

Effects of supplementation with oregano essential oil on ileal digestibility, intestinal histomorphology, and performance of broiler chickens[□]

Efectos de la suplementación con aceites esenciales de orégano sobre la digestibilidad ileal, histomorfometría intestinal y comportamiento productivo de pollos de engorde

Efeito da suplementação com óleos essenciais de orégano sobre a digestibilidade ileal, morfometria intestinal e desempenho produtivo de frangos de corte

Liliana L Betancourt^{1,3*}, Zoot, ScD; Claudia J Ariza², Zoot, PhD; Germán Afanador¹, MVZ, PhD.

¹Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia, ²CORPOICA, Bogotá, Colombia,

³Universidad de La Salle, Bogotá, Colombia.

(Recibido: 16 junio, 2011; aceptado: 20 marzo, 2012)

Summary

Objective: evaluate the effects of different chemotypes of oregano essential oil (OEO) on protein, fat, and energy ileal digestibility of broiler chickens at 21 days of age. **Methods:** six treatments were evaluated: 200 ppm of OEO from three varieties produced and ground in Sabana de Bogotá-Colombia: *O. vulgare L ssp hirtum* (OH); *O. vulgare L.* (OL) y *O. majorana* (OM); 500 ppm Chlortetracycline (AB) and a control without additives (C). Between 14 and 21 days of age the chickens were fed with starter diets supplemented with 0.5 g/kg chromium oxide (Cr_2O_3) as a inert marker. The ileal digesta was collected, and protein, fat, energy, and chromium were analyzed in both feed and ileal content, and ID was calculated. **Results:** AB group showed a higher protein ID compared to control group, 83.7 and 75.3%, respectively ($p<0.05$). Both OM and AB experimental groups presented higher values of ID for energy and fat compared to control group, 92.3, 91.7 and 84.2%, respectively ($p<0.05$). These groups also presented a higher body weight at day 21 ($p<0.05$). However, the difference disappeared at 42 d of age. A negative correlation was estimated between body weight and carvacrol intake ($r: -0.55$), but it was positive with thymol intake ($r: 0.46$, $p<0.05$). **Conclusions:** the results showed different responses of chickens depending on the composition of OEO.

Key words: broiler chicken, carvacrol, digestibility, thymol.

Resumen

Objetivo: evaluar los efectos de diferentes quimiotipos de aceites esenciales de orégano (AEO) sobre la digestibilidad ileal (DI) de proteína, grasa y energía en dietas para pollos de engorde a los 21 días de

□ Para citar este artículo: Betancourt LL, Ariza CJ, Afanador G. Efectos de la suplementación con aceites esenciales de Orégano sobre la digestibilidad ileal, histomorfometría intestinal y comportamiento productivo de pollos de engorde. Rev Colomb Cienc Pecu 2012; 25:240-251.

* Autor para correspondencia: Liliana Betancourt, Universidad de La Salle. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Carrera 7 No. 172-85, Bogotá, Colombia (571) 677 1893, E-mail: lcbetancourt@unisalle.edu.co.

edad. **Métodos:** se evaluaron seis tratamientos: 200 ppm de AEO procedente de tres variedades producidas y cultivadas en la Sabana de Bogotá, Colombia: *O. vulgare* L ssp *hirtum* (OH); *O. vulgare* L. (OL) y *O. majorana* (OM); 50 ppm de aceite esencial de *O. vulgare* L ssp *hirtum* cultivado en Grecia (OG); 500 ppm de clortetraceclina (AB) y el control sin ningún aditivo (C). Entre los 14 y 21 días, los pollos recibieron una dieta de iniciación con 0.5 g/kg de óxido de cromo (Cr_2O_3) como marcador inerte. Se colectó la digesta ileal y se determinó la energía y cromo en alimento y contenido ileal para calcular la DI. **Resultados:** el grupo AB presentó la mejor DI de la proteína comparado con el grupo control, 83.7 y 75.3%, respectivamente ($p < 0.05$). La más alta DI de energía y grasa fue para OM y AB respecto al grupo control, 92.3, 91.7 y 84.2%, respectivamente ($p < 0.05$). Estos grupos también presentaron el mayor peso corporal a los 21 días de edad ($p < 0.05$), sin presentar diferencias a los 42 días de edad. Se observó una correlación negativa entre el consumo de carvacrol y el peso corporal ($r = -0.55$) y una correlación positiva con el consumo de timol ($r = 0.46$, $p < 0.05$). **Conclusión:** se comprobó una respuesta diferencial de pollos de engorde a los AEO de acuerdo a su composición.

Palabras clave: carvacrol, digestibilidad, pollos de engorde, timol.

Resumo

Objetivo: deste estudo foi avaliar os efeitos de diferentes quimiotipos de óleos essenciais de orégano (AEO) sobre a digestibilidade ileal (DI) da proteína, gordura e energia da dieta para frangos de corte aos 21 dias de idade. **Métodos:** Seis tratamentos foram avaliados: 200 ppm de AEO a partir de três variedades produzidas e cultivadas na Sabana de Bogotá, Colômbia: *O. vulgare* L ssp *hirtum* (OH); *O. vulgare* L. (OL) y *O. majorana* (OM); 50 ppm de óleo essencial de *O. vulgare* L ssp *hirtum* produzido e cultivado na Grécia (OG); 500 ppm de clortetraceclina (AB) e controle sem aditivo (C). Entre os dias 14 e 21, as aves receberam uma dieta inicial com 0.5 g/kg de óxido de cromo (Cr_2O_3) como marcador inerte. A digesta ileal foi coletada, foi analisado o conteúdo de matéria seca, proteína, energia, gordura e cromo nas rações e na digesta e a DI foi calculada. **Resultados:** O grupo AB apresentou maior DI da proteína, em comparação com o grupo controle, 83.7 e 75.3%, respectivamente ($p < 0.05$). A maior DI de energia e gordura foi para OM e AB em relação ao C, 92.3, 91.7 e 84.2%, respectivamente ($p < 0.05$). Estes grupos também tiveram o maior peso aos 21 dias ($p < 0.05$), sem diferenças aos 42 dias de idade. Foi observada uma correlação negativa entre o consumo de carvacrol e o peso corporal ($r: -0.55$) e uma correlação positiva com o consumo de timol ($r: 0.46$, $p < 0.05$). **Conclusões:** Resposta diferencial de frangos de corte foi observado para a composição do OEO.

Palavras chave: carvacrol, digestibilidade, frangos de corte timol.

Introducción

Los antibióticos promotores de crecimiento (APC) en la dieta de pollos de engorde han permitido mejorar la productividad y competitividad de la industria avícola (Dibner y Richards, 2005). Sin embargo, cada vez más países prohíben la utilización de APC, amparados en el principio de precaución debido a que los APC pueden conducir al desarrollo de resistencia bacteriana (Castanon, 2007). La restricción al uso de APC, unido a la creciente demanda de productos diferenciados, saludables y seguros, ha abierto las puertas al uso de aditivos funcionales de origen natural, como los AEO (Zhang *et al.*, 2005).

Los AEO son mezclas de compuestos volátiles aislados de plantas medicinales que están constituidos principalmente por carvacrol y timol incluyendo sus precursores biosintéticos, el γ -Terpineno y el p-Cimeno (Russo *et al.*, 1998). Actualmente, se han reconocido múltiples efectos funcionales de los AEO y sus mezclas, tales como: antimicrobianos *in vitro* (Baricevic y Bartol, 2002), antioxidantes (Botsoglou *et al.*, 2002), antimicóticos, antiparasitarios y estimulantes de las secreciones digestivas (Hernández *et al.*, 2004; Jang *et al.*, 2007). Los aceites esenciales surgen entonces como una alternativa integral para su uso como pronutrientes en alimentación animal (Williams y Losa, 2001; Hernandez *et al.*, 2004; Jamroz *et al.*, 2003; Mitsch *et al.*, 2004), entre otros.

Sin embargo, los efectos de los aceites esenciales en pollos de engorde no han sido consistentes. Mientras que algunos investigadores concluyen que el efecto de los AEO depende de las condiciones higiénico-sanitarias de las explotaciones (Lee et al., 2003a), otros estudios muestran que los AEO mejoraron la ganancia de peso corporal y la conversión alimenticia de pollos de engorde (Giannenas et al., 2003).

La mayor importancia en investigación y desarrollo tecnológico se ha dado para los AEO ricos en carvacrol (Nitsas, 2000), pero otros quimiotipos poco estudiados ricos en sabibeno o en timol, podrían tener un efecto potencial más relevante como alternativa al uso de antibióticos en pollos de engorde. El presente estudio se planteó con el fin de evaluar el efecto de AEO procedente de tres principales quimiotipos de orégano, ricos en carvacrol, en timol y en sabibeno, sobre la digestibilidad ileal (DI) de la proteína, la grasa y la energía y su relación con el desempeño productivo del pollo de engorde y la mortalidad por ascitis. Igualmente se planteó establecer la relación entre el consumo de carvacrol y timol con la respuesta fisiológica y productiva del pollo de engorde.

Materiales y métodos

Alojamiento y diseño experimental

El estudio se realizó en el Centro de Investigaciones de CORPOICA Tibaitatá, km 14 vía Mosquera, Colombia, ubicado a 2.547 msnm, con una temperatura media de 13 °C, precipitación anual de 621 mm. Se alojaron 750 pollos de engorde en baterías provistas de fuente eléctrica de calor, comederos de canal, bebederos automáticos de copa, rejilla y bandeja de recolección de excretas.

Se utilizaron 750 pollos de engorde machos de 1 día de edad de la línea Hybro, distribuidos aleatoriamente en seis tratamientos con cinco réplicas por tratamiento y 25 pollos por replica por un periodo de 42 días. Los pollos se manejaron de acuerdo a las directrices de las normas de cuidado y uso de animales del Comité de Ética Institucional. Las dietas se formularon sobre una base comercial de maíz y torta de soya y se diseñaron para cubrir

los requerimientos nutricionales en las distintas fases de pollos en crecimiento (Rostagno et al., 2005). Las dietas fueron fortificadas con premezclas de vitaminas y minerales (Tabla 1). Los tratamientos evaluados fueron: 200 ppm de AEO procedente de tres variedades producidas y cultivadas en la Sabana de Bogotá, Colombia: *O. vulgare* H. (OH); *O. vulgare* L. (OL) y *O. majorana* (OM); 50 ppm de aceite esencial de *O. vulgare* L ssp *hirtum* cultivado en Grecia (OG); 500 ppm de clortetraceclina (AB) y un grupo control sin ningún tipo de aditivo (C).

Tabla 1. Dietas experimentales.

Ingredientes, g.kg ⁻¹	Pre-inicio 1-7 d	Inicio 7-21 d	Crecimiento 21-42 d
Maíz	539.1	566.5	621.8
Torta de soya, 49% PC	277.1	254.0	203.2
Soya extruida	100.0	100.0	100.0
Aceite de palma	17.9	21.7	18.8
Harina de pescado	20.0	15.0	15.0
Fosfato dicálcico	14.3	13.6	12.0
Carbonato de Calcio	12.2	11.7	10.9
Premezcla vitam. y miner*	2.0	2.0	2.0
Sal común	3.5	3.5	3.5
Bicarbonato de Sodio	3.0	3.0	3.0
L-Lisina HCl	1.9	1.2	1.8
DL- Metionina	2.1	1.5	1.5
L-Triptófano	1.1	0.3	0.6
Colina HCl, 60%	1.0	1.0	1.0
Composición calculada, %			
Proteína cruda	22.61	21.14	19.40
EM, kcal/g	3.000	3.050	3.100
Grasa	6.67	6.95	6.50
Calcio	0.96	0.90	0.82
Fósforo total	0.80	0.76	0.64
Fósforo disponible	0.48	0.45	0.41
BDE, mEq/kg	257	247	224
Lisina digestible	1.28	1.15	1.07
Metionina digestible	0.53	0.45	0.44
Total AAS	0.81	0.72	0.70
Treonina digestible	0.83	0.74	0.70

*Contenido por kg: Zinc 20.000 mg; Hierro: 8.400 mg; Manganeso: 35.000 mg; cobre: 1.700 mg; iodo: 430 mg; Selenio: 60 mg; Vitamina A: 3.440.00UI; Vitamina D3: 680.000UI; Vitamina E: 4.000UI; Colina: 172.000 mg; Niacina: 9.000 mg; Pantotenato de Calcio: 3.060 mg; Vitamina B2: 1.430 mg; Vitamina B2: 1.430 mg; Vitamina K3: 856 mg; Vitamina B12: 4.6 mg.

BDE: balance dietario de electrolitos.

Extracción y análisis de aceites esenciales

Se obtuvieron tres quimiotipos de orégano de un cultivo comercial bajo invernadero en la Sabana de Bogotá, el cual fue mantenido bajo un programa de riego y fertilización de acuerdo a los requerimientos del suelo. Las plantas se llevaron

para su clasificación a la unidad de taxonomía de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Colombia. El AEO de *O. Vulgare L ssp hirtum* importado fue obtenido en Estados Unidos y cultivado en Grecia. La extracción del AEO se hizo por el método de arrastre de vapor en un equipo tipo cleveger durante 3 horas. Los aceites se enviaron para su análisis por GC/MS en el Laboratorio de Cromatografía de la Universidad Industrial de Santander con el fin de identificar los metabolitos secundarios y componentes principales de los AEO.

Prueba de digestibilidad ileal

Los pollos se alimentaron a voluntad desde el día 1 hasta el día 14 con las dietas experimentales de preiniciación. Desde el día 14 a 21, se suministraron las dietas experimentales de iniciación, con 5 g de óxido de cromo como marcador /kg de alimento. El día 22 se sacrificaron 4 pollos por réplica, se removió el tracto gastro intestinal y se colectó la digesta ileal (20 cm desde la unión ileo-cecal). Se mezcló el contenido ileal de los cuatro pollos y se liofilizó, se molió a 0.5 mm y se almacenó a -20 °C hasta su análisis químico (Jamroz *et al.*, 2003; Hernández *et al.*, 2004).

Análisis químico

Tanto en las dietas como en la digesta ileal se determinó el contenido de Nitrógeno por el método Kjeldahl (AOAC, 2006) y se calculó la proteína cruda como $N \times 6.25$. La fracción lipídica se determinó por extracción con éter en equipo Soxhlet durante 6 horas. La energía bruta se determinó en una bomba calorimétrica adiabática (Parr, 1720), y el contenido de cromo se cuantificó por espectrofotometría de absorción atómica. Todos los valores se expresan sobre la base de materia seca. Con los resultados generados del análisis químico se determinó el coeficiente de digestibilidad ileal aparente para la proteína cruda, el extracto etéreo y la energía, según la siguiente ecuación.

$$CDA = 100 - (100 \times (\%MA / \%MCi) \times (\%NC / \%NA))$$

Donde, CDA es el coeficiente de digestibilidad aparente para cada principio nutritivo, %MA es el

porcentaje de cromo en el alimento, %MCi es el porcentaje de cromo en el contenido ileal excretas, %NCi es el porcentaje de nutriente en el contenido ileal, y %NA es el porcentaje de nutriente en el alimento (Virden *et al.*, 2007).

Micrometría del epitelio intestinal

Las muestras se procesaron de acuerdo a la técnica descrita por Wu *et al.* (2004). Se sacrificaron cinco pollos por tratamiento (uno por réplica) a los 3, 7, 14 y 21 días de edad, los pollos se sacrificaron por dislocación cervical. Se tomaron segmentos de aproximadamente 2 cm del punto medio del duodeno, yeyuno e íleon. Se lavaron los segmentos con solución de 0.9% de NaCl para remover el contenido intestinal y se fijaron en formaldehído buferizado al 4%. Se realizaron cortes de 5 μ m, a los cuales se les aplicó una tinción con Hematoxilina-eosina y se ubicaron en láminas para la posterior determinación de las variables morfométricas. Se utilizó el analizador de imágenes computarizado Image Analyzer Leco Instruments® 2001, Versión 2.02, con un aumento de 40X. Se midió la profundidad de la cripta, altura de la vellosidad (l), ancho apical de la vellosidad (a) y ancho en la base (b), sobre 10 vellosidades adyacentes por muestra, categorizadas en buen estado. De estos valores se derivó el área de la vellosidad como $(a+b)/2 \times l$ (Iji *et al.*, 2001).

Análisis estadístico

El estudio se realizó bajo un diseño completamente al azar y los resultados se analizaron usando el procedimiento GLM (General Linear Model) de SAS Institute (2002). Se hicieron análisis estadísticos descriptivos, análisis de varianza y cuando se presentaron diferencias significativas se utilizó la prueba de Tukey para comparar la media de los tratamientos experimentales ($p < 0.05$). Para establecer la relación entre el consumo acumulado de carvacrol y timol con el peso corporal a los 21 días de edad, se hizo un análisis de correlación. El porcentaje de mortalidad de cada tratamiento experimental fue comparado con la mortalidad del grupo control mediante pruebas de Chi Cuadrado.

Resultados

Composición de los AEO

Los componentes mayoritarios fueron el carvacrol, el timol y sus precursores, el ρ -cimeno y el γ -terpineno. *O. Vulgare L ssp hirtum*, procedente de Grecia presentó un 50.8% de carvacrol superior a *O. Vulgare L ssp hirtum* nacional con 21.7%. El contenido de timol se encontró en un nivel más alto en *O. vulgare L* con 21.5%. En *O. majorana* se destaca un contenido especialmente alto de compuestos “sabinilo” con 24.7%, cuando se compara con las otras variedades (0.9-4.7%). Con base en estos resultados y el nivel de inclusión de AEO en la dieta se estimó el aporte de carvacrol, timol y sabibeno y sus derivados (Tabla 2).

Tabla 2. Concentración estimada de carvacrol y timol en las dietas experimentales. ponent of different orégano essential oil chemotypes

Compuestos	mg/kg			
	OH	OM	OL	OG
sabibeno y derivados	11.2	49.4	12.2	1.5
carvacrol	43.4	7.4	8.6	25.4
Thymol	9.4	20.0	43.0	3.8

OH= 200 ppm aceite esencial *O. vulgare L ssp hirtum*.; OL= 200 ppm aceite esencial *O. vulgare L*.; OM= 200 ppm de aceite esencial *O. majorana*; OG= 50 ppm aceite esencial *O. O. vulgare L ssp hirtum*.

Digestibilidad ileal

La DI a los 21 días de edad se presenta en la tabla 3. No se observaron diferencias significativas en la DI de proteína, extracto etéreo y energía en los grupos suplementados con AEO y con AB. Pero el grupo experimental alimentado con antibiótico, superó significativamente la DI de proteína, respecto al grupo control, con valores de 83.7 y 75.3%, respectivamente ($p < 0.05$). Para el extracto etéreo, los grupos AB y OM presentaron la mejor DI, respecto al grupo control con DI 92.3 y 91.7% en relación con 84.2%, respectivamente ($p < 0.05$). Esta tendencia fue similar para los valores de energía. Se observó una correlación significativa ($p < 0.05$) entre la DI de la proteína ($r: 0.67$), el

extracto etéreo ($r: 0.99$) y la energía ($r: 0.91$) con el peso corporal a los 21 días de edad ($p < 0.05$) dentro de los grupos experimentales OH, OM, OG y AB.

Tabla 3. Digestibilidad ileal (%) de pollos de engorde alimentados con AEO en la dieta.

Parámetro	OH	OL	OM	OG	AB	C	EEM*
Proteína	76.2 ^{ab}	76.6 ^{ab}	80.5 ^{ab}	79.6 ^{ab}	83.7 ^a	75.3 ^b	1.763
Grasa	89.2 ^{ab}	90.7 ^{ab}	91.7 ^a	88.5 ^{ab}	92.3 ^a	84.2 ^b	1.577
Energía	69.4 ^{ab}	69.1 ^{ab}	70.6 ^a	67.6 ^{ab}	72.7 ^a	63.0 ^b	1.613

OH= 200 ppm aceite esencial *O. vulgare L ssp hirtum*.; OL= 200 ppm aceite esencial *O. vulgare L*.; OM= 200 ppm de aceite esencial *O. majorana*; OG= 50 ppm aceite esencial *O. O. vulgare L ssp hirtum*, AB= 500 ppm de clortetraciclina; C= control sin aditivo.

^{abc}: promedios con letras diferentes en sentido horizontal, presentan diferencias significativas, $p < 0.05$.

*EEM: error estándar de la diferencia de medias

Micrometría intestinal

En la tabla 4 se muestran los resultados obtenidos en las variables: altura de la vellosidad intestinal, profundidad de la cripta, área de la vellosidad y la relación entre altura de la vellosidad y profundidad de la cripta en yeyuno. No se observaron tendencias claras en función de los diferentes grupos experimentales. Pero cuando se hicieron análisis de correlación global entre estos parámetros con el peso corporal, se encontró una correlación significativa entre altura de la vellosidad en yeyuno a los 3 d con el peso corporal a los 14 d ($r: 0.59$, $p < 0.01$) y a los 42 d ($r: 0.51$, $p < 0.05$) y el área de la vellosidad de yeyuno con el peso a los 14 días ($r: 0.59$, $p < 0.01$) y a los 42 días ($r: 0.56$, $p < 0.01$). El peso corporal a los 21 días de edad mostró una correlación con la altura de la vellosidad y relación altura de la vellosidad: profundidad de cripta de yeyuno a los 14 días de edad ($p < 0.05$), mientras que el peso corporal a los 35 días se asoció con la vellosidad de íleon a los 3 días de edad ($p < 0.05$).

Tabla 4. Micrometría del epitelio intestinal de yeyuno de pollos de engorde alimentados con AEO.

Días	OH	OL	OM	OG	AB	C	EEM*
Altura de la vellosidad (μm)							
3	421 ^{ab}	503 ^a	498 ^a	409 ^{ab}	401 ^{ab}	355 ^b	26.296
7	614	601	667	605	586	645	33.104
14	789	805	879	691	930	1009	83.806
21	920	915	895	969	1096	1009	66.834
Profundidad de cripta (μm)							
3	83 ^{ab}	94 ^{ab}	98 ^a	86 ^{ab}	77 ^{ab}	67 ^b	5.013
7	139 ^{ab}	112 ^b	140 ^{ab}	151 ^{ab}	169 ^a	156 ^{ab}	11.034
14	173	162	197	208	169	168	14.890
21	169	178	168	244	175	168	23.424
Área vellosidad (μm^2)							
3	11.292	18.008	17.223	13.981	13.669	13.875	1.571
7	26.358 ^{ab}	23.151 ^b	28.502 ^{ab}	22.536 ^b	36.875 ^a	25.902 ^{ab}	2.715
14	35.564	42.221	44.204	43.926	43.877	47.002	3.302
21	39.743	40.088	38.456	48.584	46.777	47.002	4.536
Altura vellosidad: profundidad de cripta							
3	5.4	5.4	5.1	4.8	5.3	5.1	0.411
7	4.5 ^{ab}	5.4 ^a	4.9 ^{ab}	4.1 ^{ab}	3.5 ^b	4.1 ^{ab}	0.290
14	4.6	5.4	4.7	3.3	5.5	6.1	0.585
21	5.5	5.4	6.3	4.3	6.3	6.1	0.762

OH= 200 ppm aceite esencial *O. vulgare L. ssp hirtum.*; OL= 200 ppm aceite esencial *O. vulgare L.*; OM= 200 ppm de aceite esencial *O. majorana*; OG= 50 ppm aceite esencial *O. vulgare L. ssp hirtum.* AB= 500 ppm de clortetraciclina; C= control sin aditivo. ^{abc}: promedios con letras diferentes en sentido horizontal, presentan diferencias significativas, $p < 0.05$. *EEM: Error estándar de la diferencia de medias.

Cuando se analizó la longitud de las fracciones del intestino, se encontró que los grupos suplementados con AEO presentaron una mayor longitud en yeyuno e íleon respecto a los grupos no suplementados, AB y C ($p < 0.01$). El consumo de AEO generó un efecto trófico sobre el yeyuno e íleon. Es así como la longitud promedio en yeyuno de los grupos suplementados con AEO fue superior cuando se compara con los grupos no suplementados AB y C, 61.0 vs 54.1 cm en promedio, respectivamente (resultados no reportados).

Comportamiento productivo de los pollos de engorde

El grupo suplementado con *O. majorana*; OM, mantuvo un peso corporal superior, a los 7 días

respecto al grupo OH, a los 14 días respecto a OG y a los 21 días de edad, junto con CP y CN respecto a los grupos OG y OH ($p < 0.05$). Al finalizar el ciclo de producción de 42 días, a pesar de mantenerse OM numéricamente un valor superior en peso corporal con 2.453 g, respecto a los demás grupos experimentales cuyo peso corporal no superó los 2.400 g, estas diferencias no fueron significativas (Tabla 5). Los grupos OM y OL presentaron un mayor consumo de alimento respecto a OH ($p < 0.05$), pero al finalizar estas diferencias no fueron significativas, sin embargo, OH presentó un consumo más bajo (-6.5%) respecto a OL. La mejor conversión alimenticia se obtuvo en la segunda semana con los grupos suplementados con AEO y AB respecto a C ($p = 0.056$); pero la conversión acumulada hasta los 21 días no presentó diferencias significativas entre los grupos experimentales.

Tabla 5. Parámetros productivos de pollos de engorde alimentados con AEO.

Días	OH	OL	OM	OG	AB	C	EEM*
Peso corporal, g							
7	131 ^b	141 ^{ab}	143 ^a	135 ^{ab}	138 ^{ab}	140 ^{ab}	2.621
14	365 ^{ab}	392 ^a	387 ^a	358 ^b	374 ^{ab}	372 ^{ab}	6.613
21	739 ^{ab}	770 ^{ab}	778 ^a	724 ^b	779 ^a	770 ^a	13.181
42	2.359	2.443	2.453	2.385	2.390	2.394	87.248
Consumo de alimento, g/día							
1	15.1 ^b	17.2 ^a	17.0 ^a	15.8 ^{ab}	15.7 ^{ab}	15.3 ^b	0.619
2	41.8 ^b	44.3 ^{ab}	44.0 ^{ab}	41.9 ^b	42.5 ^b	45.7 ^a	0.967
3	74.2	74.8	77.5	72.4	77.1	77.0	2.825
Acum	3.595	3.830	3.764	3.747	3.772	3.790	77.182
Conversión, g:g							
1	1.17	1.20	1.17	1.18	1.14	1.10	0.040
2	1.25 ^b	1.24 ^b	1.27 ^b	1.32 ^{ab}	1.26 ^b	1.38 ^a	0.025
3	1.39	1.39	1.40	1.39	1.33	1.35	0.056
Acum	1.56	1.60	1.56	1.60	1.61	1.62	0.038
Mortalidad, %							
1-42d	5.5 ^b	2.2 ^b	6.7 ^b	8.3 ^b	4.4 ^b	13.3 ^a	0.001*

OH= 200 ppm aceite esencial *O. vulgare L. ssp hirtum.*; OL= 200 ppm aceite esencial *O. vulgare L.*; OM= 200 ppm de aceite esencial *O. majorana*; OG= 50 ppm aceite esencial *O. vulgare L. ssp hirtum.* AB= 500 ppm de clortetraciclina; C= control sin aditivo.

abc: promedios con letras diferentes en sentido horizontal, presentan diferencias significativas, $p < 0.05$. *: Valor de P prueba Chi cuadrado.

*EEM: Error estándar de la diferencia de medias

En el presente estudio, la causa de mortalidad observada fue por ascitis, los pollos presentaron extravasación de plasma en la cavidad toraco-abdominal. Todos los grupos experimentales presentaron diferencias significativas respecto al grupo control ($p < 0.01$). Los grupos suplementados con antibiótico y AEO presentaron una mortalidad promedio por ascitis de 5.42% en comparación con el grupo control, con un promedio de mortalidad de 13.3%.

Relación entre el peso corporal y el consumo de carvacrol

Bajo las condiciones del presente estudio, cuando se relaciona el consumo de carvacrol y timol (en grupos experimentales alimentados con AEO) con el peso corporal, se encontró que los grupos que presentaron un mayor consumo de carvacrol fueron los que obtuvieron el peso corporal más bajo, cuando se compara con los grupos de menor consumo de carvacrol ($p < 0.05$). Por el contrario, los grupos que consumieron más timol fueron los que presentaron un mejor peso corporal ($p < 0.05$). Esto fue confirmado por el análisis de correlación, encontrando un coeficiente de correlación entre el peso corporal y el consumo acumulado de carvacrol a los 21 d de -0.55, y -0.50 a los 42 d ($p < 0.05$). En

contraste, se encontró un coeficiente de correlación positivo entre el peso corporal y el consumo de timol a los 21 días de edad con $r = 0.46$ ($p < 0.05$) hasta los 21 d y 0.37 hasta los 42 d.

Discusión

Composición y clasificación de AEO

El presente estudio se constituye en el primer reporte sobre la evaluación de los tres principales quimiotipos de Orégano, altos en carvacrol (*O. vulgare H*), altos en timol (*O. vulgare L*) y altos en sabibeno y sus derivados (*O. majorana*), cultivados en la Sabana de Bogotá. Los componentes predominantes en *O. vulgare* fueron los compuestos fenólicos carvacrol, timol y sus precursores. Kokkini (1997) reportó similares resultados en *O. vulgare*. En el presente estudio, carvacrol, timol, γ -terpineno y p-cimeno, sumados totalizaron 61.24% en *O. vulgare L* y 67.01% en *O. Vulgare L ssp hirtum*. La superioridad en el contenido de carvacrol del AEO importado, estaría explicada posiblemente por las condiciones agroecológicas diferentes en los sistemas de producción bajo invernadero en la Sabana de Bogotá. Sangwan (2001) señala que las vías

metabólicas de síntesis de metabolitos secundarios en las plantas medicinales son moduladas por la fisiología de la planta y factores ambientales que la afectan, como la ontogenia de la planta, la fotosíntesis, el fotoperiodo, el clima, la intensidad de luz, la humedad, entre otros, los cuales pudieron determinar la composición de las variedades estudiadas en el presente trabajo.

Se ha generalizado que el AEO procedente de *O. vulgare L. ssp. hirtum*, conocido también como orégano Griego, es el de mejor calidad, debido a su alto contenido de carvacrol y alto rendimiento de aceite esencial (7 ml/100 g MS), mostrando contenidos de carvacrol entre 79.5 y 93%, por lo que se clasifica a esta subespecie como un orégano tipo carvacrol (Goliaris et al., 2002). Sin embargo, en las especies cultivadas en la Sabana de Bogotá, el contenido de carvacrol no superó el 22%. *O. vulgare L.*, por el contrario, mostró un contenido mayor de timol. Mockute et al. (2001) comprobaron altos contenidos de timol en algunos quimiotipos de *O. vulgare L. ssp. vulgare* en Italia. En *O. majorana*, por el contrario, el componente mayoritario fue el transhidrato de sabibeno, característico de este quimiotipo; Kokkini (1997) también encontró que sabibeno es el componente mayoritario de *O. majorana*. Estos resultados indican que a pesar de la variación en la composición de aceites esenciales por efecto del ambiente, la quimiotipificación puede ser una herramienta útil para la clasificación y valoración funcional del orégano.

Digestibilidad ileal

La secreción de enzimas y jugos digestivos es un factor esencial para la digestión de los alimentos. Los extractos de plantas pueden estimular la producción de saliva y jugos gástricos, ácidos biliares y jugo pancreático, favoreciendo el proceso de digestión (Platel y Srinivasan, 2003; Cross et al., 2007). Otro factor asociado con la digestibilidad es el tiempo de permanencia del alimento en su tránsito por el TGI. Manzanilla et al. (2004) comprobaron que una mezcla de extractos de plantas modificaron la tasa de vaciado del estómago en cerdos destetos. Posiblemente, estos efectos soportan y explican la mejor digestibilidad ileal obtenida en el presente estudio con la inclusión

de AEO respecto al grupo control. Hernández et al. (2004) encontraron que la inclusión de una mezcla de extractos de plantas (orégano, canela y tomillo) en la dieta de pollos de engorde mejoró la digestibilidad ileal y total de materia seca, extracto etéreo y almidón, pero no encontraron efectos sobre la digestibilidad de la proteína. En el presente estudio sí se observó una mejor DI para la proteína con la inclusión de AEO y AB en la dieta de pollos de engorde.

Si bien son diversos los factores que afectan la eficiencia alimenticia, tales como un incremento en el consumo de alimento, una reducción de los requerimientos de mantenimiento, una reducción de la grasa corporal y un incremento en la digestibilidad y metabolizabilidad de la dieta, cerca del 97% de la variación de la metabolizabilidad, está explicada por la variación en la digestibilidad (Mignon-Grasteau et al., 2004); lo cual podría explicar la asociación directa encontrada entre la digestibilidad ileal de la proteína, la grasa y la energía con el peso corporal de los pollos de engorde. La edad es otro factor determinante de la digestibilidad, Noy y Sklan (1995) explicaron que a las 3 semanas de edad se observa una estrecha correlación entre el consumo de alimento y la digestibilidad, porque el TGI alcanza su máximo desempeño digestivo en términos enzimáticos. Sin embargo, cuando se analiza el grupo control, a pesar de presentar un menor porcentaje de digestibilidad, el peso corporal fue comparable a los grupos experimentales OM y AB. Este comportamiento se explicaría posiblemente porque, si bien hay compartimentos determinantes para la expresión productiva de los animales, tales como el digestivo, dicha expresión es de carácter multifactorial, y posiblemente factores como la densidad de aves debido a una mayor mortalidad en estos grupos experimentales, mayor disponibilidad de equipo y confort, mejoraron el comportamiento de los pollos de engorde.

Micrometría intestinal

La estructura y la función de la mucosa intestinal depende del balance entre la proliferación, migración y apoptosis (Murakami et al., 2007). La función principal de las células de las criptas es

secretora y las células del epitelio son absorptivas. Similares resultados encontraron Yamauchi *et al.* (2006) quienes reportaron una asociación entre un mejor comportamiento de los pollos de engorde y una mayor altura y área de la vellosidad intestinal por efecto de la inclusión de extracto de caña; de otra parte, Xia *et al.* (2004) asoció una mayor relación vellosidad:cripta en intestino delgado de pollos a un menor contenido de *E. coli* y *Clostridium*. En contraste, Miles *et al.* (2006) obtuvieron una reducción en el área total de la vellosidad, la altura de la vellosidad y profundidad de la cripta en íleon por efecto de la inclusión de Virginiamicina, sin observar una relación directa de estos parámetros con el comportamiento productivo de los pollos de engorde. Por el contrario, en el presente estudio, los parámetros de la vellosidad intestinal de yeyuno estuvieron relacionados con el peso corporal a los 14, 21 y 42 días de edad de los pollos de engorde.

En general, se afirma que el estado de las vellosidades intestinales y células epiteliales es un buen indicador de la absorción de nutrientes, de tal forma que las alteraciones en la histología intestinal se podrían asociar con la dieta, activando las funciones intestinales para promover el crecimiento y la inmuno-estimulación (Yamauchi *et al.*, 2006), pero como se indicó anteriormente, los resultados de los diferentes estudios en pollos de engorde, son aún contrastantes en este aspecto.

Analizando el crecimiento de la vellosidad, se reporta que el desarrollo completo de la vellosidad en yeyuno e íleon se logra 14 días post nacimiento (Uni, 1999), pero en el presente estudio se encontró que el crecimiento se mantuvo hasta 21 días, incluso, Kondo (2003) observó un desarrollo gradual hasta 36 días post nacimiento. Los antioxidantes como la vitamina E se han asociado a un mejor desarrollo de la mucosa intestinal en pollos de engorde. Considerando que los AEO tienen un efecto antioxidante, podría esperarse un efecto positivo sobre el epitelio intestinal (Murakami *et al.*, 2007). Sin embargo, no hubo una respuesta clara por efecto de la suplementación de los AEO en el presente estudio.

Comportamiento productivo

Los resultados de los efectos de AEO no han sido muy consistentes, mientras que Botsoglou *et al.* (2002) no reportaron efectos de los AEO en el crecimiento de pollos de engorde, otros estudios han encontrado un mejor comportamiento productivo (Giannenas *et al.*, 2003). Los efectos positivos de los extractos de plantas sobre el comportamiento de los pollos de engorde también han sido atribuidos a su actividad antimicrobiana, Jamroz *et al.* (2005) observaron una reducción de *E. coli*, *C. perfringens* y hongos, así como un aumento de *Lactobacillus* spp por efecto de la suplementación con una mezcla de capsaicina, cinamaldehído y carvacrol. Sin embargo, Ultee *et al.* (2002) señalan también que si bien la actividad antibacteriana de carvacrol y timol se basa en su efecto desestabilizante de la membrana celular bacteriana, este efecto podría conducir a problemas secundarios en el animal, si no se dosifica adecuadamente.

En el presente estudio, los grupos suplementados con AEO de mayor contenido de carvacrol fueron los que presentaron un menor peso corporal. En estudios previos se ha comprobado que el carvacrol puede presentar respuestas adversas en el consumo de alimento y ganancia de peso corporal, como lo reportaron Lee *et al.* (2003b) con la inclusión de 200 ppm de carvacrol en la dieta de pollos de engorde.

Dušan *et al.* (2006) comprobaron también un efecto citotóxico de AEO comerciales con 55% de carvacrol sobre células Caco-2 en dosis altas, pero con dosis media (0.37 mM) la toxicidad y muerte celular fue baja. Posiblemente la dilución en la que se utilice el AEO así como el vehículo sea un factor importante para considerar en el desarrollo de un producto a nivel comercial. Force *et al.* (2000) advirtieron que una exposición de la mucosa intestinal a AEO concentrados, no emulsionados, puede causar irritación localizada. Con los niveles de inclusión utilizados en el presente estudio, los AEO ricos en carvacrol no tuvieron los efectos positivos esperados, lo cual sugiere que el nivel de inclusión puede ser un factor determinante en la respuesta productiva de los pollos de engorde.

En este estudio se comprobó que los AEO procedentes de distintos quimiotipos de orégano pueden tener efectos diferentes sobre el comportamiento productivo de los pollos de engorde, lo cual pudo estar directamente relacionado con el contenido y proporción de carvacrol y timol de los mismos, así como de otros metabolitos secundarios dominantes como sabibeno en *O. majorana*. Constituyéndose en el primer estudio que evalúa el efecto de los tres principales quimiotipos de AEO sobre el comportamiento de pollos de engorde; así como el primer trabajo que reporta asociaciones entre diferentes niveles de consumo de carvacrol y de timol con la expresión productiva de los pollos de engorde. Cross *et al.* (2007) llegaron a conclusiones similares cuando evaluaron la inclusión de extractos de plantas de diferentes especies. Se destaca principalmente una respuesta diferencial frente al consumo de timol, el cual estuvo positivamente asociado con el consumo de alimento y peso corporal. Lee *et al.* (2003b) comprobaron también con la inclusión de 200 ppm de timol no se presentan efectos adversos observados con el consumo de carvacrol.

La calidad de la dieta y las condiciones ambientales son factores importantes cuando se evalúa la respuesta productiva de los pollos de engorde frente al uso de aditivos. Lee *et al.* (2003a) concluyeron que posiblemente, bajo condiciones ambientales menos higiénicas que las experimentales o con dietas de baja digestibilidad se podría obtener efectos positivos de los constituyentes de extractos de plantas. En efecto, cuando se ha evaluado AEO comerciales con reto con coccidia, se mejora el comportamiento productivo de los pollos de engorde (Giannenas *et al.*, 2003). Se ha demostrado también que el ambiente en el cual se crían los animales podría modificar la microflora intestinal y el grado de contaminación ambiental afectando la respuesta de los pollos de engorde a los promotores de crecimiento (Tannok, 1998). Las aves levantadas en piso pueden mostrar más infección con patógenos que las levantadas en batería (Willis *et al.*, 2002). Esto podría explicar que bajo las condiciones experimentales del presente estudio, en batería, no se observaron efectos significativos de los aditivos promotores de crecimiento, AEO y AB, sobre el

peso corporal y la conversión de alimento en pollos de engorde.

Finalmente, con la inclusión de aditivos AEO y AB en la dieta de los pollos de engorde se redujo en un 59.2% la mortalidad por ascitis. Este comportamiento podría estar explicado por un mejor desempeño y homeostasis del tracto gastrointestinal. Los aceites esenciales de orégano tienen también propiedades antiinflamatorias y potenciadoras del sistema inmune que podrían explicar los efectos positivos de estos AEO. Los trabajos de Chichlowski *et al.* (2007) encontraron la mejor eficiencia metabólica vía cambios en la fisiología intestinal, alterando las citoquinas pro y antiinflamatorias, reduciendo en un 17% el consumo de oxígeno (demanda) en toda la masa corporal vía reducción del metabolismo intestinal, con la inclusión de un probiótico en la alimentación de pollos de engorde.

La alteración de la función inmune puede incrementar la tasa metabólica hasta en un 27% (Martin *et al.*, 2003) y este tipo de aditivos por su efecto modulador de la respuesta inmune e inflamatoria, podrían generar una reducción de la tasa metabólica, la demanda de oxígeno y la susceptibilidad al síndrome ascítico. Sin embargo, se requieren estudios más precisos a este nivel para comprobar bajo condiciones de estrés de altitud y frío los mecanismos por los cuales los AEO y los AB lograron reducir la mortalidad por ascitis.

En conclusión, bajo las condiciones del presente estudio, se pudieron comprobar otros efectos funcionales para los AEO, como una mejor digestibilidad ileal para la proteína, grasa y energía. El comportamiento productivo de pollos de engorde alimentados con AEO se asoció directamente con el consumo de timol. Estos resultados podrían abrir posibilidades de investigación y de mercado con variedades nativas con un alto contenido de timol, adaptadas a condiciones áridas y en ambientes extremos de América tropical.

Agradecimientos

Los autores agradecen a la Universidad de La Salle por la financiación del estudio,

CORPOICA donde se hizo el experimento, Dr. Aureliano Hernández, director del Laboratorio de Morfofisiología, Laboratorio de Cromatografía de la Universidad Industrial de Santander, Dr. Luis Enrique Cuca, dir. Lab. Fitoquímica, por sus recomendaciones para la extracción y manejo de los aceites esenciales.

Referencias

- AOAC International. Official Methods of Analysis of AOAC International. 18th ed. Assoc. Off. Anal. Chem., Arlington, VA; 2006.
- Baricevic D, Bartol T. The biological/pharmacological activity of the *Origanum* Genus. In: Spiridon EK, editors. Oregano, the genera *Origanum* and *Lippia*. New York: Taylor & Francis Inc.; 2002. p.177-201.
- Botsoglou NA, Florou-Paner P, Christaki E, Didry DJ, Fletouris NL, Spais AB. Effect of dietary oregano essential oil on performance of chickens and on iron-induced lipid oxidation of breast, thigh and abdominal fat tissues. *Br Poult Sci* 2002; 43:223-230.
- Castanon JIR. History of the use of antibiotic as growth promoters in European poultry feeds. *Poult Sci* 2007; 86:2466-2471.
- Chichlowski M, Croom J, McBride BW, Daniel L. Direct-fed microbial PrimaLac and salinomycin modulate whole-body and Intestinal mucosal cytokine production in broiler chick. *Poult Sci* 2007; 86:1100-1106.
- Cross DE, Mcdevitt RM, Hillman K, Acamovic T. The effect of herbs and their associated essential oils on performance, dietary digestibility and gut microflora in chickens from 7 to 28 days of age. *Br Poult Sci* 2007; 48:496-506.
- Dibner JJ, Richards JD. Antibiotic growth promoters in agriculture: history and mode of action. *Poult Sci* 2005; 84:634-643.
- Dušan F, Sabol M, Katarína D, Dobroslava B. Essential oils their antimicrobial activity against *Escherichia coli* and effect on intestinal cell viability. *Toxicol in vitro* 2006; 20:1435-1445.
- Force M, Sparks WS, Ronzio RA. Inhibition of enteric parasites by emulsified oil of oregano *in vivo*. *Phytother Res* 2000; 14:213-214.
- Giannenas I, Florou-Paneri P, Papazahariadou M, Christaki E, Botsoglou NA, Spais AB. Effect of dietary supplementation with oregano essential oil on performance of broilers after experimental infection with *Eimeria tenella*. *Arch Anim Nutr* 2003; 57:99-106.
- Goliaris AH, Chatzopoulou PS, Katsiotis ST. Production of new Greek oregano clones and analysis of their essential oils. *J Herbs Spices Med Plants* 2002; 10:29-35.
- Hernández F, Madrid J, García V, Orengo J, Megía MD. Influence of two plant extracts on broilers performance, digestibility, and digestive organ size. *Poult Sci* 2004; 83:169-174.
- Iji PA, Saki A, Tivey DR. Body and intestinal growth of broiler chicks on a commercial starter diet. 1. Intestinal weight and mucosal development. *Br Poult Sci* 2001; 42:505-513.
- Jamroz D, Orda J, Kamel C, Wiliczekiewicz A, Wartelecki T, Skorupinska J. The influence of phytogetic extracts on performance, nutrient digestibility, carcass characteristics and gut microbial status in broiler chickens. *J Anim Feed Sci* 2003; 12:583-596.
- Jamroz D, Wiliczekiewicz A, Wartelecki T, Orda J, Sukorupinska J. Use of active substances of plant origin in chicken diets based on maize and locally grown cereals. *Br Poult Sci* 2005; 46:485-493.
- Jang IS, Ko YH, Kang SY, Lee CY. Effect of a commercial essential oil on growth performance, digestive enzyme activity and intestinal microflora population in broiler chickens. *Anim Feed Sci Technol* 2007; 134:304-315.
- Kokkini S. Taxonomy, diversity, and distribution of *Origanum* species. Proceedings of the IPGRI International Workshop on Oregano, CIHEAM, Valenzano (Bari), Italy 1997; 1:2-11.
- Kondo N. Estudo das características morfológicas de diferentes regiões do intestino delgado e índices zootécnicos em quatro linhagens de frangos de corte. Tese de Doutorado. Facultad de Medicina Veterinária e Zootectia. Universidade Estadual Paulista, Botucatu, Brazil. 2003.
- Lee KW, Everts H, Kappert HJ, Frehner M, Losa R, Beynen AC. Effect of dietary essential oils on growth performance, digestive enzymes and lipid metabolism in female broiler chickens. *Br Poult Sci* 2003a; 44:450-457.
- Lee KW, Everts H, Kappert HJ, Yeom KH, Beynen AC. Dietary carvacrol lowers body weight gain but improves feed conversion in female broiler chickens. *J Appl Poult Res* 2003b; 12:394-399.
- Manzanilla EG, Perez JF, Martin M, Kamel C, Baucells F, Gasa J. Nov effect of plant extracts and formic acid on the intestinal equilibrium of early-weaned pigs. *J Anim Sci* 2004; 82:3210-3218.
- Martin LB, Scheuerlein A, Wikelski M. Immune activity elevates energy expenditure of house sparrows: A link between direct and indirect costs? *Proc Biol Sci* 2003; 270:153-158.
- Mignon-Grasteau S, Muley N, Bastianelli D, Gomez J, Péron A, Sellier N, Millet N, Besnard J, Hallouis J-M, and Carré B. Heritability of digestibilities and divergent selection for digestion ability in growing chicks fed a wheat diet. *Poult Sci* 2004; 83:860-867.
- Mitsch P, Zitterl-Eglseer K, Kohler B, Gabler C, Losa R, Zimpenik I. The effect of two different blends of essential oil components on the proliferation of *Clostridium perfringens* in the intestines of broiler chickens. *Poult Sci* 2004; 83:669-675.

- Mockute D, Bernotiene G, Judzentiene A. The essential oil of *Origanum vulgare* L. ssp. *vulgare* growing wild in Vilnius district (Lithuania). *Phytochemistry* 2001; 57:65-69.
- Nitsas FA. Pharmaceutical composition containing herbal-based active ingredients; methods for preparing same and uses of same for medical and veterinary purposes. United States Patent 6, 106, 838, 22 August; 2000.
- Noy Y, Sklan D. Digestion and absorption in the young chick. *Poult Sci* 1995; 74:366-373.
- Platel K, Srinivasan K. Stimulatory influence of select spices on bile secretion in rats. *Nutr Res* 2003; 20:1493-1503.
- Rostagno HS, Albino LFT, Donzele JL. Composição de alimentos e exigências nutricionais. Tabelas brasileiras para aves e suínos; 2ª ed. Editora UFV, Viçosa; 2005.
- Russo M, Galletti GC, Bocchini P, Carnacini A. Essential oil chemical composition of wild populations of Italian oregano spice (*Origanum vulgare* ssp. *hirtum* (Link) Ietswaart): A preliminary evaluation of their use in chemotaxonomy by cluster analysis. 1. Inflorescences. *J Agric Food Chem* 1998; 46:3741-3746
- Sangwan NS, Farooqi AHA, Shabih F, Sangwan RS. Regulation of essential oil production in plants. *Plant Growth Regul* 2001; 34:3-21.
- SAS. SAS Procedures Guide (Version 9). SAS Inst. Inc., Cary, NC.; 2002
- Tannock GW. Studies of intestinal microflora: a prerequisite for the development of probiotics. *Int Dairy J* 1998; 8:527-533.
- Ultee A, Bennik MHJ, Moezelaar R. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Appl Environ Microbiol* 2002; 68:1561-1568.
- Uni Z. Functional development of the small intestine in domestic birds: cellular and molecular aspects. *Poult Avian Biol Rev* 1999; 10:167-179.
- Viriden W S, Lilburn MS, Thaxton JP, Corzo A, Hoehlerddagger D, Kidd MT. The effect of corticosterone-induced stress on amino acid digestibility in Ross broilers. *Poult Sci* 2007; 86:338-342.
- Williams P, Losa R. Blending essential oils for poultry. *Feed Mix* 2002; 10:8-9.
- Willis WL, Murray C, Talbott C. *Campylobacter* isolation trends of cage versus floor broiler chickens: one year study. *Poult Sci* 2002; 81:629-631.
- Wu YB, Ravindran V, Thomas DG, Birtles MJ, Hendriks WH. Influence of phytase and xylanase, individually or in combination, on performance, apparent metabolisable energy, digestive tract measurements and gut morphology in broilers fed wheat-based diets containing adequate level of phosphorus. *Br Poult Sci* 2004; 45:76-84.
- Zhang KY, Yan F, Keen CA, Waldroup PW. Use of essential oils and organic acids in diets for broiler chickens. *Int J Poult Sci* 2005; 4:612-619.