

UNIVERSIDAD PRIVADA ANTENOR ORREGO

FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS

**ESCUELA PROFESIONAL DE MEDICINA VETERINARIA Y
ZOOTECNIA**



**Efecto de la adición de extractos de cítricos, como
promotor de crecimiento, sobre la integridad intestinal en
gallinas ponedoras de la línea Hy Line Brown de 50
semanas de edad**

TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE:

MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

OSCAR ANIBAL CONTRERAS VASQUEZ

TRUJILLO, PERÚ

2021

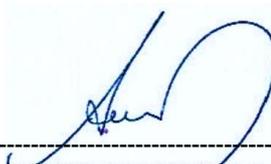
La presente tesis ha sido revisada y aprobada por el siguiente Jurado:



Ing. Dr. Wilson Lino Castillo Soto
PRESIDENTE



MV. Mg. Luis Abraham Ortiz Tenorio
SECRETARIO



MVZ. Angélica María Huamán Dávila
VOCAL



Ing. Mg. César Eduardo Honorio Javes
ASESOR

DEDICATORIA

A Dios, por guiarme por el buen camino.

A mis padres, Cristóbal y María por haberme forjado como persona y ser un ejemplo de superación en la vida.

A mis hijas, Ingrid y Kristel que son el motor y motivo de mi vida.

A mi esposa, Blanca por ser mi compañera de toda la vida.

AGRADECIMIENTO

A mi Asesor, Ing. César Eduardo Honorio Javes, por ser un gran amigo y principal colaborador durante todo este proceso, que con su dirección, conocimiento, enseñanza y colaboración permitió el desarrollo de este trabajo.

A Ing. Jaime Pascual, por el apoyo incondicional en desarrollo final del trabajo de investigación.

A mi jurado, por el interés, motivación, apoyo y crítica, necesarios para la realización de este trabajo. Un especial agradecimiento por este privilegio.

A mis amigos y familiares que siempre con una palabra de aliento están en presentes para seguir alcanzando mis metas.

ÍNDICE GENERAL

| | Pág. |
|---|--------------------------------------|
| CARATULA..... | i |
| APROBACIÓN POR EL JURADO DE TESIS ... | ¡Error! Marcador no definido. |
| DEDICATORIA..... | iii |
| AGRADECIMIENTO | iv |
| ÍNDICE GENERAL..... | iv |
| ÍNDICE DE CUADROS..... | vii |
| RESUMEN | x |
| ABSTRACT | 11 |
| I. INTRODUCCIÓN..... | 12 |
| II. REVISIÓN DE BIBLIOGRAFÍA..... | 3 |
| 2.1. Situación actual de la producción avícola | 3 |
| 2.2. Fisiología digestiva de las aves | 3 |
| 2.3. Tracto Gastrointestinal (TGI)..... | 4 |
| 2.4. Integridad Intestinal..... | 5 |
| 2.5. Los antibióticos promotores de crecimiento (APC)..... | 7 |
| 2.6. Mecanismo de acción y efectos de los APC | 8 |
| 2.7. Consecuencias de la prohibición de los APC | 9 |
| 2.8. Prebióticos y pectooligosacáridos (POS) | 10 |
| 2.9. Los extractos cítricos (EC) y aceites esenciales (AEs) como alternativa a los APC | 11 |
| 2.10. Mecanismo de acción de los AEs frente a los microorganismos..... | 12 |
| 2.11. Actividad antimicrobiana de los AEs In vivo | 13 |
| III. MATERIALES Y METODOS | 14 |
| 3.1. Lugar de investigación | 14 |
| 3.2. Animales de estudio..... | 14 |
| 3.3. Instalaciones y equipos..... | 14 |
| 3.4. Alimentación | 14 |
| 3.5. Variable independiente | 15 |

| | | |
|--------------|---|-----------|
| 3.6. | Tratamientos | 15 |
| 3.7. | Variables evaluadas..... | 16 |
| 3.8. | Procedimiento para evaluar la Integridad Intestinal. | 16 |
| 3.9. | Análisis estadístico | 18 |
| IV. | RESULTADOS | 19 |
| V. | DISCUSIÓN | 22 |
| VI. | CONCLUSIONES | 25 |
| VII. | RECOMENDACIONES | 26 |
| VIII. | BIBLIOGRAFIA | 27 |
| IX. | ANEXOS | 35 |

ÍNDICE DE CUADROS

| | Pág. |
|---|-----------|
| Cuadro 1. Antibióticos promotores de crecimiento utilizados en avicultura..... | 8 |
| Cuadro 2. Efectos de los prebióticos en avicultura.. | 11 |
| Cuadro 3. Clasificación de la capacidad antimicrobiana in vitro de algunos componentes del aceite esencial presentes en extractos cítricos..... | 13 |
| Cuadro 4. Efecto de AEs en avicultura..... | 13 |
| Cuadro 5. Composición porcentual y nutricional de las dietas de postura 2 para línea Hy line Brown de 50 semanas de edad, Según los tratamientos..... | 15 |
| Cuadro 6. Promedios de altura de vellosidades, Profundidad de cripta y relación Vellosidad/Cripta en gallinas ponedoras de 56 semanas de edad | 19 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | Pág. |
|---|-----------|
| Figura 1. Altura de vellosidades y profundidad de cripta de Yeyuno 25 % en gallinas ponedoras de 56 semanas de edad..... | 20 |
| Figura 2. Altura de vellosidades y profundidad de cripta de yeyuno 50 % en gallinas ponedoras de 56 semanas de edad..... | 20 |
| Figura 3. Relación entre altura de vellosidades y profundidad de cripta de Yeyuno 25% y Yeyuno 50% en gallinas ponedoras de 56 semanas de edad..... | ¡Error! |
| Marcador no definido. | 21 |

ÍNDICE DE ANEXOS

| | |
|--|----|
| Anexo 1. Procesos para hacer la instalación para la crianza de las gallinas ponedoras de 50 semanas de edad..... | 37 |
| Error! Marcador no definido. | |
| Anexo 2. Distribución de las gallinas ponedoras, por cada tratamiento..... | 37 |
| Anexo 3. Proceso de cortes del intestino delgado (Yeyuno 25 y 50%)..... | 38 |
| Anexo 4. Intervalos de medida de altura de vellosidades y profundidad de cripta, en el tratamiento con dieta base en gallinas ponedoras a las 56 semanas de edad. Al 25% del Yeyuno..... | 38 |
| Anexo 5. Intervalos de medida de altura de vellosidades y profundidad de cripta, en el tratamiento con dieta base más ácido cítrico en gallinas ponedoras a las 56 semanas de edad. Al 25% del Yeyuno..... | 39 |
| Anexo 6. Intervalos de medida de altura de vellosidades y profundidad de cripta, en el tratamiento con dieta base en gallinas ponedoras a las 56 semanas de edad. Al 50% del Yeyuno..... | 39 |

RESUMEN

El objetivo de esta tesis fue evaluar el efecto de los extractos de cítricos en sobre la integridad intestinal. Se utilizaron 448 en gallinas ponedoras de la línea Hy-line Brown de 50 semanas de edad. Las cuales fueron distribuidos a través de un diseño completamente al azar con dos tratamientos y ocho repeticiones: dieta base (DB) y dieta base más extracto cítricos (DBEC) siendo la unidad experimental de 28 gallinas ponedoras (cuatro jaulas de siete aves). Las dietas fueron formuladas para satisfacer los requerimientos nutricionales de gallinas ponedoras de la línea Hy-line Brown en postura comercial fase dos, las cuales tuvieron el mismo aporte nutricional y energético. Los resultados fueron analizados mediante el análisis de varianza (ANOVA) y los promedios comparados con la prueba de Tukey. Los resultados de la integridad intestinal, altura de vellosidades, profundidad de cripta y relación vellosidad/cripta en la porción Yeyuno en la porción de 25% e íleon 50% en gallinas ponedoras de 56 semanas de edad; tuvieron diferencia significativa ($P > 0.05$), a favor de la dieta que uso extractos cítricos (DBEC), teniendo valores de 890.70 y 277.15 μm . y relación V/C de 3.21 para la porción del Yeyuno 25% y 773.16 y 173.45 μm . y la relación V/C de 4.46, para la porción de íleon 50%. Por lo tanto se concluye que el uso de extractos cítricos en dietas las dietas de gallinas ponedoras mejora la integridad intestinal.

ABSTRACT

The objective of this thesis was to evaluate the effect of citrus extracts on intestinal integrity, 448 were used in laying hens of 50 weeks old of the Hy line brown. The chickens were distributed through completely randomized designed with two treatments and eight repetitions: Base diet (DB) and base diet (DBEC) being the experimental unit of 28 laying hens' four cages of seven birds. The diets formulated to meet the nutritional requirements of hens of the Hyline Brown line in phase two commercial stance, having the same nutritional and energy value. The results were analyzed through the analysis of variance (ANOVA) and average compared with the turkey's test. The results on intestinal integrity, between the measure of villus height crypt dept and villus crypt ratio in the jejunal portion in the 25 and 50% portion in laying hens 56 weeks of age; it had a significant different ($P > 0.05$), in favor of the diet that used citrus extracts (DBEC), having values of 890.70 and 277.15um, and a V/C ratio of 3.21 for the portion of the jejunum at 25% and 173.45um and V/C ratio of 4.46, for 50% jejunal portion, therefore it is concluded that the use of citrus extracts in diets of laying hens improves intestinal integrity

I.INTRODUCCIÓN

En la actualidad, la producción avícola está teniendo un gran crecimiento en nuestro país; siendo así que, en el año 2019 la producción de aves incrementó un 4.5% y huevos en un 8.0% a nivel nacional comparado con el año anterior (MINAGRI, 2019). Dicho aumento se debe a un alto consumo de huevos de la población peruana, a tal punto que consumo per cápita de huevo anual se elevó de 224 en el año 2018 a 239 huevos en el 2019 (MINAGRI, 2019). Además, para aumentar la producción, en avicultura se utilizan antibióticos como promotores de crecimiento (Apata, 2009).

Sin embargo, la utilización de antibióticos como promotores de crecimiento (APC) ha sido cuestionada por la comunidad científica, puesto que su empleo ha tenido graves consecuencias como la resistencia microbiana (Zwe y otros, 2018; Assafi y otros, 2020). Por esta razón, la Comunidad Europea prohibió el uso de APC en animales de abasto generando (ESVAC, 2017) con ello la búsqueda de sustitutos de estos antibióticos y de este modo mantener una alta productividad a bajo costo, ofreciendo producto de buena calidad.

Por tal motivo, se ha estudiado a los nutraceuticos como: prebióticos, probióticos, simbióticos, extractos de plantas, aceites esenciales (AEs) y ácidos orgánicos; para mejorar la salud de los animales, reducir las bacterias patógenas y modular la respuesta inmunitaria (Sugiharto, 2016). Sin embargo, los extractos de plantas, los aceites esenciales (AEs) y las especias llevan mayor tiempo siendo empleados en medicina humana que en animales (Kamel, 2000).

Como alternativa se plantea el uso de extractos de cítricos puesto que actúan como promotor de crecimiento natural, controlando a

los microorganismos patógenos manteniendo el equilibrio de la microbiota (Steiner, 2006).

El presente trabajo se justifica, puesto no existen trabajos sobre extractos cítricos ni POS en gallinas de postura en Perú, teniendo como objetivo evaluar el efecto de los extractos cítricos sobre la integridad intestinal en gallinas ponedoras de la línea Hy-line Brown de 50 semanas de edad.

II. REVISIÓN DE BIBLIOGRAFÍA

2.1. Situación actual de la producción avícola

La avicultura ha tenido un crecimiento constante en los últimos años, incluso con los altos costos de alimentación. No obstante, esta situación se compensa con el costo de producción de huevos, que es uno de los principales productos pecuarios del país. La producción nacional de huevos del año 2018 fue de 452 234 toneladas y en el año 2019 se alcanzó las 488 484 toneladas, lo que significó un incremento del 8.0%. Del mismo modo, el consumo per cápita nacional de huevo en el año 2018 fue de 224 unidades y en el año 2019 alcanzó las 239 unidades, lo que significó un incremento del 6.7% (MINAGRI, 2019).

La restricción del uso de APC genera la necesidad creciente de manejar la microbiota intestinal y el sistema inmune mediante la utilización de nutraceuticos en lugar de fármacos. Además, el cumplimiento riguroso de las medidas de sanidad y bioseguridad de las granjas se volverá más importante. Por lo cual hoy en día, existe una gran variedad de productos comerciales a base de nutraceutico tales como: los acidos orgánicos, prebióticos, probióticos, simbioticos, aceites esenciales, enzimas, nucleótidos y extractos citricos (Sugiharto, 2016).

2.2. Fisiología digestiva de las aves

Las necesidades alimentarias de las aves estan limitadas por su anatomía y capacidad del sistema digestivo. Esto determina, el tipo de alimento que debe suministrarse a las aves para cubrir sus requerimientos nutricionales, donde se prioriza los de mantenimiento, luego las relacionadas con la producción de huevos. Además, la capacidad que posee el ave para aprovechar los nutrientes presentes en la dieta es

dependiente de la salud e integridad gastrointestinal; del mismo modo, para una adecuada nutrición, es necesario complementar la dieta con macrominerales, micro minerales y vitaminas; dada su importancia para el óptimo aprovechamiento de otros nutrientes (Hill y otros, 2006). Según Macari y otros (1994), las aves tiene un aparato digestivo relativamente corto respecto al de los mamíferos, principalmente en el tramo intestinal, lo que se traduce en menor tiempo de interacción enzima-sustrato y menor eficiencia en la absorción de nutrientes. El tránsito intestinal tarda alrededor de dos horas y media. Sin embargo, esto varía por el tipo y cantidad de alimento, y el estado fisiológico del ave; de este modo, el tránsito en los polluelos bordea las 4 horas y en las gallinas de postura es de 8 horas.

2.3. Tracto Gastrointestinal (TGI)

Es un tubo cubierto por células epiteliales que realizan funciones específicas como el molimiento físico del alimento, secreción, digestión, absorción, transporte de nutrientes y funciones inmunológicas. La mucosa intestinal tiene pliegues microscópicos llamados vellosidades intestinales, las cuales tienen microvellosidades (Rodríguez, 2005). La microbiota del TGI interviene en: mecanismos de defensa del TGI; procesos metabólicos; desarrollo y formación del intestino (diámetro y longitud); en el aspecto nutricional, interviene en aprovechamiento de energía y nitrógeno, la absorción de vitaminas y minerales, ácidos grasos y glucosa.

Según Milian (2005), citado por Aguavil (2012), la microbiota intestinal está constituida mayormente por bacterias ácido lácticas y es importante para degradar los nutrientes no digeridos previamente, favoreciendo el mantenimiento de la integridad intestinal. Esta microbiota varía a lo largo del TGI en función del pH y la viscosidad, que se presentan en cada tramo de los intestinos.

La exclusión competitiva se fundamenta en favorecer la colonización intestinal por bacterias benéficas que imposibiliten la adhesión de bacterias patógenas y/o sobrepasen numericamente a la microbiota potencialmente patógena. Las bacterias del tipo cocoide, como *Enterococcus* son las primeras en colonizar el intestino y son sucedidas por las del tipo bacilo como *Lactobacillus spp*, *Bacteroides spp* y *Escherichia coli* estas bacterias colonizadoras generan una capa que impide la colonización por otras bacterias. Además, los ciegos de las aves se encuentran poblados por *Escherichia coli*, *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Clostridium*, *Staphylococcus* y *Streptococcus* (Vargas, 2007).

Sansalone (2008), citado por Aguavil (2012), reportó la presencia de por lo menos 400 especies bacterianas en el TGI y sólo se conocen el 15% de ellas. Además, debe existir permanentemente un equilibrio entre la microbiota, la integridad intestinal y la dieta de los animales. La disrupción de este equilibrio, puede conllevar a la aparición de lesiones o enfermedad.

2.4. Integridad Intestinal

Hoerr (2009), concluyó que la integridad intestinal es el funcionamiento óptimo del TGI que maximiza los parámetros productivos de los animales. Por lo cual, la integridad intestinal es fundamental para tener una producción rentable. Según Duchatel (2005), citado por Aguavil (2012), en condiciones normales, la microbiota intestinal se encuentra en equilibrio (eubiosis) y permanece constante durante toda la vida. Sin embargo, esta eubiosis puede ser alterada por distintos factores como: el estrés calórico, intoxicaciones, micotoxinas, desequilibrios nutricionales, despique, vacunaciones, antibióticos y sustancias que modifican el pH intestinal normal. Por lo tanto, los factores que perturban la eubiosis de la

microbiota intestinal, afectan la salud del animal. En las bases de las vellosidades intestinales se ubican unas las Criptas de Lieberkühn, cuyas células epiteliales son cilíndricas simples; se encuentran también células caliciformes, enterocromafines y de Paneth. Las células de Paneth sólo se ubican en la base de las criptas del intestino delgado, tienen forma piramidal y presentan características de células secretoras de proteínas. Estas células secretan lisozima, enzima que degrada la pared bacteriana, de esta forma regula la microbiota intestinal. La lámina propia, posee vasos sanguíneos y linfáticos que moviliza los nutrientes absorbidos para su posterior distribución en el cuerpo. Finalmente, la capa muscular es la responsable del peristaltismo y presenta dos capas: la musculatura circular interna y la longitudinal externa, presentes en todo del tubo digestivo y son moduladas por los plexos nerviosos de Meissner y Auerbach (Uni y otros, 2000).

Dado que existe un constante desprendimiento celular en el ápice de las vellosidades intestinales, la lámina epitelial se encuentra en constante renovación. Las células madre originan, mediante mitosis, a los demás tipos celulares. Esta división mitótica se realiza en el fondo de las criptas y a medida que ascienden por la vellosidad, pasan por un estadio intermedio antes de madurar. No obstante, la maduración de las células de Paneth ocurre en sentido contrario, se desplaza hacia segmentos más profundo. El reemplazo de los enterocitos y células caliciformes se realiza cada 4 y 7 días; sin embargo, las células de Paneth son reemplazadas cada 2 y 4 semanas (Ganz, 2000).

Los enterocitos y sus microvellosidades inician la producción de carbohidrasas y peptidasas al completar su diferenciación estructural, que se lleva a cabo en el periodo de desplazamiento de las células por el primer tercio de la vellosidad, la absorción de azúcares y aminoácidos, inicia cuando el desplazamiento del enterocito pasa la primera mitad de la

vellosidad y sigue aumentando hasta ser descamados (Uni y otros, 2000).

2.5. Los antibióticos promotores de crecimiento (APC)

Los antibióticos empleados en la avicultura se clasifican en tres grupos: terapéuticos (para tratar infecciones de origen bacteriano), profilácticos (para prevenir enfermedades) y promotores del crecimiento (para mejorar la tasa de crecimiento) (Di Corcia y Nazzari, 2002; Apata, 2009).

Los APC son usados para destruir o inhibir bacterias y son administrados en dosis subterapéuticas. Estos compuestos mejoran los parámetros productivos tales como: la conversión alimenticia, la ganancia de peso y reducen la morbilidad y mortalidad debido a enfermedades infecciosas. Estudios revelaron que los APC pueden mejorar el crecimiento entre 4 y el 8% y la eficiencia alimenticia entre un 2 y 5% (Allen y Stanton, 2014). La oxitetraciclina, la bacitracina, la clortetraciclina, la tilosina, la neomicina, la avoparcina y la virginiamicina son algunos de los antimicrobianos que se emplean como profilácticos y promotores del crecimiento en dosis inferiores a las usadas con como terapéuticos (Apata, 2009).

Sin embargo, el uso indiscriminado de los APC ha generado el surgimiento de la resistencia bacteriana a los antimicrobianos reportada en las aves (Zwe y otros, 2018), productos alimenticios de origen avícola (Parry-Hanson y otros, 2020) y en humanos (Assafi y otros, 2020). Del mismo modo, se ha demostrado que las aguas residuales de los centros de producción avícola transfieren dichos genes de resistencia al medio ambiente, llegándose a encontrar en aguas superficiales y subterráneas (Manzetti y Ghisi, 2014; Hubbard y otros, 2020), cuencas hidrográficas (Marti y otros, 2014; Amato y otros, 2020) y agua potable (Manzetti y Ghisi, 2014).

2.6. Mecanismo de acción y efectos de los APC

Todos los antibióticos pueden controlar el crecimiento y proliferación bacteriana; no obstante, difieren en el mecanismo de control. Además, el efecto sobre la microbiota intestinal varía según el tipo de antibiótico (Cuadro 1).

Cuadro 1. Antibióticos promotores de crecimiento utilizados en avicultura.

| Antimicrobiano | Función ^b |
|--|---|
| Bacitracina (BMD, Zn) ^a | Mejorar conversión alimenticia Incrementar producción de huevos Prevención y control de enteritis Tratamiento de aerosaculitis |
| Clortetraciclina ^c | Mejorar conversión alimenticia Control de sinovitis infecciosa (<i>Mycoplasma</i>) Control de aerosaculitis (<i>E. coli</i>) Reducción de mortalidad por <i>E. coli</i> Reducción de mortalidad por <i>Salmonella Typhimurium</i> |
| Bambermycina | Mejorar conversión alimenticia |
| Lincomicina | Mejorar conversión alimenticia |
| Neomicina/oxytetraciclina ^d | Mejorar conversión alimenticia Control de sinovitis infecciosa (<i>Mycoplasma</i>), cólera aviar (<i>Pasteurella multocida</i>), aerosaculitis (<i>E. coli</i>) Control de <i>Hexamita meleagridis</i> |
| Penicilina | Mejorar conversión alimenticia |
| Tylosina | Mejorar conversión alimenticia |
| Virginiamicina | Mejorar conversión alimenticia Prevenir enteritis necrótica (<i>C. perfringens</i>) |

^aAbreviaturas: BMD: Bacitracina Metileno Disalicilato, Zn: Zinc bacitracina.

^bEl uso aprobado de los medicamentos depende de la especie animal, el peso vivo, la edad, la combinación con otros medicamentos, la aplicación y las restricciones (tiempos de espera antes del envío al mercado).

^cNo aprobado para su uso en la producción de huevos de aves de corral; la oxitetraciclina está aprobada para aplicaciones similares, pero en menos aplicaciones que la clortetraciclina.

^dLa mayoría de los antimicrobianos de la tabla están aprobados para su uso en combinaciones de dos o tres antimicrobianos con diferentes espectros de actividad y para diferentes aplicaciones.

Fuente: adaptado de Allen y Stanton (2014).

Entre otros efectos de los APC tenemos: La reducción de procesos inflamatorios que aumentan los requerimientos de mantenimiento, reducción de metabolitos microbianos que reducen el crecimiento (NH₃ y ácido láctico), disminuyen la competencia por nutrientes con la microbiota potencialmente patógena, favorecen la absorción y utilización de los nutrientes, mejoran la digestibilidad de nutrientes y, por lo tanto, reducen el impacto medio ambiental (Bedford, 2000).

2.7. Consecuencias de la prohibición de los APC

Se espera la disminución de la resistencia antimicrobiana que se transmite de los productos de animal a los humanos por medio de genes de resistencia presentes en las bacterias (Zwe y otros; 2018; Assafi y otros, 2020; Parry-Hanson y otros, 2020). No obstante, surgieron unos efectos indeseados en la industria avícola. En Suecia, durante los 2 a 3 años posteriores al retiro de los APC, aumentaron los problemas entéricos, principalmente enteritis necrótica (EN) por *Clostridium* y se triplicó la cantidad de hígados decomisados en los mataderos. Dada esta situación, se necesitó volver a utilizar virginiamicina como terapéutico, pero con el doble de su dosis (20 ppm). Del mismo modo, se implementaron distintas estrategias nutricionales como: reducción proteína cruda (proteína no digerida sirve de sustrato para *Clostridium*), aumento de aminoácidos sintéticos, dietas con mayor fibra, uso de enzimas y coccidiostatos ionóforos (Roldán, 2010).

Según la OMS (2003), citado por Cepero (2006), un estudio realizado en Dinamarca, reveló que la conversión alimenticia aumentó en un 2.3%, no obstante, se consideró que era compensado con la reducción de costos en antibióticos al no incluir APC. Del mismo modo, recalcó que los efectos de los APC dependen de diferentes factores como: manejo,

sanidad, genética, alojamiento y dieta.

Además, se observó una reducción significativa en la eliminación de nitrógeno y fósforo de las heces, lo cual reduce el impacto medioambiental. Por lo tanto, se concluyó que es posible prescindir de los APC en condiciones similares a las de Dinamarca.

2.8. Prebióticos y pectooligosacáridos (POS)

Los prebióticos son digeribles sólo por los probióticos, que benefician al hospedador al modular selectivamente la composición y el metabolismo de microbiota intestinal (Das y otros, 2012). Los prebióticos se clasifican en: Mananooligosacáridos (MOS), Fructooligosacáridos (FOS), Galactooligosacáridos (GOS), Isomaltooligosacárido (IMO) y pectooligosacáridos (POS) (Sugiharto, 2016; Zhao y otros, 2019).

Los POS o también llamados oligosacáridos pécticos, son prebióticos emergentes que derivan de polisacáridos presentes en la pared celular vegetal (Chen y otros, 2017; Zhao y otros, 2019). Algunos estudios demostraron que la suplementación dietética con POS de espino puede regular el metabolismo de los lípidos y la capacidad antioxidante en ratones (Li y otros, 2010; Li y otros, 2013), y la POS de remolacha azucarera puede mejorar la microflora intestinal de humanos y cerdos *in vitro* (Leijdekkers y otros, 2014).

Por otro lado, estudios en animales de abasto demostraron que la suplementación con oligosacárido péctico de manzana (APOS) en la dieta mejora el rendimiento del crecimiento, la capacidad antioxidante, la composición de la microbiota y la morfología de la mucosa yeyunal en lechones (Chen y otros, 2017). Asimismo, la suplementación dietética de APOS alivió los efectos de la exposición al rotavirus sobre la diarrea, la

salud intestinal y la capacidad antioxidante, el estrés del retículo endoplásmico, la autofagia y la apoptosis de la mucosa yeyunal en lechones (Mao y otros, 2017). Del mismo modo, en un estudio realizado en gallinas reproductoras, el uso de APOS aumentó el peso del huevo ($p \leq 0.01$), la altura de la albúmina y las unidades Haugh ($p < 0.05$); sin embargo, no mostró influencia en las vellosidades intestinales (Zhao y otros, 2019) (cuadro 2).

Cuadro 2. Efectos de los prebióticos en avicultura.

| Tipo ^a | Actividad | Referencia |
|-------------------|--|------------------------|
| FOS o MOS | Reduce la población de <i>C. perfringens</i> y <i>E. coli</i> en el tracto gastrointestinal. | Kim y otros (2011) |
| GOS | Aumenta <i>Bifidobacterium spp.</i> en heces. | Baffoni y otros (2012) |
| IMO | Aumenta poblaciones cecales de lactobacilos y bifidobacterias, y disminuye <i>E. coli</i> . | Mookiah y otros (2014) |
| POS | Aumenta altura de albúmina, aumenta unidades Haugh y disminuye profundidad de cripta en duodeno. | Zhao y otros (2019) |

^aMOS: Mananoligosacáridos, FOS: Fructooligosacáridos, GOS: Galactooligosacáridos IMO: Isomaltooligosacárido.

2.9. Los extractos cítricos (EC) como alternativa a los APC

Se conocen 6350 especies que poseen actividad antibacterial, no obstante la mayoría fueron estudios *in vitro* (Mahady, 2005). Los EC poseen una gran diversidad de componentes que han demostrado eficacia al combatir *E. coli*, *S. Typhimurium* y *C. perfringes* (Franz y otros, 2010; Hippenstiel y otros, 2011; Bassolé y Juliani, 2012). Es tanta la cantidad de componentes activos que resulta complicado atribuir dichos efectos a un único ingrediente (Steiner, 2006), por ello son considerados como alternativas naturales a los promotores de crecimiento, con menor toxicidad y libres de residuos comparados con los antibióticos (Gong y

otros, 2014). y son mezclas complejas de compuestos producidos por organismos vivos y aislados por medios físicos únicamente (prensado) de una planta completa o parte de una planta de origen taxonómico conocido, por lo que son considerados como fitobióticos (Sugiharto, 2016; Zhai y otros, 2018). Además, son considerados como promotores del crecimiento en las dietas avícolas (Zhang y otros, 2014).

2.10. Mecanismo de acción de los extractos cítricos (EC) frente a los microorganismos

La actividad antimicrobiana de los EC se ha explorado en muchos estudios *in vitro*. Trabajos realizados demostraron que el timol, el eugenol y el carvacrol tienen una alta capacidad antimicrobiana contra bacterias patógenas como *E. coli* y *S. Typhimurium* (Franz y otros, 2010; Hippenstiel y otros, 2011; Bassolé y Juliani, 2012). Además, el timol, eugenol y carvacrol poseen estructuras similares y se ha demostrado que ejercen efectos antimicrobianos sinérgicos al combinarse en menores dosis (Bassolé y Juliani, 2012).

Un mecanismo antibacteriano conocido está relacionado con su hidrofobicidad y componentes como terpenoides, fenólicos, quelación de metales por fenol y flavonoide, que rompen la membrana celular y alteran la permeabilidad de las membranas celulares y la homeostasis celular con la consecuencia de la pérdida de componentes celulares, el influjo de otras sustancias o incluso la muerte celular (Windisch y otros, 2008; Brenes y Roura, 2010; Solórzano-Santos y Miranda-Navales, 2012; O'Bryan y otros, 2015; Widodo, 2020). Además, las bacterias Gram negativas son más tolerantes a las acciones del aceite esencial que las bacterias Gram positivas debido a sus constituyentes hidrófilos en la membrana externa (Brenes y Roura, 2010; Seow y otros, 2014).

Cuadro 3. Clasificación de la capacidad antimicrobiana *in vitro* de algunos componentes del aceite esencial presentes en extractos cítricos.

| Patógeno | Clasificación | Referencia |
|-----------------------------|---|----------------------------|
| <i>E. coli</i> | Carvacrol>terpinol>linalol | Ait-Ouazzou y otros (2011) |
| <i>E. coli</i> O157:H7 | Timol>geraniol, carvacrol>eugenol | Si y otros (2006) |
| <i>S. Typhimurium</i> DT104 | Carvacrol>timol | Si y otros (2006) |
| <i>S. aureus</i> ATCC 25923 | Carvacrol>geraniol>linalol>citronelal>eugenol | Zyl (2006) |
| <i>E. coli</i> ATCC 11775 | Eugenol>carvacrol>geraniol>linalol>citronelal | Zyl (2006) |

2.11. Actividad antimicrobiana de los extractos cítricos (EC) *In vivo*

Los estudios indican que el efecto de los EC sobre el rendimiento de la puesta varía entre los experimentos, por lo que debe justificarse cuidadosamente antes de implementar el resultado en la práctica. Asimismo, el uso de aceite de canela, aceite de bergamota y EOM parece prometedor para reemplazar el uso de APC en las aves de corral (Cuadro 4).

Cuadro 4. Efecto de Extractos cítricos en avicultura.

| Animal | Nivel de inclusión | Efecto | Referencia |
|--------------------|---------------------------------|---|--------------------------|
| Gallina de postura | <i>Nigella sativa</i> (1-3 ppm) | Redujo significativamente <i>E. coli</i> en heces. No afectó los parámetros productivos. | Bölükbaşı y otros (2009) |
| Gallina de postura | Bergamota (1-3 ppm) | Aumentó la conversión alimenticia, peso de huevo y fuerza de cáscara del huevo. No afectó consumo de alimento. | Bölükbaşı y otros (2009) |
| Gallina de postura | Canela (40 ppm) | Aumentó el peso del huevo, la masa del huevo y la conversión alimenticia en condiciones de estrés por frío. No afectó consumo, ni ganancia de peso. | Torki y otros (2015) |
| Gallina de postura | EOM de 0 a 600 ppm | Aumentó la masa del huevo, el peso del huevo y la fuerza de la cáscara del huevo. No afectó el peso corporal, el consumo de alimento y la conversión alimenticia. | Olgun (2016) |

EOM: mezcla sin información sobre la proporción de cada EC utilizado.

III. MATERIALES Y METODOS

3.1. Lugar de investigación

La fase experimental se realizó en la granja Avícola AVIPORC S.A.C., ubicada en el sector de Valdivia Alta, Huanchaco, La Libertad. Latitud -8.12714, Longitud -79.0324, Altitud 82 msnm.

La medición de los cortes histológicos, se realizó en el Laboratorio de Histología y Embriología de la Universidad Privada Antenor Orrego, ubicado en distrito de Trujillo, departamento de La Libertad.

3.2. Animales de estudio

Se utilizaron 448 gallinas de la línea Hy-line Brown de 50 semanas de edad, con una producción promedio de 90%, las cuales fueron tratadas y ubicadas en 64 baterías según los dos tratamientos.

3.3. Instalaciones y equipos

Se utilizaron las baterías de la granja AVIPORC S.A.C, 32 jaulas por tratamiento, las cuales contienen comedero y un bebedero tipo niples, con las siguientes dimensiones: altura 36cm, ancho 52cm y largo 60 cm, en donde se colocaron 7 gallinas; cada 4 jaulas forman una unidad experimental de 28 gallinas.

3.4. Alimentación

Las aves recibieron las dietas según los tratamientos, las mismas que fueron formuladas para atender requerimientos de nutrientes de las gallinas en fase 2 de producción de huevo; siguiendo las recomendaciones de la Guía de manejo de la línea Hy Line Brown para 50 semanas. Las que son mostradas en el cuadro 5, el alimento fue formulado para 115 g/ave/día.

Cuadro 5. Composición porcentual y nutricional de las dietas de postura 2 para línea Hy line Brown de 50 semanas de edad por tratamiento.

| ingredientes (%) ¹ | Tratamientos ³ | |
|--------------------------------|---------------------------|---------|
| | DB | DBEC |
| Maíz | 56.00 | 56.00 |
| Torta de soya | 20.75 | 20.70 |
| Harina Integral de soya | 10.50 | 10.50 |
| Aceite vegetal | 2.00 | 2.00 |
| Carbonato de calcio | 11.5 | 11.5 |
| Sal veterinaria sin yodo | 0.35 | 0.35 |
| Bicarbonato de sodio | 0.20 | 0.20 |
| DL –Metionina | 0.15 | 0.15 |
| Lisina-HCl | 0.05 | 0.05 |
| Complejo Enzimático | 0.01 | 0.01 |
| Premix Vitamina/Mineral | 0.10 | 0.10 |
| Phosbic | 0.30 | 0.30 |
| Fitasa | 0.01 | 0.01 |
| Secuestrante de micotoxinas | 0.10 | 0.10 |
| Bacitracina | 0.05 | 0.00 |
| Extracto Cítrico | 0.00 | 0.025 |
| Cloruro de Colina | 0.10 | 0.10 |
| Valor nutricional ² | | |
| Energía Metab, kcal/kg | 2800.00 | 2800.00 |
| Proteína Cruda, % | 17.25 | 17.25 |
| Lisina, % | 0.84 | 0.84 |
| Metionina+Cistina, % | 0.70 | 0.70 |
| Calcio, % | 4.10 | 4.10 |
| Fosforo Disponible, % | 0.42 | 0.42 |

¹Composición de ingredientes según Rostagno (2011).

²Requerimientos basados en Hy-line (2016).

³DB: Dieta base con promotor de crecimiento, DBEC: Dieta base + extracto de cítricos (0.025%).

3.5. Variable independiente

Extracto de cítricos

3.6. Tratamientos

Los tratamientos fueron conformados por la inclusión de extractos cítricos a una dieta base.

DB : Dieta base con promotor de crecimiento

DBEC : Dieta base más extracto de cítricos (0.025%)

El extracto cítrico utilizar pertenece a la compañía francesa, NOR-FEED y cuyo nombre es Nor-Spice AB, es un promotor de crecimiento natural hecho a base de extractos de cítricos, los que tienen un efecto regulador en el balance de la microbiota. Su composición es la siguiente: Limoneno (aceite esencial de cítricos), citroflavonoides y pecti oligosacáridos (POS).

3.7. Variables evaluadas

- Altura de vellosidades (μm)
- Profundidad de cripta (μm)
- Relación V/C

3.8. Procedimiento para evaluar la Integridad Intestinal.

La evaluación de la estructura intestinal se realizó a las 56 semanas de edad de las gallinas del grupo experimental y el grupo control, y consistió en la medición de la altura de las vellosidades intestinales y profundidad de cripta del yeyuno. Para la evaluación de la estructura intestinal, se escogieron 6 gallinas, al azar, de cada grupo; por cada repetición (12 ejemplares en total).

Cada ejemplar elegido estuvo en ayunas antes de ser insensibilizado y luego, desangrado mediante un corte en la vena yugular. Para la obtención de la muestra, se procedió con la apertura del área abdominal, para exponer las vísceras, enfocándonos en las regiones intestinales de interés (yeyuno e íleon). En la semana 56, se colectaron segmentos de 2 cm x 2 cm de la porción craneal del yeyuno; y de la porción craneal del íleon de los animales (25% y 50% de la longitud total del intestino, respectivamente). Los segmentos colectados fueron limpiados con suero fisiológico (NaCl 0.9%) antes de ser colectados para la fijación en frascos con formol al 10%, para luego ser rotulados de acuerdo al tratamiento, fecha y repetición. La muestra permaneció por tres días en la solución de formol, se procedió con la confección de las láminas histológicas de acuerdo a los protocolos del método empleado (tinción con hematoxilina y eosina). Se realizó, en primer lugar, el corte de cada una de las muestras para la ubicación en los casetes para el lavado de la muestra, el deshidratado (enjuague con concentraciones crecientes de alcohol y xilol), aclarado, enjuague en parafina e infiltración en parafina fundida para elaborar los cortes en el micrótopo.

Para la adhesión de los cortes histológicos a las láminas porta objeto, se empleó albúmina. La tinción de hematoxilina y eosina consiste en teñir la muestra, primero con la hematoxilina en agua, para resaltar las sustancias ácidas o las que las contengan (como el núcleo que contiene ácido desoxirribonucleico); y, después de un proceso corto de deshidratado, con el colorante Eosina amarillento en alcohol, que tiñe las estructuras básicas como el citoplasma y demás orgánulos celulares. Finalmente, las muestras se enjuagan con alcohol xilol y se colocaron las láminas cubreobjetos, cada lámina quedó constituida por 5 cortes, en los cuales se realizaron las mediciones. En el laboratorio del Campus I de la Universidad Privada Antenor Orrego, se observaron y midieron individualmente las muestras con un microscopio con cámara incorporada

acoplado a una computadora. Las imágenes de los cortes fueran captadas con objetivo de 10X. Por cada lámina, correspondiente a cada segmento, se realizaron 15 medidas, de las cuales se obtendrán el promedio. Para la medición de altura de vellosidades, se tomaron un intervalo de medida, en micras (μm), desde el ápice de la vellosidad hasta la base o la abertura de la cripta de colindante. En el caso de la profundidad de criptas de Lieberkühn, el intervalo de medida consistirá entre la parte superior del lumen hasta el fondo, donde se encuentran las células de Paneth. Finalmente, para medir el espesor fondo de cripta – serosa, se tomaron la medida desde la zona inferior externa de la cripta hasta la capa serosa del intestino.

3.9. Análisis estadístico

Las aves fueron distribuidas a través del diseño completamente al azar (DCA) con dos tratamientos y 8 repeticiones. Cada unidad experimental estuvo compuesta por 28 gallinas, siguiendo el modelo lineal aditivo. El modelo lineal aditivo será:

$$Y_{ijk} = u + T_i + e_{ijk}$$

Dónde:

Y_{ijk} = Respuesta de la variable

u = Promedio general

T_i = Efecto del tipo de extractos cítricos

e_{ijk} = Error experimental.

Las variables evaluadas fueron analizadas a través del análisis de varianza y los promedios comparados a través de la prueba de Tukey (Montgomery, 2005).

IV.RESULTADOS

4.1. Corte histológico del Yeyuno 25% e íleon 50%

Los resultados del corte histológicos a las 56 semanas de edad, se encuentran en el Cuadro 6 y en las Figuras 1, 2 y 3 donde se observa que, para ambos segmentos evaluados, los promedios de altura de vellosidades intestinales y profundidad de cripta de los animales que recibieron ácidos cítrico en las dietas fueron significativamente mayores ($P < 0.05$) que aquellos que no recibieron extractos cítricos; en la relación altura de vellosidad y profundidad de cripta, el tratamiento sin ácidos cítricos (DB) mostró diferencia significativa ($P < 0.05$) con los tratamientos con extractos cítricos (DBAC).

Cuadro 6. Promedios de altura de vellosidades, Profundidad de cripta y relación Vellosidad/Cripta en gallinas ponedoras de 56 semanas de edad.

| Segmentos/variables del intestino | Tratamientos ¹ | | SEM ² |
|--|---------------------------|----------|------------------|
| | DB | DBEC | |
| Yeyuno (25%) | | | |
| Altura de vellosidades (μm) | 706.70 b | 890.70 a | 6.98 |
| Profundidad de cripta (μm) | 152.65 b | 277.15 a | 1.98 |
| Relación vellosidad/cripta | 4.63 a | 3.21b | 0.12 |
| Íleon (50%) | | | |
| Altura de vellosidades (μm) | 663.25 b | 773.16 a | 17.09 |
| Profundidad de cripta (μm) | 120.70 b | 173.45 a | 2.43 |
| Relación vellosidad/cripta | 5.50 a | 4.46 b | 0.17 |

¹ Para cada variable, promedios seguidos de letras diferentes en la fila, difieren entre sí por la prueba de Tukey ($P < 0.05$).

² DB: tratamiento control, DBEC: tratamiento con Extractos Cítricos.

³ SEM: Error estándar del promedio (μm).

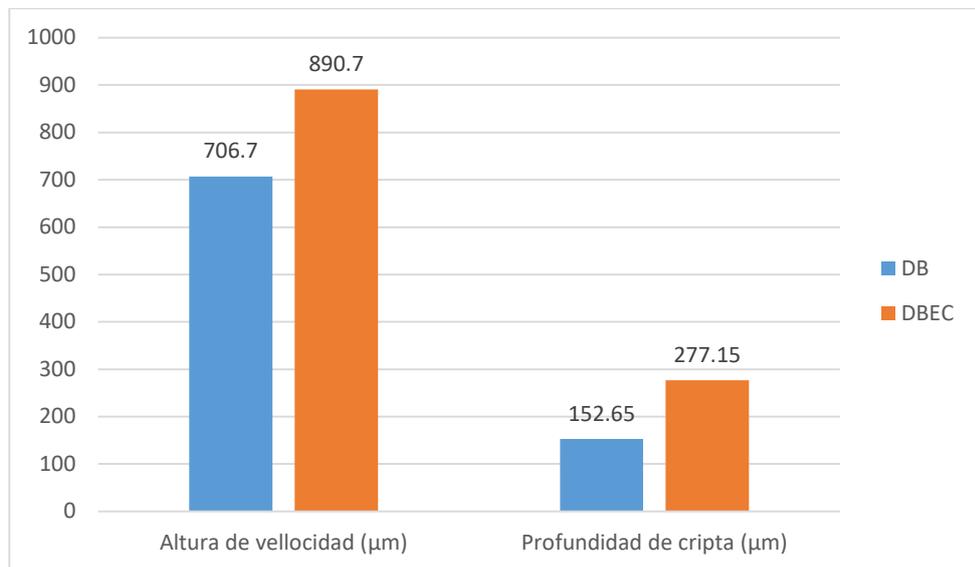


Figura 1. Altura de vellosidades y profundidad de cripta de Yeyuno 25 % en gallinas ponedoras de 56 semanas de edad.

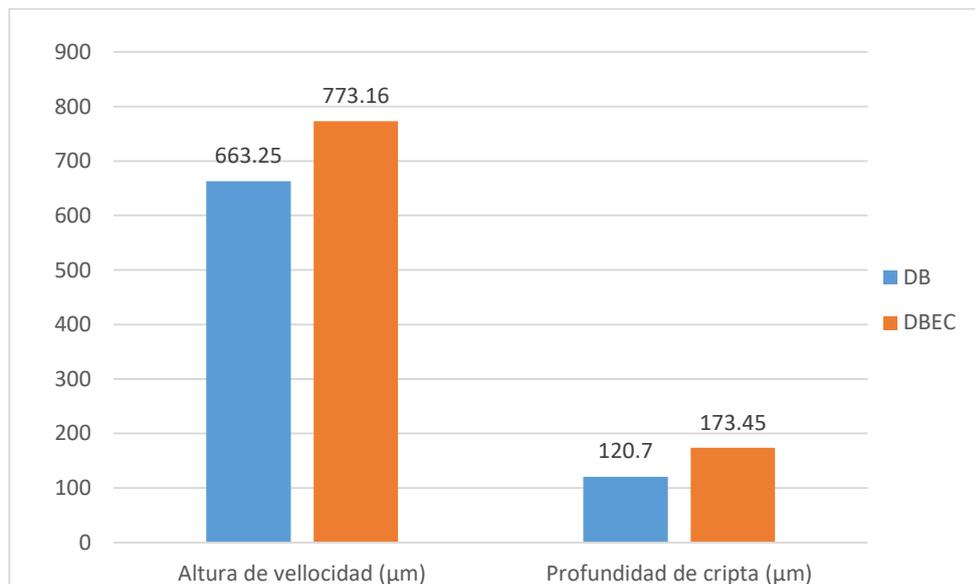


Figura 2. Altura de vellosidades y profundidad de cripta de íleon 50 % en gallinas ponedoras de 56 semanas de edad.

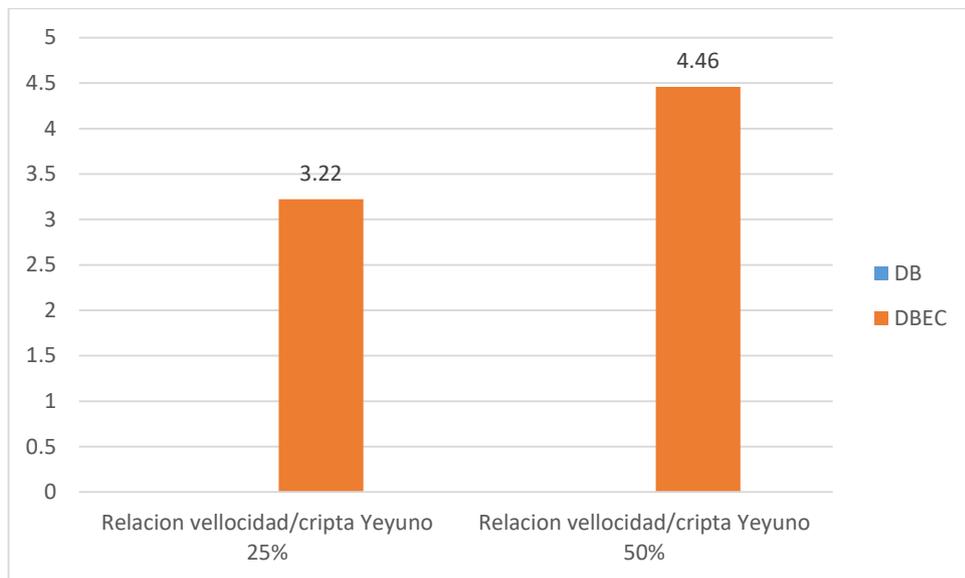


Figura 3. Relación entre altura de vellosidades y profundidad de cripta de Yeyuno 25% e Íleon 50% en gallinas ponedoras de 56 semanas de edad.

V. DISCUSIÓN

5.1. Resultados sobre la integridad intestinal

La adición de extractos cítricos en las dietas de gallinas ponedoras de 56 semanas de edad, se obtuvo diferencia estadística ($p < 0.05$) entre los datos del tratamiento dieta base (DB) y el tratamiento con extracto cítrico (DBAC) en cuanto a las medidas de altura de las vellosidades, profundidad de cripta y Relación Altura de vellosidad/profundidad de cripta (V/C) en yeyuno e íleon en gallinas ponedoras de 56 semanas de edad.

En la altura de vellosidad se encontró diferencias significativas ($P < 0.05$) con una mayor profundidad en el tratamiento con extracto cítrico con 890.70 (yeyuno al 25%) μm y 773.16 μm (íleon 50%) μm respectivamente, y la menor en tratamiento con dieta base (DB) con 706.70 μm (yeyuno 25%) y 663.25 μm (íleon 50%) μm . Está bien estudiado que las vellosidades intestinales son muy importantes para la absorción de nutrientes del tracto intestinal; por lo tanto, la morfometría y densidad de estas vellosidades puede afectar la eficiencia alimenticia, el desempeño y la salud del animal (Hampson, 1986; Pelicano y otros, 2003). Además, una vellosidad corta disminuye la superficie de absorción de nutrientes y un alargamiento de la vellosidad indica una rápida reconversión del tejido y una alta demanda por nuevos tejidos (Yason y otros, 1987). Nuestros resultados pueden deberse a que los POS favorecen el aumento de la microbiota benéfica del intestino y con esto propicia la salud intestinal, lo cual conlleva a un incremento de la altura de las vellosidades intestinales (Apajalahti y otros, 2004; Castanys-Muñoz y otros, 2016). Los resultados coinciden con lo reportado por Yusrizal y Chen (2003) que evaluaron los efectos de la inclusión de FOS en el alimento (1g/kg) sobre las características intestinales, evidenciando que aumenta la longitud del intestino delgado e incrementa la densidad de las

vellosidad (Van y Jansman, 2002).

En la profundidad de la Cripta se encontró diferencias significativas ($P < 0.05$) con una mayor profundidad en el tratamiento con extracto cítrico con $277.15\mu\text{m}$ (yeyuno al 25%) y $163.65\mu\text{m}$ (íleon 50%) μm respectivamente y la menor en tratamiento con dieta base (DB) con $152.65\mu\text{m}$ (yeyuno 25%) y $124.71\mu\text{m}$ (íleon 50%). El aumento en la profundidad de las criptas se traduce en el incremento de la rotación celular, dando lugar a una renovación rápida de las vellosidades que podría ser necesaria durante el aumento de la carga patógena (Awad y otros, 2009). Nuestros resultados coinciden con Xu y otros (2003) quienes utilizaron MOS y Ácidos orgánicos (1 g/kg). Asimismo, Baurhoo y otros (2007) obtuvieron un incremento de la profundidad de las criptas con ácidos cítricos. Asimismo, fue reportado por Catala-Gregori y otros (2007); mientras que Yang y otros (2008) encontraron una disminución en la profundidad de las criptas al suplementar 2 kg de MOS. Por el contrario, Williams y otros (2008) indicaron que la estructura del intestino de los pollos no se modificó con la suplementación de la ración con ácidos orgánicos.

La relación altura de vellosidad y profundidad de cripta (V/C) se obtuvo diferencia significativa ($P < 0.05$) entre la dieta base tanto en la porción yeyuno en 25% e íleon 50% comparada con el tratamiento que uso extractos cítricos en la dieta (DBAC). Estos resultados coinciden con Rebolé y otros (2010), que observaron mayor relación longitud de la vellosidad/profundidad de la cripta. Por el contrario, Rehman y otros (2006) constataron que las aves que consumían inulina la longitud de las vellosidades y la profundidad de las criptas del yeyuno aumentaban, pero no se modificó el cociente longitud de la vellosidad/profundidad de la cripta. Williams y otros (2001) señalaron que la formación de AGCC a partir de los carbohidratos fermentables es importante para el

mantenimiento de la morfología e integridad funcional del epitelio del colon.

Cambios en la morfología intestinal tales como: vellosidades más cortas y criptas más profundas han sido asociados con la presencia de toxinas (Yason y otros, 1987). En tanto Williams y otros (2008), no encontraron diferencias estadísticas en la altura de las vellosidades, profundidad cripta y relación V/C en el duodeno en las tres semanas donde se comparó un FOS y un antibiótico como control.

VI. CONCLUSIONES

El uso de extractos cítricos suministrado en dietas en gallinas ponedoras mejora la salud intestinal del intestino delgado.

VII. RECOMENDACIONES

Realizar trabajos de investigación usando extractos cítricos en otras especies de Monogástricos.

Evaluar el pH del intestino delgado usando extractos cítricos y su relación con la integridad intestinal.

VIII. BIBLIOGRAFIA

- Aguavil, J., Enriquez, A. 2012. Evaluación del efecto de un probiótico nativo elaborado en base a *Lactobacillus acidophilus* y *Bacillus subtilis* sobre el sistema gastrointestinal en pollos broiler ross-308 en Santo Domingo de los Tsáchilas. Tesis para obtener título de Ingeniero Zootecnista. Escuela Politécnica del Ejército. Santo Domingo, Ecuador.
- Ait-Ouazzou, A., Cherrat, L., Espina, L., Lorán, S., Rota, C., Pagán, R. 2011. The antimicrobial activity of hydrophobic essential oil constituents acting alone or in combined processes of food preservation. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*. 12(3): 320-329.
- Allen, H.K., Stanton, T.B. 2014. Altered Egos: Antibiotic Effects on Food Animal Microbiomes. *Annual Review of Microbiology*. 68(1):297-315.
- Amato, H.K., Wong, N.M., Pelc, C., Taylor, K., Price, L.B., Altabet, M., Jordan, T.E., Graham, J.P. 2020. Effects of concentrated poultry operations and cropland manure application on antibiotic resistant *Escherichia coli* and nutrient pollution in Chesapeake Bay watersheds. *Science of The Total Environment*. 735: 139401.
- Apata, D. 2009. Antibiotic resistance in poultry. *Int. J. Poult. Sci.* 8:404–408.
- Apajalahti, J., Kettunen, A., Graham, H. 2004. Characteristics of the gastrointestinal microbial communities, with special reference to the chicken. *World's Poultry Science Journal*. 60(2): 223-232.
- Assafi, M.S., Hado, H.A., Abdulrahman, I.S. 2020. Detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in broiler and broilers farm workers in

- Duhok, Iraq by using conventional and PCR techniques. *Iraqi J Vet Sci.* 34(1):15-22.
- Awad, W. A., 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.
- Baffoni, L., Gaggìa, F., Di Gioia, D., Santini, C., Mogna, L., Biavati, B. 2012. A Bifidobacterium-based synbiotic product to reduce the transmission of *C. jejuni* along the poultry food chain. *International Journal of Food Microbiology.* 157(2): 156-161.
- Baurhoo, B., Phillip, L., Ruiz-Feria, C.A. 2007. Effects of purified lignin and mannan oligosaccharides on intestinal integrity and microbial populations in the ceca and litter of broiler chickens. *Poult. Sci.* 86: 1070-1078.
- Bassolé, I.H.N., Juliani, H.R. 2012. Essential Oils in Combination and Their Antimicrobial Properties. *Molecules.* 17(4): 3989-4006.
- Bedford, M.R. 2000. Removal of antibiotic growth promoters from poultry diets: implications and strategies to minimize subsequent problems. *World Poultry Science Journal.* 56: 347-365.
- Bölükbaşı, S.C., Kaynar, O., Erhan, M.K. Urupan, H. 2009. Effect of feeding *Nigella sativa* oil on laying hen performance, cholesterol and some proteins ratio of egg yolk and *Escherichia coli* count in feces. *Archiv für Geflügelkunde.* 73(3): 167-172.
- Brenes, A., Roura, E. 2010. Essential oils in poultry nutrition: Main effects and modes of action. *Animal Feed Science and Technology.* 158(1): 1-14.

- Castanys-Muñoz, E., Martin, M.J., Vazquez, E. 2016. Building a Beneficial Microbiome from Birth. *Advances in Nutrition*. 7(2): 323-330.
- Catala-Gregori, P., Mallet, S., Travel, A., Lesire, M. 2007. Un extrait de plantes et un prebiotique sont aussi efficaces que l'avitamycine pour ameliorer les performances du poulet de chair. 7e Journées de la Recherche Avicole, Tours, France. pp. 206-206.
- Cepero, R. 2006. Retirada de los antibióticos promotores de crecimiento en la Unión Europea: causas y consecuencias. Departamento de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos. Facultad de Veterinaria., Universidad de Zaragoza.
- Chen, H., Hu, H., Chen, D., Tang, J., Yu, B., Luo, J., He, J., Luo, Y., Yu, J., Mao, X. 2017. Dietary Pectic Oligosaccharide Administration Improves Growth Performance and Immunity in Weaned Pigs Infected by Rotavirus. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 65(14): 2923-2929.
- Das, L., Bhaumik, E., Raychaudhuri, U., Chakraborty, R. 2012. Role of nutraceuticals in human health. *J. Food Sci. Technol.* (49):173–183.
- Di Corcia, A., Nazzari, M. 2002. Liquid chromatographic–mass spectrometric methods for analyzing antibiotic and antibacterial agents in animal food products. *J. Chromatogr. A*. 974:53–89.
- ESVAC. 2017. Sales of veterinary antimicrobial agents in 30 european countries in 2015. Trends from 2010 to 2015. Available at https://www.ema.europa.eu/en/documents/report/seventh-esvac-report-sales-veterinary-antimicrobial-agents-30-european-countries-2015_en.pdf

- Franz, C., Baser, K.H.C., Windisch, W. 2010. Essential oils and aromatic plants in animal feeding – a European perspective. A review. *Flavour and Fragrance Journal*. 25(5): 327-340.
- Ganz, T. 2000. Paneth cells—guardians of the gut cell hatchery. *Nat. Immunol.* 1: 99-100.
- Gong, J., Yin, F., HouY, Yin, Y. 2014. Review: Chinese herbs as alternatives to antibiotics in feed for swine and poultry production: Potential and challenges in application. *Canadian Journal of Animal Science*.
- Hill, R., Wyse, G., Anderson, M. 2006. *Fisiología animal: nutrición, alimentación y digestión*. Trad. Por M. Maggi, U. Patrone, M. Tavella, K. Tzal. Madrid. España. Panamericana. 916 p.
- Hippenstiel, F., Abdel-Wareth, A., Kehraus, S., Südekum, K. 2011. Effects of selected herbs and essential oils, and their active components on feed intake and performance of broilers-a review. *Arch Geflügelk.* 75: 226-234.
- Hoerr, F. 2009. La Integridad intestinal y su importancia económica en la Industria Avícola. Disponible en: http://www.avicultura.com.mx/avicultura/home/impresion.asp?cve_art=458
- Hubbard, L.E., Givens, C.E., Griffin, D.W., Iwanowicz, L.R., Meyer, M.T., Kolpin, D.W. 2020. Poultry litter as potential source of pathogens and other contaminants in groundwater and surface water proximal to large-scale confined poultry feeding operations. *Science of The Total Environment*. 735: 139459.
- Kamel, C.A. 2000. A novel look at a classic approach of plant extracts. *Feed Mix Special*. 249:19-25.

- Kim, G.-B., Seo, Y.M., Kim, C.H., Paik, I.K. 2011. Effect of dietary prebiotic supplementation on the performance, intestinal microflora, and immune response of broilers. *Poultry Science*. 90(1): 75-82.
- Leijdekkers, A.G.M., Aguirre, M., Venema, K., Bosch, G., Gruppen, H., Schols, H.A. 2014. In Vitro Fermentability of Sugar Beet Pulp Derived Oligosaccharides Using Human and Pig Fecal Inocula. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 62(5): 1079-1087.
- Li, T., Li, S., Du, L., Wang, N., Guo, M., Zhang, J., Yan, F., Zhang, H. 2010. Effects of haw pectic oligosaccharide on lipid metabolism and oxidative stress in experimental hyperlipidemia mice induced by high-fat diet. *Food Chemistry*. 121(4): 1010-1013.
- Li, T., Zhu, R., Dong, Y., Liu, Y., Li, S., Chen, G. 2013. Effects of Pectin Pentaoligosaccharide from Hawthorn (*Crataegus pinnatifida* Bunge. Var. Major) on the Activity and mRNA Levels of Enzymes Involved in Fatty Acid Oxidation in the Liver of Mice Fed a High-Fat Diet. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 61(31): 7599-7605.
- Mahady, G. 2005. Medicinal plants for the prevention and treatment of bacterial infections. *Current Pharmaceutical Design*. 11:2405-2427
- Macari, M., Furlan, R., Gonzales, E. 1994. Fisiología aviária aplicada a frangos de corte. UNESP, São Paulo-Brasil. 296 p.
- Manzetti, S., Ghisi, R. 2014. The environmental release and fate of antibiotics. *Mar Pollut Bull*. 79:7-15.

- Mao, X., Xiao, X., Chen, D., Yu, B., He, J., Chen, H., Xiao, X., Luo, J., Luo, Y., Tian, G., Wang, J. 2017. Dietary apple pectic oligosaccharide improves gut barrier function of rotavirus-challenged weaned pigs by increasing antioxidant capacity of enterocytes. *Oncotarget*. 8(54): 92420-92430. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.21367>
- Marti, E., Variatza, E., Balcazar, J. 2014. The role of aquatic ecosystems as reservoirs of antibiotic resistance. *Trends Microbiol*. 22:36-41.
- MINAGRI. 2019. Boletín estadístico mensual de la producción y comercialización de productos avícolas. Disponible en: <https://cdn.www.gob.pe/uploads/document/file/519920/produccion-comercializacion-avicola-dic19-070220.pdf>
- Montgomery, D. 2005. *Diseño y análisis de experimentos*: Limusa Wiley.
- Mookiah, S., Sieo, C.C., Ramasamy, K., Abdullah, N., Ho, Y. W. 2014. Effects of dietary prebiotics, probiotic and synbiotics on performance, caecal bacterial populations and caecal fermentation concentrations of broiler chickens. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 94(2): 341-348.
- O'Bryan, C.A., Pendleton, S.J., Crandall, P.G., Ricke, S.C. 2015. Potential of Plant Essential Oils and Their Components in Animal Agriculture – in vitro Studies on Antibacterial Mode of Action. *Frontiers in Veterinary Science*.
- Olgun, O. 2016. The Effect of Dietary Essential Oil Mixture Supplementation on Performance, Egg Quality and Bone Characteristics in Laying Hens. *Annals of Animal Science*. 16(4): 1115-1125. <https://doi.org/10.1515/aoas-2016-0038>

- Parry-Hanson, K.A., Otwey, R.Y., Mosi, L. 2020. Microbiological quality and Salmonella prevalence, serovar distribution and antimicrobial resistance associated with informal raw chicken processing in Accra, Ghana. *Food Control*. 118:107440
- Pelicano, ERL, Sousa, PA, Sousa, HBA, Figueiredo, DF, Biago, MM, Carballo, SR., Bordon, VF. 2003. Intestinal mucosa development in broiler chickens fed natural growth promoters. *Braz.J. Poult. Sci*. 7: 221-229.
- Rebolé, A., Ortiz, LT., Rodríguez, ML., Alzueta, C., Treviño, J., Velasco, S. 2010. Effects of inulin and enzyme complex, individually or in combination, on growth performance, intestinal microflora, cecal fermentation characteristics, and jejunal histomorphology in broiler chickens fed a wheat- and barley-based diet. *Poult.Sci*. 89: 276-286.
- Rodríguez, J. 2005. Integridad intestinal del pollo de engorde. *Rev. Vet. Mundo Veterinario*. 8(9):1-8.
- Roldán, L. 2010. Evaluación del uso de los aceites esenciales como alternativa al uso de los antibióticos promotores de crecimiento en pollos de engorde. Tesis para magíster en Producción Animal, línea de profundización en nutrición de monogástricos. Bogotá, Colombia. Universidad nacional de Colombia. 149 p.
- Seow, Y.X., Yeo, C.R., Chung, H.L., Yuk, H.-G. 2014. Plant Essential Oils as Active Antimicrobial Agents. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 54(5): 625-644.
- 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.

Solórzano-Santos, F., Miranda-Novales, M.G. 2012. Essential oils from aromatic herbs as antimicrobial agents. *Current Opinion in Biotechnology*. 23(2): 136-141.

Steiner, T. 2006. Natural growth promoters as a key to animal performance. Nottingham, United Kingdom. British Library Cataloguing in publication Data. 98 p.

Sugiharto, S. 2016. Role of nutraceuticals in gut health and growth performance of poultry. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*. 15(2): 99-111.

Torki, M., Akbari, M., Kaviani, K. 2015 Single and combined effects of zinc and cinnamon essential oil in diet on productive performance, egg quality traits, and blood parameters of laying hens reared under cold stress condition *International Journal of Biometeorology*. 59(9): 1169-1177.

Uni, Z., Geyra, A., Ben-Hur, H., Sklan, D. 2000. Small intestinal development in the young chick: crypt formation and enterocyte proliferation and migration. *Br. Poultry Sci.* 41: 544-551.

Vargas, F. 2007. Efecto de un Acidificante en el Rendimiento Productivo de Pollos de Carne de la Línea Cobb 500; Tesis para obtener el grado de Ingeniero Zootecnista. Trujillo, Perú. Universidad Nacional de Trujillo. 67 p.

- Widodo, E. 2020. The Prospective Use of Essential Oil from Herbs as Feed Additive for Laying Poultry: A Review. IOP Conference Series: Earth and Environmental Science. 478: 012003.
- 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.
- Xu, Z.R.C., Hu, M. S., Xia, X. A., Zhan, M., Wang, Q. 2003. Effects of dietary fructooligosaccharide on digestive enzyme activities, intestinal microflora and morphology of male broilers. Poult. Sci. 82: 1030-1036.
- Yang, Y., Iij, P.A., Kocher, A., Thomson E., Mikkelsen, LL., Choct, M. 2008. Effects of mannanoligosaccharide in broiler chicken diets on growth performance, energy utilization, nutrient digestibility and intestinal microflora. Br. Poult. Sci. 49: 186-194.
- Yason, C.V., Schat, K.A. 1987. Pathogenesis of rotavirus infection in various age groups of chickens and turkeys; clinical signs and virology. Am J Vet Resp. 48: 977.
- Yusrizal, Y., Chen, T.C. 2003. Effect of adding chicory fructans in feed on broiler growth performance, serum cholesterol and intestinal length. Int. J. Poult Sci. 2: 214-219.
- Zhai, H., Liu, H., Wang, S., Wu, J., Klünter, A.-M. 2018. Potential of essential oils for poultry and pigs. Animal Nutrition. 4(2): 179-186.
- Zhang, Y., Gong, J., Yu, H., Guo, Q., Defelice, C., Hernandez, M., Yin, Y., Wang, Q. 2014. Alginate-whey protein dry powder optimized for target

delivery of essential oils to the intestine of chickens. *Poultry Science*. 93(10): 2514-2525.

Zhao, S., Zhang, K., Ding, X., Celi, P., Yan, L., Bai, S., Zeng, Q., Mao, X., Xu, S., Wang, J. 2019. The impact of dietary supplementation of different feed additives on performances of broiler breeders characterized by different egg-laying rate. *Poultry Science*. 98(11): 6091-6099.

Zwe, Y., Tang, V., Aung, K., Gutiérrez, R., Ng, L., Yuk, H-G. 2018. Prevalence, sequence types, antibiotic resistance and, *gyrA* mutations of *Salmonella* isolated from retail fresh chicken meat in Singapore. *Food Control*. 90: 233–240.

Zyl, R.L. van, Seatlholo, S.T., Vuuren, S.F. van, Viljoen, A.M. 2006. The Biological Activities of 20 Nature Identical Essential Oil Constituents. *Journal of Essential Oil Research*. 18:129-133.

IX. ANEXOS

Anexo 1. Distribución de las gallinas ponedoras, por cada tratamiento.



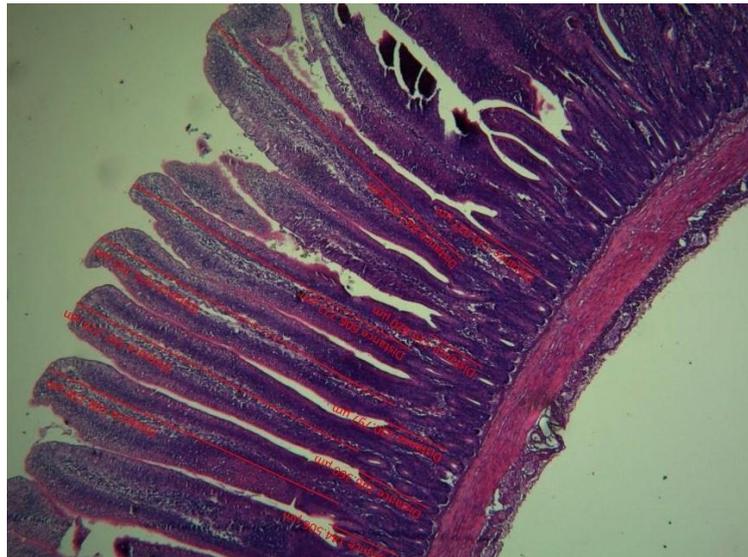
Anexo 2. Proceso de cortes del intestino delgado



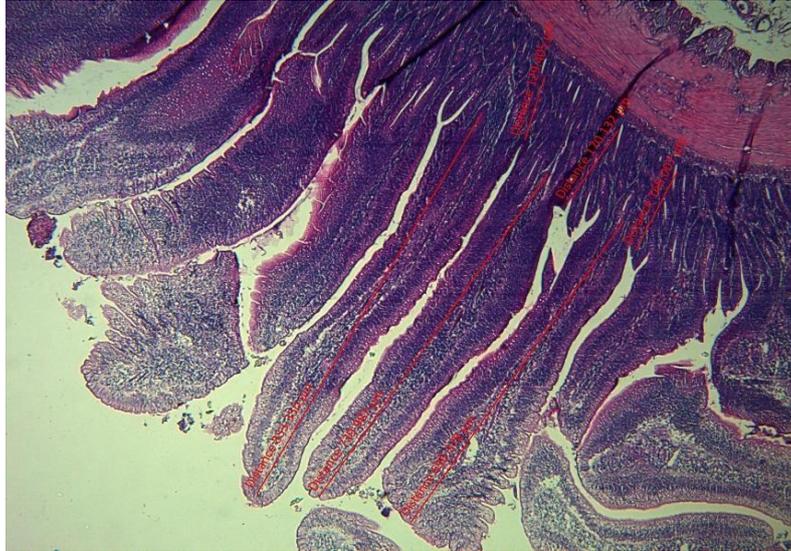
Anexo 3. Intervalos de medida de altura de vellosidades y profundidad de cripta, en el tratamiento con dieta base en gallinas ponedoras a las 56 semanas de edad. Al 25% del Yeyuno.



Anexo 4. Intervalos de medida de altura de vellosidades y profundidad de cripta, en el tratamiento con dieta base más ácido cítrico en gallinas ponedoras a las 56 semanas de edad. Al 25% del Yeyuno



Anexo 5. Intervalos de medida de altura de vellosidades y profundidad de cripta, en el tratamiento con dieta base en gallinas ponedoras a las 56 semanas de edad. Al 50% del Yeyuno



Anexo 6. Intervalos de medida de altura de vellosidades y profundidad de cripta, en el tratamiento con dieta base más ácido cítrico en gallinas ponedoras a las 56 semanas de edad. Al 50% del Yeyuno

