

VIDA ÚTIL Y BENEFICIOS DE LOS NUTRACÉUTICOS COMO ALTERNATIVAS AL ÓXIDO DE ZINC

Shelf life and benefits of oregano and purple garlic as an alternative to zinc oxide.

Torrallbo Martín, A.¹, Serrano-Jara, D.², Cubero Pablo M.J.¹, Jordán Bueso, M.J.³, Martínez-Conesa, C.³, Rivera-Gomis, J.⁴

1. Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Campus de Excelencia Internacional “Campus Mare Nostrum”, Universidad de Murcia, 30100, Murcia, Espinardo, España. andrea.torrallbom@um.es, mjcubero@um.es.
2. Institución Universitaria de Investigación e Innovación Agroalimentaria y Agroambiental. Carretera de Beniel, km 3,2, 03312 Orihuela (Alicante), d.serrano@umh.es
3. Grupo de Investigación en Agricultura de Secano para el Desarrollo Rural, Departamento de Desarrollo Rural, Enología y Agricultura Sostenible, Instituto Murciano de Investigación y Desarrollo Agroalimentario (IMIDA), 30150, Murcia, La Alberca de Las Torres, España. mariaj.jordan@carm.es, cristina.martinez4@carm.es.
4. Centre for Epidemiology and Planetary Health, Department of Veterinary and Animal Science, Northern Faculty, Scotland’s Rural College, RAVIC, 9 Inverness Campus, Inverness, IV2 5NA, Scotland, UK. Jorge.Gomis@sruc.ac.uk.

Autor para correspondencia: Daniel Serrano-Jara, d.serrano@umh.es

Tipo de artículo: Trabajo Fin de Grado (Veterinaria)

Recibido: 31/07/2024

Aceptado: 20/09/2024

RESUMEN

El destete es una de las etapas más críticas en la producción porcina, con frecuentes diarreas. Se ha utilizado ampliamente el óxido de Zinc (ZnO), hasta su prohibición en Europa en 2022. Los compuestos bioactivos del orégano y el ajo morado fueron investigados por sus propiedades medicinales, y podrían ser alternativas al ZnO y a los antibióticos.

Se compararon siete tratamientos dietéticos: un grupo control negativo (dieta basal), un grupo control positivo con ZnO (2500 mg/kg de alimento), dos grupos con aceite esencial de orégano al 0.4% y al 1.2% respectivamente, dos grupos con moltura de ajo morado al 0.4% y al 2% respectivamente, y un grupo con aceite esencial de orégano al 1.2% combinado con moltura de ajo morado al 2%. Los tratamientos se realizaron tras el destete a los 21 días, durante 2 semanas en el pre-estárter y durante 5 semanas en el estárter. Al finalizar las 10 semanas, los lechones se pesaron y se realizó la necropsia para tomar muestras de yeyuno e íleon y evaluar su morfometría. Hemos estudiado el impacto de la degradación de los nutracéuticos durante su almacenamiento en los silos, así como su repercusión sobre la morfometría del yeyuno e íleon y su influencia en la ganancia media diaria y el índice de conversión.

Al evaluar la degradación de los compuestos bioactivos en los piensos, almacenados durante 5 semanas, se identificó una pérdida del 30% tanto en el orégano como en el ajo morado. No obstante, no hubo diferencias significativas en el rendimiento productivo y la morfometría intestinal entre el tratamiento con ZnO y el combinado de moltura de ajo morado al 2% y el aceite esencial de orégano al 1.2%. En conclusión, estas dosis son una buena alternativa como promotores del crecimiento y para la prevención de la diarrea post-destete.

Palabras clave: lechones, aceite de orégano, ajo morado, estabilidad, beneficios.

ABSTRACT

Weaning is one of the most critical stages in pig production, often giving rise to diarrhoea. ZnO has been widely used, until its ban in Europe in 2022. The bioactive compounds of oregano and purple garlic are the subject of study in this research for their medicinal properties and could be alternatives to ZnO and antibiotics.

Seven dietary treatments were compared: a negative control group (basal diet), a positive control group with zinc oxide (2500 mg/kg of food), two groups with oregano essential oil at 0.4% and 1.2%, respectively, two groups with ground purple garlic at 0.4% and 2% respectively, and one group with oregano essential oil at 1.2% combined with ground purple garlic at 2%. The treatments were carried out after weaning at 21 days, for 2 weeks in the pre-starter and for 5 weeks in the starter. At the end of 10 weeks, the piglets were weighed, and necropsy was performed to take samples of the jejunum and ileum and evaluate their morphometry. We have studied the impact of the degradation of nutraceuticals during their storage in silos, as well as its impact on the morphometry of the jejunum and ileum and its influence on productive performance such as average daily gain and conversion rate.

When evaluating the degradation of bioactive compounds in feed, stored for 5 weeks, it was concluded that there was a 30% loss in both oregano and purple garlic. However, there were no significant differences in productive performance and intestinal morphometry between the treatment with zinc oxide and the combination of 2% ground purple garlic and 1.2% oregano essential oil. In conclusion, these doses are a good alternative as growth promoters and for the prevention of post-weaning diarrhoea.

Key words: piglets, oregano oil, purple garlic, stability, benefits.

INTRODUCCIÓN

La resistencia a los antimicrobianos es un importante problema de salud pública que debe ser abordado en diversos frentes y por diferentes agentes (EFSA 2024). Las estrategias de alimentación encaminadas a sustituir fármacos son una prioridad para optimizar la producción porcina (Luise et al., 2023) Las soluciones naturales para mejorar la salud de los animales y

reducir la dependencia de los antimicrobianos están adquiriendo cada vez más importancia y los aceites esenciales podrían ser una solución (Hall et al., 2021)..

El óxido de zinc se emplea para mejorar el crecimiento y reducir las patologías digestivas en los lechones destetados (Han & Thacker, 2010). El zinc modifica la microbiota intestinal y tiene actividad antimicrobiana (Ortiz Sanjuán et al., 2024). Pero implica inconvenientes, con-

taminación ambiental por la alta proporción excretada en las heces, efectos tóxicos sobre el lechón por exposición prolongada y cambios en la población bacteriana gastrointestinal. Por todo ello, se ha prohibido su uso desde 2022 en la Unión Europea (Rivera-Gomis et al., 2020).

El destete es una etapa crítica porque el sistema inmune está inmaduro (Davis et al., 2006) y los lechones se estresan por la separación temprana de la madre, los cambios de alimentación y de ambiente (Lallès et al., 2007). Estos factores provocan disbiosis intestinal con proliferación de bacterias patógenas e inflamación de las mucosas, que evolucionan hacia diarrea (Schokker et al., 2015). Todo ello se traduce en disminución del rendimiento digestivo, malabsorción de nutrientes, menor crecimiento y pérdidas económicas (Serrano-Jara et al., 2023).

Los fitógenos son derivados botánicos que pueden emplearse como promotores del crecimiento y estimulantes del sistema inmune (Dhama et al., 2015, Zare et al., 2021). Los aceites esenciales obtenidos de plantas son el mayor grupo de aditivos fitógenos para los piensos. Las sustancias bioactivas más usadas en este tipo de estudios son el carvacrol, el eugenol, el cinamaldehído, el timol y la capsaicina (Luise et al., 2023). Estos compuestos volátiles se han usado históricamente en la nutrición humana y animal por su sabor, pero más recientemente por sus propiedades funcionales (Hall et al., 2021).

El ajo (*Allium sativum*) se ha usado desde la antigüedad por sus propiedades preventivas y curativas (Santhosha et al., 2013, K. H. Wang et al., 2009). La moltura de ajo morado (MAM) contiene fitoquímicos con efectos sinérgicos entre ellos, incluyendo: ajoenos (E-ajoeno, Z-ajoeno), tiosulfatos (alicina), vinilditiinas (2-vinil-(4H)-1,3-ditiina, 3-vinil-(4H)-1,2-ditiina), sulfuros (dialilo disulfuro (DADS) y trisulfuro de dialilo (DATS). La alicina (tiosulfato de alilo) es el compuesto más activo. Los compuestos fitoquímicos del ajo tienen diversos beneficios, antiinflamatorios (Gu et al., 2013),

anticancerígenos, antioxidantes, antimicrobianos y antifúngicos (Davis, 2005).

El aceite esencial de orégano (*Origanum vulgare* L) está registrado como aditivo para piensos en la UE (Hofmann et al., 2022). Es capaz de aumentar la altura de las vellosidades (Zou et al., 2017), posee propiedades antiinflamatorias y antimicrobianas (Suntres et al., 2015) y los compuestos fenólicos son antioxidantes (Kulisic et al., 2004). El carvacrol y el timol tienen actividad bactericida contra *E. coli* (Zou et al., 2017, Tan et al., 2015). Además, mejora el crecimiento en cerdos destetados, así como en otras especies como corderos y pollos de engorde (Rivera-Gomis et al., 2020). El aceite esencial de orégano (AEO) crea una barrera física contra los microorganismos en el intestino, al inducir mayor producción de glico-conjugados, lo que mejora la resistencia a las enfermedades y el rendimiento del crecimiento (Niu et al., 2024). Según Luise et al., (2023), la combinación del carvacrol, timol y cinamaldehído mantiene el balance antioxidante y reduce la inflamación intestinal en cerdos tras el destete.

Tanto la alicina como el carvacrol son sustancias volátiles y, por tanto, inestables. La inestabilidad da lugar a su degradación por oxidación durante el almacenaje en los silos. Esta oxidación se ve afectada por la exposición a la humedad, al oxígeno y a la luz (Liu et al., 2018). El oxígeno y el agua pueden ser responsables de la oxidación de la alicina, dando como resultado disulfuros de dialilo y, por otro lado, de la oxidación de carvacrol que da lugar a la timoquinona (Tessaro et al., 2022).

Dado que los componentes bioactivos del ajo y el orégano son propensos a cambios de concentración en el pienso y no se ha investigado previamente la estabilidad de estos aditivos alimentarios resulta imprescindible llevar a cabo este estudio sobre su comportamiento tanto en el pienso pre-estárter como en el estándar una vez almacenados en silos. La finalidad de este trabajo es evaluar la degradación de los componentes bioactivos del aceite esencial de

orégano y de la moltura de ajo morado tras su almacenamiento en silos y estudiar el efecto de la concentración final consumida por los lechones en la salud intestinal y los parámetros productivos en la fase de cría.

MATERIAL Y MÉTODOS

Animales, alojamiento y diseño experimental.

Los protocolos experimentales que se usaron en el estudio fueron aprobados, con código de autorización 471/2018, gracias al Comité Ético de Experimentación Animal (CEEA) de la Universidad de Murcia. Además, se ha tenido en cuenta la legislación vigente en referencia al bienestar animal en la UE para el manejo de los animales (Ley 7/2023 del 28 de marzo).

Los lechones son cruce de Large White, Pietrain y Landrace. El destete tuvo lugar a los 21 días de edad y el sacrificio a las 10 semanas de edad. Se alojaron en condiciones de granja comercial en la empresa Dalland Hybrid España S.A ubicada en Fortuna (Región de Murcia).

Se realizaron 7 tratamientos experimentales en los lechones: una dieta basal de grupo con-

trol, sin ZnO ni ningún tipo de aditivo experimental; ZnO (2500 mg de Zn/kg de pienso); AEO 0.4%; AEO 1.2%; MAM 0.4%; MAM 2%; AEO 1.2% + MAM 2%. Cabe mencionar que el ZnO que se administró fue Zincotrax (Andrés Pinaluba S.A., Tarragona, España). La moltura de ajo morado se obtuvo de Adibio S.L. (Teruel, España). El aceite esencial de orégano se adquirió de la empresa Esencias Martínez Lozano S.A (Murcia, España). Se presentó en cápsulas de 800 µm, recubierto de una capa de mono y diglicéridos de ácidos grasos comestibles y grasa de girasol hidrogenada. El encapsulado se llevó a cabo por la compañía Capselos SL. (Huesca, España).

En cada uno de los 7 grupos se utilizaron 50 animales, 25 hembras y 25 machos, siendo un total de 350. Al realizar 10 réplicas de cada uno, el volumen total de animales en el estudio productivo fue 3500 lechones. En cada grupo se sacrificaron 2 animales, al ser replicados 10 veces, el total de animales en el estudio morfométrico fue 140. Cada réplica tuvo una duración de 7 semanas, desde el destete hasta el final del período de transición (Tabla 1).

Tabla 1. Distribución de grupos, réplicas y animales.

Grupo	Réplicas	Animal/Réplica	Animal/Grupo
Dieta basal	10	2	20
ZnO	10	2	20
AEO 0.4%	10	2	20
AEO 1.2%	10	2	20
MAM 0.4%	10	2	20
MAM 2%	10	2	20
AEO 1.2%+MAM 2%	10	2	20
Total		14	140

AEO: aceite esencial de orégano; MAM: moltura de ajo morado.

Los parámetros productivos estudiados fueron el consumo medio diario (CMD), la ganancia media diaria (GMD), el peso corporal final (PCF) y el índice de conversión (IC).

Composición de los aditivos y del pienso

Durante 2 semanas, tras el destete, los lechones se alimentaron con pienso pre-estárter, y hasta las 10 semanas de edad se les dio el pienso estándar.

La dieta control propuesta satisface las necesidades energéticas y nutricionales de los lechones durante el destete. Los principales compuestos de AEO fueron carvacrol (70.32%) y timol (4.10%). El MAM contiene 63% de ajo morado, además de ácido salicílico (E-551) y ácido cítrico como aditivos.

Análisis cuantitativo de los componentes bioactivos en el pienso: estabilidad del almacenaje

Se fabricaron dos lotes de pienso, uno pre-estárter y otro estándar, que fueron enriquecidos con los aditivos a estudiar, justo antes de incluirlos en la dieta de los animales. Durante el almacenaje de los piensos en la granja comercial, se recogían muestras al inicio y al final de cada dieta experimental. Ambos lotes se mantuvieron en los silos durante 15 días (pre-estárter) y 34 días (estárter), que respectivamente hacen referencia a las muestras inicial y final. Estas muestras se mantenían en bolsas de vacío, almacenadas a -80°C hasta su análisis por triplicado.

Extracción de compuestos bioactivos del pienso con moltura de ajo morado (MAM)

Tras sacar del silo las muestras iniciales a los 15 días y finales a los 34 días, se homogeneizaron y se redujeron a partículas con un tamaño inferior a 0.5 mm. Se aislaron los compuestos bioactivos usando el método de extracción só-

lido/líquido. Se añadieron 2 mL de un agente extractor compuesto por 70% de metanol, 10% de agua, 10% de acetona y 10% de cloroformo, enriquecido con 5 ppm de hesperidina como estándar interno, a 250 mg de la muestra molida. La mezcla se agitó a 900 oscilaciones por minuto (Vibromático, Selecta, España), durante 30 minutos y se centrifugó otros 10 minutos a $1480 \times g$ para separar el residuo sólido del extracto.

Análisis HPLC-ESI-MS/TOF de extractos de pienso con MAM

La determinación química de los extractos de moltura de ajo morado se realizó mediante cromatografía líquida (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EE.UU., serie 1200) y con espectrometría de masas de alta resolución (LC-QTOF MS/MS), usando un sistema híbrido cuádruple de tiempo de detector de vuelo (Agilent Technologies, modelo 6540) descrito previamente (Molina-Calle et al., 2017).

Para la separación cromatográfica se utilizó una columna C18 de fase inversa (Zorbax Eclipse Plus C18, Santa Clara, CA, USA) de Rápida Resolución HD 3.0 x 150 mm, 1.8 μm). La fase móvil constaba de agua (A) y acetonitrilo (B), ambos acidificados al 0.1% (v/v) con ácido fórmico. Los gradientes de elución fueron: 0 a 1 min, 4% (B); 1 a 6 min, aumento de 4 a 40% (B); de 6 a 10 min, aumento de 40% a 100% de (B); y, para finalizar, durante 10-20 min para asegurar la elución de todos los componentes de la muestra, se mantuvo al 100% (B). El caudal fue de 0.25 ml/min y se inyectaron 2 μl de muestra.

El análisis de espectrometría de masas se llevó a cabo usando una fuente de ionización por electro pulverización, operando en modo de ionización negativa. La detección se realizó considerando un rango de masas de 60 a 1200 m/z, utilizando diferentes energías de colisión (20 y 40 eV). Para la cuantificación de aliin y y-glutamyl-S-alilcisteína, se aplicaron modelos de regresión lineal usando técnicas de dilución

estándar en un rango de cuantificación de 0.1 a 10 mg/ml.

Extracción de compuestos bioactivos de piensos con aceite esencial de orégano (AEO)

Las muestras se homogeneizaron hasta alcanzar un tamaño de <0.5 mm de partícula y se llevó a cabo un método de extracción sólido/líquido. En este caso, mediante sonicación a 40°C, se extrajeron 40 mL de una mezcla de solventes orgánicos (hexano/acetato de etilo 60/40 v/v) con 1 g de alimento pulverizado, durante 15 min, seguido de agitación durante 30 min con un agitador magnético a la misma temperatura y atmósfera inerte. Las mezclas resultantes se centrifugaron durante 10 min a 2000 x g y los sobrenadantes se secaron a 40°C en condiciones de vacío en un sistema evaporador (Syncore Polyvap R-96) (Büchi, Flawil, Suiza). Los residuos secos se volvieron a disolver en metanol y se añadieron 2 ml. Los extractos se mantuvieron en viales a -80°C hasta su correspondiente análisis.

Análisis HPLC de extractos de pienso de AEO

Tanto el análisis cualitativo como cuantitativo de los componentes principales de AEO (carvacrol y timol) se realizó con cromatografía líquida de alta presión acoplada a un dispositivo detector de matriz de diodos (HPLC-DAD 1200 series, Agilent, Waldbronn, Alemania). La separación cromatográfica se llevó a cabo en una columna Zorbax SB-C18 de fase inversa (4.6 x 250 mm, tamaño de poro de 5 µm, tecnologías Agilent, EE.UU.) a temperatura ambiente. La fase móvil fue agua acidificada (ácido fórmico al 0.05%) (A) y acetonitrilo (B). El gradiente utilizado fue: 0 min, 50% B; 5 min, 52% B; 10 min, 55% B; 13 min, 90% B; 15 min, 100% B (mantenido hasta el minuto 22); 25 min, 50% B, con un caudal de 1 ml/min. La longitud de

onda de detección se fijó en 210 nm. Antes de la inyección, las muestras se pasaron a través de un filtro de 0.45 µm (Milipore SAS, Molsheim, Francia) y se inyectaron 20 µl. Para la cuantificación de carvacrol y timol se calcularon modelos de regresión lineal empleando técnicas de dilución estándar. Los resultados se expresaron en mg de compuesto fenólico/g de alimento.

Muestras de yeyuno e íleon para el estudio de los parámetros histológicos

Las muestras de los lechones se tomaron a las 10 semanas de edad. Todos los animales sacrificados pesaron 20 ± 1 kg. Se muestrearon 2 animales por grupo experimental en las 10 réplicas, siendo un total de 140 lechones (Tabla 1). Se recogieron 140 de yeyuno y 140 de íleon.

El procesamiento de las muestras se realizó de acuerdo a Serrano-Jara et al., (2023). Se tomaron 5 cm de yeyuno a 100 cm de la válvula ileocecal y 5 cm de íleon a 10 cm de la válvula ileocecal. Se realizó un corte longitudinal en la mitad de la muestra, obteniendo una porción tubular cerrada y una porción abierta. Los tejidos se colocaron en formol al 10% y se enviaron al Departamento de Anatomía y Patología Comparada de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Murcia, donde se mantuvieron a temperatura ambiente durante 48 horas.

Las muestras se cortaron transversalmente en segmentos y se colocaron en casetes de plástico para reintroducirlos en formol al 10%. Tras esto, los tejidos se cubrieron en parafina durante 12 horas y se dejaron enfriar para que solidificaran. Del bloque de parafina se realizaron cortes con el microtomo. Se obtuvieron muestras de 4 µm que se tiñeron con hematoxilina-eosina (HE). Posteriormente, con microscopio óptico a 10 aumentos se realizó la evaluación morfológica en 10 vellosidades de cada muestra. La altura y el ancho de las vellosidades y la profundidad de la cripta se midieron usando el software SPOT Avanzado versión 4.0.5.

Análisis estadístico

Los componentes analizados estadísticamente fueron carvacrol y timol en el AEO y γ -glutamyl-S-aliltio-cisteína, γ -glutamyl-S-metilcisteína, γ -glutamyl-S-alilcisteína, compuestos de azufre totales y aliina en el MAM. Las variables estadísticas de la morfometría intestinal comprenden la altura, el espesor y la profundidad de las vellosidades.

El análisis se realizó con el software IBM SPSS Estadístico, versión 26.0. Se comprobaron los datos mediante la prueba de Shapiro-Wilk y se presentaron como media \pm desviación estándar de la media (SD). La comparación se realizó usando la prueba ANOVA unidireccional, se-

guida de la prueba de comparaciones múltiples de Tukey. El valor de $p < 0.05$ se empleó como indicador de significancia en todos los análisis.

RESULTADOS

Parámetros productivos

A pesar de que no se encontraron diferencias significativas entre el consumo diario medio (CMD) de alimento con los diferentes tratamientos ($p = 0.063$), sí se encontraron diferencias significativas en el resto de los parámetros productivos entre los grupos experimentales: GMD ($p < 0.005$), IC ($p < 0.001$) y PCF ($p < 0.005$) (Tabla 2).

Tabla 2. Resultados de los parámetros del crecimiento y consumo: GMD, IC, CMD y PCF mediante análisis estadístico (prueba ANOVA unidireccional) con el programa SPSS.

Grupo	R	M/R	M	GMD Media	IC Media	CMD Media	PCF Media
Dieta basal	10	50	500	0.27 ^{abc}	2.20 ^{bc}	0.58	18.68 ^{ab}
ZnO	10	50	500	0.28 ^{bc}	1.77 ^{ab}	0.49	19.14 ^{ab}
AEO 0.4%	10	30	300	0.24 ^{ab}	2.16 ^{abc}	0.51	17.35 ^{ab}
AEO 1.2%	10	50	500	0.29 ^c	1.84 ^{ab}	0.53	19.76 ^b
MAM 0.4%	10	30	300	0.23 ^a	2.58 ^c	0.59	16.82 ^a
MAM 2%	10	50	500	0.28 ^{bc}	1.91 ^{ab}	0.54	19.32 ^b
AEO 1.2% + MAM 2%	10	40	400	0.28 ^{bc}	1.68 ^a	0.47	19.79 ^b
SEM				0.01	0.05	0.01	0.24
P-valor				<0.005	<0.001	0.063	<0.005

Las letras (a, b, c) indican diferencias estadísticamente significativas entre los grupos ($p \leq 0.05$). Réplica R; Muestra/réplica M/R; Muestra M; Ganancia media diaria GMD; índice de conversión IC; consumo medio diario CMD; peso corporal final PCF; error estándar de la media SEM

Para el índice de conversión (SEM=0.05), el grupo que obtuvo el valor más bajo fue el AEO 1.2% + MAM 2% (1.68), mientras que los valores más altos corresponden con el grupo control (2.20) y MAM 0.4% (2.58). Los grupos ZnO (1.78), AEO 1.2% (1.84) y MAM 2% (1.91) también mostraron diferencias significativas con MAM 0.4%.

Los valores más altos de ganancia media diaria (SEM=0,01) corresponden al grupo que recibió AEO 1.2% (0.28), mostrando diferencias significativas respecto a los tratados con AEO 0.4% (0.24) y MAM 0.4% (0.23).

Respecto al peso corporal final (SEM=0.24), los grupos que obtuvieron los valores más altos fueron AEO 1.2% + MAM 2% (19.79), AEO

1.2% (19.76) y MAM 2% (19.32), superando al ZnO (19.14).

Cuantificación de los principales componentes activos de AEO en pienso pre- estárter y estárter.

En la tabla 3 se refleja la variación en la concentración de carvacrol y timol en ambos piensos, desde el inicio hasta el final del experimento.

Se detectó una disminución estadísticamente significativa ($p < 0.05$) en la concentración de los dos componentes bioactivos (carvacrol y timol). Tras los 34 días de almacenamiento, se cuantificó una pérdida aproximada del 30%

Tabla 3. Cuantificación de los principales componentes activos del aceite esencial de orégano en pienso pre- estárter y estárter.

	% de AEO	Días de almacenamiento	Carvacrol (mg/kg de alimento)	Timol (mg/kg de alimento)
Pre- estárter	0.4%	0	275.32 ± 18.99 ^a	14.73 ± 0.98 ^a
		15	244.74 ± 2.07 ^b	13.14 ± 0.14 ^b
	1.2%	0	856.31 ± 27.44 ^a	46.67 ± 1.23 ^a
		15	720.09 ± 1.95 ^b	39.32 ± 1.36 ^b
	1.2% + MAM 2%	0	930.52 ± 30.81 ^a	49.44 ± 1.55 ^a
		15	794.33 ± 38.54 ^b	46.13 ± 1.79 ^b
Estárter	0.4%	0	214.92 ± 6.35 ^a	13.10 ± 0.30 ^a
		34	187.54 ± 3.84 ^b	11.44 ± 0.40 ^b
	1.2%	0	845.72 ± 33.5 ^a	46.34 ± 1.45 ^a
		34	583.38 ± 9.74 ^b	30.16 ± 1.34 ^b
	1.2% + MAM 2%	0	917.89 ± 42.23 ^a	44.74 ± 2.73 ^a
		34	655.63 ± 11.23 ^b	32.92 ± 2.18 ^b

Las letras (a, b) indican diferencias estadísticamente significativas entre los días de almacenamiento en cada tipo de suplementación y su correspondiente alimento, en $p \leq 0.05$. Los valores son ($n = 3 \pm$ desviación estándar)

en el pienso estándar suplementado con un 1.2 % de AEO.

Análisis de los componentes bioactivos de MAM en el pienso pre- estándar y estándar

En relación con el análisis de los componentes bioactivos del MAM en el pienso, el

análisis cromatográfico (HPLC-MS/MS) permitió identificar un total de 9 componentes de azufre, principalmente derivados de la cisteína. Entre ellos, la aliina y la γ -Glutamyl-S-alilcisteína destacan como los principales compuestos cuantificados ya que representan casi dos tercios del contenido total de los compuestos identificados de azufre (tabla 4).

Tabla 4. Cuantificación de los principales componentes activos de la moltura de ajo morado en el pienso pre-estándar y estándar.

Mg/kg	D	γ -Glutamyl-S-Alilitio-cisteína	γ -Glutamyl-S-metilcisteína	γ -Glutamyl-S-Alilcisteína	Compuestos de azufre total	Aliin
MAM 0.4%						
Pre-estándar	0	18.72 \pm 1.51 ^a	18.82 \pm 1.33 ^a	101.79 \pm 1.70 ^a	338.72 \pm 9.16 ^a	5.13 \pm 1.06
	15	17.06 \pm 1.39 ^a	17.12 \pm 1.10 ^a	91.61 \pm 4.03 ^b	314.07 \pm 11.42 ^b	4.88 \pm 0.92
Estándar	0	17.63 \pm 2.54 ^a	19.48 \pm 1.47 ^a	113.82 \pm 15.74 ^a	343.81 \pm 7.98 ^a	5.57 \pm 0.63
	34	12.24 \pm 1.84 ^b	13.24 \pm 0.98 ^b	80.46 \pm 3.88 ^b	271.17 \pm 16.04 ^b	4.67 \pm 0.64
MAM 2%						
Pre- estándar	0	304.92 \pm 10.74 ^a	193.14 \pm 5.83 ^a	1309.30 \pm 27.74 ^a	1913.27 \pm 30.52 ^a	141.6 \pm 6.46 ^a
	15	270.07 \pm 7.72 ^b	171.95 \pm 3.92 ^b	1169.53 \pm 35.14 ^b	1692.44 \pm 15.55 ^b	132.9 \pm 6.42 ^a
Estándar	0	311.12 \pm 7.26 ^a	187.74 \pm 4.63 ^a	1275.35 \pm 35.93 ^a	1896.86 \pm 42.15 ^a	146.5 \pm 8.45 ^a
	34	215.23 \pm 5.51 ^b	119.67 \pm 6.81 ^b	844.61 \pm 1.71 ^b	1312.71 \pm 54.85 ^b	119.7 \pm 8.51 ^b
MAM 2% + AEO 1.2%						
Pre- estándar	0	296.49 \pm 6.66 ^a	190.18 \pm 2.60 ^a	1279.78 \pm 36.28 ^a	1872.91 \pm 72.16 ^a	136.75 \pm 4.14 ^a
	15	264.30 \pm 4.18 ^b	170.08 \pm 7.15 ^b	1124.33 \pm 32.75 ^b	1637.55 \pm 26.70 ^b	126.71 \pm 8.25 ^a
Estándar	0	306.38 \pm 10.73 ^a	186.65 \pm 7.20 ^a	1278.07 \pm 42.71 ^a	1918.79 \pm 68.07 ^a	141.35 \pm 8.06 ^a
	34	217.72 \pm 13.83 ^b	124.33 \pm 3.02 ^b	855.41 \pm 7.34 ^b	1382.76 \pm 96.07 ^b	116.53 \pm 9.83 ^b

Las letras (a, b) indican diferencias estadísticamente significativas entre los días de almacenamiento, dentro de cada nivel de suplementación y su correspondiente alimento, en $p \leq 0.05$; los valores son ($n=3 \pm$ desviación estándar).

El contenido total se refiere a la suma de todos los compuestos de azufre, incluido el γ -L-glutamyl-S-(2-carboxil-1-propil) cisteinilglicina, sulfuro de aliletilo, S-1-propenil-L-cisteína, S-alilcisteína y S-propil-L-cisteína, que se cuantificaron como equivalentes de γ -glutamyl-S-alil-cisteína.

El perfil órgano-sulfurado del MAM en los piensos se analizó al final de ambas etapas de alimentación (pre-estárter y estárter). En el caso de la alimentación pre-estárter, para las 3 dietas enriquecidas, se observó una reducción de la concentración que osciló entre el 9 y el 13%

después de 15 días de almacenamiento. Sin embargo, al transcurrir 34 días, se evidenció un proceso de degradación más pronunciado, con pérdidas que variaron entre el 30% y el 36% en comparación con la concentración inicial.

Parámetros de morfometría intestinal

En YEYUNO, no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos para el parámetro de la altura de las vellosidades ($p > 0.05$) (Tabla 5).

En cambio, sí se encontraron diferencias

Tabla 5. Parámetros de morfometría intestinal (μm) de yeyuno e íleon para los diferentes grupos experimentales (n=20).

Grupo		AV	EV	PC	AV : PC
		Media \pm DE	Media \pm DE	Media \pm DE	Media \pm DE
Yeyuno	Dieta basal	406.39 \pm 57.16	160.11 \pm 17.33 ^c	287.53 \pm 46.84	1.46 \pm 0.40
	ZnO	387.36 \pm 66.58	147.81 \pm 12.78 ^{bc}	279.50 \pm 44.42	1.43 \pm 0.37
	AEO 0.4%	402.00 \pm 53.79	154.50 \pm 16.16 ^{bc}	298.73 \pm 56.33	1.40 \pm 0.33
	AEO 1.2%	421.84 \pm 50.80	141.80 \pm 17.83 ^{ab}	282.07 \pm 50.40	1.54 \pm 0.32
	MAM 0.4%	380.02 \pm 58.56	162.15 \pm 14.06 ^c	272.15 \pm 46.57	1.46 \pm 0.44
	MAM 2%	414.84 \pm 59.12	152.15 \pm 16.00 ^{bc}	268.01 \pm 34.08	1.58 \pm 0.35
	AEO 1.2% + MAM 2%	436.43 \pm 49.18	130.86 \pm 11.88 ^a	261.12 \pm 35.64	1.70 \pm 0.25
	p-valor	>0.05	<0.05	>0.05	>0.05
Íleon	Dieta basal	366.96 \pm 65.93	154.81 \pm 13.79 ^{ab}	294.98 \pm 43.48	1.28 \pm 0.32
	ZnO	405.78 \pm 62.01	155.60 \pm 11.15 ^{ab}	285.86 \pm 51.56	1.47 \pm 0.35
	AEO 0.4%	376.48 \pm 67.02	153.11 \pm 13.82 ^a	288.86 \pm 35.11	1.32 \pm 0.26
	AEO 1.2%	395.61 \pm 50.70	145.49 \pm 18.39 ^a	270.41 \pm 50.11	1.53 \pm 0.43
	MAM 0.4%	369.33 \pm 33.87	170.50 \pm 22.19 ^b	282.43 \pm 41.49	1.34 \pm 0.24
	MAM 2%	387.17 \pm 49.77	156.31 \pm 17.51 ^{ab}	266.84 \pm 31.68	1.48 \pm 0.31
	AEO 1.2% + MAM 2%	416.07 \pm 31.08	140.43 \pm 11.45 ^a	268.79 \pm 34.15	1.58 \pm 0.28
	p-valor	>0.05	<0.05	>0.05	>0.05

Las letras (a, b, c) indican diferencias estadísticamente significativas entre los grupos ($p \leq 0.05$). AV: altura vellosidades; EV: espesor de las vellosidades; PC: profundidad de las criptas; DE: desviación estándar. AEO: aceite esencial de orégano; MAM: moltura de ajo morado.

significativas en el espesor de las vellosidades ($p < 0.05$). Los valores más altos corresponden al MAM 0.4% ($162.15 \pm 14.06 \mu\text{m}$) y a la dieta basal ($160.11 \pm 17.33 \mu\text{m}$), que mostraron diferencias significativas con el AEO 1.2% ($141.80 \pm 17.43 \mu\text{m}$) y la dosis combinada de AEO 1.2% y MAM 2% ($130.86 \pm 11.88 \mu\text{m}$) que obtuvieron los valores más bajos.

En referencia a la profundidad de las criptas y la relación entre la altura de las vellosidades y la profundidad de las criptas, no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos ($p > 0.05$).

En ÍLEON, no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos para el parámetro de la altura de las vellosidades ($p > 0.05$).

Los resultados del espesor de las vellosidades sí presentaron diferencias significativas ($p < 0.05$). El valor más alto correspondió a MAM 0.4% ($170 \pm 22.19 \mu\text{m}$), el cual mostró diferencias con la dosis combinada de AEO 1.2% y MAM 2% ($140.43 \pm 11.45 \mu\text{m}$), y AEO 1.2% ($145.49 \pm 18.39 \mu\text{m}$) y AEO 0.4% ($153.11 \pm 13.82 \mu\text{m}$), pero no con el resto de los tratamientos.

En referencia a la profundidad de las criptas y la relación entre la altura de las vellosidades y la profundidad de las criptas, no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos ($p > 0.05$).

DISCUSIÓN

La prohibición en Europa en el año 2022 del ZnO en la dieta de los lechones supone un gran reto sanitario y productivo. Con la creciente demanda del consumidor por alternativas a los antimicrobianos seguros y sostenibles, los nutraceuticos de plantas han sido objeto de evaluación para optimizar la salud animal (Hall et al., 2021). Sin embargo hasta la fecha, ningún producto estudiado puede calificarse como sustituto real del ZnO (Serrano-Jara et al., 2023).

Las principales preocupaciones con respecto a los compuestos bioactivos del ajo morado

y el orégano son su procesado y su almacenamiento, ya que estos factores condicionan su eficacia (Martins et al., 2016). En este estudio, se han evaluado el ajo morado y el orégano, tanto solos como en combinación, en comparación con las dosis farmacológicas de ZnO. Se han tomado de referencia valores de salud intestinal, así como parámetros productivos.

Se realizaron ensayos de laboratorio donde examinamos la estabilidad del AEO encapsulado durante tres meses a temperatura ambiente (25°C). Los resultados mostraron que el carvacrol presentaba una alta estabilidad en las micropartículas encapsuladas. Al final del experimento, la concentración varió de 73 ± 4.24 a 70 ± 2.26 mg de carvacrol/g de partícula encapsulada. Las pérdidas en los componentes fenólicos de AEO se atribuyeron a las condiciones ambientales, debido a las altas temperaturas comunes en la región mediterránea, a procesos de oxidación, junto con sus posibles interacciones químicas con otros componentes de la matriz alimentaria (L. Wang et al., 2020).

La formación de timo-hidroquinona y venzo-quinonas puede ser el resultado de la oxidación de los compuestos fenólicos (Güneş et al., 2006). Sin embargo, investigaciones posteriores indicaron la estabilidad de las formas oxidativas del carvacrol y el timol (Soliman et al., 2020). Estos estudios demostraron que su degradación fue inducida por peróxido de hidrógeno, y en condiciones de foto-degradación térmica. Estos resultados concuerdan con nuestros hallazgos, porque el análisis mediante HPLC tras el almacenamiento de los piensos no reveló la presencia de estos productos de degradación de las quinonas.

En relación con las interacciones químicas del carvacrol con otros componentes presentes en las matrices de los piensos, otros autores investigaron el impacto de la composición de los alimentos en la migración del carvacrol. Según sus hallazgos, el contenido de grasa ejerce efectos significativos sobre la absorción de carvacrol en los productos, lo que reduce signifi-

cativamente la actividad antimicrobiana de este componente fenólico (L. Wang et al., 2020).

En cuanto al factor de la temperatura, otros investigadores describieron una disminución aproximada del 61.84% de contenido de carvacrol en nano-cápsulas/microesferas de policaprolactona de AEO almacenadas a 40°C (Fraj et al., 2019). Basándonos en los resultados expuestos, podemos deducir que las pérdidas en los compuestos fenólicos de AEO presentes en ambos piensos están principalmente asociadas con la temperatura media (21 ± 10°C) de la región local (sudeste español) durante el ensayo experimental (de abril a diciembre del 2019), así como con posibles interacciones con algunos componentes de las matrices de alimentación.

Varios autores han descrito la presencia de compuestos órgano-sulfurados en el ajo. La alicina es el compuesto bioactivo principal del ajo y representa entorno al 70-80% del contenido total de azufre orgánico (Salehi et al., 2019). Sin embargo, otros autores identificaron la cicloalíina como componente principal órgano-sulfurado (Moreno-Ortega et al., 2020). En contraste, otros investigadores hallaron en el ajo entero un perfil distinto al descrito en la Tabla 3, que se trata del siguiente: 1% de aliina, junto con (1)-S-metil-L-cisteína sulfóxido (metiina) y (1)-S-(trans-1-propenil)-L-cisteínasulfóxido, S-(2-carboxipropil) glutatión, γ -glutamyl-S-alil-L-cisteína, γ -glutamyl-S-(trans-1-propenil)-L-cisteína y γ -glutamyl-S-alilo-mercapto-L-cisteína (Amagase et al., 2001). En nuestro caso, dado que el ajo morado utilizado en este estudio es un ecotipo autóctono de *Allium sativum* ("Las Pedroñeras"), las disparidades en la composición cuantitativa se pueden atribuir a la variabilidad intraespecífica entre los ecotipos de esta especie (Martínez-Casas et al., 2017).

Como se ha mencionado previamente, la falta de estabilidad química de estos extractos órgano-sulfurados es de particular importancia. Estos compuestos activos son susceptibles a la oxidación, a la volatilización y a la degrada-

ción, cuando se exponen a condiciones ambientales desfavorables, como las altas temperaturas, la exposición al oxígeno y a la luz (Tavares et al., 2021).

Cabía esperar que hubiera pérdidas en el perfil de órgano-sulfurados. Los sulfóxidos de S-alqu(en)ilcisteína son uno de los grupos principales de componentes que aumentan sus concentraciones, debido a la degradación del ajo. Estos componentes surgen como resultado de la conversión de los dipéptidos correspondientes de γ -glutamyl en sulfóxidos (Horníčková et al., 2010). Sin embargo, el propósito principal de este trabajo no fue investigar el proceso de degradación, sino garantizar que, al finalizar el ensayo de experimentación, los animales recibieran una concentración adecuada de componentes bioactivos para mejorar su salud intestinal. Dado que este estudio se realizó en una granja comercial que utiliza aditivos vegetales, era de especial relevancia estudiar la degradación de sus componentes activos y sus efectos.

El aceite esencial vegetal recubierto suplementado en la dieta tiene un mejor efecto de promoción sobre el crecimiento, los índices séricos y la flora bacteriana fecal que el aceite esencial vegetal sin recubrir (Niu et al., 2024). Esto puede deberse a que las microcápsulas de AEO utilizan principalmente un proceso de recubrimiento de grasa para mejorar la estabilidad oxidativa, la estabilidad térmica y la actividad biológica de los nutrientes.

En relación con los parámetros productivos, las dosis altas de AEO (1.2%), MAM (2%) y su combinación, mostraron niveles equivalentes o mejores que el ZnO en términos de GMD, IC y PCF. Lechones alimentados con dosis menores de AEO (0.4%) y MAM (0.4%) también mejoran el rendimiento del crecimiento (GMD y PCF) (Rivera-Gomis et al., 2020).

Respecto a la morfometría de las vellosidades en este estudio, los resultados más favorables se obtuvieron con las dosis más altas de MAM y AEO y su combinación, en algunos casos hasta con valores superiores al grupo de

ZnO. El grupo que recibió la combinación de AEO y MAM presentó en yeyuno e íleon vellosidades más estrechas y largas, y criptas menos profundas. Esto, al tratarse de una mayor superficie, se traduce en una mejor absorción de nutrientes (Fonseca-García et al., 2017, He et al., 2017). Se ha observado que dosis altas de AEO y MAM, cuando se combinan, tienen efectos positivos en la estructura e inmunidad intestinal (Tatara et al. 2008). No obstante, se ha demostrado que dosis más bajas al 0.4% tienen un impacto más beneficioso sobre el estrés oxidativo (Rivera-Gomis et al., 2020).

El efecto del AEO no se limita solo al tejido intestinal. La administración oral demuestra influencia en la composición de la sangre y las células importantes para el sistema inmune, como las células T (Hofmann et al., 2022). En este estudio, se empleó AEO durante toda la vida productiva de los cerdos. La calidad de la carne y la canal en general no se vieron afectados por la suplementación, indicando que la administración dietética durante el periodo de cebo no ejerce efectos directos valorables en los parámetros de la carne de cerdo.

Otro enfoque interesante se basa en el empleo de AEO en la alimentación de las madres. Las raciones maternas durante la última etapa de gestación y la lactancia pueden conducir a mejoras en la salud y el rendimiento de la progenie, con una menor incidencia de mortalidad y una menor necesidad de medicación (Hall et al., 2021).

Es importante destacar que si bien la combinación de MAM y AEO mostró resultados favorables, no se observó acción sinérgica (Serrano-Jara et al., 2023). Sin embargo, el aceite esencial natural parece ser más efectivo comparado con los componentes aislados, debido a los efectos de sinergia, aunque el mecanismo de acción no ha sido descrito (Hofmann et al., 2022).

Además de la comparación entre los nutracéuticos y el ZnO, también cabe mencionar que el ZnO afecta al microbiota. La diversidad de

microbiota denominada como beta mostró una dispersión mayor y los índices de diversidad alfa fueron menores, en comparación con los demás tratamientos. Especialmente en situaciones estresantes, como es el destete, un aumento de los índices de diversidad alfa se ha asociado con una microbiota más estable y madura (Luise et al., 2023).

Sin embargo, uno de los mecanismos beneficiosos por los cuales el timol o el carvacrol inhiben la proliferación de patógenos está relacionado con sus efectos en las membranas citoplasmáticas y el metabolismo energético, ya que pueden inhibir la actividad de la histidina descarboxilasa y unirse a proteínas (Luise et al., 2023).

CONCLUSIONES

Durante el almacenamiento de los piensos suplementados en los silos, los componentes fenólicos (30%) y alifáticos (36%) sufren pérdidas respecto a su concentración inicial. No obstante, la concentración final permanece activa y es responsable de los beneficios observados. Las concentraciones de aceite esencial de orégano al 1.2%, moltura de ajo morado al 2% y su combinación mostraron un efecto beneficioso similar o, incluso superior, al ZnO sobre los parámetros productivos. La morfometría intestinal de los lechones alimentados con los nutracéuticos fue similar al grupo tratado con ZnO. Estos nutracéuticos representan una alternativa viable como sustitutos al ZnO.

FUENTES DE FINANCIACIÓN

El proyecto ha sido financiado por el Centro para el Desarrollo Tecnológico Industrial (CDTI) del Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades y cofinanciado con el Programa Operativo FEDER de Crecimiento Inteligente. Premiado por la Universidad de Murcia en el año 2019 al «Proyecto estratégico de transferencia con gran impacto social y económico».

REFERENCIAS

- Amagase, H., Petesch, B. L., Matsuura, H., Kasuga, S., & Itakura, Y. (2001). Intake of Garlic and Its Bioactive Components. *The Journal of Nutrition*, 131(3), 955S-962S. <https://doi.org/10.1093/jn/131.3.955S>
- Cera, K. R., Mahan, D. C., Cross, R. F., Reinhart, G. A., & Whitmoyer, R. E. (1988). Effect of Age, Weaning and Postweaning Diet on Small Intestinal Growth and Jejunal Morphology in Young Swine. *Journal of Animal Science*, 66(2), 574-584. <https://doi.org/10.2527/jas1988.662574x>
- Davis, M. E., Sears, S. C., Apple, J. K., Maxwell, C. V., & Johnson, Z. B. (2006). Effect of weaning age and commingling after the nursery phase of pigs in a wean-to-finish facility on growth, and humoral and behavioral indicators of well-being^{1,2}. *Journal of Animal Science*, 84(3), 743-756. <https://doi.org/10.2527/2006.843743x>
- Davis, S. R. (2005). An overview of the antifungal properties of allicin and its breakdown products – the possibility of a safe and effective antifungal prophylactic. *Mycoses*, 48(2), 95-100. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0507.2004.01076.x>
- Dhama, K., Latheef, S. K., Mani, S., Samad, H. A., Karthik, K., Tiwari, R., Khan, R. U., Alagawany, M., Farag, M. R., Alam, G. M., Laudadio, V., & Tufarelli, V. (2015). Multiple Beneficial Applications and Modes of Action of Herbs in Poultry Health and Production-A Review. *International Journal of Pharmacology*, 11(3), 152-176. <https://doi.org/10.3923/ijp.2015.152.176>
- EFSA. (2024, febrero 28) Es necesario proseguir la labor de lucha contra la resistencia a los antimicrobianos (RAM) en seres humanos y en animales. <https://www.efsa.europa.eu/es/news/continued-efforts-needed-fight-antimicrobial-resistance-amr-humans-and-animals>
- Fonseca-García, I., Escalera-Valente, F., Martínez-González, S., Carmona-Gasca, C. A., Gutiérrez-Arenas, D. A., Ávila-Ramos, F., Fonseca-García, I., Escalera-Valente, F., Martínez-González, S., Carmona-Gasca, C. A., Gutiérrez-Arenas, D. A., & Ávila-Ramos, F. (2017). Effect of oregano oil dietary supplementation on production parameters, height of intestinal villi and the antioxidant capacity in the breast of broiler. *Austral journal of veterinary sciences*, 49(2), 83-89. <https://doi.org/10.4067/S0719-81322017000200083>
- Fraj, A., Jaâfar, F., Marti, M., Coderch, L., & Ladhari, N. (2019). A comparative study of oregano (*Origanum vulgare* L.) essential oil-based polycaprolactone nanocapsules/ microspheres: Preparation, physicochemical characterization, and storage stability. *Industrial Crops and Products*, 140, 111669. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.111669>
- Gu, X., Wu, H., & Fu, P. (2013). Allicin Attenuates Inflammation and Suppresses HLA-B27 Protein Expression in Ankylosing Spondylitis Mice. *BioMed Research International*, 2013(1), 171573. <https://doi.org/10.1155/2013/171573>
- Güneş, A., Bayraktar, O., & Yılmaz, S. (2006). Liquid-Phase Oxidation of Carvacrol Using Zeolite-Encapsulated Metal Complexes. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 45(1), 54-61. <https://doi.org/10.1021/ie050185o>
- Hall, H. N., Wilkinson, D. J., & Le Bon, M. (2021). Oregano essential oil improves piglet health and performance through maternal feeding and is associated with changes in the gut microbiota. *Animal Microbiome*, 3(1), 2. <https://doi.org/10.1186/s42523-020-00064-2>
- Han, Y.-K., & Thacker, P. A. (2010). Effects of Antibiotics, Zinc Oxide or a Rare Earth Mineral-Yeast Product on Performance, Nutrient Digestibility and Serum Parameters

- in Weanling Pigs. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 23(8), 1057-1065. <https://doi.org/10.5713/ajas.2010.90569>
- He, X., Hao, D., Liu, C., Zhang, X., Xu, D., Xu, X., Wang, J., & Wu, R. (2017). Effect of Supplemental Oregano Essential Oils in Diets on Production Performance and Relatively Intestinal Parameters of Laying Hens. *American Journal of Molecular Biology*, 07(01), 73-85. <https://doi.org/10.4236/ajmb.2017.71006>
- Hofmann, H. H., Heusler, K., Roth, K., Pröll-Cornelissen, M. J., Große-Brinkhaus, C., Schellander, K., & Neuhoﬀ, C. (2022). Oregano essential oil showed limited effects on pigs' carcass quality and haematology whereas a transcriptome analysis revealed significant modulations in the jejunum and the ileum. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 106(5), 1017-1035. <https://doi.org/10.1111/jpn.13639>
- Horníčková, J., Kubec, R., Cejpek, K., Velíšek, J., Ovesná, J., & Stavělková, H. (2010). Profiles of S-alk(en)ylcysteine sulfoxides in various garlic genotypes. *Czech Journal of Food Sciences*, 28(4), 298-308. <https://doi.org/10.17221/135/2010-CJFS>
- Kulisic, T., Radonic, A., Katalinic, V., & Milos, M. (2004). Use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil. *Food Chemistry*, 85(4), 633-640. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2003.07.024>
- Lallès, J.-P., Bosi, P., Smidt, H., & Stokes, C. R. (2007). Nutritional management of gut health in pigs around weaning. *Proceedings of the Nutrition Society*, 66(2), 260-268. <https://doi.org/10.1017/S0029665107005484>
- Liu, R., Yang, Y.-N., Yi, L., Qing, J., Li, Q.-Y., Wang, W.-S., Wang, J., Tang, Y.-X., & Tan, H. (2018). Diallyl disulfide effect on the invasion and migration ability of HL-60 cells with a high expression of DJ-1 in the nucleus through the suppression of the Src signaling pathway. *Oncology Letters*, 15(5), 6377-6385. <https://doi.org/10.3892/ol.2018.8139>
- Luise, D., Correa, F., Negrini, C., Viridis, S., Mazzoni, M., Dalcanale, S., & Trevisi, P. (2023). Blend of natural and natural identical essential oil compounds as a strategy to improve the gut health of weaning pigs. *Animal*, 17(12), 101031. <https://doi.org/10.1016/j.animal.2023.101031>
- Martínez-Casas, L., Lage-Yusty, M., & López-Hernández, J. (2017). Changes in the Aromatic Profile, Sugars, and Bioactive Compounds When Purple Garlic Is Transformed into Black Garlic. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(49), 10804-10811. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b04423>
- Martins, N., Petropoulos, S., & Ferreira, I. C. F. R. (2016). Chemical composition and bioactive compounds of garlic (*Allium sativum* L.) as affected by pre- and post-harvest conditions: A review. *Food Chemistry*, 211, 41-50. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.05.029>
- Molina-Calle, M., de Medina, V. S., Priego-Capote, F., & de Castro, M. D. L. (2017). Establishing compositional differences between fresh and black garlic by a metabolomics approach based on LC-QTOF MS/MS analysis. *Journal of Food Composition and Analysis*, 62, 155-163. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2017.05.004>
- Moreno-Ortega, A., Pereira-Caro, G., Ordóñez, J. L., Moreno-Rojas, R., Ortíz-Somovilla, V., & Moreno-Rojas, J. M. (2020). Bioaccessibility of Bioactive Compounds of 'Fresh Garlic' and 'Black Garlic' through In Vitro Gastrointestinal Digestion. *Foods*, 9(11), Article 11. <https://doi.org/10.3390/foods9111582>
- Niu, Y., Chen, Y., Liu, J., Liu, Y., Xiao, S., Yang, C., Yang, T., & Huan, W. (2024). Effect of diets supplemented with coated plant essential oil on the growth performance, immunity, antioxidant activity, and fecal

- microbiota of weaned piglets. *Frontiers in Veterinary Science*, 11, 1346922. <https://doi.org/10.3389/fvets.2024.1346922>
- Ortiz Sanjuán, J. M., Manzanilla, E. G., Cabre-ra-Rubio, R., Crispie, F., Cotter, P. D., Gar-rido, J. J., Ekhlás, D., O'Neill, L., & Argüel-lo, H. (2024). Fine-tuning of post-weaning pig microbiome structure and functionality by in-feed zinc oxide and antibiotics use. *Frontiers in Cellular and Infection Microbi-ology*, 14, 1354449. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2024.1354449>
- Rivera-Gomis, J., Peres Rubio, C., Martínez Conesa, C., Otal Salaverri, J., Cerón, J. J., Tortosa, D. E., & Cubero Pablo, M. J. (2020). Effects of Dietary Supplementation of Garlic and Oregano Essential Oil on Biomarkers of Oxidative Status, Stress and Inflammation in Postweaning Piglets. *Animals*, 10(11), 2093. <https://doi.org/10.3390/ani10112093>
- Salehi, B., Zucca, P., Orhan, I. E., Azzini, E., Adetunji, C. O., Mohammed, S. A., Baner-jee, S. K., Sharopov, F., Rigano, D., Shar-ifi-Rad, J., Armstrong, L., Martorell, M., Sureda, A., Martins, N., Selamoğlu, Z., & Ahmad, Z. (2019). Allicin and health: A comprehensive review. *Trends in Food Science & Technology*, 86, 502-516. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.03.003>
- Santhosha, S. G., Jamuna, P., & Prabhavathi, S. N. (2013). Bioactive components of garlic and their physiological role in health maintenance: A review. *Food Bioscience*, 3, 59-74. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2013.07.001>
- Schokker, D., Zhang, J., Vastenhouw, S. A., Heilig, H. G. H. J., Smidt, H., Rebel, J. M. J., & Smits, M. A. (2015). Long-Lasting Effects of Early-Life Antibiotic Treatment and Routine Animal Handling on Gut Microbiota Composition and Immune System in Pigs. *PLOS ONE*, 10(2), e0116523. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0116523>
- Serrano-Jara, D., Rivera-Gomis, J., Tornel, J. A., Bernabé, A., Martínez-Conesa, C., Navarro, J. A., Cánovas, R., Otal, J., & Cubero, M. J. (2023). Effects of dietary supplementation with purple garlic powder and oregano es-sential oil on intestinal health in post-wean-ing piglets from commercial farms. *Veterinary Research Communications*, 47(2), 901-909. <https://doi.org/10.1007/s11259-022-10053-2>
- Soliman, R. M., Salam, R. A. A., Eid, B. G., Khayyat, A., Neamatallah, T., Mesbah, M. K., & Hadad, G. M. (2020). Stability study of thymoquinone, carvacrol and thymol using HPLC-UV and LC-ESI-MS. *Acta Pharmaceutica*, 70(3), 325-342. <https://doi.org/10.2478/acph-2020-0028>
- Suntres, Z. E., Coccimiglio, J., & Alipour, M. (2015). The Bioactivity and Toxicological Actions of Carvacrol. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 55(3), 304-318. <https://doi.org/10.1080/10408398.2011.653458>
- Tan, C., Wei, H., Sun, H., Ao, J., Long, G., Jiang, S., & Peng, J. (2015). Effects of Di-etary Supplementation of Oregano Essen-tial Oil to Sows on Oxidative Stress Sta-tus, Lactation Feed Intake of Sows, and Piglet Performance. *BioMed Research In-ternational*, 2015(1), 525218. <https://doi.org/10.1155/2015/525218>
- Tavares, L., Santos, L., & Zapata Noreña, C. P. (2021). Bioactive compounds of garlic: A comprehensive review of encapsulation technologies, characterization of the encapsulated garlic compounds and their indus-trial applicability. *Trends in Food Science & Technology*, 114, 232-244. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.05.019>
- Tessaro, P. S., Meireles, A. M., Guimarães, A. S., Schmitberger, B., Lage, A. L. A., Patrício, P. S. de O., Martins, D. C. da S., & DeFre-itas-Silva, G. (2022). The polymerization of carvacrol catalyzed by Mn-porphyrins: Obtaining the desired product guided by the choice of solvent, oxidant, and catalyst. *New Journal of Chemistry*, 46(44), 21136-

21147. <https://doi.org/10.1039/d2nj03171j>
- Verdonk, J. M. A. J., Spreeuwenberg, M. A. M., Bakker, G. C. M., & Verstegen, M. W. A. (2001). Nutrient intake level affects histology and permeability of the small intestine in newly weaned piglets. Digestive physiology of pigs. Proceedings of the 8th Symposium, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, Sweden, 20-22 June 2000, 332-334. <https://doi.org/10.1079/9780851995175.0332>
- Wang, K. H., Shi, S. R., Dou, T. C., & Sun, H. J. (2009). Effect of a free-range raising system on growth performance, carcass yield, and meat quality of slow-growing chicken. *Poultry Science*, 88(10), 2219-2223. <https://doi.org/10.3382/ps.2008-00423>
- Wang, L., Heising, J., Fogliano, V., & Dekker, M. (2020). Fat content and storage conditions are key factors on the partitioning and activity of carvacrol in antimicrobial packaging. *Food Packaging and Shelf Life*, 24, 100500. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2020.100500>
- Wong, B. T., Park, S., Kovanda, L., He, Y., Kim, K., Xu, S., Lingga, C., Hejna, M., Wall, E., Sripathy, R., Li, X., & Liu, Y. (2022). Dietary supplementation of botanical blends enhanced performance and disease resistance of weaned pigs experimentally infected with enterotoxigenic *Escherichia coli* F18. *Journal of Animal Science*, 100(12), skac353. <https://doi.org/10.1093/jas/skac353>
- Zare, M., Tran, H. Q., Proke-ová, M., & Stejskal, V. (2021). Effects of Garlic *Allium sativum* Powder on Nutrient Digestibility, Haematology, and Immune and Stress Responses in Eurasian Perch *Perca fluviatilis* Juveniles. *Animals*, 11(9), Article 9. <https://doi.org/10.3390/ani11092735>
- Zou, Y., Hu, X. M., Zhang, T., Wei, H. K., Zhou, Y. F., Zhou, Z. X., & Peng, J. (2017). Effects of dietary oregano essential oil and vitamin E supplementation on meat quality, stress response and intestinal morphology in pigs following transport stress. *Journal of Veterinary Medical Science*, 79(2), 328-335. <https://doi.org/10.1292/jvms.16-0576>