestra un índice V/C mayor al del control, aunque sin diferencias estadísticamente significativas.

Algunos autores señalan que un incremento en la profundidad de las criptas se asocia con un incremento en el índice de producción de células de las criptas (CCPR, de sus siglas en inglés) (Domeneghini *et al.*, 2006), que asociado a una disminución en la altura de la vellosidad debida a un daño, puede llevar a un aumento de la velocidad de la migración de enterocitos para compensar la pérdida de altura, dando menor tiempo a estas células para madurar y expresar su capacidad de transporte, obteniendo como resultado una absorción de nutrientes deficiente (Thomson *et al.*, 1994). En este sentido, Xu *et al.* (2003) observan que un aumento de la profundidad de las criptas acompañado de una disminución de la longitud de las vellosidades puede desembocar en una incorrecta absorción de nutrientes y en un descenso en el rendimiento de los animales.

Por otro lado, otros autores asocian el aumento del índice V/C debido a un incremento en la altura de la vellosidad, con un beneficio en la absorción de nutrientes y con el mantenimiento de la integridad de la barrera epitelial (Yang *et al.*, 2009). En este sentido, según nuestros resultados, aunque en las ratas alimentadas con *Thymbra capitata* se observa en duodeno e íleon el menor índice V/C debido a una mayor profundidad de las criptas, el mantenimiento de la longitud de las vellosidades y el mayor incremento de peso, sugieren una mayor eficiencia en la absorción de nutrientes que puede ser debida tanto a la morfología intestinal como a otros factores implicados. De forma similar ocurre con el tratamiento con mezcla de aceites, cuyo incremento de peso es semejante al de los animales del grupo *Thymbra*, aunque su efecto más significativo se produce sobre el crecimiento morfológico de la parte proximal del intestino delgado. Sería interesante además, determinar si este aumento de la profundidad de las criptas puede estar asociado con un aumento posterior de la altura de las vellosidades en estudios más prolongados en el tiempo. Los resultados de nuestro estudio contrastan con los encontrados por Michiels *et al.* (2010), que observan que la suplementación de la dieta de cerdos recién destetados con distintas formulaciones de carvacrol y timol durante doce días produce un aumento en el índice V/C respecto a un control.

En contraposición a ello, los resultados de Reisinger *et al.* (2011) muestran que la suplementación con aceites esenciales ricos en carvacrol producen un incremento de la profundidad de las criptas del yeyuno de aves de engorde, exponiendo que este efecto no se asocia con una aceleración del índice de migración celular de las criptas hacia la vellosidad, permitiendo, por tanto, una correcta diferenciación celular. Además, se ha observado que la alimentación con aditivos vegetales que contienen carvacrol produce un aumento del número de las células caliciformes, una modulación de la composición de la mucina intestinal y un aumento de la secreción mucosa (Jamroz *et al.*, 2006; Reisinger *et al.*, 2011; Tsirtsikos *et al.*, 2012). Estos aditivos con carvacrol pueden ejercer un papel protector del intestino, ya que este incremento de la mucosidad impide la adhesión de bacterias al epitelio intestinal (Jamroz *et al.*, 2005). De acuerdo con Amit-Romach *et al.* (2009), el descenso de la producción de sustancias mucosas, que constituye la primera línea de defensa del intestino, favorece las

condiciones de adhesión y proliferación de bacterias potencialmente patógenas en detrimento de bacterias beneficiosas.

En resumen, los grupos Mezcla y Thymbra muestran un índice un 26-28% menor que el Control en el duodeno, mientras que el grupo Zigys disminuye la relación V/C en torno a un 14% respecto al Control. En yeyuno, los tratamientos Mezcla y Thymbra presentan una diferencia con el Control en el índice V/C de alrededor del 11,5%, y el grupo Zigys muestra valores similares a este tan solo un 3% menores. En el segmento final del intestino, comparando con el tratamiento Control, el grupo Mezcla disminuye un 6% el índice y el grupo Thymbra un 19%, mientras que la relación V/C del tratamiento Zigys es un 6% mayor a la del Control.

IV.1.2.4 Grosor de la mucosa.

El grosor de la mucosa intestinal se mide desde el borde interior de la mucosa hasta la *Muscularis mucosae*, tanto en los tres segmentos del intestino delgado como en el intestino grueso.

En el intestino delgado la mucosa se presenta más engrosada en el duodeno ($713,20 \pm 26,297 \mu\text{m}$) que en el resto de secciones, resultado de una mayor longitud de las vellosidades y profundidad de las criptas. Yeyuno e íleon muestran un grosor semejante de sus mucosas, con un $438,06 \pm 29,135 \mu\text{m}$ y $436,02 \pm 25,873 \mu\text{m}$ de longitud, respectivamente.

En la **Figura IV.8** se observa que, en duodeno, los grupos Mezcla ($736,45 \pm 39,278$) y Zigys ($735,27 \pm 103,545$) muestran una mucosa más gruesa que los tratamientos Control ($687,38 \pm 129,610$) y Thymbra ($693,69 \pm 115,155$), aunque las diferencias existentes no son significativas estadísticamente. La mucosa del yeyuno se presenta más gruesa en los animales tratados con mezcla de aceites esenciales ($470,74 \pm 85,679$), mientras que aquella con menor grosor se observa en los animales alimentados con pienso Control ($406,48 \pm 87,938$). En el íleon, sin embargo, la mucosa menos engrosada se encuentra en las ratas alimentadas con *Thymus zigys* ($399,36 \pm 38,264$). Pese a las diferencias observadas, el análisis ANOVA no revela una significación

estadística de las mismas para ninguno de los tramos del intestino delgado. Tras un daño en la mucosa, producido por diversos motivos, el mecanismo de recuperación incluye un proceso inflamatorio que llevaría a un engrosamiento de la misma (Blikslager *et al.*, 2007), lo que sugiere, según nuestros resultados, que los compuestos ensayados no producen un daño en la mucosa. Incluso se ha demostrado de forma *in vitro* un fuerte efecto beneficioso de aceites esenciales compuestos por carvacrol y timol sobre la inhibición de la producción de mediadores inflamatorios (Loizzo *et al.*, 2009; Menichini *et al.*, 2009), así como el efecto antiinflamatorio de carvacrol (Guimarães *et al.*, 2012) y de timol (Riella *et al.*, 2012) sobre roedores.

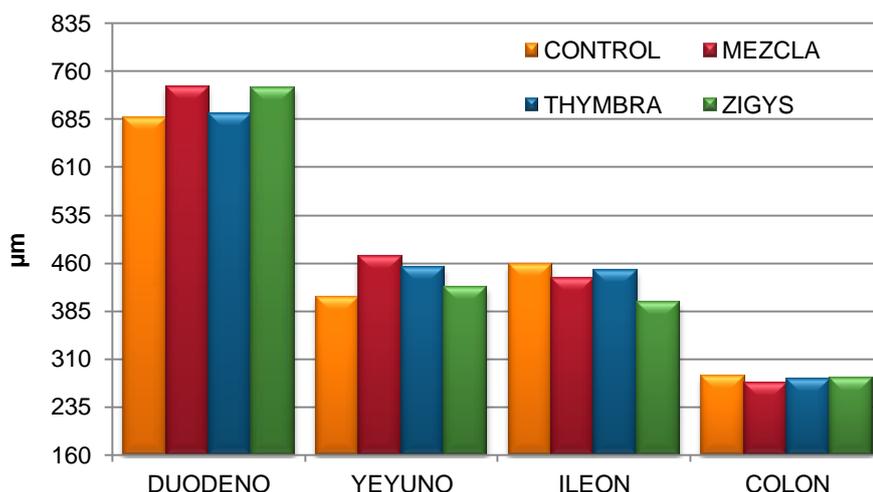


Figura IV.8. Grosor de la mucosa de las distintas secciones del intestino delgado y grueso de ratas destetadas precozmente y alimentadas con aceites esenciales de plantas aromático-medicinales.

Los ensayos llevados a cabo por Falchini-Queiroz *et al.* (2012) con aceite esencial de *Thymus vulgaris* y sus componentes aislados carvacrol y timol, después de descartar su citotoxicidad *in vitro*, indican que las tres sustancias inhiben el edema inflamatorio de forma significativa, pero solo el aceite esencial y el carvacrol ejercen además un efecto inhibitorio en la migración de leucocitos

en una zona dañada. Sus datos sugieren que el carvacrol puede actuar como inhibidor de ciertos mediadores inflamatorios que no se relacionan con el mecanismo de acción del timol. El carvacrol, como compuesto mayoritario en el aceite de *Thymus vulgaris* quimiotipo carvacrol, parece ser, según estos autores, el responsable de su efecto antiinflamatorio. Por otro lado, el timol administrado en la dieta de lechones tras el destete parece disminuir los linfocitos intraepiteliales de la mucosa del intestino delgado (Michiels *et al.*, 2010), los cuales se ven incrementados en estados patológicos intestinales como la enfermedad celiaca (Chang *et al.*, 2005) u otras enfermedades asociadas a la inflamación intestinal (Hayday *et al.*, 2001).

En el intestino grueso, el grosor de la mucosa, medida a la altura del colon ascendente, presenta unos valores similares en todos los tratamientos, aunque es ligeramente superior en el grupo Control (283,39±29,247) que en los grupos con aceites esenciales, siendo el menor de ellos el tratamiento Mezcla (272,26±33,232). El análisis estadístico no muestra diferencias entre los cuatro tipos de alimentación ensayados.

Por tanto, los aceites esenciales ricos en carvacrol y timol, mediante distintos mecanismos de acción, parecen poseer un marcado efecto antiinflamatorio.

IV.2 EFECTO DEL ACEITE ESENCIAL SOBRE LA PRODUCCIÓN DE CERDOS DESTETADOS PRECOZMENTE

IV.2.1 Parámetros productivos y fisiológicos.

El estado general de salud de los animales es bueno durante todo el experimento, sin mostrar anormalidades clínicas que hicieran necesario el tratamiento con medicamentos. Durante los días nueve y diez después del destete, se observan heces blandas en dos animales dentro de los grupos Control, Mezcla y Thymbra, no observándose, sin embargo, ningún caso en el grupo Zygis. Pasados estos dos días, el aspecto de las heces vuelve a la normalidad. Esta alteración en la consistencia de las excreciones coincide con la introducción en la alimentación del 25% del pienso “Starter” completo para lechones, tras ofrecer exclusivamente a los animales, durante la primera semana de transición, un pienso de leche suplementado con zinc. En ningún caso se relaciona la aparición de heces más blandas con la introducción de aceites esenciales a la alimentación, puesto que también se observan en el grupo Control con diformiato de potasio, y están ausentes en los animales alimentados con aceite esencial de *Thymus zygis*. De acuerdo con van Beers-Schreurs *et al.* (1998), los lechones tienen la capacidad de absorber en el intestino grueso electrolitos y ácidos grasos volátiles inmediatamente tras el destete, pero es necesario un periodo de adaptación para la absorción óptima de agua, que se alcanza aproximadamente a las dos semanas, por lo que los animales en esta etapa se vuelven más vulnerables a la pérdida de fluidos del intestino ante cualquier cambio en la alimentación o infección microbiana.

La capacidad promotora del crecimiento de los aceites esenciales elegidos para este ensayo se compara con un control positivo suplementado con un producto comercial de diformiato de potasio (Formi®). Este producto, aprobado por la Comisión Europea como el primer promotor del crecimiento no antibiótico en animales no rumiantes, ha demostrado su capacidad para aumentar la ganancia de peso hasta en un 14%, incrementar la ingesta de alimento y mejorar el índice de conversión (Chowdhury *et al.*, 2008).

Los efectos de los aceites esenciales de plantas aromático-medicinales en la dieta de cerdos destetados a los 21 días de edad, durante la etapa de transición al cebo, se miden sobre el consumo medio diario de alimento (CMD), la ganancia media diaria de peso (GMD), el índice de conversión de alimento (IC) y el porcentaje que representan hígado, riñón y bazo respecto al peso total del animal.

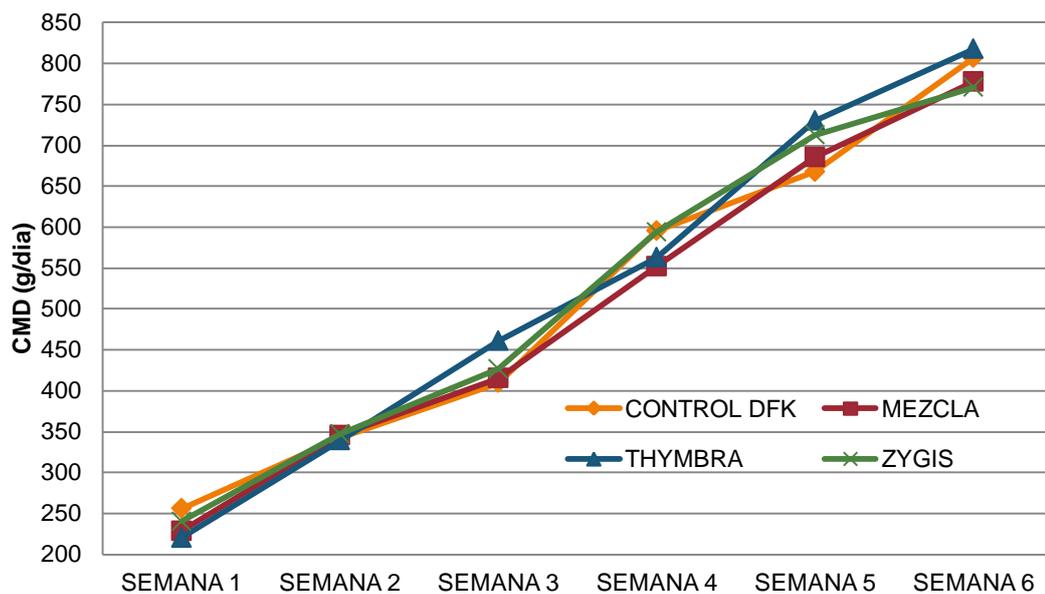


Figura IV.9. Consumo medio diario de pienso (g/día) de cerdos destetados a los 21 días y alimentados con aceites esenciales de plantas aromáticas.

Atendiendo a los consumos medios diarios calculados semanalmente se observa en la **Figura IV.9** que, en general, todos los grupos siguen la misma tendencia al comienzo del estudio. En la primera semana de ensayo los consumos oscilan entre los 256,14 g/día del grupo Contro-DFK y los 220,20 g/día del grupo Thymbra. En la segunda semana se equiparan los consumos de todos los grupos observándose un valor medio de $343,55 \pm 3,45$ g/día y un aumento del consumo alrededor del 45,4% respecto a la primera semana.

La tercera semana, momento que coincide con la introducción del 100% del pienso enriquecido con ácidos orgánicos y aceites esenciales, se produce un descenso en el incremento del CMD de todos los grupos (valor medio $417,21 \pm 8,53$ g/día), excepto en los animales tratados con aceite de *Thymbra capitata*, cuyo consumo asciende a 461,01 g/día. Algunos autores señalaron un rechazo a compuestos de marcado sabor amargo, como el timol, cuando era incluido en la dieta de cerdos a concentraciones similares a las usadas en nuestro experimento (Michiels *et al.*, 2012), por lo que el alimento se introdujo de forma gradual para evitar un descenso brusco de la ingesta. Sin embargo, la disminución del consumo observada en esta semana no parece deberse al rechazo de los aceites esenciales, ya que también se observa en los animales alimentados con diformiato de potasio, compuesto de olor neutro o inodoro (Mroz, 2005; Eidelsburger *et al.*, 2007), mientras que la ingesta de pienso con aceite esencial rico en carvacrol no sufre este descenso. No obstante, el consumo de alimento de este grupo aumenta en menor medida en la cuarta semana, en torno a un 22,13%, siendo inferior al de los tratamientos Control-DFK y Zygis y ligeramente superior al Mezcla, aumentando estos tres grupos una media de 39,12% respecto a la semana precedente.

En la quinta semana de tratamiento el consumo de alimento de los animales del grupo Control-DFK frena su aumento (12,1%), siendo el CMD de este grupo inferior al resto de grupos que aumentan un 24,55%. También en la sexta y última semana de ensayo es el grupo Thymbra el que presenta los consumos más elevados, con 817,83 g/día, seguido del grupo Control-DFK, mientras que los grupos Mezcla y Zygis muestran ingestas inferiores y similares entre ellos con un valor medio de 774,3 g/día.

Ensayos realizados sobre cerdos recién destetados a los que se les administra una mezcla comercial de aceites esenciales con un contenido de 0,018 g/kg de timol y cinamaldehído, muestran un ligero aumento de la ingesta de alimento en los primeros días después del destete, aunque este incremento se hace menos evidente conforme los animales crecen, siendo los consumos similares a los de un control sin suplementar e inferiores a los de un control positivo suplementado con antibióticos (Li *et al.*, 2012a). Otros ensayos

muestran cómo el mismo compuesto, con dos concentraciones distintas (0,018 g/kg y 0,027 g/kg de timol y cinamaldehído), consigue aumentar significativamente la ingesta de pienso, respecto a un control sin suplementar, en lechones destetados precozmente (Li *et al.*, 2012b). En contraposición a esto, otros autores observan una baja ingesta de alimento junto a una escasa ganancia de peso en lechones destetados precozmente y alimentados con una mezcla de aceites esenciales de orégano, naranja, anís y achicoria (Ahmed *et al.*, 2013), mientras que los ensayos de Jugl-Chizzola *et al.* (2006) revelan una menor preferencia de los cerdos en la fase de destete por el alimento enriquecido con tomillo y orégano frente a un pienso sin suplementar. Estos resultados contrastan con los nuestros, ya que en el tiempo total de experimentación todos los grupos han tenido un consumo medio diario de alimento similar, en torno a 512,71 g/d, siendo el grupo con menor consumo el de los cerdos alimentados con la mezcla de aceites (500,76 g/d) y el de mayor consumo el grupo Thymbra (521,95 g/d). Teniendo en cuenta que el diformiato potásico solo es rechazado por los animales cuando se incluye en la dieta a concentraciones muy elevadas (por encima del 10%) (European Commission, 2002; European Food Safety Authority EFSA, 2009), y que a niveles menores o iguales a 1,8% puede mantener o mejorar entre un 7% y un 9% el consumo de alimento respecto a un control sin suplementar (Paulicks *et al.*, 2000; Canibe *et al.*, 2001; Eidelsburger *et al.*, 2007), consideramos que no se ha producido un rechazo de los aceites esenciales por parte de los animales ya que los consumos medios son equiparables a los del control positivo.

En cuanto a la ganancia de peso, los animales alcanzan al final del ensayo un peso medio de 17,80±1,585 kg para el grupo Control-DFK, de 19,12±2,007 kg para el grupo Mezcla, de 19,42±2,905 kg para el grupo Thymbra y de 19,68±2,118 kg para el grupo Zygis. Observando la evolución de la ganancia media diaria de peso el análisis estadístico revela diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos. En la **Figura IV.10** se observa que la primera semana los valores oscilan entre los 159,70±39,81 g/día de ganancia del grupo Zygis y los 187,54±57,90 g/día del grupo Thymbra.

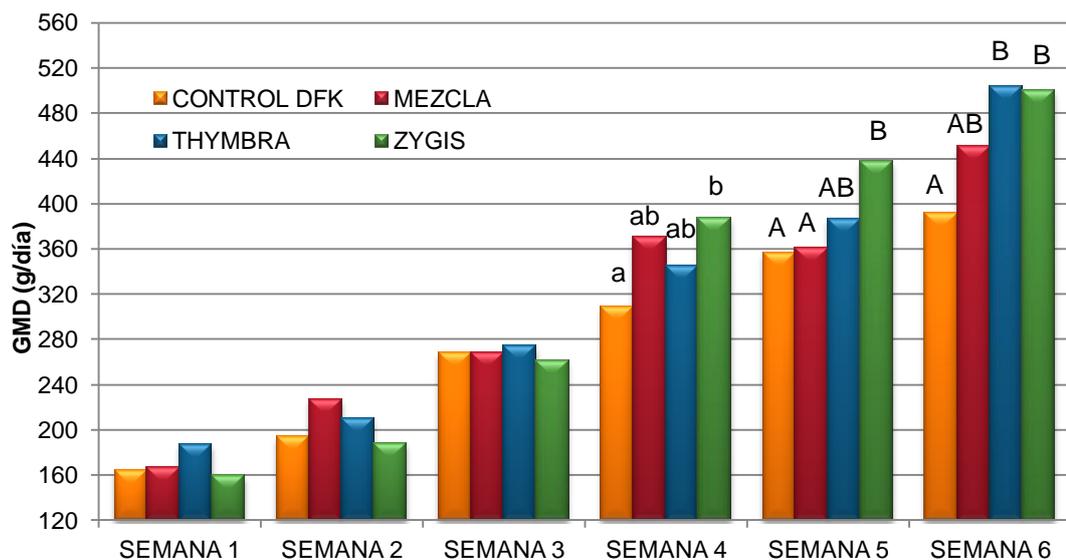
Transcurrida una semana, la ganancia de peso más baja se vuelve a registrar en el grupo Zygis, seguida del grupo Control-DFK, mientras que el valor más alto se observa en el grupo Mezcla, con un aumento de peso del 17,3% respecto al Control.

En la tercera semana las diferencias entre grupos disminuyen, observándose un valor medio de GMD de $268,44 \pm 5,28$ g/día. En este tramo del ensayo el análisis estadístico no muestra diferencias significativas entre los tratamientos.

Es a partir de la cuarta semana cuando las diferencias se hacen notables, debido a un aumento de la ganancia de peso respecto a la semana anterior en los grupos alimentados con aceites esenciales. El ascenso más importante se produce en los animales del grupo Zygis, cuya diferencia del 26% respecto al Control-DFK en esta semana es estadísticamente significativa ($p < 0,05$).

En la quinta semana de ensayo, el aumento general en la ganancia de peso es más moderado que en la semana anterior, llegando a descender incluso en el grupo Mezcla. Los animales alimentados con el pienso Control-DFK, que siguen presentando la ganancia de peso más baja, son junto al grupo Mezcla los que presentan diferencias estadísticamente significativas con el grupo Zygis ($p < 0,01$), cuya GMD es un 22,8% mayor a la del Control.

En la última semana de tratamiento, los animales del grupo Thymbra aumentan un 30,34% su ganancia de peso respecto a la semana anterior, mostrando valores de GMD semejantes a los obtenidos por el grupo Zygis en esta semana, con un valor promedio entre los dos de 502,47 g/día. La ganancia media diaria de peso de estos dos grupos supone en esta semana un aumento del 28,5% respecto al Control-DFK, siendo esta diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,01$). El valor del grupo Mezcla, debido a un aumento del 24,7% en la ganancia de peso respecto a la semana precedente, termina siendo un 15,2% mayor al del Control-DFK, pero sin presentar diferencias significativas estadísticamente.



Distintas letras en minúscula indican diferencias significativas ($p < 0,05$).
 Distintas letras en mayúscula indican diferencias significativas ($p < 0,01$).

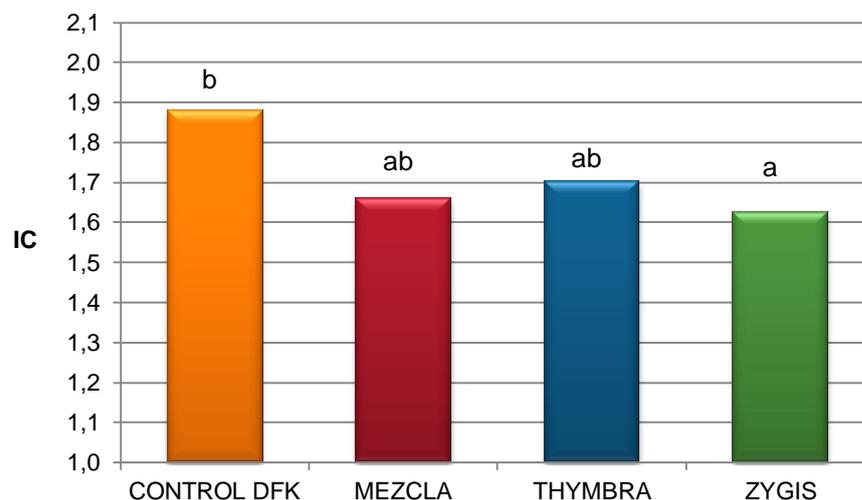
Figura IV.10. Ganancia media diaria de peso (g/día) de cerdos destetados precozmente y alimentados con aceites esenciales de plantas aromáticas.

En líneas generales, se observa que a partir de la cuarta semana los tres grupos alimentados con aceites esenciales presentan un valor de ganancia media diaria superior al grupo control con ácidos orgánicos. De acuerdo con estos resultados, Sads y Bilkei (2003) observaron un aumento significativo de la ganancia de peso en cerdos alimentados con un suplemento de aceite esencial de orégano, rico en carvacrol y timol, durante las cuatro últimas semanas de la fase de transición, frente a grupos sin este suplemento. En otros ensayos con aceite esencial de orégano con un 65% de carvacrol también se observa un aumento de la ganancia diaria de peso y un descenso de la incidencia de diarrea, aunque en ambos casos las diferencias no son significativas (Marcin *et al.*, 2006). Incluso, la suplementación de la dieta de cerdas durante el embarazo y la lactancia con una mezcla a baja concentración de carvacrol, cinamaldehído y oleoresina de pimiento tiene un efecto beneficioso sobre la supervivencia y la tasa de crecimiento de los lechones durante la etapa de lactación (Matysiak *et al.*, 2012). También el diformiato potásico, utilizado como control positivo en

este ensayo, ha mostrado su eficacia para mejorar significativamente la GMD, respecto a un control sin suplementar, durante el periodo posdestete, encontrando las mayores diferencias en las tres o cuatro últimas semanas de la etapa de transición (Kluge *et al.*, 2006; Htoo y Molares, 2012). Estos autores, sin embargo, suplementan la dieta con un 1,2% de este compuesto, frente al 0,16% usado en nuestro ensayo. Por tanto, con el mismo porcentaje de suplementación (0,16%), los aceites esenciales son mejores promotores del crecimiento de cerdos en la fase posterior al destete, destacando en esta tarea el aceite esencial de *Thymus zygis*.

Si se tiene en cuenta la cantidad total de alimento consumido por cada animal y el peso incrementado en todo el periodo de transición obtenemos los valores del índice de conversión de alimento (IC), que ponen de manifiesto una mejor eficiencia en la conversión del pienso de los grupos alimentados con aceites esenciales, con un valor medio de 1,66. En la **Figura IV.11** se observa que la mayor diferencia, y estadísticamente significativa ($p < 0,05$), se da entre el grupo Control-DFK y el grupo Zygis, representando éste un descenso del 13,4%, diferencias que obedecen claramente a la mejora significativa del crecimiento observada en los animales alimentados con aceite esencial rico en timol. Mueller *et al.* (2012) también encuentran el mejor índice de conversión en cerdos alimentados con aceite esencial de tomillo (40,2% de timol) respecto a un control sin suplementar, aunque las diferencias encontradas en este caso no son significativas. Del mismo modo, los ensayos de Li *et al.* (2012a), aunque no muestran diferencias significativas en cuanto al IC, muestran una ligera mejora del mismo en cerdos alimentados con una mezcla comercial de AE con timol y cinamaldehído, respecto a un control positivo suplementado con antibióticos promotores del crecimiento, debido a un consumo más moderado de alimento y una ganancia de peso similar. En nuestro caso, se suplementa el alimento con 1,048 g de timol/kg y 1,1664 g de carvacrol/kg (y la mezcla a partes iguales de los dos aceites esenciales en el grupo mezcla), cantidad superior a los 0,15 g de timol/kg ofrecidos en el experimento llevado a cabo por Mueller *et al.* (2012) y los 0,018 g/kg de timol y cinamaldehído usados en los ensayos de Li *et al.* (2012a), aumento que parece ser suficiente para ampliar las diferencias de este índice del rendimiento productivo de los animales respecto a un control

suplementado, en nuestro caso, con diformiato de potasio. El diformiato potásico ha mostrado también en diversas ocasiones su capacidad promotora del crecimiento en cerdos, mejorando el peso final de los animales, la ganancia media diaria de peso y el índice de conversión de alimento respecto a un control (Poeikhampha y Bunchasak, 2011; Htoo y Molares, 2012), aunque algunos autores no encontraron diferencias en ninguno de estos parámetros cuando se comparaban con un control sin suplementar (Canibe *et al.*, 2001). En nuestro estudio, los aceites esenciales de plantas aromático-medicinales utilizados consiguen un mejor rendimiento de los animales que la suplementación con diformiato de potasio. No obstante, otros ensayos realizados en cerdos con mezcla de aceites esenciales ricos en limoneno, eugenol y pineno frente a un grupo control no muestran diferencias en el índice de conversión, siendo ligeramente superior esta cifra en los animales alimentados con los aceites esenciales (Janczyk *et al.*, 2009), así como Muhl y Liebert (2007) no observaron diferencias significativas en los parámetros de rendimiento productivo de cerdos destetados precozmente y suplementados con una mezcla de aditivos vegetales con timol y carvacrol.



Distintas letras en minúscula indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Figura IV.11. Índice de conversión (IC) de alimento de cerdos alimentados con ácidos orgánicos y aceites esenciales de PAM.

La mejora en el rendimiento de los animales al ser alimentados con aceites esenciales de plantas aromáticas puede deberse, según exponen Yan *et al.* (2010), a un incremento de la digestibilidad de la materia seca, el nitrógeno y la energía, hecho que estos autores observan en las primeras seis semanas de la fase de crecimiento de cerdos alimentados con una mezcla comercial de aceites esenciales de tomillo, romero y orégano. Este incremento significativo de la digestibilidad de la materia seca y la proteína cruda, y la consiguiente mejora en la absorción de nutrientes, también lo observan Zitterl-Eglseer *et al.* (2008) en cerdos en la fase de destete cuando se les administra un pienso enriquecido con una mezcla comercial de aceites esenciales con carvacrol y timol como principales componentes, encontrando un rendimiento equiparable al obtenido con antibióticos promotores del crecimiento. También los aceites esenciales y extractos de plantas pueden mejorar la respuesta inmune de los animales (Taranu *et al.*, 2012), lo que puede influir en el incremento del rendimiento productivo, como observan Li *et al.* (2012a) a través de distintos parámetros, como el incremento de la proliferación de linfocitos o el descenso de citoquinas. Asimismo, la microbiota intestinal también estimula la función del sistema inmune. La microbiota saprofita o comensal normal de la mucosa intestinal juega un papel importante en la protección del huésped mediante distintos mecanismos, por ejemplo, secretando sustancias antimicrobianas que inhiben el crecimiento de patógenos o compitiendo con ellos por nutrientes o sitios de unión en la mucosa (Cummings *et al.*, 2004). Los aceites esenciales podrían mejorar la microbiota intestinal a través del incremento del índice Lactobacillus:Enterobacteria (L:E) en el intestino delgado (Manzanilla *et al.*, 2004) y ciego Castillo *et al.* (2006) o la reducción de *E. coli* en intestino grueso (Li *et al.*, 2012a). Sin embargo, otros ensayos no encuentran un efecto consistente de los aceites esenciales sobre la microbiota intestinal (Muhl y Liebert, 2007). Generalmente se considera que una microbiota intestinal equilibrada es un requisito para un buen estado de salud, especialmente para el bienestar intestinal, el desarrollo y funcionamiento normal del sistema inmune y la prevención de infecciones por patógenos y diarreas (de Vrese y Offick, 2010). Sin embargo, en nuestro caso, los resultados en este sentido son contradictorios, ya que los animales con mayor rendimiento productivo y ausencia de diarrea (grupo Zygis) son los que presentan un menor índice

Lactobacillus:Enterobacteria, mientras que los animales del grupo Control-DFK presentan una buena relación entre estos dos grupos de bacterias (sin diferencias significativas con el resto) pero un peor índice de conversión y crecimiento de los animales.

También, al igual que se hace con las ratas, se estudia el peso de los órganos de detoxificación -hígado y riñón- y del bazo en relación al peso corporal del animal (**Tabla IV.2**), herramienta que los miembros de la Sociedad de Patología Toxicológica consideran de utilidad en estudios generales de toxicidad para caracterizar de forma inicial posibles efectos de los compuestos ensayados (Michael *et al.*, 2007). Como señalan Amna *et al.* (2013) en estudios de toxicidad oral sub-aguda de un extracto etanólico vegetal, tanto hígado como riñón pueden servir como órgano diana de su efecto.

En primer lugar se observa el peso que representa el hígado respecto al total en cada uno de los grupos, obteniéndose valores entre el 2,6 % (Control-DFK) y el 2,4 % (Thymbra). Estos resultados descartan una hipertrofia provocada por los aceites esenciales, cuyas evidencias aparecen cuando el incremento del peso del hígado es igual o mayor al 20% (Amacher *et al.*, 2006). Sin embargo, como exponen Sellers *et al.* (2007) y Hall *et al.* (2012), la hipertrofia hepatocelular no tiene por qué ser necesariamente un cambio adverso o relacionado con el tratamiento sino un simple cambio adaptativo, siempre y cuando se descarte una alteración patológica clínica o histológica.

En cuanto al peso del riñón, se observa que en los lotes Control-DFK y Mezcla este órgano representa alrededor de un 0,55% respecto al peso corporal, y en los grupos Thymbra y Zygis este valor es más bajo, rondando el 0,52%. Algunos estudios de toxicidad encuentran una relación directa entre el aumento del peso del órgano y el aumento del daño renal (Nematbakhsh *et al.*, 2013), mientras que otros autores observan un descenso en el peso de órganos como hígado y riñón acompañada de una reducción del peso corporal (Adeneye *et al.*, 2010; Amna *et al.*, 2013), lo cual constituye un indicador de toxicidad después de una exposición a una sustancia tóxica (Teo *et al.*, 2002). En ensayos de toxicidad subcrónica de aceite esencial de *Ocimum gratissimum* se observa en ratas una relación entre el incremento de la dosis y el aumento del

peso medio de los órganos respecto a un control (Orafidiya *et al.*, 2004), por lo que en nuestro ensayo, las mínimas diferencias observadas entre tratamientos descartan un daño patológico o de toxicidad tanto en riñón como en hígado.

Tabla IV.2- Valores medios, en porcentaje, que representan el peso del hígado, riñón y bazo de cerdos en relación al peso corporal.

Tratamiento	Hígado	Riñón	Bazo
Control DFK	2,589±0,1433	0,545±0,0238	0,166±0,0121
Mezcla	2,553±0,2651	0,545±0,0555	0,181±0,0179
Thymbra	2,408±0,1701	0,519±0,0542	0,174±0,0177
Zygis	2,482±0,2766	0,516±0,0329	0,164±0,0213

El porcentaje que supone el bazo respecto al peso corporal es mayor en el grupo Mezcla (0,181%), seguido del grupo Thymbra (0,174%). En los lotes Control-DFK y Zygis se observa que el bazo de los animales es más pequeño, representando alrededor del 0,165% del peso corporal. Una dosis alta de sustancias con potencial alergénico o sensibilizador puede producir el paso de moléculas a través de la piel, que serán absorbidas por el sistema linfático o los capilares sanguíneos, produciendo un incremento en la proliferación de linfocitos en el bazo (Chipinda *et al.*, 2009). Estos linfocitos activados por la presencia de antígenos son sensibles a señales que conducen a la apoptosis o muerte celular, produciéndose un descenso del peso del bazo con el aumento de la dosis (Gao *et al.*, 2008; Fang *et al.*, 2010). Un descenso en el peso del bazo puede ser indicativo de la depresión del sistema inmune y reflejar una caída de la respuesta celular (Sangha *et al.*, 2011). Por otro lado, sustancias potencialmente tóxicas pueden producir un aumento en el peso de este órgano, debido posiblemente a la proliferación de tejido fibroso y la hiperplasia de los folículos linfáticos (Yamano *et al.*, 1998). Aunque el peso del bazo constituye un indicador sensible de inmunotoxicidad (estimulación o reducción inmune), se considera de valor limitado debido a la variabilidad entre animales, los efectos relacionados con el estrés y alteraciones fisiológicas no relacionadas con el tratamiento (Michael *et al.*, 2007). En nuestro estudio, aunque no existen

diferencias estadísticamente significativas, el valor p encontrado entre el lote Mezcla y el Zygis es bajo ($P=0,0595$).

A pesar de las diferencias observadas, el análisis ANOVA no muestra diferencias estadísticamente significativas para ninguno de los tres órganos, y puesto que los efectos tóxicos se manifiestan también por una disminución del peso corporal o mortalidad (Thanabhorn *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2012), se descarta, a priori, cualquier tipo de efecto de los aceites ensayados sobre estos órganos.

IV.2.2 Estudio del pH y microbiota intestinal.

IV.2.2.1 pH intestinal.

La función del intestino y su integridad frente a patógenos depende en gran parte del pH del mismo. El pH del sistema digestivo cambia desde la boca al intestino delgado, y las enzimas de cada una de esas áreas tienen un pH óptimo de funcionamiento que será importante alcanzar para una correcta digestión (Starr *et al.*, 2012). Por otro lado, la secreción de ácido clorhídrico por parte de las glándulas gástricas permite mantener un pH más ácido en el estómago. Éste, además de proteger al estómago de la colonización de una amplia variedad de microorganismos intolerantes al bajo pH, actúa como una barrera impidiendo el paso a organismos sensibles al ácido hacia el intestino delgado y grueso, encontrándose una correlación entre el aumento del pH y el incremento de la concentración bacteriana en el jugo gástrico (Wilson, 2005).

El uso de los ácidos orgánicos en alimentación comenzó por su utilidad para mejorar el crecimiento de los animales al destete, atribuyendo esta mejora a una bajada del pH gástrico y a la consiguiente modificación de la microbiota intestinal (Burnell *et al.*, 1988; Radecki *et al.*, 1988). Actualmente, existe aún cierta controversia en cuanto al papel acidificante de los ácidos orgánicos sobre el contenido gastrointestinal. Sin embargo, la mayoría de estas sustancias son capaces de disminuir tanto el pH del alimento suplementado como el pH gástrico, ejerciendo un efecto más difuso sobre el resto del tracto gastrointestinal (Kil *et al.*, 2011), aunque algunos autores han observado su acción solo sobre el intestino grueso (Bosi *et al.*, 2007). Por ello, se compara el poder de disminución del pH a lo largo del tracto gastrointestinal del diformiato de potasio (Formi®), aprobado por la Comisión Europea como aditivo para la alimentación animal (Reglamento (CE) N° 184/2007), con el de los aceites esenciales de plantas aromático-medicinales ensayados. Los ácidos orgánicos pueden modular la microbiota intestinal disminuyendo la carga de bacterias potencialmente patógenas (Li *et al.*, 2008), lo que para Tsioloyiannis *et al.* (2001) se traduce en una menor competencia bacteriana por los nutrientes, que junto a un incremento de la actividad enzimática debido a la reducción del pH gástrico,

mejora los parámetros productivos de los cerdos durante la fase posterior al destete.

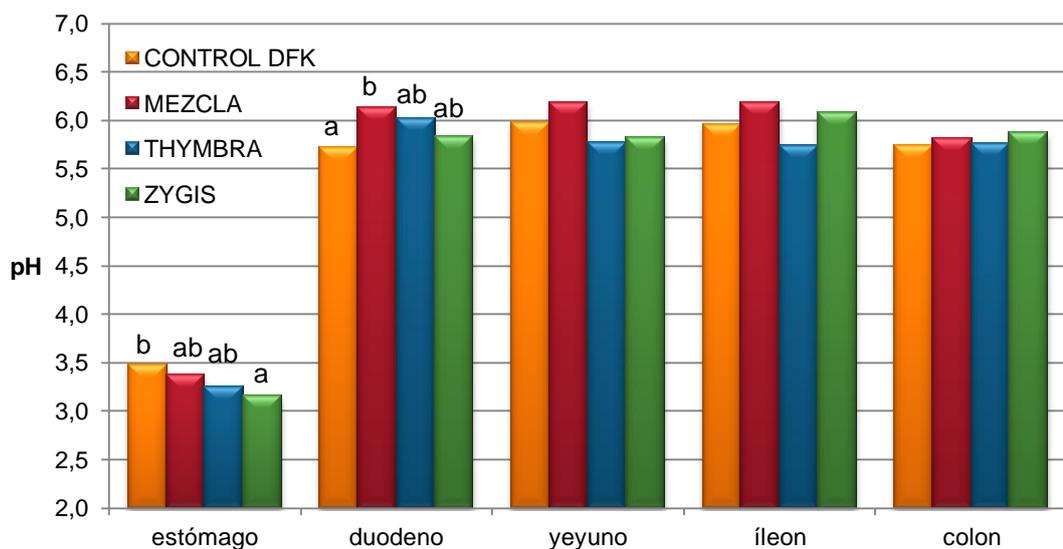
La acidez del estómago en cerdos va disminuyendo desde el nacimiento, encontrando que a los 22 días de vida los lechones sin destetar muestran un pH gástrico en torno a 3,4, mientras que aquellos animales destetados aumentan el pH del estómago a 4,9 (Efird *et al.*, 1982), lo que sugiere que el sistema digestivo de los animales es incapaz de producir el suficiente ácido a esta edad o que la capacidad tampón de los piensos es distinta a la de la leche materna. Además, las dietas ofrecidas a los lechones tras el destete contienen una elevada cantidad de proteínas que son de difícil digestión ya que la capacidad productora de enzimas proteolíticas del páncreas y del “borde en cepillo” del intestino no está totalmente desarrollada a las 3 o 4 semanas de edad (Pluske *et al.*, 2003c), por lo que estas proteínas sin digerir son susceptibles de fermentación bacteriana, afectando negativamente al pH intestinal, a la incidencia de diarrea y a la cantidad de bacterias patógenas encontradas en el contenido intestinal y las heces de los animales (Halas *et al.*, 2007; Wellock *et al.*, 2008).

A nivel estomacal, el pH medio de los animales utilizados en este estudio se sitúa en torno a 3,32. El valor más elevado lo encontramos en los animales del grupo Control-DFK, alimentados con la mezcla comercial de diformiato de potasio Formi® (3,48±0,2). Con un pH ligeramente menor, que representa una reducción del 2,9 %, se encuentra el grupo de animales alimentados con Mezcla de aceites esenciales, seguidos del lote de lechones tratados con Thymbra, con un pH un 6,6 % menor al del Control-DFK. Los animales del grupo Zygis presentan un pH estomacal de 3,16, siendo este valor estadísticamente menor al encontrado en el grupo Control-DFK, representando una disminución del 9,2 %. En línea con nuestros resultados, Michiels *et al.* (2010) exponen que cerdos recién destetados alimentados con distintas dosis de carvacrol y timol revelan una acidez similar a la encontrada en el estómago de nuestros animales, con un pH que oscila entre 3,2 y 3,5. Una dosis de 2000 mg/ kg de timol, similar a la empleada en nuestro ensayo, consigue también el pH más bajo (3,2) en el estómago de los animales. Un descenso en el pH gástrico mejora la función de

barrera del estómago frente a bacterias susceptibles al ácido como las coliformes y favorece el crecimiento de bacterias ácido lácticas, pudiendo observarse este efecto a lo largo de toda la longitud del intestino delgado (Canibe y Jensen, 2003). Además, Zhu *et al.* (2006), mediante un estudio *in vitro*, confirman que un pH por debajo de 2,5 en el contenido gástrico ejerce un fuerte efecto bactericida sobre cepas patógenas de *Escherichia coli* y *Helicobacter pylori*, mientras que este efecto disminuye a un pH de 3 y prácticamente desaparece por encima de 3,5, observando también, que la actividad proteolítica de la pepsina gástrica incrementa la susceptibilidad de las bacterias a cualquiera de estos pH en los que se encuentra su rango de actividad (2,5-3,5). Bergonzelli *et al.* (2003) añaden que, en condiciones *in vitro*, un pH similar al del estómago puede aumentar el poder bactericida de algunos aceites esenciales sobre especies como *Helicobacter pylori*. Por tanto, la adición de aceites esenciales de plantas aromáticas al pienso de cerdos recién destetados podría ejercer un mayor poder bactericida en el estómago del que ya poseen estos aceites en otras condiciones, ayudando a la eliminación de organismos potencialmente patógenos e impedir así que colonicen los distintos tramos del intestino.

Inmediatamente después del esfínter pilórico, se mide el pH a nivel del duodeno. El contenido ácido del estómago es neutralizado por la secreción pancreática, compuesta en su mayor parte por una solución diluida de bicarbonato de sodio, que crea un entorno más alcalino, necesario para el buen funcionamiento de las enzimas presentes en el jugo segregado (Rumsey, 2005). En esta parte del tracto gastrointestinal, el pH más elevado corresponde a los animales del grupo Mezcla, con un valor de 6,14. Los grupos con aceite de *Thymbra capitata* y *Thymus zygis* reducen su pH un 1,9% y un 5%, respectivamente, respecto al grupo Mezcla, aunque estadísticamente no son distintos entre sí. Sin embargo, el grupo Control-DFK, presenta en este primer tramo del intestino el pH más ácido, de 5,72, presentando diferencias estadísticamente significativas con los valores del grupo Mezcla, cuyo pH es un 6,7% mayor. Los experimentos llevados a cabo por Harada *et al.* (1988) relacionan una mayor acidez del contenido que pasa al duodeno con el aumento de las secreciones pancreáticas, lo que podría explicar el pH más

básico encontrado en los animales alimentados con aceites esenciales, respecto al control con ácidos orgánicos. Sin embargo, teniendo en cuenta esto, la relación de pH entre los distintos aceites ensayados debería ser la contraria, por lo que otros factores deben influir en el flujo de secreciones a nivel del duodeno además del pH del contenido que proviene del estómago. En este sentido, Joliffe (2009) expone que un quimo demasiado ácido estimula la liberación de secretina, la cual ralentiza el vaciado gástrico, reduciendo a su vez la producción de ácido gástrico e incrementando la secreción de jugo pancreático alcalino al duodeno; aunque también el contenido graso o de aminoácidos del quimo modifica las secreciones y la velocidad de vaciado gástrico.



Distintas letras en minúscula indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Figura IV.12. Medida del pH a lo largo del tracto gastrointestinal de cerdos alimentados con aceites esenciales de plantas aromáticas.

El pH, aunque con pequeñas fluctuaciones, se mantiene de forma estable a lo largo de todo el intestino delgado, observándose un pH medio en el

duodeno de $5,93\pm 0,19$, en yeyuno de $5,94\pm 0,19$ y en íleon de $5,99\pm 0,19$, sin observarse diferencias significativas entre las distintas partes.

En yeyuno, el tratamiento con mezcla de aceites esenciales sigue presentando el pH más elevado ($6,19\pm 0,34$), seguido por el tratamiento Control-DFK ($5,98\pm 0,45$), que aumenta un 4,2 % su valor respecto al mostrado en el duodeno. Los tratamientos Zygis y Thymbra presentan un pH similar entre ellos, en torno a 5,8, siendo este último el más ácido para esta parte del intestino. En la parte final del intestino delgado los valores de pH se mantienen de forma similar a los del yeyuno, excepto en el grupo Zygis cuyo pH aumenta un 4,3 %. Tanto en yeyuno como en íleon no se presentan diferencias estadísticas entre los tratamientos ensayados. Los valores de pH medidos a lo largo del intestino coinciden por los encontrados por Michiels *et al.* (2010) en la parte proximal del intestino delgado de cerdos en la fase de transición, no así la parte distal, que revela un pH ligeramente superior al de nuestros animales. Del mismo modo, los valores de pH encontrados por Grilli (2007) en cerdos alimentados con timol al finalizar la fase de destete son similares en la parte proximal del intestino delgado, y algo superiores en la parte distal, aunque cuando se compara esta alimentación con ácidos orgánicos las diferencias encontradas tampoco son significativas. Otros ensayos muestran que el pH del contenido intestinal homogeneizado de duodeno y yeyuno de gallinas ponedoras alimentados con ácidos orgánicos es significativamente menor al pH encontrado en animales alimentados con una mezcla de aditivos vegetales con carvacrol y timol (Özek *et al.*, 2011). En general, la acidez del intestino delgado y grueso va aumentando significativamente tras el destete, dando lugar a un descenso de la concentración de amonio, subproducto tóxico del metabolismo bacteriano, por la inhibición del crecimiento de organismos patógenos (Janczyk *et al.*, 2009; Wallace *et al.*, 2011).

El pH del intestino grueso, medido a nivel del colon medio, muestra una acidez similar en todos los grupos, en torno a 5,8, por lo que el análisis estadístico no revela diferencias significativas entre los tratamientos. En la misma línea, Grilli (2007) encuentra valores de pH alrededor de 5,9 en el colon

de cerdos alimentados tanto con timol como con ácidos orgánicos, a los 42 días vida.

IV.2.2.2 Microbiota intestinal.

La proporción total de bacterias presentes en el tracto gastrointestinal (TGI) de los animales es difícil de estimar ya que depende de diversos factores como la dieta, la localización geográfica, el sitio del que se recoge la muestra y la técnica empleada para la medición, entre otros. Este último factor es de especial importancia ya que según el estudio de la microbiota intestinal del cerdo llevado a cabo por Leser *et al.* (2002), y realizado mediante análisis independientes de cultivo, la mayoría de las especies de bacterias que colonizan el TGI no han sido aún caracterizadas.

En el experimento que hemos llevado a cabo se eligen y cuantifican mediante técnicas tradicionales aquellos grupos de bacterias más relevantes para conocer el efecto de la dieta sobre la microbiota del intestino delgado de los animales en esta etapa de transición al cebo. Asimismo, se utilizan técnicas moleculares (PCR en tiempo real) para obtener un acercamiento a la cantidad de bacterias totales y enterobacterias presentes a lo largo del intestino, y poder además comparar los resultados obtenidos con ambas técnicas.

IV.2.2.2.1 Cuantificación bacteriana por métodos tradicionales dependientes de cultivo.

Debido a que los trastornos intestinales son la principal causa de enfermedad y muerte de cerdos en fase de transición, se considera de importancia la detección y/o cuantificación de algunos grupos de bacterias presentes en el tracto gastrointestinal, ya que permite conocer el estado general de salud en el que se encuentran los animales.

Durante el tiempo de experimentación con cerdos alimentados con aceites esenciales de plantas aromático-medicinales y ácidos orgánicos ningún animal mostró anomalías clínicas que hicieran necesario el tratamiento con antibióticos. Sin embargo, durante los días nueve y diez después del destete, y

coincidiendo con la introducción del pienso enriquecido con ácidos orgánicos y aceites esenciales, se observó la aparición de una consistencia más blanda en las heces de dos animales de los grupos Control, Mezcla y Thymbra, mientras que las deposiciones de los animales del grupo Zygis fueron de consistencia normal durante todo el tiempo de experimentación. No obstante, el estado general de salud observado en los animales fue bueno a lo largo del ensayo, y pasados estos dos días la consistencia de las excreciones volvió a la normalidad. Aunque la ausencia de antibióticos promotores del crecimiento en la alimentación de cerdos después del destete puede aumentar la incidencia de diarrea (Fairbrother *et al.*, 2005), los compuestos ensayados en este experimento no han producido una diarrea aguda en ninguno de los animales, y además, de acuerdo con nuestras observaciones, otros ensayos han evidenciado que la suplementación del alimento con una mezcla comercial de aceites esenciales con timol y cinamaldehído mejoró significativamente la consistencia de las heces respecto a un control sin suplementar y se mostró similar a las encontradas en animales alimentados con antibióticos promotores del crecimiento (Li *et al.*, 2012a). En otros ensayos con aceites esenciales de orégano y tomillo en la alimentación de cerdos de la misma edad se observó también un buen estado de salud general de los animales (Mueller *et al.*, 2012).

Para la cuantificación bacteriana por métodos tradicionales se utiliza contenido intestinal fresco de yeyuno. Otros autores utilizan esta porción intestinal para el recuento de enterobacterias y *Lactobacillus* (Manzanilla *et al.*, 2004) o para el estudio de la diversidad microbiana (Messori *et al.*, 2013) en cerdos destetados precozmente, considerando además, que la microbiota presente en el contenido intestinal del yeyuno distal sería una muestra representativa del tracto digestivo proximal, tal y como se desprende de los ensayos llevados a cabo por Roca (2007).

El efecto de la alimentación con aceites esenciales en nuestro estudio se midió inicialmente mediante el recuento en placa de microorganismos aerobios mesófilos totales. Aunque existen bacterias termófilas presentes en el TGI de los cerdos y son excretadas con las heces (Hrenović *et al.*, 2010), la mayor parte de las bacterias intestinales, incluidas las patógenas, tienen normalmente

una temperatura óptima de crecimiento cercana a la temperatura corporal de su huésped (Trüper y Schleifer, 2006), por lo que el recuento de organismos mesófilos totales nos proporciona información sobre la carga total de bacterias y la posible presencia de bacterias entéricas potencialmente patógenas cuando se obtienen recuentos muy elevados. Los resultados obtenidos muestran que no hay diferencias estadísticamente significativas entre los grupos, que presentan una carga microbiana media de $7,41 \pm 0,43$ (**Figura IV.13**). El grupo de animales tratados con aceite esencial de *Thymus zygis* presenta la mayor cantidad de bacterias mesófilas en yeyuno ($7,99 \pm 1,22$ log ufc/g), seguido de los grupos Mezcla y Thymbra, con una cantidad similar de microorganismos mesófilos, en torno a 7,36 log ufc/g, y por último, con la cantidad más baja, se encuentra el grupo Control, tratado con ácidos orgánicos. La menor cantidad de organismos mesófilos totales en el grupo alimentado con la mezcla de aceites ensayados puede indicar un cierto efecto sinérgico de los mismos, que fue observado por Michiels *et al.* (2007) al utilizar una mezcla de carvacrol y timol sobre bacterias anaerobias totales presentes en una simulación *in vitro* de las condiciones del estómago y el intestino delgado.

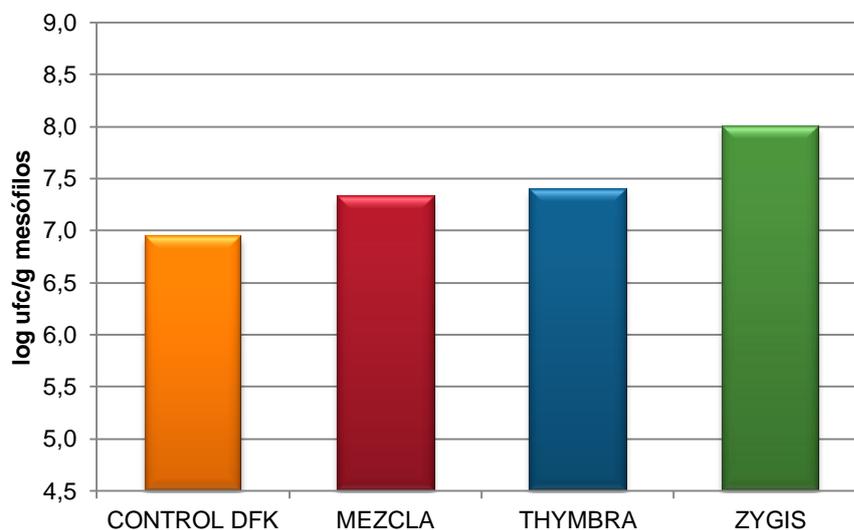


Figura IV.13. Cantidad de organismos mesófilos aerobios totales presentes en el contenido intestinal del yeyuno de cerdos alimentados con aceites esenciales.

Diversos ensayos ponen de manifiesto la susceptibilidad de los organismos aerobios mesófilos totales del intestino de cerdos a distintos elementos que pueden ser introducidos con la dieta (Waché *et al.*, 2009; Hrenovic *et al.*, 2010). Sin embargo, los experimentos realizados por Mueller *et al.* (2012) en cerdos de nueve semanas alimentados con 150 mg/kg de carvacrol y timol, procedente de aceite esencial de orégano y tomillo, respectivamente, muestran, como en nuestro caso, una amplia variabilidad entre individuos que impide encontrar diferencias significativas cuando se observan los organismos aerobios mesófilos de la superficie mucosa de yeyuno y colon, respecto a un control sin suplementar y dietas con otros aceites esenciales.

También se estudia la cantidad de *Escherichia coli*, habitante normal del tracto intestinal, que posee algunas cepas de carácter patógeno causantes de una gran variedad de enfermedades intestinales y extraintestinales en ganado porcino (McGlone y Pond, 2003). Entre los tratamientos con aceites esenciales, el de *Thymus zygis* parece ser el más efectivo contra *E. coli* (6,15 log ufc/g), seguido del tratamiento con mezcla de aceites esenciales, que presenta un recuento de estas coliformes ligeramente mayor, y del de *Thymbra capitata*. En el grupo de animales alimentados con ácidos orgánicos estas bacterias coliformes, con una cantidad de $5,65 \pm 0,96$ log ufc/g, están presentes en yeyuno en menor medida que en los individuos tratados con aceites esenciales de PAM, pero las diferencias encontradas no son significativas estadísticamente (Figura IV.14).

En los ensayos de Mueller *et al.* (2012), el aceite esencial de orégano, rico en carvacrol, y el aceite esencial de tomillo, rico en timol, introducido cada terpeno en una cantidad de 0,15 g/kg, produjo un ligero descenso en las bacterias *E. coli* presentes en la superficie de la mucosa del yeyuno de cerdos, frente a un control sin suplementar, sin encontrarse diferencias significativas. Incluso, en la mucosa del colon, el recuento de estos microorganismo fue mayor en los grupos alimentados con aceites esenciales que en el control. Sin embargo, entre estos dos aceites esenciales, es el aceite rico en timol el que presenta, como en nuestro caso, los recuentos de *E. coli* más bajos en heces al

final de tratamiento. Por el contrario, en una simulación de las condiciones del intestino delgado, el carvacrol presenta un efecto antimicrobiano frente a *E. coli* ligeramente superior al del timol (Michiels *et al.*, 2007), así como otros experimentos *in vitro* sugieren que el carvacrol a concentraciones sub-letales previene la formación de flagelos en cepas de *E. coli* causantes de infecciones, reduciendo así la motilidad de estas bacterias y, por tanto, su adherencia a las células epiteliales del intestino (Burt *et al.*, 2007). Otros aditivos naturales han mostrado también su habilidad para unirse a cepas de *Escherichia coli* enterotoxigénica K88, inductoras de diarrea en lechones destetados de forma precoz, y bloquear su adherencia a la mucosa intestinal porcina (González-Ortiz *et al.*, 2014), por lo que la combinación de ingredientes naturales, con sus distintos modos de acción, podría ser útil para disminuir los casos de diarrea post-destete.

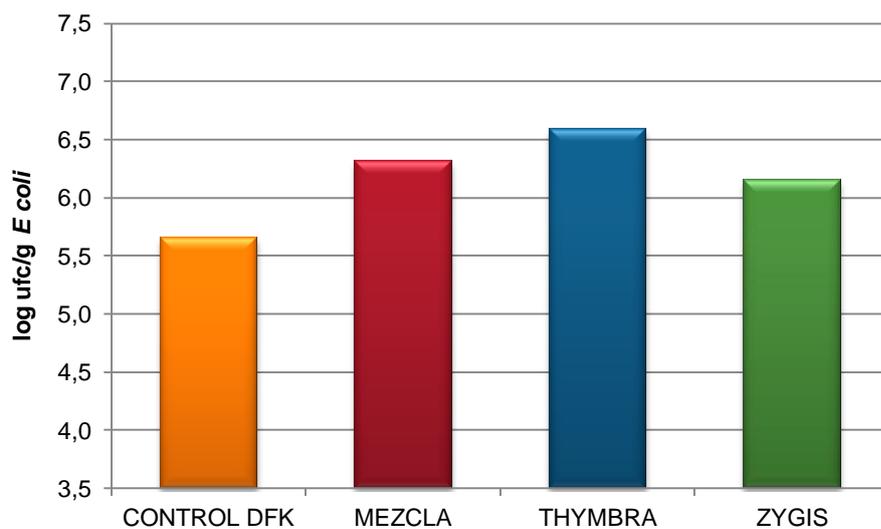


Figura IV.14. Cantidad de *Escherichia coli* presente en el contenido intestinal del yeyuno de cerdos alimentados con aceites esenciales.

Los resultados de Xu *et al.* (2008) indican que el mecanismo de acción tanto de timol como de carvacrol es la alteración de la membrana citoplasmática de *Escherichia coli*, la cual aumenta su permeabilidad y permite el paso de

protones y potasio, produciendo finalmente la despolarización de su potencial de membrana. Un factor añadido a su potencial antimicrobiano parece ser la presencia del grupo hidroxilo en estos fenoles, además de un sistema de electrones deslocalizados. Así, compuestos como el cimeno, precursor de carvacrol sin grupo hidroxilo, o el mentol, con grupo hidroxilo pero carente de un sistema de electrones deslocalizados, poseen una menor actividad antimicrobiana (Ultee *et al.*, 2002). Además, Wang *et al.* (2009) apuntan a que una microencapsulación de carvacrol con alginato de calcio permite reducir su absorción en el estómago y liberar más del 80% del compuesto en el intestino, en una simulación gastrointestinal *in vitro*, manteniendo, respecto al compuesto sin encapsular, su capacidad antimicrobiana contra *E. coli* K88. En base a esto, que podría servir para otros aceites esenciales de carácter hidrofóbico, la cantidad de aceite que llega a los distintos segmentos del intestino delgado de nuestros animales puede no ser suficiente para ejercer una fuerte actividad contra algunos tipos de bacterias. Así, una elevada cantidad de timol (10 g/Kg) en la dieta de lechones precozmente destetados puede producir cambios en la comunidad bacteriana del yeyuno de cerdos (Janczyk *et al.*, 2008), pero, como exponen Fabian *et al.* (2006), las dosis de aceites esenciales capaces de ejercer un marcado efecto antibacteriano también aumentan su capacidad potencial de producir citotoxicidad sobre las células del intestino, por lo que parece importante encontrar las dosis adecuadas de aceites esenciales que ejerzan un efecto antimicrobiano sin afectar negativamente a las células intestinales.

De acuerdo con nuestros resultados, la suplementación de la dieta con ácidos orgánicos provocó un descenso del *E. coli* presente en el íleon de aves en comparación con una dieta suplementada con una mezcla de timol y carvacrol a partes iguales (Akyurek y Yel, 2011). En este caso, se observa una fuerte significación en las diferencias encontradas, debiendo tener en cuenta que la cantidad suplementada de ácidos orgánicos y fenoles es muy superior a la ofrecida a nuestros animales. En concreto, el diformiato de potasio, utilizado como control positivo en nuestro estudio, ha mostrado su efectividad contra coliformes, de manera *in vivo* (12 g/kg- 18 g/Kg) e *in vitro* (Øverland *et al.*, 2000; Canibe *et al.*, 2001; Knarreborg *et al.*, 2002).

Por otro lado, como ya se ha comentado, solo algunas cepas de *E. coli* tienen carácter patógeno, por lo que una mayor cantidad de estos organismos no implica necesariamente un peor estado de salud de los animales ni una mayor incidencia de diarrea. Como se ha visto en este experimento, el grupo Zygis, que no presenta casos de diarrea, muestra una cantidad de *E. coli* mayor al grupo Control con diformiato de potasio, en el que si observan heces de menor consistencia en algunos animales durante los días nueve y diez después del destete. Además, una mayor diversidad en la comunidad comensal de *E. coli* parece constituir una defensa contra cepas patógenas de esta misma bacteria, encontrando una menor diversidad en el intestino de cerdos después del destete que en individuos de mayor edad (Bok *et al.*, 2013).

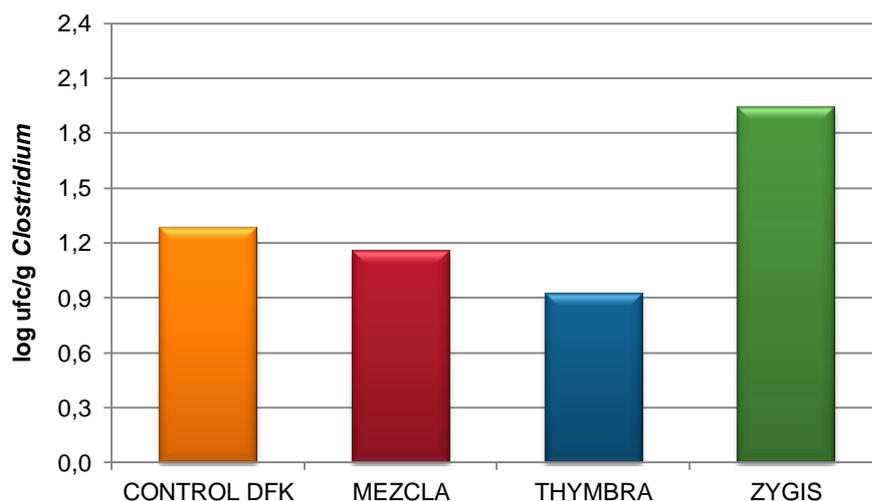


Figura IV.15. Cantidad de *Clostridium spp.* presente en el contenido intestinal del yeyuno de cerdos alimentados con aceites esenciales de plantas aromáticas.

Las especies del genero *Clostridium* son numerosas y tienen una amplia distribución, siendo pobladores normales del intestino de animales y humanos, con algunas especies potencialmente enteropatógenas o productoras de enterotoxemias (Markey *et al.*, 2013). En el recuento de este grupo de bacterias,

los casos no detectados se manejan como valor cero. En la **Figura IV.15** se observa como el tratamiento con AE de *Thymbra capitata* ($0,92 \pm 1,02$ log ufc/g) parece ser el más efectivo contra *Clostridium* spp., mostrando una reducción frente al grupo Control-DFK de un 28%, aunque esta diferencia no es estadísticamente significativa debido a la gran variabilidad entre individuos observada en estos análisis. Entre los grupos alimentados con AE, el segundo en efectividad es el grupo Mezcla con un recuento de *Clostridium* spp. un 10% menor al del grupo alimentado con ácidos orgánicos, y en último lugar se encuentra el grupo Zygis, que se muestra el menos efectivo contra este tipo de microorganismos, aunque sin encontrarse diferencias significativas con el resto de grupos.

La mayor parte de enfermedades entéricas en cerdos debidas a clostridios son causadas por *Clostridium perfringens*, principalmente de tipo A y C, y por *Clostridium difficile*, siendo todos ellos productores de toxinas y pudiendo encontrarse en ocasiones en el contenido intestinal o la heces de individuos sanos (Songer y Uzal, 2005). En vista de nuestros resultados, una dieta suplementada con aceite esencial rico en carvacrol parece influir sobre el crecimiento de *Clostridium* spp. reduciendo su contenido en el tracto gastrointestinal. Además, el carvacrol ha mostrado en estudios *in vitro* su efectividad reduciendo la producción de toxinas de varias cepas virulentas de *Clostridium difficile*, influyendo en la expresión de los genes involucrados en la producción y regulación de las toxinas, disminuyendo así su citotoxicidad sin inhibir el crecimiento de bacterias beneficiosas del tracto gastrointestinal (Mooyottu *et al.*, 2014). Otros ensayos *in vitro* realizados con AE de *Satureja montana* (29% de timol y 11% de carvacol) evidencian un marcado efecto de este compuesto contra *C. perfringens* tipo A solo a muy elevada concentración (31,25 g/Kg) (De Oliveira *et al.*, 2011). La actividad antibacteriana de diversos aceites esenciales de plantas aromático-medicinales y sus compuestos probada por Dormans y Deans (2000), muestra que tanto *Origanum vulgare* como *Thymus vulgaris* poseen un espectro de actividad similar contra *Clostridium sporogenes*; sin embargo, cuando se analiza el poder antibacteriano de sus principales compuestos por separado los resultados reflejan una elevada actividad del carvacrol, mientras que el timol no parece poseer ningún poder

inhibitorio frente a esta bacteria, lo que podría deberse a una acción sinérgica de los distintos componentes del aceite y no solo a la acción de sus componentes principales.

En experimentos *in vivo* realizados por Timbermont *et al.* (2010) en aves se observa una elevada efectividad del timol para inhibir el crecimiento de *Clostridium perfringens*, resultados que contrastan con los nuestros, especialmente si lo comparamos con el efecto producido por el suplemento rico en carvacrol. Sin embargo, en los resultados observados por Janczyk *et al.* (2008) en cerdos de siete semanas infectados de forma oral con *Salmonella typhimurium* tras el destete, una elevada cantidad de timol en la dieta (10 g/Kg) no parece ejercer ningún efecto, tanto en animales infectados como no infectados previamente, sobre *Clostridium* spp. presente en el contenido intestinal del yeyuno de estos animales. En línea con los resultados observados en nuestro experimento, 0,3 g/kg de AE de orégano (77% carvacrol y 9,5 % timol) producen un descenso significativo de *Clostridium* spp. presente en el intestino de aves (Kirkpınar *et al.*, 2011).

Por otro lado, el diformiato de potasio ha mostrado ser efectivo contra *C. perfringens* cuando se aplica en pollos de carne a una concentración de 4,5 g/kg, una cantidad superior a la empleada en nuestro ensayo (1,6 g/kg) (Mikkelsen *et al.*, 2009).

De entre las bacterias beneficiosas que podemos encontrar en el intestino, las del género *Lactobacillus* son las predominantes y las que mejor información nos proporcionan sobre la salud general del tracto gastrointestinal (Reuter, 2001; Pieper *et al.*, 2006). Inmediatamente tras el destete Janczyk *et al.* (2009) encuentran un recuento bajo de *Lactobacillus* en el intestino delgado, y un incremento posterior en la cantidad de estas bacterias, ya que se adaptan con rapidez a los cambios de la alimentación ocurridos en esta etapa (Janczyk *et al.*, 2007). Asimismo, Wen *et al.* (2011) observan que, en animales de la misma edad, los *Lactobacillus* encontrados a lo largo del tracto gastrointestinal muestran una gran estabilidad, por lo que los diferentes *Lactobacillus* presentes en las heces pueden representar a la comunidad intestinal. La **Figura IV.16** pone de manifiesto la presencia de una mayor cantidad de bacterias lácticas en

el yeyuno de animales alimentados con AE de *Thymbra capitata*, rico en carvacrol, con un recuento de $10,32 \pm 0,93$ log ufc/g, que corresponde a un aumento del 13% respecto al grupo Control. El resto de grupos muestra un recuento inferior de *Lactobacillus*, muy semejante entre ellos, que oscila entre los 9,12 log ufc/g de *Lactobacillus* hallados en el grupo con ácidos orgánicos y los 8,9 log ufc/g del grupo Mezcla. El análisis de la varianza no refleja, sin embargo, diferencias estadísticas entre las dietas. La mayor presencia de bacterias lácticas en los animales alimentados con *Thymbra capitata* coinciden con los menores valores de pH encontrados en el yeyuno e el íleon de los animales del mismo grupo, ya que estas bacterias producen ácido láctico, el cual favorece el descenso de los valores de pH, ayudando además a inhibir el crecimiento de bacterias patógenas (Fayol-Messaoudi *et al.*, 2005).

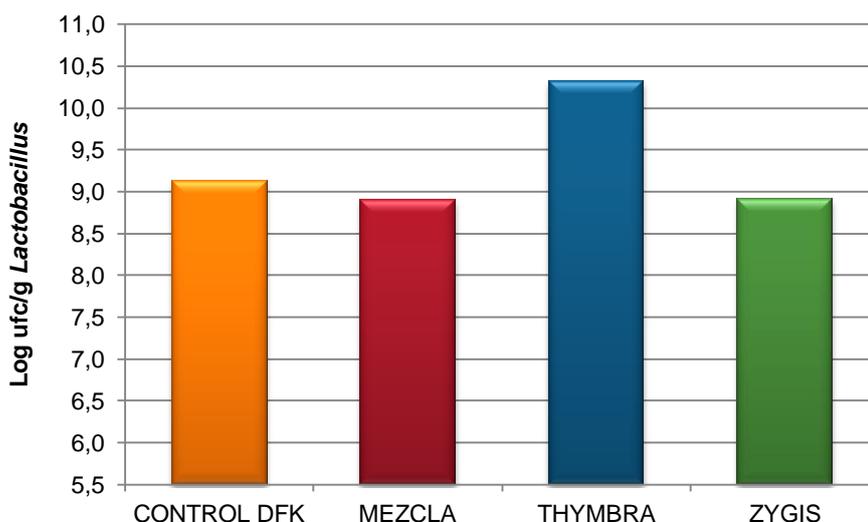


Figura IV.16. Cantidad de bacterias del género *Lactobacillus* presentes en el contenido intestinal del yeyuno de cerdos alimentados con aceites esenciales.

De manera *in vitro*, los ensayos de Michiels *et al.* (2007) revelan un elevado potencial inhibidor de carvacrol y timol sobre *Lactobacillus*, principalmente en las condiciones del estómago, cuando se compara con otros fitoquímicos como trans-cinamaldehído y eugenol, lo cual parece contradecir los

resultados obtenidos en esta investigación. Otros estudios de actividad antimicrobiana *in vitro* corroboran estos resultados, y exponen que, como se ha comentado con anterioridad, compuestos fenólicos como carvacrol, actúan desestabilizando la membrana citoplasmática y aumentando la permeabilidad de la misma (Gill y Holey, 2006), lo que dota de un gran poder bactericida a aceites esenciales de *Thymus vulgaris* L., *Thymbra capitata* L. y *Origanum vulgare* L. contra organismos gram-positivos y gram-negativos, incluyendo bacterias patógenas y también especies del género *Lactobacillus* (Bouzouita *et al.*, 2003; Di Pasqua *et al.*, 2005).

Sin embargo, los trabajos realizados sobre animales no muestran este efecto bactericida sobre los organismos del género *Lactobacillus*, por lo que las condiciones que se crean en el estómago e intestino, referentes tanto al pH como a la interacción con los distintos compuestos de la alimentación y la digestión, parecen influir positivamente en la acción de estos compuestos fenólicos sobre las bacterias ácido-lácticas. Diversos aceites esenciales, entre los que se encuentran el de orégano y tomillo, consiguen aumentar ligeramente el recuento de *Lactobacillus* en la superficie intestinal del yeyuno de cerdos precozmente destetados, cuando se comparan con un control (Mueller *et al.*, 2012). En línea con los resultados de nuestro experimento, la combinación a partes iguales de carvacrol y timol en la dieta obtuvo cantidades ligeramente inferiores de bacterias lácticas a las observadas en el íleon de aves alimentadas con una mezcla de ácidos orgánicos, aunque promovieron significativamente el crecimiento de bacterias lácticas frente a un control sin suplementar (Akyurek y Yel, 2011).

Sin embargo, en otros ensayos llevados a cabo con lechones post-destete con dietas enriquecidas con timol y carvacrol (Michiels *et al.*, 2010) es la alimentación con timol la que más favorece el crecimiento de *Lactobacillus*, aunque en este caso la suplementación se produce con el compuesto puro y no con un aceite esencial, rico en este fenol, que en su mezcla con otros compuestos, podría ejercer un efecto distinto al del compuesto puro por sí solo. También en aves la suplementación de la dieta con 0,05 g/kg de una mezcla de aceites esenciales con timol y carvacrol, estimula el crecimiento de *Lactobacillus*

frente a un control y una dieta con antibióticos (Jang *et al.*, 2007). De acuerdo con nuestros resultados, ensayos sobre aves a las que se les administra 0,3 g/Kg de un AE de orégano con alta concentración de carvacrol muestran un aumento en la cantidad de *Lactobacillus* spp., respecto a un control, aunque estos cambios, como en nuestro caso, no llegan a ser significativos (Kirkpınar *et al.*, 2011). Además, se ha descrito que sales de ácidos orgánicos en forma de diformiato también ejercen un efecto beneficioso en aves, aumentando la cantidad de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* presentes en su intestino (Lückstädt y Theobald, 2009), por lo que es considerable la capacidad de la *Thymbra capitata* para aumentar el número de estas bacterias en el intestino, sobre todo al compararlo con compuestos que ya han mostrado eficacia para ello.

Del mismo modo, las enterobacterias forman parte de la microbiota normal del intestino. Aunque la mayoría de las especies que forman este grupo de bacterias son oportunistas, algunas son potencialmente patógenas y pueden causar diversas enfermedades entéricas (Granados y Villaverde, 1997). En la siguiente figura (**Figura IV.17**) se observa que, frente a las bacterias entéricas, los grupos alimentados con aceites esenciales presentan un efecto muy semejante entre ellos, con un recuento medio de 6,97 log ufc/g, y mayor al grupo Control (ácidos orgánicos), aunque sin ser estas diferencias estadísticamente significativas. El menor efecto de los aceites esenciales frente a enterobacterias puede deberse a que algunas bacterias se adaptan a sus compuestos cuando se encuentran a concentraciones sub-letales (Ultee *et al.*, 2000), teniendo en cuenta, además, que las bacterias gram-positivas parecen ser más sensibles a los compuestos de los aceites esenciales (Smith-Palmer *et al.*, 1998; Thapa *et al.*, 2012), aunque la eficacia contra uno u otro grupo de bacterias dependerá también de la combinación de plantas que se utilice (Gutierrez *et al.*, 2008). No obstante, ensayos *in vitro* realizados por Fadli *et al.* (2012) con aceites esenciales de especies de tomillo con un 76% de carvacrol, muestran una clara actividad contra bacterias gram-negativas, afectando a la permeabilidad de sus membranas, tanto interna como externa, pudiendo jugar estos aceites un importante papel en la lucha contra bacterias patógenas resistentes, ya sea por sí solos o facilitando la entrada en la célula en combinación con otros compuestos. También Kortman *et al.* (2014) sugieren

que el carvacrol puede utilizarse como suplemento dietético para prevenir el crecimiento y la colonización de patógenos como *Salmonella typhimurium*, que se produce en el intestino grueso cuando se ingieren complementos orales de hierro.

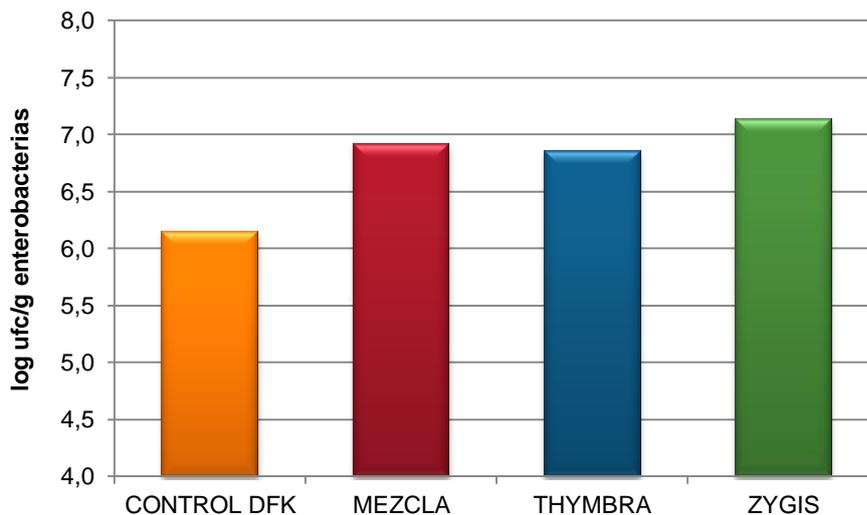


Figura IV.17. Cantidad de enterobacterias presentes en el contenido intestinal del yeyuno de cerdos alimentados con aceites esenciales.

En general, el poder de los aceites esenciales contra las enterobacterias ha sido puesto de manifiesto de forma *in vitro* por diversos autores (Friedman *et al.*, 2002; Rafii y Shahverdi, 2007; Cosge *et al.*, 2009; Witkowska y Sowinska, 2013). Concretamente, aquellos aceites que contienen un alto porcentaje de componentes fenólicos, como carvacrol y timol, muestran una mayor capacidad inhibitoria (Peñalver *et al.*, 2005). Estos mismos autores observan un mayor poder antimicrobiano en aceites esenciales cuya composición es mayoritaria en carvacrol y ausente de timol. Sin embargo, otros aceites con estas características no muestran el mismo efecto antibacteriano, por lo que la combinación del resto de componentes del aceite, y no solo sus componentes mayoritarios, parecen ser determinantes en su actividad. Otros autores (Thapa *et al.*, 2012) señalan que la interacción de los distintos componentes que forman

un aceite esencial depende también de las especies de bacterias sobre las que se actúe, incidiendo además en la importancia de realizar rigurosos controles de calidad en cuanto a la composición de los aceites esenciales si estos quieren ser aplicados de forma terapéutica o profiláctica.

Los estudios realizados sobre ganado porcino son más escasos y muestran resultados diversos en cuanto al efecto que los aceites esenciales ejercen sobre las bacterias entéricas. La combinación de un 0,04% de aceites esenciales en la dieta de cerdos recién destetados no ejerció ningún efecto sobre las enterobacterias presentes en el contenido intestinal (Janczyk *et al.*, 2009), quizá por la baja cantidad ofrecida, pero tampoco la adición de una mayor cantidad de timol (1%; 10 g/Kg) a la dieta de lechones de la misma edad infectados con *Salmonella typhimurium* afectó a la cantidad excretada de esta bacteria en las heces de los animales (Trevisi *et al.*, 2007). Otros autores (Yan *et al.*, 2012), sin embargo, vieron un descenso significativo de la cantidad excretada de *E. coli* cuando se administró a la dieta de cerdos en la fase de transición una mezcla de compuestos vegetales en la que se incluía tomillo. También en lechones recién destetados, la adición de 17 ml/100 kg de aceite esencial con un 65% de carvacrol produjo un descenso en la incidencia de diarrea y en la cantidad de enterobacterias encontradas en heces, respecto a un control, aunque aceites esenciales con alto contenido en eugenol fueron más efectivos contra las bacterias entéricas (Marcin *et al.*, 2006).

En el caso de los ácidos orgánicos, una mezcla de 4 g/Kg de ácido fórmico y 4 g/kg de ácido láctico no ejerció ninguna influencia sobre *Salmonella typhimurium* en cerdos infectados (Martín-Peláez *et al.*, 2010). Por el contrario, la publicación del comité científico de la Comisión Europea sobre el uso de diformiato de potasio (FormiTMLHS) (2001) en la alimentación de cerdos informa del descenso en la cantidad de *Enterobacteriaceae* cuando este aditivo se incluye en una cantidad entre el 1,2 y 2%. Según los resultados obtenidos en nuestro estudio, el 0,16% añadido al pienso de nuestros animales parece ser suficiente para disminuir ligeramente el número de este grupo de bacterias respecto al mismo porcentaje de aceite esencial.

Sin embargo, es el equilibrio entre estos dos grupos de bacterias la referencia utilizada por diversos autores para valorar el estado general de salud del intestino (Castillo *et al.*, 2007; Han *et al.*, 2011; O'Shea *et al.*, 2011; Chen *et al.*, 2012). El índice Lactobacillus:Enterobacterias (L:E) ha sido tradicionalmente usado para medir la solidez de la microbiota que habita el intestino, presentando una mayor resistencia a enfermedades gastrointestinales aquellos individuos con un índice más elevado (Ewing y Cole, 1994). Atendiendo a este índice, se obtienen los mejores resultados con los tratamientos con AE de *Thymbra capitata* ($1,55\pm 0,28$) y diformiato potásico ($1,50\pm 0,31$), lo que supone una mayor proporción de bacterias lácticas frente a enterobacterias (**Figura IV.18**). Los otros dos AE ensayados muestran valores similares entre ellos, en torno a 1,28, e inferiores a los del grupo Control-DFK, aunque las diferencias encontradas no son estadísticamente significativas. A pesar de no haber significancia estadística, se observa una marcada diferencia entre los grupos Thymbra y Zygis ($p=0,0787$).

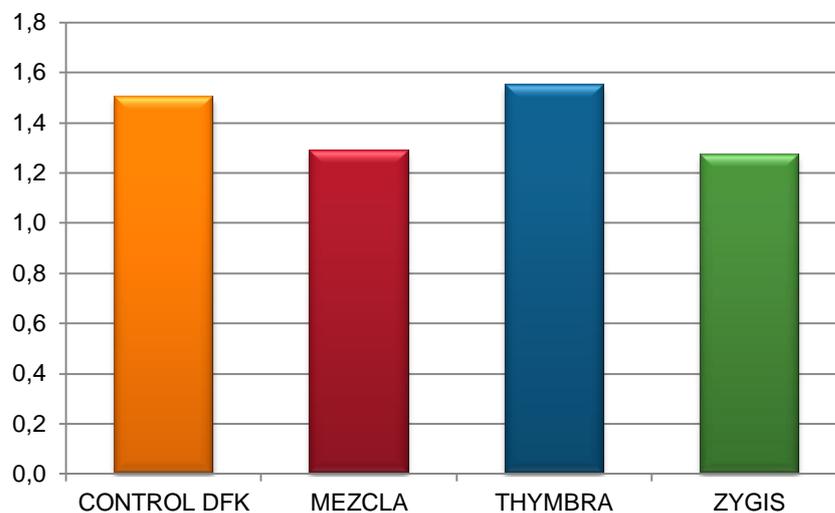


Figura IV.18. Índice L:E en el yeyuno de cerdos alimentados con aceites esenciales.

Como ya se ha comentado, los aceites esenciales de plantas aromático-medicinales han sido propuestos como alternativa natural a los antibióticos para el control de bacterias patógenas intestinales. De estos aceites o componentes mayoritarios de los mismos, entre los que se encuentran carvacrol y timol, destaca su eficacia de manera *in vitro* contra distintas enterobacterias patógenas, cuando se recrean las condiciones del intestino de cerdos, siendo las bacterias lácticas mínimamente sensibles a estos compuestos, que son además estables a condiciones de pH bajo (Si *et al.*, 2006), lo que hace a estos fenoles, o los aceites que los contienen, susceptibles de uso en alimentación para modular los principales grupos de bacterias implicados en la salud y bienestar del ganado porcino.

Así, la suplementación de la dieta de lechones con 300 mg/kg de una mezcla vegetal de cinamaldehído, oleorresina de pimiento y 15 mg/kg de carvacrol aumentó la cantidad de *Lactobacillus* en yeyuno, disminuyendo ligeramente la cantidad de enterobacterias y mejorando significativamente la proporción entre ambos grupos de bacterias (Manzanilla *et al.*, 2004). La misma dieta experimental aumentó significativamente, respecto a un control, el índice L:E en el ciego de cerdos debido al incremento significativo de lactobacilos (Castillo *et al.*, 2006). Estos resultados coinciden con los nuestros ya que la alimentación con mayor cantidad de carvacrol presenta el mejor índice, debido principalmente al gran aumento en la cantidad de *Lactobacillus* y no al descenso de enterobacterias. Por el contrario, el grupo Control con diformiato de potasio debe su elevado índice a un marcado descenso de las enterobacterias, mientras que los lactobacilos parecen no verse afectados por este tratamiento. De acuerdo con estos resultados, Février *et al.* (2001) encontraron un descenso de ciertas enterobacterias en el colon de cerdos alimentados con diformiato de potasio al 0,9% y 1,8%, mientras que el número de lactobacilos no se vio alterado.

Además, diversos aditivos vegetales entre los que se encuentran el aceite esencial de orégano y tomillo, ricos en carvacrol y timol, respectivamente, ejercen un efecto antioxidante indirecto, mejorando el sistema xenobiótico en varios órganos de cerdos al final de la fase de transición, lo que puede suponer

una mejora en la defensa contra microorganismos o sustancias tóxicas derivadas de la alimentación (Mueller *et al.*, 2012).

IV.2.2.2 Cuantificación bacteriana por PCR en tiempo real.

Una de las herramientas que más han hecho avanzar el diagnóstico clínico y la investigación microbiológica es la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la cual permite sintetizar específica y exponencialmente en pocas horas una determinada fracción de ADN a partir del uso de dos pequeños fragmentos del mismo (primers o cebadores) para así, determinar la presencia o ausencia de un microorganismo en particular (van Pelt-Verkuil *et al.*, 2008). A pesar de la importancia de esta técnica, presenta ciertas limitaciones, principalmente en la cuantificación de ácidos nucleicos, por lo que la introducción de nuevos reactivos e instrumentación ha permitido modificar la técnica PCR tradicional para crear una tecnología a tiempo real que permite salvar dichas desventajas. El uso de la PCR en tiempo real (RT-PCR, por sus siglas en inglés) posibilita, a través del empleo de moléculas indicadoras fluorescentes, analizar la cinética de la reacción a tiempo real, siendo ésta específica para cada muestra y número inicial de copias génicas (Mackay *et al.*, 2007; Bustin *et al.*, 2012). Debido a su elevada especificidad (Smith y Osborn, 2009) se adopta esta técnica para evaluar su uso en la cuantificación de bacterias totales y enterobacterias a lo largo del intestino, delgado y grueso.

Mediante una curva estándar a partir de un cultivo puro de *Escherichia coli* se realiza la cuantificación de bacterias totales y enterobacterias. En la totalidad de bacterias presentes en el tracto gastrointestinal se observan claras diferencias en la cantidad encontrada en el intestino delgado, con una media de 7,33 log copias gen/g, y el intestino grueso, con una media de 8,73 log copias gen/g (**Figura IV.19**). Otros autores han observado recuentos similares de bacterias totales para estas regiones del intestino (Jensen y Jørgensen, 1994), mientras que algunos encuentran valores ligeramente superiores al comparar la totalidad de bacterias encontrada en intestino delgado, grueso y heces, para cerdos de la misma edad (Castillo *et al.*, 2006; Metzler *et al.*, 2009).

En el tramo perteneciente al yeyuno la cantidad de bacterias encontrada es muy semejante en los 4 grupos experimentales, observándose valores que van desde 7,4 log copias gen/g en los individuos tratados con AE de *Thymus zygis*, y 7,25 log copias gen/g del grupo de animales alimentados con ácidos orgánicos.

Avanzando hacia el íleon, la cantidad de bacterias se eleva en el grupo Mezcla hasta $7,48 \pm 0,41$ log copias gen/g, pero debido a la variabilidad existente siguen sin encontrarse diferencias significativas con el grupo Control-DFK, cuyos valores son similares a los encontrados en yeyuno. Disminuyen, sin embargo, la cantidad de bacterias totales en los tratamientos Thymbra y Zygis, siendo este último, con $7,23 \pm 0,5$ log copias gen/g, el grupo con menor carga bacteriana en el tramo final del intestino delgado. En este caso, las diferencias observadas tampoco son estadísticamente significativas.

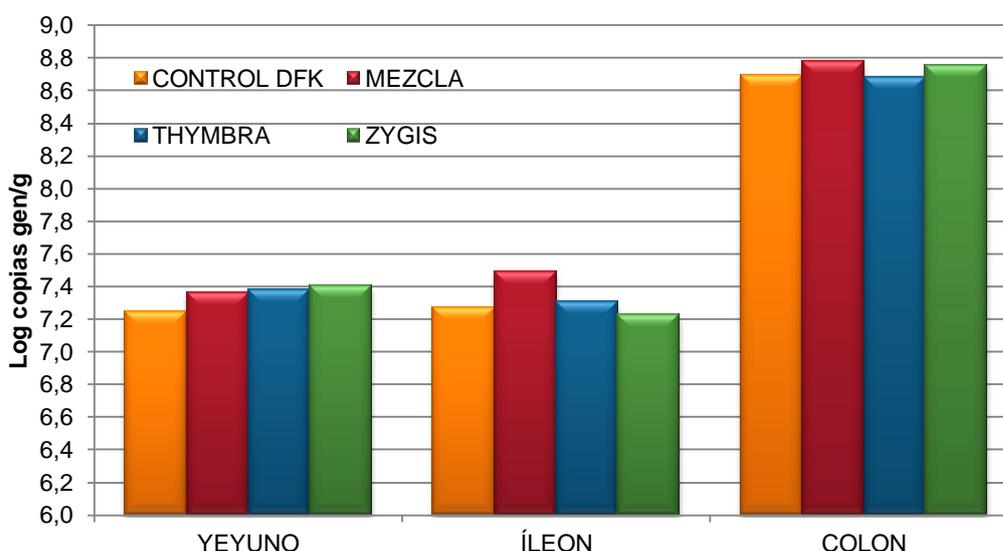


Figura IV.19. Cantidad de bacterias totales en el tracto gastrointestinal de cerdos analizadas mediante PCR en tiempo real.

El número total de bacterias aumenta considerablemente a su paso por el intestino grueso, hecho también observado por Metzler *et al.* (2009) al cuantificar la población de bacterias en íleon y heces de cerdos adultos. En el contenido intestinal del colon se observa que los animales que presentan una mayor cantidad de bacterias totales son el grupo Mezcla y el grupo Zygis, con valores muy similares en torno a 8,76 log copias gen/g. Con un valor inferior están los lotes Control-DFK y Thymbra, que muestran también valores similares entre ellos, con una media de 8,69 log copias gen/g. Además de estos resultados, cabe destacar la baja variabilidad encontrada en los distintos grupos sobre la cantidad de bacterias totales medidas en colon, a pesar de lo cual, el análisis estadístico no muestra diferencias significativas entre los tratamientos.

De acuerdo con Castillo *et al.* (2006), los cambios que se dan con la alimentación parecen afectar más a la ecología y a la actividad metabólica de la comunidad bacteriana que al número total de bacterias. Así, la alimentación de cerdos tras el destete con una mezcla de extractos de plantas con carvacrol presentó la diversidad bacteriana más baja al compararla con una dieta control, otra suplementada con antibiótico (avilamicina) y una con ácido orgánico (butirato de sodio), medida mediante PCR y enzimas de restricción (PCR-RFLP, por sus siglas en inglés) (Roca *et al.*, 2014). Por otro lado, Levesque *et al.* (2012) afirman que la nutrición afecta a largo plazo a la comunidad bacteriana asociada a la mucosa intestinal, pero no a la composición microbiana del contenido del intestino. Por ello, sería interesante obtener una información más detallada de la composición y diversidad bacteriana del intestino de cerdos alimentados con aceites esenciales de tomillo mediante técnicas como la pirosecuenciación, capaz de evaluar con más precisión la cantidad relativa de bacterias sin la necesidad de un conocimiento previo de los organismos presentes (Armougom *et al.*, 2009; Poroyko *et al.*, 2010), así como analizar distintos indicadores de la actividad metabólica de estas bacterias.

Respecto a las enterobacterias cuantificadas por RT-PCR (**Figura IV.20**), los resultados muestran menores diferencias entre tratamientos en yeyuno. Conforme se avanza en el tracto gastrointestinal estas diferencias se hacen

más evidentes, no llegando, sin embargo, a ser estadísticamente significativas en ningún caso.

En yeyuno, de entre los grupos de animales alimentados con aceites esenciales, el que menor cantidad de enterobacterias presenta es el grupo Mezcla, mientras que el tratamiento menos efectivo contra este grupo de bacterias es el de *Thymbra capitata*. En el grupo Control-DFK, sin embargo, se observan los recuentos más bajos de estas bacterias, aunque las diferencias observadas entre grupos no son significativas.

Una vez en el íleon, la carga de enterobacterias aumenta un 6,27% en el grupo Mezcla, siendo en este tramo del intestino el tratamiento con aceites esenciales que mayor cantidad presenta de estas bacterias, seguido del grupo Thymbra, cuyo recuento de enterobacterias aumenta un 2,25% respecto al medido en yeyuno. Sin embargo, la cantidad de enterobacterias decae un 4,16% y un 10,85% en los grupos Zygis y Control-DFK, respectivamente.

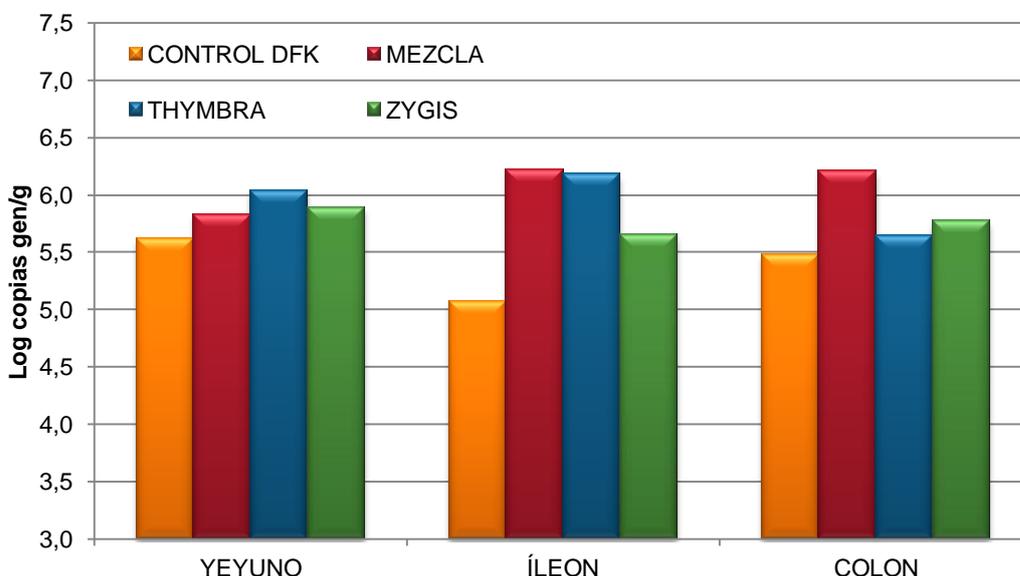


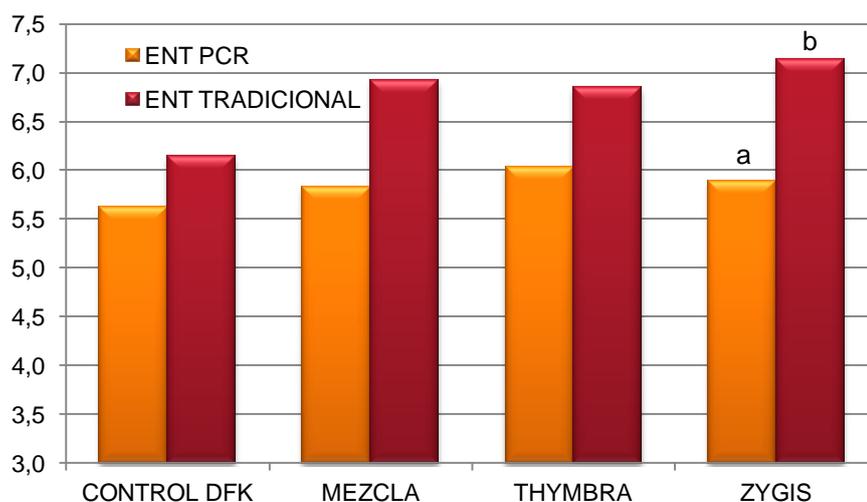
Figura IV.20. Cantidad de enterobacterias en el tracto gastrointestinal de cerdos analizadas mediante PCR en tiempo real.

Al estudiar el contenido del intestino grueso, se observa que la cantidad de enterobacterias permanece invariable, y superior al resto de tratamientos, en el grupo Mezcla. La carga de enterobacterias aumenta un 2,1% en el grupo Zygis respecto a las encontradas en íleon, y disminuyen, sin embargo, un 9,4% en el tratamiento con *Thymbra capitata*, siendo éste el grupo con aceites esenciales que mejores resultados muestra. El lote Control-DFK, aumenta también su carga de enterobacterias con respecto al íleon un 7,5%. Probablemente, el menor poder bactericida de los aceites esenciales y sus componentes en el contenido intestinal respecto al ácido fórmico puede deberse a una baja concentración de los mismos en estos tramos más distales del intestino delgado y grueso. Según Michiels *et al.* (2010), entre un 25-39% del timol y carvacrol administrado a través de la alimentación es absorbido en el estómago, y sobre un 50-66% se absorbe en la parte más proximal del intestino delgado, por lo que una concentración baja de estos compuestos en el resto del tramos del intestino puede no ejercer su efecto antimicrobiano de manera efectiva sobre ciertos grupos de bacterias. Como han puesto de relieve algunos autores (Piva *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2009; Grilli *et al.*, 2010), la microencapsulación u otro tipo de formulación, en la que el compuesto de interés queda protegido, favorecen una liberación más lenta a lo largo del intestino, aumentado así su efecto sobre toda la longitud del mismo. Sin embargo, Michiels *et al.* (2010) no encontraron diferencias en la liberación y absorción de timol en el intestino cuando este se administró encapsulado y sin encapsular.

No obstante, como ya se ha comentado, ninguna de las diferencias encontradas en la cantidad de enterobacterias a lo largo del intestino, son estadísticamente significativas.

Si comparamos los recuentos de enterobacterias presentes en el yeyuno obtenidos por ambos métodos (**Figura IV.21**) observamos que no siguen exactamente la misma tendencia, además de que, al contrario de lo esperado, los valores hallados son un 13,4% superior de media con los métodos microbiológicos tradicionales. Normalmente, la cantidad mínima cuantificable de bacterias mediante PCR en tiempo real es mayor, ya que un porcentaje de

bacterias del intestino están muertas o son viables pero no son cultivables, por lo que cabría esperar mayores recuentos con este método (Huijsdens *et al.*, 2002; Khan *et al.*, 2007). Las diferencias observadas entre métodos son solo significativas estadísticamente para el tratamiento con AE de *Thymus zygis* ($p < 0,05$), pero además, cabe destacar las diferencias observada en el grupo Mezcla, ya que el análisis estadístico establece un valor $p = 0,058$. En contraposición a estos resultados, la comparación entre ambos métodos realizada por Castillo *et al.* (2006) muestra valores más altos con el uso de RT-PCR que con métodos microbiológicos tradicionales, cuando se cuantifican bacterias totales, enterobacterias y lactobacilos. Sin embargo, otros autores (Nadkarni *et al.*, 2002) observan, al diseñar y evaluar cebadores universales para estimar la carga bacteriana total, valores similares de bacterias independientemente del uso de PCR en tiempo real o del recuento de colonias.



Distintas letras en minúscula indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Figura IV.21. Comparación de los resultados obtenidos en la cuantificación de enterobacterias (ENT) en yeyuno de cerdos, por métodos de recuento microbiológico tradicionales (log ufc/g) y por PCR en tiempo real (log copias gen/g).

Por el contrario, diversos autores han informado de la obtención de falsos negativos con el uso de PCR clásica y PCR en tiempo real (Papin *et al.*, 2004; Cattoli *et al.*, 2009; Bacich *et al.*, 2011). Así, en la comparación de los métodos de cultivo bacteriano tradicional y PCR en tiempo real realizada por Rovai *et al.* (2014) sobre distintos grupos de bacterias presentes en la leche de cabra y oveja, la identificación de *Streptococcus* spp. y *Enterobacteriaceae* mediante PCR fue fallida mientras que si fueron cultivables mediante métodos tradicionales. Además, aunque para la extracción de ADN del contenido intestinal se utilizó un kit comercial específico para muestras fecales (QIAamp Stool Mini Kit-Qiagen), estas muestras biológicas complejas contienen sustancias inhibitoras que pueden reducir la eficiencia de la amplificación (Al-Soud y Rådström, 2000). Por otro lado, los métodos microbiológicos tradicionales dependientes de cultivo presentan limitaciones como su larga duración, el sesgo que introducen debido al propio cultivo, la recuperación únicamente de especies cultivables de la microbiota intestinal y su baja sensibilidad, lo que puede llevar a la sobreestimación de algunas especies y la subestimación de otras (Gueimonde y Salminen, 2004). Sin embargo, respecto a la sensibilidad de los métodos dependientes de cultivo, Xu *et al.* (2012) encontraron, al comparar con métodos independientes de cultivo, una mayor sensibilidad de las técnicas tradicionales, con el consiguiente riesgo de falsos positivos.

No obstante, cabe señalar que el contenido intestinal usado para la cuantificación por un método y otro procede de porciones contiguas del intestino, y no de una misma muestra homogeneizada y dividida para la realización de las dos técnicas, con el fin de mantener la esterilidad de las distintas porciones en el momento de la toma de muestras. La porción más distal de las dos utilizadas para la cuantificación bacteriana en yeyuno se utilizó para la microbiología tradicional, mientras que la más proximal se usó para la técnica de RT-PCR. Teniendo en cuenta, como sugieren Roca *et al.* (2014), que el yeyuno distal y el ciego son las secciones donde las poblaciones bacterianas pueden verse alteradas más rápidamente debido a factores generadores de estrés, pequeñas variaciones en la microbiota podrían explicar, en parte, los resultados obtenidos en nuestro estudio en cuanto a las diferencias entre un método y otro.

Los métodos dependientes e independientes de cultivo deberían ser usados como complementarios, principalmente si el objetivo de estudio está relacionado con la evaluación de un riesgo para la salud pública (Vaz-Moreira *et al.*, 2011). Sin embargo, y aunque los métodos moleculares presentan un elevado coste, la rapidez en la detección y cuantificación respecto al cultivo microbiológico tradicional y su mayor precisión, especificidad y reproducibilidad cuando estos métodos son comparados en diferentes matrices (Khan *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2014), hacen de la técnica de PCR en tiempo real un método más adecuado para la cuantificación bacteriana.

A continuación se presentan dos tablas resumen con los recuentos obtenidos por medio de los métodos tradicionales dependientes de cultivo (**Tabla IV.3**) y mediante PCR en tiempo real (**Tabla IV.4**).

Tabla IV.3. Tabla resumen con medias y desviaciones estándar de los recuentos microbianos por métodos tradicionales (log ufc/g), de contenido intestinal de yeyuno de cerdos de 9 semanas destetados precozmente.

	Control DFK	Mezcla	Thymbra	Zygis
Mesófilos aerob. tot.	6,94±1,09	7,32±1,03	7,40±1,08	7,99±1,22
<i>Escherichia coli</i>	5,65±0,96	6,31±1,80	6,59±0,88	6,15±1,17
<i>Clostridium s-r</i>	1,28±1,07	1,15±1,30	0,92±1,02	1,94±0,96
<i>Lactobacillus spp.</i>	9,12±2,28	8,90±1,37	10,32±0,93	8,91±1,41
Enterobacterias	6,15±1,46	6,92±0,87	6,85±1,39	7,13±1,33
Índice L:E	1,50±0,31	1,29±0,10	1,55±0,28	1,27±0,22

Tabla IV.4. Tabla resumen con medias y desviaciones estándar de los recuentos de bacterias totales (TOT) y Enterobacterias (ENT) por PCR en tiempo real (log copias gen/g), de contenido intestinal de cerdos de 9 semanas destetados precozmente.

		Control DFK	Mezcla	Thymbra	Zygis
Yeyuno	TOT	7,25±0,44	7,36±0,38	7,38±0,40	7,40±0,25
	ENT	5,62±0,87	5,83±1,02	6,04±0,97	5,89±0,90
Íleon	TOT	7,27±0,45	7,48±0,41	7,30±0,85	7,23±0,50
	ENT	5,07±1,01	6,22±0,86	6,18±1,07	5,65±1,04
Cólon	TOT	8,69±0,09	8,77±0,09	8,68±0,09	8,75±0,06
	ENT	5,48±0,65	6,21±0,63	5,65±0,94	5,77±0,65

IV.2.3 Transferencia de fenoles a la carne y al plasma de cerdos alimentados con aceites esenciales.

Mediante cromatografía líquida se detectan y cuantifican los fenoles de interés, carvacrol y timol, presentes en el pienso, así como en el plasma de la sangre recogida en el momento del sacrificio, y en los músculos *Longissimus dorsi* y los músculos semimembranoso y semitendinoso, con el fin de comprobar la transferencia y/o acumulación de estos fenoles en la sangre y en dos de las partes más apreciadas para el consumo, correspondientes a lomo y jamón, respectivamente.

IV.2.3.1 Técnica de extracción de fenoles.

Determinados los métodos que seguiremos para la extracción de los fenoles carvacrol y timol de cada una de las matrices de estudio (músculo *Longissimus dorsi*, músculos semimembranoso y semitendinoso, y plasma de cerdo), se realiza el cálculo de los porcentajes de recuperación de estos dos fenoles y de los límites de detección (LDD) y de cuantificación (LDC) obtenidos en las tres matrices.

IV.2.3.1.1 Límite de detección y de cuantificación.

Para ensayos cuantitativos se suelen definir dos límites, el límite de detección (LDD) y el límite de cuantificación (LDC). El LDD se define como la cantidad más baja, distinta de un blanco y por encima de la señal de fondo del sistema, que puede ser detectada de forma fiable, mientras que el LDC se define como la más baja concentración de analito que puede ser medida cuantitativamente con un aceptable nivel de incertidumbre (Hopkins y Barwick, 2008).

En la **Tabla IV.5** se observan los valores del límite de detección y del límite de cuantificación obtenidos para cada matriz y técnica de extracción. Como apuntan Van De Steene y Lambert (2008), el efecto matriz es uno de los mayores problemas que surgen al desarrollar un método de análisis, por lo que el límite de detección dependerá tanto del instrumental utilizado para la

detección y el analito de estudio, como de la composición de dicha matriz (Rosseau, 2001).

Tabla IV.5. Límites de detección y cuantificación (ppb).

		<i>L. dorsi</i>		Semimembranoso y Semitendinoso		Plasma	
		LDD	LDC	LDD	LDC	LDD	LDC
Carvacrol	Con enzima	2,38	7,92	11,66	38,87	n.d.	n.d.
	Sin enzima	3,49	11,63	9,60	32,01	n.d.	n.d.
Timol	Con enzima	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	Sin enzima	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

LDD: Límite de detección

LDC: Límite de cuantificación

n.d.: No detectado

IV.2.3.1.2 Recuperaciones.

Para el correcto cálculo de la concentración de fenoles en cada muestra se realiza previamente el cálculo de la recuperación de los fenoles en estudio para cada método de extracción elegido y en cada una de las matrices, tras añadir una concentración conocida de patrones a una muestra control.

Tabla IV.6. Porcentajes de recuperación de carvacrol y timol en las distintas matrices.

		<i>L. dorsi</i>	Semimembranoso y Semitendinoso	Plasma
Carvacrol	Con enzima	82,4	85,6	98,7
	Sin enzima	72,4	74,4	94,1
Timol	Con enzima	88,9	91,3	99,2
	Sin enzima	76,8	82,5	97,5

En la **Tabla IV.6** se presentan los porcentajes de recuperación de cada compuesto en los músculos de las patas traseras y en el lomo de cerdo mediante extracción con metanol en un sistema tipo Soxhlet, y en plasma de cerdo con una extracción química con acetonitrilo, con tratamiento enzimático previo y sin él en ambas extracciones.

IV.2.3.2 Cantidad de fenoles ingeridos en la dieta.

El pienso de los animales es analizado antes del comienzo del estudio para determinar la cantidad real de carvacrol y timol presente en el alimento. El análisis mediante cromatografía líquida refleja una cantidad de fenoles en cada uno de los piensos que se observa en la **Tabla IV.7**, y que corresponden a una cantidad de aceite esencial de *Thymbra capitata* y *Thymus zygis* sub. *gracilis* en el pienso del 0,16%.

Tabla IV.7. Cantidad de fenoles en pienso (mg/g).

	Carvacrol	Timol
Mezcla	0,623	0,513
Thymbra	1,177	0,005
Zygis	0,069	1,020

Tabla IV.8. Cantidad de fenoles totales ingeridos por los cerdos en todo el periodo de transición (g).

	Carvacrol	Timol
Mezcla	11,441	9,421
Thymbra	22,290	0,107
Zygis	1,277	18,852

Teniendo en cuenta la cantidad de alimento ingerido por los animales durante las seis semanas de tratamiento, correspondientes a la fase de transición, y la cantidad de fenoles presentes en los distintos piensos, se

obtiene la cantidad total de carvacrol y timol ingeridos durante todo el período de estudio (**Tabla IV.8**).

IV.2.3.3 Transferencia de fenoles terpénicos de aceite esencial a la carne de cerdo.

Los aceites esenciales son mezclas complejas de numerosas moléculas, y según Bakkali *et al.* (2008) aún se debe dilucidar si sus efectos biológicos son el resultado de un sinergismo de todas estas moléculas o de la actividad de los principales compuestos presentes en mayor cantidad en el aceite. Estos mismos autores consideran que, para fines biológicos, el uso de un aceite esencial completo proporciona mayor información que el estudio de algunos de sus principales componentes por separado.

El metabolismo o transformación biológica de moléculas externas al organismo es un proceso que generalmente conduce a la detoxificación y al incremento de la solubilidad en agua de estas sustancias para poder ser excretadas, siendo el hígado el lugar principal de metabolización, aunque las distintas moléculas también pueden ser metabolizadas en el intestino –tanto en el lumen como en la mucosa intestinal-, los riñones, pulmones, tejido nervioso y el plasma (Lemke, 2003). Normalmente, este proceso puede incluir una o dos fases de metabolismo. En las reacciones de fase I, en la que intervienen comúnmente enzimas monooxigenasas de citocromo P450, monooxigenasas de flavina e hidrolasas, se introduce en la molécula un grupo polar reactivo que la convertirá en un sustrato adecuado para reacciones de fase II. En estas reacciones de fase II, normalmente, las enzimas de conjugación incorporan a la molécula sustitutos endógenos a través de reacciones de acetilación, sulfatación, glucuronidación y conjugación con aminoácidos, que generalmente conducen a una inactivación de la molécula, y que aumentan su solubilidad en agua para hacerlo más fácilmente excretable (Lemke, 2003; Hodgson, 2011).

Un gran número de compuestos monoterpénicos experimentan una amplia glucuronidación *in vivo*, por lo que la cuantificación de los conjugados requiere de una hidrólisis enzimática (Chan, 2001). Así, este ensayo se centra en la detección en carne de los fenoles carvacrol y timol, y de sus formas

glucuronizadas como consecuencia de los procesos de biotransformación, para conseguir un acercamiento a la cantidad total de estos compuestos acumulada en el músculo.

Los datos obtenidos concernientes a la cantidad de fenoles acumulados en carne reflejan que, en este sentido, los músculos *Longissimus dorsi* y músculo semimembranoso y semitendinoso, pertenecientes a lomo y patas traseras, respectivamente, se comportan de diferente forma en cuanto a metabolismo y acumulación de estos compuestos se refiere.

Tabla IV.9. Cantidad de carvacrol y timol (ppm) encontrada en lomo de cerdos (músculo *Longissimus dorsi*) alimentados con aceites esenciales de PAM.

	Carvacrol		Timol	
	Con enzima	Sin enzima	Con enzima	Sin enzima
Mezcla	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Thymbra	0,112±0,014	0,05±0,021	n.d.	n.d.
Zygis	n.d.	n.d.	0,028±0,003	n.d.

n.d.: No detectado.

En la **Tabla IV.9** se muestra la cantidad de carvacrol y timol presente en el músculo *Longissimus dorsi*, en los tres tratamientos con aceites esenciales, cuando este es sometido a una hidrolización enzimática previa o no. Cuando las muestras de lomo se tratan con enzima β -glucuronidasa, donde se valoran los compuestos en forma libre (aglicona) más aquellos que se encuentran formando conjugados con ácido glucurónico, se detecta carvacrol y timol en los grupos donde es el compuesto mayoritario en el pienso, observándose, además, que la cantidad de carvacrol acumulada en lomo es cuatro veces mayor a la de timol. Cuando se miden los principios activos que se encuentran en forma libre, sin realizar una hidrolización enzimática previa de las muestras, encontramos solamente carvacrol en el grupo Thymbra mientras que en el resto de grupos no se detecta ninguno de los dos fenoles estudiados.

Tanto carvacrol como timol tienen carácter lipofílico, y es su coeficiente de partición ($\log P$ octanol/agua), que refleja la lipoficidad de una molécula, el que parece influir en la penetración de fenoles a través de células epiteliales (Silderberg *et al.*, 2006). Un mayor coeficiente de partición se asocia a un incremento en la penetración de terpenos (El-Kattan *et al.*, 2001), y dados los coeficientes de estos dos compuestos $-\log P$ octanol/agua de carvacrol 3,64 y $\log P$ octanol/agua de timol 3,28- el carvacrol sería mejor absorbido en el epitelio intestinal (El-Kattan *et al.*, 2001; Ultee *et al.*, 2002), razón por la cual podría llegar a acumularse en este músculo más fácilmente que el timol.

Además, como apuntan De Boer *et al.* (2005), la distribución en los diferentes tejidos dependerá de otros factores, ya que observaron que en ratas la mayor concentración de quercetina se producía en los pulmones, mientras que en cerdos los tejidos diana eran principalmente hígado y riñón, poniendo de manifiesto que el metabolismo de cada compuesto es particular para cada tejido y especie animal. En este sentido, también Serrano *et al.* (2007) encontraron un comportamiento diferente en moléculas terpénicas en relación a su acumulación en distintos tejidos adiposos de terneros alimentados con aceites esenciales.

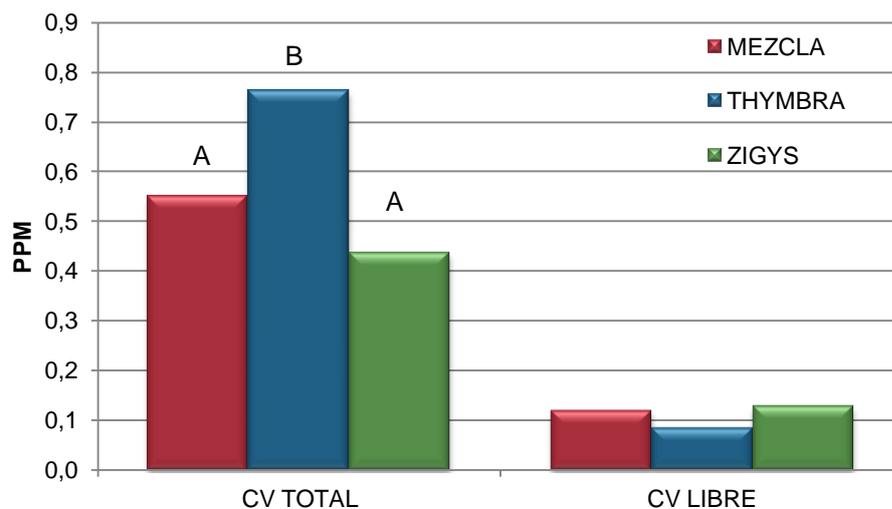
Por otro lado, teniendo también en cuenta que cada individuo posee su propio patrón de isoenzimas, y que existe una gran variedad de enzimas metabolizadoras, se obtiene como resultado una respuesta variable a los distintos componentes de la dieta (Van Bladeren, 1997).

Según los datos obtenidos, al comparar los resultados del análisis con enzima (conjugado y forma libre) o sin enzima (forma libre), se observa que el 57,7% del carvacrol detectado en lomo se encuentra conjugado con ácido glucurónico.

Al analizar los fenoles presentes en la carne del músculo semimembranoso y semitendinoso de las patas traseras se observa que la forma libre, tanto de carvacrol (**Figura IV.22**) como de timol (**Figura IV.23**), es significativamente menor a la cantidad total de compuesto obtenida cuando se tratan las muestras con enzima ($p < 0,01$), es decir, que la mayoría de estos compuestos en las extremidades posteriores se encuentran en forma conjugada

con ácido glucurónico (Mezcla: carvacrol 78,1% y timol 66%; Thymbra: carvacrol 88,7% y timol 62,5%; Zygis: carvacrol 70,4% y timol 92,2%).

Parece lógico pensar que la forma glicosilada con ácido glucurónico sea acumulada en mayor cantidad en los tejidos respecto a su forma aglicona ya que según Clifford (2004), solo un 5% o 10% de los fenoles, polifenoles y taninos consumidos con la dieta se absorben al inicio del intestino delgado, y de esa parte un 95% pasa a la circulación de mamíferos como conjugados, mientras que solo el 5% aproximadamente, pasa al plasma sin modificar. Normalmente, la forma aglicona es metabolizada formando sulfatos, glucuronidos y/o metabolitos metilados a través de la acción de las Sulfotransferasas (SULT), uridine-5'-difosfato glucuronosiltransferasas (UGTs) y catecol-O-metiltransferasas (COMT), respectivamente, y una vez en la sangre los metabolitos pueden sufrir más conversiones en el hígado, donde la circulación enterohepática de la bilis puede devolverlos al intestino delgado (Crozier *et al.*, 2009). Concretamente, La detoxificación de fenoles implica, principalmente, la conjugación del grupo hidroxilo con sulfato y ácido glucurónico (Shangari *et al.*, 2005), sin embargo las proporciones relativas que se producen de cada metabolito varían entre especies, observándose en el cerdo un defecto en la conjugación con sulfato, por lo que la excreta de fenoles se produce exclusivamente en forma de glucurónido (Hodgson, 2011), y será mayormente acumulado de esta forma en los tejidos. El 90 o 95% de la ingesta total de estos compuestos, más algunos glucuronidos excretados a través de la bilis, no se absorben y son metabolizados por la microbiota del colon (Clifford, 2004). Las bacterias intestinales, gracias a sus β -glucuronidasas pueden liberar agliconas de los metabolitos conjugados en la bilis, pudiendo, estas agliconas, ser reabsorbidas durante el ciclo enterohepático (Coldham y Sauer, 2000).



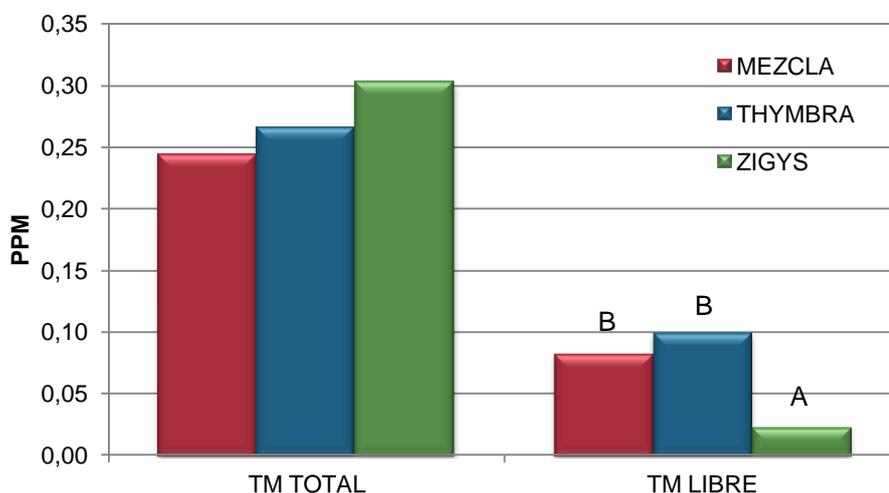
Distintas letras en mayúscula indican diferencias significativas ($p < 0,01$).

Figura IV.22. Cantidad de carvacrol total y libre presente en el músculo semimembranoso y semitendinoso de cerdos alimentados con aceites esenciales de PAM.

En la **Figura IV.22** se muestran los valores de carvacrol obtenidos del análisis del músculo semimembranoso, con y sin tratamiento enzimático previo. El carvacrol total encontrado en los animales del grupo Thymbra es, con 0,763 ppm, significativamente mayor al encontrado en los grupos Mezcla y Zygis, que presentan valores semejantes con un valor medio de 0,5 ppm. Sin embargo, aunque la cantidad de carvacrol libre encontrado en los tres grupos es semejante, con una media de 0,11 ppm, se observa que el grupo Thymbra presenta la menor concentración del compuesto en forma libre.

En cuanto a la concentración de timol total (conjugado y libre) encontrado en el músculo semimembranoso y semitendinoso (**Figura IV.23**) no se observan diferencias significativas entre grupos, siendo en los animales alimentados con AE de *Thymus zygis*, rico en este fenol, donde mayor cantidad se acumula. Los otros dos grupos experimentales presentan valores muy semejantes, con una media de 0,25 ppm. En cambio, la forma libre de timol se halla en menor

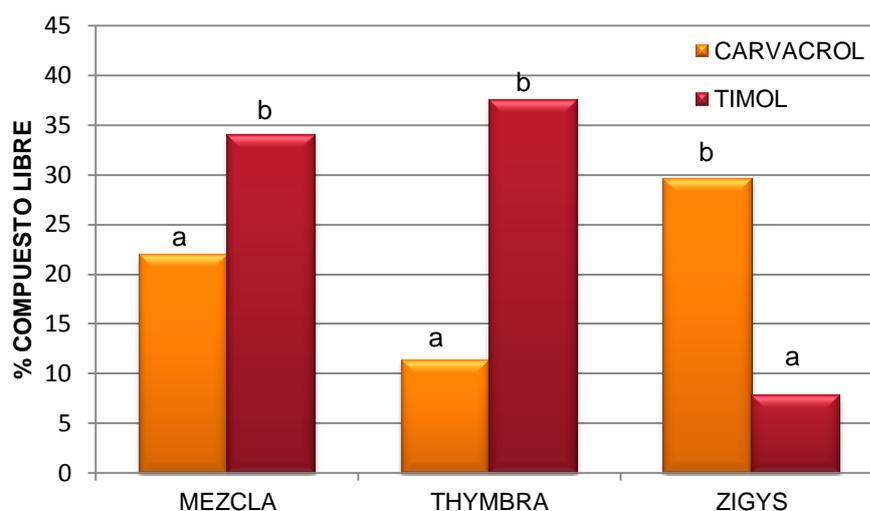
cuantía en el grupo Zygis, siendo estadísticamente diferente a la encontrada en los grupos Mezcla y Thymbra.



Distintas letras en mayúscula indican diferencias significativas ($p < 0,01$).

Figura IV.23. Cantidad de timol total y libre presente en el músculo semimembranoso y semitendinoso de cerdos alimentados con aceites esenciales de PAM.

Inciendo en el porcentaje de compuesto libre de fenoles encontrado en los músculos de las patas traseras, respecto a la cantidad total, se observa en la **Figura IV.24** que existen diferencias estadísticas entre las cantidades de carvacrol y timol halladas en todos los grupos. Cabe destacar que en el tratamiento con AE de *Thymbra capitata*, rico en carvacrol, y en el tratamiento con *Thymus zygis*, rico en timol, el fenol en forma libre predominante en los músculos de las extremidades posteriores es el que se encuentra en menor concentración en estos aceites, por lo que es menos ingerido por los animales. En el tratamiento con mezcla de AE, donde el carvacrol es ligeramente predominante en el pienso, se observa, sin embargo, que la cantidad de timol en forma libre es mayor a la de carvacrol.



Distintas letras en minúscula indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Figura IV.24. Cantidad de carvacrol y timol encontrada en forma libre en el músculo semimembranoso y semitendinoso de cerdos alimentados con aceites esenciales de PAM.

Diversos autores señalan que los compuestos de plantas que se introducen a través de la dieta pueden modular el metabolismo mediante la inducción o inhibición de enzimas involucradas en la biotransformación (Van Bladeren, 1997; Langouët *et al.*, 2000; Lampe y Peterson, 2002): Atendiendo a esto, la mayor concentración de carvacrol y timol en su forma libre en los músculos de los animales donde es mayor su ingesta podría activar el metabolismo, aumentando proporcionalmente su forma glucuronizada frente a su forma libre, lo que explicaría las bajas cantidades en forma libre observadas respecto a los otros tratamientos.

Considerando la cantidad media de fenoles ingerida por animal durante el ensayo, y que el peso medio final de los animales utilizados para la toma de muestras ($n=8$) es de 19,70 kg en el grupo Mezcla, 19,16 kg en el grupo Thymbra y 19,37 kg en el grupo Zygis, se obtiene la cantidad, en ppm, consumida por animal durante todo el ensayo, y comparando estos valores con las cantidades de carvacrol y timol obtenidos en la carne de estos animales, se

calcula el porcentaje de acumulación real que se produce de estos compuestos en el músculo, que se muestran a continuación en una tabla resumen (**Tabla IV.10**).

Otros autores también han observado una transmisión de compuestos de la dieta a los tejidos. Así, Serrano *et al.* (2007) observaron en terneros alimentados con aceites esenciales, una acumulación de moléculas terpénicas en distintos tejidos adiposos. Asimismo, se encontró un incremento significativo de compuestos polifenólicos en la carne de corderos lactantes cuando sus madres fueron alimentadas con hojas destiladas de romero, mejorando, además, el estado oxidativo de estas carnes (Moñino *et al.*, 2008).

Por otro lado, Zitterl-eglseer *et al.* (2008), tras la alimentación de cerdos destetados precozmente con una mezcla de aditivos vegetales ricos en carvacrol y timol, recuperaron estos compuestos en plasma, heces y riñón, mostrando el papel de este tejido en la excreción de aceites esenciales y su metabolitos a través de la orina. Sin embargo, y en contraposición a los resultados obtenidos en nuestro estudio, ni estos compuestos ni metabolitos derivados de ellos fueron detectados en muestras de carne.

Tal como muestran los resultados de acumulación de los compuestos fenólicos en el músculo semimembranoso y semitendinoso de las patas traseras de cerdo, parece que, en el caso del timol, existe una cantidad determinada de este compuesto acumulable por el músculo que sería independiente de la cantidad ingerida. Esto explicaría que la cantidad encontrada en el músculo en el grupo Mezcla sea ligeramente menor a la encontrada en el grupo Thymbra, cuando éste ingiere cerca de un 99% menos de compuesto. Así, el valor medio de timol encontrado en los tres grupos en este músculo se sitúa en $0,27 \pm 0,030$ ppm, con lo que la pequeña desviación estándar obtenida entre los valores indicaría la existencia de un mínimo y un máximo de acumulación de timol extremadamente próximos, o de una cantidad más o menos fija de timol que es capaz de acumular el músculo semimembranoso, y cuya fluctuación dependería más del propio metabolismo del músculo y del animal que de la cantidad de compuesto consumida.

En el caso del carvacrol, el valor medio de lo acumulado en el músculo en los tres grupos es de $0,58 \pm 0,165$ ppm, cuya desviación estándar sugiere también la existencia de un máximo y un mínimo de acumulación del compuesto en los músculos de las patas traseras, ligeramente más amplio al del timol, e independiente de la cantidad ingerida.

Tabla IV.10. Cantidad de fenoles acumulada en los músculos semimembranoso y semitendinoso de cerdos en relación al peso vivo del animal (ppm).

		Consumido con la dieta	Semimembranoso y Semitendinoso	% Acumulación
Mezcla	Carvacrol	580,746	0,551	0,095
	Timol	478,207	0,243	0,051
Thymbra	Carvacrol	1163,345	0,763	0,066
	Timol	5,584	0,266	4,763
Zygis	Carvacrol	65,933	0,437	0,663
	Timol	973,255	0,302	0,031

Así, a pesar de la cantidad acumulada de fenoles ingerida durante el experimento no se produce un incremento drástico en los tejidos, al menos en términos de fenoles totales. En este sentido, los ensayos realizados por Moñino *et al.* (2008) no observaron un aumento en la cantidad de polifenoles en carne cuando los animales fueron alimentados con dieta suplementada con una mayor concentración de romero, incluso en el caso del ácido carnósico la cantidad encontrada en carne fue significativamente menor en los animales con mayor cantidad de romero en la dieta. Como sugieren Serrano *et al.* (2007), el exceso de compuesto puede haber sido mal absorbido a lo largo del tracto digestivo o los procesos de eliminación pueden haber actuado correctamente previniendo la acumulación de terpenos en los tejidos en cantidades excesivas, por ello sería más elevada la cantidad acumulada relativa en la carne a la que llega una menor cantidad de compuesto. También Kohlert *et al.* (2000) concluyen que una elevada acumulación de terpenos volátiles es improbable, considerando el alto volumen de distribución de estos compuestos y su rápida eliminación, que se produce de media en una hora.

IV.2.3.4 Detección de fenoles en plasma de cerdo.

En el plasma obtenido a partir de la sangre tomada de los animales en el momento del sacrificio no se detecta carvacrol ni timol en ninguno de los tratamientos.

A pesar de que la glucuronidación en cerdos parece ser más probable que la conjugación con sulfatos (Hodgson, 2011), Kohlert *et al.* (2002) encuentran que en el plasma humano el timol es detectado solo en forma de timol sulfato, mientras que su forma libre y conjugada con ácido glucurónico no se observa. Parece, además, que los terpenos experimentan una rápida distribución desde la sangre a los tejidos (Kohlert *et al.*, 2000), por lo que el tiempo transcurrido desde la última ingesta de los cerdos hasta su sacrificio y recolección de la sangre (aproximadamente 2 horas) puede haber sido suficiente para encontrar niveles no detectables en el plasma de los animales.

Asimismo, entre un 6% y un 8%, aproximadamente, del peso de un animal se debe al volumen de sangre, es decir, que animales como los utilizados en este experimento pueden tener de 1,1 a 1,5 litros de sangre. La extracción de carvacrol y timol se realiza a partir de un volumen de 5 ml de plasma, obtenidos de unos 12,3 ml de sangre, con lo que esta cantidad constituye entre el 0,82% y el 1,12% del volumen total de sangre, porcentaje quizá insuficiente para detectar estos compuestos en el plasma.

IV.2.4 Efecto de la alimentación sobre la carne de cerdo.

Dado que la alimentación es un factor importante que influye en la calidad de la carne (Apple, 2007; Boler *et al.*, 2009), se estudia el efecto de los aceites esenciales ensayados sobre algunos parámetros físico-químicos de la carne fresca y sobre las preferencias sensoriales de los consumidores en carne cocinada.

IV.2.4.1 Parámetros físico-químicos de la carne.

Los parámetros de calidad medidos en la carne fresca son: pH, capacidad de retención de agua, medida como pérdidas de agua por goteo, y color. Estos atributos están fuertemente interrelacionados entre sí. El color y capacidad de retención de agua dependen básicamente del metabolismo del glucógeno y de las condiciones en que se realizan los cambios de pH durante la transformación *post mortem* del músculo a carne (Sterten *et al.*, 2009).

IV.2.4.1.1 pH.

La calidad final de la carne está influida en gran medida por la temperatura y el descenso del pH durante la conversión del músculo en carne en la primera hora después del sacrificio. En cuanto éste se produce se elimina el aporte de oxígeno, forzando metabólicamente al músculo a una glicólisis anaerobia que degrada las reservas de glucógeno del músculo, y produce y acumula, a su vez, ácido láctico que provocará la caída de pH típica de este proceso (Scheffler y Gerrard, 2007; Bañón, 2012). La degradación del glucógeno juega un papel principal en los cambios *post mortem* que tienen lugar en el tejido muscular y tiene un efecto considerable sobre la calidad de la carne de cerdo (Przybylski *et al.*, 2006). Estos mismos autores señalan que la cantidad de glucógeno en el músculo depende principalmente de la especie animal, y de las razas dentro de cada especie, así como del tipo de músculo, pudiendo ser modificada esta cantidad con la alimentación y el ejercicio.

La medida del pH del músculo *Longissimus dorsi* a los 45 minutos *post mortem* (pH_{45m}) proporciona información sobre la posible aparición de carnes

PSE (Pálida, Suave y Exudativa), mientras que la medida realizada en la carne del mismo músculo a las 24 horas después del sacrificio ($\text{pH}_{24\text{h}}$) informa principalmente sobre la aparición de carnes oscuras, duras y secas (DFD, por sus siglas en inglés), así como de los gérmenes, beneficiosos o patógenos, que pueden crecer en la carne, y su consiguiente conservación y vida útil (Rosenvold y Andersen, 2003; Guàrdia *et al.*, 2005; Holmer *et al.*, 2009).

Una carne PSE es normalmente el resultado de un acelerado índice de glicólisis *post mortem*, dando lugar a un pH bajo en el músculo mientras la temperatura de la canal permanece aún elevada, aproximadamente por encima de 35°C , lo cual causa una desnaturalización de las proteínas que se relaciona con una menor capacidad de retención de agua (CRA) (Bowker *et al.*, 2000, Huff-Lonergan y Page, 2001).

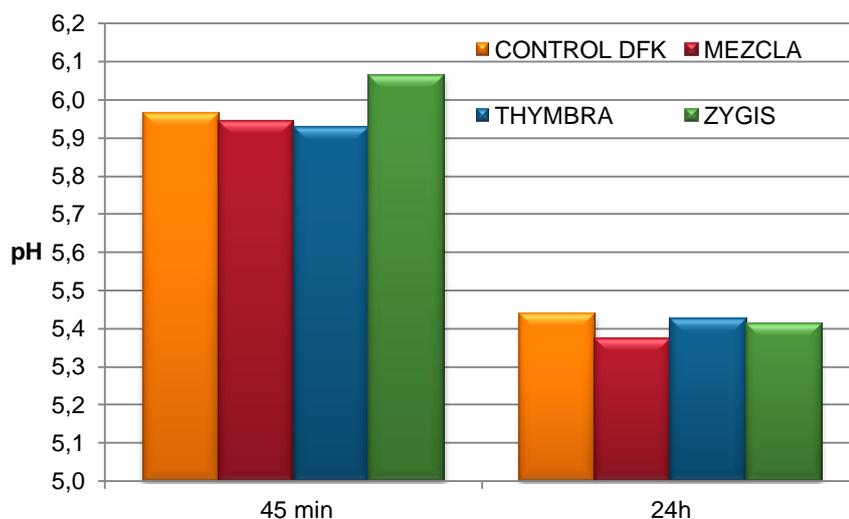


Figura IV.25. pH de la carne de cerdo medida en el músculo *Longissimus dorsi* a los 45 minutos y las 24 horas *post mortem*.

Como se observa en la **Figura IV.25**, aunque el análisis estadístico de los valores de pH del músculo *Longissimus dorsi* a los 45 minutos del sacrificio no revela diferencias significativas entre los tratamientos, la carne de los animales alimentados con *Thymus zygis* es ligeramente más básica ($6,07\pm 0,06$)

que la del resto de los grupos, que presentan una media de $5,94 \pm 0,02$. El valor más bajo ($5,93 \pm 0,06$) es el obtenido por el grupo *Thymbra*, que se mantiene, sin embargo, dentro de los niveles normales de pH para carne de cerdo definidos por Honkavaara (1988), cuyos valores se sitúan entre $5,8 < \text{pH} \leq 6,4$, y los usados por Candek-Potokar *et al.* (1998) y Ruusunen *et al.* (2007), que consideran carnes normales aquellas con un $\text{pH} > 5,9$ y $\text{pH} > 5,8$, respectivamente.

A las veinticuatro horas del sacrificio, la bajada de pH que ocurre al transformar el músculo en carne se produce de forma similar en todos los tratamientos, alcanzando un valor medio de $5,41 \pm 0,03$. En este caso tampoco son destacables diferencias estadísticas entre las distintas alimentaciones ensayadas. Algunos problemas en la calidad de la carne pueden ser atribuidos a los cambios de pH, causados en buena parte por las condiciones de estrés a las que se ven sometidos los animales antes del sacrificio, considerando que bajo condiciones ideales el pH final de la carne debe situarse en torno 5,5 (Elmore y Mottram, 2009). Cuando los animales sufren un estrés crónico el nivel de glucógeno en el músculo disminuye, por lo que se produce una menor cantidad de ácido láctico y, por tanto, se obtiene un mayor $\text{pH}_{24\text{h}}$ que será indicador de carnes DFD cuando su valor se sitúa por encima de 6, lo cual se relaciona con carnes con mayor riesgo de deterioro y menor vida útil (Warris, 2010). Sin embargo, la raza o línea genética y el ayuno anterior al sacrificio también influyen en los valores de pH finales, encontrando que aquellos animales que se alimentaron unas dos horas antes del sacrificio mostraron valores de $\text{pH}_{24\text{h}}$ significativamente menores a los que se mantuvieron en ayunas (van Laack *et al.*, 2001), lo cual podría explicar el pH ligeramente inferior a 5,5 encontrado en nuestros animales, ya que muchos de ellos accedieron voluntariamente al alimento inmediatamente antes del transporte al matadero, transcurriendo un tiempo aproximado de dos horas hasta el sacrificio. Asimismo, los valores de $\text{pH}_{24\text{h}}$, excepto el de la carne de los animales del grupo mezcla, que es ligeramente inferior, se encuentran dentro de los valores esperados por Ryu y Kim (2005) para carne de cerdo, mientras que Bidner *et al.* (2004) exponen que un pH final entre 5,4 y 6 ofrece una mejor calidad de consumo de la carne de lomo de cerdo fresca cocinada, así como un pH mayor mejoraría las

características tecnológicas de la carne destinada al procesado. Además, en línea con nuestros resultados, los ensayos llevados a cabo por Janz *et al.* (2007) en cerdos alimentados con aceites esenciales y oleorresinas de plantas aromático-medicinales muestran carnes con un pH final medio de 5,44, similar al encontrado en nuestros animales, mientras que ni la suplementación prolongada de la dieta con un extracto vegetal rico en compuestos fenólicos ni la adición de aceite esencial de orégano a la dieta mostraron, como en nuestro caso, diferencias en el pH a los 45 minutos ni en el pH final de la carne, respecto a un control (Simitzis *et al.*, 2010; Rossi *et al.*, 2013). Sin embargo, aunque Rossi *et al.* (2013) sí encontraron una mejora del estado oxidativo y la vida útil de la carne, la suplementación de la dieta con una mezcla de aceites esenciales de tomillo, romero y orégano no mejoró en otros casos la calidad de la carne de cerdo a nivel oxidativo (Yan *et al.*, 2010).

También cabe destacar que los valores de pH que se toman de referencia corresponden a ensayos sobre calidad de carne que se realizan en cerdos de talla comercial, de aproximadamente 100 kg de peso, y no sobre animales de nueve semanas, que en nuestro caso alcanzan un peso medio aproximado de 19 kg, con lo que los valores de pH podrían verse modificados por la edad y el peso. Así, Álvarez (2002) observó una caída de pH más brusca entre los 45 min y las 2 h *post mortem* en animales con un peso inferior a 60 kg, y estos valores aumentaron conforme se elevaba el peso de la canal.

IV.2.4.1.2 Capacidad de retención de agua.

La capacidad de retención de agua se define generalmente como la cualidad de la carne para retener la humedad, que puede ser aquella propia del tejido muscular o cualquier fluido que sea añadido a la carne en el procesado posterior (Huff-Lonergan, 2009). Este mismo autor expone que esta pérdida de agua suele ser medida en carne fresca como pérdidas por goteo y se conoce como el porcentaje de peso de la carne que se pierde debido a los fluidos que se liberan de los tejidos durante el almacenamiento sin aplicar ninguna fuerza mecánica aparte de la gravedad. Las pérdidas por goteo dependen principalmente del acortamiento de los sarcómeros, lo cual se regula por la

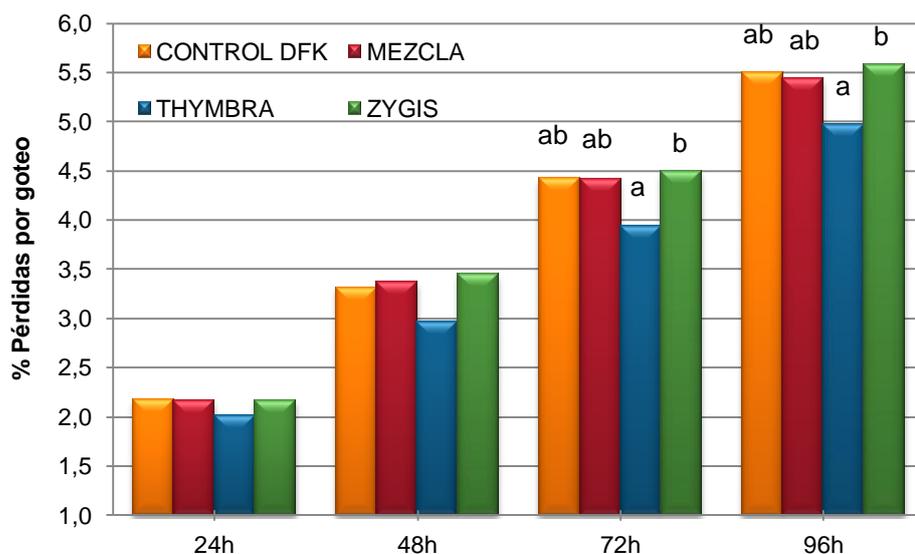
interacción de la temperatura del músculo y el desarrollo del rigor mortis (Fischer, 2007).

Así, el poder de retención hídrica de la carne constituye uno de los parámetros de calidad más importantes, en el cual, el valor de pH del músculo desempeña un papel de gran relevancia. Desde un punto de vista sensorial el pH incide en la textura, la jugosidad, el color y la dureza de la carne; desde un punto de vista nutricional se pueden originar pérdidas de agua, proteína, elementos minerales, vitaminas hidrosolubles, etc.; desde un punto de vista tecnológico, se produce goteo cuando el valor de pH es excesivamente bajo y las proteínas pierden su capacidad de ligar moléculas de agua cuando se acercan a sus puntos isoeléctricos, por el contrario, un pH elevado provoca hinchamientos en la carne por exceso de retención de agua. (Gil Hernández, 2010).

En la **Figura IV.26** se observa que la alimentación ensayada ejerce un efecto significativo sobre la capacidad de retención de agua de la carne, medida como pérdidas por goteo, de piezas obtenidas del músculo *Longissimus dorsi*.

En las veinticuatro primeras horas no se observan diferencias estadísticas en el porcentaje de pérdida de agua entre los grupos, siendo el valor medio de los tratamientos Control-DFK, Mezcla y Zygis de 2,17%, y algo inferior la pérdida de agua del grupo Thymbra (2,02%).

A las cuarenta y ocho horas las diferencias empiezan a hacerse notables entre el grupo alimentado con aceite de *Thymbra capitata* y el resto de grupos, que presentan una pérdida de agua media del 3,38 %. Aunque estas diferencias continúan sin ser significativas estadísticamente, se observa que el grupo Thymbra muestra una pérdida de agua un 10,3% menor a la del grupo Control.



Distintas letras en minúscula indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Figura IV.26. Valores medios de pérdida de agua por goteo en *Longissimus dorsi*, a lo largo del tiempo.

Tras setenta y dos horas se amplían las diferencias entre el grupo Thymbra y el resto de los grupos (4,45%), llegando a ser estadísticamente significativas ($p < 0,05$) con el grupo Zygis (4,50±0,34%). Respecto al grupo Control-DFK, aunque la pérdida de agua se reduce en un 11%, la diferencia no es estadísticamente significativa. Como señala Huff-Lonergan (2009), la medida de las pérdidas por goteo es dependiente del tiempo, y la cantidad perdida se incrementará con el paso de éste de una manera no-lineal.

A las noventa y seis horas se continúa con la misma tendencia, ampliándose, además, las diferencias entre el grupo Thymbra (4,97%) y el resto de los grupos (5,51%). En este caso, la pérdida de agua por goteo del grupo Thymbra es un 9,6% menor a la producida en el grupo Control-DFK, no encontrándose diferencias significativas entre ambos grupos. En cambio, sí se observan diferencias significativas ($p < 0,05$) entre el grupo Thymbra y el grupo Zygis, que sufre una pérdida de agua del 5,57%.

Aunque algunos autores exponen que una mayor caída en el pH a los 45 minutos en el músculo *Longissimus dorsi* da como resultado una mayor pérdida de agua por goteo (Ruusunen *et al.*, 2007), nuestros resultados muestran que la carne del grupo Thymbra, con un pH_{45m} ligeramente menor al resto, que podría llevar a obtener una carne más exudativa (Candek-Potokar *et al.*, 1998), es, sin embargo, la carne con menores pérdidas hídricas por goteo. Es común estimar indirectamente la capacidad de retención de agua a través de las medidas del color y el pH, que, aunque de gran importancia, explican solo una parte de la variación de las pérdidas por goteo (Prevolnik *et al.*, 2009).

De acuerdo con nuestros resultados, los ensayos llevados a cabo por Rossi *et al.* (2013) revelan que la suplementación de la dieta de cerdos con extractos de plantas (*Lippia* spp.) pueden disminuir hasta un 23% las pérdidas por goteo de la carne, aunque, como en nuestro caso, estas diferencias no son significativas respecto a un control. Tal y como exponen Traore *et al.* (2012) la pérdida de agua en la carne parece ser un proceso multifactorial, que se ve afectado, entre otras cosas, por la oxidación de las proteínas, por lo que el carácter antioxidante del carvacrol puede ser, en parte, responsable de las menores pérdidas de agua por goteo observadas en la carne de cerdos alimentados con aceite esencial de *Thymbra capitata*. Por el contrario, otros extractos vegetales como el de té verde, cuyos componentes polifenólicos poseen una potente actividad antioxidante, no produjeron ninguna mejora en la capacidad de retención de agua de carne de cerdo respecto a un control (Augustin *et al.*, 2008).

IV.2.4.1.3 Color CIELab.

Para el consumidor, el aspecto y el color de la carne de cerdo influyen de manera determinante en el momento de la compra, ya que constituye la única forma de valorar su calidad cuando está expuesta o empaquetada (Lindahl *et al.*, 2006). En el color de la carne influye el contenido en pigmentos, la reflectancia interna y la distribución de las formas de mioglobina, la forma reducida o desoximioglobina (Mb), la forma oxigenada u oximioglobina (MbO₂) y la forma oxidada o metamioglobina (MetMb) (Lindahl *et al.*, 2001). Según Young

y West (2001), una parte de la estructura de la mioglobina actúa como un almacén de oxígeno y es el responsable del cambio de color de rojo-púrpura de la carne recién cortada, asociado a la forma reducida de la mioglobina, a color rojo brillante cuando se expone al oxígeno y se une a él (MbO_2), produciéndose este cambio en cuestión de segundos. Sin embargo, estos mismos autores señalan que el paso a la forma oxidada de la mioglobina (MetMb) se produce con mayor lentitud a partir de la autooxidación de la MbO_2 , en el que la molécula pierde la capacidad de almacenar oxígeno y otorga a la carne una pigmentación marrón poco apreciada por el consumidor.

Se suele relacionar el aumento del pH con una mayor intensidad del color rosado de la carne (Brewer *et al.*, 2001), sin embargo, parece que la temperatura del músculo influye más que el pH sobre el color y la estabilidad del mismo (Mancini y Hunt, 2005), mientras que otros datos indican que el rango de pH y temperatura encontrados en el músculo *post mortem* no alterarían la mioglobina hasta el punto de explicar por sí solos los cambios de color observados en la carne, principalmente en aquellas con características PSE (Sauerland, 2008).

De las coordenadas CIELab estudiadas, el valor de a^* (verde/rojo) es el de mayor utilidad, principalmente en estudios de decoloración de carne fresca, mientras que los valores de L^* y b^* no se incluyen tan frecuentemente en estudios de decoloración, pero constituyen, sin embargo, un indicador de la luminosidad y de la coloración amarilla/azul de la carne, respectivamente (Faustman y Phillips, 2001).

Los valores de L^* y a^* que encuentran Simitzis *et al.* (2010) en carne de cerdos alimentados con aceite esencial de orégano están en línea con los obtenidos en nuestro estudio, no así aquellos valores observados al medir la coordenada b^* , mientras que el valor de todas las coordenadas de color medidas por Rossi *et al.* (2013) en el músculo *Longissimus dorsi* de cerdos alimentados con un extracto vegetal rico en polifenoles, es similar a nuestros resultados (**Tabla IV.11**).

Tabla IV.11. Coordenadas CIELab e índices de color del músculo *Longissimus dorsi* de cerdos de nueve semanas alimentados con aceites esenciales.

	Control DFK	Mezcla	Thymbra	Zygis
L*	51,10±1,57	51,60±1,66	51,93±0,85	51,12±1,22
a*	6,25±0,61	6,10±0,54	6,16±0,37	6,08±0,37
b*	1,85±0,22 ^A	2,24±0,27 ^B	1,92±0,21 ^A	1,86±0,21 ^A
C*_{ab}	6,47±0,67	6,49±0,61	6,43±0,43	6,37±0,40
h_{ab}	15,65±1,86 ^A	20,16±2,07 ^B	17,26±1,46 ^A	17,05±1,75 ^A

Distintos superíndices en mayúscula en la misma fila indican diferencias significativas ($p < 0,01$).

De las coordenadas CIELab medidas en este ensayo, se encuentran diferencias estadísticas en el valor de b^* ($p < 0,01$) entre el grupo de animales alimentados con la mezcla de aceites esenciales, el cual muestra el valor más alto para esta coordenada (más amarillo), y el resto de tratamientos, suponiendo un aumento del 17,3% respecto al grupo Control-DFK. Según exponen Lindahl *et al.* (2001), el amarilleamiento (valor de b^*) se ve influido principalmente por las distintas formas de mioglobina que se encuentran en la carne, mientras que la reflectancia interna influye poco en este valor y el contenido en pigmentos casi nada. Los ensayos llevados a cabo por Karamucki *et al.* (2013) confirman que al aumento del valor de b^* se debe a un incremento de la cantidad relativa de las formas de mioglobina oxigenada y oxidada (MbO_2 y MetMb) a costa de su forma reducida (Mb). Se considera que la suplementación de la dieta con compuestos de marcada actividad antioxidante ayuda a prevenir la oxidación lipídica, además de retardar la formación de MetMb cuando la carne está expuesta al aire, mejorando la estabilidad del color Young y West (2001). Dada la capacidad antioxidante de los aceites esenciales (Miguel, 2010), cabría esperar, en los grupos alimentados con estas sustancias, valores de b^* menores a los del grupo Control-DFK. Sin embargo, el extracto vegetal de *Lippia* spp. rico en antioxidantes introducido en la dieta de cerdos, también aumentó considerablemente, sin llegar a observarse una significación estadística, el valor de b^* respecto a un control (Rossi *et al.*, 2013). En contraste, la adición de una mezcla comercial de aceites esenciales de tomillo,

romero y orégano a la dieta disminuyó significativamente el valor de b^* (Yan *et al.*, 2010), mientras que en nuestros resultados no se observan diferencias, o se aumenta su valor, como en el caso de la dieta con la mezcla de los dos aceites esenciales ensayados.

Por otro lado, la alimentación no parece tener efecto sobre los valores de L^* y a^* , para los que no se encuentran diferencias significativas. De acuerdo con estos resultados, Lahucky *et al.* (2010) tampoco encontraron un efecto de la alimentación con extracto de orégano y otros extractos vegetales sobre las coordenadas L^* y a^* a las 24 h del sacrificio, sin embargo sí se observó a los cinco días de almacenamiento para los valores de a^* , que fueron significativamente mayores a los de un control.

En cuanto a los índices calculados a partir de las coordenadas CIELab solo en el ángulo de tono h_{ab} se observan diferencias, siendo el valor del grupo Mezcla estadísticamente superior a los otros grupos ($p < 0,01$), y presentando un aumento del 28,9 % respecto al grupo Control-DFK. El ángulo de tono h_{ab} se considera un buen predictor del pardeamiento de la carne (pérdida del color rojo y aumento del color amarillo) (Luciano *et al.*, 2009), sin embargo, como argumentan Hernández-Hernández *et al.* (2009), la oxidación de la Mb y la MbO₂ a MetMb, de color marrón, se asocia no solo a una reducción del color rojo de la carne (valores h_{ab} más altos) sino también a un descenso de los valores de C^*_{ab} , aspecto este último que no se observa en ninguno de los grupos con aceites esenciales, incluido el grupo M.

En contraposición a nuestros resultados, Lara *et al.* (2011) encontraron una disminución significativa de los valores de h_{ab} durante el almacenamiento de carne de cerdos alimentados con un extracto de romero en comparación con un control y otros productos antioxidantes, indicando la existencia de valores más cercanos al color rojo en estas carnes. También la adición directa de extracto de alubia azuki como antioxidante natural a salchichas de carne de cerdo disminuyó significativamente el valor de h_{ab} , mejorando la estabilidad del color de las mismas (Jayawardana *et al.*, 2011).

Sin embargo, otros autores como O'Grady *et al.* (2008) no encontraron efecto de la alimentación con un extracto vegetal antioxidante sobre el color ni otros parámetros físico-químicos de la carne aquí estudiados.

Los resultados de color de nuestro ensayo son obtenidos a las 24 horas después del sacrificio, sin embargo, sería interesante observar en posteriores estudios el efecto de la suplementación de la dieta con aceites esenciales sobre la estabilidad del color a lo largo del tiempo durante el almacenamiento en refrigeración.

IV.2.4.2 Evaluación sensorial de carne cocinada mediante un panel de consumidores.

II.2.4.2.1 Encuesta de consumo.

La prueba sensorial discriminatoria realizada en el Laboratorio de Plantas Aromático-Medicinales y de Extractos del IMIDA como ensayo preliminar sobre carne de lomo y de jamón (Díaz López, 2011) revela un porcentaje acertado de discriminación del 43,3%, en las piezas procedentes del jamón, frente al 31,7% registrado en las muestras procedentes del lomo.

Además, el análisis de fenoles en carne, cuyos resultados se explican más arriba (**apartado IV.2.3.3**), refleja una mayor acumulación de carvacrol y timol en músculos de las patas traseras que en el lomo de los animales. En base a esto y a la prueba sensorial preliminar realizada en carne de cerdo, se decide realizar el análisis sensorial entre consumidores no entrenados sobre hamburguesas elaboradas a partir de la carne del jamón de los animales usados en el experimento.

Para valorar las diferencias sensoriales entre las muestras de los distintos tratamientos y conocer los gustos de los consumidores se realiza una prueba discriminatoria triangular y un test de preferencia. A la hoja de cata se adjunta una encuesta de consumo (**Anexo 2**) con el fin de conocer el perfil y los hábitos de consumo de los catadores implicados en el estudio, así como una serie de cuestiones relacionadas con la opinión de los encuestados sobre los

productos naturales y la predisposición a la compra de alimentos con valor añadido.

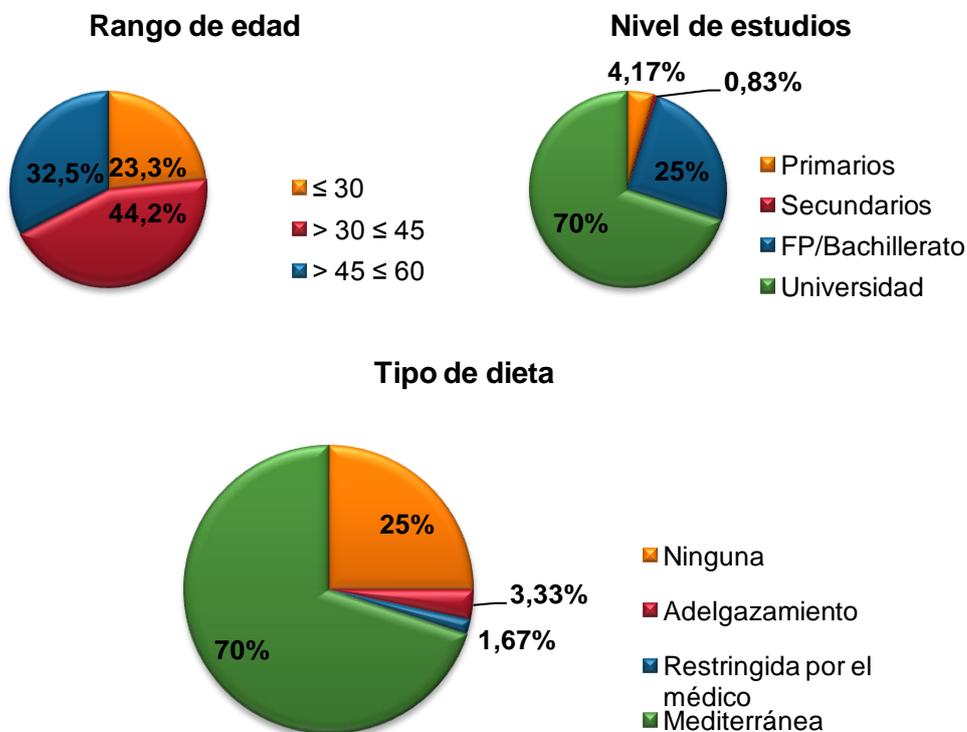


Figura IV.27. Características del panel de consumidores.

De los 302 catadores, el 50,8% son hombres y el 49,2% mujeres, y el 80% del total del panel son personas no fumadoras, y un 58% de los encuestados tienen hijos.

Las **Figuras IV.27** y **IV.28** muestran algunos aspectos del perfil de los catadores participantes de esta prueba. El intervalo de edad mayoritario se sitúa entre los 30-45 años y, ya que el cuestionario se realiza entre el personal del Instituto Murciano de Investigación Agraria y Alimentaria (IMIDA) mayoritariamente, el 70% de los consumidores encuestados posee titulación universitaria. Este mismo es el porcentaje de personas que sigue una alimentación variada tipo mediterránea frente a un 25% de personas que no sigue ningún tipo de dieta y un pequeño porcentaje de encuestados que lleva

una alimentación restringida por el médico o dieta de adelgazamiento. Respecto a los hábitos deportivos de los encuestados destacamos una mayoría de personas que practican una actividad física de intensidad media una vez por semana.

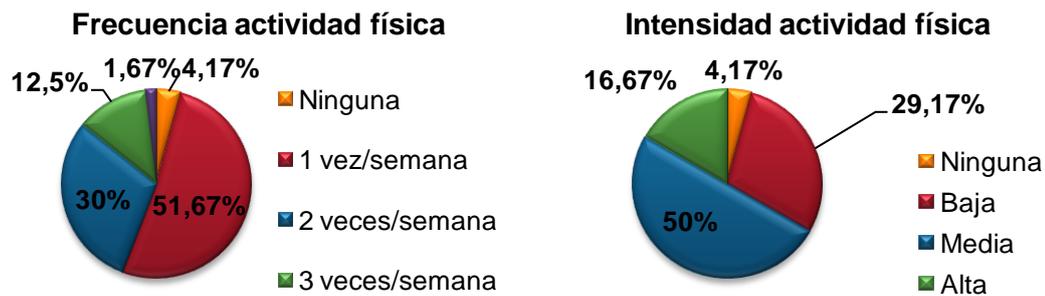


Figura IV.28. Hábitos deportivos del panel de consumidores.

Entre los factores que los encuestados consideran en el momento de la compra (**Figura IV.29**), la frescura del producto es señalada como muy importante por el 72,5% de los consumidores, mientras que un 44,2% considera el aspecto que presentan los alimentos como el factor más importante. Fortomaris *et al.* (2006) señalan que tanto la edad como el género o la procedencia, urbana o rural, del consumidor afectan de manera sustancial a sus preferencias en relación a la apariencia de la carne de cerdo, teniendo además en cuenta que estas preferencias varían enormemente entre países (Ngapo *et al.*, 2007). También se observa que los consumidores anteponen en importancia los beneficios que los alimentos pueden aportar a la salud al precio de los mismos. Por último, los consumidores encuestados señalan el origen de los productos como el de menor importancia en el momento de la compra.

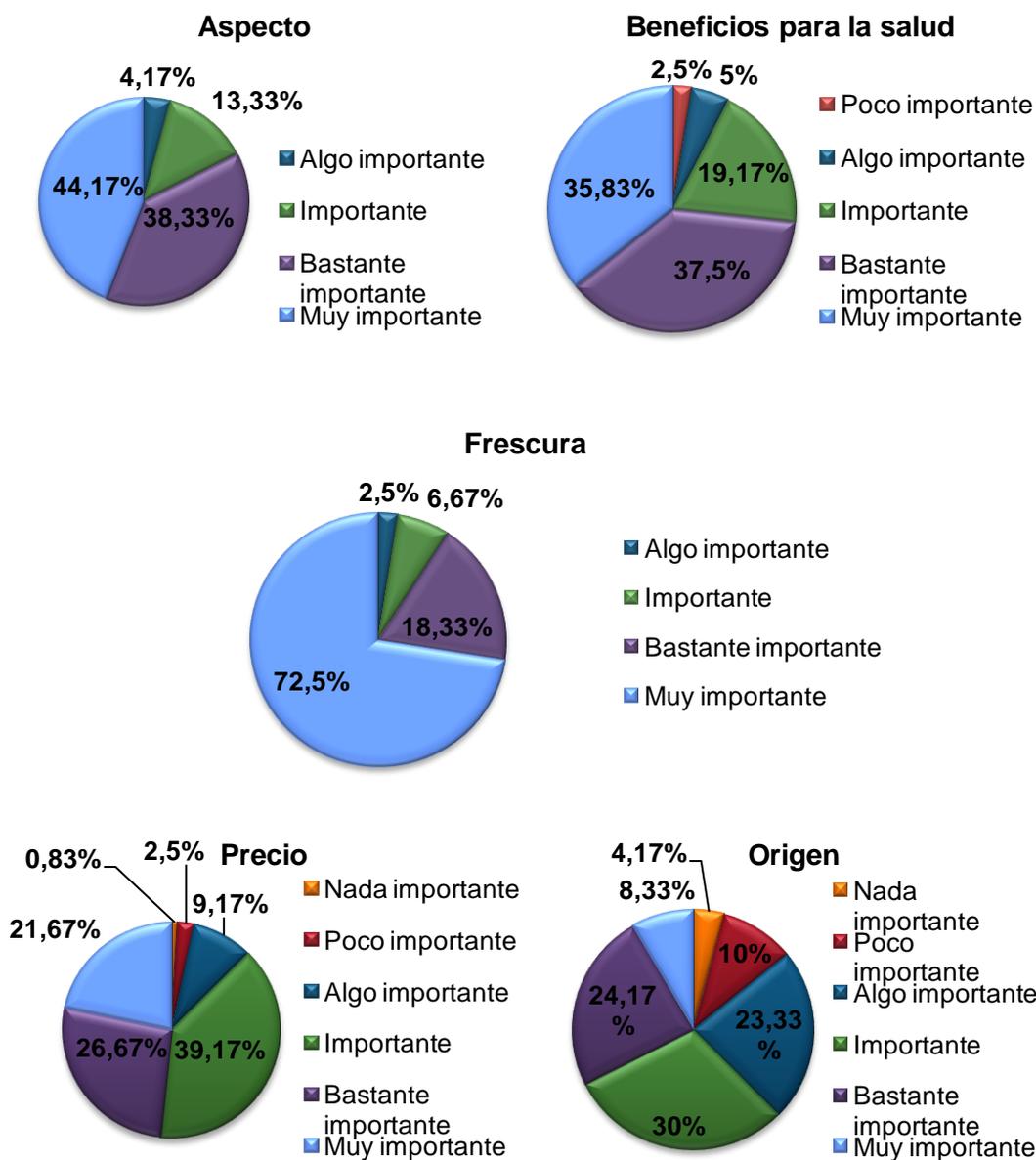


Figura IV.29. Importancia de diversos factores de compra.

Cabe destacar que la encuesta se realiza en el año 2011, en ese momento solo el 21,67% de los encuestados consideró el precio como un factor muy importante, pero quizá en la actualidad sería más valorado por el efecto acumulado de las consecuencias de la crisis, pudiendo hacer variar los aspectos decisivos en el momento de la compra.

En cuanto a la frecuencia de consumo de carne fresca (**Figura IV.30**), el 8,3% de los encuestados dicen consumirla a diario, un 5% la toma aproximadamente una vez por semana y un 0,8% consume carne fresca esporádicamente. La mayoría de las personas participantes en la encuesta (85,8%) consume carne fresca varias veces a la semana. Cuando se les pregunta por el tipo de carne, el cerdo, con un 21,7%, se encuentra en segundo lugar entre las carnes más consumidas habitualmente, detrás de la de pollo, con un 41,7%. Estos resultados coinciden con los observados en el conjunto de España para carne fresca (Alcalde *et al.*, 2013).

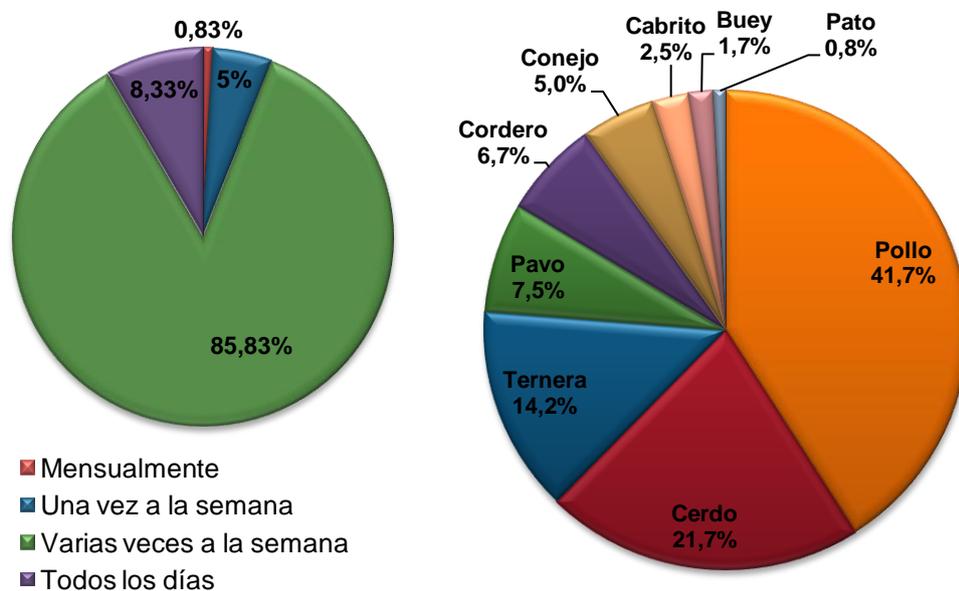


Figura IV.30. Frecuencia de consumo de carne fresca y tipo de carne consumida habitualmente.

En la **Tabla IV.12** se muestra la frecuencia con que los encuestados consumen los distintos tipos de carne fresca que se encuentran de forma más habitual en el mercado, observándose que son la carne de pollo, cerdo y ternera las que presentan una mayor frecuencia de consumo semanal, mientras que las carnes menos populares entre los consumidores son las de pato y buey.

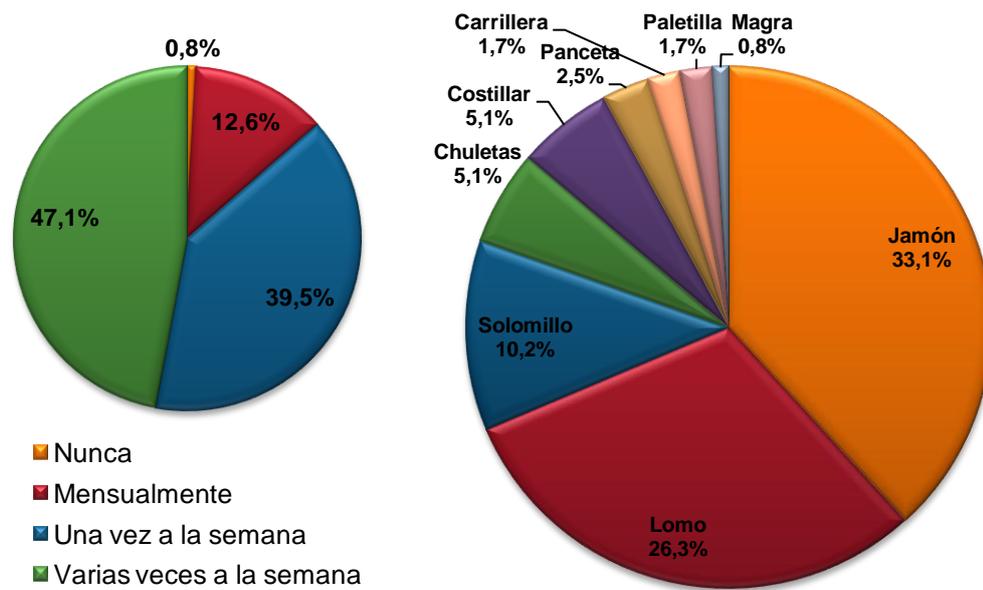
Tabla IV.12. Frecuencia de consumo de distintos tipos de carne fresca.

	0	1	2	3	4	5
Ternera	4,2%	21,7%	23,3%	28,3%	8,3%	14,2%
Cerdo	3,3%	10,8%	21,7%	23,3%	19,2%	21,7%
Buey	68,3%	24,2%	4,2%	0,8%	0,8%	1,7%
Cordero	15,8%	30,0%	31,7%	10,0%	5,8%	6,7%
Cabrito	40,0%	42,5%	9,2%	3,3%	2,5%	2,5%
Pollo	1,7%	0,8%	6,7%	23,3%	25,8%	41,7%
Pavo	42,5%	26,7%	14,2%	5,0%	4,2%	7,5%
Conejo	31,7%	25,8%	14,2%	16,7%	6,7%	5,0%
Pato	82,5%	14,2%	0,8%	0,8%	0,8%	0,8%

0: nunca 1: esporádicamente 2: mensualmente 3: varias veces al mes 4: 1-3 veces por semana 5: más de 3 veces por semana.

Cuando los consumidores son preguntados sobre la frecuencia de consumo de carne fresca de cerdo (**Figura IV.31**), el 47,1% señala que la consume varias veces a la semana, un 39,5% solo una vez por semana mientras que un 12,6% lo consume ocasionalmente y un pequeño porcentaje nunca lo consume. Las partes del cerdo más populares entre los encuestados para su consumo en fresco son el jamón (33,1%) y el lomo (26,3%) principalmente, seguido del solomillo, consumido de forma habitual por el 10,2% de los encuestados, y otras partes del animal consumidas de manera menos frecuente como chuletas, costillar, panceta, carrillera, etc.

En la **Tabla IV.13** se observa la frecuencia con la que los encuestados consumen las distintas partes del cerdo en forma fresca, resaltando que la carne de jamón y de lomo es la más consumida en número de días por semana, y las manos y el codillo las partes menos utilizadas por los encuestados.



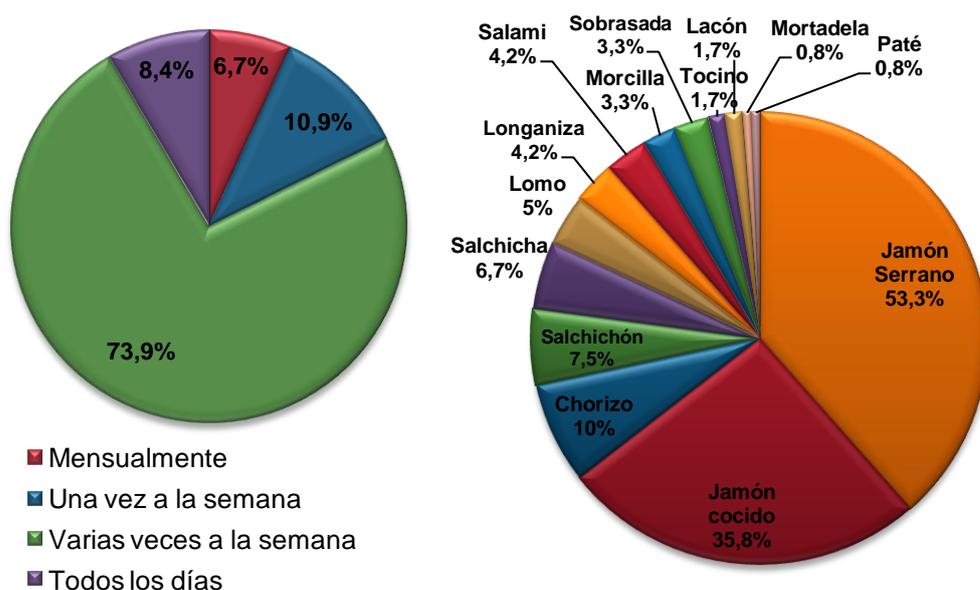
Figuras IV.31. Frecuencia de consumo de carne fresca de cerdo y partes más consumidas de forma habitual.

Tabla IV.13. Frecuencia de consumo de distintas partes de carne fresca de cerdo.

	0	1	2	3	4	5
Chuletas	33,1%	16,9%	18,6%	17,8%	8,5%	5,1%
Lomo	0,8%	7,6%	10,2%	31,4%	23,7%	26,3%
Carrillera	66,9%	19,5%	5,1%	6,8%	0,0%	1,7%
Codillo	76,3%	19,5%	3,4%	0,8%	0,0%	0,0%
Costillar	52,5%	22,9%	15,3%	2,5%	1,7%	5,1%
Jamón	6,8%	6,8%	8,5%	20,3%	24,6%	33,1%
Magra	56,8%	20,3%	9,3%	10,2%	2,5%	0,8%
Manos	83,1%	14,4%	1,7%	0,0%	0,8%	0,0%
Paletilla	54,2%	23,7%	10,2%	8,5%	1,7%	1,7%
Panceta	51,7%	26,3%	9,3%	7,6%	2,5%	2,5%
Solomillo	23,7%	17,8%	16,9%	21,2%	10,2%	10,2%

0: nunca 1: esporádicamente 2: mensualmente 3: varias veces al mes 4: 1-3 veces por semana 5: más de 3 veces por semana.

De la misma forma, y ya que los derivados del cerdo tienen gran cabida en nuestra dieta, se pregunta a los participantes en la encuesta sobre la frecuencia de su consumo y los derivados del cerdo más habituales en sus compras (**Figura IV.32**). Los resultados muestran que casi un 74% de los encuestados consume derivados del cerdo varias veces por semana y un 8,4% diariamente. El 11% de los consumidores solo los consume una vez por semana y un porcentaje algo menor los consume de forma ocasional. Entre los derivados más consumidos de forma habitual encontramos los preparados procedentes del jamón, serrano y cocido. El chorizo es el tercer producto consumido habitualmente por los encuestados, seguido de alimentos como el lomo embuchado, longaniza, salami, etc., que se incluyen en la dieta de los consumidores de manera más esporádica.



Figuras IV.32. Frecuencia de consumo de derivados del cerdo y productos más consumidos habitualmente.

Atendiendo a la frecuencia de consumo de los distintos derivados del cerdo que encontramos habitualmente en el mercado, se muestra en la **Tabla IV.14** que el jamón serrano y cocido son los de mayor frecuencia de consumo

semanal, mientras que salami y chópéd son los derivados del cerdo que más encuestados (70-75%) aseguran no consumir nunca.

Tabla IV.14. Frecuencia de consumo de distintos productos derivados del cerdo.

	0	1	2	3	4	5
Chópéd	75,0%	16,7%	5,8%	1,7%	0,8%	0,0%
Chorizo	25,0%	20,0%	25,8%	14,2%	5,0%	10,0%
Jamón Serrano	2,5%	2,5%	3,3%	18,3%	20,0%	53,3%
Jamón cocido	5,0%	8,3%	10,8%	20,0%	20,0%	35,8%
Lacón	60,8%	22,5%	8,3%	5,0%	1,7%	1,7%
Lomo embuchado	21,7%	20,8%	25,0%	17,5%	10,0%	5,0%
Longaniza	26,7%	25,0%	24,2%	13,3%	6,7%	4,2%
Morcilla	27,5%	35,0%	19,2%	11,7%	3,3%	3,3%
Mortadela	64,2%	15,8%	12,5%	4,2%	2,5%	0,8%
Panceta seca	55,8%	28,3%	9,2%	3,3%	3,3%	0,0%
Paté	37,5%	31,7%	16,7%	8,3%	5,0%	0,8%
Salami	70,0%	16,7%	2,5%	5,0%	1,7%	4,2%
Salchicha	23,3%	16,7%	23,3%	21,7%	8,3%	6,7%
Salchichón	24,2%	23,3%	20,8%	17,5%	6,7%	7,5%
Sobrasada	20,0%	33,3%	25,0%	14,2%	4,2%	3,3%
Tocino	48,3%	39,2%	5,8%	4,2%	0,8%	1,7%

0: nunca 1: esporádicamente 2: mensualmente 3: varias veces al mes 4: 1-3 veces por semana 5: más de 3 veces por semana.

Como parte final de la encuesta se pide a los consumidores dar su opinión sobre diversas cuestiones. En primer lugar, se les pregunta la opinión que tienen de la carne de cerdo y sus derivados y el motivo de su respuesta. En la **Figura IV.33** se observa que alrededor del 71% de las personas encuestadas dice tener una buena opinión de la carne de cerdo y de los derivados que se producen a partir de ella. Entre las razones dadas a esta respuesta destaca principalmente el sabor de estos productos, que los hace ser atractivos para los consumidores. También la relación calidad-precio, la buena aceptación de los embutidos elaborados a partir de carne de cerdo y la variedad que de estos

productos podemos encontrar en el mercado, son otros de los motivos expuestos por los encuestados para su opinión positiva a estos alimentos (**Figura IV.34**). El estudio de Ngapo *et al.* (2007) sobre preferencias internacionales llevado a cabo sobre consumidores de 22 países también señala el sabor como la razón principal de la aceptación de la carne de cerdo, por encima de otros factores como el precio.

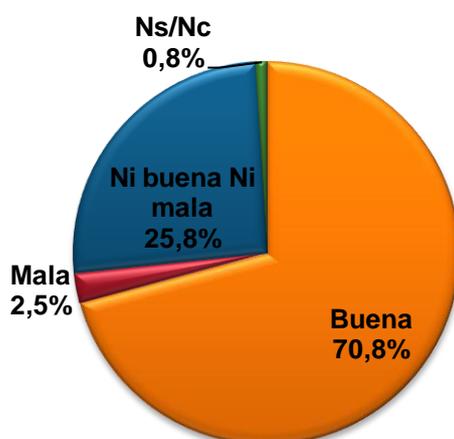


Figura IV.33. Opinión de los consumidores sobre la carne de cerdo y sus derivados.

En contraposición, solo un 2,5% de los consumidores dice tener una mala opinión de estos productos y cerca de un 26% no opina ni bien ni mal sobre ellos (**Figura IV.33**). El motivo principal se centra en el contenido graso que algunas de estas carnes y derivados poseen, mientras que algunos de los encuestados señalan las diferencias de calidad que estos alimentos presentan dependiendo de la zona de producción (**Figura IV.34**).

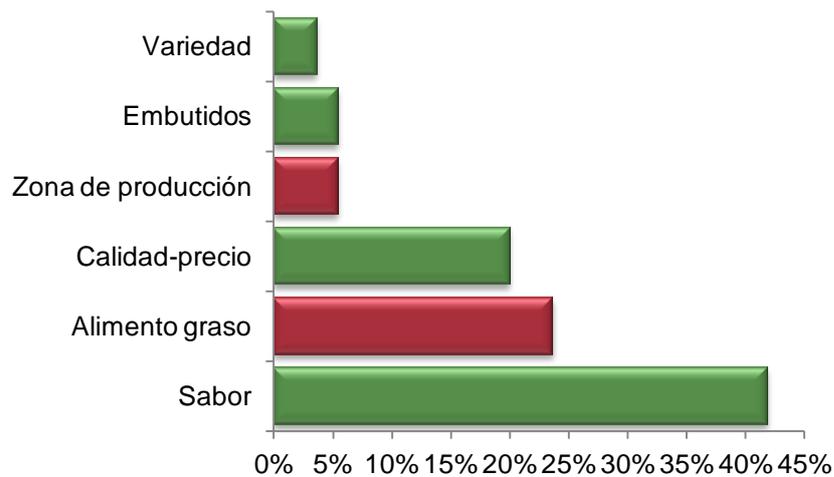


Figura IV.34. Motivos expuestos por los consumidores sobre su opinión de la carne de cerdo y derivados.

Atendiendo a los objetivos de nuestro ensayo, se pregunta a los consumidores si consideran que una alimentación más natural de los animales (sin aditivos sintéticos ni antibióticos) puede aportar beneficios a su propia salud y si estarían dispuestos a pagar un precio más alto por una carne de este tipo. Como se observa en la **Figura IV.35**, el 92% de los encuestados opina que dar una alimentación más natural a los animales puede producir carnes que aporten beneficios para su salud. Solo un 3% de las personas no cree que aporte beneficio alguno y un 6% no tiene clara su opinión sobre esta cuestión. Además, el 83% de las personas preguntadas estaría dispuesto a pagar más por una carne más natural que pudiera aportar beneficios a su salud respecto a carnes producidas, por ejemplo, con aditivos sintéticos o antibióticos. Solo un 7% de las personas no pagaría un precio más elevado por una carne de este tipo y un 11% no sabe qué haría o no se pronuncia sobre este tema.

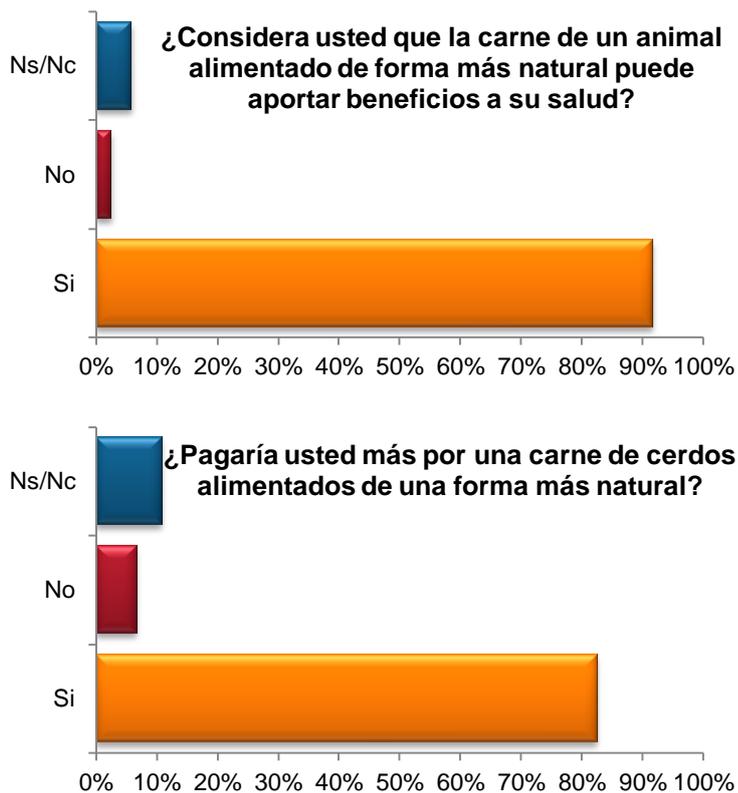


Figura IV.35. Opinión de los consumidores sobre aditivos naturales en alimentación porcina e intención de compra de estas carnes.

Como se ha comentado con anterioridad, la creciente preocupación por obtener alimentos más seguros ha llevado a la UE a prohibir los antibióticos como promotores del crecimiento en alimentación animal. Un mal uso de estas sustancias puede llevar a la acumulación de residuos en alimentos de origen animal que pueden ser potencialmente tóxicos para los humanos y, por otro lado, la exposición continua a bajos niveles de los mismos podría alterar la microbiota intestinal, así como causar enfermedades o desarrollar resistencias que hicieran fallida una terapia con antibióticos en situaciones clínicas en las que éstos fueran necesarios (Nisha, 2008). Estos problemas se agravan cuando algunos mecanismos de información y control para la seguridad alimentaria sobre el uso de antibióticos se revelan poco útiles al no garantizar la ausencia de residuos en las carnes de consumo que llegan al mercado (van Wagenberg *et al.*, 2012).

Además, en línea con los resultados de la encuesta, Chamorro *et al.* (2012) apuntan a un cambio de tendencia en los criterios de decisión de los consumidores españoles en el momento de la compra. Factores determinantes hasta ahora, como el precio o la apariencia, pierden relevancia a favor de otros atributos extrínsecos como la certificación de calidad o la funcionalidad y diseño del empaquetado. En este sentido, según Vandendriessche (2008), la seguridad alimentaria es y seguirá siendo de una importancia crucial, pero la industria cárnica se abre paso hacia un escenario en el que la nutrición y la salud en relación a sus productos cobran mayor importancia tanto para las autoridades sanitarias como para el consumidor. La idea del uso del alimento para propósitos de salud más que para la mera nutrición permite enfocar los esfuerzos de la industria cárnica en la incorporación de ingredientes funcionales para obtener alimentos con un valor añadido (Jiménez-Colmenero *et al.*, 2001). En la revisión realizada por Zhang *et al.* (2010), que se centra en distintas estrategias que mejoren el valor funcional de la carne y sus productos a través de funciones fisiológicas que promuevan condiciones de salud y disminuyan el riesgo de enfermedades, se señala la importancia de las PAM y especias y su papel como fuente de antioxidantes naturales que retardan el deterioro de alimentos por oxidación lipídica, así como su capacidad para inhibir el crecimiento de microorganismos y disminuir el riesgo de algunas enfermedades. Sin embargo, como apuntan Velasco y Williams (2011), serán necesarias posteriores investigaciones que demuestren de forma directa la biodisponibilidad de los aceites esenciales y sus componentes en la carne.

IV.2.4.2.2 Prueba discriminatoria y de preferencia.

Con el fin de conocer la repercusión que la alimentación con aceites esenciales ricos en fenoles -carvacrol y timol- ensayada sobre cerdos en su fase de transición tiene sobre la carne, se realiza una prueba discriminatoria triangular sobre un panel de consumidores no entrenados.

Los resultados muestran (**Figura IV.36**) que en las tres comparaciones realizadas un porcentaje mayor al 33% de los consumidores discrimina correctamente entre las muestras ofrecidas, lo que indica en este tipo de

pruebas triangulares que los aciertos no son debidos al azar. Se observa que las muestras de carne Control y de carne del grupo de animales alimentados con mezcla de aceites esenciales es la que menores diferencias presenta con un 41,7 % de aciertos, mientras que la carne Control frente a la carne de cerdos alimentados con *Thymbra capitata* y *Thymus zygis* se distingue de manera similar con un porcentaje en torno al 46%.

Cuando el porcentaje de acierto se comprara entre hombres y mujeres y fumadores y no fumadores no se observan diferencias entre ellos.

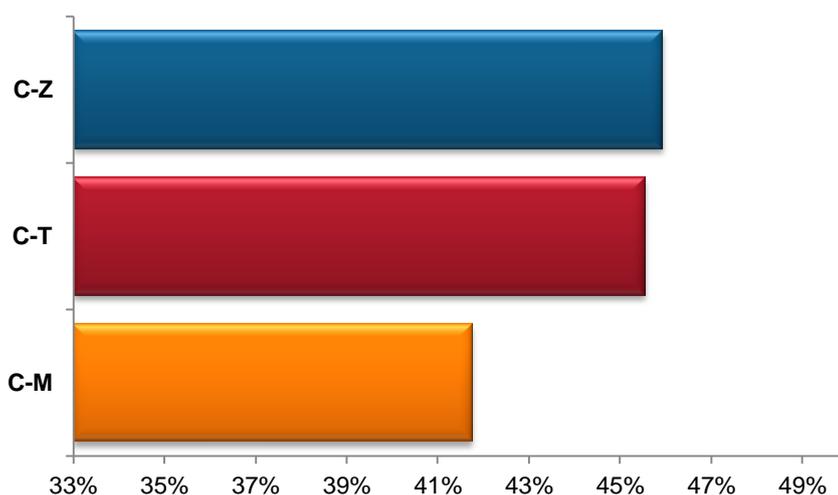


Figura IV.36. Porcentaje de acierto de la prueba discriminativa triangular.

En la **Tabla IV.15** se muestran los resultados de la prueba discriminativa de hamburguesas de cerdo cocinadas y del test de preferencia realizado sobre las mismas.

Al basar las diferencias en el nivel de significación establecido por la norma UNE-EN ISO 4120:2007 para pruebas triangulares, los resultados muestran que los consumidores diferencian las muestras C-DFK de las T y las C-DFK de las Z con un 0,01 de significación, mientras que las diferencias entre las muestras C-DFK de las M son menores pero también significativas al 0,05.

En contraste con nuestros resultados, la adición a la dieta de oleorresina o aceite esencial de orégano, romero, ajo o jengibre no reveló diferencias en el flavor o aroma de la carne cocinada respecto a un control, probablemente debido a que el nivel de inclusión (0,05%) fue demasiado bajo (Janz *et al.*, 2007).

Tabla IV.15. Resultados de la prueba discriminatoria triangular y de la prueba de preferencia sobre hamburguesas de cerdo.

		C#M	C#T	C#Z
Prueba triangular	Total consumidores	103	101	98
	Discrimina correctamente	43	46	45
	Nivel significación	0,05	0,01	0,01
Prueba de preferencia	Total consumidores	43	46	45
	Preferencia aceites	20	31	25
	Nivel significación	-	0,05	-

Sin embargo, la adición de especias o aceites esenciales puede producir en ocasiones cambios indeseables en el flavor o aroma de los alimentos (Burt, 2004), por lo que es importante conocer no solo si el consumidor percibe este alimento como diferente sino, además, si esta diferencia observada es positiva.

Por ello, tras la prueba triangular los consumidores establecen sus preferencias respecto a las muestras ofrecidas, teniendo en consideración para el análisis solo aquellos individuos que consiguen discriminar los patrones correctamente. Las preferencias entre los consumidores indican que las muestras con aceite son preferidas en un número mayor de casos, exceptuando las muestras con mezcla de aceite esencial que son ligeramente menos elegidas por los consumidores respecto al Control-DFK. En la **Tabla IV.15** se observa el nivel de significación obtenido mediante las tablas de prueba binomial de dos extremos de Roessler (1978), que refleja que solo la elección de las muestras con *Thymbra capitata* frente a las muestras Control es estadísticamente significativa ($p < 0,05$).

En cerdos, la suplementación de la dieta con distintos porcentajes de aceite esencial de orégano (83,1% de carvacrol) no produjo diferencias significativas en la aceptación general de la carne cocinada al ser comparada con un control (Simitzis *et al.*, 2010), aunque se observa una mayor aceptación conforme aumenta la cantidad de aceite esencial incluido en la dieta. Ensayos en otros animales sí mostraron una preferencia significativamente mayor por carne de corderos cuyas madres fueron alimentadas con hoja destilada de romero durante la gestación y la lactación, frente a un control (Nieto, 2009), retrasando además la aparición de rancidez durante el almacenamiento a través del retraso de la oxidación lipídica, y mejorando su vida útil (Nieto *et al.*, 2011). Por el contrario, otros aditivos vegetales antioxidantes como la quercetina incluidos en la dieta de corderos influyeron negativamente en la preferencia de los consumidores (Andrés *et al.*, 2014).

El flavor que los compuestos presentes en el aceite esencial han podido transmitirle a la carne es presumiblemente el factor más influyente en la elección de las distintas muestras por parte del panel de consumidores. El carvacrol, como compuesto mayoritario en el aceite esencial de *Thymbra capitata*, o metabolitos derivados de este, parecen conferir a la carne cocinada unas características que la hacen más apetecible al consumidor. Aunque el picado de la carne disminuye la capacidad de retención de agua (24%) debido a la pérdida de estructura de las fibras, la adición de un 2% de sal disminuye considerablemente esta pérdida de líquido (Honikel, 2010). Teniendo además en cuenta que la carne de cerdos alimentados con *Thymbra capitata* presentó las menores pérdidas de agua por goteo, y que la percepción de jugosidad en carne se considera que está relacionada con la cantidad de agua en la misma (Wood *et al.*, 1994), este factor ha podido influir también, en cierta medida, a las diferencias encontradas entre los distintos tratamientos. Aunque en general se percibe como cierta la correlación entre la capacidad de retención de agua y la jugosidad de la carne, autores como Pearce *et al.* (2011), no encuentran tal correlación, mientras que sospechan que la terneza, habitualmente considerado un atributo independiente, sí puede estar relacionado con la capacidad de retención de agua.

Dado que la carne de jamón de animales alimentados con aceites esenciales, principalmente el de *Thymbra capitata*, ha mostrado una mayor aceptación por parte de los consumidores de este estudio, y podría mejorar la calidad de consumo de esta carne debido a su mayor capacidad para retener agua en su estructura, sería interesante ahondar en los efectos de este aceite sobre distintos aspectos sensoriales y de calidad de la carne, o productos derivados de ella, tales como su estabilidad oxidativa, su estabilidad microbiológica y el aumento de su vida útil, de cara a una posible comercialización de estos productos.

IV.3 RESUMEN DE LA DISCUSIÓN

La alimentación con aceites esenciales de *Thymus zygis* subsp. *gracilis* y *Thymbra capitata*, ricos en timol y carvacrol, respectivamente, proporciona un mejor crecimiento de los animales monogástricos utilizados en este ensayo, ratas y cerdos, frente a un control sin suplementar y otro suplementado con ácidos orgánicos (diformiato de potasio), con probada eficacia como promotor del crecimiento en cerdos (Chowdhury *et al.*, 2008). Esta cuestión, de máxima importancia en ganadería para evitar pérdidas económicas, ha sido ya probada en producción porcina con aceites esenciales de similares características (Sads y Bilkei, 2003; Marcin *et al.*, 2006; Mueller *et al.*, 2012). Junto a esto, cabe destacar el buen estado de salud general observado en los animales durante el ensayo, encontrándose heces más blandas solo en dos animales de cada grupo, excepto en Z, durante los días 9 y 10 después del destete.

Uno de los aspectos a tener en cuenta es la morfología de la mucosa intestinal, que puede ser modificada por distintos componentes de la dieta y que se relaciona con una mejor absorción de los nutrientes y una correcta función de barrera de la mucosa, protectora frente al paso de infecciones y antígenos de la dieta. El destete en producción porcina se relaciona con un aumento de la profundidad de las criptas, asociado a un incremento en el índice de producción de células en las mismas (Domeneghini *et al.*, 2006), y una disminución en la altura de las vellosidades, lo que puede llevar a un aumento de la velocidad de la migración de enterocitos para compensar la pérdida de altura, dando menor tiempo a estas células para madurar y expresar su capacidad de transporte, obteniendo como resultado una absorción de nutrientes deficiente (Thomson *et al.*, 1994). Por el contrario, otros estudios (Reisinger *et al.*, 2011) en los que se suplementa la dieta de aves con AE ricos en carvacrol, el aumento en la profundidad de las criptas no se asocia a un aumento del índice de migración celular desde las criptas hacia la vellosidad, por lo que las células se diferenciarían correctamente. En este sentido, aunque en las ratas alimentadas con *Thymbra capitata* se observa el menor índice V/C en duodeno e íleon debido a una mayor profundidad de las criptas, el mantenimiento de la longitud de las vellosidades y el mayor incremento de peso, sugieren una mayor

eficiencia en la absorción de nutrientes que puede ser debida tanto a la morfología intestinal como a otros factores implicados. De forma similar ocurre con el tratamiento con mezcla de aceites, cuyo incremento de peso es semejante al de los animales del grupo Thymbra, aunque su efecto más significativo se produce sobre el crecimiento morfológico de la parte proximal del intestino delgado. Según lo expuesto, estos aceites podrían contribuir a paliar los efectos negativos del destete precoz al promover el crecimiento morfológico de la mucosa intestinal. Sin embargo, sería necesario realizar posteriores ensayos en cerdos en la fase de transición que confirmen este efecto.

Además de por una correcta morfología intestinal, la mejora en la absorción de nutrientes que conduzca a un aumento de peso de los animales puede ser debida al efecto beneficioso de los AE sobre la digestibilidad de la materia seca, nitrógeno y energía (Zitterl-Eglseer *et al.*, 2008; Yan *et al.*, 2010), así como a una mejora de la respuesta inmune (Taranu *et al.*, 2012).

Asimismo, el epitelio intestinal de mamíferos parece ejercer un papel esencial y activo en el equilibrio de la microbiota, que abarca, por ejemplo, desde la mera función de barrera física hasta la secreción de péptidos antimicrobianos por parte de las células de Paneth (Duerr y Hornef, 2012). A su vez, la microbiota saprofita o comensal normal de la mucosa intestinal juega un papel importante en la protección del huésped mediante distintos mecanismos como la secreción de sustancias antimicrobianas que inhiben el crecimiento de patógenos, o bien compitiendo con ellos por nutrientes o sitios de unión en la mucosa (Cummings *et al.*, 2004). Los AE, a través del descenso del pH del estómago observado en los cerdos, pueden mejorar la función de barrera del mismo frente a bacterias susceptibles al ácido, como coliformes, y favorecer el crecimiento de bacterias ácido lácticas, pudiendo observarse este efecto a lo largo de toda la longitud del intestino delgado (Canibe y Jensen, 2003). Como recogen Zhu *et al.* (2006) en estudios *in vitro*, un pH en el estómago por debajo de 3,5 ejerce un fuerte efecto bactericida frente a cepas patógenas de *Escherichia coli* y *Helicobacter pylori*. Por todo ello, los aceites esenciales podrían mejorar la microbiota intestinal a través del incremento del índice

Lactobacillus:*Enterobacteria* (L:E) en el intestino delgado (Manzanilla *et al.*, 2004) y ciego Castillo *et al.* (2006). Sin embargo, en nuestro caso, los resultados en este sentido son contradictorios, ya que los animales con menor pH estomacal, mayor rendimiento productivo y ausencia de diarrea (grupo Zygis) son los que presentan un menor índice L:E, mientras que los animales del grupo C-DFK presentan una buena relación entre estos dos grupos de bacterias (sin diferencias significativas con el resto) pero un peor índice de conversión y crecimiento de los animales. Por otra parte, el grupo de cerdos alimentados con *Thymbra capitata* presenta un buen crecimiento e IC de los animales, así como un mejor índice L:E, similar al Control-DFK, debido a un aumento del número de *Lactobacillus* spp.

Por otro lado, la alimentación con AE permite la transferencia de sustancias biológicamente activas a la carne. Los datos obtenidos concernientes a la cantidad de fenoles acumulados en carne reflejan que, en este sentido, los músculos *Longissimus dorsi* y músculo semimembranoso y semitendinoso, pertenecientes a lomo y jamón, respectivamente, se comportan de diferente forma en cuanto a metabolismo y acumulación de estos compuestos se refiere. Tanto en las patas traseras como en el lomo, el carvacrol se transfiere a la carne en mayor cantidad que el timol, preferentemente en forma conjugada con ácido glucurónico, posiblemente debido al propio metabolismo del músculo y al coeficiente de partición octanol/agua que influye en la penetración de los fenoles a través de las células del epitelio (El-Kattan *et al.*, 2001; Ultee *et al.*, 2002; Silderberg *et al.*, 2006). Aunque carvacrol y timol son las formas biológicamente más activas, cuyas propiedades antimicrobianas y antioxidantes más importantes son de sobra conocidas (Peñalver *et al.*, 2005; Kumar *et al.*, 2008; El Bouzidi *et al.*, 2013), algunas formas derivadas de estas, como la timoquinona, producto de la oxidación de timol y carvacrol, muestran efectos antitumorales y hepatoprotectores. (Badary, 1999; Talib y Abukhader, 2013), por lo que la alimentación con aceites esenciales de distintas especies de tomillo podría servir para obtener productos cárnicos con un valor añadido, permitiendo obtener carnes más duraderas y seguras y pudiendo ofrecer al consumidor un

alimento funcional obtenido de forma natural, si se confirma su biodisponibilidad en humanos.

Del mismo modo, la presencia de estos compuestos en la carne puede variar sus características físico-químicas y organolépticas. Así, las menores pérdidas de agua encontradas en la carne del grupo *Thymbra* podrían deberse al carácter antioxidante del carvacrol, ya que, como exponen Traore *et al.* (2012), la pérdida de agua en la carne se ve afectada, ente otras cosas, por la oxidación de las proteínas. Dada esta capacidad antioxidante de los aceites esenciales (Miguel, 2010), cabría esperar, en los grupos alimentados con dichas sustancias, una mejora en el color de la carne expresado a través de las coordenadas CIELab, aunque no se observan diferencias respecto al Control-DFK, e incluso los valores de b^* y h_{ab} , asociados al pardeamiento de la carne (Luciano *et al.*, 2009), del grupo M aumentan significativamente respecto al resto de tratamientos.

Además la alimentación con aceites esenciales puede producir en ocasiones cambios indeseables en el flavor de los alimentos (Burt, 2004). Sin embargo, la presencia de carvacrol y timol en la carne de este estudio repercute positivamente en su sabor, principalmente en el caso de la *Thymbra capitata*.

Por todo lo expuesto, los aceites esenciales, y especialmente el aceite esencial de *Thymbra capitata*, pueden ser una interesante alternativa natural al uso de antibióticos promotores del crecimiento sintéticos y sería conveniente ahondar en los efectos de este aceite, por si solo o en combinación con diformiato de potasio, sobre los distintos aspectos que afectan a la producción porcina, especialmente a nivel de la microbiota intestinal para combinar la capacidad de uno y otro de aumentar el recuento de *Lactobacillus* spp. y disminuir el de enterobacterias. También sería interesante incidir en el efecto de este aceite esencial sobre las características sensoriales y de calidad de la carne, o productos derivados de ella, tales como su estabilidad oxidativa, su estabilidad microbiológica y el aumento de su vida útil, de cara a una posible comercialización de estos productos con un valor añadido.

V. CONCLUSIONES

Las conclusiones que se desprenden de esta Tesis Doctoral son las siguientes:

Primera. Los aceites esenciales ensayados actúan como promotores de crecimiento al mejorar el índice de conversión de alimento de los animales, tanto en cerdos como en ratas, aunque en estas últimas presenta un efecto menos significativo.

Segunda. La administración de aceite esencial de *Thymbra capitata* favorece el crecimiento morfológico de la parte proximal y distal del intestino delgado, lo que unido a un mayor incremento de peso, sugiere un aumento de la eficiencia en la absorción de nutrientes. De forma similar ocurre con el tratamiento con mezcla de aceites, aunque su efecto más significativo se produce sobre la parte proximal del intestino delgado.

Tercera. Los aceites esenciales ensayados igualan, e incluso mejoran en algunos aspectos, la actividad del diformiato de potasio sobre la salud intestinal en cerdos recién destetados, ya que producen una mayor acidificación del pH estomacal respecto al ácido orgánico.

Debido a los buenos resultados obtenidos en la relación *Lactobacillus*:*Enterobacterias* en el yeyuno de cerdos analizados en el estudio, asociada en el caso de *Thymbra capitata* al aumento de *Lactobacillus*, y al descenso de enterobacterias en el diformiato de potasio, se considera que sería interesante el estudio combinado de los dos compuestos en alimentación animal.

Cuarta. El empleo de aceite esencial de *Thymbra capitata* y *Thymus zygis* en la alimentación de cerdos favorece la transmisión de sus compuestos fenólicos mayoritarios, carvacrol y timol, a la carne, especialmente a los músculos de las patas traseras, lo cual influye en las características físico-químicas y sensoriales de la carne. De los aceites estudiados, el de *Thymbra capitata* es el que presenta una mayor transmisión de su fenol mayoritario, carvacrol, responsable del aumento de la capacidad de retención de agua durante el almacenamiento, y de la mayor aceptación de esta carne por parte de los consumidores.

VI. EUROPEAN DOCTORATE MENTION

EUROPEAN DOCTORATE MENTION

DOCTORAL THESIS SUMMARY



UNIVERSITY OF MURCIA

**EFFECT OF ESSENTIAL OILS FROM AROMATIC AND
MEDICINAL PLANTS IN THE TRANSITION PHASE OF
MONOGASTRIC ANIMALS**

**Advisor during external stay: Massimo Fabbi
Istituto Zooprofilattico Sperimentale della
Lombardia e dell'Emilia Romagna (IZSLER)
Pavia, ITALY**

**MARÍA DEL PILAR DE HARO GONZÁLEZ
2015**

VI.1 SUMMARY

VI. 1.1 ANTECEDENTS AND OBJECTIVES

Pig farming is of vital importance to the human race because pigs are the greatest providers of meat in a world containing more than 7000 million inhabitants (Faostat, 2011; indexmundi, 2012).

With the passage of time, pig farming has become an intensive and “technified” industrial practice in order to increase production, with the result that many new clinical threats have appeared. One of the most problematic stages of pig production is the weaning of piglets as they are given feed for the first time, since to maximize production weaning takes place very early (at 21 days), when their digestive system is still immature and adapted only to receiving highly digestible liquid food. Added to this, the animals are separated from their mothers and put together with other piglets, with which they must establish a

hierarchical order (Hendriks *et al.*, 1998). Together, these changes produce a nutritional stress that contributes to the appearance of dysfunctions in the intestinal and immune systems of the animals, which may lead to a reduction in food intake and digestion. This means that the animals are especially sensitive to microbial infections of the intestine, involving diarrhoea, weight loss and even death, especially during the first week post-weaning (Campbell *et al.*, 2013). As a result of the above, the gastrointestinal tract (GIT) suffers profound changes which accelerate tissue growth and cell maturation (Xu *et al.*, 2000; Godlewski *et al.*, 2005). Whereas during lactation the intestinal mucosa presents what is considered an optimal relation between villus height and crypt depth, this equilibrium is lost after weaning since the villus diminishes in height and crypt depth increases (Spreeuwenberg *et al.*, 2001; Budiño *et al.*, 2005). In common with that observed in rats, this process is accompanied by a diminution in ingestion due to the change in feed and stress, which leads to an increase in permeability and a diminution in the function of the intestinal mucosa barrier, increasing the possibility of infection (Wirén *et al.*, 1999; Spreeuwenberg *et al.*, 2001; Boudry *et al.*, 2004). Moreover, the brief period of fasting that generally occurs after weaning and the subsequent consumption of a solid diet alter the quantity and type of substrate available for the microorganisms found in the digestive tract (Pluske *et al.*, 2003), so that the bacterial profiles of the faeces of weaned pigs differ from those found in lactating animals due to the change in diet (Inoue *et al.*, 2005). The main change is the increased quantity of enterobacteria (Konstantinov *et al.*, 2006; Pieper *et al.*, 2006), and the more complex intestinal microbiota with increased levels of other potentially dangerous pathogens such as *Clostridium* sp. or *Streptococcus suis* (Konstantinov *et al.*, 2006; Su *et al.*, 2008). By contrast, the number of *Lactobacillus* spp. decreases in the different segments of the gastrointestinal tract (Konstantinov *et al.*, 2006; Pieper *et al.*, 2006; Su *et al.*, 2008).

As a consequence of these problems, low quantities of antibiotics are frequently added to the feed of the animals to improve their general state of health, encourage growth and reduce mortality (Cromwell, 2002). However, the prolonged use of antibiotic growth promoters (AGP) has led in recent years to an increase in the number of resistant strains that affect humans (Saenz *et al.*,

2000; Pena *et al.*, 2004; Thakur and Grebeyes, 2005; de Neeling *et al.*, 2007; van der Wolf *et al.*, 2012), a situation that is considered as an important public health problem (Witte, 1998). Indeed, concern over the effect of such substances has led the European Union to prohibit their use (EC 1831/2003), a ban that came into effect on 1 January 2006. However, the intensive production of pigs requires solutions to the above mentioned problems, for which reason substantial research effort has been directed during the last decade at finding alternatives to these antimicrobials.

An interesting alternative to using antibiotics is to use essential oils (EO) of aromatic-medicinal plants, which have been seen to have several beneficial activities for the intestinal health of piglets – as antimicrobials and stimulators of digestive secretions and epithelial renovation - with a consequent stabilizing effect on the intestinal microbiota, thus increasing nutrient absorption and improving animal health (Windisch *et al.*, 2008). Carvacrol and thymol, particularly, have a strong ability to inhibit different types of bacteria (Lambert *et al.*, 2001; Faleiro *et al.*, 2005), which is attributed to the phenolic hydroxyl group of these compounds and the presence of a system of delocalized electrons (Ultee *et al.*, 2002). These two compounds are the major compounds found in the essential oils of *Thymus zygis* subsp. *gracilis* and *Thymbra capitata*. Despite the strong antimicrobial and antioxidant activity of the phenolic compounds, carvacrol and thymol, Youdim *et al.* (2002) found that neither is as effective as the total EO, leading Rota *et al.* (2008) to suggest that there was a synergistic effect between each and with other components of the respective oils.

In light of the above, it was thought that these EOs might represent an alternative to the use of antibiotics in pig feed, and would perhaps be able to control the intestinal pathologies associated with the weaning period and promote growth, particularly during this time.

Objectives

General objective:

To assess the use of the essential oils from *Thymus zygis* subsp. *gracilis* and *Thymbra capitata* as growth promoters and as sources of active ingredients that improve the quality of livestock production and resulting meat products.

Specific objectives:

1- To determine the action of the essential oils from *Thymus zygis* subsp. *gracilis*, *Thymbra capitata* and their mixture on animal performance and morphological growth of the rat intestine during weaning.

2- To evaluate the effects of adding these potential natural growth promoters in pigs at the time of weaning and the introduction of solid feed, compared with the effects of organic acids approved by the EU as growth promoters.

3- To determine the effect of the EOs on the pH and intestinal microbiota of early weaned piglets compared with the effects of organic acids.

4- To study the transmission of active ingredients of these EOs (carvacrol and thymol) and their effect on the resulting meat quality and its acceptance by consumers.

VI. 1.2 MATERIAL AND METHODS

VI.1.2.1 ESSENTIAL OILS

To ascertain the *in vivo* effects of the EOs from aromatic-medicinal plants, experiments were carried out on rats and pigs starting the moment immediately following weaning. Both experiments used the EOs of *Thymus zygis* subsp. *gracilis* chemotype “thymol” and *Thymbra capitata* chemotype “carvacrol”, obtained by hydrodistillation by Blas Lorente González S.L. The volatile profile of the EOs assayed was obtained by GC-MS using the method described by Jordán *et al.* (2009). The results showed that thymol represented 65.5% of the

EO from *Thymus zygis* subsp. *gracilis* and carvacrol 72.9% of the EO from *Thymbra capitata*.

VI.1.2.2 EXPERIMENTAL MODEL IN RATS

Animals and feed

A total of 32 male, 28 day old Sprague Dawley rats (weaned at 21 days) were used. These weighed 60-79 g at the beginning of the experiment, which was conducted in two replicas (2x16 animals), assigning the animals randomly to 4 groups of 4 animals - a control group, which was fed a rat maintenance diet, and 3 groups (Thymbra, Zygis and Mixture) - in which the effect of adding 0.06% of each EO separately and a mixture of the same was studied. Over a period of ten days, the intake of water and feed, and faeces weight were recorded. The rats were weighed at the outset, half-way through and at the end of the experiment, and the feed conversion ratio (FCR) was calculated.

Intestine and viscera sampling

Samples of the small and large intestine (rinsed in PBS) were taken from different parts of each. Three parts of the small intestine were taken for analysis: duodenum (5 cm after the first 0.5 cm from the pylorus), jejunum (5 cm of the mid-part of the intestine) and ileum (5 cm beginning 1 cm before the ileocecal valve). From the large intestine, 5 cm of the ascending colon (measured from the caecum) were taken. The samples were cleaned in PBS and fixed in 10% buffered neutral formaldehyde for subsequent histological study.

Then, the spleen, liver and kidneys were extracted, rinsed with PBS and weighed. Half of one of the kidneys, and one lobule from the liver were stored in formol for subsequent image analysis.

Histological study

After fixing the samples in formol, 1 cm thick cross sections of the duodenum, jejunum, ileum and colon were made, and parts of the kidney and liver were reserved for histological examination. Five- micron thick sections were made at different depths before staining with haematoxylin-eosin. The zones to

be studied were selected by image analysis (Axioskop transmission light microscope, Carl Zeiss. S.A., connected to a Sony DXC 151-Ap. video camera and, an MIP-4,5 image analyser from Digital Image System, Barcelona). In the small intestine the villus length (from the tip to the point of union with the Lieberkühn crypts), Lieberkühn crypt depth (from the point of union with the villus to the base of the crypt) and mucosa thickness (from the tip of the villus to the *muscularis mucosae*) were measured (Van Dijk *et al.*, 2001; Wayhs *et al.*, 2004). In the large intestine, we measured the total thickness of the mucosa (from the inside edge of the mucosa to *muscularis mucosae*).

Liver and kidney samples were examined by microscope to confirm structural regularity and to rule out any toxicity on the part of the compounds under study.

Chemicals and reagents

Formaldehyde (Formol) 3.7-4% buffered to pH=7 and stabilized with methanol was supplied by Panreac Química S.A.U. (Barcelona-Spain). Histological paraffin for including the tissues was from Guinama S.L.U. (Valencia-Spain). Partially denaturalize, chemically pure absolute ethanol was from Panreac Química S.A. (Barcelona-Spain). Hematoxyline was supplied by Panreac Química S.A.U. (Barcelona-Spain) and eosin by Sigma-Aldrich Inc. (St. Louis, MO). PBS (Phosphate Buffer Saline).

VI.1.2.3 EXPERIMENTAL MODEL IN PIGS

Animals and feed

Eighty piglets of both sexes (castrated males) (Pietrain*Large white x Large white*Landrace) were weaned at 21 days and randomly distributed into four homogenous lots. The experiment was carried out in two replicas (2x40 animals). The mean weight of the animals at the outset was 6.831 ± 1.685 kg, and they were weighed weekly thereafter, as was the amount of feed consumed, so that the FCR could be calculated. Both feed and water were offered *ad libitum* throughout the experiment.

The experimental groups comprised a positive control group (C-DFK), which was fed with a complete starter feed (Alimentos del Mediterráneo, S. Coop.-Lorca, Murcia) supplemented with 0.16% of a commercial mixture of potassium diformate (Formi®), a *Thymbra* group (T) fed the same starter feed supplemented with 0.16% EO from *Thymbra capitata*, a *Zygis* group (Z), whose feed was supplemented with 0.16% EO from *Thymus zygis* subsp. *gracilis*, and a Mixture group (M), where the feed contained 0.16% of a mixture of both EOs in equal proportions.

After weaning, the animals were gradually introduced to the feeds being studied and fed with the same for the following 42 days, corresponding to the transition phase. The first week the animals were fed entirely with a special milk feed supplemented with zinc (zinc oxide calier 2500 mg/kg) from Alimentos del Mediterráneo, S. Coop. (Lorca, Murcia). They were then fed a mixture of 75% milk feed and 25% of the corresponding experimental diet for 3 days, followed by the mixture at 50% of each component for 4 days. During the following four weeks the animals were fed the experimental diets at 100%. At the end of the 42 day transition period, eight animals from each group were sacrificed.

Sample taking

At sacrifice and during bleeding blood samples were taken into sodium heparin collection tubes 5000 IU/ml (Chiesi, Barcelona, Spain) and stored at 4 °C until reaching the laboratory. The plasma was separated by centrifugation (3500 rpm, 4 °C, 10 min) in an Eppendorf 5810R (Hamburg, Germany). To stabilize the phenols, the plasma was acidified with 0.01 M acetate buffer in a 1:11 proportion (Manach *et al.*, 1997) and stored at -80 °C for subsequent analyses.

During evisceration the whole gastrointestinal tract was removed from each animal, sealing the sections of interest by means of intestinal clamps to maintain sterility. Two samples (15 cm) of the intestinal content were taken from the jejunum (1 metre before the ileocecal valve), ileum (last 15 cm before the ileocecal valve) and colon (10 cm transverse colon). The samples were placed in sterile jars and kept at 4 °C. Part of the jejunum intestinal content was cultured

the same day for microbiological analysis, while the rest of the samples were homogenised and lyophilised for subsequent real time PCR analysis. The liver, kidneys and spleen were also removed, washed in PBS and weighed.

Twenty-four hours after sacrifice loin (*Longissimus dorsi* muscle) and hind leg muscles (*semitendinosus* and *semimebranosus* muscles) samples were taken for tests and analyses.

Effect of the feeds on the pork meat

The meat pH was measured at different times: 45 minutes *post mortem* in the *Longissimus dorsi* using a pHmeter (Crison Instruments, S.A. model 507) coupled to a penetration electrode (Crison, 52-33), and at 24 hours *post mortem* after homogenization, following ISO 2917:1999, by means of a pHmeter (Crison Instruments, S.A. model GLP 21) with combined electrode (Crison, 52-02).

The water holding capacity was measured by drip loss in the fresh meat (2 cm thick fillets), in accordance with the reference methods published by Honikel (1998), at 24, 48, 72 and 96 hours. The percentage of drip loss was calculated with respect to the initial weight of the fillets (% drip loss= (initial weight – final weight) x 100/ initial weight).

Objective colour measurements were made by CR-300 Chroma Meter (Minolta Camera, Osaka, Japan) in the fillets (2 cm) of fresh back meat against a white background, using standard D65 illuminant and light protection tube with glass CR-A33a to calibrate the white and measurements made in the meat. CIELab coordinates were obtained (CIE, 1976) L^* , a^* and b^* , and the value of C^*_{ab} (Chroma= $(a^{*2} + b^{*2})^{1/2}$) and h_{ab} (Hue angle= $\arctg(b^*/a^*) \times [360^\circ / (2 \times 3.14)]$).

To assess whether the feed supplied to the animals influenced the meat flavour, a triangular discrimination test comparing each of the three treatments with the control (2 identical samples and 1 different) was used with an untrained panel of consumers (n=302). The panel was also asked to take a preference test in which panellists were asked which sample they preferred of the three they were offered. The meat for the tests was minced and presented in hamburger

(80 g and 2% salt) using boned hind leg meat, cooked in aluminium foil to prevent surface charring on a double electric hotplate (Media Liscia, Silanos, Milan, Italy) at 150 °C for 2 min after the interior of the samples had reached 72 °C, as measured by a T200 portable (Digitron Instrumentation Ltd., Merd Lane, Hertford, United Kingdom).

Study of the digestive system

The pH of the stomach, duodenum, ileum and colon was measured immediately after sacrifice by means of a penetration electrode (model 52-33) coupled to a Crison pHmeter (model GLP 21).

Bacterial counts of the fresh intestinal content of the jejunum were made using traditional culture-dependent methods. An initial 10^{-1} dilution was made with sterile PBS from 4 g of intestinal content, from which serial decimal dilutions were made before plating, in triplicate, in selective media. The following quantification methods were used: total aerobic mesophiles using the pour plate method on plate count agar (PCA) (OXOID), total enterobacteria using the pour plate method on MacConkey agar (OXOID), *Escherichia coli* using the pour plate method on chromogenic ID-F agar (BioMerieux), sulphite-reducing *Clostridium* by the pour plate method on SPS agar (Merck) in a test tube, sealed with paraffin wax to create anaerobic conditions, and *Lactobacillus* spp. using the pour plate method on MRS agar (Merck). All the incubations were carried out under aerobic conditions at 37° C, for 48 h, except sulphite-reducing clostridiums (anaerobiosis) and *Lactobacillus* (atmosphere of incubation enriched with 5-10% CO₂ during 3 days).

Total bacteria and enterobacteria counts in the intestinal contents of the jejunum, ileum and colon were made using real time PCR. The QIAamp DNA Stool Mini Kit (QIAGEN) was used to extract DNA, pretreating the Qiagen columns to eliminate contaminating bacterial DNA traces by washing twice with DNA and RNA-free DEPC (diethyl pyrocarbonate) - treated water at 72 °C. Every 15 samples, the residual contamination of the column and reagents were checked (without sample). Knowing the proportion of water in the samples, an equivalent to 200 mg of intestinal content was weighed. The lysis temperature

was raised to 95 °C for 5 minutes and an incubation step with lysozyme was introduced (200 µL lysozyme buffered solution (20 mg/ml, 37°C, 30 minutes)) to improve rupture of the cell walls of Gram-positive bacteria. DNA was stored at -25°C.

The following primers were used for PCR quantification, after checking their specificity (BLAST-<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>): 314F and 518R for total bacteria (Dar *et al.*, 2005; Handschur *et al.*, 2009), and Eco1457F and Eco1652R for enterobacteria (Bartosch *et al.*, 2004). A standard quantification curve was constructed from a pure culture of *Escherichia coli*, which provided the following linear regression equations to describe the relation between the threshold cycle (Ct) and the logarithm of the number of copies:

$$\text{Total Bacteria } y = -0.2706 x + 11.32 \text{ (R}^2=0.9967\text{)}$$

$$\text{Enterobacteria } y = -0.296 x + 11.52 \text{ (R}^2=0.9989\text{)}$$

It was also checked that the selected primers did not amplify the DNA by extracting pig DNA from sterile blood and making a PCR with the primer being used.

Real time PCR was performed with the StepOne Plus thermocycler (Applied Biosystem), using optical grade 96-well plates. The mastermix used was composed of 12.5 µl of SYBR Green Mastermix 2X, 1.25 µl of each primer (10 µM) and 8 µl of DEPC water, to which was added 200 ng/µl of DNA sample before amplification. The samples were analysed in duplicate.

All the amplification programs included an initial 20 minute step at 95 °C to activate the polymerase, followed by 42 denaturalisation cycles of 30 seconds at 95 °C, primer annealing for 1 minute at the optimal temperature (Total bacteria 60 °C and enterobacteria 62 °C) in a modification of the procedure described by Castillo *et al.* (2006) and Guo *et al.* (2008). To determine the specificity of the amplification, a 15 second step at 95 °C was added, analysing the product melting curve after the last cycle of each amplification.

Analysis of phenols

Phenols were extracted in duplicate from meat samples of *Longissimus dorsi* and the mixture of *Musculus semitendinosus* and *semimembranosus*. After homogenisation, one portion of meat was lyophilised (Virtis model 6K BTEL-85), and the rest was treated enzymatically before lyophilisation (860 IU/g of type H5 β -glucuronidase from *Helix pomatia* in acetate buffer pH 5, in a Binder APT Line™ KB 240-UL incubator at 37 °C, with constant shaking for 18 h (Nakamura and Tonogai, 2003). The phenols were extracted from 1.5 g of lyophilised sample with 150 ml of methanol in a Soxhlet Büchi B-811 (2 h and nitrogen atmosphere) dried in a Büchi evaporator, model Syncore Polyvap R-96 (Q-101) at 350 mbar and 37 °C). The residue was redissolved in 2 ml of methanol and stored at -80 °C.

In addition, the phenols present in 5 ml of pig plasma were extracted, and then part of the samples were treated with 606 IU/ml H5 β -glucuronidase from *Helix pomatia* dissolved in an acetate buffer pH 5, and kept in the dark with constant shaking at 37 °C for 2 hours (Piskula and Terao, 1998). All the samples were treated with 5 ml acetonitrile, and maintained in an ultrasounds bath (Ultrasons-H, JP Selecta S.A.) for 10 min). The protein fraction was separated by centrifugation (9000 rpm, -2 °C, 5 min), and the supernatant stored at -80 °C.

The compounds were identified and quantified by reverse phase HPLC (Eclipse XDB-C18; 4.6x150 mm, 5 μ m pore size) (Agilent Technologies; Waldbronn, Germany), using a guard column (Zorbax SB-C18; 4.6x125 mm, 5 μ m pore size, Agilent Technologies).

The mobile phase was acetonitrile (A) and acidified water containing 5% formic acid (B). The gradient was as follows: 0 min, 30% B; 5 min, 45% B; 16 min, 50% A; 18 min, 55% A; 20 min, 100% B, 26 min, 100% B; followed by a 2 min hold before return to the initial conditions. The flow rate was 1.0 ml/min, and the detection wavelengths were set at 280 nm. The phenolic components were identified by comparing the retention times and spectra with those of commercially available standard compounds. For the purpose of quantification,

linear regression models were determined using standard dilution techniques (**Table VI.1**).

Then, the percentage of phenolic compounds recovered from each matrix was calculated, along with the limits of detection and quantification.

Table VI.1. Linear regression equations for quantifying the phenols in pig meat and plasma.

	Regression line (meat)	Regression line (plasma)
Carvacrol	$y = 18.25 x + 4.0402$	$y = 24.205 x - 0.601$
	$R^2 = 0.9971$	$R^2 = 0.9999$
Thymol	$y = 18.436 x + 0.905$	$y = 16.161 x + 0.1792$
	$R^2 = 0.9999$	$R^2 = 1$

Reagents and chemicals

The reagents, chemicals and their respective suppliers are listed below: Plate counting agar (PCA) and MacConkey Agar from OXOID Ltd (Cambridge, UK). Chromogenic ID-F agar from bioMérieux (Madrid, Spain). MRS agar and SPS agar from Merck (Madrid, Spain). PBS (Phosphate Buffer Saline). QIAamp DNA Stool Mini Kit and DNeasy Blood & Tissue Kit from QIAGEN. SYBR[®] Green Master mix (Applied Biosystems). HPLC grade methanol (CH₃OH), HPLC grade acetic acid (CH₃COOH), HPLC grade formic acid (HCOOH), HPLC grade acetonitrile HPLC (CH₃CN) and anhydrous sodium acetate for ACS analysis (CH₃COONa), all from Scharlau Chemie SA (Barcelona, Spain). H5 type β-glucuronidase-sulfatase from Helix pomatia was supplied by Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Thymol and carvacrol were from Sigma-Aldrich Inc.

VI.1.2.4 STATISTICAL ANALYSIS

After confirming the homoscedasticity of the variances by the Levene statistic, the mean values of each of the four groups assayed were compared by ANOVA with a confidence level of 95%. When the ANOVA test pointed to

significant differences between groups, to identify them a multiple range test comparing the means was carried out using the Tukey HSD test.

VI. 1.3 MOST RELEVANT RESULTS

VI.1.3.1 EFFECT OF ESSENTIAL OILS ON GROWTH AND INTESTINAL MORPHOLOGY IN RATS

All the rats fed the essential oils gained weight more rapidly than the animals fed the control diet, with significant differences between C and T ($p < 0.05$). However, although the FCR was greater in groups M, T and Z, no significant differences were found with the control group. There were neither differences in the weight of the liver, kidneys and spleen.

As regards intestinal morphology, the relation between villus length and crypt depth (V/C) in the duodenum was significantly ($p < 0.01$) higher in C than in M and T due mainly to the greater depth of the Lieberkühn crypts in the EO-fed groups. In the last portion of the small intestine (ileum) the V/C ratio was also significantly higher in Z ($p < 0.05$) than in T due to the greater crypt depth of the latter, since intestinal villi length along the intestine was similar in both the treatments. The total thickness of the intestinal mucosa showed no differences in the small intestine or colon.

VI.1.3.2 EFFECT OF ESSENTIAL OILS ON THE PRODUCTION OF EARLY WEANED PIGS.

Productive and physiological parameters

In general, the animals showed good health throughout the experiment, reaching a mean final weight of 17.80 ± 1.585 kg (C-DFK), 19.12 ± 2.007 kg (M), 19.42 ± 2.905 kg (T) and 19.68 ± 2.118 kg (Z). The animals fed EO showed a higher FCR than those of the Control with potassium diformate, with statistical differences between C-DFK and Z ($p < 0.05$).

Study of intestinal pH and microbiota

The pH measured in the stomach was lower in the EO-fed animals than in the control, with significant differences between C-DFK and Z ($p < 0.05$). In the duodenum, however, the pH of the control was lowest, and significantly so in the case of M ($p < 0.05$). In the rest of the gastrointestinal tract (GIT) there were no statistically significant differences between treatments.

As regards the bacterial quantification in the jejunum using traditional culture-dependent methods, there were no statistically significant differences between treatments due to the high variability between animals. However, the quantity of *Escherichia coli* was greater in the EO-treated animals. The treatment rich in carvacrol (T) seemed to be more effective against *Clostridium* spp. than C-DFK, while Z showed the highest counts of these bacteria. Moreover, group T had 13% more *Lactobacillus* spp. than C-DFK, and higher counts than the other EO treatments, while enterobacteria showed lower levels in C-DFK. As regards the Lactobacillus:Enterobacteria (L:E) ratio, which has traditionally been used to measure the strength of the microbiota inhabiting the intestine (Ewing and Cole, 1994), the best results were obtained in T (1.55 ± 0.28) and C-DFK (1.50 ± 0.31).

The total bacterial counts made in the jejunum, ileum and colon by real time PCR did not differ between treatments. The number of enterobacteria was lowest in group C-DFK throughout the GIT, although there were no statistically significant differences from the rest of the groups.

Transfer of phenols to the meat and plasma of pigs

The data concerning the quantity of phenols, carvacrol and thymol, accumulated in the meat show that the *Longissimus dorsi* and *semimembranosus* and *semitendinosus* muscles, from the back and hind legs, respectively, behave differently as regards their metabolism. When back samples were treated with β -glucuronidase and the free form (aglicone) of the compounds were analysed along with those forming conjugates with glucuronic acid, carvacrol and thymol were detected in the respective groups where each was the major compound in the feed, although the amount of carvacrol

accumulating in the back muscle was four times higher than that of thymol (0.112 ± 0.014 vs. 0.028 ± 0.003). When the active ingredients found in free form were measured without previous enzymatic hydrolyzation, only carvacrol was found in the Thymbra group, while in the rest of the groups neither of the phenols under study was found.

In the meat from the hind leg muscles, the free form, both of carvacrol and thymol, was significantly ($p < 0.01$) lower than the total quantity obtained when the samples were treated with enzyme; that is, most of these compounds in the hind leg muscles are conjugated with glucuronic acid (Mixture: carvacrol 78.1% and thymol 66%; Thymbra: carvacrol 88.7% and thymol 62.5%; Zygis: carvacrol 70.4% and thymol 92.2%).

Total carvacrol levels were significantly ($p < 0.01$) higher in group T (0.763 ppm) than in groups M and Z, where the levels were similar (0.5 ppm). However, although the level of free carvacrol was similar in all three groups (mean 0.11 ppm), group T showed the lowest concentration.

As regards the total concentration of thymol (conjugated and free) found in the hind leg muscles there were no significant differences between groups, although the animals of group Z (receiving a diet rich in this phenol) accumulated the greatest quantity (0.3 ppm). As regards the thymol occurring in its free form, the level measured in group Z (0.02 ppm) was significantly lower ($p < 0.01$) than in groups M and T.

The differences between the levels of the two compounds suggest that, in the case of thymol, a given quantity of this compound is accumulated in muscle regardless of the quantity consumed. In the case of carvacrol, there seem to be a maximum and minimum level accumulated in hind leg muscles, the range being slightly wider than in the case of thymol, and again independent of the amount ingested.

Neither carvacrol nor thymol was detected in the plasma of the animals of any group at sacrifice.

Effect of feed on pig meat

No differences were found in the pH of the *Longissimus dorsi* muscle at 45 min and 24 h *post mortem*.

The meat from group T suffered less drip loss than the other groups, the differences between groups T and Z at 72 and 96 h were statistically significant ($p < 0.05$).

Concerning the CIELab colour measurement, the variance analysis identified significantly ($p < 0.01$) higher b^* and h_{ab} levels in the meat from group M than in the other groups.

The results of the sensorial analysis carried out by the untrained panel showed that the panellist correctly distinguished the EO samples from the Control in a triangular discrimination test with a significance level of 0.05 between C-DFK and M and 0.01 between C-DFK and T, and C-DFK and Z. However, it is not only important to ascertain whether consumers can distinguish between the meat from animals given an EO supplemented diet, but also whether they prefer one meat to another. In the preference study, the consumers preferred T and Z to C-DFK, with the difference between C-DFK and T being statistically significant ($p < 0.05$).

VI.1.4 DISCUSSION

Feeds containing the essential oils of *Thymus zygis* subsp. *gracilis* and *Thymbra capitata*, which are rich in thymol and carvacrol, respectively, improved growth in the monogastric animals used in the experiments described compared to a control group fed a diet without supplement (rats) and another control group fed a diet supplemented with potassium diformate (pigs), which has proved to be an efficient growth promoter in pigs (Chowdhury *et al.*, 2008). This is of great importance in animal husbandry in general to avoid economic loss, and has already been tried in pig production using essential oils of similar characteristics (Sads and Bilkei, 2003; Marcin *et al.*, 2006; Mueller *et al.*, 2012). The good health of the treated animals observed throughout the experiment is also worth

mentioning, since soft faeces were only observed in two animals of each group, except Z, on days 9 and 10 post-weaning.

One of the aspects to be considered is the morphology of the intestinal mucosa, which can be modified by different components of the diet and is related to the better absorption of nutrients and a correct barrier function of the mucosa, providing protection from infection and antigens from the diet. Early weaning in pig production has been related to an increase in crypt depth - which is related to an increase in the cell production index in them (Domeneghini *et al.*, 2006) - and a decrease in villus height, which may lead to an increase in the speed of enterocyte migration to compensate for the loss of height, giving less time for these cells to mature and express their transport capacity, which would result in the deficient absorption of nutrients (Thomson *et al.*, 1994). Meanwhile, other studies (Reisinger *et al.*, 2011) in which the diet of poultry was supplemented with essential oils rich in carvacrol, the increase in crypt depth was not associated with an increase of the cellular migration index from the crypts to the villi, allowing correct cell differentiation. In this sense, although rats fed with *Thymbra capitata* were observed to have a lower villus/crypt index in the duodenum and ileum due to the greater depth in the crypts, the maintenance of villus length and a greater increase in weight suggest a higher nutrient absorption efficiency, due to the intestinal morphology or other factors. Something similar occurred in the treatment with the mixture of the oils, where weight gain was similar to that of the animals of the *Thymbra* group, although the most significant effect was on the morphological growth of the proximal part of the small intestine. According to the above, these oils could contribute to mitigating the negative effects of premature weaning by promoting morphological growth in the intestinal mucosa. However, it is necessary to make further studies in the weaning period of pigs to confirm this effect.

Besides a correct intestinal morphology, the improvement in nutrient absorption that leads to an increase in animal weight could be caused by the beneficial effects of the essential oils on the digestibility of the dry material, nitrogen and energy (Zitterl-Eglseer *et al.*, 2008; Yan *et al.*, 2010), as well as by improvements in the immune response (Taranu *et al.*, 2012).

Also, the intestinal epithelium of mammals appears to have an essential and active role in the balance of the microbiota, which ranges, for example, from the simple function of physical barrier to the secretion of antimicrobial peptides by Paneth cells (Duerr and Hornef, 2012). At the same time, the saprophytic or normal commensal bacteria of the intestinal mucosa play an important role in the host protection through different mechanisms, such as the secretion of antimicrobial substances that inhibit the growth of pathogens, or compete with invading organism for binding sites and nutrients (Cummings *et al.*, 2004). By decreasing the pH in the stomach of the pigs, the essential oils used in our experiment, could improve the barrier function against the bacteria most susceptible to acid, like coliforms, and favour the growth of lactic acid bacteria, an effect that can be observed along the small intestine (Canibe and Jensen, 2003). As Zhu *et al.* (2006) say, in *in vitro* studies, a stomach pH under 3.5 has a strong bactericidal effect against pathogenic strains of *Escherichia coli* and *Helicobacter pylori*. Therefore, essential oils could improve intestinal microbiota through increasing the Lactobacillus:Enterobacteria ratio (L:E) in the small intestine (Manzanilla *et al.*, 2004) and in the caecum, Castillo *et al.* (2006). However, in our case, the results are contradictory, as the animals with a lower stomach pH, higher productive yield and absence of diarrhoea (Zygis group) were those with a lower L:E index, while animals from group C-DFK showed a good relation between these two groups of bacteria (with no significant differences from the rest) but with a worse conversion and growth index of the animals. On the other hand, the group of pigs fed with *Thymbra capitata* showed good growth and FCR of the animals, as well as a better L:E index, similar to the Control-DFK group, due to an increase in the number of *Lactobacillus* spp.

Providing feed with essential oils allow the transfer of biologically active substances to the meat. Both in the hind legs and loin, the carvacrol is transferred to the meat in higher quantities than thymol, preferably in the form of glucuronic acid, possibly due to the metabolism of the muscle and the octanol/water partition coefficient that influences the penetration of phenols through the epithelium cells (El-Kattan *et al.*, 2001; Ultee *et al.*, 2002; Silderberg *et al.*, 2006). Although carvacrol and thymol are the most biologically active forms, whose antimicrobial and antioxidant properties are very well known

(Peñalver *et al.*, 2005; Kumar *et al.*, 2008; El Bouzidi *et al.*, 2013), some forms derived from these, such as thymoquinone, produced by the oxidation of thymol and carvacrol, have antitumor and hepatoprotective effects (Badary, 1999; Talib and Abukhader, 2013), so feeding with essential oils of different thymes could be useful for obtaining meats with an added value, which are longer lasting and safer, and offering consumers a functional food obtained in a natural way, as long as their bioavailability in humans is confirmed.

Similarly, the presence of these compounds in the meat can vary their physico-chemical and organoleptic characteristics. For example, the smaller water losses observed in the meat of the *Thymbra* group could be because of the antioxidant nature of the carvacrol, since, as Traore *et al.* (2012) explain, the water loss in meat is affected, amongst other things, by protein oxidation. Given this antioxidant capacity of the essential oils (Miguel, 2010), we might expect, in the groups fed with the said substances, an improvement in the meat expressed through the CIELab coordinates. However, no differences were observed with regard to the Control-DFK, and the values of b^* and h_{ab} , associated with the browning of meat (Luciano *et al.*, 2009), increased significantly in the M group compared with the rest of the treatments.

Moreover, feed with essential oils can in some occasions produce undesired changes in the taste of food (Burt, 2004). However, the presence of carvacrol and thymol in the meat in this study had a positive effect on taste, especially in the case of *Thymbra capitata*.

For these reasons, the essential oils, especially the essential oil of *Thymbra capitata*, could be considered interesting natural alternatives to the use of antibiotics and synthetic growth promoters. It would be interesting to look more deeply into the effects of this oil, on its own or combined with potassium diformate, on different aspects of pig production. It would also be interesting to assess more thoroughly the effect of this essential oil on the sensory characteristics and the quality of the meat or of the products derived from the same, including their oxidative and microbiological stability, and any increase in half life of the meat, with a view to their possible commercial promotion as added value products.

VI.2 CONCLUSIONS

First. The essential oils tested act as growth promoters by improving the feed conversion ratio in the animals, in both pigs and rats, although in the latter the effect is less significant.

Second. The administration of the essential oil of *Thymbra capitata* favours morphological growth in the proximal and distal part of the small intestine, which, together with an increase in weight, suggests an increase in the nutrient absorption efficiency. The same applies to the treatment with a mixture of oils, although the most significant effect in this case, is on the proximal part of the small intestine.

Third. The tested essential oils equal, or even improve in some aspects, the activity of potassium diformate on the health of the intestine of recently weaned pigs, as they produce a higher acidification of stomach pH than the organic acid.

Given the good results obtained for the Lactobacillus:Enterobacteria ratio, associated in the case of *Thymbra capitata* to the increase of Lactobacillus, and the decrease in enterobacteria with potassium diformate, it would be interesting to study the combination of both components in animal feed.

Fourth. The use of essential oils of *Thymbra capitata* and *Thymus zygis* in the feeding of pigs favours the transmission of the major phenol components, carvacrol and thymol, to the meat, especially in the hind leg muscles, which influences the physico-chemical and sensory characteristics of the meat. Of the studied oils, *Thymbra capitata* presents the higher transmission of its major phenol, carvacrol, which is responsible for the increase in the capacity to retain water during storage and for the greater acceptance of this meat by consumers.

VII. RESUMEN

RESUMEN

La presente Tesis Doctoral tiene como objetivo principal evaluar el efecto de los aceites esenciales de *Thymus zygis* subsp. *gracilis*, rico en timol (65,5%), y *Thymbra capitata*, rico en carvacrol (72,9%), como promotores del crecimiento en animales monogástricos destetados precozmente, y su uso como fuente de principios activos que potencien la calidad de las producciones ganaderas.

Para este fin, 32 ratas macho Sprague Dawley, destetadas a los 21 días, se dividen aleatoriamente en cuatro lotes. El grupo Control se alimenta con un pienso base, otros dos lotes se suplementan con un 0,06% de cada aceite esencial y al cuarto grupo se le añade un 0,06% de la mezcla de los dos a partes iguales. Se calculan los parámetros productivos de los animales durante 10 días de ensayo, y tras su sacrificio, se realiza el estudio histológico del intestino a través de la medida, mediante análisis de imagen, de la longitud de las vellosidades, profundidad de las criptas y grosor de la mucosa, en intestino delgado y grueso. Por otro lado, a un total de 80 lechones de cerdo blanco, de ambos sexos (Pietrain*Large white x Large white*Landrace), destetados de forma precoz a los 21 días de edad, se les suplementa la alimentación con un 0,16% de los mismos aceites, comparándolos con un grupo Control suplementado con diformiato de potasio. Se controla el rendimiento productivo de los animales durante los 42 días de la fase de transición. De cada lote se toman al azar 8 animales sobre los que se evalúa el efecto de la alimentación sobre el pH del intestino y su microbiología, por métodos tradicionales (aerobios mesófilos totales, *Escherichia coli*, *Clostridium* sulfito-reductores, enterobacterias totales y *Lactobacillus* spp.) y por PCR en tiempo real (Bacterias totales y enterobacterias). Asimismo, se determina mediante HPLC la transferencia de los fenoles carvacrol y timol a la carne, y el efecto sobre sus características físico-químicas (pH, color CIELab y pérdidas de agua por goteo) y sensoriales (prueba discriminativa triangular y de preferencia sobre panel de consumidores).

De los resultados obtenidos se concluye que los aceites esenciales ensayados actúan como promotores del crecimiento al mejorar el índice de conversión de alimento de los animales. Asimismo, el aceite esencial de

Thymbra capitata, y en menor medida el tratamiento con mezcla de aceites, favorece el crecimiento morfológico de la parte proximal y distal del intestino delgado de ratas, lo que unido a un mayor incremento de peso, sugiere un aumento de la eficiencia en la absorción de nutrientes. Además, los aceites esenciales ensayados igualan, e incluso mejoran en algunos aspectos, la actividad del diformiato de potasio sobre la salud intestinal de los cerdos, ya que producen una mayor acidificación del pH estomacal respecto al ácido orgánico. Debido a los buenos resultados obtenidos en la relación Lactobacillus:Enterobacteria, asociada en el caso de *Thymbra capitata* al aumento de Lactobacillus, y al descenso de enterobacterias en el diformiato de potasio, se considera interesante el estudio combinado de los dos compuestos en alimentación animal. Por último, el empleo de aceite esencial de *Thymbra capitata* y *Thymus zygis* en la alimentación de cerdos favorece la transmisión de sus compuestos fenólicos mayoritarios, carvacrol y timol, a la carne, especialmente a los músculos de las patas traseras, lo cual influye en las características físico-químicas y sensoriales de la carne. El aceite esencial de *Thymbra capitata* es el que presenta una mayor transmisión de su fenol mayoritario, carvacrol, responsable del aumento de la capacidad de retención de agua durante el almacenamiento, y de la mayor aceptación de esta carne por parte de los consumidores.

SUMMARY

The main objective of this Doctoral Thesis is to evaluate the effect of essential oils from *Thymus zygis* subsp. *gracilis*, which is rich in thymol (65.5%), and *Thymbra capitata*, rich in carvacrol (72.9%), as a growth promoters for early weaned monogastric animals, and their potential use as an active compound to improve quality in animal husbandry.

For this reason, 32 Sprague Dawley male rats were weaned at 21 days of age and randomly divided into four lots. The Control group was fed a base feed, while the diet of another two lots was supplemented with 0.06% of each essential oil and the forth lot with a 0.06% mixture of both oils mixed together in equal parts. The productive parameters of the animals were calculated over a 10-day experimental period, and, aftersacrifice, a histological examination of the intestine was carried out, measuring the length of the villi, the depth of the crypts and mucosa thickness by means of image analysis of the small and large intestine. In addition, a total of 80 white piglets of both genders (Pietrain*Large white x Large white*Landrace), were weaned prematurely at the age of 21 days, and their food was supplemented (0.16%) with the same oils. The results were compared with those of a control group whose diet was supplemented with potassium diformate. The productive performance of the animals was monitored during 42 days of the transition phase. From each lot, 8 animals were randomly selected and, after sacrifice, the effect of the feed was evaluated on the pH of the digestive system and its microbiology, using traditional methods (total aerobic mesophiles, *Escherichia coli*, sulphite-reducing *Clostridium*, total enterobacteria and *Lactobacillus* spp.) and by means of real time PCR (total bacteria and enterobacteria). Also, the transfer of the phenols carvacrol and thymol to the meat was determined through HPLC, and the effect on the meat's physicochemical (pH, CIELab colour and drip loss) and sensory (discriminatory triangular test and consumer preference panel) characteristics was assessed.

From the results it is concluded that the essential oils used act as growth promoters by improving the feed conversion rate of the animals. Also, the essential oil from *Thymbra capitata*, and to a lesser extent, the treatment with a mixture of oils, favours the morphological growth of the proximal and distal part

of the small intestine of rats, which, together with the observed increase in weight, suggests an improvement in the nutrient absorption efficiency. Also, the used essential oils equals, or even improves in some aspects, the effect of potassium diformate on the intestinal health of pigs, because they increase the acidification of the stomach pH compared with the organic acid. Given the good results obtained for the Lactobacillus:Enterobacteria ratio, associated in the case of *Thymbra capitata* with the increase in *Lactobacillus* and the decreased number of enterobacteria in the potassium diformate, the use of both components together in animal feed is considered worthy of study. Lastly, the use of essential oil of *Thymbra capitata* and *Thymus zygis* in the feeding of pigs favours the transmission of their principal phenolic compounds, carvacrol and thymol, to the meat, especially to the hind leg muscles, affecting the physicochemical and sensory characteristics of the meat. The essential oil from *Thymbra capitata* is the essential oil that transmits more of its main phenol, carvacrol. This is responsible for the increased water holding capacity observed during storage, and also produced the meat that was the most accepted by consumers.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

- Abu-Lafi S, Odeh I, Dewik H, Qabajah M, Hanus LO, Dembitsky VM (2008). Thymol and carvacrol production from leaves of wild Palestinian *Majorana syriaca*. *Bioresource Technology*, 99(9): 3914-3918.
- Adamczyk S, Lázaro R, Pérez-Arquillué C, Conchello P, Herrera A (2005). Evaluation of residues of essential oil components in honey after different anti-Varroa treatments. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(26): 10085-10090.
- Adeneye AA, Adeyemi OO, Agbaje EO, Banjo AAF (2010). Evaluation of the toxicity and reversibility profile of the aqueous seed extract of *Hunteria umbellata* (k. schum.) Hallier F. in rodents. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines* 7(4): 350-369.
- Adeola O, King DE (2006). Developmental changes in morphometry of the small intestine and jejunal sucrase activity during the first nine weeks of postnatal growth in pigs. *Journal of animal Science*, 84(1): 112-118.
- Ahmed ST, Hossain ME, Kim GM, Hwang JA, Ji H, Yang CJ (2013). Effects of resveratrol and essential oils on growth performance, immunity, digestibility and fecal microbial shedding in challenged piglets. *Asian.Australasian Journal of Animal Sciences*, 26(5): 683-690.
- Akyurek H, Yel A (2011). Influence of dietary thymol and carvacrol preparation and/or an organic acid blend on growth performance, digestive organs and intestinal microbiota of broiler chickens. *African Journal of Microbiology Research*, 5(8): 979-984.
- Alcalde MJ, Ripoll G, Panea B (2013). Consumer attitudes towards meat consumption in Spain with special reference to quality marks and kid meat. En *Consumer attitudes to food quality products*. Wageningen Academic Publishers, 97-107.
- Alcaraz FJ, Sánchez P, Correal E (1989). Catálogo de las plantas aromáticas, condimentarias y medicinales de la Región de Murcia. Monografías INIA, 67.
- Allee GL, Touchette KJ (1999). Efectos de la nutrición sobre la salud intestinal y el crecimiento de lechones. En *Avances en nutrición y alimentación animal*, 125-144. Fundación Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal.
- Al-Soud WA, Rådström P (2000). Effects of amplification facilitators on diagnostic PCR in the presence of blood, feces, and meat. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(12): 4463-4470.
- Álvarez D (2002). Influencia de las condiciones *ante mortem* y la tecnología del sacrificio sobre la calidad de la carne porcina. Tesis Doctoral. Universidad de Murcia.
- Amacher DE, Schomaker SJ, Boldt SE, Mirsky M (2006). The relationship among microsomal enzyme induction, liver weight, and histological change in cynomolgus monkey toxicology studies. *Food and Chemical Toxicology*, 44(4): 528-537.
- American Association of Cereal Chemists (AACC) (2001). The definition of dietary fiber. *Cereal Foods World*, 46(3): 112-129.
- Amit-Romach E, Uni Z, Cheled S, Berkovich Z, Reifen R (2009). Bacterial population and innate immunity-related genes in rat gastrointestinal tract are altered by vitamin A-deficient diet. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 20(1): 70-77.

BIBLIOGRAFÍA

- Amna OF, Nooraain H, Noriham A, Azizah AH, Husna RN (2013). Acute and oral subacute toxicity study of ethanolic extract of cosmos caudatus leaf in Sprague Dawley rats. *International Journal of Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics*, 3(4): 301-305.
- Andrés S, Huerga L, Mateo J, Tejido ML, Bodas R, Morán L, Prieto N, Rotolo L, Giráldez FJ (2014). The effect of quercetin dietary supplementation on meat oxidation processes and texture of fattening lambs. *Meat Science*, 96(2): 806-811.
- Apple JK (2007). Effects of nutritional modifications on the water-holding capacity of fresh pork: a review *Journal of Animal Breeding and Genetetics*, 124(s1): 43-58.
- Armougom F, Bittar F, Stremmer N, Rolain JM, Robert C, Dubus JC, Sarles J, Raoult D, La Scola B (2009). Microbial diversity in the sputum of a cystic fibrosis patient studied with 16S rDNA pyrosequencing. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 28(9): 1151-1154.
- Augustin K, Blank R, Boesch-Saadatmandi C, Frank J, Wolfram S, Rimbach G (2008). Dietary green tea polyphenols do not affect vitamin E status, antioxidant capacity and meat quality of growing pigs. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 92(6): 705–711.
- Awad WA, Ghareeb K, Abdel-Raheem S, Böhm J (2009). Effects of dietary inclusion of probiotic and synbiotic on growth performance, organ weights, and intestinal histomorphology of broiler chickens. *Poultry Science*, 88(1): 49-56.
- Bach Knudsen KE (2010). Características químicas y valor nutritivo de la fibra para ganado porcino. En *Avances en nutrición y alimentación animal*, 153-172. Fundación Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal.
- Bacich DJ, Sobek KM, Cummings JL, Atwood AA, O'keefe DS (2011). False negative results from using common PCR reagents. *BMC Research Notes*, 4(1): 457.
- Badary OA (1999). Thymoquinone attenuates ifosfamide-induced Fanconi syndrome in rats and enhances its antitumor activity in mice. *Journal of Ethnopharmacology*, 67(2): 135–142
- Baer AA, Miller MJ, Dilger AC (2013). Pathogens of interest to the pork industry: A review of research on interventions to assure food safety. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 12(2): 183-217.
- Bagamboula CF, Uyttendaele M, Debevere J (2004). Inhibitory effect of thyme and basil essential oils, carvacrol, thymol, estragol, linalool and p-cymene towards *Shigella sonnei* and *S. flexneri*. *Food Microbiology*, 21(1): 33-42.
- Bager F, Madsen M, Christensen J, Aarestrup FM (1997). Avoparcin used as growth promoter is associated with the occurrence of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* on Danish poultry and pig farms. *Preventive Veterinary Medicine*, 31(1): 95-112.
- Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M (2008). Biological effects of essential oils – A review. *Food and Chemical Toxicology*, 46(2): 446–475.

- Bañón S (2012) Shelf life of fresh and frozen pork. En: Nollet LML (Ed.), *Handbook of meat, poultry and seafood quality*, 308-320. Oxford: Wiley-Blackwell.
- Bañón S, Díaz P, Rodríguez M, Garrido MD, Price A (2007). Ascorbate, green tea and grape seed extracts increase the shelf life of low sulphite beef patties. *Meat Science*, 77(4): 626-633.
- Barker N, Van de Wetering M, Clevers H (2008). The intestinal stem cell. *Genes and Development*, 22(14): 1856-1864.
- Bartosch S, Fite A, Macfarlane GT, McMurdo MET (2004). Characterization of bacterial communities in feces from healthy elderly volunteers and hospitalized elderly patients by using real-time PCR and effects of antibiotic treatment on the fecal microbiota. *Applied and Environmental Microbiology*, 70 (6) 3575-3581.
- Bassolé IHN, Juliani HR (2012). Essential oils in combination and their antimicrobial properties. *Molecules*, 17(4): 3989-4006.
- BEDCA (2014). Base de Datos Española de Composición de Alimentos. <http://www.bedca.net/>
- Bergonzelli GE, Donnicola D, Porta N, Corthésy-Theulaz IE (2003). Essential oils as components of a diet-based approach to management of *Helicobacter* infection. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47(10): 3240-3246.
- Berta G, Altamura MM, Fusconi A, Cerruti F, Capitani F, Bagni N (1997). The plant cell wall is altered by inhibition of polyamine biosynthesis. *New Phytologist*, 137(4): 569-577.
- Bhandari SK, Xu B, Nyachoti CM, Giesting DW, Krause DO (2008). Evaluation of alternatives to antibiotics using an *Escherichia coli* K88+ model of piglet diarrhea: Effects on gut microbial ecology. *Journal of animal science*, 86(4): 836-847.
- Biagi G, Piva A (2007). In vitro effects of some organic acids on swine cecal microflora. *Italian Journal of Animal Science*, 6(4), 361-374.
- Bidner BS, Ellis M, Brewer MS, Campion D, Wilson ER, McKeith FK (2004). Effect of ultimate pH on the quality characteristics of pork. *Journal of Muscle Foods*, 15(2): 139-154.
- Bigoniya P, Singh CS, Shukla A (2009). A comprehensive review of different liver toxicants used in experimental pharmacology. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Drug Research*, 1(3): 124-135.
- Blikslager AT, Moeser AJ, Gookin JL, Jones SL, Odle J. (2007). Restoration of barrier function in injured intestinal mucosa. *Physiological Reviews*, 87(2): 545-564.
- Bok E, Mazurek J, Pusz P, Stosik M, Baldy-Chudzik K (2013). Age as a factor influencing diversity of commensal *E. coli* microflora in pigs. *Polish Journal of Microbiology*, 62(2): 165-171.
- Boler DD, Gabriel SR, Yang H, Balsbaugh R, Mahan DC, Brewer MS, McKeith FK, Killefer J (2009). Effect of different dietary levels of natural-source

- vitamin E in grow-finish pigs on pork quality and shelf life. *Meat Science*, 83(4): 723-730.
- Bomba A, Jonecova Z, Koscova J, Nemcova R, Gancarikova S, Mudronova D, Scirankova L, Buleca V, Lazar G, Posivak J, Kastel R, Marekova M (2006): The improvement of probiotics efficacy by synergistically acting components of natural origin: a review. *Biologia*, 61(6): 729–734.
- Bona TDMM, Pickler L, Miglino LB, Kuritza LN, Vasconcelos SP, Santin E (2012). Óleo essencial de orégano, alecrim, canela e extrato de pimenta no controle de *Salmonella*, *Eimeria* e *Clostridium* em frangos de corte. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 32(5): 411-418.
- Bosi P, Sarli G, Casini L, De Filippi S, Trevisi P, Mazzoni M, Merialdi G (2007). The influence of fat protection of calcium formate on growth and intestinal defence in *Escherichia coli* K88-challenged weanling pigs. *Animal Feed Science and Technology*, 139(3): 170–185.
- Botsoglou NA, Christaki E, Fletouris DJ, Florou-Paneri P, Spais AB (2002). The effect of dietary oregano essential oil on lipid oxidation in raw and cooked chicken during refrigerated storage. *Meat Science*, 62(2): 259–265.
- Botsoglou NA, Grigoropoulo SH, Botsoglou E, Govaris A, Papageorgiou G (2003). The effects of dietary oregano essential oil and α -tocopheryl acetate on lipid oxidation in raw and cooked turkey during refrigerated storage. *Meat Science*, 65(3): 1193-1200.
- Boudry G, Jury J, Yang PC, Perdue MH (2007). Chronic psychological stress alters epithelial cell turn-over in rat ileum. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 292(5): G1228-G1232.
- Boudry G, Péron V, Le Huërou-Luron I, Lallès JP, Sève B (2004). Weaning induces both transient and long-lasting modifications of absorptive, secretory, and barrier properties of piglet intestine. *The Journal of Nutrition*, 134(9): 2256-2262.
- Bouzouita N, Kachouri F, Hamdi M, Chaabouni MM (2003). Antimicrobial activity of essential oils from Tunisian aromatic plants. *Flavour and Fragrance Journal*, 18(5): 380-383.
- Bowker BC, Grant AL, Forrest JC, Gerrard DE (2000). Muscle metabolism and PSE pork. *Journal of Animal Science*, 79: 1-8.
- Bozin B, Mimica-Dukic N, Simin N, Anackov G (2006). Characterization of the volatile composition of essential oils of some Lamiaceae spices and the antimicrobial and antioxidant activities of the entire oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(5): 1822-1828.
- BPEX (2011). Annual report 2010: Pig cost of production in selected countries. Agriculture and Horticulture Development Board. England.
- Brewer MS, Zhu LG, Bidner B, Meisinger DJ, McKeith FK (2001). Measuring pork color: effects of bloom time, muscle, pH and relationship to instrumental parameters. *Meat Science*, 57(2): 169-176.
- Budiño FEL, Thomaz MC, Kronka RN, Nakaghi LSO, Tucci FM, Fraga AL, Scandolera AJ, Huaynate RAR (2005). Effect of probiotic and prebiotic

- inclusion in weaned piglet diets on structure and ultra-structure of small intestine. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 48(6): 921-929
- Burnell TW, Cromwell GL, Stahly TS (1988). Effects of dried whey and copper sulfate on the growth responses to organic acid in diets for weanling pigs. *Journal of Animal Science*, 66(5): 1100-1108.
- Burt S (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods-a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94(3): 223-253.
- Burt SA, van der Zee R, Koets AP, de Graaff AM, van Knapen F, Gaastra W, Haagsman HP, Veldhuizen EJ (2007). Carvacrol Induces Heat Shock Protein 60 and Inhibits Synthesis of Flagellin in *Escherichia coli* O157:H7. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(14): 4484-4490.
- Bustin SA, Zaccara S, Nolan T (2012). An introduction to the Real-time polymerase chain reaction. En: Filion M (Ed.), *Quantitative real-time PCR in applied microbiology*. Norfolk: Caister Academic Press.
- Butenhoff JL, Kennedy Jr GL, Chang SC, Olsen GW (2012). Chronic dietary toxicity and carcinogenicity study with ammonium perfluorooctanoate in Sprague–Dawley rats. *Toxicology*, 298(1): 1-13.
- Calveyra JC, Nogueira MG, Kich JD, Biesus LL, Vizzotto R, Berno L, Coldebella A, Lopes L, Morés N, Lima GJMM, Cardoso M (2012). Effect of organic acids and mannanoligosaccharide on excretion of *Salmonella typhimurium* in experimentally infected growing pigs. *Research in Veterinary Science* 93(1): 46-47.
- Calvo MA, Angulo E, Costa-Batllo P, Shiva C, Adelantado C, Vicente A (2006). Natural plant extracts and organic acids: synergism and implication on piglet's intestinal microbiota. *Biotechnology*, 5(2): 137-142.
- Campbell JM, Crenshaw JD, Polo J (2013). The biological stress of early weaned piglets. *Journal of Animal Science and Biotechnology* 4:19.
- Candek-Potokar M, Zlender B, Lefaucheur L, Bonneau M (1998). Effects of age and/or weight at slaughter on *Longissimus dorsi* muscle: Biochemical traits and sensory quality in pigs. *Meat Science*, 48 (3): 287-300.
- Canibe N, Jensen BB (2003). Fermented and nonfermented liquid feed to growing pigs: Effect on aspects of gastrointestinal ecology and growth performance. *Journal of Animal Science*, 81(8): 2019-2031.
- Canibe N, Jensen BB (2012). Fermented liquid feed-Microbial and nutritional aspects and impact on enteric diseases in pigs. *Animal Feed Science and Technology* 173(1): 17- 40.
- Canibe N, Steien SH, Overland M, Jensen BB (2001). Effect of K-diformate in starter diets on acidity, microbiota, and the amount of organic acids in the digestive tract of piglets, and on gastric alterations. *Journal of Animal Science*, 79(8): 2123-2133.
- Cañigueral S y Vanaclocha B (2000). Usos terapéuticos del tomillo. *Revista de Fitoterapia*, 1(1): 5-13.

BIBLIOGRAFÍA

- CARM (2009). Estadística Agraria Regional 2009. Consejería de Agricultura y Agua de la Región de Murcia. www.carm.es
- CARM (2011). Estadística Agraria Regional 2011. Consejería de Agricultura y Agua de la Región de Murcia. www.carm.es
- Carneiro MSC, Lordelo MM, Cunha LF, Freire JPB (2008). Effects of dietary fibre source and enzyme supplementation on faecal apparent digestibility, short chain fatty acid production and activity of bacterial enzymes in the gut of piglets. *Animal Feed Science and Technology*, 146(1): 124-136.
- Casewell M, Friis C, Marco E, McMullin P, Phillips I (2003). The European ban on growth-promoting antibiotics and emerging consequences for human and animal health. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 52(2): 159-161.
- Castillo M, Martín-Orúe SM, Anguita M, Pérez JF, Gasa J (2007). Adaptation of gut microbiota to corn physical structure and different types of dietary fibre. *Livestock Science*, 109(1): 149-152.
- Castillo M, Martín-Orúe SM, Manzanilla EG, Badiola I, Martín M, Gasa J (2006). Quantification of total bacteria, enterobacteria and lactobacilli populations in pig digesta by real-time PCR. *Veterinary Microbiology*, 114(1): 165-170.
- Castillo M, Martín-Orúe SM, Roca M, Manzanilla EG, Badiola I, Pérez JF, Gasa J (2006). The response of gastrointestinal microbiota to avilamycin, butyrate, and plant extracts in early-weaned pigs. *Journal of Animal Science*, 84(10): 2725-2734.
- Castillo M, Skene G, Roca M, Anguita M, Badiola I, Duncan SH, Flint HJ, Martín-Orúe SM (2007). Application of 16S rRNA gene-targeted fluorescence in situ hybridization and restriction fragment length polymorphism to study porcine microbiota along the gastrointestinal tract in response to different sources of dietary fibre. *FEMS Microbiology Ecology*, 59(1): 138-146
- Castro M (2005). Use of additives on the feeding of monogastric animals. *Cuban Journal of Agricultural Science* 39: 439-445.
- Cattoli G, De Battisti C, Marciano S, Ormelli S, Monne I, Terregino C, Capua I (2009). False-negative results of a validated real-time PCR protocol for diagnosis of Newcastle disease due to genetic variability of the matrix gene. *Journal of Clinical Microbiology*, 47(11): 3791-3792.
- Chamorro A, Miranda FJ, Rubio S, Valero V (2012). Innovations and trends in meat consumption: An application of the Delphi method in Spain. *Meat Science*, 92(4): 816-822.
- Chan KK (2001). Quantitation of monoterpenoid compounds with potential medicinal use in biological fluids. *Journal of Chromatography A*, 936(1): 47-57.
- Chang F, Mahadeva U, Deere H (2005). Pathological and clinical significance of increased intraepithelial lymphocytes (IELs) in small bowel mucosa. *APMIS*, 113(6): 385-399.

- Chaves AV, Stanford K, Gibson LL, McAllister TA, Benchaar C (2008). Effects of carvacrol and cinnamaldehyde on intake, rumen fermentation, growth performance, and carcass characteristics of growing lambs. *Animal Feed Science and Technology*, 145(1): 396-408.
- Chen K, Gao J, Li J, Huang Y, Luo X, Zhang T (2012). Effects of probiotics and antibiotics on diversity and structure of intestinal microflora in broiler chickens. *African Journal of Microbiology Research*, 6(37): 6612-6617.
- Chen YJ, Kwon OS, Min BJ, Son KS, Cho JH, Hong JW, Kim IH (2005). The effects of dietary Biotite V supplementation as an alternative substance to antibiotics in growing pigs. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 18(11), 1642-1645.
- Chen YJ, Son KS, Min BJ, Cho JH, Kwon OS, Kim IH (2005). Effects of dietary probiotic on growth performance, nutrients digestibility, blood characteristics and fecal noxious gas content in growing pigs. *Asian Australasian Journal of Animal Sciences*, 18(10): 1464-1468.
- Cheng H (1974). Origin, differentiation and renewal of the four main epithelial cell types in the mouse small intestine IV. Paneth cells. *American Journal of Anatomy*, 141(4), 521-535.
- Chipinda I, Anderson SE, Butterworth LF, Beezhould D, Siegel PD (2009). Increased cell proliferation in spleen and lymph nodes peripheral to contact allergen application site. *Toxicology*, 257(3): 113-116.
- Chiquieri J, Soares RTRN, Lyra MS, Hurtado Nery VL, Fonseca JB (2009). Ácidos orgânicos na alimentação de leitões desmamados. *Archiva Zootechnica*, 58(1): 609-612.
- Chowdhury R, Haque MN, Islam KMS, Khan MJ (2008). Potassium diformate: a new alternative to antibiotic growth promoters. *Bangladesh Journal of Animal Science*, 37(2): 99-105.
- CIE (1978). Recommendations on uniform color spaces-color difference equations, psychometric color terms. *Commission International de L'Eclairage*. Paris. Supplement No. 2 to CIE Publication No. 15 (E-1.3.1) 1971/ (TC-1-3).
- Ciftci O, Tanyildizi S, Godekmerdan A (2010). Protective effect of curcumin on immune system and body weight gain on rats intoxicated with 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD). *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, 32(1): 99-104.
- Clarke RM 1973. Progress in measuring epithelial turnover in the villus of the small intestine. *Digestion*, 8(2): 161-175.
- Cliffe LJ, Humphreys NE, Lane TE, Potten CS, Booth C, Grecis RK (2005). Accelerated intestinal epithelial cell turnover: a new mechanism of parasite expulsion. *Science*, 308(5727): 1463-1465.
- Clifford MN (2004). Diet-derived phenols in plasma and tissues and their implications for health. *Planta Medica*, 70(12): 1103-1114.
- Coldham NG, Sauer MJ (2000) Pharmacokinetics of ((14)C) Genistein in the rat: gender related differences, potential mechanisms of biological action, and

BIBLIOGRAFÍA

- implications for human health. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 164(2): 206-215.
- Conway PL (1997). Development of intestinal microbiota. Gastrointestinal microbes and host interactions. En: Mackie RI, Whyte BA, Isaacson RE (Eds.), *Gastrointestinal microbiology*, vol. 2. London: Chapman and Hall.
- Corpet DE (2000). Mechanism of antimicrobial growth promoters used in animal feed. *Revue Médecine Vétérinaire*, 151(2): 99-104.
- Cosentino S, Tuberoso CIG, Pisano B, Satta M, Mascia V, Arzedi E, Palmas F (1999). In-vitro antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian thymus essential oils. *Letters in Applied Microbiology*, 29(2): 130-135.
- Cosge B, Turker A, Ipek A, Gurbuz B (2009). Chemical compositions and antibacterial activities of the essential oils from aerial parts and corollas of *Origanum acutidens* (hand.-mazz.) ietswaart, an endemic species to Turkey. *Molecules*, 14(5): 1702-1712.
- Cromwell GL (2002). Why and how antibiotics are used in swine production. *Animal Biotechnology*, 13(1): 7-27.
- Croteau R, Kutchan TM, Lewis NG (2000). Natural Products (Secondary Metabolites). En: Buchanan B, Gruissem W y Jones R (Eds.), *Biochemistry and molecular biology of plants*, 24: 1250-1319. Rockville: American Society of Plant Physiologists.
- Crozier A, Jaganath IB, Clifford MN (2009). Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. *Natural Products Reports*, 26(8): 1001-1043.
- Cummings JH, Antoine JM, Azpiroz F, Bourdet-Sicard R, Brandtzaeg P, Calder PC, Gibson GR, Guarner F, Isolauri E, Pannemans D, Shortt C, Tuijtelars S, Watzl B (2004). PASSCLAIM1-Gut health and immunity. *European Journal of Nutrition*, 43(2): II/118-II/173.
- Cummings JH, Pomare EW, Branch WJ, Naylor CP, Macfarlane GT (1987). Short chain fatty acids in human large intestine, portal, hepatic and venous blood. *Gut*, 28(10): 1221-1227.
- Cummins AG, Jones BJ, Thompson FM (2006). Postnatal epithelial growth of the small intestine in the rat occurs by both crypt fission and crypt hyperplasia. *Digestive Diseases and Sciences*, 51(4): 718-723.
- Cummins AG, Steele TW, Labrooy JT, Shearman DJC (1988). Maturation of the rat small intestine at weaning: changes in epithelial cell kinetics, bacterial flora, and mucosal immune activity. *Gut*, 29(12): 1672-1679.
- Dar SA, Kuenen JG, Muyzer G (2005). Nested PCR-denaturing gradient gel electrophoresis approach to determine the diversity of sulfate-reducing bacteria in complex microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(5): 2325-2330.
- Daudelin JF, Lessard M, Beaudoin F, Nadeau É, Bissonnette N, Boutin Y, Brousseau JP, Lauzon K, Fairbrother JM (2011). Administration of probiotics influences F4 (K88)-positive enterotoxigenic *Escherichia coli*

- attachment and intestinal cytokine expression in weaned pigs, *Veterinary Research*, 42: 69.
- De Boer VCJ, Dihal AA, van der Woude H, Arts ICW, Wolfram S, Alink GM, Rietjens IMCM, Keijer J, Hollman PCH (2005). Tissue distribution of quercetin in rats and pigs. *The Journal of Nutrition*, 135(7): 1718-1725.
- De Busser EV, Dewulf J, Zutter LD, Haesebrouck F, Callens J, Meyns T, Maes W, Maes D (2011). Effect of administration of organic acids in drinking water on faecal shedding of *E. coli*, performance parameters and health in nursery pigs. *The Veterinary Journal*, 188(2): 184-188.
- De Neeling AJ, Van den Broek MJM, Spalburg EC, Van Santen-Verheувel MG, Dam-Deisz WDC, Boshuizen HC, Van de Giessen AW, Van Duijkeren E, Huijsdens XW (2007). High prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in pigs. *Veterinary Microbiology*, 122(3): 366-372.
- De Oliveira TL, de Araújo Soares RA, Ramos EM, Cardoso MG, Alves E, Piccoli RH (2011). Antimicrobial activity of *Satureja montana* L. essential oil against *Clostridium perfringens* type A inoculated in mortadella-type sausages formulated with different levels of sodium nitrite. *International Journal of Food Microbiology*, 144(3): 546-555.
- De Vrese M, Offick B (2010). Probiotics and prebiotics: effects on diarrhea. En: Watson RR, Preedy VR (Eds.), *Bioactive foods in promoting health: probiotics and prebiotics*, 205-227. Academic Press.
- Debersac P, Vernevaut MF, Amiot MJ, Suschetet M, Siess MH (2001). Effects of a water-soluble extract of rosemary and its purified component rosmarinic acid on xenobiotic metabolizing enzymes in rat liver. *Food and Chemical Toxicology*, 39(2): 109-117.
- Decreto nº 50/2003, de 30 de mayo, por el que se crea el Catálogo Regional de Flora Silvestre Protegida de la Región de Murcia y se dictan las normas para el aprovechamiento de diversas especies forestales.
- Di Pasqua R, De Feo V, Villani F, Mauriello G (2005). In vitro antimicrobial activity of essential oils from Mediterranean Apiaceae, Verbenaceae and Lamiaceae against foodborne pathogens and spoilage bacteria. *Annals of Microbiology*, 55(2): 139-143.
- Díaz López J (2011). Aceites esenciales de plantas aromáticas como alternativa a los antibióticos en alimentación porcina. Trabajo Fin de Carrera. Escuela Politécnica Superior de Orihuela. Universidad Miguel Hernández de Elche.
- Dibner JJ, Richards JD (2005). Antibiotic growth promoters in agriculture: history and mode of action. *Poultry Science*, 84(4):634-643.
- Dilworth L, Gardner M, Asemota H, Omoruyi F (2012). Intestinal morphology assessments of rats fed phytic acid extract from sweet potato (*Ipomoea batatas*) and IP6. *Basic and Applied Pathology*, 5(4): 84-90.
- Ding YY, Zhang CH, He XL, Huang L, Yin ZJ (2011). Growth performance responses and indicators of gastrointestinal health in early weaned pigs fed Chinese herbal medicine additives-supplemented diets. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 10: 1580-1587.

BIBLIOGRAFÍA

- Directiva del Consejo 86/609/CEE, de 24 de noviembre de 1986, relativa a la aproximación de las disposiciones legales, reglamentarias y administrativas de los Estados miembros respecto a la protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos.
- Domeneghini C, Di Giancamillo A, Arrighi S, Bosi G (2006). Gut-trophic feed additives and their effects upon the gut structure and intestinal metabolism. State of the art in the pig, and perspectives towards humans. *Histology and Histopathology*, 21(3): 273-283.
- Donnelly JK, Robinson DS (1995). Free radicals in foods. *Free Radical Research*, 22(2):147-176.
- Dormans HJD, Deans SG (2000). Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology*, 88(2): 308-316.
- Duerr CU, Hornef MW (2012). The mammalian intestinal epithelium as integral player in the establishment and maintenance of host–microbial homeostasis. *Seminars in Immunology*, 24(1): 25-35.
- Ebersbach T, Andersen JB, Bergström A, Hutkins RW, Licht TR (2012). Xylo-oligosaccharides inhibit pathogen adhesion to enterocytes in vitro. *Research in Microbiology*, 163(1): 22-27.
- Edreva A, Velikova V, Tsonev T, Dagnon S, Gürel A, Aktaş L, Gesheva E (2008). Stress-protective role of secondary metabolites: diversity of functions and mechanisms. *Gen. Appl. Plant Physiology*, 34(1-2): 67-78
- Efird RC, Armstrong WD, Herman DL (1982). The development of digestive capacity in young pigs: effects of age and weaning system. *Journal of Animal Science*, 55(6): 1380-1387.
- Eidelsburger U, Wald C, Portocarero-Khan N (2007). Effect of potassium diformate (Formi®) inclusion at two different dietary protein levels on performance and health of weaner piglets. En: *Proceedings of the 6th BOKU Symposium Tierernährung*, 248-253.
- El Bouzidi L, Jamali CA, Bekkouche K, Hassani L, Wohlmuth H, Leach D, Abbad A. (2013). Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of essential oils obtained from wild and cultivated Moroccan *Thymus* species. *Industrial Crops and Products*, 43: 450-456.
- El-kattan AF, Asbill CS, Kim N, Michniak BB (2001). The effects of terpene enhancers on the percutaneous permeation of drugs with different lipophilicities. *International Journal of Pharmaceutics*, 215(1): 229-240.
- Elmore JS, Mottram DS (2009). Flavour development in meat. En: Kerry JP, Ledward D (Eds.), *Improving the sensory and nutritional quality of fresh meat*, 111-146. Cambridge: Woodhead Publishing.
- European Agency for the Evaluation of Medicinal Products (1996). Thymol Summary Report. EMEA-Veterinary Medicines Evaluation Unit.
- European Commission (2002). Revision of the report of 22 march 2001 of the Scientific Committee on Animal Nutrition on the use of potassium diformate (FormiTH LHS) as feed additive.

- European Food Safety Authority EFSA (2009). Scientific opinion on the safety and efficacy of Formi™ LHS (potassium diformate) as a feed additive for sows. *EFSA Journal*, 7(9): 1315.
- Ewing WN, Cole DJA (1994). *The Living Gut: An introduction to microorganisms in nutrition*. UK: Context.
- Fabian D, Sabol M, Domaracká K, Bujkákóvá D (2006). Essential oils-their antimicrobial activity against *Escherichia coli* and effect on intestinal cell viability. *Toxicology in Vitro*, 20(8): 1435-1445.
- Fachini-Queiroz FC, Kummer R, Estevao-Silva CF, Carvalho MD, and Cunha JM, Grespan R, Bersani-Amado CA, Cuman RKN (2012). Effects of thymol and carvacrol, constituents of *Thymus vulgaris* L. essential oil, on the inflammatory response. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2012: 657026.
- Fadli M, Chevalier J, Bolla JM, Mezrioui NE, Hassani L, Pages JM (2012). *Thymus maroccanus* essential oil, a membranotropic compound active on Gram-negative bacteria and resistant isolates. *Journal of Applied Microbiology*, 113(5): 1120-1129.
- Fairbrother JM, Nadeau E, Gyles CL (2005). *Escherichia coli* in post weaning diarrhea in pigs: An update on bacterial types, pathogenesis, and prevention strategies. *Animal Health Research Reviews*, 6(1): 17-39.
- Faleiro L, Miguel G, Gomes S, Costa L, Venâncio F, Teixeira A, Figueiredo AC, Barroso JG, Pedro LG (2005). Antibacterial and antioxidant activities of essential oils isolated from *Thymbra capitata* L. (Cav.) and *Origanum vulgare* L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(21): 8162-8168.
- Fang X, Feng Y, Wang J, Dai J (2010). Perfluorononanoic acid-induced apoptosis in rat spleen involves oxidative stress and the activation of caspase-independent death pathway. *Toxicology*, 267(1): 54-59.
- FAO/WHO (2002). Guidelines for the evaluation of probiotics in food. Report of a Joint FAO/WHO Working Group on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. London, Ontario, Canada.
- FAOSTAT (2011). Estadísticas de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. <http://faostat.fao.org/>
- FAOSTAT (2012). Estadísticas de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. <http://faostat.fao.org/>
- Faustman C, Phillips A (2001). Measurement of discoloration in fresh meat. En: Wrolstad RE (Ed.), *Current protocols in food analytical chemistry*, F3.3.1-F3.3.13. New York: Wiley & Sons.
- Fayol-Messaoudi D, Berger CN, Coconnier-Polter MH, Lievin-Le Moal V, Servin AL (2005). pH-, Lactic acid-, and non-lactic acid-dependent activities of probiotic Lactobacilli against *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(10): 6008-6013.
- Février C, Gotterbarm G, Jaghelin-Peyraud Y, Lebreton Y, Legouevéc F, Aumattre A (2001). Effects of adding potassium diformate and phytase

- excess for weaned piglet. En: Lindberg JE, Ogle B (Eds.) *Proceedings of the 8th Symposium on digestive physiology of pigs*, 192-194. Wallingford, UK: CABI publishing.
- Fischer K (2007). Drip loss in pork: influencing factors and relation to further meat quality traits. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, 124(s1): 12-18.
- Fortomaris P, Arsenos G, Georgiadis M, Banos C, Stamataris C, Zygoiannis D (2006). Effect of meat appearance on consumer preferences for pork chops in Greece and Cyprus. *Meat Science*, 72(4): 688-696.
- Franco LD, Fondevila M, Lobera MB, Castrillo C (2005). Effect of combinations of organic acids in weaned pig diets on microbial species of digestive tract contents and their response on digestibility. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 89(3-6): 88-93.
- Franklin MA, Mathew AG, Vickers JR, Clift RA (2002). Characterization of microbial populations and volatile fatty acid concentrations in the jejunum, ileum, and cecum of pigs weaned at 17 vs 24 days of age. *Journal of Animal Science*, 80(11): 2904-2910.
- Franz C, Baser KHC, Windisch W (2010). Essential oils and aromatic plants in animal feeding—a European perspective. A review. *Flavour and Fragrance Journal*, 25(5): 327-340.
- Freire JPB, Guerreiro AJG, Cunha LF, Aumaitre A (2000). Effect of dietary fibre source on total tract digestibility, caecum volatile fatty acids and digestive transit time in the weaned piglet. *Animal Feed Science and Technology*, 87(1): 71-83.
- Friedman M, Henika PR, Mandrell RE (2002). Bactericidal activities of plant essential oils and some of their isolated constituents against *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella enterica*. *Journal of Food Protection*, 65(10): 1545-1560.
- Fuller R (1995). Probiotics: Their development and use. En: Fuller R, Heidt PJ, Rusch V, Van der Waaij D (Eds), *Probiotics: prospects of use in opportunistic infections*, 8: 1-8. Herborn-Dill, Germany: Institute for Microbiology and Biochemistry.
- Gabert VM, Sauer WC (1994). The effects of supplementing diets for weanling pigs with organic acids. A review. *Journal of Animal and Feed Science*, 3(2): 73-87.
- Gabert VM, Sauer WC (1995). The effect of fumaric acid and sodium fumarate supplementation to diets for weanling pigs on amino acid digestibility and volatile fatty acid concentrations in ileal digesta. *Animal Feed Science and Technology*, 53(3): 243-254.
- Gao S, Wang Y, Zhang P, Dong Y, Li B (2008). Subacute oral exposure to dibromoacetic acid induced immunotoxicity and apoptosis in the spleen and thymus of the mice. *Toxicological sciences*, 105(2): 331-341.
- García del Moral R (1993). Manual de laboratorio de anatomía patológica. McGraw-Hill/Interamericana de España.

- Gebert S, Davis E, Rehberger T, Maxwell CV (2011). Lactobacillus brevis strain 1E1 administered to piglets through milk supplementation prior to weaning maintains intestinal integrity after the weaning event. *Beneficial Microbes*, 2(1), 35-45.
- German JB (1999). Food processing and lipid oxidation. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 459: 23-50.
- Gerritsen R, van Dijk AJ, Rethy K, Bikker P (2010). The effect of blends of organic acids on apparent faecal digestibility in piglets. *Livestock Science*, 134(1): 246-248.
- Gibson GR, Roberfroid MB (1995). Dietary modulation of the colonic microbiota: Introducing the concept of prebiotics. *The Journal of Nutrition*, 125(6): 1401-1412.
- Gil Hernández A (2010). Tratado de nutrición. Tomo II: Composición y calidad nutritiva de los alimentos. Madrid: Editorial Panamericana.
- Gill AO, Holley RA (2006). Disruption of *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Lactobacillus sakei* cellular membranes by plant oil aromatics. *International Journal of Food Microbiology*, 108(1): 1-9.
- Godlewski MM, Biernat M, Wolinski J, Zabielski R, Szymanczyk S, Valverde Piedra JL, Motyl T (2004). Epithelial cell apoptosis in the gut of pig neonates and chicken - new application for laser scanning cytometry. En: *Proceedings of the signal transduction: signal transduction pathways as therapeutic targets*. Luxembourg.
- Godlewski MM, Slupecka M, Wolinski J, Skrzypek T, Skrzypek H, Motyl T, Zabielski R (2005). Into the unknown-The death pathways in the neonatal gut epithelium. *Journal of Physiology and Pharmacology: an official journal of the Polish Physiological Society*, 56: 7-24.
- Golparvar AR, Bahari B (2011). Effects of phenological stages on herbage yield and quality/quantity of oil in garden thyme (*Thymus vulgaris* L.). *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(25): 6085-6089.
- Gong J, Yu H, Liu T, Li M, Si W, de Lange CFM, Dewey C (2008). Characterization of ileal bacterial microbiota in newly-weaned pigs in response to feeding lincomycin, organic acids or herbal extract. *Livestock Science*, 116(1): 318-322.
- González-Ortiz G, Pérez JF, Hermes RG, Molist F, Jiménez-Díaz R, Martín Orúe SM (2014). Screening the ability of natural feed ingredients to interfere with the adherence of enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) K88 to the porcine intestinal mucus. *British Journal of Nutrition*, 111(4): 633-642.
- Granados R, Villaverde MC (1997). Microbiología. Vol. 1. Madrid: Paraninfo Editorial.
- Grilli E (2007). Development of non pharmaceutical strategies to improve intestinal health in weaning piglets. Tesis Doctoral. Università di Bologna.
- Grilli E, Messina MR, Tedeschi M, Piva A (2010). Feeding a microencapsulated blend of organic acids and nature identical compounds to weaning pigs

BIBLIOGRAFÍA

- improved growth performance and intestinal metabolism. *Livestock Science*, 133(1): 173-175.
- Guàrdia MD, Estany J, Balasch S, Oliver MA, Gispert M, Diestre A (2005). Risk assessment of DFD meat due to pre-slaughter conditions in pigs. *Meat Science*, 70(4): 709-716.
- Gueimonde M, Salminen S (2004). Methods of analyzing gut microbiota. En: Salminen S, von Wright A (Eds.), *Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects*, 365-374. Boca Ratón, FL: CRC Press.
- Guerra CM, Galán JA, Méndez JJ, Murillo E (2008). Evaluación del efecto del extracto de orégano (*Origanum vulgare*) sobre algunos parámetros productivos de cerdos destetos. *Revista Tumbaga* 3: 16-29.
- Guggenbuhl P, Séon A, Quintana AP, Nunes CS (2007). Effects of dietary supplementation with benzoic acid (VevoVital®) on the zootechnical performance, the gastrointestinal microflora and the ileal digestibility of the young pig. *Livestock Science*, 108(1): 218-221.
- Guimarães AG, Xavier MA, Santana MT, Camargo EA, Santos CA, Brito FA, Barreto EO, Cavalcanti SCH, Antonioli AR, Oliveira RCM, Quintans-Júnior LJ (2012). Carvacrol attenuates mechanical hypernociception and inflammatory response. *Naunyn Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 385(3), 253–263.
- Guo X, Xia X, Tang R, Wang K (2008). Real-time PCR quantification of the predominant bacterial divisions in the distal gut of Meishan and Landrace pigs. *Anaerobe*, 14(4): 224- 228.
- Gur E, Waner T (1993). The variability of organ weight background data in rats. *Laboratory Animals*, 27(1): 65-72.
- Gutierrez J, Barry-Ryan C, Bourke P (2008). The antimicrobial efficacy of plant essential oil combinations and interactions with food ingredients. *International Journal of Food Microbiology*, 124(1): 91-97.
- Gutiérrez-Lugo MT, Barrientos-Benitez T, Luna B, Ramírez-Gama RM, Bye R, Linares E, Mata R (1996). Antimicrobial and cytotoxic activities of some crude drug extracts from Mexican medicinal plants. *Phytomedicine*, 2(4): 341-347.
- Ha MA, Jarvis MC, Mann JI (2000). A definition for dietary fibre. *European Journal of Clinical Nutrition*, 54(12): 861-864.
- Hadecek F (2002). Secondary Metabolites as Plant Traits: Current Assessment and Future Perspectives. *Critical Reviews in Plant Science*, 21(4): 273-322.
- Halas D, Hansen CF, Hampson DJ, Mullan BP, Kim JC, Wilson RH, Pluske JR (2010). Dietary supplementation with benzoic acid improves apparent ileal digestibility of total nitrogen and increases villous height and caecal microbial diversity in weaner pigs. *Animal Feed Science and Technology* 160(3): 137–147.
- Halas D, Heo JM, Hansen CF, Kim JC, Hampson DJ, Mullan BP, Pluske JR (2007). Organic acids, prebiotics and protein level as dietary tools to

- control the weaning transition and reduce post-weaning diarrhoea in piglets. CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources, 79: 13.
- Hall AP, Elcombe CR, Foster JR, Harada T, Kaufmann W, Knippel A, Küttler K, Malarkey DE, Maronpot RR, Nishikawa A, Nolte T, Schulte A, Strauss V, York MJ (2012). Liver hypertrophy: A review of adaptive (adverse and non-adverse) changes—conclusions from the 3rd international ESTP Expert Workshop. *Toxicologic Pathology*, 40(7): 971-994.
- Hammer KA, Carson CF, Riley TV (1999). Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *Journal of Applied Microbiology*, 86(6): 985-990.
- Han KS, Balan P, Molist Gasa F, Boland M (2011). Green kiwifruit modulates the colonic microbiota in growing pigs. *Letters in Applied Microbiology*, 52(4): 379-385
- Hanczakowska E, Swiajkiewicz M, Szewczyk A (2007). Effect of dietary nettle extract on pig meat quality. *Medycyna Weterynaryjna*, 63(5): 525-527.
- Hanczakowska E, Swiatkiewicz M (2012). Effect of herbal extracts on piglet performance and small intestinal epithelial villi. *Czech Journal of Animal Science*, 57(9): 420-429.
- Handschr M, Karlic H, Hertel C, Pfeilstöcker M, Halsberger AG (2009). Preanalytic removal of human DNA eliminates false signals in general 16s rDNA PCR monitoring of bacterial pathogens in blood. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 32(3): 207-219.
- Hang SQ, Zhu WY (2012). Gut bacterial and Lactobacilli Communities of weaning piglets in response to mannan oligosaccharide and sugar beet pulp in vitro fermentation. *Journal of Integrative Agriculture*, 11(1): 122-133.
- Hansen CF, Riis AL, Bresson S, Højbjerg O, Jensen BB (2007). Feeding organic acids enhances the barrier function against pathogenic bacteria of the piglet stomach. *Livestock Science*, 108(1): 206-209.
- Harada E, Kiriya H, Kobayashi E, Tsuchita H (1988). Postnatal development of biliary and pancreatic exocrine secretion in piglets. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 91(1): 43-51.
- Hashemi SR, Zulkifli I, Davoodi H, Zunita Z, Ebrahimi M (2012). Growth performance, intestinal microflora, plasma fatty acid profile in broiler chickens fed herbal plant (*Euphorbia hirta*) and mix of acidifiers. *Animal Feed Science and Technology*, 178(3): 167-174.
- Hayday A, Theodoridis E, Ramsburg E, Shires J (2001) Intraepithelial lymphocytes: exploring the Third Way in immunology. *Nature Immunology*, 2(11): 997-1003.
- Hedemann MS, Eskildsen M, Laerke HN, Pedersen C, Lindberg JE, Laurinen P, Bach Knudsen KE (2006). Intestinal morphology and enzymatic activity in newly weaned pigs fed contrasting fiber concentrations and fiber properties. *Journal of Animal Science*, 84(6): 1375-1386.

BIBLIOGRAFÍA

- Hedemann MS, Højsgaard S, Jensen BB (2003). Small intestinal morphology and activity of intestinal peptidases in piglets around weaning. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 87(1-2): 32-41.
- Hendriks HJM, Pedersen BK, Vermeer HM, Wittman M (1998). Pig housing systems in Europe: current distributions and trends. *Pig News and Information*, 19(4): 97-104.
- Hernandez F, Madrid J, Garcia V, Orengo J, Megias MD (2004). Influence of two plant extracts on broilers performance, digestibility, and digestive organ size. *Poultry Science*, 83(2): 169-174.
- Hernández-Hernández E, Ponce-Alquicira E, Jaramillo-Flores ME, Guerrero Legarreta I (2009). Antioxidant effect rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) and oregano (*Origanum vulgare* L.) extracts on TBARS and colour of model raw pork batters. *Meat Science*, 81(2): 410-417.
- Hernandez-Hernandez O, Muthaiyan A, Moreno FJ, Montilla A, Sanz ML, Ricke SC (2012). Effect of prebiotic carbohydrates on the growth and tolerance of *Lactobacillus*. *Food Microbiology*, 30(2): 355-361
- Heywood R (1981). Target organ toxicity. *Toxicology Letters*, 8(6): 349-358.
- Hodgson E (2011). A textbook of modern toxicology. New Jersey: John Wiley & Sons.
- Högberg A, Lindberg JE (2006). The effect of level and type of cereal non-starch polysaccharides on the performance, nutrient utilization and gut environment of pigs around weaning. *Animal Feed Science and Technology*, 127(3): 200-219.
- Högberg A, Lindberg JE, Leser T, Wallgren P (2004). Influence of cereal non-starch polysaccharides on ileo-caecal and rectal microbial populations in growing pigs. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 45(1-2): 87-98.
- Holmer SF, McKeith RO, Boler DD, Dilger AC, Eggert JM, Petry DB, McKeith FK, Jones KL, Killefer J (2009). The effect of pH on shelf-life of pork during aging and simulated retail display. *Meat Science*, 82(1): 86-93.
- Honikel KO (1998). Reference methods for the assessment of physical characteristics of meat. *Meat Science*, 49(4): 447-457.
- Honikel KO (2010). Curing. En: Toldrá F (Ed.), *Handbook of meat processing*, 125-141. John Wiley & Sons.
- Honkavaara M (1988). Influence of PSE pork on the quality and economics of cooked, cured ham and fermented dry sausage manufacture. *Meat Science*, 24(3): 201-207.
- Hopkins SL, Barwick V (2008). An introduction a method validation. En: Keer JT, Birch L (Eds.), *Essentials of nucleic acid analysis: a robust approach*. Cambridge, UK: Royal Society of Chemistry.
- Horváth G, Kovács K, Kocsis B, Kustos I (2009). Effect of thyme (*Thymus vulgaris* L.) essential oil and its main constituents on the outer membrane protein composition of *Erwinia* strains studied with microfluid chip technology. *Chromatographia*, 70(11-12): 1645-1650.

- Hosoyamada Y, Sakai T (2005). Structural and mechanical architecture of the intestinal villi and crypts in the rat intestine: integrative reevaluation from ultrastructural analysis. *Anatomy and Embryology*, 210(1): 1-12.
- Houdijk JGM, Bosch MW, Verstegen MWA, Berenpas HJ (1998). Effects of dietary oligosaccharides on the growth performance and faecal characteristics of young growing pigs. *Animal Feed Science and Technology*, 71(1): 35-48.
- Hrenovic J, Tofant A, Ostovic M, Milic D (2010). Effect of clinoptilolite addition on bacterial counts in pig slurry. En: *Proceedings of the 3rd Croatian-Slovenian Symposium on Zeolites*, 65-68.
- Htoo JK y Molaes J (2012). Effects of dietary supplementation with two potassium formate sources on performance of 8- to 22-kg pigs. *Journal of Animal Science*, 90(4): 346-349.
- Huff-Loneragan E (2009). Fresh meat water-holding capacity. En: Kerry J, Ledward D (Eds.), *Improving the sensory and nutritional quality of fresh meat*, 147-160. Elsevier.
- Huff-Loneragan E, Page J (2001). The role of carcass chilling in the development of pork quality. National Pork Producers Council.
- Huijsdens XW, Linskens RK, Mak M, Meuwissen SGM, Vandenbroucke-Grauls CMJE, Savelkoul PHM (2002). Quantification of bacteria adherent to gastrointestinal mucosa by real-time PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(12): 4423-4427.
- Ilsley SE, Miller HM, Greathead HMR, Kamel C (2003). Plant extracts as supplements for lactating sows: effects on piglet performance, sow food intake and diet digestibility. *Animal Science*, 77: 247-254.
- Imdorf A, Bogdanov S, Ibáñez Ochoa R, Calderone NW (1999). Use of essential oils for the control of *Varroa jacobsoni* Oud. in honey bee colonies. *Apidologie*, 30(2-3): 209-228.
- Indexmundi (20014). <http://www.indexmundi.com>.
- Inoue R, Tsukahara T, Nakanishi N, Ushida K (2005). Development of the intestinal microbiota in the piglet. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 51(4): 257-265.
- Isman MB (2000). Plant essential oils for pest and disease management. *Crop Protection*, 19(8): 603-608.
- ISO 2917 (1999). International Organization for Standardization. Measurement of the pH. En: *International standards meat and meat products*. <http://www.iso.org>
- Jacela JY, DeRouchey JM, Tokach MD, Goodband RD, Nelssen JL, Renter DG, Dritz SS (2010). Feed additives for swine: Fact sheets—prebiotics and probiotics, and phytochemicals. *J Swine Health Prod.*, 18(3): 132-136.
- Jami E, Shabtay A, Nikbachat M, Yosef E, Miron J, Mizrahi I (2012). Effects of adding a concentrated pomegranate-residue extract to the ration of lactating cows on in vivo digestibility and profile of rumen bacterial population. *Journal of Dairy Science*, 95(10): 5996-6005.

- Jamroz D, Wertelecki T, Houszka M, Kamel C (2006). Influence of diet type on the inclusion of plant origin active substances on morphological and histochemical characteristics of the stomach and jejunum walls in chicken. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 90(5-6): 255-268.
- Jamroz D, Wiliczekiewicz A, Wertelecki T, Orda J, Skorupinska J (2005). Use of active substances of plant origin in chicken diets based on maize and locally grown cereals. *British Poultry Science*, 46(4): 485-493.
- Janczyk P, Pieper R, Smidt H, Souffrant WB (2007). Changes in the diversity of pig ileal lactobacilli around weaning determined by means of 16S rRNA gene amplification and denaturing gradient gel electrophoresis. *FEMS Microbiology Ecology*, 61(1): 132-140.
- Janczyk P, Pieper R, Smidt H, Souffrant WB (2010). Effect of alginate and inulin on intestinal microbial ecology of weanling pigs reared under different husbandry conditions. *FEMS Microbiology Ecology*, 72(1): 132-142.
- Janczyk P, Pieper R, Urubschurov V, Wendler KR, Souffrant WB (2009). Investigations on the effects of dietary essential oils and different husbandry conditions on the gut ecology in piglets after weaning. *International Journal of Microbiology*, 2009: 1-9.
- Janczyk P, Trevisi P, Souffrant WB, Bosi P (2008). Effect of thymol on microbial diversity in the porcine jejunum. *International Journal of Food Microbiology*, 126(1): 258-261.
- Jang IS, Ko YH, Kang SY, Lee CY (2007). Effect of a commercial essential oil on growth performance, digestive enzyme activity and intestinal microflora population in broiler chickens. *Animal Feed Science and Technology*, 134(3): 304-315.
- Janz JAM, Morel PCH, Wilkinson BHP, Purchas RW (2007). Preliminary investigation of the effects of low-level dietary inclusion of fragrant essential oils and oleoresins on pig performance and pork quality. *Meat Science*, 75(2): 350-355.
- Jarvis BB (2000). The role of nature products in evolution. En: Romeo JT, Ibrahim R, Varin L, De Luca V (Eds.), *Recent Advances in Phytochemistry*, 34: 1-24. Elsevier Science.
- Jarvis P, Saul J, Aylott M, Bate S, Geys H, Sherington J (2011). An assessment of the statistical methods used to analyse toxicology studies. *Pharmaceutical Statistics*, 10(6): 477-484.
- Jayawardana BC, Hirano T, Han K-H, Ishii H, Okada T, Shibayama S, Fukushima M, Sekikawa M, Shimada KI (2011). Utilization of adzuki bean extract as a natural antioxidant in cured and uncured cooked pork sausages. *Meat Science*, 89(2): 150-153.
- Jensen BB (1998). The impact of feed additives on the microbial ecology of the gut in young pigs. *Journal of Animal and Feed Sciences*, 7: 45-64.
- Jensen BB y Jørgensen H (1994). Effect of Dietary Fiber on Microbial Activity and Microbial Gas Production in Various Regions of the Gastrointestinal Tract of Pigs. *Applied and Environmental Microbiology*, 60(6): 1897-1904.

- Jensen BB, Engberg RM (2004). Primary Production Management: Antibiotic growth promoters. En: Werner Klinth Jensen (Ed.), Encyclopedia of meat science, 1030-1034. Oxford: Elsevier.
- Jensen MS, Jensen SK, Jacobsen K (1997). Development of digestive enzymes in pigs with emphasis on lipolytic activity in the stomach and pancreas. *Journal of Animal Science*, 75(2): 437-445.
- Jiménez-Colmenero F, Carballo J, Cofrades S (2001). Healthier meat and meat products: their role as functional foods. *Meat Science*, 59(1): 5-13.
- Joliffe DM (2009). Practical gastric physiology. *Continuing Education in Anaesthesia, Critical Care & Pain*, 9(6): 173-177.
- Jordán MJ, Martínez RM, Goodner KL, Baldwin EA, Sotomayor JA (2006). Seasonal variation of *Thymus hyemalis* Lange and Spanish *Thymus vulgaris* L. essential oils composition. *Industrial Crops and Products*, 24(3): 253-263.
- Jordán MJ, Martínez RM, Martínez C, Moñino I, Sotomayor JA (2009). Polyphenolic extract and essential oil quality of *Thymus zygis* ssp. *gracilis* shrubs cultivated under different watering levels. *Industrial Crops and Products*, 29(1):145-153.
- Jugl-Chizzola M, Ungerhofer E, Gabler C, Hagmüller W, Chizzola R, Zitterl-Eglseer K, Franz C (2006). Testing of the palatability of *Thymus vulgaris* L. and *Origanum vulgare* L. as flavouring feed additive for weaner pigs on the basis of a choice experiment. *Berliner und Münchener tierärztliche Wochenschrift*, 119(5-6): 238-243.
- Juśkiewicz J, Semaskaite A, Zduńczyk Z, Wróblewska M, Gružasuskas R, Juśkiewicz M (2007). Minor effect of the dietary combination of probiotic *Pediococcus acidilactici* with fructooligosaccharides or polysaccharidases on beneficial changes in the cecum of rats. *Nutrition research*, 27(3): 133-139.
- Karamucki T, Jakubowska M, Rybarczyk A, Gardzielewska J (2013). The influence of myoglobin on the colour of minced pork loin. *Meat Science*, 94(2): 234-238.
- Kasprowicz-Potocka M, Frankiewicz A, Selwet M, Chilomer K (2009). Effect of salts and organic acids on metabolite production and microbial parameters of piglets' digestive tract. *Livestock Science*, 126(1): 310-313.
- Kenny M, Smidt H, Mengheri E, Miller B (2011). Probiotics—do they have a role in the pig industry?. *Animal*, 5(3): 462-470.
- Khan IUH, Gannon V, Kent R, Koning W, Lapen DR, Miller J, Neumann N, Phillips R, Robertson W, Topp E, van Bochove E, Edge TA (2007). Development of a rapid quantitative PCR assay for direct detection and quantification of culturable and non-culturable *Escherichia coli* from agriculture watersheds. *Journal of Microbiological Methods*, 69(3): 480-488.
- Kil DY, Kwon WB, Kim BG (2011). Dietary acidifiers in weanling pig diets: a review. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 24(3): 231-247.

BIBLIOGRAFÍA

- Kim HB, Borewicz K, White BA, Singer RS, Sreevatsan S, Tu ZJ, Isaacson RE (2011). Longitudinal investigation of the age-related bacterial diversity in the feces of commercial pigs. *Veterinary Microbiology*, 153(1): 124-133.
- Kirkpınar F, Ünlü HB, Özdemir G (2011). Effects of oregano and garlic essential oils on performance, carcass, organ and blood characteristics and intestinal microflora of broilers. *Livestock Science*, 137(1): 219-225.
- Kluge H, Broz J, Ede K (2006). Effect of benzoic acid on growth performance, nutrient digestibility, nitrogen balance, gastrointestinal microflora and parameters of microbial metabolism in piglets. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 90(7-8): 316-324.
- Knarreborg A, Miquel N, Granli T, Jensen BB (2002). Establishment and application of an in vitro methodology to study the effects of organic acids on coliform and lactic acid bacteria in the proximal part of the gastrointestinal tract of piglets. *Animal Feed Science and Technology* 99(1): 131-140.
- Kohlert C, Schindler G, März RW, Abel G, Brinkhaus B, Derendorf H, Gräfe EU, Veit M (2002). Systemic availability and pharmacokinetics of thymol in humans. *The Journal of Clinical Pharmacology*, 42(7): 731-737.
- Kohlert C, van Rensen I, März R, Schindler G, Graefe EU, Veit M (2000). Bioavailability and pharmacokinetics of natural volatile terpenes in animals and humans. *Planta Medica*, 66(6): 495-505.
- Kong XF, Wu GY, Liao YP, Hou ZP, Liu HJ, Yin FG, Li TJ, Huang RL, Zhang YM, Deng D, Xie MY, Deng ZY, Xiong H, Ruan Z, Kang P, Yang CB, Yin YL, Fan MZ (2007). Dietary supplementation with Chinese herbal ultra-fine powder enhances cellular and humoral immunity in early-weaned piglets. *Livestock Science*, 108(1): 94-98.
- Kong XF, Yin FG, He QH, Liu HJ, Li TJ, Huang RL, Fan MZ, Liu YL, Hou YQ, Li P, Ruan Z, Deng ZY, Xie MY, Xiong H, Yin YL (2009). *Acanthopanax senticosus* extract as a dietary additive enhances the apparent ileal digestibility of amino acids in weaned piglets. *Livestock Science*, 123(2): 261-267.
- Konstantinov SR, Awati A, Smidt H, Williams AB, Akkermans ADL, De Vos WM (2004). Specific response of a novel and abundant *Lactobacillus amylovorus*-like phylotype to dietary prebiotics in the gut of weaning piglets. *Applied and environmental microbiology*, 70(7): 3821-3830.
- Konstantinov SR, Awati AA, Williams BA, Miller BG, Jones P, Stokes CR, Akkermans ADL, Smidt H, de Vos WM (2006). Post-natal development of the porcine microbiota composition and activities. *Environmental Microbiology*, 8(7): 1191-1199.
- Konstantinov SR, Favier CF, Zhu WY, Williams BA, Klüß J, Souffrant W, De Vos WM, Akkermans ADL, Smidt H (2004). Microbial diversity studies of the porcine gastrointestinal ecosystem during weaning transition. *Animal Research*, 53(4): 317-324.
- Konstantinov SR, Zhu WY, Williams BA, Tamminga S, de Vos WM, Akkermans ADL (2003). Effect of fermentable carbohydrates on piglet fecal bacterial

- communities as revealed by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of 16S ribosomal DNA. *FEMS Microbiology Ecology*, 43(2): 225-235.
- Kortman GA, Roelofs RW, Swinkels DW, de Jonge MI, Burt SA, Tjalsma H (2014). Iron-induced virulence of *Salmonella enterica* serovar typhimurium at the intestinal epithelial interface can be suppressed by carvacrol. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58(3): 1664-1670.
- Krause DO, Bhandari SK, House JD, Nyachoti CM (2010). Response of nursery pigs to a synbiotic preparation of starch and an anti-*Escherichia coli* K88 probiotic. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(24): 8192-8200.
- Kreuzer S, Janczyk P, Aßmus J, Schmidt MF, Brockmann GA, Nöckler K (2012). No beneficial effects evident for *Enterococcus faecium* NCIMB 10415 in weaned pigs infected with *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104. *Applied and environmental microbiology*, 78(14): 4816-4825.
- Kreuzer S, Machnowska P, Aßmus J, Sieber M, Pieper R, Schmidt MF, Brockmann GA, Scharek-Tedin L, Johne R (2012). Feeding of the probiotic bacterium *Enterococcus faecium* NCIMB 10415 differentially affects shedding of enteric viruses in pigs. *Veterinary Research*, 43(1): 58.
- Kucharzik T, Lügering N, Rautenberg K, Lügering A, Schmidt MA, Stoll R, Domschke W (2000). Role of M cells in intestinal barrier function. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 915(1): 171-183.
- Kumar A, Shukla R, Singh P, Prasad CS, Dubey NK (2008). Assessment of *Thymus vulgaris* L. essential oil as a safe botanical preservative against post harvest fungal infestation of food commodities. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 9(4): 575-580.
- Kyriakis SC, Tsioloyiannis VK, Vlemmas J, Sarris K, Tsinas AC, Alexopoulos C, Jansegers L (1999). The effect of probiotic LSP 122 on the control of post-weaning diarrhoea syndrome of piglets. *Research in Veterinary Science*, 67(3), 223-228.
- Lahucky R, Nuernberg K, Kovac L, Bucko O, Nuernberg G (2010). Assessment of the antioxidant potential of selected plant extracts—*In vitro* and *in vivo* experiments on pork. *Meat Science*, 85(4): 779-784.
- Lambert RJW, Skandamis PN, Coole PJ, Nychas GJE (2001). A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *Journal of Applied Microbiology*, 91(3): 453-462.
- Lampe JW, Peterson S (2002). Brassica, biotransformation and cancer risk: genetic polymorphisms alter the preventive effects of cruciferous vegetables. *The Journal of Nutrition*, 132(19): 2991-2994.
- Langouët S, Furge LL, Kerriguy N, Nakamura K, Guillouzo A, Guengerich FP (2000). Inhibition of human cytochrome p450 enzymes by 1,2-dithiole-3-thione, oltipraz and its derivatives, and sulforaphane. *Chemical Research in Toxicology*, 13(4): 245-252.

BIBLIOGRAFÍA

- Lara MS, Gutierrez JI, Timón M, Andrés AI (2011). Evaluation of two natural extracts (*Rosmarinus officinalis* L. and *Melissa officinalis* L.) as antioxidants in cooked pork patties packed in MAP. *Meat Science*, 88(3): 481-488.
- Lavabre M (1995). *Aromaterapia—libro práctico*. Mexico DF: Lasser Press.
- Le Bon M, Davies HE, Glynn C, Thompson C, Madden M, Wiseman J, Dodd CER, Hurdidge L, Payne G, Le Treut Y, Craigon J, Töttemeyer S, Mellits KH (2010). Influence of probiotics on gut health in the weaned pig. *Livestock Science*, 133(1): 179-181.
- Le Dividich J, Rooke JA, Herpin P (2005). Nutritional and immunological importance of colostrum for the new-born pig. *The Journal of Agricultural Science*, 143(6): 469-485.
- Lee KG, Shibamoto T (2002). Determination of antioxidant potential of volatile extracts isolated from various herbs and spices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(17): 4947-4952.
- Lee SJ, Umamo K, Shibamoto T, Lee K (2005). Identification of volatile components in basil (*Ocimum basilicum* L.) and thyme leaves (*Thymus vulgaris* L.) and their antioxidants properties. *Food Chemistry*, 91(1): 131-137.
- Lemke TL (2003). *Review of organic functional groups: Introduction to medicinal organic chemistry*. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins.
- Leser TD, Amenuvor JZ, Jensen TK, Lindecrona RH, Boye M, Møller K (2002). Culture-independent analysis of gut bacteria: the pig gastrointestinal tract microbiota revisited. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(2): 673-690.
- Levesque CL, Yu H, Gong J, de Lange CFM (2012). Ileal mucosa-associated - but not ileal digesta- bacterial profiles in grower pigs are influenced by nutrition and use of antibiotics for weaner pigs. *Journal of Animal Science*, 90: 448-450.
- Ley 32/2007, de 7 de noviembre, para el cuidado de los animales, en su explotación, transporte, experimentación y sacrificio.
- Li P, Piao X, Ru Y, Han X, Xue L, Zhang H (2012a). Effects of adding essential oil to the diet of weaned pigs on performance, nutrient utilization, immune response and intestinal health. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences (AJAS)*, 25(11): 1617-1626.
- Li SY, Ru YJ, Liu M, Xu B, Perón A, Shi XG (2012b). The effect of essential oils on performance, immunity and gut microbial population in weaner pigs. *Livestock Science*, 145(1): 119-123.
- Li YJ, Zhao GY, Du W, Zhang TJ (2009). Effect of dietary isomaltooligosaccharides on nutrient digestibility and concentration of glucose, insulin, cholesterol and triglycerides in serum of growing pigs. *Animal feed science and technology*, 151(3): 312-315.
- Li Z, Yi G, Yin J, Sun P, Li D, Knight C (2008). Effects of organic acids on growth performance, gastrointestinal ph, intestinal microbial populations and

- immune responses of weaned pigs. *Asian-Australasian Journal of Animal Science*, 21(2): 252-261.
- Li ZH, Wang Q, Ruan X, Pan CD, Jiang DA (2010). Phenolics and plant allelopathy. *Molecules*, 15(12): 8933-8952.
- Lindahl G, Karlsson AH, Lundström K, Andersen HJ (2006). Significance of storage time on degree of blooming and colour stability of pork loin from different crossbreeds. *Meat Science*, 72(4): 603-612.
- Lindahl G, Lundström K, Tornberg E (2001). Contribution of pigment content, myoglobin forms and internal reflectance to the colour of pork loin and ham from pure breed pigs. *Meat Science*, 59(2): 141-151.
- Liotta L, Chiofalo B, Lo Presti V, Piccolo D, Chiofalo V (2007). Rosemary extract (*Rosmarinus officinalis* L.) supplementation into the diet of Nero Siciliano pigs: Effects on lipid oxidation. *Italian Journal of Animal Science*, 6(1s): 306-308.
- Lis-Balchin M, Deans SG (1998). Studies on the potential usage of mixtures of plant essential oils as synergistic antibacterial agents in foods. *Phytotherapy Research*, 12(7): 472-475.
- Literak I, Dolejska M, Rybarikova J, Cizek A, Strejckova P, Vyskocilova M, Friedman M, Klimes J (2009). Highly variable patterns of antimicrobial resistance in commensal *Escherichia coli* isolates from pigs, sympatric rodents, and flies. *Microbial Drug Resistance*, 15(3): 229-237.
- Loft S, Poulsen HE (1996). Cancer risk and oxidative DNA damage in man. *Journal of Molecular Medicine*, 74(6): 297-312.
- Loizzo MR, Menichini F, Conforti F, Tundis R, Bonesi M, Saab AM, Statti GA, Cindio B, Houghton PJ, Menichini F, Frega NG (2009). Chemical analysis, antioxidant, antiinflammatory and anticholinesterase activities of *Origanum ehrenbergii* Boiss. and *Origanum syriacum* L. essential oils. *Food Chemistry*, 117(1): 174-180.
- LookForDiagnosis (2013). <http://www.lookfordiagnosis.com>
- López-Bote C, Isabel B, Rey AI (1999). Efecto de la nutrición y del manejo sobre la calidad de la grasa en el cerdo. En: *Avances en nutrición y alimentación animal*, 223-252. Fundación Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal.
- Luciano G, Monahan FJ, Vasta V, Biondi L, Lanza M, Priolo A (2009). Dietary tannins improve lamb meat colour stability. *Meat Science*, 81(1): 120-125.
- Lückstädt C, Theobald P (2009) Effect of a formic acid-sodium formate premixture on *Salmonella*, *Campylobacter* and further gut microbiota in broilers. En: *Proceedings and abstracts of the 17th european symposium on poultry nutrition*, 246.
- Machado M, Dinis AM, Salgueiro L, Cavaleiro C, Custódio JBA, do Céu Sousa M (2010). Anti-*Giardia* activity of phenolic-rich essential oils: effects of *Thymbra capitata*, *Origanum virens*, *Thymus zygis* subsp. *sylvestris*, and *Lippia graveolens* on trophozoites growth, viability, adherence, and ultrastructure. *Parasitology Research*, 106(5): 1205-1215.

BIBLIOGRAFÍA

- Mackay IM, Mackay JF, Nissen MD, Sloots TP (2007). Real-time PCR: History and fluorogenic chemistries. En: Mackay IM (Ed.), *Real-time PCR in microbiology: from diagnosis to characterization*, 1-39. Norfolk, UK: Caister Academic Press.
- Mackie RI, Sghir A, Gaskins HR (1999). Developmental microbial ecology of the neonatal gastrointestinal tract. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 69(5): 1035s-1045s.
- MAGRAMA (2011). Anuario de Estadística 2011. Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. <http://www.magrama.gob.es>
- MAGRAMA (2012). Anuario de Estadística 2012. Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. <http://www.magrama.gob.es>
- Mair C, Plitzner C, Domig KG, Schedle K, Windisch W (2010). Impact of inulin and a multispecies probiotic formulation on performance, microbial ecology and concomitant fermentation patterns in newly weaned piglets. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 94(5): e164-e177.
- Manach C, Morand C, Demigné C, Texier O, Régéat F, Rémésy C (1997). Bioavailability of rutin and quercetin in rats. *FEBS letters*, 409(1): 12-16.
- Mancini RA, Hunt MC (2005). Current research in meat color. *Meat Science*, 71(1): 100-121.
- Manning TS, Gibson GR (2004). Prebiotics. *Best Practice and Research Clinical Gastroenterology*, 18(2): 287-298.
- Mantere-Alhonen S (1995). Propionibacteria used as probiotics-A review. *Lait*, 75(4-5): 447-452.
- Manzanilla EG, Perez JF, Martin M, Kamel C, Baucells F, Gasa J (2004). Effect of plant extracts and formic acid on the intestinal equilibrium of early-weaned pigs. *Journal of Animal Science*, 82(11): 3210-3218.
- Marcin A, Sústriková A, Mati R (2006). The effects of aromatic oils on growth performance and physiological parameters in the intestine of weaned pigs. *Slovak Journal of Animal Science*, 39(1-2): 103-107.
- Marinho MC, Lordelo MM, Cunha LF, Freire JPB (2007). Microbial activity in the gut of piglets: I. Effect of prebiotic and probiotic supplementation. *Livestock Science*, 108(1): 236-239.
- Marinho MC, Pinho MA, Mascarenhas RD, Silva FC, Lordelo MM, Cunha LF, Freire JPB (2007). Effect of prebiotic or probiotic supplementation and ileo-rectal anastomosis on intestinal morphology of weaned piglets. *Livestock Science*, 108(1): 240-243.
- Marion J, Biernat M, Thomas F, Savary G, Le Breton Y, Zabielski R, Huerou-Luron I, Le Dividich JL (2002). Small intestine growth and morphometry in piglets weaned at 7 days of age. Effects of level of energy intake. *Reproduction Nutrition Development*, 42(4): 339-354.
- Markey B, Leonard F, Archambault M, Cullinane A, Maguire D (2013). *Clinical veterinary microbiology*. Elsevier Health Sciences.

- Marshman E, Booth C, Potten CS (2002). The intestinal epithelial stem cell. *Bioessays*, 24(1): 91-98.
- Martínez de Victoria E, Mañas M, Yago MD (2005). Fisiología de la digestión. En: Gil A (Ed.), *Tratado de nutrición Tomo I*, 249-293. Madrid: Acción Médica.
- Martínez JL, Rojo F (2011). Metabolic regulation of antibiotic resistance. *FEMS Microbiology Reviews*, 35(5): 768-789.
- Martinez MJ, Betancourt J, Alonso-Gonzalez N, Jauregui A (1996). Screening of some Cuban medicinal plants for antimicrobial activity. *Journal of ethnopharmacology*, 52(3), 171-174.
- Martinez RCR, Aynaou AE, Albrecht S, Schols HA, De Martinis ECP, Zoetendal EG, Venema K, Saad SMI, Smidt H (2011). In vitro evaluation of gastrointestinal survival of *Lactobacillus amylovorus* DSM 16698 alone and combined with galactooligosaccharides, milk and/or *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb-12. *International Journal of Food Microbiology*, 149(2): 152-158.
- Martínez RM, Jordán MJ, Quílez M, Sotomayor JA (2005). Effects of edaphoclimatic conditions on *Thymus hyemalis* L. essential oil yield and composition. *Journal of Essential Oil Research*, 17(6): 614-618.
- Martín-Peláez S, Costabile A, Hoyles L, Rastall RA, Gibson GR, La Ragione RM, Woodward MJ, Mateu E, Martín-Orúe SM (2010). Evaluation of the inclusion of a mixture of organic acids or lactulose into the feed of pigs experimentally challenged with *Salmonella typhimurium*. *Veterinary Microbiology*, 142(3): 337-345.
- Matysiak B, Jacyno E, Kawecka M, Kotodziej-Skalska A, Pietruszka A (2012). Effect of plant extracts fed before farrowing and during lactation on sow and piglet performance. *South African Journal of Animal Science*, 42(1): 15-21.
- Maury J, Nicoletti C, Guzzo-Chambraud L, Maroux S (1995). The filamentous brush border glycocalyx, a mucin-like marker of enterocyte hyperpolarization. *European Journal of Biochemistry*, 228(2): 323-331.
- McCracken BA, Spurlock ME, Roos MA, Zuckermann FA, Gaskins HR (1999). Weaning anorexia may contribute to local inflammation in the piglet small intestine. *The Journal of Nutrition*, 129(3): 613-619.
- McGlone J, Pond WG (2003). *Pig production: biological principles and applications*. Clifton Park, NY: Delmar Learning.
- Medel P, Latorre MA, Mateos GG (1999). Nutrición y alimentación de lechones destetados precozmente. En: *Avances en nutrición y alimentación animal*, 145-196. Fundación Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal.
- Menichini F, Conforti F, Rigano D, Formisano C, Piozzi F, Senatore F (2009). Phytochemical composition, anti-inflammatory and antitumour activities of four *Teucrium* essential oils from Greece. *Food Chemistry*, 115(2), 679-686.

- Messori S, Trevisi P, Simongiovanni A, Priori D, Bosi P (2013). Effect of susceptibility to enterotoxigenic *Escherichia coli* F4 and of dietary tryptophan on gut microbiota diversity observed in healthy young pigs. *Veterinary Microbiology*, 162(1): 173-179.
- Metzler B, Bauer E, Mosenthin R (2005). Microflora management in the gastrointestinal tract of piglets. *Asian-Australasian Journal of Animal Science*, 18: 1353-1362.
- Metzler BU, Mosenthin R, Baumgärtel T, Rodehutschord M (2009). Effects of fermentable carbohydrates and low dietary phosphorus supply on the chemical composition of faecal bacteria and microbial metabolites in the gastrointestinal tract of pigs. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 93(1): 130-139.
- Metzler BU, Vahjen W, Baumgärtel T, Rodehutschord M, Mosenthin R (2009). Changes in bacterial populations in the ileum of pigs fed low-phosphorus diets supplemented with different sources of fermentable carbohydrates. *Animal Feed Science and Technology*, 148(1): 68-89.
- Michael B, Yano B, Sellers RS, Perry R, Morton D, Roome N, Johnson JK, Schafer K, and Pitsch S (2007). Evaluation of organ weights for rodent and non-rodent toxicity studies: a review of regulatory guidelines and a survey of current practices. *Toxicologic Pathology*, 35(5): 742-750.
- Michiels J, Missotten J, Dierick N, Fremaut D, Maene P, De Smet S (2008). In vitro degradation and in vivo passage kinetics of carvacrol, thymol, eugenol and trans-cinnamaldehyde along the gastrointestinal tract of piglets. *Journal of the Science of Food Agriculture*, 88(13): 2371-2381.
- Michiels J, Missotten J, Fremaut D, De Smet S, Dierick N (2007). *In vitro* dose-response of carvacrol, thymol, eugenol and trans-cinnamaldehyde and interaction of combinations for the antimicrobial activity against the pig gut flora. *Livestock Science*, 109(1): 157-160.
- Michiels J, Missotten J, Olyn A, Dierick N, Fremaut D, De Smet S (2012). Effect of dose of thymol and supplemental flavours or camphor on palatability in a choice feeding study with piglets. *Czech. Journal of Animal Science*, 57(2): 65-74.
- Michiels J, Missotten J, Van Hoorick A, Olyn A, Fremaut D, De Smet S, Dierick N (2010). Effects of dose and formulation of carvacrol and thymol on bacteria and some functional traits of the gut in piglets after weaning. *Archives of Animal Nutrition*, 64(2): 136-154.
- Miguel MG (2010). Antioxidant activity of medicinal and aromatic plants. A review. *Flavour and Fragrance Journal*, 25(5): 291-312.
- Miguel MG (2010). Antioxidant and anti-inflammatory activities of essential oils: a short review. *Molecules*, 15(12): 9252-9287.
- Modesto M, D'Aimmo MR, Stefanini I, Trevisi P, De Filippi S, Casini L, Mazzoni M, Bosi P, Biavati B (2009). A novel strategy to select *Bifidobacterium* strains and prebiotics as natural growth promoters in newly weaned pigs. *Livestock Science*, 122(2): 248-258.

- Modesto M, Stefanini I, D'Aimmo MR, Nissen L, Tabanelli D, Mazzoni M, Bosi P, Strozzi GP, Biavati B (2011). Strategies to augment non-immune system based defence mechanisms against gastrointestinal diseases in pigs. *NJAS Wageningen Journal of Life Sciences*, 58(3): 149-156.
- Moldão-Martins M, Bernardo-Gil MG, Beirão da Costa LM (2002). Sensory and chemical evaluation of *Thymus zygis* L. essential oil and compressed CO₂ extracts. *European Food Research and Technology*, 214(3): 207-211.
- Mondet F, Goodwin M, Mercer A (2011). Age-related changes in the behavioural response of honeybees to Apiguard®, a thymol-based treatment used to control the mite *Varroa destructor*. *Journal of Comparative Physiology A*, 197(11):1055-1062.
- Moñino I, Martínez C, Sotomayor JA, Lafuente A, Jordán MJ (2008). Polyphenolic transmission to Segureño lamb meat from ewes' diet supplemented with the distillate from rosemary (*Rosmarinus officinalis*) leaves. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(9): 3363-3367.
- Montagne L, Arturo-Schaan M, Le Floc'h N, Guerra L, Le Gall M (2010). Effect of sanitary conditions and dietary fibre on the adaptation of gut microbiota after weaning. *Livestock Science*, 133(1): 113-116.
- Montagne L, Cavaney FS, Hampson DJ, Lallès JP, Pluske JR (2004). Effect of diet composition on postweaning colibacillosis in piglets. *Journal of Animal Science*, 82(8): 2364-2374.
- Montesi A, García-Albiach R, Pozuelo MJ, Pintado C, Goñi I, Rotger R (2005). Molecular and microbiological analysis of caecal microbiota in rats fed with diets supplemented either with prebiotics or probiotics. *International Journal of Food Microbiology*, 98(3): 281-289.
- Moore KA, Lemischka IR (2006). Stem cells and their niches. *Science*, 311(5769): 1880-1885.
- Mooyottu S, Kollanoor-Johny A, Flock G, Bouillaut L, Upadhyay A, Sonenshein AL, Venkitanarayanan K (2014). Carvacrol and trans-cinnamaldehyde reduce *Clostridium difficile* toxin production and cytotoxicity in vitro. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(3): 4415-4430.
- Morales R (1986). Taxonomía de los géneros *Thymus* (excluida la sección *Serpyllum*) y *Thymbra* en la Península Ibérica. *Ruizia*, 3: 1-324. Madrid.
- Morales R (2010). *Flora Ibérica. Plantas vasculares de la Península Ibérica e Islas Baleares. Vol. XII Verbenaceae-Labiatae-Callitrichaceae*. Madrid: Real Jardín Botánico, CSIC.
- Morelli L (2008). Postnatal development of intestinal microflora as influenced by infant nutrition. *The Journal of Nutrition*, 138(9): 1791S-1795S.
- Mroz Z (2005). Organic acids as potential alternatives to antibiotic growth promoters for pigs. *Advances in Pork Production*, 16: 169-182.
- Mueller K, Blum NM, Kluge H, Bauerfeind R, Froehlich J, Mader A, Wendler KR, Mueller AS (2012). Effects of broccoli extract and various essential oils on

- intestinal and faecal microflora and on xenobiotic enzymes and the antioxidant system of piglets. *Open Journal of Animal Science*, 2: 78-98.
- Muhl A, Liebert F (2007). Growth and parameters of microflora in intestinal and faecal samples of piglets due to application of a phytogetic feed additive. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 91(9-10): 411-418.
- Mulder IE, Schmidt B, Stokes CR, Lewis M, Bailey M, Aminov RI, Prosser JI, Gill BP, Pluske JR, Mayer CD, Musk CC, Kelly D (2009). Environmentally-acquired bacteria influence microbial diversity and natural innate immune responses at gut surfaces. *BMC Biology*, 7(1): 79-99.
- Muñoz F (1987). *Plantas medicinales y aromáticas: estudio, cultivo y procesado*. Madrid: Editorial Mundi-prensa.
- Nadkarni MA, Martin FE, Jacques NA, Hunter N (2002). Determination of bacterial load by real-time PCR using a broad-range (universal) probe and primers set. *Microbiology*, 148(1): 257-266.
- Naidoo V, McGaw LJ, Bisschop SPR, Duncan N, Eloff JN (2008). The value of plant extracts with antioxidant activity in attenuating coccidiosis in broiler chickens. *Veterinary Parasitology*, 153(3): 214-219.
- Nakamura Y, Tonogai Y (2003). Metabolism of grape seed polyphenol in the rat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(24): 7215-7225.
- Namkung H, Li M, Gong J, Yu H, Cottrill M, De Lange CFM (2004). Impact of feeding blends of organic acids and herbal extracts on growth performance, gut microbiota and digestive function in newly weaned pigs. *Canadian journal of animal science*, 84(4): 697-704.
- Näthke IS (2004). The adenomatous polyposis coli protein: the Achilles heel of the gut epithelium. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 20: 337-366.
- Nematbakhsh M, Ashrafi F, Nasri H, Talebi A, Pezeshki Z, Eshraghi F, Haghghi M (2013). A model for prediction of cisplatin induced nephrotoxicity by kidney weight in experimental rats. *Journal of Research in Medical Sciences*, 18(5): 370-373.
- Nemcová R, Bomba A, Gancarciková S, Herich R, Guba P (1999). Study of the effect of *Lactobacillus paracasei* and fructooligosaccharides on the faecal microflora in weanling piglets. *Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift*, 112(6-7): 225-228.
- Ngapo TM, Martin JF, Dransfield E (2007). International preferences for pork appearance: I. Consumer choices. *Food Quality and Preference*, 18(1): 26-36.
- Ngapo TM, Martin JF, Dransfield E (2007). International preferences for pork appearance: II. Factors influencing consumer choice. *Food Quality and Preference*, 18(1): 139-151.
- Nieto G (2009). Efecto de la alimentación de ovejas gestantes con romero (*Rosmarinus officinalis*, L.) y tomillo (*Thymus zygis* subsp. *gracilis*) sobre calidad de la carne de cordero. Tesis Doctoral. Universidad de Murcia.

- Nieto G, Díaz P, Bañón S, Garrido MD (2010a). Dietary administration of ewe diets with a distillate from rosemary leaves (*Rosmarinus officinalis* L.): Influence on lamb meat quality. *Meat Science*, 84(1): 23-29.
- Nieto G, Díaz P, Bañón S, Garrido MD (2010b). Effect on lamb meat quality of including thyme (*Thymus zygis* ssp. *gracilis*) leaves in ewes' diet. *Meat Science*, 85(1): 82-88.
- Nieto G, Estrada M, Jordán MJ, Garrido MD, Bañón S (2011). Effects in ewe diet of rosemary by-product on lipid oxidation and the eating quality of cooked lamb under retail display conditions. *Food Chemistry*, 124(4): 1423-1429.
- Niewold TA, Schroyen M, Geens MM, Verhelst RS, Courtin CM (2012). Dietary inclusion of arabinoxylan oligosaccharides (AXOS) down regulates mucosal responses to a bacterial challenge in a piglet model. *Journal of Functional Foods*, 4(3): 626-635.
- Nisha AR (2008). Antibiotic residues-A global health hazard. *Veterinary World*, 1(12): 375-377.
- Nochta I, Halas V, Tossenberger J, Babinszky L (2010). Effect of different levels of mannan-oligosaccharide supplementation on the apparent ileal digestibility of nutrients, N-balance and growth performance of weaned piglets. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 94(6): 747-756.
- Ntalli NG, Caboni P (2012). Botanical nematicides in the mediterranean basin. *Phytochemistry Reviews*, 11(4): 351-359.
- O'Connor TP, Lam MM, Diamond J (1999). Magnitude of functional adaptation after intestinal resection. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 276(5): R1265-R1275.
- O'Grady MN, Carpenter R, Lynch PB, O'Brien NM, Kerry JP (2008). Addition of grape seed extract and bearberry to porcine diets: Influence on quality attributes of raw and cooked pork. *Meat Science*, 78(4): 438-446.
- O'Grady MN, Maher M, Troy DJ, Moloney AP, Kerry JP (2006). An assessment of dietary supplementation with tea catechins and rosemary extract on the quality of fresh beef. *Meat Science*, 73(1): 132-143.
- O'Shea CJ, Sweeney T, Lynch MB, Callan JJ, O'Doherty JV (2011). Modification of selected bacteria and markers of protein fermentation in the distal gastrointestinal tract of pigs upon consumption of chitosan is accompanied by heightened manure odor emissions. *Journal of Animal Science*, 89(5): 1366-1375.
- O'Connor TP, Lam MM, Diamond J (1999). Magnitude of functional adaptation after intestinal resection. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrativa and Comparative Physiology*, 276(5): R1265-R1275.
- Oetting LL, Utiyama CE, Giani PA, Ruiz US, Miyada VS (2006). Efeitos de extratos vegetais e antimicrobianos sobre a digestibilidade aparente, o desempenho, a morfometria dos órgãos ea histologia intestinal de leitões recém-desmamados. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 35(4): 1389-1397.

BIBLIOGRAFÍA

- Ogawa T, Asai Y, Yasuda K, Sakamoto H (2005). Oral immunoadjuvant activity of a new synbiotic *Lactobacillus casei* subsp *casei* in conjunction with dextran in BALB/c mice. *Nutrition Research*, 25(3): 295-304.
- OMS (2009). Evaluation of certain veterinary drug residues in food. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. World Health Organization Technical Report Series, nº 954. WHO Press.
- OMS (2014). <http://www.who.int/topics/shigella/en/>
- Orafidiya LO, Agbani EO, Iwalewa EO, Adelusola KA, Oyedapo OO (2004). Studies on the acute and sub-chronic toxicity of the essential oil of *Ocimum gratissimum* L. leaf. *Phytomedicine*, 11(1): 71-76.
- Ouwehand AC, Derrien M, de Vos W, Tiihonen K, Rautonen N (2005). Prebiotics and other microbial substrates for gut functionality. *Current Opinion in Biotechnology*, 16(2): 212-217.
- Øverland M, Granli T, Kjos NP, Fjetland O, Stokstad M, Steien SH (2000). Effect of dietary formates on growth performance, carcass traits, sensory quality, intestinal microflora, and stomach alterations in growing-finishing pigs. *Journal of Animal Science*, 78(7): 1875-1884.
- Øverland M, Kjos NP, Borg M, Skjerve E, Sørum H (2008). Organic acids in diets for entire male pigs: Effect on skatole level, microbiota in digesta, and growth performance. *Livestock Science*, 115(2): 169-178.
- Øverland M, Kjos NP, Borg M, Sørum H (2007). Organic acids in diets for entire male pigs. *Livestock Science*, 109(1): 170-173.
- Özek K, Wellmann KT, Ertekin B, Tarim B (2011). Effects of dietary herbal essential oil mixture and organic acid preparation on laying traits, gastrointestinal tract characteristics, blood parameters and immune response of laying hens in a hot summer season. *Journal of Animal and Feed Sciences*, 20(4): 575-586.
- Papavramidis TS, Kaidoglou K, Grosomanidis V, Kazamias P, Anagnostopoulos TH, Paramythiotis D, Kotzampassi K (2009). Short-term fasting-induced jejunal mucosa atrophy in rats –the role of probiotics during refeeding. *Annals of gastroenterology*, 22(4): 268-274.
- Papin JF, Vahrson W, Dittmer DP (2004). SYBR green-based real-time quantitative PCR assay for detection of west Nile virus circumvents false-negative results due to strain variability. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(4): 1511-1518.
- Paulicks BR, Roth FX, Kirchgessner M (2000). Effects of potassium diformate (Formi® LHS) in combination with different grains and energy densities in the feed on growth performance of weaned piglets. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 84(3-4): 102-111.
- Pearce KL, Rosenvold K, Andersen HJ, Hopkins DL (2011). Water distribution and mobility in meat during the conversion of muscle to meat and ageing and the impacts on fresh meat quality attributes-A review. *Meat Science*, 89(2): 111-124.

- Pena A, Serrano C, Réu C, Baeta L, Calderón V, Silveira I, Sousa JC, Peixe L (2004). Antibiotic residues in edible tissues and antibiotic resistance of faecal *Escherichia coli* in pigs from Portugal. *Food Additives and Contaminants*, 21(8):749-755.
- Peñalver P, Huerta B, Borge C, Astorga R, Romero R, Perea A (2005). Antimicrobial activity of five essential oils against origin strains of the Enterobacteriaceae family, *APMIS* 113(1): 1-6.
- Pérez JF, Nofrarías M (2008). Influencia de la nutrición sobre la patología digestiva del lechón. En: *Avances en nutrición y alimentación animal*, 81-105. Fundación Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal.
- Pérez-Sánchez R, Infante F, Gálvez C, Ubera JL (2007). Fungitoxic activity against phytopathogenic fungi and the chemical composition of *Thymus zygis* essential oils. *Food Science and Technology International*, 13(5): 341-347.
- Peters JM y Boyd EM (1966). Organ weights and water levels of the rat following reduced food intake. *The Journal of Nutrition*, 90(4): 354-360.
- Petterson A, Domig KJ, Schedle K, Windisch W, Kneifel W (2010). Comparison of three methods to enumerate gut microbiota of weanling piglets fed insoluble dietary fibre differing in lignin content. *Journal of Agricultural Science*, 148(2): 225-232.
- Pieper R, Janczyk P, Schumann R, Souffrant WB (2006). The intestinal microflora of piglets around weaning- with emphasis on lactobacilli. *Archiva Zootechnica*, 9: 28-40.
- Pina-Vaz C, Gonçalves Rodrigues A, Pinto E, Costa-de-Oliveira S, Tavares C, Salgueiro L, Cavaleiro C, Gonçalves MJ, Martinez-de-Oliveira J (2004). Antifungal activity of Thymus oils and their major compounds. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 18(1): 73-78.
- Piskula MK, Terao J (1998). Accumulation of (-)-epicatechin metabolites in rat plasma after oral administration and distribution of conjugation enzymes in rat tissues. *The Journal of Nutrition*, 128(7): 1172-1178.
- Piva A, Pizzamiglio V, Morlacchini M, Tedeschi M, Piva G (2007). Lipid microencapsulation allows slow release of organic acids and natural identical flavors along the swine intestine. *Journal of Animal Science*, 85(2): 486-493.
- Platel K, Srinivasan K (1996). Influence of dietary spices or their active principles on digestive enzymes of small intestinal mucosa in rats. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 47(1): 55-59.
- Pluske JR, Black B, Pethick DW, Mullan BP, Hampson DJ (2003a). Effects of different sources and levels of dietary fibre in diets on performance, digesta characteristics and antibiotic treatment of pigs after weaning. *Animal Feed Science and Technology*, 107(1): 129-142.
- Pluske JR, Hopwood DE, Hampson DJ (2003b). Relación entre la microbiótica intestinal, el pienso y la incidencia de diarreas, y su influencia sobre la salud del lechón tras el destete. En: *Avances en nutrición y alimentación*

BIBLIOGRAFÍA

- animal*, 93-108. Fundación Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal.
- Pluske JR, Kerton DJ, Cranwell PD, Campbell RG, Mullan BP, King RH, Power GN, Pierzynowski SG, Westrom B, Rippe C, Peulen O, Dunshea FR (2003c). Age, sex, and weight at weaning influence organ weight and gastrointestinal development of weanling pigs. *Australian Journal of Agricultural Research*, 54: 515-527.
- Pluske JR, Pethick DW, Hampson DJ (2003d). El impacto de la nutrición sobre desórdenes y enfermedades de tipo entérico en porcino. En: *Avances en nutrición y alimentación animal*, 49-69. Fundación Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal.
- Pluske JR, Williams IH, Aherne FX (1996). Maintenance of villus height and crypt depth in piglets by providing continuous nutrition after weaning. *Animal Science*, 62(1): 131-144.
- Poeikhampha T, Bunchasak C (2011). Comparative effects of sodium gluconate, mannan oligosaccharide and potassium diformate on growth performances and small intestinal morphology of nursery pigs. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 24(6): 844-850.
- Poroyko V, White JR, Wang M, Donovan S, Alverdy J, Liu DC, Morowitz MJ (2010). Gut microbial gene expression in mother-fed and formula-fed piglets. *PLoS One*, 5(8): e12459.
- Poulose AJ, Croteau R (1978). Biosynthesis of aromatic monoterpenes: conversion of γ -terpinene to p-cymene and thymol in *Thymus vulgaris* L. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 187(2): 307-314.
- Prevolnik M, Candek-Potokar M, Novic M, Skorjanc D (2009). An attempt to predict pork drip loss from pH and colour measurements or near infrared spectra using artificial neural networks. *Meat Science*, 83(3): 405-411.
- Przybylski W, Monin G, Maria Kocwin-Podsiadla M, Krzeczio E (2006). Glycogen metabolism in muscle and its effects on meat quality in pigs—A mini review. *Polish Journal of Food Nutrition Sciences*, 15(3): 257-262.
- Radecki SV, Juhl MR, Miller ER (1988). Fumaric and citric acid as feed additives in starter pig diets: Effect on performance and nutrient balance. *Journal of Animal Science*, 66(10): 2598-2605.
- Rafii F, Shahverdi AR (2007). Comparison of essential oils from three plants for enhancement of antimicrobial activity of nitrofurantoin against enterobacteria. *Chemotherapy*, 53(1): 21-25.
- Ramakrishna Rao R, Platel K, Srinivasan K (2003). In vitro influence of spices and spice-active principles on digestive enzymes of rat pancreas and small intestine. *Nahrung*, 47(6): 408-412.
- Rauha JP, Remes S, Heinonen M, Hopia A, Kähkönen M, Kujala T, Pihlaja K, Vuorela H, Vuorela P (2000). Antimicrobial effects of Finnish plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds. *International Journal of Food Microbiology*, 56(1): 3-12.

- Ravindran V (2010). Aditivos en alimentación animal: presente y futuro. En: *Avances en nutrición y alimentación animal*, 3-26. Fundación Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal.
- Rawani A, Pal S, Chandra G (2011). Evaluation of antimicrobial properties of four plant extracts against human pathogens. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 1(1): S71-S75.
- Real Decreto 1135/2002, de 31 de octubre, relativo a las normas mínimas para la protección de cerdos.
- Real Decreto 1201/2005, de 10 de octubre, sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos.
- Reglamento (CE) 1774/2002 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 3 de octubre de 2002, por el que se establecen las normas sanitarias aplicables a los subproductos animales no destinados al consumo humano.
- Reglamento (CE) 1831/2003 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 22 de septiembre de 2003, sobre los aditivos en la alimentación animal.
- Reglamento (CE) 184/2007 de la Comisión, de 20 de febrero de 2007, relativo a la autorización de diformato de potasio (Formi LHS) como aditivo para la alimentación animal.
- Reglamento (CE) 852/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 29 de abril de 2004, relativo a la higiene de los productos alimenticios.
- Reglamento (CE) 853/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 29 de abril de 2004, por el que se establecen normas específicas de higiene de los alimentos de origen animal.
- Reglamento (CE) 854/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 29 de abril de 2004, por el que se establecen normas específicas para la organización de controles oficiales de los productos de origen animal destinados al consumo humano.
- Reichling J, Schnitzler P, Suschke U, Saller R (2009). Essential oils of aromatic plants with antibacterial, antifungal, antiviral, and cytotoxic properties—an overview. *Forschende Komplementärmedizin*, 16(2): 79-90.
- Reisinger N, Steiner T, Nitsch S, Schatzmayr G, Applegate TJ (2011). Effects of a blend of essential oils on broiler performance and intestinal morphology during coccidial vaccine exposure. *The Journal of Applied Poultry Research*, 20(3): 272-283.
- Report of the Scientific Committee on Animal Nutrition on the use of potassium diformate (FormiTMLHS) as feed additive (adopted on 22 March 2001). European Commission-Health & Consumer Protection Directorate-General.
- Reuter G (2001). The Lactobacillus and Bifidobacterium microflora of the human intestine: composition and succession. *Current Issues in Intestinal Microbiology*, 2(2):43-53.
- Riella KR, Marinho RR, Santos JS, Pereira-Filho RN, Cardoso JC, Albuquerque-Junior RLC, Thomazzi SM (2012). Anti-inflammatory and cicatrizing

BIBLIOGRAFÍA

- activities of thymol, a monoterpene of the essential oil from *Lippia gracilis*, in rodents. *Journal of Ethnopharmacology*, 143(2): 656-663.
- Risley CR, Kornegay ET, Lindemann MD, Weakland SM (1991). Effects of organic acids with and without a microbial culture on performance and gastrointestinal tract measurements of weanling pigs. *Animal Feed Science and Technology*, 35(3): 259-270.
- Risley CR, Kornegay ET, Lindemann MD, Wood CM, Eigelt WN (1992). Effect of feeding organic acids on selected intestinal content measurements at varying times postweaning in pigs. *Journal of Animal Science*, 70(1): 196-206.
- Rivas-Martínez S (1987). Nociones sobre fitosociología, biogeografía y bioclimatología. En: Peinado M, Rivas Martínez S (Eds.), *La vegetación de España*, 19-45. Madrid: Serv. Publ. Univ. Alcalá de Henares.
- Roca Canudas M (2008). Estudio del ecosistema bacteriano del tracto digestivo del cerdo mediante técnicas moleculares. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Barcelona.
- Roca M, Nofrarías M, Majó N, Pérez de Rozas AM, Segalés J, Castillo M, Martín-Orúe SM, Espinal A, Pujols J, Badiola I (2014). Changes in bacterial population of gastrointestinal tract of weaned pigs fed with different additives. *BioMed Research International*, 2014: ID 269402.
- Rodríguez-Palenzuela P, García J, de Blas C (1998). Fibra soluble y su implicación en nutrición animal: enzimas y probióticos. En: *Avances en nutrición y alimentación animal*, 227-240. Fundación Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal.
- Roessler EB, Pangbom RM, Sjdell JL, Stone H (1978). Expanded statistical tables for estimating significance in paired-preference, duo-trio and triangle tests. *Journal of Food Science*, 43(3):940-943.
- Romero Márquez MD (2004). Plantas aromáticas: tratado de aromaterapia científica. Buenos Aires, Argentina: Editorial Kier.
- Rosenvold K, Andersen HJ (2003). Factors of significance for pork quality-a review. *Meat Science*, 64(3): 219-237.
- Ross GR, Gusils C, Oliszewski R, Colombo de Holgado S, González SN (2010). Effects of probiotic administration in swine. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 109(6): 545-549.
- Ross MH, Wojciech P (2007). Histología. Editorial Médica Panamericana.
- Rosseau RM (2001). Detection limit and estimate of uncertainty of analytical XRF results. *The Rigaku Journal*, 18(2): 33-47.
- Rossi R, Pastorelli G, Cannata S, Tavaniello S, Maiorano G, Corino C (2013). Effect of long term dietary supplementation with plant extract on carcass characteristics meat quality and oxidative stability in pork. *Meat Science*, 95(3): 542-548.
- Rota MC, Herrera A, Martínez RM, Sotomayor JA, Jordán MJ (2008). Antimicrobial activity and chemical composition of *Thymus vulgaris*,

- Thymus zygis* and *Thymus hyemalis* essential oils. *Food Control*, 19(7): 681-687.
- Roth FX, Kirchgessner M (1998). Organic acids as feed additives for young pigs: nutritional and gastrointestinal effects. *Journal of Animal Feed Sciences*, 7: 25-33.
- Rovai M, Caja G, Salama AAK, Jubert A, Lázaro B, Lázaro M, Leitner G (2014). Identifying the major bacteria causing intramammary infections in individual milk samples of sheep and goats using traditional bacteria culturing and real-time polymerase chain reaction. *Journal of Dairy Science*, 97(9): 1-8.
- Rumsey D (2005). Small intestine: structure and function. En: Caballero B, Allen L, Prentice A (Eds.) *Encyclopedia of human nutrition*. Oxford, UK: Elsevier Academic Press.
- Russo M, Galletti GC, Bocchini P, Carnacini A (1998). Essential oil chemical composition of wild populations of Italian oregano spice (*Origanum vulgare* ssp. *hirtum* (Link) letswaart): A preliminary evaluation of their use in chemotaxonomy by cluster analysis. 1. Inflorescences. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(9): 3741-3746.
- Ruusunen M, Partanen K, Pösö R, Poulanne E (2007). The effect of dietary protein supply on carcass composition, size of organs, muscle properties and meat quality of pigs. *Livestock Science*, 107(2): 170-181.
- Ryu YC y Kim BC (2005). The relationship between muscle fiber characteristics, postmortem metabolic rate, and meat quality of pig *Longissimus dorsi* muscle. *Meat Science*, 71(2): 351-357.
- Saad N, Delattre C, Urdaci M, Schmitter JM, Bressollier P (2013). An overview of the last advances in probiotic and prebiotic field. *LWT-Food Science and Technology*, 50(1): 1-16.
- Sads PR, Bilkei G (2003). The effect of oregano and vaccination against Glässer's disease and pathogenic *Escherichia coli* on postweaning performance of pigs. *Irish Veterinary Journal*, 56 (12): 611-615.
- Sáenz Y, Zarazaga M, Lantero M, Gastañares MJ, Baquero F, Torres C (2000). Antibiotic resistance in *Campylobacter* Strains isolated from animals, food, and humans in Spain in 1997-1998. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44(2): 267-271.
- Salgueiro LR, Pinto E, Gonçalves MJ, Pina-Vaz C, Cavaleiro C, Rodrigues AG, Palmeira A, Tavares C, Costa-de-Oliveira S, Martinez-de-Oliveira J. (2004). Chemical composition and antifungal activity of the essential oil of *Thymbra capitata*. *Planta Medica*, 70(6):572-575.
- Sánchez Gómez P, Soriano Cano C, Correal Castellanos E (1992). Tomillos del sureste ibérico. Su aprovechamiento y posibilidades de cultivo. En: *Jornadas ibéricas de plantas medicinales, aromáticas y de aceites esenciales*. INIA, Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación.
- Sancho E, Batlle E, Clevers H (2003). Live and let die in the intestinal epithelium. *Current Opinion in Cell Biology*, 15(6): 763-770.

BIBLIOGRAFÍA

- Sangha GK, Kaur K, Khera KS, Singh B (2011). Toxicological effects of cypermethrin on female albino rats. *Toxicology International*, 18(1): 5-8.
- Santoro GF, das Graças Cardoso M, Guimarães LGL, Salgado APSP, Menna-Barreto RFS, Soares MJ (2007). Effect of oregano (*Origanum vulgare* L.) and thyme (*Thymus vulgaris* L.) essential oils on *Trypanosoma cruzi* (Protozoa: Kinetoplastida) growth and ultrastructure. *Parasitology Research*, 100(4):783-790.
- Sauerland M (2008). Effect of pH and temperature on myoglobin in fresh meat. Tesis Doctoral. The Ohio State University.
- Scheffer JJC (1993). The isolation of essential oils-factors influencing the oil composition. *Acta Horticulturae (ISHS)* 344: 2-8.
- Scheffler TL y Gerrard DE (2007). Mechanisms controlling pork quality development: The biochemistry controlling postmortem energy metabolism. *Meat Science*, 77(1): 7-16.
- Schmidt B, Mulder IE, Musk CC, Aminov RI, Lewis M, Stokes CR, Bailey M, Prosser JI, Gill BP, Pluske JR, Kelly D (2011). Establishment of normal gut microbiota is compromised under excessive hygiene conditions. *PLoS One*, 6(12): e28284.
- Sellers R, Morton D, Michael B, Roome N, Johnson JK, Yano BL, Perry R, Schafer K (2007). Society of toxicologic pathology position paper: organ weight recommendations for toxicology studies. *Toxicologic Pathology*, 35(5): 751-755.
- Serrano E, Cornu A, Kondjoyan N, Figueredo G, Agabriel J, Micol D (2007). Terpene accumulation in muscle and fatty tissues of calves supplemented with essential oils. *Journal of Animal and Feed Sciences*, 16(2): 168-179.
- Shangari N, Chan TS, O'Brien PJ (2005). Sulfation and glucuronidation of phenols: Implications in coenzyme Q metabolism. En: Sies H, Packer L (Eds.), *Methods in Enzymology. Phase II Conjugation Enzymes and Transport Systems*, Volumen 400: 342. Gulf Professional Publishing.
- Shea KM (2003). Antibiotic resistance: what is the impact of agricultural uses of antibiotics on children's health?. *Pediatrics*, 112(1): 253-258.
- Shebab DI (2013). Celiac disease. *Egyptian Journal of Internal Medicine*, 25: 53-62.
- Shim SB (2005). Effects of prebiotics, probiotics and synbiotics in the diet of young pigs. Tesis Doctoral. Wageningen University.
- Si W, Gong J, Tsao R, Zhou T, Yu H, Poppe C, Johnson R, Du Z (2006). Antimicrobial activity of essential oils and structurally related synthetic food additives towards selected pathogenic and beneficial gut bacteria. *Journal of Applied Microbiology*, 100(2): 296-305.
- Silderberg M, Morand C, Mathevon T, Besson C, Manach C, Scalbert A, Remesy C (2006). The bioavailability of polyphenols is highly governed by the capacity of the intestine and of the liver to secrete conjugated metabolites. *European Journal of Nutrition*, 45(2): 88-96.

- Silva MAD, Pessotti BMDS, Zanini SF, Colnago GL, Rodrigues MR, Nunes LDC, Zanini MS, Martins IVF (2009). Intestinal mucosa structure of broiler chickens infected experimentally with *Eimeria tenella* and treated with essential oil of oregano. *Ciência Rural*, 39(5): 1471-1477.
- Simitzis PE, Deligeorgis SG, Bizelis JA, Dardamani A, Theodosiou I, Fegeros K (2008). Effect of dietary oregano oil supplementation on lamb meat characteristics. *Meat Science*, 79(2): 217-223.
- Simitzis PE, Symeon GK, Charismiadou MA, Bizelis JA, Deligeorgis SG (2010). The effects of dietary oregano oil supplementation on pig meat characteristics. *Meat Science*, 84(4): 670-676.
- Simpson JM, McCracken VJ, Gaskins HR, Mackie RI (2000). Denaturing gradient gel electrophoresis analysis of 16s ribosomal dna amplicons to monitor changes in fecal bacterial populations of weaning pigs after introduction of *Lactobacillus reuteri* strain MM53. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(11): 4705-4714.
- Skrzypek T, Valverde Piedra JL, Skrzypek H, Wolinski J, Kazimierczak W, Szymanczyk S, Pawlowska M, Zabielski R (2005). Light and scanning electron microscopy evaluation of the postnatal small intestinal mucosa development in pigs. *Journal of Physiology and Pharmacology*, 56(3): 71-87.
- Smith CJ y Osborn AM (2009). Advantages and limitations of quantitative PCR (Q-PCR)-based approaches in microbial ecology. *FEMS Microbiology Ecology*, 67(1): 61-20.
- Smith-Palmer A, Stewart J, Fyfe L (1998). Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. *Letters in Applied Microbiology*, 26(2): 118-122.
- Snoeck V, Goddeeris B, Cox E (2005). The role of enterocytes in the intestinal barrier function and antigen uptake. *Microbes and Infection*, 7(7): 997-1004.
- Songer JG y Uzal FA (2005). Clostridial enteric infections in pigs. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 17(6): 528-536.
- Sotomayor JA (1998). Estudio sobre Plantas Aromáticas de los géneros *Salvia* y *Thymus*, espontáneas en el SE Ibérico, para su establecimiento como cultivo. Tesis Doctoral. Universidad de Murcia.
- Sotomayor JA, Martínez RM, García AJ, Jordán MJ (2004). *Thymus zygis* subsp. *gracilis*: watering level effect on phytomass production and essential oil quality. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(17): 5418-5424.
- Spreeuwenberg MAM (2002). Diet composition and gut integrity in weaned piglets. Tesis Doctoral. Wageningen University.
- Spreeuwenberg MAM, Verdonk JMAJ, Gaskins HR, Verstegen MWA (2001). Small epithelial barrier function is compromised in pigs with low feed intake at weaning. *The Journal of Nutrition*, 131(5): 1520-1527.

BIBLIOGRAFÍA

- Starr C, Taggart R, Evers C, Starr L (2012). *Animal Structure & Function*, Volume 5. Cengage Learning.
- Sterten H, Frøystein T, Oksbjerg N, Rehnberg AC, Ekker AS, Kjos NP (2009). Effects of fasting prior to slaughter on technological and sensory properties of the loin muscle (*M. longissimus dorsi*) of pigs. *Meat Science*, 83(3): 351-357.
- Su Y, Yao W, Pérez-Gutiérrez ON, Smidt H, Zhu WY (2008). Changes in abundance of *Lactobacillus* spp. and *Streptococcus suis* in the stomach, jejunum and ileum of piglets after weaning. *FEMS Microbiology Ecology*, 66(3): 546-555.
- Sueiro RA, Araujo M, Santos CJ, Gómez MJ, Garrido MJ (2001). Evaluation of Coli-ID and MUG Plus media for recovering *Escherichia coli* and other coliform bacteria from groundwater samples. *Water Science and Technology*, 43(12): 213-216.
- Swann MM, Baxter KL, Field HI (1969). Report of the joint committee on the use of antibiotics in animal husbandry and veterinary medicine. Her Majesty's Stationary Office, London.
- Swords WE, Wu CC, Champlin FR, Buddington RK (1993). Postnatal changes in selected bacterial groups of the pig colonic microflora. *Neonatology*, 63(3): 191-200.
- Taiz L, Zeiger E (2010). *Plant physiology*. Sunderland, MA: Sinauer Associates.
- Talib WH, Abukhader MM (2013). Combinatorial effects of thymoquinone on the anticancer activity and hepatotoxicity of the prodrug CB 1954. *Scientia Pharmaceutica*, 81(2): 519-530.
- Taranu I, Marin DE, Untea A, Janczyk P, Motiu M, Criste RD, Souffrant WB (2012). Effect of dietary natural supplements on immune response and mineral bioavailability in piglets after weaning. *Czech Journal of Animal Science*, 57(7): 332-343.
- Tekwu EM, Pieme AC, Beng VP (2012). Investigations of antimicrobial activity of some Cameroonian medicinal plant extracts against bacteria and yeast with gastrointestinal relevance. *Journal of Ethnopharmacology*, 142(1): 265-273.
- Tekwu EM, Pieme AC, Beng VP (2012). Investigations of antimicrobial activity of some Cameroonian medicinal plant extracts against bacteria and yeast with gastrointestinal relevance. *Journal of Ethnopharmacology*, 142(1): 265-273.
- Teo S, Stirling D, Thomas S, Hoberman A, Kiorpes A, Khetani V (2002). A 90-day oral gavage toxicity study of D-methylphenidate and D,L-methylphenidate in Sprague-Dawley rats. *Toxicology*, 179(3): 183-196.
- Thakur S, Grebeyes WA (2005). Prevalence and antimicrobial resistance of *Campylobacter* in antimicrobial-free and conventional pig production systems. *Journal of Food Protection*, 68(11): 2402-2410.

- Thanabhorn S, Jaijoy K, Thamaree S, Ingkaninan K, Panthong A (2006). Acute and subacute toxicity study of the ethanol extract from *Lonicera japonica* Thunb. *The Journal of Ethnopharmacology*, 107(3): 370-373.
- Thapa D, Losa R, Zweifel B, Wallace RJ (2012). Sensitivity of pathogenic and commensal bacteria from the human colon to essential oils. *Microbiology*, 158: 2870-2877.
- Thomson AB, Cheeseman CI, Keelan M, Fedorak R, Clandinin MT (1994). Crypt cell production rate, enterocyte turnover time and appearance of transport along the jejunal villus of the rat. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1191(1): 197-204.
- Timbermont L, Lanckriet A, Dewulf J, Nollet N, Schwarzer K, Haesebrouck F, Ducatelle R, Van Immerseel F (2010). Control of *Clostridium perfringens*-induced necrotic enteritis in broilers by target-released butyric acid, fatty acids and essential oils. *Avian Pathology*, 39(2): 117-121.
- Tolozan EM, Diamond J (1992). Ontogenetic development of nutrient transporters in rat intestine. *American Journal of Physiology*, 263: G593-G593.
- Torres C, Zarazaga M (1998). Repercusiones en el hombre del consumo de antibióticos por animales. *Revista Española de Quimioterapia*, 11: 29-35.
- Traore S, Aubry L, Gatellier P, Przybylski W, Jaworska D, Kajak-Siemaszko K, Santé-Lhoutellier V (2012). Higher drip loss is associated with protein oxidation. *Meat Science*, 90(4): 917-924.
- Trebichavsky I, Splichal I, Rada V, Splichalova A. (2010). Modulation of natural immunity in the gut by *Escherichia coli* strain Nissle 1917. *Nutrition Reviews*, 68(8): 459-464.
- Trevisi P, Meriardi G, Mazzoni M, Casini L, Tittarelli C, De Filippi S, Minieri L, Lalatta-Costerbosa G, Bosi P (2007). Effect of dietary addition of thymol on growth, salivary and gastric function, immune response, and excretion of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, in weaning pigs challenged with this microbe strain. *Italian Journal of Animal Science*, 6(1s): 374-376.
- Troncone R, Caputo N, Zibella A, Moliterno G, Maiuri L, Auricchio S (1994). Effects of gluten enriched diet on the small intestinal mucosa of normal mice and mice with graft versus host reaction. *Gut*, 35(6): 779-782.
- Trowell H, Southgate DA, Wolever TMS, Lead SAR, Gassul MA, Jenkins DJA (1976). Dietary fibre redefined. *The Lancet*, 307(7966): 967.
- Trüper HG, Schleifer K-H (2006). Prokaryote characterization and identification. En: Dorwin M, Falkow S (Eds.), *The prokaryotes, Vol. 1, Symbiotic associations, biotechnology, applied microbiology*, 1:58-79. Springer Science & Business Media.
- Tsiloyiannis VK, Kyriakis SC, Vlemmas J, Sarris K (2001). The effect of organic acids on the control of porcine post-weaning diarrhoea. *Research in Veterinary Science*, 70(3): 287-293.
- Tsirtsikos P, Fegeros K, Kominakis A, Balaskas C, Mountzouris C (2012). Modulation of intestinal mucin composition and mucosal morphology by dietary phytochemical inclusion level in broilers. *Animal*, 6(7): 1049-1057.

BIBLIOGRAFÍA

- Ultee A, Bennik MHJ, Moezelaar R (2002). The Phenolic Hydroxyl Group of Carvacrol Is Essential for Action against the Food-Borne Pathogen *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(4): 1561-1568.
- Ultee A, Kets EP, Alberda M, Hoekstra FA, Smid EJ (2000). Adaptation of the food borne pathogen *Bacillus cereus* to carvacrol. *Archives Microbiology*, 174(4): 233-238.
- UNE-EN ISO 4120:2007. Análisis sensorial. Metodología. Prueba triangular (ISO 4120:2004). Asociación Española de Normalización y Certificación (AENOR).
- USDA (2014). Livestock and Poultry: World Markets and Trade. Foreign Agricultural Service, United States Department of Agriculture. En: <http://www.usda.gov/wps/portal/usda/usdahome>
- Van Beers-Schreurs HM, Nabuurs MJ, Vellenga L, Kalsbeek-van der Valk HJ, Wensing T, Breukink HJ (1998). Weaning piglets, microbial fermentation, short chain fatty acids and diarrhoea. *The Veterinary Quarterly*, 20(3): S64-S68.
- Van Bladeren PJ (1997). Influence of non-nutrient plant components on biotransformation enzymes. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 51(8): 324-327.
- Van De Steene JC, Lambert WE (2008). Comparison of matrix effects in hplc-ms/ms and uplc-ms/ms analysis of nine basic pharmaceuticals in surface waters. *Journal of the American Society of Mass Spectrometry*, 19(5): 713-718.
- Van den Ende W, Peshev D, De Gara L (2011). Disease prevention by natural antioxidants and prebiotics acting as ROS scavengers in the gastrointestinal tract. *Trends in Food Science & Technology*, 22(12): 689-697.
- Van der Wolf PJ, Rothkamp A, Junker K, De Neeling AJ (2012). *Staphylococcus aureus* (MSSA) and MRSA (CC398) isolated from post-mortem samples from pigs. *Veterinary Microbiology*, 158(1): 136-141.
- Van Dijk AJ, Niewold TA, Margry RJCF, Van Den Hoven SGC, Nabuurs MJA, Stockhofe-Zurwieden N, Beynen AC (2001). Small intestinal morphology in weaned piglets fed a diet containing spray-dried porcine plasma. *Research in Veterinary Science*, 71(1): 17-22.
- Van Kempen TATG, Tibble S (2006). Nuevas consideraciones sobre la mortalidad de lechones al nacimiento. En: *Avances en nutrición y alimentación animal*, 115-123. Fundación Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal.
- Van Laack RL, Stevens SG, Stalder KJ (2001). The influence of ultimate pH and intramuscular fat content on pork tenderness and tenderization. *Journal of Animal Science*, 79(2): 392-397.
- Van Pelt-Verkuil E, Van Belkum A, Hays JP (2008). Principles and technical aspects of PCR amplification. New York: Springer.

- Van Wagenberg CPA, Backus GBC, van der Vost JGAJ, Urlings BAP (2012). Usefulness of food chain information provided by Dutch finishing pig producers to control antibiotic residues in pork. *Preventive Veterinary Medicine*, 107(1): 142-145.
- Vandenberg N, van Oorschot RA (2002). Extraction of human nuclear DNA from feces samples using the QIAamp DNA stool mini kit. *Journal of Forensic Sciences*, 47(5): 993-995.
- Vandendriessche F (2008). Meat products in the past, today and in the future. *Meat Science*, 78(1): 104-113.
- Vaz-Moreira I, Egas C, Nunes OC, Manaia CM (2011). Culture-dependent and culture-independent diversity surveys target different bacteria: a case study in a freshwater sample. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 100(2): 245-257.
- Velasco V, Williams P (2011). Improving meat quality through natural antioxidants. *Chilean Journal of Agricultural Research*, 71(2): 313-322.
- Viuda-Martos M, Ruiz-Navajas Y, Sánchez-Zapata E, Fernández-López J, Pérez-Álvarez JA (2010). Antioxidant activity of essential oils of five spice plants widely used in a Mediterranean diet. *Flavour and Fragrance Journal*, 25(1): 13-19.
- Waché YJ, Valat C, Postollec G, Bougeard S, Burel C, Oswald IP, Fravallo P (2009). Impact of deoxynivalenol on the intestinal microflora of pigs. *International Journal of Molecular Sciences*, 10(1): 1-17.
- Wallace TC, Guarner F, Madsen K, Cabana MD, Gibson G, Hentges E, Sanders ME (2011). Human gut microbiota and its relationship to health and disease. *Nutrition Reviews*, 69(7): 392-403.
- Wang D, Meng J, Gao H, Xu K, Xiao R, Zhong Y, Luo X, Yao P, Yan H, Liu L (2012). Evaluation of reproductive and developmental toxicities of Pu-erh black tea (*Camellia sinensis* var. *assamica*) extract in Sprague Dawley rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 142(3): 836-844.
- Wang HY, Kim S, Kim H, Kim J, Kim Y, Park SD, Jin H, Choi Y, Uh Y, Lee H (2014). Real-time PCR TaqMan assay for rapid screening of bloodstream infection. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 13(1): 3-10.
- Wang JF, Jensen BB, Jørgensen H, Li DF, Lindberg JE (2002). Ileal and total tract digestibility, and protein and fat balance in pigs fed rice with addition of potato starch, sugar beet pulp or wheat bran. *Animal Feed Science and Technology*, 102(1): 125-136.
- Wang Q, Gong J, Huang X, Yu H, Xue F (2009). In vitro evaluation of the activity of microencapsulated carvacrol against *Escherichia coli* with K88 pili. *Journal of Applied Microbiology*, 107(6): 1781-1788.
- Warris PD (2010). The effects of live animal handling on carcass and meat quality. En: Warris PD (Ed.), *Meat science: an introductory text*, (Ed. 2), 97-112. CABI.

BIBLIOGRAFÍA

- Waterman PG, Mole S (1994). Why are phenolic compounds so important?. En: Waterman PG, Mole S (Eds.), *Analysis of phenolic plant metabolites*, 44-65. Oxford: Blackwell Scientific Publications.
- Wayhs MLC, Patrício FSR, Amancio OMS, Pedroso MZ, Fagundes Neto U, Morais MB (2004). Morphological and functional alterations of the intestine of rats with iron-deficiency anemia. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 37(11), 1631-1635.
- Wellock IJ, Fortomaris PD, Houdijk JGM, Kyriazakis I (2008). Effects of dietary protein supply, weaning age and experimental enterotoxigenic *Escherichia coli* infection on newly weaned pigs: health. *Animal*, 2(6): 834-842.
- Wen Y, Wei-yun Z, Smidt H, Verstegen MWA (2011). Cultivation-independent analysis of the development of the *Lactobacillus* spp. community in the intestinal tract of newborn piglets. *Agricultural Sciences in China*, 10 (3): 438-447.
- Wenk C (2001). The role of dietary fibre in the digestive physiology of the pig. *Animal Feed Science and Technology*, 90(1): 21-33.
- Wierup M (2001). The Swedish experience of the 1986 year ban of antimicrobial growth promoters, with special reference to animal health, disease prevention, productivity, and usage of antimicrobials. *Microbial Drug Resistance*, 7(2): 183-190.
- Williams DH, Stone MJ, Hauck PR, Rahman SK (1989). Why are secondary metabolites (natural products) biosynthesized?. *Journal of Natural Products*, 52(6): 1189-1208.
- Wilson M (2005). *Microbial inhabitants of humans: their ecology and role in health and disease*. Cambridge University Press.
- Windisch W, Schedle K, Plitzner C, Kroismayr A (2008). Use of phytogetic products as feed additives for swine and poultry. *Journal of Animal Science*, 86(14): E140–E148.
- Wirén M, Söderholm JD, Lindgren J, Olaison G, Permert J, Yang H, Larsson J (1999). Effects of starvation and bowel resection on paracellular permeability in rat small-bowel mucosa in vitro. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 34(2): 156-162.
- Witkowska D, Sowinska J (2013). The effectiveness of peppermint and thyme essential oil mist in reducing bacterial contamination in broiler houses. *Poultry Science*, 92(11): 2834-2843.
- Witte W (1998). Medical consequences of antibiotic use in agriculture. *Science*, 279(5353): 996-997.
- Wood JD, Nute GR, Fursey GAJ, Cuthbertson A (1995). The effect of coking conditions on the eating quality of pork. *Meat Science*, 40(2): 127-135.
- Xu J, Zhou F, Ji BP, Pei RS, Xu N (2008). The antibacterial mechanism of carvacrol and thymol against *Escherichia coli*. *Letters in Applied Microbiology*, 47(3): 174-179.

- Xu RJ, Mellor DJ, Tungthanathanich P, Birtles MJ, Reynolds GW, Simpson HV (1992). Growth and morphological changes in the small and the large intestine in piglets during the first three days after birth. *Journal of Developmental Physiology*, 18(4): 161-172.
- Xu RJ, Wang F, Zhang SH (2000). Postnatal adaptation of the gastrointestinal tract in neonatal pigs: a possible role of milk-borne growth factors. *Livestock Production Science*, 66(2): 95-107.
- Xu Y, Moser C, Al-Soud WA, Sørensen S, Høiby N, Nielsen PH, Thomsen TR (2012). Culture-dependent and -independent investigations of microbial diversity on urinary catheters. *Journal of Clinical Microbiology*, 50(12): 3901-3908.
- Xu ZR, Hu CH, Xia MS, Zhan XA, Wang MQ (2003). Effects of dietary fructooligosaccharide on digestive enzyme activities, intestinal microflora and morphology of male broilers. *Poultry Science*, 82(6): 1030-1036.
- Yamano T, Shimizu M, Noda T (1998). Comparative effects of repeated administration of cadmium on kidney, spleen, thymus, and bone marrow in 2-, 4-, and 8-month-old male Wistar rats. *Toxicological Sciences*, 46(2): 393-402.
- Yan L, Meng QW, Kim IH (2011). The effect of an herb extract mixture on growth performance, nutrient digestibility, blood characteristics and fecal noxious gas content in growing pigs. *Livestock Science*, 141(2): 143-147.
- Yan L, Meng QW, Kim IH (2012). Effect of an herb extract mixture on growth performance, nutrient digestibility, blood characteristics, and fecal microbial shedding in weanling pigs. *Livestock Science*, 145(1): 189-195.
- Yan L, Wang JP, Kim HJ, Meng QW, Ao X, Hong Sm, Kim IH (2010). Influence of essential oil supplementation and diets with different nutrient densities on growth performance, nutrient digestibility, blood characteristics, meat quality and fecal noxious gas content in grower–finisher pigs. *Livestock Science*, 128(1): 115-122.
- Yang H, Liu A, Zhang M, Ibrahim SA, Pang, Z, Leng X, Ren F (2009). Oral administration of live *Bifidobacterium* substrain isolated from centenarians enhances intestinal function in mice. *Current Microbiology*, 59(4): 439-445.
- Youdim KA, Deans SG, Finlayson HJ (2002). The antioxidant properties of thyme (*Thymus zygis* L.) essential oil: an inhibitor of lipid peroxidation and a free radical scavenger. *Journal of Essential Oil Research*, 14(3): 210-215.
- Young AJ (1991). The photoprotective role of carotenoids in higher plants. *Physiologia Plantarum*, 83(4): 702-708.
- Young B, Wheeler PR, Heath JW (2000). Wheeler's histología funcional. Elsevier España.
- Young OA y West J (2001). Meat color. En: Hui YH, Nip WK, Rogers R (Eds.), *Meat science and applications*, 39-69. Boca Ratón, FL: CRC Press.

BIBLIOGRAFÍA

- Yun JH, Park WG, Lee HB, Piao LG, Kim YY (2007). Effects of single or complex antibiotics on growth performance, nutrient digestibility, morphological changes of the small intestine, and antibiotic resistance in weanings pigs. En: *Abstracts ASAS/ADSA Midwest Meeting*. Journal of Animal Science, 85(2): 47-148.
- Zhang G, Zhang W, Lian B, Gu L, Zhou Q, Liu TX (1999). Insecticidal effects of extracts from two rice varieties to brown planthopper, *Nilaparvata lugens*. Journal of Chemical Ecology, 25(8): 1843-1853.
- Zhang W, Xiao S, Samaraweera H, Lee EJ, Ahn DU (2010). Improving functional value of meat products. Meat Science, 86(1): 15-31.
- Zhao PY, Jung JH, Kim IH (2012). Effect of mannan oligosaccharides and fructan on growth performance, nutrient digestibility, blood profile, and diarrhea score in weanling pigs. Journal of Animal Science, 90(3): 833-839.
- Zhu H, Hart CA, Sales D, Roberts NB (2006). Bacterial killing in gastric juice-effect of pH and pepsin on *Escherichia coli* and *Helicobacter pylori*. Journal of Medical Microbiology, 55(9): 1265-1270.
- Zhu WY, Williams BA, Konstantinov SR, Tamminga S, de Vos WM, Akkermans ADL (2003). Analysis of 16S rDNA reveals bacterial shift during in vitro fermentation of fermentable carbohydrate using piglet faeces as inoculums. Anaerobe, 9(4): 175-180.
- Zimmermann B, Bauer E, Mosenthin R (2001). Pro- and prebiotics in pig nutrition-potential modulators of gut health? Journal of Animal and Feed Sciences, 10(1): 47-56.
- Zitterl-Eglseer K, Wetscherek W, Stoni A, Kroismayr A, Windisch W (2008). Bioavailability of essential oils of a phytobiotic feed additive and impact of performance and nutrient digestibility in weaned piglets. Bodenkultur, 59:121-129.
- Zoetendal EG, Akkermans ADL, Akkermans-Van Vliet WM, de Visser JAGM, de Vos WM (2001). The host genotype affects the bacterial community in the human gastrointestinal tract. Microbial Ecology in Health and Disease, 13(3): 129-134.
- Zoetendal EG, Akkermans ADL, De Vos WM (1998). Temperature gradient gel electrophoresis analysis of 16S rRNA from human fecal samples reveals stable and host-specific communities of active bacteria. Applied and Environmental Microbiology, 64(10): 3854-3859.

IX. ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I.1. Censo por países de ganado porcino en la Unión Europea en el año 2012.....	6
Tabla I.2. Principales géneros y familias de plantas medicinales y aromáticas en España.....	50
Tabla III.1. Composición porcentual de los aceites esenciales de <i>Thymus zygis</i> subsp. <i>gracilis</i> y <i>Thymbra capitata</i>	73
Tabla III.2. Composición del PBS	84
Tabla III.3. Composición analítica de la dieta basal	87
Tabla III.4. Composición porcentual de la dieta basal.....	87
Tabla III.5. Composición analítica del pienso de leche	88
Tabla III.6. Composición porcentual del pienso de leche.....	89
Tabla III.7. Ecuaciones de regresión lineal para la cuantificación de bacterias totales y enterobacterias presentes en el contenido intestinal de cerdos.....	100
Tabla III.8. Ecuaciones de regresión lineal para la cuantificación de fenoles en carne y plasma de cerdo.....	105
Tabla IV.1. Valores medios, en porcentaje, que representan el peso del hígado, riñón y bazo de ratas en relación al peso corporal	115
Tabla IV.2. Valores medios, en porcentaje, que representan el peso del hígado, riñón y bazo de cerdos en relación al peso corporal	138
Tabla IV.3. Tabla resumen con medias y desviación estándar de los recuentos microbianos por métodos tradicionales (log ufc/g), de contenido intestinal de yeyuno de cerdos de 9 semanas destetados precozmente	168
Tabla IV.4. Tabla resumen con medias y desviación estándar de los recuentos de bacterias totales (TOT) y enterobacterias (ENT) por PCR en tiempo real (log	

copias gen/g), de contenido intestinal de cerdos de 9 semanas destetados precozmente	169
Tabla IV.5. Límites de detección y cuantificación (ppb)	171
Tabla IV.6. Porcentajes de recuperación de carvacrol y timol en las distintas matrices	171
Tabla IV.7. Cantidad de fenoles en pienso (mg/g)	172
Tabla IV.8. Cantidad de fenoles totales ingeridos por los cerdos en todo el periodo de transición (g)	172
Tabla IV.9. Cantidad de carvacrol y timol (ppm) encontrada en lomo de cerdos (músculo <i>Longissimus dorsi</i>) alimentados con aceites esenciales de PAM	174
Tabla IV.10. Cantidad de fenoles acumulada en los músculos semimembranoso y semitendinoso de cerdos en relación al peso vivo del animal (ppm)	181
Tabla IV.11. Coordenadas CIELab e índices de color del músculo <i>Longissimus dorsi</i> de cerdos de nueve semanas alimentados con aceites esenciales.....	191
Tabla IV.12. Frecuencia de consumo de distintos tipos de carne fresca	198
Tabla IV.13. Frecuencia de consumo de distintas partes de carne fresca de cerdo.....	199
Tabla IV.14. Frecuencia de consumo de distintos productos derivados del cerdo	201
Tabla IV.15. Resultados de la prueba discriminatoria triangular y de la prueba de preferencia sobre hamburguesas de cerdo	207
Table VI.1. Linear regression equations for quantifying the phenols in pig meat and plasma	234

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura I.1. Distribución de la producción mundial de distintos tipos de carne..... 4

Figura I.2. Cantidad de carne de cerdo producida (millones de toneladas) en el año 2012 por los principales países productores 5

Figura I.3. Distribución del censo de porcino en España, por Comunidades Autónomas..... 8

Figura I.4. Estructura de la cabaña ganadera en España y la Región de Murcia, datos de 2012 y 2011, respectivamente 9

Figura I.5. Estructura general de las distintas capas de la pared del tracto gastrointestinal..... 18

Figura I.6. Estructuras básicas del intestino delgado 19

Figura I.7. Tipos de células del epitelio intestinal y movimiento de migración de las mismas 23

Figura I.8. Distribución de *Thymus zygis* subsp. *gracilis* y *Thymbra capitata* en la Región de Murcia 52

Figura I.9. Vista general de las principales rutas de biosíntesis de metabolitos secundarios 56

Figura I.10. Estructura química de timol y carvacrol, y de sus precursores p-cimeno y γ -terpineno..... 57

Figura III.1. Plantación de *Thymus zygis*..... 72

Figura III.2. Rata Sprague Dawley 75

Figura III.3. Jaulas metabólicas utilizadas en el estudio..... 76

Figura III.4. Calibración y medida de la longitud de una vellosidad intestinal ... 80

Figura III.5. Medida de la profundidad de las criptas del intestino delgado 81

Figura III.6. Medida del grosor de la mucosa del intestino delgado 81

Figura III.7. Medida del grosor de la mucosa del intestino grueso.....	82
Figura III.8. Imagen microscópica de hígado de rata.....	83
Figura III.9. Imagen microscópica de riñón de rata.....	83
Figura III.10. Granja porcina “Las Nubes” para la explotación intensiva de lechones en fase de transición.....	86
Figura III.11. Cerdos utilizados en el ensayo.....	90
Figura III.12. Medida del pH de la carne a los 45 minutos <i>post mortem</i>	93
Figura III.13. Extractor tipo Soxhlet utilizado para el proceso de extracción de fenoles en carne	102
Figura III.14. Programa de elución de la fase móvil para el análisis de carvacrol y timol en carne y plasma de cerdo mediante HPLC.....	105
Figura IV.1. Consumo de alimento (a) y agua (b) de ratas recién destetadas, alimentadas con aceites esenciales de plantas aromático-medicinales	112
Figura IV.2. Incremento de peso (g) de ratas recién destetadas durante su alimentación con aceites esenciales de plantas aromático-medicinales	113
Figura IV.3. Índice de conversión de alimento de ratas alimentadas con aceites esenciales de PAM frente a un pienso base	114
Figura IV.4. Cantidad de heces excretadas por ratas recién destetadas durante la alimentación con aceites esenciales de plantas aromáticas.....	114
Figura IV.5. Longitud (μm) de las vellosidades del intestino delgado de ratas destetadas precozmente y alimentadas con aceites esenciales de plantas aromáticas	118
Figura IV.6. Profundidad (μm) de las criptas de Lieberkühn del intestino delgado de ratas destetadas precozmente y alimentadas con aceites esenciales de plantas aromáticas	121

Figura IV.7. Relación entre la altura de las vellosidades y la profundidad de las criptas intestinales	122
Figura IV.8. Grosor de la mucosa de las distintas secciones del intestino delgado y grueso de ratas destetadas precozmente y alimentadas con aceites esenciales de plantas aromático-medicinales	126
Figura IV.9. Consumo medio diario de pienso (g/día) de cerdos destetados a los 21 días y alimentados con aceites esenciales de plantas aromáticas	129
Figura IV.10. Ganancia media diaria de peso (g/día) de cerdos destetados precozmente y alimentados con aceites esenciales de plantas aromáticas	133
Figura IV.11. Índice de conversión (IC) de alimento de cerdos alimentados con ácidos orgánicos y aceites esenciales de PAM.....	135
Figura IV.12. Medida del pH a lo largo del tracto gastrointestinal de cerdos alimentados con aceites esenciales de plantas aromáticas	143
Figura IV.13. Cantidad de organismos mesófilos aerobios totales presentes en el contenido intestinal del yeyuno de cerdos alimentados con aceites esenciales	147
Figura IV.14. Cantidad de <i>Escherichia coli</i> presente en el contenido intestinal del yeyuno de cerdos alimentados con aceites esenciales	149
Figura IV.15. Cantidad de <i>Clostridium spp.</i> presente en el contenido intestinal del yeyuno de cerdos alimentados con aceites esenciales de plantas aromáticas	151
Figura IV.16. Cantidad de bacterias del género <i>Lactobacillus</i> presentes en el contenido intestinal del yeyuno de cerdos alimentados con aceites esenciales	154
Figura IV.17. Cantidad de enterobacterias presentes en el contenido intestinal del yeyuno de cerdos alimentados con aceites esenciales	157
Figura IV.18. Índice L:E en el yeyuno de cerdos alimentados con aceites esenciales.....	159

Figura IV.19. Cantidad de bacterias totales en el tracto gastrointestinal de cerdos analizadas mediante PCR en tiempo real.....	162
Figura IV.20. Cantidad de enterobacterias en el tracto gastrointestinal de cerdos analizadas mediante PCR en tiempo real	164
Figura IV.21. Comparación de los resultados obtenidos en la cuantificación de enterobacterias (ENT) en cerdos por métodos de recuento microbiológico tradicionales (log ufc/g) y por PCR en tiempo real (log copias gen/g)	166
Figura IV.22. Cantidad de carvacrol total y libre presente en el músculo semimembranoso y semitendinoso de cerdos alimentados con aceites esenciales de PAM	177
Figura IV.23. Cantidad de timol total y libre presente en el músculo semimembranoso y semitendinoso de cerdos alimentados con aceites esenciales de PAM	178
Figura IV.24. Cantidad de carvacrol y timol encontrada en forma libre en el músculo semimembranoso y semitendinoso de cerdos alimentados con aceites esenciales de PAM	179
Figura IV.25. pH de la carne de cerdo medida en el músculo <i>Longissimus dorsi</i> a los 45 minutos y las 24 horas <i>post mortem</i>	184
Figura IV.26. Valores medios de pérdida de agua por goteo en <i>Longissimus dorsi</i> , a lo largo del tiempo	188
Figura IV.27. Características del panel de consumidores.....	194
Figura IV.28. Hábitos deportivos del panel de consumidores	195
Figura IV.29. Importancia de diversos factores de compra.....	196
Figura IV.30. Frecuencia de consumo de carne fresca y tipo de carne consumida habitualmente	197

Figuras IV.31. Frecuencia de consumo de carne fresca de cerdo y partes más consumidas de forma habitual	199
Figuras IV.32. Frecuencia de consumo de derivados del cerdo y productos más consumidos habitualmente	200
Figura IV.33. Opinión de los consumidores sobre la carne de cerdo y sus derivados	202
Figura IV.34. Motivos expuestos por los consumidores sobre su opinión de la carne de cerdo y derivados	203
Figura IV.35. Opinión de los consumidores sobre aditivos naturales en alimentación porcina e intención de compra de estas carnes	204
Figura IV.36. Porcentaje de acierto de la prueba discriminatoria triangular.....	206

X. ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

µl	Microlitro
µm	Micrómetro
µM	Micromolar
a*	Coordenada a* (rojo-verde)
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
AE	Aceite/s esencial/es
AGCC	Ácidos grasos de cadena corta
ANOVA	Análisis de la varianza
APC	Antibióticos promotores del crecimiento
ARN	Ácido Ribonucleico
ARNr	Ácido ribonucleico ribosómico
AXOS	Arabinosilano-oligosacáridos
b*	Coordenada b* (amarillo-azul)
BEDCA	Base de Datos Española de Composición de Alimentos
BHT	Hidroxitolueno butilado
BLAST	Herramienta de búsqueda de alineamientos locales
BOE	Boletín Oficial del Estado
C	Grupo de animales alimentados con una dieta Control sin suplementar
C* _{ab}	Índice de saturación o Chroma
CARM	Comunidad Autónoma de la Región de Murcia
CC.AA.	Comunidad/es Autónoma/s
CCPR	Índice de producción de células de las criptas intestinales
C-DFK	Grupo de animales alimentados con una dieta Control suplementada con diformiato de potasio.
CE	Comisión Europea
CIE	Commision Internationale de L'Eclairage
CIFEA	Centro Integrado de Formación y Experiencias Agrarias de la Región de Murcia
cm	Centímetro
CMD	Consumo medio diario
COMT	Catecol-o-metiltransferasas
CRA	Capacidad de retención de agua
Ct	Ciclo umbral / threshold cycle
CV	Carvacrol

ABREVIATURAS

DEPC	Dietil pirocarbonato
DFD	Carne oscura, dura y seca
EFSA	Autoridad europea para la seguridad alimentaria
EMA	Agencia europea para la evaluación de productos medicinales
ENT	Enterobacterias
EO	Essential oils
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la alimentación y la agricultura
FAOSTAT	División de estadísticas de la FAO
FCR	Feed Conversion ratio
FD	Fibra dietética
Formi®	Mezcla comercial de diformiato de potasio
FOS	Fructo-oligosacáridos
g	gramo
GIT	Gastrointestinal tract
GMD	Ganancia de peso media diaria
h_{ab}	Ángulo de tono
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
IC	Índice de conversión de alimento
IMIDA	Instituto Murciano de Investigación y Desarrollo Agrario y Alimentario
IMO	Isomalto-oligosacáridos
ISO	Organización internacional de normalización
Kcal	Kilocalorías
L*	Luminosidad
L:E	Relación entre <i>Lactobacillus</i> y enterobacterias
LDC	Límite de cuantificación
LDD	Límite de detección
log P	Coeficiente de partición
M	Alimentación con una mezcla a partes iguales de aceite esencial de <i>Thymus zygis</i> subsp. <i>gracilis</i> y <i>Thymbra capitata</i>
MAGRAMA	Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente
Mb	Mioglobina
MbO ₂	Oximioglobina
MetMb	Metamioglobina
min	Minuto

ml	mililitro
mm	Milímetro
MOS	Manano-oligosacáridos
MRS	Agar Man Rogosa Sharpe
N.O.	Noroeste
Nd	No detectado
ng	Nanogramos
nm	Nanómetros
°C	Grado centígrado
OGM	Organismo Genéticamente Modificado
OMS	Organización Mundial de la Salud
p	Probabilidad
PAM	Plantas aromáticas y medicinales
PBS	Tampón fosfato salino
PCA	Agar para recuento en placa
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pH _{24h}	Medida de pH a las 24 horas del sacrificio
pH _{45m}	Medida de pH a los 45 minutos del sacrificio
pK _a	Constante de disociación ácida
PNA	Polisacáridos no amiláceos
ppb	Partes por billón
ppm	Partes por millón
PSE	Carne pálida, suave y exudativa
RFLP	Polimorfismos en la longitud de fragmentos de restricción
rpm	Revoluciones por minuto
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real
S. coop	Sociedad Cooperativa
SPS	Agar Sulfito Polimixina Sulfadiazina
STP	Sociedad de patología toxicológica
SULT	Sulfotransferasas
T	Grupo de animales alimentados con aceite esencial de <i>Thymbra capitata</i>
TGGE	Electroforesis en gel con gradiente de temperatura
TGI	Tracto gastrointestinal
TM	Timol

ABREVIATURAS

TOT	Bacterias totales
TR	Tiempo de retención
UE	Unión Europea
UFC	Unidades Formadoras de Colonias
UGTs	Glucuronosiltransferasas
UI	Unidades Internacionales
UNE	Norma Española
USDA	Departamento de Agricultura de los Estados Unidos
V/C	Relación entre la altura de la vellosidad y la profundidad de las criptas intestinales
XOS	Xilo-oligosacáridos
Z	Grupo de animales alimentados con aceite esencial de <i>Thymus zygis</i> subsp. <i>gracilis</i>

XI. ANEXOS

ANEXO 1- INFORME DE LA COMISIÓN ÉTICA DE INVESTIGACIÓN DE LA UNIVERSIDAD DE MURCIA

UNIVERSIDAD DE
MURCIA

Vicerrectorado de Investigación
e Internacionalización

cm
CAMPUS MARE NOSTRUM

COMISIÓN DE ÉTICA DE INVESTIGACIÓN

INFORME DE LA COMISIÓN DE ÉTICA DE INVESTIGACIÓN DE LA UNIVERSIDAD DE MURCIA

Jaime Peris Riera, Catedrático de Universidad y Secretario de la Comisión de Ética de Investigación de la Universidad de Murcia

CERTIFICA:

Que D^a. María Pilar De Haro González ha presentado el proyecto de investigación titulado *"Efecto de los aceites esenciales de plantas aromático-medicinales en la fase de transición de animales monogástricos"*, a la Comisión de Ética de Investigación de la Universidad de Murcia.

Que dicha Comisión analizó toda la documentación presentada, y de conformidad con lo acordado el día 11 de junio de 2013¹, por unanimidad se emite informe FAVORABLE desde el punto de vista ético de la investigación.

Y para que conste y tenga los efectos que correspondan, firmo esta certificación, con el visto bueno del Presidente de la Comisión, en Murcia 14 de junio de 2013.

Vº Bº
EL PRESIDENTE DE LA COMISIÓN
DE ÉTICA DE INVESTIGACIÓN
DE LA UNIVERSIDAD DE MURCIA


Fdo.: Gaspar Ros Berruezo



¹ A los efectos de lo establecido en el art. 27.5 de la Ley 30/1992 de 26 de noviembre de Régimen Jurídico de las Administraciones Públicas y del P.A.C. (B.O.E. 27-11), se advierte que el acta de la sesión citada está pendiente de aprobación

ANEXO 2- CUESTIONARIO PREVIO A LA REALIZACIÓN DE LA CATA DE HAMBURGUESAS DE CERDO.

GRUPO DE INVESTIGACIÓN DE PLANTAS AROMÁTICO-MEDICINALES Y EXTRACTOS VEGETALES. IMIDA

La encuesta que tiene ante usted es anónima. Rogamos la cumplimente y evite el intercambio de opiniones. Muchas gracias por su colaboración.

1. Datos generales:

Sexo: Mujer Hombre

Edad: ≤ 30 > 30 ≤ 45 > 45 ≤ 60

Fumador: Si No

Estudios:

Primaria Secundaria Formación profesional/Bachillerato Universidad

Número de personas que viven en su hogar (incluido/a usted): ___ personas

Número de niños en su hogar por edades:

___ Niños de 0 a 3 años

___ Niños de 4 a 10 años

___ Niños de 11 a 18 años

No hay niños en mi hogar.

• Puntúe la **actividad física** que realiza y con qué frecuencia considerando:

0: nunca, **1:** 1 vez por semana, **2:** 2 veces por semana, **3:** 3 veces por semana **4:** 4 o más veces por semana.

Ninguna

Actividad física baja (caminar lento, subir escaleras):

Actividad física media (correr 20 min, bicicleta, caminar rápido, yoga, Pilates, etc):

Actividad física alta (correr 1 hora, spinning, aerobico, nadar, etc):

• ¿Qué **tipo de alimentación** realiza habitualmente?

Dieta mediterránea

Dieta restringida por el médico

Dieta de adelgazamiento

Ningún tipo de dieta

Otras _____

- **Puntúe de 0 a 5** qué importancia tienen los siguientes **factores en el momento de la compra** (0 nada importante y 5 muy importante).

___ aspecto ___ precio ___ origen ___ frescura ___ beneficios para la salud

2.- Hábitos de consumo:

- ¿Con qué frecuencia come usted **carne**?

Todos los días Varias veces a la semana Una vez a la semana
 Mensualmente Nunca

- **Puntúe de 0 a 5** los **tipos de carne que consume habitualmente** (0 no consumo y 5 más de 3 veces por semana).

___ Ternera ___ Cerdo ___ Buey ___ Cordero ___ Cabrito
___ Pollo ___ Pavo ___ Conejo ___ Pato

- ¿Con qué frecuencia come usted **carne de cerdo**?

Todos los días Varias veces a la semana Una vez a la semana
 Mensualmente Nunca

- **Puntúe de 0 a 5** las **partes del cerdo que consume habitualmente** (0 no consumo y 5 más de 3 veces por semana).

___ Chuletas ___ Lomo ___ Solomillo ___ Panceta ___ Paletilla ___ Jamón
___ Magra ___ Carrillera ___ Costillar ___ Manos ___ Codillo

- **Puntúe de 0 a 5** los **derivados del cerdo que consume habitualmente** (0 no consumo y 5 más de 3 veces por semana).

___ Chóped ___ Chorizo ___ Jamón serrano ___ Jamón cocido ___ Lacón
___ Lomo embuchado ___ Longaniza ___ Morcilla ___ Mortadela ___ Panceta
___ Paté ___ Salami ___ Salchicha ___ Salchichón ___ Sobrasada ___ Tocino

- ¿Con qué frecuencia come usted **derivados del cerdo**?

Todos los días Varias veces a la semana Una vez a la semana
 Mensualmente Nunca

- ¿Qué opinión tiene sobre la carne de cerdo y sus derivados?

Buena Ni buena ni mala Mala NS/NC

¿Por qué?.....

- ¿Considera usted que un animal alimentado de forma más natural (sin aditivos sintéticos ni antibióticos) puede aportar beneficios a su salud? Si No NS/NC

- ¿Estaría usted dispuesto a pagar más por esta carne? Si No NS/NC

ANEXO 3- FICHA DE PRUEBA DISCRIMINATORIA TRIANGULAR Y PRUEBA DE PREFERENCIA DE HAMBURGUESAS DE CERDO.

Fecha:.....

HOJA DE DEGUSTACIÓN DE LAS HAMBURGUESAS DE CERDO

Ante usted va a tener dos series de tres muestras de hamburguesas de cerdo cada una, dos de ellas son idénticas entre sí.

Por favor, beba un poco de agua antes de empezar.

1ª Serie:

<p>1.-Escriba los tres códigos</p> <p>Muestra nº:_____ Muestra nº:_____ Muestra nº: _____</p> <p>2.-Rodee con un círculo el código de la muestra diferente atendiendo exclusivamente al olor y sabor.</p> <p>3.-La muestra que prefiere es el número:</p> <p>Comentarios:</p>

2ª Serie:

<p>1.-Escriba los tres códigos</p> <p>Muestra nº:_____ Muestra nº:_____ Muestra nº: _____</p> <p>2.-Rodee con un círculo el código de la muestra diferente atendiendo exclusivamente al olor y sabor.</p> <p>3.-La muestra que prefiere es el número:</p> <p>Comentarios:</p>

MUCHAS GRACIAS

ANEXO 4- TABLAS DE COMPOSICIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVO.

Agar para recuento en placa (PCA) (OXOID) pH $7 \pm 0,2$

Componente	Cantidad (g/l)
Triptona	5,0
Extracto de levadura	2,5
Dextrosa	1,0
Agar	9,0

Agar MacConkey (OXOID) pH $7,4 \pm 0,2$

Componente	Cantidad (g/l)
Lactosa	10,0
Peptona de caseína	20,0
Sales biliares	1,5
Cloruro sódico	5,0
Rojo neutro	0,05
Cristal violeta	0,001
Agar	15,0

Agar cromogénico ID-F (BioMerieux) pH $7,2 \pm 0,2$

Componente	Cantidad (g/l)
Gelatina de peptona	7,0
Extracto de levadura	3,0
Cloruro sódico	5,0
Sales biliares	1,5
Mezcla de activadores	0,3
Mezcla de sustratos cromogénicos	0,3
Agar	15,0

Agar SPS (Merck) pH $7,0 \pm 0,2$

Componente	Cantidad (g/l)
Peptona de caseína	15,0
Extracto de levadura	10,0
Sulfito sódico	0,5
Citrato férrico	0,5
Sulfato de polimixina B	0,01
Sulfadiazina sódica	0,12
Agar	13,9

Agar MRS (Merck) pH 5,7 ± 0,2

Componente	Cantidad (g/l)
Peptona de caseína	10,0
Extracto de carne	10,0
Extracto de levadura	4,0
Glucosa	20,0
Dipotasio hidrogenofosfato	2,0
Tween® 80	1,0
Hidrogenocitrato diamónico	2,0
Acetato sódico	5,0
Sulfato magnésico	0,2
Sulfato manganésico	0,04
Agar	14,0

