



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA
SALUD ANIMAL

EVALUACIÓN DE LA EFECTIVIDAD DE SUSTANCIAS HÚMICAS COMO
ANTIMICROBIANAS Y PROMOTORAS DEL CRECIMIENTO EN CERDOS
JÓVENES

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:
JONATHAN ALEXANDER AGREDO PALECHOR

TUTOR:
SERGIO GÓMEZ ROSALES¹

COMITÉ TUTOR:
SUSANA ELISA MENDOZA ELVIRA¹
GERARDO MARISCAL LANDÍN¹

¹Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán

QUERÉTARO, MÉXICO
JUNIO 2024



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



PROTESTA UNIVERSITARIA DE INTEGRIDAD Y HONESTIDAD ACADÉMICA Y PROFESIONAL

De conformidad con lo dispuesto en los artículos 87, fracción V, del Estatuto General, 68, primer párrafo, del Reglamento General de Estudios Universitarios y 26, fracción I, y 35 del Reglamento General de Exámenes, me comprometo en todo tiempo a honrar a la Institución y a cumplir con los principios establecidos en el Código de Ética de la Universidad Nacional Autónoma de México, especialmente con los de integridad y honestidad académica.

De acuerdo con lo anterior, manifiesto que el trabajo escrito titulado: Evaluación de la Efectividad de Sustancias Húmicas como Antimicrobianas y Promotoras del Crecimiento en Cerdos Jóvenes.

que presenté para obtener el grado de ---- Doctorado ---- es original, de mi autoría y lo realicé con el rigor metodológico exigido por mi programa de posgrado, citando las fuentes de ideas, textos, imágenes, gráficos u otro tipo de obras empleadas para su desarrollo.

En consecuencia, acepto que la falta de cumplimiento de las disposiciones reglamentarias y normativas de la Universidad, en particular las ya referidas en el Código de Ética, llevará a la nulidad de los actos de carácter académico administrativo del proceso de graduación.

Atentamente

**Jonathan Alexander Agredo Palechor
520463336**

DEDICATORIAS

A mi querida familia, por su amor incondicional, apoyo y sacrificio a lo largo de este arduo camino. A mi madre, por ser mi roca y mi inspiración constante. A mi abuela, cuyas palabras de aliento han sido mi luz en los momentos oscuros. A mi hijo, por ser mi mayor motivación y recordarme cada día el verdadero propósito de mis esfuerzos. A mi hermana, cómplice y confidente en cada paso del camino. A todos ustedes, gracias por ser mi ancla en los momentos de duda y mi mayor motivo de celebración.

A mi pareja, aunque ya no se encuentre en este plano terrenal, agradezco por su compañía, comprensión, paciencia infinita, amor y apoyo incondicional. A tu lado, encontré la fortaleza y el equilibrio necesarios para alcanzar mis metas. Gracias por ser mi compañero de vida y por creer en mí incluso en los momentos más difíciles.

A mis amigos, por estar siempre presentes, incluso en la distancia, brindándome su amistad, ánimo y risas que han hecho más llevaderos estos años de estudio. A cada uno de ustedes, gracias por ser mi red de apoyo inquebrantable.

A mi asesor, por su guía experta, sabiduría y dedicación a lo largo de este proyecto. Sus consejos y correcciones han sido fundamentales para dar forma a esta tesis. Agradezco sinceramente su compromiso y apoyo constante.

Finalmente, a mí mismo, por nunca rendirme, por perseverar incluso en los momentos más difíciles, y por mantener viva la llama de la pasión por la investigación y el conocimiento.

Esta tesis está dedicada con amor y gratitud a cada uno de ustedes, quienes han dejado una huella imborrable en mi vida y han sido mi fuerza en este viaje académico.

AGRADECIMIENTOS

Quisiera expresar mi profundo agradecimiento al Dr. Sergio Gómez Rosales, por su orientación experta, apoyo inquebrantable y paciencia infinita durante todo el proceso de investigación y redacción de esta tesis. Su sabiduría académica y compromiso con la excelencia han sido una inspiración constante para mí.

Asimismo, quiero agradecer a Susana Elisa Mendoza Elvira y a Gerardo Mariscal Landín, integrantes de comité de tesis; por sus valiosas sugerencias, comentarios y revisiones que contribuyeron significativamente a mejorar la calidad de este trabajo. Su experiencia y conocimientos fueron fundamentales para el desarrollo de esta investigación.

También deseo expresar mi gratitud a mis compañeros de clase y colegas, quienes brindaron apoyo moral, intercambio de ideas y motivación en momentos cruciales de este proceso. Sus contribuciones han enriquecido enormemente este trabajo.

Mi más profundo agradecimiento a todas las personas e instituciones que han contribuido al éxito de este trabajo de investigación. En primer lugar, deseo expresar mi sincera gratitud al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT) por su generoso apoyo financiero a través de la beca Nacional, la cual ha sido fundamental para llevar a cabo este proyecto. Su generosidad y compromiso con la educación superior son invaluableles.

Agradezco sinceramente a la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) y al Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), por proporcionar los recursos necesarios y el ambiente propicio para llevar a cabo este proyecto de investigación. La infraestructura académica, las bibliotecas y el acceso a bases de datos fueron fundamentales para el desarrollo de esta tesis.

1. RESUMEN

El proceso del destete en cerdos y otros factores de estrés durante el crecimiento reducen la productividad y predisponen a los animales a desórdenes digestivos metabólicos durante la etapa de engorda. Actualmente se están buscando nuevas alternativas que ayuden a subsanar esta situación y permitan a su vez, sustituir el uso de antibióticos promotores de crecimiento (APC) en la dieta. Diferentes fuentes de sustancias húmicas (SH), a excepción de SH extraídas de lombricomposta, se han evaluado en cerdos al destete, crecimiento y finalización como promotoras del crecimiento, obteniendo resultados promisorios. Por lo cual se realizaron dos experimentos con el objetivo de evaluar los efectos de la adición de SH extraídas de lombricomposta en el alimento sobre la productividad, estatus antioxidante, morfometría y número de células caliciformes en las vellosidades y la microbiología en lechones al destete, así como el balance de nutrientes en cerdos en crecimiento. Al destete, se usaron 200 lechones, alojados en 10 corrales por tratamiento que se asignaron a uno de cuatro tratamientos: 1= Dieta control positivo (CP) con antibiótico promotor del crecimiento (APC:), 2= Dieta control negativo (CN) sin APC, 3 y 4= Dietas sin APC adicionadas con 2500 y 5000 ppm de SH, respectivamente. Durante el periodo de 1-42 días posdestete, se evaluó el peso corporal (PC), consumo diario de alimento (CDA), ganancia diaria de peso (GDP) y eficiencia alimenticia (EA). La capacidad antioxidante en músculo *Psoas mayor*, *Longissimus dorsi* y suero sanguíneo, morfometría intestinal y el conteo de células caliciformes se evaluaron al destete, 3 y 7 días posdestete. La materia seca (MS) y cenizas del metacarpo se determinaron al destete y día 7 posdestete. Los resultados fueron sometidos a ANOVA en un modelo de bloques al azar. En el período de 1-42 días, se observó mayor GDP (4= 297 y 3= 261.7 vs 2= 222.4 y 1= 242.9 g/día; P=0.05; EEM= 15.021), y mayor EA (4= 0.58, 3= 0.53 vs 1= 0.50 y 2= 0.49; P=0.05; EEM = 0.023) en los lechones que recibieron SH, respecto a los CP

y CN. El potencial antioxidante de la actividad de eliminación de radicales 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo aumentó de acuerdo al nivel de inclusión de SH, en músculo *Longissimus dorsi* y suero sanguíneo a los 3 y 7 días posdestete, y al día 7 posdestete en músculo *Psoas mayor*. Respecto a la histología de vellosidades en el yeyuno, al día 3 posdestete los cerdos adicionados con SH tuvieron una mayor altura de vellosidades (3= 317.75, 4= 310.46 vs 2= 278.08 y 1= 307.12 μm ; P= 0.05; EEM= 10.86), ancho de vellosidades (3= 94.64, 4= 95.04 Vs 2= 85.39, y 1= 93.51 μm ; P= 0.01; EEM= 2.32) y área de vellosidades (3= 95841, 4= 93678 Vs 2= 76646 y 1= 93471 μm^2 ; P= 0.01; EEM=4343), respecto al CN. La profundidad de criptas fue mayor en lechones adicionados con SH (3= 236.78, 4= 241.85 vs 1= 194.65 y 2= 203.01 μm ; P= 0.01; EEM= 6.57) respecto al CP y CN. Al día 7 posdestete los lechones adicionados con SH mostraron mayor altura de vellosidades (3= 293.24, 4= 282.45 vs 1= 258.95 y 2= 253.03 μm ; P= 0.01; EEM=7.89); área de vellosidades (3= 101354, 4= 94575 vs 1= 85633 y 2= 82125 μm^2 ; P= 0.01; EEM= 3818) y profundidad de criptas (3= 326.82, 4= 337.28 vs 2= 283.88 y 1= 321.53 μm ; P= 0.01; EEM= 8.285) comparados con el CP y CN. Posteriormente, fueron usados en cerdos en crecimiento, cuatro tratamientos en un diseño factorial de 2 dietas (1: control con colistina 1kg/ton [APC] y 2: con 5000 ppm de SH [SH]) combinadas con 2 inóculos (1: solución salina fisiológica [SSF] y 2: lipopolisacárido capsular de *Escherichia coli* (LPS) por vía intramuscular. En los resultados no se encontró diferencia significativa en las interacciones. El CDA (1= 1318.6 vs 2= 1414.5 g/d; P=0.05; EEM= 28.550), GDP (1= 556.2 vs 2= 667.2 g/d; P= 0.05; EEM= 34.423) y EA (1= 0.41 vs 2= 0.47; P= 0.05; EEM= 0.0208) fueron más altos en los cerdos adicionados con SH. No hubo diferencias en la digestibilidad o retención de nitrógeno (N) y energía € entre APC y SH. La GDP (1= 673.6 vs 2= 549.8 g/d; P= 0.05; EEM= 35.329) y EA (1= 0.48 vs 2= 0.40; P= 0.05; EEM= 0.0203) fueron mayores en los cerdos inoculados con SSF. No hubo diferencias en la digestibilidad o retención de N y E entre SSF y LPSEc. Los resultados sugieren que en cerdos que experimentan condiciones de estrés, como el destete o la exposición a agentes infecciosos, la adición de SH de

lombricomposta en la ración mejora las variables productivas, el estatus antioxidante y la integridad intestinal y mantiene la digestibilidad y retención de N y E al mismo nivel que los cerdos adicionados con APC.

Palabras clave: Lechones, Destete, Colistina, Sustancias húmicas, Productividad, Digestibilidad.

ABSTRACT

The weaning process in pigs and other stress factors during the growth reduce productivity and predispose animals to digestive and metabolic disorders during the fattening stage. New alternatives are being sought to help remedy this situation and allow, in turn, to replace the use of antibiotic growth promoters (AGP) in the diet. Different sources of humic substances (HS), with the exception of HS extracted from vermicompost, have been evaluated in pigs at weaning and growing stages as growth promoters, with promising results. Therefore, two experiments were carried out with the objective of evaluating the effects of the addition of HS from vermicompost in the feed on the productivity, antioxidant status, morphometry and number of goblet cells in the villi and microbiology in piglets at weaning, as well as the nutrient balance in growing pigs. At weaning, 200 piglets were used, housed in 10 pens per treatment and were assigned to one of four treatments: 1= Positive control diet (PC) with AGP, 2= Negative control diet (NC) without AGP, 3 and 4= Diets without AGP added with 2500 and 5000 ppm HS, respectively. During the period of 1-42 days post-weaning, body weight (BW), daily feed intake (DFI), daily weight gain (DWG) and feed efficiency (FE) were evaluated. The antioxidant capacity in psoas major muscle, longissimus dorsi and blood serum, intestinal morphometry and goblet cell count were evaluated at weaning, 3 and 7 days postweaning. Metacarpal dry matter (DM) and ash were determined at weaning and day 7 postweaning. The results were subjected to ANOVA in a randomized complete block design. In the period of 1-42 days, higher DWG (4= 297 and 3= 261.7 vs 2= 222.4 and 1= 242.9 g/day; $P=0.05$; SEM= 15.021), and higher FE (4= 0.58, 3= 0.53 vs 1= 0.50 and 2= 0.49; $P=0.05$; SEM = 0.023) were found in piglets receiving HS, compared to the PC and NC. The antioxidant potential of 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical scavenging activity increased according to the dietary levels of HS, in longissimus dorsi muscle and blood serum at 3 and 7 days postweaning, and at day 7 post-weaning in psoas major muscle. Regarding the histology of villus in the

jejunum, on day 3 post-weaning the pigs added with HS had a greater villus height (3= 317.75, 4= 310.46 vs 2= 278.08 and 1= 307.12 μm ; P= 0.05; SEM= 10.86), villus width (3= 94.64, 4= 95.04 Vs 2= 85.39, and 1= 93.51 μm ; P= 0.01; SEM= 2.32); and villus area (3= 95841, 4= 93678 Vs 2= 76646 and 1= 93471 μm^2 ; P= 0.01; SEM=4343), compared to the NC. The crypt depth was greater in piglets added with HS (3= 236.78, 4= 241.85 vs 1= 194.65 and 2= 203.01 μm ; P= 0.01; SEM= 6.57) compared to the PC and NC. On day 7 postweaning, the piglets added with HS showed greater villus height (3= 293.24, 4= 282.45 vs 1= 258.95 and 2= 253.03 μm ; P= 0.01; SEM=7.89); villus area (3= 101354, 4= 94575 vs 1= 85633 and 2= 82125 μm^2 ; P= 0.01; SEM= 3818) and crypt depth (3= 326.82, 4= 337.28 vs 2= 283.88 and 1= 321.53 μm ; P= 0.01; SEM= 8.285) compared to the PC and NC. In growing pigs, four treatments were used in a factorial design of 2 diets (1: control with 1kg/ton colistin [AGP] and 2: with 5000 ppm HS [HS]) combined with 2 inoculums (1: physiological saline solution [FSS] and 2: Capsular lipopolysaccharide from *Escherichia coli* (LPS) intramuscularly. In the results, no significant difference was found in the interactions. The DFI (1= 1318.6 vs 2= 1414.5 g/d; P=0.05; SEM= 28.550), DWG (1= 556.2 vs 2= 667.2 g/d; P= 0.05; SEM= 34.423) and FE (1= 0.41 vs 2= 0.47; P= 0.05; SEM= 0.0208) were higher in pigs added with HS. There were no differences in the digestibility or retention of N and E between AGP and HS. DWG (1= 673.6 vs 2= 549.8 g/d; P= 0.05; SEM= 35.329) and FE (1= 0.48 vs 2= 0.40; P= 0.05; SEM= 0.0203) were higher in pigs inoculated with FSS. There were no differences in N and E digestibility or retention between FSS and LPS. The results suggest that in pigs experiencing stress conditions, such as weaning or exposure to infectious agents, the addition of HS from vermicompost in the rations improves productive variables, antioxidant status and intestinal integrity and maintains digestibility and retention of N and E at the same level as the pigs added with AGP.

Keywords: Piglets, Weaning, Colistin, Humic substances, productivity, digestibility.

CONTENIDO

	pág.
DEDICATORIAS.....	I
AGRADECIMIENTOS	II
1. RESUMEN.....	III
ABSTRACT	VI
CONTENIDO.....	IX
2. INTRODUCCIÓN.....	1
3. REVISIÓN DE LITERATURA	5
3.1. Aditivos alimenticios como alternativa al uso de APC.....	5
3.2. Mecanismos de acción propuestos para las sustancias húmicas	6
3.3. Efecto de las sustancias húmicas sobre el crecimiento de microorganismos.	7
3.4. Efecto de las sustancias húmicas sobre la barrera de moco intestinal	9
3.5. Efecto de las sustancias húmicas sobre la respuesta inmune e inflamación	10
3.6. Adición de sustancias húmicas en cerdos.....	11
3.7. Sustancias húmicas obtenidas de lombricomposta	14
3.8. Extracción/ aislamiento de sustancias húmicas	15
3.9. Uso potencial de sustancias húmicas de lombricomposta en cerdos al destete	17
5. JUSTIFICACIÓN	20
6. OBJETIVOS	21
6.1. OBJETIVO GENERAL.....	21
6.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	21
7. MATERIAL Y MÉTODOS.....	22
7.1. Declaración ética.....	22
7.2. Ubicación	22
7.3. Obtención de sustancias húmicas.....	22
7.4. Identificación de estructuras químicas y grupos funcionales de las sustancias húmicas.....	24
7.5. Prueba de comportamiento productivo en lechones al destete	24

7.5.1	Animales, tratamientos y manejo.....	24
7.5.2	Sacrificio y toma de muestras	27
7.5.3	Determinaciones de laboratorio	28
7.5.3.1	<i>Capacidad antioxidante</i>	28
7.5.3.2	<i>Oxidación lipídica</i>	29
7.5.3.3	<i>Evaluación histología, morfometría intestinal</i>	29
7.5.4	Análisis estadístico.....	30
7.6	Prueba balance de nitrógeno y energía en cerdos en crecimiento	30
7.6.1	Animales, tratamientos, manejo.....	30
7.6.2	Prueba de balance y toma de muestras	32
7.6.3	Análisis de laboratorio	32
7.6.4	Análisis de los datos	33
7.6.5	Análisis estadístico.....	34
8	RESULTADOS.....	35
8.1	Comportamiento productivo.....	35
8.2	Consistencia fecal y mediciones del metacarpo.....	36
8.3	Respuesta antioxidante	37
8.4	Histología, morfología intestinal	39
8.5	Balance de nitrógeno y energía	43
9	DISCUSIÓN	46
10	CONCLUSIONES.....	61
11	ABREVIATURAS Y SIGLAS.....	62
12	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63

2. INTRODUCCIÓN

El destete constituye uno de los eventos más estresantes en la vida del cerdo afectando la productividad y predisponiendo a desórdenes digestivos en el corto y mediano plazo. Los lechones al destete sufren diferentes factores de estrés, que pueden ser alimenticios, sociales, ambientales e infecciosos; las consecuencias son cambios profundos en la fisiología digestiva, respuesta inmune, conducta y capacidad de crecimiento (Reis de Souza et al., 2012; Gresse et al., 2019; Rentería et al., 2021). Ante esta problemática, es común el uso de antibióticos promotores del crecimiento (APC) en la dieta, los cuales ayudan a controlar el desarrollo de bacterias patógenas y disminuir el riesgo de enfermedades que afectan negativamente el crecimiento, la eficiencia productiva y la rentabilidad de la industria cárnica. Sin embargo, se ha señalado que el uso prolongado de los APC puede ocasionar resistencia en bacterias patógenas, poniendo en riesgo la salud de los animales y el hombre (Cassini et al., 2019; Woolhouse et al., 2015).

Por lo que, se están buscando alternativas para reducir el uso de los APC en los alimentos, manteniendo una producción eficiente y obteniendo alimentos de alta calidad, inocuos y a bajo costo (Aluthge et al., 2019; Faba et al., 2020); siguiendo la recomendación de la Autoridad de Seguridad Alimentaria Europea (EFSA) de adoptar una estrategia integrada con nuevos alimentos y aditivos funcionales (Cormican et al., 2017). Una de las alternativas al uso de APC son, el empleo de las sustancias húmicas (SH) debido a que se ha demostrado que poseen propiedades benéficas en la salud del hombre y animales, y sus efectos son multidireccionales actuando sobre la microbiota, integridad intestinal, uso de nutrientes y respuesta inmune (EMEA, 1999; Klocking y Helbig, 2005; Jacob et al., 2019). Las fuentes comerciales más concentradas de SH son la leonardita y el lignito, que se obtienen de las minas, y se utilizan ampliamente para mejorar el rendimiento de los cultivos en la agricultura; en menor medida, son utilizados como promotores del crecimiento

en animales (Peña- Méndez et al., 2005; Arif et al., 2019; Maguey-González et al., 2022). Los componentes principales de las SH son los ácidos húmicos (AH), ácidos fúlvicos (AF) y las huminas; que son constituyentes orgánicos del suelo, arroyos, lagos y océanos (Lehmann y Kleber, 2015; Piccolo et al., 2019). En los extremos de las cadenas laterales de las SH hay grupos funcionales que confieren diferentes cualidades, por ejemplo, coloidales, espectrales, electroquímicas y de intercambio de iones (Peña-Méndez et al., 2005; Piccolo et al., 2019).

En cerdos al destete suplementados con SH provenientes de leonardita se han reportado mejoras en el crecimiento y estatus mineral, reducción de biomarcadores séricos indicativos de estrés oxidativo y disminución de la incidencia de diarreas (Trckova et al., 2018; Dell'Anno et al., 2020). En pollos de engorda se han adicionado SH extraídas de lombricompostas, ya sea en el agua de bebida o alimento, con resultados promisorios en la eficiencia productiva (Domínguez et al., 2021; Maguey-González et al., 2022); en cerdos no se ha evaluado la suplementación con SH extraídas de lombricomposta como opción al uso de los APC.

El destete en cerdos provoca bajo consumo de alimento y cambios morfológicos y funcionales en el intestino incluyendo una longitud intestinal más corta, atrofia de vellosidades, hiperplasia de las criptas, aumento de mitosis y reciclaje de células epiteliales, reduciendo la actividad enzimática del borde de cepillo y la capacidad de absorción (Rentería et al., 2021). Además, se estableció que el destete temprano induce la expresión de citocinas pro inflamatorias y provoca un deterioro sostenido de la función de barrera intestinal (Hampson, 2004; Pluske et al., 2009); lo que ocasiona un aumento de la permeabilidad paracelular, con un mayor transporte de antígenos a la lámina propia, lo que lleva a la inflamación intestinal; beneficiando la proliferación de bacterias patógenas, provocando cambios en la producción de células caliciformes secretoras de mucinas, y aumentando la susceptibilidad del lechón a las infecciones bacterianas (Rentería et al., 2021). Ante esta situación, surge la necesidad de emplear APC en la dieta animal para controlar su desarrollo, y de esta manera

disminuir el riesgo de enfermedades que afecten negativamente el crecimiento y la eficiencia productiva (Wang et al., 2022).

Se han propuesto varios mecanismos de acción para explicar éstas mejoras en cerdos adicionando SH en su dieta, pero ninguno ha sido confirmado hasta la fecha (Ángeles et al., 2022). Se ha propuesto que las SH pueden estimular el crecimiento de microorganismos actuando como fuentes de nutrientes y estimulando la absorción de nutrientes a través de la pared celular de las bacterias. En la microbiota intestinal de los animales, se ha reportado que las SH pueden estimular el crecimiento de bacterias benéficas como *Lactobacilos* en pollos (Domínguez-Negrete et al., 2019), actuando posiblemente como acidificantes y antimicrobianos al disminuir el pH, mejorando así la salud intestinal y la productividad (Disetlhe et al., 2017); mientras que en cerdos al destete pueden estimular el crecimiento de *Prevotella* como respuesta adaptativa al cambio de dieta (Trckova et al., 2018).

Se ha sugerido, que las SH tienen la habilidad de crear capas protectoras sobre la membrana mucosa epitelial del tracto digestivo impidiendo la penetración de bacterias y sustancias tóxicas producidas por estas mismas, debido a sus características coloidales y alta capacidad de formar agregados dentro de soluciones (Kühnert et al., 1991; EMEA, 1999). Este efecto protector de las SH sobre el epitelio digestivo también se ha asociado a aumentos en la digestibilidad de nutrientes en pollos y cerdos (Písaříková et al., 2010; Gómez-Rosales y Angeles, 2015), aumentos en la altura de las vellosidades, profundidad de criptas y área de superficie epitelial en ratones (Yasar et al., 2002) y pollos (Taklimi et al., 2012; Disetlhe et al., 2017). De igual forma, se ha demostrado que la protección de la mucosa digestiva por las SH mejora la integridad intestinal, lo que se ha asociado a una mayor expresión de mucina-2 en el yeyuno y ciego (Mudroňová et al., 2020); permitiendo que las vellosidades mantengan su integridad frente a patógenos, toxinas y alteraciones en la dieta (López-García et al., 2023). Siendo ésta una de las principales mucinas formadoras de gel, que representa el componente de

barrera primario de las capas de moco y un sitio donde reside la IgA secretora (Honda y Takeda, 2009; Macpherson y Harris, 2004). Confiriendo a su vez, efectos inmunoestimulantes e inmunomoduladores por parte de las SH, sobre diferentes enfermedades infecciosas; lo que se ha asociado con sus propiedades antiinflamatorias (Schepetkin et al., 2002; Schepetkin et al., 2003; Van Rensburg, 2015).

Sin embargo, en trabajos previos se reportó que no hubo efectos por la adición de las SH en la digestibilidad de algunos componentes de la dieta o hubo impacto negativo en la digestibilidad de proteína y grasa en cerdos (Korniewicz et al., 1999; Písaříková et al., 2010), lo que se asoció a dosis altas de SH. Probablemente porque las SH poseen una alta capacidad de adsorción, lo cual pudiera afectar la capacidad de reabsorción de nutriente; dando como resultado un paso más lento del contenido intestinal, un período de digestión prolongado y un aumento de los procesos anabólicos de la energía (Písaříková et al., 2010).

En pollos se informó un mayor peso corporal y ganancia de peso y una menor tasa de conversión alimenticia por la adición de SH usando diferentes fuentes comerciales (Ozturk et al., 2010; Ozturk et al., 2012; Taklimi et al., 2012; Arif et al., 2019). Utilizando un extracto líquido o seco de SH de lombricomposta, se ha informado mayor peso corporal final y ganancia de peso y menor conversión alimenticia en pollos de engorda (Angeles et al., 2022a).

Hasta la fecha no se ha evaluado el efecto de SH extraídas de lombricomposta sobre la microbiota digestiva, el crecimiento, capacidad antioxidante de la carne y suero y la histología de las vellosidades intestinales; así mismo no se ha evaluado la digestibilidad y balance de nitrógeno (N) y energía (E) en cerdos alimentados con SH de lombricomposta.

3. REVISIÓN DE LITERATURA

3.1. Aditivos alimenticios como alternativa al uso de APC

El principal fundamento del uso de APC en los alimentos de los animales, en dosis sub terapéuticas es el control del desarrollo de bacterias patógenas para disminuir el riesgo de enfermedades que afectan negativamente el crecimiento, la eficiencia productiva y la rentabilidad de la industria cárnica. Contrario a esto, se ha señalado que el uso prolongado de los APC puede ocasionar resistencia en bacterias patógenas, poniendo en riesgo la salud de los animales y el hombre (Cassini et al., 2019; Woolhouse et al., 2015). Se están buscando alternativas para reducir el uso de los APC en los alimentos, manteniendo una producción eficiente y obteniendo alimentos de alta calidad, inocuos y a bajo costo (Aluthge et al., 2019; Faba et al., 2020).

Existe una lista muy extensa de aditivos alimenticios que se han probado para substituir los APC, dentro de los cuales se incluye diferentes tipos de probióticos como bacterias del género *Lactobacilos*, *Bacilos* y *Bifidobacteria* y levaduras como *Saccharomyces cerevisiae*. También se han evaluado algunos prebióticos como los mananooligosacáridos (MOS) derivados de *S. cerevisiae* y diferentes ácidos orgánicos; más recientemente los fitoaditivos como extractos de plantas y aceites esenciales han ganado interés en esta área (Puvača, 2008; Windisch et al., 2008; Cortes-Coronado et al., 2017). Aunque no se ha encontrado ninguna alternativa efectiva que sustituya totalmente los efectos de los APC sobre el control de la microbiota, la mayoría de los aditivos mencionados han mostrado beneficios sobre la producción y salud de los animales. Algunos productos pueden reducir los efectos negativos de bacterias patógenas, otros estimulando el crecimiento de bacterias benéficas, o mejorando la integridad intestinal y uso de nutrientes, o estimulando la respuesta inmune local y general. Una alternativa al uso de APC son las SH, debido se ha demostrado que las SH poseen propiedades benéficas en la salud del hombre y animales, y sus efectos son multidireccionales actuando sobre

la microbiota, integridad intestinal, uso de nutrientes y respuesta inmune (EMEA, 1999; Klocking y Helbig, 2005; Jacob et al., 2019). Las SH se pueden usar por vía oral en caballos, rumiantes, cerdos y aves de corral para el tratamiento de diarrea, dispepsia e intoxicaciones agudas siguiendo las recomendaciones del Comité de Medicamentos Veterinarios de La Agencia Europea para la Evaluación de Medicamentos (EMEA, 1999). Las SH son macromoléculas que se producen por la biodegradación de la materia orgánica, que involucra procesos físicos, químicos y microbiológicos, en los que eucariotas (lombriz y hongos) y procariotas (bacterias aeróbicas) descomponen aún más la materia orgánica (Maguey-Gonzalez et al., 2022). Los componentes principales de las SH son los AH, AF y huminas; son constituyentes orgánicos del suelo, arroyos, lagos y océanos (Lehmann y Kleber, 2015; Piccolo et al., 2019). En las cadenas laterales de las SH hay grupos funcionales que confieren diferentes cualidades, por ejemplo, coloidales, espectrales, electroquímicas y de intercambio de iones (Peña-Méndez et al., 2005; Piccolo et al., 2019).

3.2. Mecanismos de acción propuestos para las sustancias húmicas

Durante siglos, las SH se han usado en humanos como suplemento nutricional y con fines terapéuticos y en la agricultura como suplemento de suelos (Peña-Méndez et al., 2005; Swidsinski et al., 2017; Jacob et al., 2019). Las primeras descripciones de las aplicaciones médicas de las SH se pueden encontrar en Sánscrito y escritos antiguos de Roma y China, donde se les atribuían propiedades místicas (Swidsinski et al., 2017). El uso balneoterapéutico de la turba en la antigua Babilonia, en la Baja Mesopotamia, y en el Imperio Romano, representa la aplicación médica más significativa de las SH, donde los habitantes ya reconocían los efectos curativos del barro (Priegnitz, 1986). Pero fue hasta principios de 1800 que se llevó a cabo por primera vez su caracterización y descripción química por Berzelius (1839) uno de los predecesores de la química moderna. Se han sugerido

diferentes efectos biológicos de las SH en microorganismos, plantas y animales. Se ha indicado que las SH provenientes de lignito tienen acción protectora sobre la mucosa intestinal, efectos antiinflamatorios, adsorptivos y antitóxicos y propiedades antimicrobianas en los animales (EMEA, 1999). En la siguiente sección se revisan los principales mecanismos de acción de las SH relacionados a su intervención en la protección de la mucosa intestinal, incluyendo la presencia de bacterias benéficas y patógenas, el reforzamiento de la capa de moco y la respuesta inmune intestinal.

3.3. Efecto de las sustancias húmicas sobre el crecimiento de microorganismos.

En las áreas de ciencias del suelo y plantas, se han documentado extensamente los efectos benéficos de las SH sobre diversos microorganismos (Kulikova et al., 2005) incluyendo bacterias del Filo *Firmicutes* (Gramss et al., 1999) encontradas comúnmente en el aparato digestivo de los animales. Los mecanismos más sobresalientes de las SH sobre la actividad de los microorganismos son:

a) Como fuente de sustratos, aportando principalmente carbono y nutrientes como N, fósforo, oligoelementos y vitaminas, y aportando estructuras (alifáticas y aromáticas) dentro de las cadenas biosintéticas de las células bacterianas. Se ha observado la utilización completa de SH por los microorganismos cuando constituyen la única fuente de carbono y N (Filip y Berthelin, 2001), y

b) Aumentando la absorción de nutrientes como N y otros micronutrientes en las bacterias debido a su carácter anfifílico, comportándose como surfactantes naturales ya que pueden adsorberse en diferentes superficies naturales que incluyen membranas biológicas (Samson y Visser, 1989; Vigneault et al., 2000) aumentando su permeabilidad a los nutrientes disponibles en el medio.

En animales suplementados con SH, los efectos sobre la microbiota intestinal

han sido inconsistentes. En dos estudios se han reportado incrementos en los conteos de *Lactobacilos* en el intestino de pollos con respecto al grupo tratado con antibióticos (Aksu y Bozkurt, 2009; Domínguez-Negrete et al., 2019). Pero en otros trabajos no se observaron cambios en los conteos de *Lactobacilos* en el intestino y ciego en pollos suplementados con SH (Shermer et al., 1998; Maguey-González et al., 2018a). Respecto al efecto de SH sobre el crecimiento de *E. coli*, en ensayos *in vitro* no se ha encontrado inhibición de los conteos de esta bacteria (Ansorg y Rochus, 1978; Yarkova, 2011), mientras que en estudios *in vivo* se han reportado conteos menores de *E. coli* en intestino y ciego (Aksu y Bozkurt, 2009) y conteos de hasta de 10-100 veces mayores de *E. coli* en el ciego (Shermer et al., 1998) en pollos adicionados con SH respecto al grupo control. En pollos y cerdos suplementados con SH no se han observado efectos inhibitorios sobre el crecimiento de *C. perfringens* (Kaevska et al., 2016; Dominguez-Negrete et al., 2019). Tampoco se han observado efectos inhibitorios sobre los conteos de *Salmonella spp* en el ciego de pollos que consumieron SH (Maguey-González et al., 2018b).

En cerdos al destete suplementados con SH se reportó menor abundancia relativa de *Firmicutes*, *Bacteroides*, *Anaerovibrio*, *Oscillospira*, y *Ruminococcus*, y una tendencia a mayor abundancia de *Prevotella* en las heces en comparación con los cerdos del grupo control (Trckova et al., 2018). Los autores sugieren que el consumo de una dieta basada en vegetales adicionada con SH mantuvo el balance de la microbiota intestinal en respuesta al cambio de una dieta líquida a una dieta sólida después del destete, lo que se explica por la disminución de *Bacteroides*, que pueden utilizar mejor la lactosa de la leche de la cerda, y el aumento de *Prevotella* que tienen mayor capacidad de degradar polisacáridos de plantas.

La información revisada indica que las SH pueden estimular el crecimiento de microorganismos actuando como fuentes de nutrientes y estimulando la absorción de nutrientes a través de la pared celular de las bacterias. En la microbiota intestinal de los animales, se ha reportado que las SH pueden estimular el

crecimiento de bacterias benéficas como *Lactobacilos* en pollos, mientras que en cerdos al destete pueden estimular el crecimiento de *Prevotella* como respuesta adaptativa al cambio de dieta. Por otro lado, las SH no han mostrado efectos inhibitorios sobre el crecimiento de bacterias potencialmente patógenas como *E. coli*, *Salmonela* y *C. perfringens*.

3.4. Efecto de las sustancias húmicas sobre la barrera de moco intestinal

Se ha sugerido que las SH tienen la habilidad de crear capas protectoras sobre la membrana mucosa epitelial del tracto digestivo impidiendo la penetración de bacterias y sustancias tóxicas producidas por bacterias, debido a sus características coloidales y alta capacidad de formar agregados dentro de soluciones (Kühnert et al., 1991; EMEA, 1999). Esta sugerencia ha sido apoyada por los resultados de dos trabajos recientes. En condiciones *in vitro* simulando la digestión en pollos se encontró aumento de la viscosidad del contenido en el buche y el intestino en los tratamientos que incluyeron SH, y en condiciones *in vivo* se reportó mayor viscosidad intestinal y menor translocación bacteriana al hígado en pollos que recibieron SH (Maguey- González et al., 2018a). También en pollos suplementados con SH se reportó mayor expresión del gen de la mucina intestinal 2 (MUC-2) en intestino (Mudroňová et al., 2020). La MUC-2, es una de las principales mucinas formadoras de gel, representa el componente de barrera primario de las capas de moco y un sitio donde reside la IgA secretora. La MUC-2 es la primera línea de defensa que limita el contacto epitelial o la penetración de la microbiota y otros antígenos potencialmente peligrosos al organismo (Honda y Takeda, 2009; Macpherson y Harris, 2004).

Los cambios en la cantidad, aumento o disminución, o en la composición del moco pueden conducir a reacciones inflamatorias indeseables (Wang et al., 2018). En el estudio de Maguey-González et al. (2018b) se sometió a los pollos a restricción alimenticia por 24 h para inducir inflamación del intestino y provocar

mayor permeabilidad de bacterias a través de las células epiteliales (Kutappan et al., 2015). En los pollos tratados con SH además de que se redujo la translocación bacteriana al hígado, se redujo el paso del intestino a la sangre de un marcador de permeabilidad, el isotiocianato de fluoresceína dextrano (FITC-d); lo que sugiere que las SH redujeron la inflamación de la mucosa, probablemente por la asociación de sus propiedades coloidales y la estimulación en la secreción de mucinas, lo que se reflejó en un aumento de la viscosidad intestinal.

Este efecto protector de las SH sobre el epitelio digestivo también se ha asociado a aumentos en la digestibilidad de nutrientes en pollos y cerdos (Písaříková et al., 2010; Gómez-Rosales y Angeles, 2015), aumentos en la altura de las vellosidades, profundidad de criptas y área de superficie epitelial en ratones (Yasar et al., 2002) y pollos (Taklimi et al., 2012; Disetlthe et al., 2017) y aumento en la actividad de enzimas digestivas en la mucosa de pollos (Mao et al., 2019) y peces de agua dulce (Gao et al., 2017).

3.5. Efecto de las sustancias húmicas sobre la respuesta inmune e inflamación

Se ha demostrado que las SH exhiben diferentes efectos inmunoestimulantes e inmunomoduladores sobre diferentes enfermedades infecciosas, lo que también se ha asociado con sus propiedades antiinflamatorias (Schepetkin et al., 2002; Schepetkin et al., 2003; Van Rensburg, 2015). Parece ser que las SH forman complejos sólidos con carbohidratos, que permiten la formación de glicoproteínas con la capacidad de unirse a células NK y linfocitos T y permiten la comunicación posterior entre estas células (Schepetkin et al., 2003). En estudios *in vitro* se ha observado la activación de granulocitos humanos después de ser estimulados con SH, con aparición de H₂O₂ en la superficie de las células y de la correspondiente actividad de oxidasa unida a la membrana (Riede et al., 1991). Se ha reportado incremento en la proliferación de linfocitos humanos con el uso de dosis crecientes

de SH, inhibición de la liberación de citocinas proinflamatorias como TNF- α , IL-1, IL-6 e IL-10 e inhibición del complemento a través de las vías: alternativa y clásica (Van Rensburg y Naude, 2009).

En macrófagos peritoneales de roedores se encontró que la adición de ácido fúlvico (AF) aumentó la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y óxido nítrico (que representan mecanismos citotóxicos y citostáticos de inmunidad inespecífica), así como la incorporación de timidina en el DNA de linfocitos extraídos del bazo (Schepetkin et al., 2003). Otros reportes indican que las SH son eficaces en la supresión de la hipersensibilidad tardía, el edema de la pata e hipersensibilidad por contacto en ratas, reducen los niveles de proteína C reactiva de los pacientes que sufren osteoartritis de la rodilla y reacciones alérgicas de tipo 1 de los pacientes que padecen rinitis estacional (Van Rensburg, 2015).

En pollos adicionados con SH se observó estimulación del crecimiento de órganos del sistema inmune, principalmente el timo y la bolsa de Fabricio (Disetlhe et al., 2017). También en pollos suplementados con SH se ha reportado aumento en los títulos de anticuerpos contra el virus de la Influenza aviar (Tohid et al., 2010), la enfermedad Infecciosa de la Bolsa de Fabricio (Nagarajuet al., 2014) y el virus de Newcastle (Aksu y Bozkurt, 2009; Mehdi y Hasan, 2012). Sin embargo, en pollos no se han observado efectos benéficos de la adición de SH en la concentración de IgA en el intestino (Maguey-González et al., 2018a) o la expresión génica de IgA en el ciego (Mudroňová et al., 2020). En cerdos adicionados con SH se ha reportado mayor recuento relativo de linfocitos en la sangre (Wang et al., 2008) y aumento en la actividad de neutrófilos, lo que podría proteger contra bacterias patógenas y disminuir la tasa de mortalidad durante la infección bacteriana aguda (Dabovich et al., 2003).

3.6. Adición de sustancias húmicas en cerdos

La idea de utilizar las SH como aditivos promotores del crecimiento en los

animales es reciente, especialmente en cerdos (Trckova et al., 2005). En un estudio en cerdos al destete adicionados con leonardita y lignito como fuentes de SH en los alimentos se observó mayor peso corporal, menor incidencia de diarreas y ausencia de mortalidad (Trckova et al., 2018) en comparación con el grupo control. En otros trabajos también se han observado mejoras en el crecimiento de cerdos al destete adicionados con SH (Slavík, 1999; Zralý y Písaříková, 2010). En el estudio de Trckova et al. (2018) los cerdos al destete suplementados con SH tuvieron menor abundancia relativa de *Firmicutes*, *Bacteroides*, *Anaerovibrio*, *Oscillospira*, y *Ruminococcus*, y una tendencia a mayor abundancia de *Prevotella* en el intestino en comparación con los cerdos del grupo control. Los autores sugieren que el consumo de una dieta basada en vegetales adicionada con SH mantuvo el balance de la microbiota intestinal en respuesta al cambio de una dieta líquida a una dieta sólida después del destete, lo que se explica por la disminución de *Bacteroides*, que pueden utilizar mejor la lactosa de la leche de la cerda, y el aumento de *Prevotella* que tienen mayor capacidad de degradar polisacáridos de plantas. También se reportó cambios en la microbiota y reducciones en la concentración de ácidos grasos volátiles y producción de gas en el ciego de lechones la destete suplementados con SH (Visscher et al., 2019), lo que sugiere junto con los resultados de Trckova et al. (2018) que las SH influyen positivamente en las bacterias intestinales manteniendo un balance adecuado en la microbiota en función del cambio en la dieta.

En cerdos en crecimiento adicionados con diferentes fuentes de SH en los alimentos también se han reportado mayores ganancias de peso y eficiencia alimenticia (Ji et al., 2006; Wang et al., 2008; Bai et al., 2013). En ratas suplementadas con SH se aumentó el peso corporal y la retención de nitrógeno lo que se asoció con una mayor área de la superficie epitelial, mayor longitud de las vellosidades y mayor profundidad de la cripta en la mucosa digestiva (Yasaret al., 2002). Se ha sugerido que las SH causan una menor tasa de pasaje del alimento a través del intestino aumentándose el tiempo de exposición de los nutrientes a las

enzimas digestivas (Korniewicz et al. 1999; Suchý et al. 1999). El aumento en la viscosidad en el intestino debido a la formación de geles se ha asociado a disminución de la tasa de pasaje del alimento a través del aparato digestivo (Van Der Klis et al., 1993; Yasar, 2003).

Otros efectos colaterales observados en cerdos suplementados con SH son las mejoras en la calidad de la carne con incremento del marmoleo y disminución del grosor de la grasa dorsal (Ji et al., 2006; Wang et al., 2008; Bai et al., 2013). Estos hallazgos podrían estar relacionados al incremento en la actividad de la lipasa sensible a hormonas y disminución de la actividad de la lipoproteína lipasa en el tejido adiposo de cerdos adicionados con cantidades crecientes de AF en el alimento (Chang et al., 2014). Otros cambios detectados en cerdos suplementados con SH son el aumento en la concentración sérica de minerales (Ca, P y Mg) y porcentaje de linfocitos (Trckova et al., 2018), así como disminución del estrés oxidativo después de un desafío con LPS de *E. coli* (Weber et al., 2014).

Opuesto a los resultados revisados, en algunos trabajos no se han observado beneficios o los resultados de producción han sido inconsistentes en los cerdos suplementados con SH (Ji et al., 2006; Weber et al., 2014; Visscher et al. 2019). La variabilidad en los efectos de las SH sobre el crecimiento y otras respuestas en cerdos probablemente se debe a los diferentes orígenes y dosis de SH empleadas. Las SH presentan características diferentes, como la longitud de la cadena principal, la composición de las cadenas laterales en función de su origen (plantas, suelos, turba y carbón). Las fuentes comerciales más usadas de SH son la leonardita y lignito, las cuales son extraídas de minas, y constituyen recursos no renovables. Las lombricompostas también contienen cantidades importantes de SH (8-12%) debido al proceso de humificación que es coadyuvado por el trabajo de las lombrices. En un estudio previos donde se usó ácido húmico (AH) de lombricomposta en pollos de engorda, se encontró reducción de la permeabilidad intestinal y de la traslocación bacteriana al hígado después de un desafío para provocar inflamación del intestino (Maguey-González et al., 2018^a); mientras que

en otra investigación donde se adicionó un extracto de SH en pollos se observó mayor rendimiento de la canal, lo que se asoció a un aumento de *Lactobacilos* en el yeyuno y reducción de la excreción de oocistos de coccidias (Domínguez-Negrete et al., 2019). En cerdos no se ha evaluado la inclusión de SH provenientes de una lombricomposta como promotor del crecimiento.

3.7. Sustancias húmicas obtenidas de lombricomposta

El lombricompostaje es un proceso bio-oxidativo que implica la descomposición de materiales orgánicos por especies de lombrices detritívoras que habitan en la hojarasca. Éstas son importantes porque fragmentan los materiales orgánicos y aumentan la superficie, pero las especies microscópicas en el estómago de las lombrices y sus excrementos son responsables de la descomposición real. Se considera que estos procesos relacionados con el intestino y las heces tienen un impacto significativo en las propiedades del lombricompostaje. Por su parte, las especies de lombrices utilizadas en lombricomposta son: *Eisenia fétida*, *Eisenia andrei*, y *Dendrobaena veneta*; siendo *E. fétida* una de las especies de lombrices de tierra más utilizadas debido a su alta tasa de digestión de materia orgánica, tolerancia a las condiciones ambientales, rápida tasa de reproducción, ciclo de vida corto y tolerancia al manejo (Magüey-González et al., 2022).

Se pueden distinguir dos fases en la lombricomposta: 1) una fase activa en la que las lombrices procesan los desechos mediante trituración física, ingestión y descomposición microbiana, y 2) una fase similar a la de maduración en la que las lombrices se mueven hacia capas más frescas de desechos no digeridos y los microbios proporcionan descomposición adicional (Domínguez et al., 2015).

La materia orgánica fresca como el estiércol animal utilizado en el presente experimento, se transforma en sustancias más estables similares al humus, los nutrientes se reciclan y se crea energía durante todo el proceso de

lombricompostaje; el cual debe ser aeróbico y una parte del mismo debe tener lugar en circunstancias termófilas (Maguey-González et al., 2022).

3.8. Extracción/ aislamiento de sustancias húmicas

AH, AF y huminas son los tres tipos principales de compuestos húmicos que se encuentran en suelos y sedimentos (Peña-Méndez et al., 2005; Lehmann y Kleber, 2015). Se utiliza una solución acuosa fuertemente básica de hidróxido de sodio o hidróxido de potasio para extraer SH del humus y otras fases sólidas. Las SH precipitan en esta solución cuando el pH se ajusta a 1 con ácido clorhídrico o sulfúrico, dejando a los AF en la solución (parte superior) (Stevenson, 1982; Maguey-González et al., 2022). Siendo la distinción más importante entre estos: los AF son insolubles en medios alcalinos, mientras que los AF son insolubles en medios ácidos y las huminas son insolubles a cualquier pH (Figura 1).

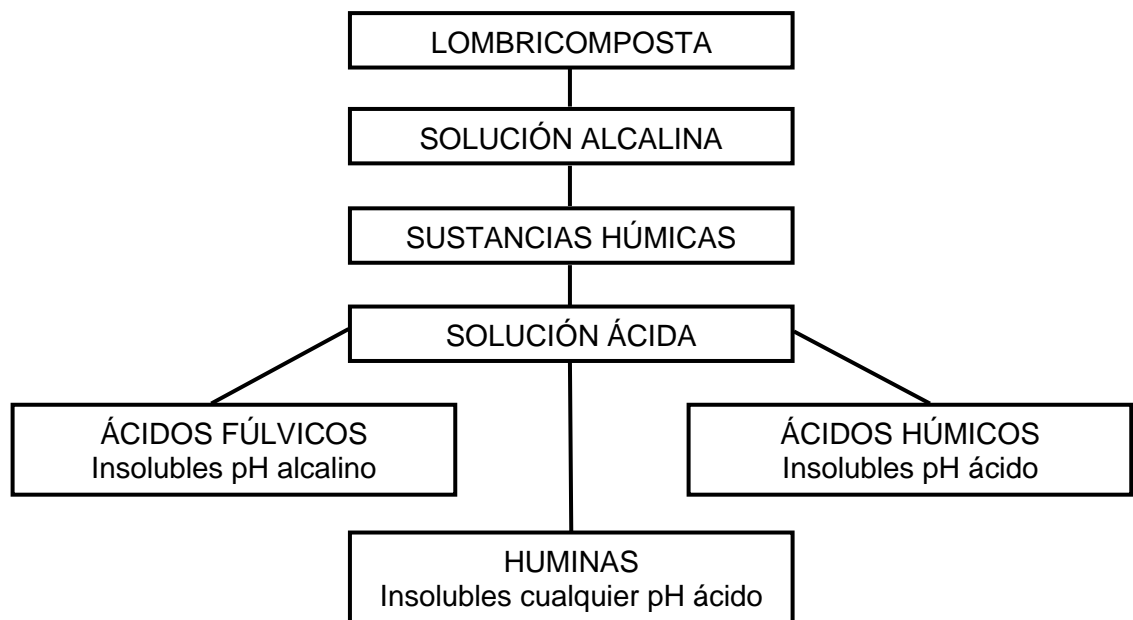


Figura 1. Fracciones de Sustancias Húmicas

Además de los disolventes alcalinos, para la extracción de SH se han propuesto agentes quelantes, disolventes orgánicos y soluciones salinas acuosas. Los disolventes alcalinos son los más eficientes y comúnmente utilizados (Maguey-González et al., 2022). La extracción de AH con NaOH es un método estándar para aislar AH, con una eficiencia de extracción de más del 80% de las muestras de suelos (Tabla 1).

Tabla 1. Agentes utilizados para la extracción de sustancias húmicas.

Agente	Extracción SH (%)
NaOH	80
Na ₄ P ₂ O ₇	30
Quelantes Orgánicos	30
Acetil-acetona/Hidroxiquinona	30
Ácido fórmico	55

Las SH se encuentran conformadas por cadenas alifáticas o anillos aromáticos, y en las cadenas laterales se distinguen grupos funcionales (carboxilos (COOH), hidroxilos (OH), fenólicos, carbonilos (C=O)) que confieren diferentes cualidades (coloidales, espectrales, electroquímicas y de intercambio de iones). (Peña-Méndez et al., 2005; Sanmiguel et al. 2014; Piccolo et al., 2019).

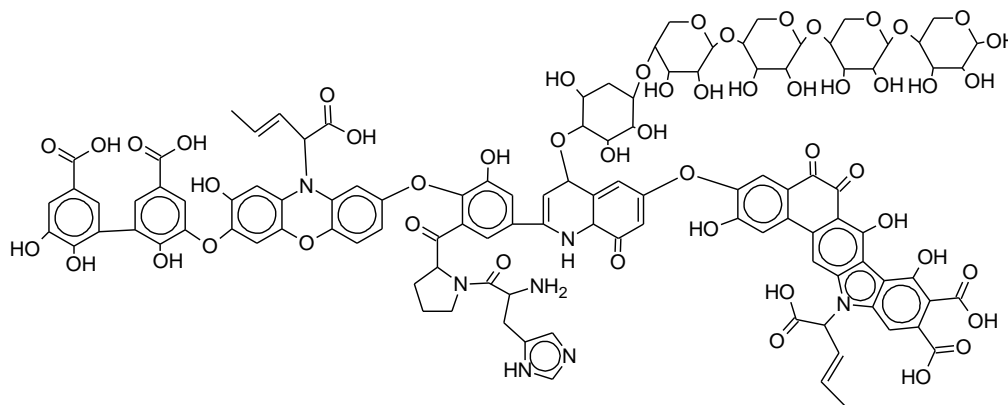


Figura 2. Estructura 2D de SH extraídas de lombricomposta (Domínguez-Negrete et al., 2019).

3.9 Uso potencial de sustancias húmicas de lombricomposta en cerdos al destete

El destete constituye uno de los eventos más estresantes en la vida del cerdo afectando la productividad y predisponiendo a desórdenes digestivos en el corto y mediano plazo. Los lechones al destete sufren diferentes factores de estrés, que pueden ser alimenticios, sociales, ambientales e infecciosos; las consecuencias son cambios profundos en la fisiología digestiva, respuesta inmune, conducta y capacidad de crecimiento (Reis de Souza y Mariscal, 2012; Gresse et al., 2019; Rentería et al, 2021). Los cambios alimenticios son los más importantes porque la composición de los alimentos sólidos al destete es variable e incluyen granos de cereales y pasta de soya que contienen almidones y proteínas complejas, que el lechón no digiere completamente ya que su capacidad enzimática está apenas en desarrollo, y además pueden contener antígenos o factores antinutricionales (Reis de Souza et al., 2005; Aguilera et al., 2006). Debido a esto, el lechón rechaza el alimento al principio, y el alimento consumido es parcialmente digerido quedando grandes cantidades de almidones y proteínas en el intestino, los cuales son fermentados por bacterias, dando lugar a diarreas ya sea mecánicas o infecciosas (Reis de Souza et al., 2010; Reis de Souza et al., 2012).

Al destete se presenta un consumo bajo y errático de alimento con ayunos que pueden variar desde algunas horas hasta días, lo que provoca retraso o suspensión de los movimientos estomacales, congestión de los vasos sanguíneos intestinales provocando hemorragias y ulceraciones en la mucosa, además de edematización e inflamaciones con presencia de células epiteliales inmaduras. El resultado es la atrofia de las vellosidades intestinales, descamación y muerte acelerada de los enterocitos, lo que reduce la concentración de enzimas digestivas y la superficie de digestión de la mucosa (Reis de Souza et al., 2005; Aguilera et al., 2006). El destete, también afecta negativamente el funcionamiento de la barrera intercelular que llevan a cabo proteínas conocidas como uniones estrechas que

consisten principalmente en complejos de proteínas transmembrana como las claudinas, ocludinas y las proteínas citosólicas *zona occludens*, que unen las proteínas transmembrana a las actinas citoesqueléticas. Las uniones estrechas conectan y sellan el espacio entre dos enterocitos y en condiciones normales evitan el paso de moléculas grandes como antígenos, o agentes patógenos, como virus, bacterias y parásitos a través del espacio intercelular, lo que se conoce como función de barrera (Moeser y Blikslager, 2007; Kim et al., 2012).

El sistema inmune asociado a la mucosa intestinal (innato y adaptativo) es inmaduro en lechones destetados entre los 21 a 28 días de edad y su respuesta post-destete se reduce debido a los cambios dramáticos que sufre la superficie de la mucosa intestinal. Además, al destete se elevan las concentraciones de cortisol en la sangre, lo que causa una inmunosupresión adicional (Moeser et al., 2007; Gallois et al., 2009; Smith et al., 2010). Es por ello que, los cerdos jóvenes son susceptibles a una serie de enfermedades bacterianas, que incluyen la colibacilosis causada por serotipos de *E. coli* enterotoxigénica y la salmonelosis causada por *Salmonella spp* (Hampson y Pluske, 2004; Pluske y Hampson, 2009). Esto se debe principalmente al deterioro de la función de barrera de la mucosa, debido a que la matriz proteica que se encuentra en los espacios intercelulares se debilita por la inflamación del intestino, lo que aumenta la permeabilidad del epitelio.

En estudios con cerdos al destete adicionados con SH en los alimentos se han reportado mejoras en las variables productivas y la salud (Slavík, 1999; Zralý y Písaříková, 2010; Trckova et al., 2018); también se reportó un mejor balance en la microbiota intestinal de lechones al destete por efecto del cambio de dieta (Trckova et al. (2018).

4. HIPÓTESIS

La adición de SH a partir de una lombricomposta en el alimento de cerdos destetados, favorece la homeostasis de la microbiota intestinal, mejora el crecimiento en el período posdestete, la integridad intestinal de los animales, favorece la digestibilidad y retención de nutrientes en cerdos jóvenes.

5. JUSTIFICACIÓN

La adición de SH a la dieta en cerdos, es una alternativa para reducir o alternar el uso de los APC en los alimentos, manteniendo una producción eficiente y obteniendo alimentos de alta calidad, inocuos y a bajo costo; debido a sus posibles efectos positivos en la microbiota intestinal, reducción de la inflamación y reforzamiento de la función de barrera intestinal.

6. OBJETIVOS

6.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto antimicrobiano y promotor del crecimiento de un extracto de SH a partir de una lombricomposta en lechones al destete sobre las variables productivas, estatus antioxidante de la carne, respuesta inmune en la mucosa digestiva, cambios histológicos, y en cerdos en crecimiento la digestibilidad y retención de nutrientes.

6.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obtener el extracto de SH a partir de una lombricomposta elaborada con excretas de ovinos a través de una extracción alcalina.
- Determinar la dosis óptima de SH (0, 2500 y 5000 ppm de inclusión) que optimiza las variables productivas al destete.
- Evaluar la estabilidad y el estatus antioxidante en carne y suero sanguíneo.
- Estimar los cambios en la histología de las vellosidades intestinales.
- Comparar la digestibilidad y el balance de N y E en cerdos alimentados con APC y SH de lombricomposta, inoculados o no con lipopolisacárido de *Escherichia coli* (LPS).

7. MATERIAL Y MÉTODOS

7.1 Declaración ética

El presente estudio fue revisado y aprobado por el Subcomité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales Experimentales (SICUAE) de la Universidad Nacional Autónoma de México, protocolo número: SICUAE.DC-2021/1-1.

7.2 Ubicación

Las actividades experimentales se llevaron a cabo en las instalaciones del Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Fisiología y Mejoramiento Animal (CENIDFyMA) del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP); ubicado en la localidad de Ajuchitlán, municipio de Colón, Querétaro, México. La extracción de SH se realizó en el módulo de tratamiento de residuos y laboratorio de nutrición animal. El primer experimento correspondiente a la prueba de comportamiento productivo en lechones al destete, se desarrolló en la “Unidad Experimental Porcina”; la capacidad antioxidante se realizó en el “Laboratorio de calidad de carnes”; las determinaciones de histología intestinal en el “Laboratorio de Reproducción Animal”; y la respuesta inmune en el “Laboratorio de biología molecular”. El segundo experimento correspondiente al balance de N y E en cerdos en crecimiento se realizó en la “Unidad Metabólica”.

7.3 Obtención de sustancias húmicas

En un estudio previo (Domínguez-Negrete et al., 2019) se extrajo y aisló las SH de la misma lombricomposta que fue usada en el presente trabajo y se reportó la concentración de AH, AF, cenizas y aromaticidad de 47.1, 29.6, 23.2 y 53.8%

respectivamente; así mismo se reportaron los resultados de grupos funcionales, análisis elemental y tipos de cristales.

En primera instancia, el estiércol de oveja pasó por un proceso de pre-descomposición de dos semanas antes de ser inoculado con lombriz roja californiana y se cosechó tres meses después. El lombricompostaje se realizó en invernadero con ventilación natural, y previo a su extracción se retiraron los materiales extraños que contenía; se secaron a temperatura ambiente y se pasaron a través de una malla metálica con el fin de homogeneizar el tamaño de las partículas.

La extracción y aislamiento de SH se realizó en tres fases siguiendo las recomendaciones de Stevenson (1982). Esto es, en la primera fase se depositaron 100 kg de lombricomposta seca en un contenedor y se mezclaron con 400 L de hidróxido de sodio (NaOH, 0.5 M), se homogeneizó la mezcla y se dejó reposar durante 24 h. La mezcla se decantó para separar la fracción líquida, que se recogió en un recipiente. En la segunda fase se adicionaron 300 L de NaOH 0.1 M a la fracción sólida restante, se homogeneizó y luego de 24 h se decantó la fracción líquida y se recogió en el mismo recipiente. En la tercera fase, se agregaron 100 L de agua a la fracción sólida restante, se homogeneizó y se dejó reposar nuevamente durante 24 h. La mezcla se decantó y la fracción líquida se almacenó en el recipiente. Las tres fracciones líquidas extraídas se mezclaron y homogeneizaron, depositándolas en lechos de secado con piso de concreto cubierto con plástico, dentro de un invernadero con ventilación natural. Se depositaron cincuenta litros de extracto en cada cubeta y se dejaron secar a temperatura ambiente durante siete días. Al final de este período, el sólido se recogió y se secó durante 48 h a 55°C en un horno de aire forzado (Shel Lab, Cornelius, OR, EUA.) previo a molerlo en un molino (Thomas Willey, Thomas Scientific, EUA) con una pantalla de 0,1 mm de diámetro.

7.4 Identificación de estructuras químicas y grupos funcionales de las sustancias húmicas

Para la identificación de grupos funcionales, se utilizó un espectrofotómetro infrarrojo (Spectrum GX, Perkin-Elmer, EUA) con transformación de Fourier con reflectancia total atenuada (FTIR-ATR) con un accesorio ATR. Todos los espectros fueron recolectados en un rango de 4000–400 cm^{-1} , con una resolución de 4 cm^{-1} , utilizando 32 escaneos por muestra. La muestra se analizó por triplicado. El análisis elemental de SH se llevó a cabo utilizando espectroscopía de rayos X dispersiva de energía (EDS). Se utilizó un microscopio electrónico de barrido ambiental Phillips XL30 / 40 EDS-ESEM equipado con una fuente de rayos X (microspot XTrace) y un detector XFlash® 6/10 (Bruker Nano GmbH). La muestra se analizó por triplicado, utilizando mapeo de zona. Los tipos de cristales se detectaron con difracción de rayos X (DRX). Las muestras se analizaron por triplicado en un difractómetro (SmartLab 2100, Rigaku, Japón). Se utilizaron una fuente de radiación $\text{CuK}\alpha$ de 30 kV y una fuente de alimentación fija de 20 mA. Los patrones de difracción se midieron en una región 2-Theta de 3 a 70°, usando un paso de 0.02°. Los resultados se utilizaron para el cálculo de la aromaticidad. La aromaticidad se calculó en base al método descrito anteriormente. Se identificaron las bandas γ y G, que representan las partes alifáticas y aromáticas, respectivamente. Se realizó la desconvolución del patrón XRD obtenido por el programa PeakFit v.4.12, y se determinó el área bajo la curva usando la siguiente fórmula:

$$\text{Aromaticidad, \%} = \frac{\text{Banda G} \times 100}{\text{Banda G} + \text{Banda } \gamma}$$

7.5 Prueba de comportamiento productivo en lechones al destete

7.5.1 Animales, tratamientos y manejo

Se utilizaron 200 lechones ([Large white \times Landrace] \times Large white) provenientes de dos lotes de parición, destetados a los 22 días de edad con un peso

corporal promedio de 5.58 ± 0.69 kg; los cuales se aleatorizaron de acuerdo a la camada de origen, sexo y peso en uno de los siguientes tratamientos: 1= dieta control positivo (CP) que contenía colistina a una dosis de 40 ppm, 2= dieta control negativo (CN) sin APC, 3= dieta sin APC y adicionada con 2500 ppm de SH, y 4= dieta sin APC y adicionada con 5000 ppm de SH. Se tuvieron diez corrales (repeticiones) por tratamiento con cinco lechones por corral y un total de 50 animales por tratamiento.

Durante las primeras tres semanas posdestete los lechones se alojaron en una sala cerrada de concreto, con ambiente controlado (28 a $30 \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante la primera y segunda, respectivamente), mediante un sistema de calefacción. La sala de destete estuvo equipada con corrales elevados en slat a 38 cm de altura, con piso de rejilla, con 115 cm de ancho y 150 cm de largo, para una superficie efectiva de 1.7 m^2 , equipados con un bebedero de chupón y un comedero tipo tolva (con 6 bocas). Los lechones tuvieron libre acceso al agua y se suministraron tres raciones diarias de alimento a cada unidad experimental, inicialmente de 200 g en promedio cada ración; la cual se aumentó o disminuyó según el consumo diario por corral. La primera semana se suministró una dieta de Fase 1 (F1), y las 2 semanas posteriores una dieta de Fase 2 (F2).

Inicialmente se acomodaron cinco lechones por corral y se fueron disminuyendo en una unidad los tres y siete días posdestete (toma de muestras); para quedar un total de tres lechones por corral para la evaluación de variables productivas. Los lechones se pesaron individualmente al momento del destete, y posteriormente cada siete días hasta el final de la prueba para calcular la ganancia diaria de peso (GDP). Se registró el alimento ofrecido y rechazado semanalmente y se estimó el consumo diario de alimento (CDA). La EA se calculó dividiendo la GDP entre el CDA. Se evaluó en las mañanas la consistencia fecal (CF) en cada corral, con base a una evaluación visual (Ball y Aherne, 1987), en una escala de 0 a 3, donde: 3= heces muy líquida; 2= heces semi-líquidas; 1= heces pastosas; y 0= heces

con consistencia normal. La calificación diaria por corral se sumó cada semana y en el total del periodo experimental, para calcular el nivel de consistencia de las heces.

A los 22 días posdestete, los lechones se trasladaron a corrales de piso de concreto, donde permanecieron hasta completar 42 días posdestete. Las instalaciones estuvieron parcialmente abiertas, con cortinas que ayudaron a aislar la temperatura del medio externo; cada corral estuvo provisto de un comedero y un bebedero automático. Se empezó a suministrar una dieta de fase 3 (F3: Tabla 2), en una ración promedio por día de 1.5 kg de alimento por corral. Semanalmente se realizó la lectura de comedero para obtener el rechazo de alimento; de igual manera se pesó a todo el lote y se realizó la evaluación de consistencia fecal.

Tabla 2. Composición de dietas experimentales

Ingredientes, g/kg	F1	F2	F3
Maíz amarillo	393.9	467.0	618.1
Avena	50.0	40.0	0.0
Soya, pasta	120.0	200.0	306.7
Aislado de soya	76.3	48.5	0.0
Harina de pescado	50.0	0.0	0.0
Suero de leche	246.9	164.6	0.0
Maíz, Aceite	33.5	42.6	37.4
L-Lisina HCl	4.1	5.0	4.6
L-Treonina	1.2	1.3	1.2
DL-Metionina	1.8	1.9	1.3
L-Triptofano	0.3	0.2	0.1
L-Valina	0.2	0.6	0.2
Sal Común	5.0	5.0	5.0
Colistina	1.0	1.0	1.0
Carbonato de calcio	4.3	6.1	8.2
Fosfato bicálcico 18	8.7	13.3	13.5
Vitaminas*	0.9	1.0	1.0
Colina	1.0	0.8	0.8
Minerales 060**	1.0	1.0	1.0
Composición calculada de nutrientes			
Energía metabolizable, Kcal/kg	3400	3400	3335
Proteína cruda, %	22.5	20.2	19.5

Lisina digestible, %	1.50	1.35	1.23
Treonina digestible, %	0.88	0.79	0.73
Aminoácidos azufrados digestibles, %	0.82	0.74	0.68
Triptófano digestible, %	0.25	0.22	0.20
Valina digestible, %	0.96	0.86	0.78
Calcio, %	0.85	0.80	0.60
Fósforo digestible, %	0.54	0.45	0.35

*Aporte / kg de alimento: vitamina A, 4250 UI/g; vitamina D3, 800 UI/g; vitamina E, 32 UI/g; vitamina K3, 1.5 mg/kg; biotina, 120 mg/kg; cianocobalamina, 16 µg/kg; colina, 250 mg/kg; ácido fólico, 800 mg/kg; niacina, 15 mg/kg; ácido pantoténico, 13 mg/kg; piridoxina, 2.5 mg/kg; riboflavina, 5 mg/kg; tiamina, 1.25 mg/kg.

**Aporte / kg de alimento: Zn, 120 mg; Fe, 100 mg; I, 0.80 mg; Co, 0.60 mg; Mn, 40 mg; Se, 0.25 mg; Cu, 14 mg.

7.5.2 Sacrificio y toma de muestras

Al destete se seleccionaron 10 lechones al azar y fueron sacrificados para llevar a cabo un muestreo basal. A los 3 y 7 días posdestete también se seleccionó un animal por corral para ser sacrificado. En primera instancia se obtuvo una muestra de sangre por animal en tubos vacutainer de polipropileno, los cuales se centrifugaron a 3500 rpm durante 10 minutos a 4°C para obtener suero, las muestras se almacenaron en microviales de 1.5 ml y fueron congeladas a -20 °C hasta su determinación. Posteriormente, se insensibilizaron a los animales con pistola de perno cautivo de penetración y se procedió al sacrificio mediante el desangrado por corte de vena cava anterior; como lo indica la norma oficial Mexicana NOM-033-ZOO-1995 (*Sacrificio humanitario de los animales domésticos y silvestres*). Se procedió a la apertura de la cavidad abdominal para la colecta de diferentes muestras. Se cortó una porción de aproximadamente 15 cm de largo de yeyuno, el contenido fue lavado con 10 ml de agua destilada y colocado en tubos Eppendorf conteniendo formalina al 10% en solución salina de fosfato bufferado; para realizar cortes histológicos, evaluar la integridad del tejido intestinal y la abundancia de IgA, Muc-2, claudina y ocludina mediante la técnica de PCR.

Para la evaluación de capacidad antioxidante y oxidación lipídica, se extrajo una muestra de músculo *psoas mayor* y *longissimus dorsi* entre la 9ª a la 11ª costilla, los cuales fueron dispuestos en una cámara de frío hasta alcanzar 4°C;

posteriormente se midió el pH utilizando un potenciómetro para carne HI 99.163 conectado a un electrodo de punción de vidrio (HANNA Instruments México).

Se obtuvo el metacarpo anterior izquierdo para la determinación de materia seca y cenizas.

7.5.3 Determinaciones de laboratorio

7.5.3.1 Capacidad antioxidante

Se analizó la actividad de captación de radicales 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH) y la capacidad antioxidante de radicales férricos (FRAP) siguiendo procedimientos estandarizados (Serpen et al., 2012; Benzie y Strain, 1999). Se homogenizó 5 g de carne en 25 ml de tampón fosfato (homogenizador IKA T25) durante 1 min, posteriormente se centrifugó el homogenizado durante 30 min a 10.000 rpm a 4°C, para ser filtrado en papel de filtro Whatman N° 4. El filtrado se colectó en tubos Eppendorf y se almacenaron a -20°C para su posterior análisis. Para determinaciones de DPPH se mezclaron 25 µL del extracto con 975 µL de la solución DPPH en tubos de ensayo y fueron incubados en la oscuridad durante 1 h a temperatura ambiente. La absorbancia fue leída a 515 nm. Los resultados fueron expresados en mg equivalentes de Trolox/g de carne. Para las determinaciones de FRAP, se mezcló una alícuota de 25 µL del extracto con 975 µL de una solución de FRAP (2.5 mL de ácido 2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ)) 40 mM, 2.5 mL de FeCl₃ 20 mM y 25 ml de tampón de acetato 0.3 mM, pH 3.6) en tubos de ensayo. La absorbancia fue leída a 593 nm usando un espectrofotómetro UV/VIS (GENESYS 10S UV-Vis Thermo scientific, EUA), y las lecturas se tomaron a los 6 min después del inicio de la reacción. Los resultados fueron expresados como mg equivalentes de Trolox/g de carne. Para el caso de estas determinaciones en suero sanguíneo, se aplicaron los procedimientos mencionados anteriormente y los resultados fueron expresados en µM de Trolox/ml de suero.

7.5.3.2 Oxidación lipídica

La oxidación de los lípidos se determinó mediante la prueba de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) según lo descrito por (Maraschiello et al., 1999), en donde se homogenizaron 5 g de carne en un baño de hielo con 20 ml de solución de ácido tricloroacético (TCA) durante 1 min. El homogeneizado se centrifugó durante 20 min a 10.000 rpm a 4°C. El sobrenadante se filtró en tubos protegidos contra la luz y se almacenó a -20°C para su posterior análisis. Los TBARS fueron determinados en 1 ml del extracto mezclado con 1 ml de TBA en tubos de ensayo. Los tubos se calentaron durante 30 min a 95°C, enfriados y centrifugados, hasta su lectura por absorbancia a 530 nm. Los resultados fueron expresados en mg de malondialdehído (MDA)/ g de carne.

7.5.3.3 Evaluación histología, morfometría intestinal

Las muestras de aproximadamente 15 cm de largo de yeyuno, se lavaron con solución salina, fueron seccionadas en tres partes de aproximadamente 5 cm cada una y se fijaron con alfiler a una base de plástico; sumergiéndolas en formol neutralizado (formalina neutra) al 10% (Nabuurs et al., 1993). Posteriormente, se realizaron cortes histológicos de 5 µm de espesor, por medio de la técnica de inclusión en parafina; los cortes se tiñeron con hematoxilina-eosina (H&E) para el análisis morfométrico de las vellosidades. Se observaron las vellosidades en microscopio óptico a 10X, realizando 10 mediciones de vellosidades por lechón (Nabuurs et al., 1993). Se determinó la altura y ancho de vellosidades, y la profundidad de criptas (Reis de Souza et al., 2005) empleando el software (AnalySIS Optibasic de Soft Imaging System). Se realizó el cálculo de área de vellosidades y se estableció la relación altura de vellosidad/profundidad de criptas.

Mediante la tinción Pas de Schiff se cuantificó las células caliciformes neutras; la tinción azul alcian pH 1.0 se empleó para cuantificar células caliciformes fuertemente sulfatadas; la tinción azul alcian pH 2.5 para cuantificar células caliciformes no sulfatadas. Las células teñidas se cuantificaron desde la

base hasta el extremo apical de cada vellosidad. Se determinó el número de células caliciformes por mm² y por vellosidad.

7.5.4 Análisis estadístico

Los datos se sometieron a análisis de varianza (ANOVA) mediante un diseño de bloques completos al azar; el bloque fue definido por el lote de parición. Hubo cuatro tratamientos con diez repeticiones cada una con cinco lechones al inicio, y con tres lechones a partir del día siete postdestete; la unidad experimental fue el corral. Se utilizó el procedimiento de diferencia significativa para evaluar la diferencia entre los tratamientos. Las tablas muestran las medias de mínimos cuadrados y el error estándar de la media. La significación se definió como $P \leq 0.05$, mientras que la tendencia a la significación se definió como $0.05 < P \leq 0.10$.

7.6 Prueba balance de nitrógeno y energía en cerdos en crecimiento

7.6.1 Animales, tratamientos, manejo

Se utilizaron 24 cerdos machos en crecimiento con un peso corporal inicial promedio de 37 ± 0.80 kg; los cuales se alojaron de manera individual en jaulas metabólicas ubicadas en una habitación con ventilación y extractores de aire, piso de concreto y paredes de azulejo para facilitar la limpieza; la temperatura osciló entre los 21.1 y 22.6°C, las jaulas contaron con bebedero automático adaptado a un dispensador con 3 L de capacidad y un comedero individual. El piso fue de slat y en la parte inferior de la jaula se instaló una malla y una charola que permitieron la colecta diaria de heces y el filtrado de la orina.

Durante cinco días previos a la distribución de los tratamientos, se suministró una dieta basal sin APC ni SH, distribuida en dos raciones diarias, la cual se ofreció durante 1 hora para posteriormente determinar su rechazo. Los cerdos se pesaron al inicio y al final del experimento. La distribución de los tratamientos se realizó en forma alternada en ocho jaulas por lote; se usaron cuatro tratamientos en un diseño factorial de 2 dietas (1: control con colistina en una dosis de 40 ppm [APC] y 2: con

5000 ppm de SH [SH]) combinadas con 2 inóculos (1: solución salina fisiológica [SSF] y 2: LPS) por vía intramuscular. El aporte de E metabolizable (EM) calculado de las dietas fue de 3390 Kcal EM (Tabla 3); el racionamiento diario de alimento fue de 555 kcal de EM por kg^{0.6} de peso vivo (Velayudhan et al., 2015). Se inició con una inyección de 30 µg de LPS/kg de PV vía intramuscular cinco días previos a la prueba de balance y se repitió cada tercer día a partir de la primera dosis, con un aumento del 20% por cada inyección, correspondiendo a 37.5 y 45 µg de LPS/kg de PV, respectivamente. A los cerdos que no recibieron LPS se inyectó SSF en la misma cantidad. La temperatura rectal se registró diariamente.

Tabla 3. Composición de dietas experimentales y análisis estimado del aporte de nutrientes.

Ingredientes, g/Kg	APC	SH
Sorgo, grano	354.16	354.16
Soya, pasta	272.00	272.00
Maíz amarillo, grano	240.00	236.00
Canola, pasta	60.00	60.00
Sebo	33.17	33.17
Ortofosfato de calcio	9.04	9.04
Calcio, carbonato	8.70	8.70
Soya, concentrado	6.11	6.11
L-Lisina HCl	5.55	5.55
Sal	4.00	4.00
L-Treonina	1.79	1.79
DL-Metionina	1.43	1.43
Colina HCL	1.12	1.12
Sustancias húmicas	0.00	5.00
Antibiótico (colistina)	1.00	0.00
Minerales traza	0.90	0.90
Premezcla de vitaminas**	0.50	0.50
Enzimas	0.30	0.30
L-Triptófano	0.13	0.13
Fitasa	0.10	0.10

*Aporte / kg de alimento: Zn, 120 mg; Fe, 100 mg; I, 0.80 mg; Co, 0.60 mg; Mn, 40 mg; Se, 0.25 mg; Cu, 14 mg.

**Aporte / kg de alimento: vitamina A, 4250 UI/g; vitamina D3, 800 UI/g; vitamina E, 32 UI/g; vitamina K3, 1.5 mg/kg; biotina, 120 mg/kg; cianocobalamina, 16 µg/kg; colina, 250 mg/kg; ácido fólico, 800 mg/kg; niacina, 15 mg/kg; ácido pantoténico, 13 mg/kg; piridoxina, 2.5 mg/kg; riboflavina, 5 mg/kg; tiamina, 1.25 mg/kg.

Composición nutricional estimada: EM (3390 Kcal/Kg), EN (2480 Kcal/Kg), PC (20.90%).

7.6.2 Prueba de balance y toma de muestras

Se registró el comportamiento productivo y se realizó la prueba de balance para determinar la diferencia de la retención de N y E de la dieta entre tratamientos. Después de siete días de adaptación a las dietas experimentales, se adicionó a estas mismas óxido de cromo (3 g/kg) como marcador para determinar el inicio de la colecta de heces; cinco días posteriores al inicio de la toma de muestras, se adicionó nuevamente el marcador en el alimento para determinar mediante las heces marcadas el fin de la colecta. Durante este periodo la colecta de heces y orina se realizó de manera consecutiva, cada 24 h. Las muestras de orina fueron colectadas en una cubeta con capacidad de 4 L a la que se adicionó 40 ml de HCl 6M, con el objetivo de acidificar el medio y evitar la volatilización de amoníaco; la cubeta dispuso de una capa de lana de vidrio y gazas estériles en su superficie como filtro, para finalmente conservar una alícuota equivalente al 20% del volumen total colectado, en frascos de plástico. Ambas muestras (heces y orina) se conservaron a -20 °C hasta su procesamiento.

Al inicio y final del experimento se tomó una muestra de sangre de la vena yugular a cada unidad experimental, se separó el suero por centrifugación a 3500 rpm durante 10 min a 4 °C y se congeló la muestra a -20 °C hasta su determinación. Se tuvieron seis repeticiones por tratamiento.

7.6.3 Análisis de laboratorio

Las heces se descongelaron, y secaron en una estufa de aire forzado a 55 °C durante 48 h. Las muestras de alimentos y heces fueron homogeneizadas respectivamente y se fraccionaron en un molino a través de una criba de 1 mm, para posteriormente analizar su contenido de MS (AOAC, 2000), N (AOAC, 2002), E bruta (EB) mediante bomba calorimétrica adiabática (modelo 1281, Parr, Moline, IL).

Las muestras de orina se descongelaron, se homogeneizaron y se tomó una alícuota de 5% para las determinaciones mencionadas. Para la determinación de E

se tomaron muestras de 10 ml por unidad experimental, los cuales se dispusieron en bolsas 2x 3'' (S-940, 2mil poly bag), previamente pesadas y taradas en balanza electrónica; se colocaron en charolas de plástico identificadas y se congelaron a -45 °C. Se preparó y programó la liofilizadora a 36 h.

Las bolsas con las muestras recién salidas de la liofilizadora se colocaron en disecadores hasta su procesamiento, 30 min después se registró el peso final de cada bolsa más la muestra para determinar el % MS, mediante la diferencia entre este resultado y el peso inicial de la bolsa más la muestra.

Posteriormente se programó el equipo de calorimetría para introducir como spike el material auxiliar, en el cual se determinó el calor de 3 bolsas vacías de 2x 3'' (S-940, 2mil poly bag) para estandarizar el equipo, las cuales tuvieron el mismo proceso en disecador y liofilizadora. Se procedió a introducir las bolsas con las muestras al calorímetro ya programado con "spike" para la determinación de EB en cal/g.

7.6.4 Análisis de los datos

Diariamente se registró el peso del alimento ofrecido y rechazado para calcular el consumo diario de alimento (CDA) y la eficiencia alimenticia (EA) por jaula metabólica. El consumo de alimento se utilizó para obtener el consumo de MS (g/d), N (g/d) y E (Kcal/d), multiplicando el consumo de alimento por la concentración del nutriente en la dieta. La estimación de la excreción de materia MS (g/d), N (g/d) y E (Kcal/d) en heces se realizó al multiplicar la cantidad de heces producidas en base seca por la concentración de nutrimentos en las heces. La estimación de la excreción de N (g/d) y E (Kcal/d) en orina se estimó multiplicando el total de orina producida por la concentración de nutrimentos en la orina.

La ecuación establecida para determinar la digestibilidad fecal de MS, N y E es la siguiente (Stein et al., 2007):

$$Da = ((AC \times NC - CH \times NE) / (AC \times NC)) \times 100$$

Donde: Da = Coeficiente de digestibilidad aparente

AC = cantidad de alimento consumido

CH = Cantidad de heces

NC = Concentración del nutriente consumido

NE = Concentración del nutriente excretado

La estimación de retención de N (g) y ED y EM (kcal) se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$RT = CNC - CNE_{(\text{heces})} - CNE_{(\text{orina})}$$

Donde: RT = Estimación de retención

CNC = Cantidad de nutrimento consumido

CNE = Cantidad de nutrimento excretado

7.6.5 Análisis estadístico

Los datos fueron sometidos a ANOVA como un diseño de bloques completos al azar, con arreglo factorial de 2 x 2. El bloque estuvo definido por el lote.

8 RESULTADOS

8.1 Comportamiento productivo

La Tabla 4 muestra los resultados del comportamiento productivo de lechones, entre 1 a 42 días posdestete. En el período 1-7 después del destete, los lechones de los tratamientos CP y CN tuvieron una GDP más baja ($P < 0,001$) y EA ($P < 0,001$) frente a los añadidos con 2500 y 5000 ppm de SH. A partir de los 8-21 días posdestete, los lechones CP tuvieron una GDP similar al resto de los tratamientos; pero la GDP fue menor ($P < 0.01$) en CN en comparación con los lechones que recibieron 2500 y 5000 ppm de SH. A los 42 días posdestete, el PC ($P < 0.05$) y la GDP ($P < 0.05$) fue más bajo y la EA tendió a ser más bajo ($P < 0.10$) de 22-42 días después del destete en los cerdos CP y CN en comparación con los tratamientos adicionados con 5000 ppm de SH; los cerdos que recibieron 2500 ppm de SH mostraron respuestas intermedias. De 1-42 días posdestete, los cerdos CN mostraron el nivel más bajo ($P < 0,01$) y los que recibieron 5000 ppm de SH tuvieron la GDP más alta; el CP y los cerdos adicionados con 2500 ppm de SH exhibieron GDP intermedia. El CP y CN mostraron el nivel más bajo ($P < 0.05$) y los que recibieron 5000 ppm de SH tuvieron la EA más alta; mientras que los cerdos alimentados con 2500 ppm de SH exhibieron una EA intermedia. Se observó una respuesta lineal ascendente en el PC a los 42 días posdestete ($P < 0.01$), la GDP en los períodos de 1-7 ($P < 0.01$), 8-21 ($P < 0.05$), 22-42 ($P < 0.01$) y 1-42 ($P < 0.05$) días posdestete, y la EA de 1-7 ($P < 0.01$), 22-42 ($P < 0.10$) y 1-42 ($P < 0.05$) días posdestete por efecto de los incrementos en la concentración de SH en la dieta.

Tabla 4. Comportamiento productivo de lechones de 1 a 42 días posdestete

Variables de respuesta	CP	CN	SH, ppm		EEM ^a	P <
			2500	5000		
Período 1 a 7 días posdestete						
Peso corporal inicial, kg	6.04	6.02	6.00	5.96	0.230	0.99
Peso corporal día 7, kg	6.19	6.07	6.32	6.34	0.236	0.84
Consumo de alimento, g/día	149.7	149.7	161.2	160.8	5.729	0.27

Ganancia de peso, g/día	22.1 ^b	7.9 ^b	45.8 ^c	54.6 ^c	8.643	0.01
Eficiencia alimenticia	0.13 ^b	0.05 ^b	0.28 ^c	0.34 ^c	0.050	0.01
Período 8 a 21 días posdestete						
Peso corporal día 21, kg	8.51	8.13	8.54	9.00	0.301	0.26
Consumo de alimento, g/día	254.8	257.9	273.2	288.1	12.920	0.22
Ganancia de peso, g/día	165.1 ^{de}	146.8 ^d	158.4 ^{de}	189.5 ^e	12.191	0.01
Eficiencia alimenticia	0.73	0.56	0.57	0.65	0.040	0.29
Período 22 a 42 días posdestete						
Peso corporal día 42, kg	16.24 ^b	15.36 ^b	16.99 ^{bc}	18.46 ^c	0.785	0.05
Consumo de alimento, g/día	754.9	689.3	751.4	775.0	35.846	0.39
Ganancia de peso, g/día	368.4 ^b	344.3 ^b	402.4 ^{bc}	450.7 ^c	28.039	0.05
Eficiencia alimenticia	0.49	0.50	0.54	0.58	0.028	0.09
Período 1 a 42 días posdestete						
Consumo de alimento, g/día	487.3	455.6	493.6	510.3	20.557	0.28
Ganancia de peso, g/día	242.9 ^{bc}	222.4 ^b	261.7 ^{bc}	297.6 ^d	15.021	0.05
Eficiencia alimenticia	0.50 ^b	0.49 ^b	0.53 ^{bc}	0.58 ^c	0.023	0.05

^a Error estándar de la media; diferentes superíndices dentro de una fila indican un diferencia significativa ^{b, d} P < 0.05.

8.2 Consistencia fecal y mediciones del metacarpo

La CF de 1-42 días posdestete y el peso del metacarpo y el contenido de cenizas a los siete días posdestete se muestran en la Tabla 5. La CF de 1-7 (P < 0.05), 8-21 (P < 0.01) y 1-42 (P < 0.01) días postdestete, fue mayor en CN, intermedio en CP y en lechones adicionados con 2500 ppm de SH, y fue el más bajo con 5000 ppm de SH. La CF disminuyó linealmente de 1-7 (P < 0,01), 8-21 (P < 0,01) y 1-42 (P < 0,01) días posdestete conforme se incrementó la adición de SH en la dieta. Esto indica que la CF con 5000 ppm de SH tiene una inclinación hacia el 0 donde se clasifican las heces normales; mientras que CN se acerca más al 1 donde se clasifican las heces como pastosas.

No hubo diferencias entre los tratamientos para la materia seca del metacarpo y el contenido de cenizas a los siete días después del destete.

Tabla 5. Consistencia fecal de 1 a 42 días posdestete, peso y contenido de cenizas del metacarpo en lechones a los siete días posdestete.

Variables de respuesta	CP	CN	SH, ppm		EEM ^a	P <
			2500	5000		
Puntuación CF						
1-7 días	0.59 ^{bc}	0.77 ^b	0.40 ^c	0.36 ^c	0.098	0.05
8-21 días	0.70 ^b	0.89 ^b	0.55 ^{bc}	0.35 ^c	0.110	0.01
22-42 días	0.45	0.64	0.40	0.41	0.106	0.34
1 – 42 días	0.58 ^b	0.77 ^c	0.47 ^{bd}	0.37 ^d	0.059	0.01
Medidas del metacarpo						
Materia seca, %	33.20	31.56	32.08	32.15	0.524	0.21
Materia seca, g	4.81	4.65	4.63	4.78	0.338	0.48
Ceniza, %	32.01	31.66	33.64	33.06	1.176	0.06
Cenizas, g	1.53	1.47	1.56	1.58	0.116	0.97

^a Error estándar de la media; Diferentes superíndices dentro de una fila indican un diferencia significativa ^{b, d} P < 0.05.

8.3 Respuesta antioxidante

Los resultados de FRAP, DPPH y TBARS en músculo *psoas mayor* y *longissimus dorsi* y FRAP y DPPH en suero se muestran en la Tabla 6. En el músculo *psoas mayor*, FRAP, DPPH y TBARS a los tres días posdestete y TBARS y FRAP a los siete días posdestete fueron similares entre tratamientos. A los siete días posdestete, el DPPH en mg Eq. trolox/g de carne (P < 0.01) y el % de inhibición (P < 0.01) fueron más altos en cerdos adicionados con 2500 ppm de SH e intermedio en cerdos con 5000 ppm de SH, y fueron los más bajos en CN y CP. En el músculo *longissimus dorsi*, TBARS y FRAP fueron similares entre tratamientos a los tres y siete días posdestete. A los tres días del destete, el DPPH en mg Eq. trolox/g de carne (P < 0.05) y el % de inhibición (P < 0.05) fueron mayores en cerdos adicionados con 2500 y 5000 ppm SH en comparación con los tratamientos CN y CP a los siete días posdestete, el DPPH en mg Eq. trolox/g carne (P < 0.10) y % inhibición (P < 0.10) tendió a ser más alto en cerdos con 2500 y 5000 ppm de SH,

fue intermedio en CN y fueron los más bajos en CP. En suero sanguíneo, FRAP no tuvo diferencias entre tratamientos a los tres y siete días posdestete. A los tres días posterior al destete, el DPPH en mg Eq. trolox/g carne ($P < 0.01$) y el % de inhibición ($P < 0.01$) fueron mayores en cerdos que recibieron 2500 y 5000 ppm de SH en comparación con los tratamientos CN y CP. A los siete días después del destete, el DPPH en mg Eq. trolox/g de carne ($P < 0.05$) y el % de inhibición ($P < 0,05$) fueron más altos en los cerdos que recibieron 2500 y 5000 ppm SH, fueron intermedios en CN y fueron los más bajos en CP. Se encontraron respuestas crecientes lineales en DPPH en mg Eq. trolox/g carne ($P < 0.05$) y % de inhibición ($P < 0.05$) en el músculo *Psoas mayor* a los siete días posdestete y en el músculo *Longissimus dorsi* a los tres y siete días después del destete debido al aumento en la concentración de SH en la dieta.

Tabla 6. Capacidad antioxidante y oxidación lipídica en músculos *Psoas mayor*, *Longissimus dorsi*, y suero sanguíneo a los tres y siete días posdestete.

Variables de respuesta	CP	CN	SH, ppm		EEM ^a	P <
			2500	5000		
<i>Músculo Psoas mayor</i>						
Día 3 posdestete						
FRAP, mg Eq. trolox/g carne	0.06	0.06	0.06	0.07	0.006	0.39
DPPH, mg Eq. trolox/g carne	0.41	0.44	0.47	0.53	0.041	0.21
DPPH, % inhibición	17.67	18.81	20.34	22.76	1.798	0.23
TBARS, mg MDA/g carne	0.19	0.15	0.24	0.23	0.044	0.43
Día 7 posdestete						
FRAP, mg Eq. trolox/g carne	0.06	0.05	0.06	0.06	0.005	0.37
DPPH, mg Eq. trolox/g carne	0.59 ^{bc}	0.51 ^b	0.71 ^d	0.61 ^{cd}	0.038	0.01; L y C
DPPH, % inhibición	25.16 ^{bc}	21.54 ^b	30.2 ^d	26.05 ^{cd}	1.660	0.01; L y C
TBARS, mg MDA/g carne	0.24	0.24	0.19	0.26	0.036	0.55
<i>Músculo Longissimus dorsi</i>						
Día 3 posdestete						
FRAP, mg Eq. trolox/g carne	0.04	0.03	0.04	0.05	0.05	0.24

DPPH, mg Eq. trolox/g carne	0.34 ^b	0.38 ^b	0.50 ^c	0.51 ^c	0.043	0.05; L, C
DPPH, % inhibición	15.31 ^b	17.36 ^b	22.59 ^c	23.54 ^c	1.929	0.05; L, C
TBARS, mg MDA/g carne	0.17	0.14	0.16	0.18	0.031	0.84
Día 7 posdestete						
FRAP, mg Eq. trolox/g carne	0.04	0.03	0.03	0.04	0.005	0.21
DPPH, mg Eq. trolox/g carne	0.41	0.54	0.59	0.59	0.048	0.10
DPPH, % inhibición	18.86	24.75	26.85	26.49	2.250	0.10
TBARS, mg MDA/g carne	0.16	0.13	0.20	0.24	0.040	0.26
Suero sanguíneo						
Día 3 posdestete						
FRAP, μ M de trolox/ml suero	7.20	6.72	7.54	7.13	0.294	0.28
DPPH, μ M de trolox/ml suero	13.07 ^b	11.90 ^b	14.98 ^b	22.90 ^c	1.251	0.01; L, C
DPPH, % inhibición	7.81 ^b	7.01 ^b	9.12 ^b	14.54 ^c	0.857	0.01; L, C
Día 7 posdestete						
FRAP, μ M de trolox/ml suero	6.38	6.63	6.12	6.20	0.271	0.56
DPPH, μ M de trolox/ml suero	14.91 ^b	13.02 ^b	15.36 ^b	22.01 ^c	2.030	0.05; L, C
DPPH, % inhibición	9.07 ^b	7.78 ^b	9.38 ^b	13.93 ^c	1.390	0.05; L, C

^a Error estándar de la media; diferentes superíndices dentro de una fila indican un diferencia significativa ^{b, d} $P < 0.05$; L: efecto lineal; C: efecto cuadrático.

8.4 Histología, morfología intestinal

La Tabla 7 muestra los resultados de morfología intestinal en lechones al destete a los tres y siete días posdestete. Se observa que a los tres días posdestete los lechones adicionados con 2500 y 5000 ppm de SH mostraron una mayor altura de vellosidades ($P < 0.05$) en comparación con CN; y resultados similares con CP. De igual manera se evidencia un mayor ancho de vellosidades ($P < 0.01$) y una mayor área de vellosidades ($P < 0.01$) por parte de los tratamientos añadidos con 2500 y 5000 ppm de SH, en comparación con el CN, y similar con CP.

La profundidad de criptas fue mayor ($P < 0.01$) en lechones adicionados con 2500 y 5000 ppm de SH, en comparación con CP y CN.

En cuanto a la relación altura de vellosidad/profundidad de criptas, los tratamientos adicionados con 2500 y 5000 ppm de SH tuvieron valores similares ($P < 0.05$) con el tratamiento CN, y 2500 ppm de SH fue a su vez similar con CP. Obteniendo éste último los mayores valores para esta variable.

A los 7 días posdestete se observa que los lechones adicionados con SH tuvieron mayor altura de vellosidades ($P < 0.01$), mayor área de vellosidades ($P < 0.01$) en comparación con el CP y CN; la profundidad de criptas tuvo valores similares entre tratamientos añadidos con SH y el CP, y mayores que los del CN ($P < 0.01$); la relación altura de vellosidad/profundidad de criptas fue mayor ($P < 0.05$) en 2500 ppm de SH en comparación con CP y 5000 ppm SH, y similar con CN. El ancho de vellosidades fue similar entre tratamientos.

Tabla 7. Morfología intestinal en lechones al destete a los tres y siete días posdestete

Variables de respuesta	Destete	SH, ppm				EEM ^a	P <
		CP	CN	2500	5000		
Día 3 posdestete							
Alto vellosidad, μm	345.49	307.12 ^c	278.08 ^b	317.75 ^c	310.46 ^c	10.86	0.05, L
Ancho vellosidad, μm	94.49	93.51 ^c	85.39 ^b	94.64 ^c	95.04 ^c	2.322	0.01, L
Área vellosidad, μm^2	110257	93471 ^c	76646 ^b	95841 ^c	93678 ^c	4343	0.01, L
Profundidad criptas, μm	200.62	194.65 ^b	203.01 ^b	236.78 ^c	241.85 ^c	6.566	0.01, L
Alto vellosidad/ profundidad criptas	1.82	1.66 ^c	1.40 ^b	1.50 ^{bc}	1.44 ^b	0.069	0.05
Día 7 posdestete							
Alto vellosidad, μm	345.49	258.95 ^b	253.03 ^b	293.24 ^c	282.45 ^c	7.893	0.01, C
Ancho vellosidad, μm	94.49	104.07	101.46	109.03	105.53	2.553	
Área vellosidad, μm^2	110257	85633 ^b	82125 ^b	101354 ^c	94575 ^c	3818	0.01, C
Profundidad criptas, μm	200.62	321.53 ^c	283.88 ^b	326.82 ^c	337.28 ^c	8.285	0.01, L

Alto vellosidad/ profundidad criptas	1.82	0.86 ^b	0.93 ^{bc}	1.01 ^c	0.89 ^b	0.040	0.05, C
---	------	-------------------	--------------------	-------------------	-------------------	-------	---------

^a Error estándar de la media; diferentes superíndices dentro de una fila indican un diferencia significativa ^{b, c} P < 0.05. L: efecto lineal; C: efecto cuadrático.

En la Tabla 8 se observa el conteo de células caliciformes productoras de mucinas neutras, ácido sulfatadas y ácido no sulfatadas en muestras de yeyuno a los tres y siete días posdestete; las cuales muestran una disminución respecto a los valores obtenidos al destete, en ambos días.

El conteo de células caliciformes productoras de mucinas neutras/vellosidad a los tres días posdestete muestra diferencias entre tratamientos (P < 0.01), obteniendo el valor más alto con 2500 ppm de SH respecto al CP y CN, y similar con 5000 ppm SH. El conteo de células caliciformes por (mm²) no tuvo diferencia entre tratamientos.

Al día siete posdestete el número de células caliciformes (mm²) y células caliciformes/ vellosidad fue mayor (P < 0.01) con 2500 ppm SH en comparación con CP, CN y 5000 ppm SH.

A los tres días posdestete el conteo de células caliciformes productoras de mucinas ácido sulfatadas, muestran un mayor valor obtenido (P < 0.01) por los tratamientos adicionados con 2500 y 5000 ppm de SH en comparación con CN y similar con CP. Al día siete posdestete se observa una tendencia (P < 0.10) en el número de células caliciformes/vellosidad en donde el tratamiento adicionado con 2500 ppm SH tuvo valores superiores, seguido por 5000 ppm de SH, CN y CP, respectivamente. Las células caliciformes (mm²) no tuvieron diferencias entre tratamientos a los tres y siete días posdestete.

A los tres días posdestete no se evidencia diferencias en el conteo células caliciformes productoras de mucinas ácido no sulfatadas entre tratamientos. Al día siete posdestete los tratamientos adicionados con 2500 y 5000 ppm de SH mostraron un mayor número de células caliciformes/vellosidad (P < 0.01) en

comparación con CN, y similar con CP. Las células caliciformes por (mm²) no mostraron diferencia entre tratamientos.

Tabla 8. Conteo de células caliciformes productoras de mucinas neutras, ácido sulfatadas y ácido no sulfatadas en muestras de yeyuno a los tres y siete días posdestete

Variable de respuesta	Destete	CP	CN	SH, ppm		EEM ^a	P<
				2500	5000		
Células caliciformes productoras de mucinas neutras (Pas de Schiff)							
Día 3 posdestete							
Cel. caliciformes, mm ²	1487.82	768.52	742.32	788.28	748.34	34.76	0.78
Cel. caliciformes/vellosidad	127.74	60.57 ^{cd}	51.84 ^b	66.35 ^e	63.02 ^{de}	2.35	0.01
Día 7 posdestete							
Cel. caliciformes, mm ²	1487.82	607.9 ^c	554.98 ^b	712.85 ^e	687.27 ^d	27.15	0.01
Cel. caliciformes/vellosidad	127.74	48.82 ^c	40.34 ^b	69.18 ^e	60.32 ^d	2.58	0.01
células caliciformes productoras de mucinas ácido sulfatadas (Alcian blue pH 1.0)							
Día 3 posdestete							
Cel. caliciformes, mm ²	1329.70	786.45	788.54	746.82	727.15	51.30	0.79
Cel. caliciformes/vellosidad	100.66	56.05 ^c	47.88 ^b	57.87 ^c	58.18 ^c	2.60	0.01
Día 7 posdestete							
Células caliciformes, mm ²	1329.70	827.37	877.57	835.21	796.80	53.09	0.76
Células caliciformes/vellosidad	100.66	61.20	61.64	70.50	62.71	2.79	0.06
células caliciformes productoras de mucinas ácido no sulfatadas (Alcian blue pH 2.5)							
Día 3 posdestete							
Cel. caliciformes, mm ²	1248.64	788.42	913.38	793.52	726.11	68.64	0.15
Cel. caliciformes/vellosidad	98.14	57.55	55.61	59.19	58.62	2.66	0.79
Día 7 posdestete							
Cel. caliciformes, mm ²	1248.64	902.45	794.83	805.27	864.70	46.23	0.31
Cel. caliciformes/vellosidad	98.14	67.92 ^c	56.05 ^b	69.99 ^c	70.18 ^c	2.46	0.01

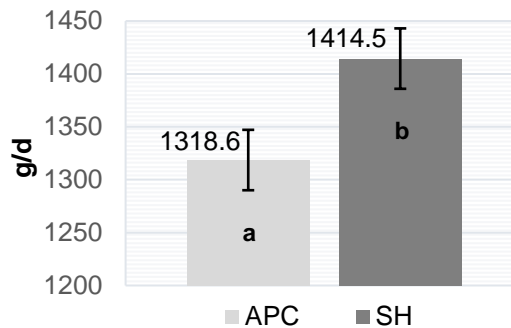
^a Error estándar de la media; diferentes superíndices dentro de una fila indican un diferencia significativa

^{b, d} P< 0.05.

8.5 Balance de nitrógeno y energía

Los resultados muestran que no hubo diferencia significativa en las interacciones. En la Gráfica 1 se observa que el efecto principal del promotor de crecimiento fue significativo para CDA (1318.6 vs 1414.5; EEM =28.550), siendo mayor el resultado obtenido en cerdos añadidos con 5000 ppm SH ($P < 0.05$).

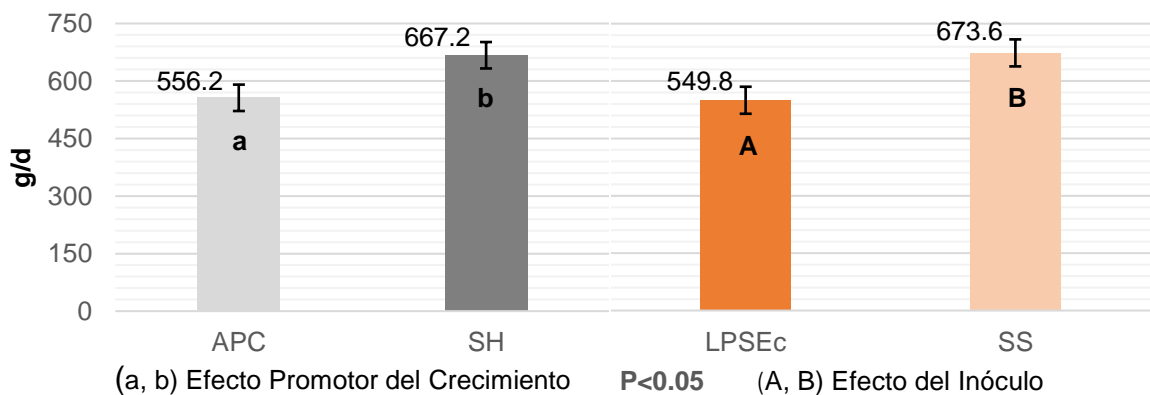
Gráfica 1. Consumo diario de alimento (CDA)



a,b Efecto del Promotor del Crecimiento, $P < 0.05$.

En la Gráfica 2 se muestra que la GDP fue mayor en los tratamientos añadidos con 5000 ppm de SH respecto a los tratamientos con APC ($P < 0.05$).

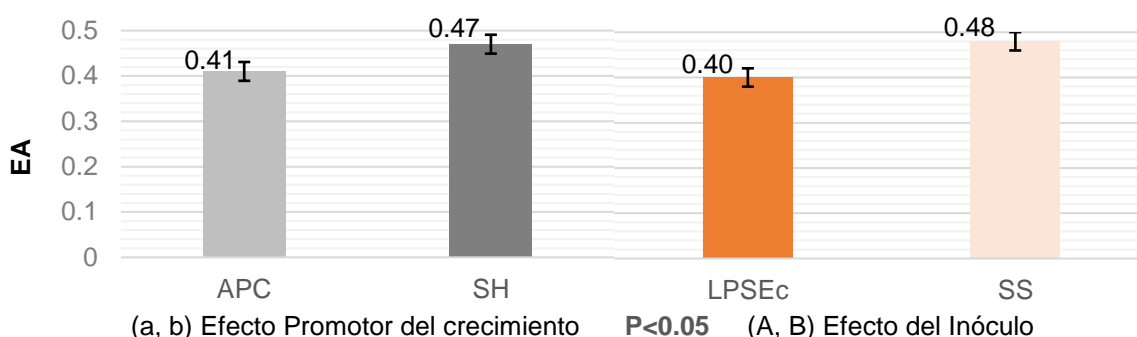
Gráfica 2. Ganancia diaria de peso (GDP)



En cuanto a la eficiencia alimenticia observada en la Gráfica 3, hubo diferencia significativa por efecto del promotor de crecimiento ($P < 0.05$), siendo

mayor el resultado obtenido en el tratamiento con 5000 ppm de SH respecto a los que se adicionó APC. Se observa también un efecto por parte del inóculo, en donde SS muestra una mayor EA respecto a LPS ($P < 0.05$).

Gráfica 3. Eficiencia Alimenticia (EA)



En la Tabla 9 se observan los resultados del balance de MS, el cual no muestra diferencias para las variables evaluadas entre tratamientos, tanto por el efecto promotor del crecimiento (SH, APC), ni por efecto del inóculo (LPS, SSF).

Tabla 9. Balance de materia seca.

Variables de respuesta	APC		SH		EEM ^a
	SSF	LPS	SSF	LPS	
Consumo de MS, g/d	1354.63	1281.93	1418.68	1391.01	36.550
MS en heces, g/d	131.35	115.02	129.84	162.22	14.491
MS digestible, %	88.62	89.93	89.72	86.99	1.519
Consumo MS digestible, g/d	1214.34	1149.50	1261.56	1238.86	43.402

^a Error estándar de la media

En la Tabla 10, se observa los resultados del balance de N; en donde el N consumido muestra diferencia entre tratamientos a los que se añadió APC respecto a los que se adicionaron 5000 ppm de SH, mostrando estos últimos valores más altos para esta variable ($P < 0.05$). Para las demás variables evaluadas no se muestran diferencias entre tratamientos.

Tabla 10. Balance de nitrógeno

Variables de respuesta	APC		SH		EEM ^a	P <
	SSF	LPS	SSF	LPS		
N consumido, g/d	38.73 ^b	36.69 ^b	41.83 ^c	41.07 ^c	1.509	0.05
N en heces, g/d	5.68	4.67	5.13	6.69	0.705	
N absorbido, g/d	33.06	32.01	36.70	34.39	1.923	
N digestible, %	84.19	87.09	87.76	83.70	2.656	
N en orina, g/d	14.96	13.59	16.92	13.84	3.355	
N excretado, g/d	20.63	18.27	22.05	20.52	3.619	
N retenido, g/d	18.10	18.42	19.78	20.55	4.006	
N retenido del consumido, %	44.02	49.72	47.89	50.79	10.074	
N retenido del absorbido, %	49.27	57.92	54.46	59.95	11.642	

^a Error estándar de la media; diferentes superíndices dentro de una fila indican una diferencia significativa ^{b-c} P < 0.05.

En la Tabla 11, se observan los resultados del balance de E, en donde no hubo diferencia por efecto promotor del crecimiento (SH, APC) y efecto del inóculo (LPS, SSF) entre tratamientos.

Tabla 11. Balance de energía

Variables de respuesta	APC		SH		EEM ^a
	SSF	LPS	SSF	LPS	
E en heces, Kcal/d	613.29	530.49	590.54	736.82	67.639
Digestibilidad de la E, %	87.03	88.67	88.53	85.53	1.734
E digestible, Kcal/kg	3190.3	3249.0	3210.7	3118.6	66.084
E excretada, Kcal/d	753.32	674.47	804.48	917.89	81.562
E en orina, Kcal/d	140.03	143.98	213.94	181.07	34.742
E metabolizable, %	84.22	85.64	84.41	82.05	1.948
E metabolizable, Kcal/kg	3086.9	3138.3	3062.4	2992.8	74.214

^a Error estándar de la media

9 DISCUSIÓN

Prueba de comportamiento productivo

Las mejoras en el peso corporal final, GDP y EA observadas en lechones destetados que fueron adicionados con SH en el presente estudio concuerdan con publicaciones previas. Se ha observado mayor GDP hasta 21 días posdestete en comparación con el grupo control en lechones a los que se les añadió 1 % de humato de sodio (Zralý y Písaříková, 2010). Cerdos destetados alimentados con dietas adicionadas con 20 g/kg de leonardita o lignito, mostraron mayor peso corporal a los 21 días posdestete y GDP en la segunda y tercera semana posdestete en comparación con el grupo control (Trckova et al., 2018). Cerdos destetados alimentados con 2000 mg/kg de humato de sodio en la dieta, tuvieron mayor peso corporal a los 16 y 30 días posdestete, GDP y CDA de 1-30 días posdestete, mientras que la EA fue menor en comparación con el grupo control (Wang et al., 2020). Además, mayor peso corporal en el día 40 después del destete, mayor GDP y CDA de 14-40 días después del destete se encontraron en lechones destetados a los que se añadió 0.25 % de leonardita en su dieta (Dell'Anno et al., 2020).

Aunque el mecanismo real no se ha dilucidado por completo, varias teorías han sido sugeridas para explicar las mejoras en el rendimiento de crecimiento en cerdos y otros animales de granja, en cuya dieta se han añadido diferentes fuentes de SH (Angeles et al., 2022b). Por ejemplo, un efecto positivo de las SH podría explicarse por el aumento de la actividad metabólica de las membranas celulares, la participación en el transporte de iones y aceleración de procesos oxidativos que estimulan funciones vitales debido al aumento de la absorción de nutrientes (Trckova et al., 2018; Zralý y Písaříková, 2010; Islam y Schuhmacher, 2005). Con mayor frecuencia, la adición de SH en animales se ha asociado con la formación de una

película protectora sobre el epitelio mucoso del tracto gastrointestinal (Angeles et al., 2022b; Kühnert et al., 1991; Maguey-Gonzalez et al., 2018) mejorando su morfología, aumentando la actividad de varias enzimas, con la consiguiente mejora en la digestión y utilización de nutrientes, especialmente de proteínas y oligoelementos (Yasar et al., 2002; Wang et al., 2008; López-García et al., 2023), así como la estabilización de la microbiota del intestino y la potenciación de la respuesta inmune (Wang et al., 2020; Trckova et al., 2018; Kunavue y Lien, 2012).

Durante más de tres décadas, las SH se han utilizado para tratar la diarrea, la dispepsia y las intoxicaciones agudas en animales como caballos, cerdos y aves de corral. A las SH se han atribuido propiedades antiinflamatorias, adsorbentes, antitóxicas y antimicrobianas (EMEA, 1999, Kühnert et al., 1991). Sin embargo, los datos científicos del uso de SH en la profilaxis de la diarrea en lechones son escasos. En investigaciones previas, se evidenció que la leonardita y lignito no pueden prevenir completamente la diarrea en lechones después del destete, pero redujeron significativamente su severidad y mortalidad relacionada (Trckova et al., 2018); también se confirmó, que el humato de sodio puede ser una opción efectiva para el reemplazo parcial de una dosis terapéutica alta de óxido de zinc en el tratamiento de la infección diarreica grave por ETEC (Trckova et al., 2015). Además, se reportó una tasa de diarrea más baja entre 1-30 días después del destete en lechones que fueron adicionados con humato de sodio (Wang et al., 2020). Estos hallazgos concuerdan con los resultados del presente estudio, en el que se observó una puntuación de CF más baja en cerdos alimentados con SH.

Se cree que las SH son los ligandos naturales más complejos, con un alto potencial para formar quelatos con varios iones, lo que se ha relacionado con una mejor utilización de minerales en plantas y animales (Peña-Méndez et al., 2005; Angeles et al., 2022a). En cerdos destetados alimentados con SH, se han encontrado resultados contrastantes en los niveles séricos o corporales de algunos minerales. Por un lado, aumento de la fosfatasa alcalina sérica, Ca, P y Mg (Dell'Anno et al., 2020; Trckova et al., 2018), pero por otro lado, se ha informado

una cierta pérdida de Mn y Se del cuerpo en lechones destetados alimentados con SH (Zralý y Písaříková, 2010). En pollos de engorda alimentados con SH, se ha informado un aumento en el contenido de ceniza, Ca y P en el hueso de la tibia (Angeles et al., 2022a). En el presente estudio, el peso del metacarpo y el contenido de cenizas fueron similares entre los tratamientos a los siete días posdestete. Esto podría deberse en parte al hecho de que los pollos de engorda habían sido adicionado con SH por períodos más largos de tiempo, con un rango entre 21 y 36 días (Angeles et al., 2022a).

La determinación de la capacidad antioxidante mediante la técnica DPPH permite evaluar la actividad de compuestos específicos o extractos usando el radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidracilo en una solución de metanol anhidro (Benzie y Strain, 1999; Serpen et al., 2012). Este radical libre es susceptible de reaccionar con compuestos antioxidantes a través de un proceso caracterizado por la cesión de un átomo de hidrógeno proporcionado por el agente antioxidante (Guija et al., 2015). La mayoría de los antioxidantes naturales son compuestos fenólicos, los cuales previenen la formación de radicales libres y la propagación de especies reactivas de oxígeno (ROS), mientras que otros eliminan los radicales libres y quelan los prooxidantes (Reddy et al., 2018). Valores altos expresados en mg Eq. trolox/g carne y % inhibición para esta variable, indica la capacidad que posee el extracto evaluado para capturar radicales libres o inhibir su formación (Antolovich et al., 2002).

Se ha indicado que el destete genera una gran cantidad de ROS y las TBAR aumentan un 50% en los lechones destetados de 28 días en comparación con los cerdos antes del destete (Wei et al., 2017), y disminuciones significativas en la capacidad antioxidante del yeyuno y colon en cerdos destetados a los 21 días de nacidos (Xu et al., 2014). Esto debido al estrés nutricional, inmunológico, social y ambiental que provoca este proceso (Reis de Souza et al., 2012; Gresse et al., 2019; Rentería et al., 2021); afectando el estado fisiológico y bioquímico del organismo, lo que provoca un estrés oxidativo (Mota et al., 2014). Siendo éste el principal

causante del deterioro de la calidad de la carne y su vida útil, lo que ocasiona cambios negativos en su valor nutritivo y en sus propiedades sensoriales y fisicoquímicas (Horbanczuck et al., 2019).

El músculo *psaos mayor* posee una actividad metabólica oxidativa en el cual intervienen cadenas de ácidos grasos, los cuales se oxidan generando más radicales libres; demandando a su vez una mayor cantidad de antioxidantes al ser más propenso a la oxidación (Jiang y Xiong, 2016). Los resultados indican que el consumo de SH durante tres días posteriores al destete no fue suficiente para provocar cambios significativos en el DPPH en el músculo *psaos mayor*, como se observó significativamente a los siete días posteriores al destete. Por otro lado, se encontraron incrementos en el DPPH a los tres y siete días postdestete en el músculo *longissimus dorsi*; esto probablemente se debió al hecho de que este músculo tiene una alta actividad metabólica glucolítica que utiliza la glucosa y la grasa como combustibles energéticos; haciéndolo menos susceptible a la oxidación, ahorrando más agentes antioxidantes con capacidad de inhibición de los radicales libres (Jiang y Xiong, 2016). Además, los altos niveles de DPPH detectados en suero a los tres y siete días después del destete respaldan los altos niveles de este índice en los músculos. Estos resultados demuestran que en lechones destetados adicionados con SH en su dieta, aumenta la capacidad de inhibición de radicales libres de la carne y, de hecho, podría usarse para prevenir el estrés oxidativo en lechones desencadenado por el proceso de destete.

En investigaciones previas en lechones al destete adicionados con SH encontraron concentraciones reducidas de productos activos de TBA y aumento de la actividad de superóxido dismutasa (SOD) y catalasa respecto al grupo control; representando un impacto positivo reforzado en el sistema de defensa antioxidante y los procesos de captación de radicales libres (Buchko, 2013). Lo que sugiere que las macromoléculas de los AH presentes en las SH, al poseer grupos fenólicos en su composición, son capaces de actuar directamente como antioxidantes; es decir,

ser donantes de electrones para los radicales libres, convirtiendo a estos últimos en sustancias moleculares, rompiendo así la cadena de reacciones de los radicales libres y la reducción de la cantidad de productos lipídicos y la modificación oxidativa de las proteínas en el cuerpo de los animales. En cerdos al destete a los que se adicionó SH, también se informó una disminución en el estrés oxidativo después de un desafío con un lipopolisacárido (LPS) de *Escherichia coli* (Weber et al., 2014).

Trckova et al. (2018), demostraron que la suplementación de leonardita y lignito en la dieta de lechones al destete tuvo un efecto benéfico sobre su estado oxidativo; encontrando niveles significativamente más bajos al disminuir el biomarcador sérico de estrés oxidativo (8-iso PGE₂), y una tendencia a disminuir el biomarcador (8-iso PGF_{2α}), en comparación con el grupo control. De igual manera, Trckova et al. (2017), encontraron una reducción del biomarcador sérico (8-iso PGF_{2α}) en lechones al destete, los cuales fueron suplementados con humato de sodio proveniente de leonardita. Estos autores sugieren que las sustancias evaluadas poseen la capacidad para captar y reducir la sobreproducción de ROS y radicales libres, y de esta manera evitar el estrés oxidativo en lechones desencadenado por el proceso del destete.

Los estudios *in vitro* e *in vivo* sobre el potencial antioxidante de las SH han revelado que las quinonas son fragmentos reducibles y los fenoles son fragmentos donantes de electrones con características antioxidantes en contraste con las quinonas aceptoras de electrones. Además, se ha propuesto que los efectos antioxidantes *in vivo* de las SH están influenciados por la composición de su estructura; por ejemplo, una alta concentración de quinonas puede resultar en la producción de grandes cantidades de sustancias reactivas al oxígeno que fomentan el estrés oxidativo y la peroxidación de lípidos, dominando así la respuesta antioxidante del músculo. Sin embargo, son los grupos funcionales que contienen oxígeno, principalmente los grupos carboxílicos y fenólicos, los que pueden explicar las propiedades antioxidantes del compuesto (Dell'Anno et al., 2020; Khil'ko et al., 2011).

Anteriormente se ha propuesto que el coeficiente de absorción de SH administradas por vía oral parece ser muy bajo, oscilando entre 0.05 y 0.07 % (EMEA, 1999). Sin embargo, otros estudios han revelado que las SH pueden asimilarse y transferirse a diferentes tejidos del cuerpo. Se han encontrado partículas de SH en todas las secciones del intestino delgado y los ganglios linfáticos asociados con el intestino, la vejiga urinaria y la tráquea en cerdos jóvenes (Büesing et al., 2011). La distribución de AH también se observó en varios tejidos, incluida la piel, el suero sanguíneo, el hígado, los músculos y el tracto digestivo de ratas en estudios previos que utilizaron ^{125}I -AH (Huang et al., 1995). Estos hallazgos sugieren que las SH podrían ser absorbidas en el intestino y transportadas en el suero sanguíneo a diferentes órganos del cuerpo, donde podrían captar y reducir directamente la sobreproducción de especies reactivas de oxígeno y radicales libres, previniendo el estrés oxidativo en los lechones provocado por el proceso de destete. Otra probable explicación de las propiedades antioxidantes de las SH se deriva de su capacidad para formar capas protectoras en la mucosa digestiva, impidiendo la penetración de bacterias y toxinas patógenas, de bacterias y alimentos, que podrían dañar la mucosa digestiva, así como una probable estabilización de las comunidades microbianas, disminuyendo los desafíos intestinales e, indirectamente, la generación de radicales libres dentro del cuerpo (Angeles et al., 2022b).

Es bien sabido, que el intestino delgado es el sitio principal para la digestión y absorción de nutrientes, y la mucosa intestinal juega un papel importante en este proceso. De igual forma, la altura, ancho y área de vellosidades, profundidad de las criptas y la relación entre la altura de las vellosidades y la profundidad de las criptas son indicadores que reflejan el estado de salud intestinal en los lechones y se usan comúnmente para la evaluación de la morfología intestinal (Liu et al., 2012; Xun et al., 2018). Durante el destete, la estructura y la morfología intestinal se ven afectados por cambios profundos que incluyen la disminución de las vellosidades y el alargamiento de las criptas, que reducen la digestión y absorción de nutrientes en

los lechones recién destetados (Pluske 2013); y a su vez se relacionan con la pérdida de células caliciformes productoras de mucinas (Pluske, 2000; Hedemann et al., 2003). Nuestros resultados concuerdan con los obtenidos por Hedemann et al. (2003), quienes identificaron que la altura máxima de las vellosidades se obtuvo al destete, mientras que fue descendiendo durante los primeros tres días posteriores al destete; coincidiendo con otros trabajos reportados, en donde se muestra que altura de vellosidades alcanzó un valor mínimo entre los dos a cinco días posdestete (Hampson, 1986, Wang et al., 2022). De igual forma, la profundidad de criptas fue incrementando a partir del destete, indicando una mayor producción de células (Hedemann et al., 2003).

Un estudio previo mostró que la disminución de la altura de vellosidades y la profundidad de las criptas, da como resultado una mayor pérdida de células o una breve reducción en la población de células de la cripta (Pluske et al., 1997; Zapata et al., 2015). Las células caliciformes se diferencian de las células madre del endodermo en que se encuentran profundamente en las criptas y, cuando maduran, migran a la superficie de las vellosidades (Dunsford et al., 1991). Por lo tanto, se puede sugerir que el aumento o disminución de mucinas neutras durante el posdestete está relacionado con la variación en los cambios de la morfología intestinal, lo que podría afectar la diferenciación de las células caliciformes y su maduración normal (Ghaleb et al., 2011).

Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Zapata et al. (2015), quienes cuantificaron el tipo de mucina secretada por las células caliciformes en lechones alimentados con una dieta basal; encontrando que las mucinas ácidas sulfatadas y no sulfatadas mostraron una mayor disminución al día cinco posdestete con una posterior recuperación a los días siete y diez posdestete. En otros estudios se ha demostrado que las células caliciformes disminuyen al destete y toma entre seis a ocho días posteriores para que éstas puedan recuperarse; para finalmente alcanzar niveles normales entre nueve y catorce días (Hedemann et al., 2003; Vente-Spreewenbergh et al., 2004; Brown et al., 2006).

La disminución de mucinas ácidas en las células caliciformes, parece estar asociado con los cambios morfológicos generados por el proceso del destete; los cuales han sido evidenciados en el presente estudio. Estos cambios en la morfología intestinal se asocian con una disminución de la altura y el área de las vellosidades (Parra et al., 2011) y lesión epitelial, ocasionando la pérdida de células caliciformes secretoras de mucinas ácidas (Liu et al., 2013).

Prueba de balance de nitrógeno y energía

Es probable que todos los animales de producción experimenten de manera natural una infección e inflamación en diversos grados en algún momento de su ciclo de vida, como el caso de los cerdos; desencadenando un impacto económico negativo en su producción al comprometer la eficiencia alimenticia, su reproducción y el aumento de los costos por atención médica (Liu et al., 2019). En el presente estudio se desafiaron a los cerdos con la aplicación de LPS vía intramuscular, utilizando el método establecido por Liu et al. (2019) con el objetivo de provocar una respuesta inflamatoria sistémica aguda y evaluar los cambios fisiológicos y de comportamiento productivo, incluyendo los cambios de temperatura corporal, CDA, GDP y la digestibilidad de MS, N y E.

Dell'Anno et al. (2020), encontraron que el CDA en cerdos con una dieta enriquecida con AH (0.25% de leonardita) fue mayor en comparación con el grupo control. En contraste, Ji et al. (2006); encontraron que el CDA de cerdos que fueron añadidos con 0.5% y 1.0% de SH fue similar al grupo control. Al suplementar la dieta de cerdos en crecimiento y finalización con niveles de inclusión desde el 0.1% al 0.8% de AF, se observó que el CDA tuvo resultados similares con el grupo control (Bai et al., 2013). Por otra parte, el CDA no tuvo diferencias entre tratamientos a los que se suministró 5% y 10% de SH y la dieta basal (Wang et al., 2008).

Estos resultados coinciden con estudios previos sobre el uso de SH en

cerdos (Bai et al., 2013; Dell'Anno et al., 2020); quienes afirman que esto puede deberse a la capacidad que poseen las SH para mejorar la adsorción de nutrientes y acelerar las funciones digestivas que pueden regular el metabolismo y el balance de los mismos, permitiendo una adecuada redistribución de nutrientes para mejorar las variables productivas. Se evidencia también, una diferencia en cuanto al efecto del inóculo entre los tratamientos a los que se aplicó el LPS y SSF; siendo mayor la GDP de los cerdos que se inyectaron con SSF. Por lo cual, es lógico pensar que al inducir un proceso de inflamación intestinal en cerdos que fueron inoculados con LPS, estos pueden expresar muchos cambios fisiológicos y de comportamiento productivo, incluyendo una temperatura corporal elevada, consumo reducido de alimento y metabolismo alterado (Liu et al., 2019); comprometiendo de esta forma su GDP en comparación con el tratamiento al que se administró SSF. Por su parte Liu et al. (2019), mediante la inyección intramuscular de 30 µg/kg de peso vivo de LPS de *E. coli* en cerdos, encontraron que la temperatura rectal de los cerdos a las 2, 4 y 6 h después de la inyección, fue significativamente más alta que al inicio; volviendo a su temperatura basal 24 h después. Entre las 2 a 6 h posteriores a la aplicación de LPS, los cerdos tuvieron una temperatura rectal superior a 40°C lo que indica que indujo fiebre, siendo un síntoma común de la respuesta inflamatoria sistémica. Resultados similares fueron obtenidos por Ji et al. (2006), Wang et al. (2008), Bai et al. (2013). Se observa también una mayor EA en los cerdos que recibieron SSF, comparados con aquellos a los que se les aplicó LPS.

Se conoce que el proceso de inflamación desencadena respuestas inmunitarias que se caracterizan por cambios significativos en la actividad metabólica (Kominsky et al., 2010). Sin embargo, los resultados de la presente investigación no muestran diferencias para las variables evaluadas en la prueba de balance de MS entre tratamientos, tanto por el efecto promotor del crecimiento (SH, APC), ni por efecto del inóculo (LPS) y la aplicación de (SSF).

Por su parte, Písaříková et al. (2010) determinaron que la digestibilidad de proteína cruda así como la grasa cruda fue significativamente menor en el grupo

adicionado con humato de sodio (HNa) en comparación con el control; además, los valores no significativos de digestibilidad de MS, fibra cruda, cenizas, extracto libre de nitrógeno y materia orgánica fueron más bajos en el grupo experimental en comparación con el control. Una posible explicación respecto a estos resultados, puede aludirse al efecto del aparente nivel elevado de inclusión de HNa en la dieta (3%) sobre el metabolismo y digestibilidad de estos nutrientes; teniendo en cuenta la alta capacidad de adsorción de las SH, por lo cual pudiera verse afectada la capacidad de reabsorción de nutrientes por parte del HNa; dando como resultado un paso más lento del contenido intestinal, un período de digestión prolongado y un aumento de los procesos anabólicos de la energía. Sin embargo, no se registraron diferencias significativas en la ganancia de peso promedio durante el experimento entre el grupo HNa y el control.

Aunque aún no se comprende la razón de la falta de diferencias entre tratamientos para estas variables; la adición de SH en la dieta, pudo haber generado una respuesta inflamatoria ligeramente reducida en los animales a los que se aplicó LPS; debido a que se ha demostrado que las SH poseen propiedades inmunoestimulantes y antiinflamatorias (EMEA, 1999; Angeles et al., 2022a), pudiendo reducir de esta forma la E utilizada durante esta respuesta, así como restringir el autodaño celular debido a la inflamación (Liu et al., 2019). Estudios previos reportaron una reducción de la digestibilidad de algunos nutrientes en cerdos adicionados con SH (Korniewicz et al., 1999; Písaříková et al., 2010); por ejemplo, se reportó una reducción significativa de la grasa dorsal y un aumento de los valores de marmoleo cuando se añadió 10% de SH a la dietas de los cerdos, lo que sugiere que los cerdos que consumieron SH no gastaron necesariamente más grasa, sino que éstas SH pueden influir en la distribución de E; redistribuyéndola en diferentes tejidos, y evidenciando probablemente que el balance de E fue similar entre los tratamientos experimentales. Por otra parte, se puede pensar que hubo mayor gasto energético para síntesis en dietas de cerdos donde se suministraron SH; lo cual se reflejó en una mayor GDP (Wang et al., 2008).

Otro aspecto importante a considerar respecto al uso de LPS, es la selección genética; la cual ha aumentado considerablemente los niveles de producción en cerdos, siendo seleccionados para alcanzar una alta eficiencia de producción; sin embargo, los animales parecen estar más expuestos a problemas de comportamiento, fisiológicos e inmunológicos (Rauw et al. 1998); como el caso de los cerdos de este experimento. Por el contrario, las razas o líneas de cerdos que no se han seleccionado para tal fin, poseen comúnmente rasgos valiosos como adaptación a condiciones difíciles, incluyendo tolerancia a enfermedades parasitarias e infecciosas (Chatelet et al., 2018). Aunado a esto, en los sistemas de producción convencionales, los cerdos se enfrentan con frecuencia a entornos no óptimos y desafiantes que perjudican su rendimiento y salud (Hyun et al., 1998); detectando mediante el historial de la granja la presencia de *E. coli* en sala de destete; por lo que probablemente los cerdos del presente estudio estuvieron expuestos a esta bacteria a temprana edad, adquiriendo resistencia frente a los antígenos de este patógeno. Por el contrario, la selección genética de animales de alto rendimiento suele llevarse a cabo en condiciones óptimas para la expresión del potencial genético y no por su capacidad para hacer frente a los factores estresantes (Doeschl-Wilson et al., 2009; Prunier et al., 2010; Chatelet et al., 2018). Se ha sugerido que esto puede conducir a la selección de animales que no pueden asignar suficientes nutrientes a otros procesos exigentes cuando enfrentan desafíos ambientales y de salud, como las respuestas del sistema inmunológico (Rauw et al., 1998), inducidas mediante la aplicación del LPS en el presente estudio.

De igual forma, se conoce que mantener un sistema inmunitario competente y generar respuestas inmunitarias efectivas es metabólicamente más desafiante para el animal, lo que requiere compensaciones con otros procesos que demandan nutrientes, como el crecimiento, la reproducción y la termorregulación (Vigors et al., 2016). En un estudio previo se ha demostrado después de un desafío infeccioso con LPS, que la proporción de lisina dirigida al sistema inmunitario aumenta del 2 al 9%, poniendo de manifiesto el costo nutricional de la respuesta inmunitaria a la

infección (Klasing, 2007).

Integración de discusión

El destete es una etapa crítica en la vida de los animales, que puede servir como modelo de estrés (psicológico, alimenticio, social, ambiental e infeccioso) para evaluar la inclusión de distintos productos, como los promotores del crecimiento, en los alimentos. En ocasiones se tiene que recurrir a la inducción de modelos de estrés, como el que se implementó en los cerdos en crecimiento en la presente investigación; en el que se simuló un proceso de estrés inmunológico/microbiológico, mediante la aplicación del LPS, con el objetivo de generar un proceso de inflamación general en el animal. En estudios previos la aplicación de LPS ha evidenciado un aumento significativo de cortisol, TNF- α , antagonista del receptor de interleucinas (IL): IL-1, IL-6 e IL-8 junto con una disminución de su actividad dentro de las primeras 6 h después de la inyección; y la reducción de ingesta de alimentos durante las primeras 24 h posteriores al desafío (Nordgreen et al., 2018); efectos que de forma natural experimentan los lechones al destete (Gresse et al., 2019), limitando el crecimiento y la capacidad productiva del cerdo, al incidir sobre el desarrollo intestinal; afectando los procesos de absorción y uso de nutrientes (Rentería et al., 2020). El cambio de una dieta altamente digestible como la leche materna a una dieta sólida durante la primera semana posdestete, resulta en una reducción drástica de las poblaciones de lactobacilos, bacterias benéficas para el organismo del animal, aumentando entonces el número de bacterias coliformes (especialmente de *Escherichia coli*); población que al ir aumentando y muriendo, induce la liberación desde su pared celular de productos proinflamatorios como el LPS (Gutiérrez et al., 2012). Este LPS induce alteraciones importantes en la estructura intestinal, que conllevan a la interrupción de su capacidad funcional, principalmente de los procesos de digestión y absorción de nutrientes (Pluske et al., 1997; Amador et al., 2007). Algunos autores han reportado que las alteraciones intestinales pueden provocar anomalías en el transporte

intestinal de agua y electrolitos (Amador et al., 2007; García et al., 2008). Otros efectos negativos a nivel intestinal debido a la exposición del LPS se han observado, sobre la permeabilidad, transporte y absorción de algunos nutrientes (Abad et al., 2001b), identificando la incidencia de las endotoxinas bacterianas sobre la absorción de aminoácidos y azúcares a nivel intestinal. Lo que podría verse representado por el aumento en el catabolismo de la proteína y la disminución en el índice de deposición de la proteína de músculo esquelético de los animales (Liu et al., 2008).

Por su parte, estudios *in vitro* e *in vivo* indican que ante la presencia de algunas toxinas bacterianas generadas principalmente por el LPS e infecciones microbianas, y durante los procesos fisiológicos desencadenados por el destete (Gutiérrez et al., 2012), se estimula la producción de una variedad de citocinas y de mediadores inflamatorios como TNF- α , IFN- γ y ciertas IL, que inducen la inflamación del tejido; lo cual puede ser la razón por la cual se ve afectada la permeabilidad y el transporte de iones y nutrientes (Liu et al., 2008).

En la presente investigación, los lechones destetados fueron alimentados con SH, mostrando mejoras en el PC final, GDP, y EA, lo cual concuerda con hallazgos previos. La adición de SH se ha asociado con una mayor actividad metabólica de las membranas celulares, transporte de iones, y procesos oxidativos que mejoran la absorción de nutrientes. Además, la formación de una película protectora en el tracto gastrointestinal mejora la morfología, la actividad enzimática, y la estabilidad de la microbiota, potenciando la respuesta inmune.

El estrés oxidativo generado por el destete en lechones, afecta la calidad de la carne. En este estudio, la adición de SH mostró capacidad antioxidante, especialmente en el músculo *Longissimus dorsi*. Se observó una mayor capacidad de inhibición de radicales libres, lo que podría ayudar a prevenir el estrés oxidativo asociado al destete. La morfología intestinal se vio afectada por el destete, con reducción de la altura de vellosidades y aumento en la profundidad de criptas. La

adición de SH no evitó completamente estos cambios, pero contribuyó a una respuesta inflamatoria reducida. La disminución en la secreción de mucinas ácidas por las células caliciformes puede estar asociada con los cambios morfológicos generados por el destete.

En respuesta al desafío con LPS, la adición de SH en la dieta provocó mejoras en la GDP y CDA en cerdos desafiados respecto a los adicionados con APC; posiblemente, reduciendo la respuesta inflamatoria y el gasto energético asociado. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en la digestibilidad de nutrientes. En contraste, los cerdos no desafiados añadidos con APC y SH mostraron un consumo de alimento similar. Por consiguiente, bajo estas condiciones se evidencia que las SH añadidas tanto en lechones como en cerdos en crecimiento son efectivas en la mejora del crecimiento y el consumo, comparadas con el APC, sin ninguna alteración en el metabolismo; mitigando posiblemente los efectos negativos del estrés asociado al destete y desafíos infecciosos. En respuesta a ello, se evidenció que los animales no desafiados mostraron un mayor CDA, en los animales desafiados con LPS/APC el CDA fue el más bajo; con LPS/SH el CDA fue intermedio; evidenciando la posible protección de las SH a nivel intestinal.

Estos resultados ponen de manifiesto que al añadir SH en la dieta de lechones al destete, se observa un efecto positivo significativo sobre las variables productivas, respecto a la adición de las mismas en cerdos en crecimiento que fueron desafiados con LPS. Sin embargo, en este último caso el efecto dado por la interacción de LPS/SH muestra una mayor GDP respecto a la interacción LPS/APC. Por lo cual, se puede considerar que el efecto de las SH fue mucho más marcado en los animales al destete que en los cerdos en crecimiento, debido a que estos últimos en su edad temprana pudieron haber estado expuestos a este agente patógeno, generando en ellos cierto nivel de tolerancia al mismo.

Con base en los resultados obtenidos en esta investigación, se puede

concluir que la adición de SH provenientes de lombricomposta en el alimento de lechones al destete y cerdos en crecimiento, tienen un impacto significativo en diversas variables; y en conjunto, respaldan la viabilidad de ser utilizadas como una alternativa eficaz para reducir o alternar el uso de APC en la alimentación de cerdos jóvenes, ofreciendo beneficios tanto en el rendimiento productivo como en aspectos relacionados con la salud intestinal. Sin embargo, se necesitan más investigaciones para profundizar en sus mecanismos específicos de acción, especialmente, en la modulación de la fisiología digestiva asociada a la reducción de la inflamación y permeabilidad de las membranas.

10 CONCLUSIONES

La adición de SH de lombricomposta al alimento de los lechones al destete mejoró linealmente el peso corporal a los 42 días después del destete y la relación GDP y EA de 1-42 días posdestete. Complementariamente, la CF se mejoró linealmente mediante el aumento de la adición de SH en la dieta. Se observaron incrementos lineales del radical DPPH y capacidad de inhibición en músculo *Longissimus dorsi* y suero sanguíneo a los tres y siete días postdestete, y en el músculo *Psoas mayor* a los siete días después del destete en respuesta a la adición creciente de SH en la dieta. La adición de SH en la dieta mejoró la morfometría intestinal y aumentó el número de células productoras de moco protector del intestino en cerdos al destete.

La suplementación de 5000 ppm de SH provenientes de lombricomposta en la dieta de cerdos en crecimiento, mejoró las variables productivas (CDA, GDP, EA) y mantuvo la digestibilidad y retención de N y E al mismo nivel que los cerdos adicionados con APC. Confirman también, que la inoculación de LPSEc redujo las variables productivas y tuvo un efecto transitorio; lo que probablemente evitó una posible interacción con las SH.

En resumen, los resultados indican que las SH extraídas de lombricomposta pueden ser usadas como alternativa sostenible para reducir o alternar el uso de APC en cerdos jóvenes.

11 ABREVIATURAS Y SIGLAS

AF	Ácidos fúlvicos
AH	Ácidos húmicos
APC	Antibióticos promotores de crecimiento
CDA	Consumo diario de alimento
CENID	Centro Nacional de Investigación Disciplinaria
CF	Consistencia fecal
EA	Eficiencia alimenticia
EFSA	Autoridad de Seguridad Alimentaria Europea
EMA	Agencia Europea para la Evaluación de Medicamentos
ESH	Extracto de sustancias húmicas
FyMA	Fisiología y Mejoramiento Animal
GDP	Ganancia diaria de peso
HNa	Humato de sodio
INIFAP	Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias
LPSEc	Lipopolisacárido de <i>E. coli</i>
PC	Peso corporal
PV	Peso vivo
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SH	Sustancias húmicas
SICUAE	Subcomité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales
Trt	Tratamiento
UAQ	Universidad Autónoma de Querétaro

12 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguilera, B.M.A., Reis de Souza, T.C., Mariscal, L.G., Borbolla, S.G.A., Aguilera, B.A. Digestibilidad de nutrimentos en lechones alimentados con dietas con aislado o concentrado de proteína de soya. *Téc. Pecu. Méx.* 2006, 44(3): 301-311.
- Aksu, T., y Bozkurt, A. S. Effect of dietary essential oils and/or humic acids on broiler performance, microbial population of intestinal content and antibody titres in the summer season. *Journal of the Faculty of Veterinary Medicine, Kafkas University.* 2009, 15: 185– 190.
- Aluthge, ND.; van Sambeek, DM.; Carney-Hinkle, EE.; Li, YS.; Fernando, SC.; Burkey, TE. The pig microbiota and the potential for harnessing the power of the microbiome to improve growth and health. *J. Anim. Sci.* 2019, 97, 3741–3757.
- Angeles, M. d. L., Gómez-Rosales, S., López-García, Y. R., & Montoya-Franco, A. Growth Performance and Tibia Mineralization of Broiler Chickens Supplemented with a Liquid Extract of Humic Substances. *Brazilian Journal of Poultry Science.* 2022a, 24, 3. <https://doi.org/10.1590/1806-9061-2021-1450>.
- Angeles, M. d. L., Gómez-Rosales, S., & Téllez-Isaias, G. Mechanisms of Action of Humic Substances as Growth Promoters in Animals. *IntechOpen.* 2022b. <https://doi.org/10.5772/intechopen.105956>.
- Ansorg, R.; Rochus, W. Studies on the antimicrobial effect of natural and synthetic humic acids. *Arzneimittelforsch.*, 1978, 28, 2195–2198.
- Antolovich, M.; Prenzler, P.; Patsalides, E.; McDonald, S.; & Robards, K. Methods for testing antioxidant activity. *The royal society of chemistry*, 2002, 127, 183-198. <https://doi.org/10.1039/b009171p>.
- Arif, M., Alagawany, M., Abd El-Hack, M. E., Saeed, M., Arain, M. A., Elnesr, S.S. Humic acid as a feed additive in poultry diets: A review. *Iran Journal of Veterinary Research.* 2019, 20(3), 167-172.
- Association of Official Analytical Chemists (AOAC). *Official Methods of Analysis.* 17th Edition, The Association of Official Analytical Chemists, Gaithersburg, MD, USA. 2000: Methods 925.10, 65.17, 974.24, 992.16.
- Association of Official Analytical Chemists (AOAC). *Official Methods of Analysis.* 17th Edition, Association of Official Analytical Chemists, Arlington. 2002
- Bai, HX.; Chang, QF.; Shi, BM.; Shan, AS. Effects of fulvic acid on growth performance and meat quality in growing-finishing pigs. *Livest. Sci.* 2013, 158, 118–123.

- Ball, RO.; Aherne, FX. Influence of dietary nutrient density, level of feed intake and weaning age on young pigs. II. Apparent nutrient digestibility and incidence and severity of diarrhoea. *Can. J. Anim. Sci.* 1987, 67, 1105-1115.
- Benzie, IEF.; Strain, JJ. Ferric reducing/antioxidant power assay: direct measure of total antioxidant activity of biological fluid and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. *Meth. Enzymol.* 1999, 299, 15-27.
- Berzelius J.J.: *Lehrbuch der Chemie*. Wöhler, Dresden and Leipzig. Germany: 1839.
- Buchko, O. M. Free radical processes in the piglets organism under the humic supplements. *Animal Biology*, 2013, 15, 27-33. <https://doi.org/10.15407/animbiol15.01.027>.
- Büesing K, Harmeyer J, Markuske K D, Zeyner A. Microscopic evidence for the uptake of orally given humic acids by the intestinal mucosa in piglets. *Animal Production Science*. 2011; 51(10):967-973. doi: 10.1071/AN11039.
- Campbell, J.M.; Crenshaw, J.D.; Polo, J. The biological stress of early weaned piglets. *J. Anim. Sci. Biotechnol.* 2013, 4: 19.
- Cassini, A.; Högberg, L. D.; Plachouras, D.; Quattrocchi, A.; Hoxha, A.; Simonsen, G. S.; Colomb-Cotinat, M.; Kretzschmar, M. E.; Devleeschauwer, B.; Cecchini, M.; et al. Attributable Deaths and Disability-Adjusted Life-Years Caused by Infections with Antibiotic-Resistant Bacteria in the EU and the European Economic Area in 2015: A Population-Level Modelling Analysis. *Lancet Infect. Dis.* 2019, 19 (1), 56–66. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(18\)30605-4](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(18)30605-4).
- Celi, P.; Cowieson, AJ.; Fru-Nji, F., Steinert, RE.; Klünter, AM.; Verlhac, V.. Gastrointestinal functionality in animal nutrition and health: new opportunities for sustainable animal production. *Animal Feed Science and Technology*, 2017, 234: 88-100.
- Chang, Q.; Lu, Z.; He, M.; Gao, R.; Bai, H.; Shi, B.; Shan, A. Effects of dietary supplementation of fulvic acid on lipid metabolism of finishing pigs. *J. Anim. Sci.* 2014, 92,4921–4926.
- Chatelet, A., Gondret, F., Merlot, E., Gilbert, H., Friggens, N. C., Le Floc'h, N. Impact of hygiene of housing conditions on performance and health of two pig genetic lines divergent for residual feed intake. *Animal*, 2018, 12(2), 350–8. <https://doi.org/10.1017/S1751731117001379x>.
- Cormican, M.; Hopkins, S.; Jarlier, V.; Reilly, J.; Simonsen, G.; Strauss, R.; et al. ECDC, EFSA and EMA joint scientific opinion on a list of outcome indicators as regards surveillance of antimicrobial resistance and antimicrobial consumption in humans and food-producing animals. *EFSA J.*, 15 (2017).
- Cortés-Coronado, RF.; Gómez-Rosales, S. ; Angeles, ML.; Casaubon-Huguenin, MT.; Sørensen-Dalgaard, T. Influence of a yeast fermented product on the serum levels of the mannan-binding lectin and the antibodies against the Newcastle disease virus

- in Ross broilers, *Journal of Applied Poultry Research*, 26(1), 2017: 38-49. <https://doi.org/10.3382/japr/pfw044>.
- Dabovich, L.; Hulbert, L.; Rudine, A.; Ji, SKF and Mcglone, J. Evaluation of nutraceutical effects on pig immunity: effects of promox. Proceedings of the 2003 Southern Section ASAS meeting. Pork Industry Institute, Department of Animal and Food Science, Texas Tech University, Lubbock, TX. 79409. 2003.
- Dell'Anno, M.; Hejna, M.; Sotira, S.; Caprarulo, V.; Reggi, S.; Pilu, R.; Miragoli, F.; Callegari, ML.; Panseri, S. and Rossi, L. Evaluation of leonardite as a feed additive on lipid metabolism and growth of weaned piglets, *Animal Feed Science and Technology*. 2020, 266, 114519. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2020.114519>.
- Disetlhe, ARP; Marume, U; Mlambo, V and Dinev, I. Humic acid and enzymes in canola-based broiler diets: effects on bone development, intestinal histomorphology and immunedevelopment. *S. Afr. J. Anim. Sci.* 2017, 47: 914-922.
- Doeschl-Wilson, A. B., Brindle, W., Emmans, G., Kyriazakis, I. Unravelling the Relationship between Animal Growth and Immune Response during Micro-Parasitic Infections. *PLOS ONE*, 2009, 4(10), e7508. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007508>.
- Domínguez, J.; Gómez-Brandón, M. The influence of earthworms on nutrient dynamics during the process of vermicomposting. *Waste Management & Research*. 2015, 31(8):859-86.
- Domínguez-Negrete, A.; Gómez-Rosales, S.; Angeles, M.d.L.; López-Hernández, LH.; Reis-de Souza, TC.; López-García, Y.; Zavala-Franco, A.; Téllez-Isaias, G. Effect of the Addition of Humic Substances as Growth Promoter in Broiler Chickens Under Two Feeding Regimens. *Animals* 2019, 9, 1101; doi:10.3390/ani9121101.
- Domínguez-Negrete, A.; Gómez-Rosales, S.; Angeles, M. d. L.; López-Hernández, L. H.; Reis de Souza, T. C.; Latorre-Cárdenas, J. D., & Téllez-Isaias, G. Addition of Different Levels of Humic Substances Extracted from Worm Compost in Broiler Feeds. *Animals*. 2021, 11, 3199. <https://doi.org/10.3390/ani11113199>
- EMEA. Committee for Veterinary Medical Products. Humic acids and their sodium salts, summary report. Committee for Veterinary Medicinal Products. [Accessed April 29, 2014]; Eur. Agency Eval. Med. Prod. 1999. http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Maximum_Residue_Limits_Report/2009/11/WC500014416.pdf.
- Fabà, L.; Litjens, R.; Allaart, J.; Roubos- van den Hil, P. Feed additive blends fed to nursery pigs challenged with Salmonella. *J. Anim. Sci.* 2020, 1–10.
- Fan, M. Z.; Sauer, W. C. Determination of apparent ileal amino acid digestibility in barley and canola meal for pigs with the direct, difference and regression methods. *J Anim Sci* 1995; 73:2364-2374.
- Filip, Z. and Berthelin, J. Analytical determination of the microbial utilization and

- transformation of humic acids extracted from municipal refuse, *Fresenius J. Anal. Chem.* 2001, 371: 675-681.
- Gallois, M., Rothkotter, H.J., Bailey, M., Stokes, C.R., Oswald, I.P. Natural alternatives to in-feed antibiotics in pig production: can immunomodulators play a role? *Animal.* 2009, 3: 1644–1661.
- Gao, Y., J. He, Z. L. He, Z. W. Li, B. Zhao, Y. Mu, J. Y. Lee, and Z. J. Chu. Effects of fulvic acid on growth performance and intestinal health of juvenile loach *Paramisgurnus dabryanus* (Sauvage). *Fish Shellfish Immunol.* 2017, 62:47–56.
- Gomez-Rosales, S., y Angeles, M.L. Addition of a worm leachate as source of humic substances in the drinking water of broiler chickens. *Asian-Australas Journal of Animal Science*, 2015, 28, 215–222.
- Gramss, G., Ziegenhagen, D. and Sorge, S. Degradation of soil humic extract by wood- and soil-associated fungi, bacteria, and commercial enzymes, *Microbiol. Ecol.* 1999. 37: 140-151.
- Gresse, R., Durand, F.C., Dunière, L., Blanquet-Diot, S., Forano, E. Microbiota Composition and Functional Profiling Throughout the Gastrointestinal Tract of Commercial Weaning Piglets. *Microorganisms* 2019, 7, 343; doi:10.3390/microorganisms7090343.
- Guija-Poma, E.; Inocente-Camones, M. A.; Ponce-Pardo, J.: & Zarzosa-Norabuena, E. Evaluación de la técnica 2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo (DPPH) para determinar capacidad antioxidante. *Horizonte Medico.* 2015, 15, 57-60. http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1727-558X2015000100008&lng=es&tlng=es.
- Hampson, D., Pluske, J. Role of diet in managing enteric disease in pigs. *In Practice* 2004, 26: 438–443.
- Hedemann, M.S., Højsgaard, S., Jensen, B.B. Small intestinal morphology and activity of intestinal peptidases in piglets around weaning. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition.* 2003, 87, 32–41.
- Honda, K., & Takeda, K. Regulatory mechanisms of immune responses to intestinal bacteria. *Mucosal Immunology*, 2009, 2: 187–196. doi:10.1038/mi.2009.8.
- Horbańczuk, O. K., Kurek, M. A., Atanasov, A. G., Brnčić, M., & Rimac-Brnčić, S. (2019). The Effect of Natural Antioxidants on Quality and Shelf Life of Beef and Beef Products. *Food Technology & Biotechnology*, 57, 439-447. <https://doi.org/10.17113/ftb.57.04.19.6267>.
- Huang TS, Lu FJ, Tsai CW. Tissue distribution of absorbed humic acids. *Environmental Geochemistry and Health.* 1995;17(1-4):1-4. doi: 10.1007/BF00188624.

- Hyun, Y., Ellis, M., Riskowski, G. and Johnson, R. W. Growth performance of pigs subjected to multiple concurrent environmental stressors. *Journal of Animal Science*, 1998, 76, 721–727. <https://doi.org/10.2527/1998.763721x>.
- Jacob, KK.; Prashob, PKJ.; Chandramohanakumar, N. Humic substances as a potent biomaterials for therapeutic and drug delivery system-A Review. *Int. J App. Pharm.* 2019,11 (3), 1-4.
- Ji, F.; McGlone JJ.; Kim, SW. Effects of dietary humic substances on pig growth performance, carcass characteristics, and ammonia emission. *J. Anim. Sci.* 2006, 84, 2482–2490.
- Jiang, J., & Xiong, Y. L. (2016). Natural antioxidants as food and feed additives to promote health benefits and quality of meat products: A review. *Meat Science*, 120, 107-117. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2016.04.005>.
- Kafantaris, I.; Stagos, D.; Kotsampasi, B.; Hatzis, A.; Kypriotakis, A.; Gerasopoulos, K.; Makri, S.; Goutzourelas, N.; Mitsagga, C.; Giavasis, I.; Petrotos, K.; Kokkas, S.; Goulas, P.; Christodoulou, V.; Kouretas, D. Grape pomace improves performance, antioxidant status, fecal microbiota and meat quality of piglets. *Animal*. 2018, 12(2): 246-255.
- Kaevska, M.; Lorencova, A.; Videnska, P.; Sedlar, K.; Provaznik, I.; Trckova, M. Effect of Sodium Humate and Zinc Oxide Used in Prophylaxis of Post-Weaning Diarrhoea on Faecal Microbiota Composition in Weaned Piglets. *Veterinární Med.* 2016, 61, 328–336.
- Kim, J.C., Hansenb, C.F., Mullana, B.P, Pluskec J.R. Nutrition and pathology of weaner pigs: Nutritional strategies to support barrier function in the gastrointestinal tract. *Animal Feed Science and Technology*. 2012, 173: 3– 16.
- Khil'ko SL, Efimova IV, Smirnova OV. Antioxidant properties of humic acids from brown coal. *Solid Fuel Chemistry*. 2011; 45(6):367–371.
- Klasing, K. C. Nutrition and the immune system, *British Poultry Science*, 2007, 48,5,525-537. <https://doi.org/10.1080/00071660701671336>
- Klocking, R. & Helbig, B. Medical aspects and application of humic substances. In: *Biopolymers for Medical and Pharmaceutical Applications* (Eds. A. Steinbuchel and R. H. Marchessault). Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany. 2005.
- Korniewicz, D.; Korniewicz, A.; Dobrzanski, Z.; Kolacz, R.; Czarnik-Matusiewicz, H.; Paleczek, B. Efficiency of mineral-fat supplement Humobentofet in boar and gilt nutrition. *Ann. Anim. Sci – Rozc Nauk Zoot.* 1999, 26, 275-289.
- Kulikova, N. A., Stepanova, E. V., and Koroleva, O. V. Mitigating activity of humic substances: direct influence on biota, in: I.V. Perminova, K. Hatfield, and N. Hertkorn (eds.) *Use of Humic Substances to Remediate Polluted Environments: From Theory*

- to Practice, NATO Science Series, IV: Earth and Environmental Sciences 52, Springer, Dordrecht, The Netherlands 2005. pp. 285–310.
- Kunavue, N. & Lien, T. F. Effects of fulvic acid and probiotic on growth performance, nutrient digestibility, blood parameters and immunity of pigs. *Journal of Animal Science Advances*, 2012; 2(8):711-721.
- Kühnert VM, Bartels KP, Kröll S, Lange N. Huminsäurehaltige Tierarzneimittel in Therapie and Prophylaxe bei gastrointestinalen Erkrankungen von Hund und Katze. *Monatshefte für Veterinärmedizin*. 1991; 46(1): 4-8.
- Kuttappan VA, Vicuña EA, Latorre JD, Wolfenden AD, Téllez GI, Hargis BM, et al. Evaluation of Gastrointestinal Leakage in Multiple Enteric Inflammation Models in Chickens. *Frontiers of Veterinary Science*. 2015; 2(1):1–6.
- Lehmann, J.; Kleber M. The contentious nature of soil organic matter. *Nature*, 2015, 528, 60–68.
- Liu, H. ; Feye, K.M.; Nguyen, Y.T. et al. Acute systemic inflammatory response to lipopolysaccharide stimulation in pigs divergently selected for residual feed intake. *BMC Genomics*, 2019, 20, 728. <https://doi.org/10.1186/s12864-019-6127-x>.
- Liu, P.; Piao, X.S.; Thacker, P.A.; Zeng, Z.K.; Li, P.F.; Wang, D.; Kim, S.W. Chito-oligosaccharide reduces diarrhea incidence and attenuates the immune response of weaned pigs challenged with *Escherichia coli* K881 J. *Anim. Sci.* 2010, 88, 3871–3879. doi:10.2527/jas.2009-2771.
- López-García, Y. R.; Gómez-Rosales, S.; Angeles, M. d. L.; Jiménez-Severiano, H.; Merino-Guzman, R.; Téllez-Isaias, G. Effect of the Addition of Humic Substances on Morphometric Analysis and Number of Goblet Cells in the Intestinal Mucosa of Broiler Chickens. *Animals*. 2023; 13(2):212. <https://doi.org/10.3390/ani13020212>
- Macpherson, A.J., y Harris, N.L. Interactions between commensal intestinal bacteria and the immune system. *Nature Reviews Immunology*, 2004, 4: 478–485.
- Maguey-González, J.A., Gómez-Rosales, S., Angeles, M. d. L., López-Hernández, L.H., Rodríguez-Hernández, E., Solís-Cruz, B., Hernández-Patlán, D., Merino-Guzman, R., & Téllez-Isaías, G. Effects of humic acids on the recovery of different bacterial strains in an in vitro chicken digestive model. *Vet. Sci.* 2022, 145, 21-28. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2022.01.004>
- Maguey-González, J. A.; Gómez-Rosales, S.; de Lourdes Ángeles, M.; Téllez-Isaías, G. Use of Humic Substances from Vermicompost in Poultry. *The Global Antimicrobial Resistance Epidemic - Innovative Approaches and Cutting-Edge Solutions*. IntechOpen. 2022. <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.102939>
- Maguey-González, J.A.; Michel, M.A.; Baxter, M.F.A.; Tellez, G.; Moore, P.A.; Solis-Cruz, B.; Hernández-Patlán, D.; Merino-Guzman, R.; Hernandez-Velasco, X.; Latorre, J.D. Efectof Humic Acids on Intestinal Viscosity, Leaky Gut and Ammonia Excretion in a

- 24 h Feed Restriction Model to Induce Intestinal Permeability in Broiler Chickens. *Anim. Sci. J.* 2018a, 89: 1002–1010.
- Maguey-González, J.A.; Michel, M.A.; Baxter, M.F.A.; Solis-Cruz, B.; Hernandez-Patlan, D.; Merino-Guzman, R.; Hernandez-Velasco, X.; Latorre, J.D.; Hargis, B.M.; Tellez, G.; et al. Effects of Humic Acids on Recovery of Salmonella Enterica Serovar Enteritidis. *Ann. Anim. Sci.* 2018b, 18, 387–399.
- Mao, Y. Modulation of the growth performance, meat composition, oxidative status, and immunity of broilers by dietary fulvic acids. *Poultry Science*. 2019, 0:1–5 <http://dx.doi.org/10.3382/ps/pez281>
- Maraschiello, C.; Sárraga, C.; García Regueiro, JA. Glutathione peroxidase activity, TBARS, and α -tocopherol in meat from chickens fed different diets. *J. Agric. Food Chem.* 1999, 47, 867–872.
- Mehdi, A.; Hasan, G. Immune Response of Broiler Chicks Fed Yeast Derived Mannan Oligosaccharides and Humate against Newcastle Disease. *World Appl. Sci. J.* 2012, 7, 779–785.
- Moeser, A.J., Blikslager, A.T., Mechanisms of porcine diarrhoeal disease. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 2007, 231: 56–67.
- Moeser, A.J., Klok, C.V., Ryan, K.A., Wooten, J.G., Little, D., Cook, V.L., Blikslager, A.T. Stress signaling pathways activated by weaning mediate intestinal dysfunction in the pig. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 2007, 292: G173–G181.
- Mota-Rojas, D., Roldán-Santiago, P., Pérez-Pedraza, E., Martínez-Rodríguez, R., Hernández-Trujillo, E., & Trujillo-Ortega, M. E. (2014). Factores estresantes en lechones destetados comercialmente. *Veterinaria México*, 45, 37-51. <https://www.scielo.org.mx/pdf/vetmex/v45nspe/v45nspea5.pdf>.
- Mudroňová, D., Karaffová, V., Pešulová, T., Koščová, J., Maruščáková, I.C., Bartkovský, M., Marcinčáková, D., Ševčíková Z., Marcinčák S. The effect of humic substances on gut microbiota and immune response of broilers. *Food and Agricultural Immunology*, 2020, 31(1): 137-149, DOI: 10.1080/09540105.2019.1707780
- Nabuurs, MJA.; Hoogendoorn, A.; Van-Der-Molen, EJ.; Van-Osta, LM. Villus height and crypt depth in weaned and unweaned pigs, reared under various circumstances in the Netherlands. *Res Vet Sci.* 1993, 55, 78–84.
- Nagaraju, R; Reddy, BS; Gloridoss, R; Suresh, BN and Ramesh, C. Effect of dietary supplementation of humic acids on performance of broilers. *Indian J. Anim. Sci.* 2014, 84:447-452.
- Nordgreen, J; Munsterhjelm, C; Aae, F; Popova, A; Boysen, P; Ranheim, B; Heinonen, M; Raszplewicz, J; Piepponen, P; Lervik, A; Valros, A & Janczak, A. M. The effect of lipopolysaccharide (LPS) on inflammatory markers in blood

- and brain and on behavior in individually-housed pigs. *Physiology & Behavior*. 2018, vol. 195, pp. 98-111.
- Ozturk, E.; Ocak, N.; Coskun, I.; Turhan, S.; and Erener, G. Effects of humic substances supplementation provided through drinking water on performance, carcass traits and meat quality of broilers. *J Anim Phys Anim Nutr*. 2020, 94:78–85.
- Ozturk, E.; Ocak, N.; Turan, A.; Erener, G.; Altop, A.; & Cankaya, S. Performance, carcass, gastrointestinal tract and meat quality traits, and selected blood parameters of broilers fed diets supplemented with humic substances. *Journal Science Food Agriculture*. 2012, 92, 59-65. <https://doi.org/10.1002/jsfa.4541>.
- Pan, L.; Qin, G.; Zhao, Y.; Wang, J.; Liu, F.; Che, D. Effects of Soybean Agglutinin on Mechanical Barrier Function and Tight Junction Protein Expression in Intestinal Epithelial Cells from Piglets. *Int. J. Mol. Sci*. 2013, 14, 21689-21704; doi:10.3390/ijms141121689.
- Peña-Méndez, E. M.; Havel, J.; Patočka, J. Humic Substances - Compounds of Still Unknown Structure: Applications in Agriculture, Industry, Environment, and Biomedicine. *J. Appl. Biomed*. 2005, 3 (1), 13–24. <https://doi.org/10.32725/jab.2005.002>.
- Piccolo, A.; Spaccini, R.; Savy, D.; Drosos M.; Cozzolino V. The Soil Humeome: Chemical Structure, Functions and Technological Perspectives. En *Sustainable Agrochemistry*. S. Vaz Jr. (ed.), Springer Nature Switzerland AG. 2019, 183.222. https://doi.org/10.1007/978-3-030-17891-8_7.
- Písaříková, B.; Zralý, Z.; Herzig, I. The effect of dietary sodium humate supplementation on nutrient digestibility in growing pigs. *Acta Vet. Brno*. 2010, 79, 349–353.
- Pluske, J.R., Hampson, D.J., Digestive disorders of pigs associated with nutrition, with emphasis on proliferative enteropathy and swine dysentery. In: Aland, A., Madec, F. (Eds.), *Sustainable Animal Production: The Challenges and Potential Developments for Professional Farming*. Wageningen Academic Publishers, The Netherlands. 2009: 275– 285.
- Priegnitz, H. *Wasserkur und Badelust*. Leipzig: Koehler & Amelang. 1986.
- Prunier, A., Heinonen, M. and Quesnel, H. High physiological demands in intensively raised pigs: impact on health and welfare. *Animal*, 2010, 4, 886–898. <https://doi.org/10.1017/S175173111000008X>
- Puvača, N. Effect of phytoadditive (*Allium sativum* L.) in fattening chicks nutrition. *Proceedings of the 32nd International Conference of Agriculture*. Novi Sad, 2008: 116-121.
- Qi, Z.; Min, Z.; Wang, G.; Feng, Y.; Guo, H.; Li, Y.; Wang, N.; Li, Y.; Wang, R.; Li, W.; Hu, J. Comparison of immunofluorescence and immunohistochemical staining with anti-insulin antibodies on formalin-fixed paraffin-embedded human pancreatic tissue

- microarray sections. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 2017, 10(3), 3671-3676.
- Rauw, W.; Kanis, E.; Noordhuizen-Stassen, E. and Grommers, F. Undesirable side effects of selection for high production efficiency in farm animals: a review. *Livestock Production Science*, 1998, 56, 15–33. [https://doi.org/10.1016/S0301-6226\(98\)00147-X](https://doi.org/10.1016/S0301-6226(98)00147-X).
- Reddy, D. M.; Reddy, G. V. B.; & Mandal, P. K. Application of Natural Antioxidants in Meat and Meat Products-A Review. *Food & Nutrition Journal*, 2018, 173. <https://doi.org/10.29011/2575-7091.100073>.
- Reis de Souza, T.C., Guerrero, C.M.J., Aguilera, B.A., Mariscal, L.G. Efecto de diferentes cereales sobre la morfología intestinal de lechones recién destetados. *Tec. Pecu. Mex.* 2005, 3(3): 309-321.
- Reis de Souza, T.C., Mariscal, L.G., Escobar, G.K. Algunos factores fisiológicos y nutricionales que afectan la incidencia de diarreas posdestete en lechones. *Vet. Méx.* 2010, 41(4): 275-283.
- Reis de Souza, T.C., Mariscal, L.G., Escobar, G.K., Aguilera, B.A., Magné, B.A. Cambios nutrimentales en el lechón y desarrollo morfofisiológico de su aparato digestivo. *Vet. Méx.* 2012, 43(2): 155-173.
- Rentería-Flores, J. A.; Gómez-Rosales, S.; López-Hernández, L. H.; Ordaz-Ochoa, G.; Anaya-Escalera, A. M.; Mejía-Guadarrama, C. A.; Mariscal-Landín, G. Principales contribuciones de Investigación del INIFAP en nutrición porcina en México: desafíos y perspectivas. *Revista Mexicana Ciencias Pecuarias*. 2021, 12 (Suplemento 3):79-110. doi: 10.22319/rmcp.v12s3.5866.
- Riede UN, Zeck-Kapp G, Freudenberg N, Keller HU, Seubert B. Humate induced activation of human granulocytes. *Virchows Arch [B]*. 1991, 60:27-34.
- Samson, G. and Visser, S.A. Surface-active effects of humic acids on potato cell membrane properties, *Soil Biol. Biochem.* 1989, 21: 343-347.
- Schepetkin I, Khlebnikov A, Se Kwon B. Medical drugs from humus matter: focus on mumie. *Drug Dev Res* 2002, 57: 140–159.
- Schepetkin IA, Khlebnikov AI, Young Ah S, et al. Characterization and biological activities of humic substances from mumie. *J Agric Food Chem* 2003, 51(18): 5245–5254.
- Serpen, A.; Gökmen, V.; Fogliano, V. Total Antioxidant Capacities of Raw and Cooked Meats. *Meat Sci.* 2012, 90 (1), 60–65. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2011.05.027>.
- Shermer, C.L.; Maciorowski, K.G.; Baile, C.A. Caecal Metabolites and Microbial Populations in Chickens Consuming Diets Containing a Mined Humate Compound. *J. Sci. Food Agric.* 1998, 77, 479–486.
- Slavík, J. The effect of humic acid WH 67 in nutrition of piglets (in Czech). *Krmivářství*. 1999, 3: 32-33.

- Smith, F., Clark, J.E., Overman, B.L., Tozel, C.C., Huang, J.H., Rivier, J.E.F., Blikslager, A.T., Moeser, A.J. Early weaning stress impairs development of mucosal barrier function in the porcine intestine. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 2010, 298: G352– G363.
- Stevenson F.J. *Humus chemistry: genesis, composition, reactions.* New York, USA, John Wiley and Sons. 1982, 443 pp.
- Suchý, P.; Herzig, I.; Písaříková, B. The use of sorbents on the basis of humic acids to reduce ammonia levels in stable environment. *Vet. Med. Czech.* 1999, 44, 331-338.
- Swidsinski, A.; Dörel, Y.; Loening-Baucke, V.; Gille, C.; Reißhauer, A.; Göktas, O.; Krüger, M.; Neuhaus, J.; Schrödl, W. Impact of Humic Acids on the Colonic Microbiome in Healthy Volunteers. *World J. Gastroenterol.* 2017, 7, 885–890.
- Taklimi SM, Ghahri H, Isakan MA. Influence of different levels of humic acid and esterified glucomannan on growth performance and intestinal morphology of broiler chickens. *AgricSci.* 2012; 3: 663–668.
- Tohid, T.; Hasan, G.; Alireza, T. E cacy of Mannanoligosaccharides and Humate on Immune Response to Avian Influenza (H9) Disease Vaccination in Broiler Chickens. *Vet. Res. Commun.* 2010, 34, 709–717.
- Trckova, M.; Matlova, L.; Hudcova, H.; Faldyna, M.; Zraly, Z.; Dvorska, L.; Beran, V.; Pavlik, I. Peat as a feed supplement for animals: A review. *Vet. Med.* 2005, 50, 361–377.
- Trckova, M., Lorencova, A., Babak, V., Neca, J., & Ciganek, M. Effects of sodium humate and zinc oxide used in prophylaxis of post-weaning diarrhoea on the health, oxidative stress status and fatty acid profile in weaned piglets. *Veterinary Research Institute in Brno, Czech Republic*, 2017, 62, 16–28. <https://doi.org/10.17221/70/2016-VETMED>.
- Trckova, M.; Lorencova, A.; Babak, V.; Neca, J.; Ciganek, M. The effect of leonardite and lignite on the health of weaned piglets. *Res. Vet. Sci.* 2018, 119, 134–142. 125.
- Velayudhan, D E.; Heo, JM.; Nyachoti, CM. Net energy content of dry extruded-expelled soybean meal fed with or without enzyme supplementation to growing pigs as determined by indirect calorimetry. *Journal of Animal Science*, 2015, 93: 3402-3409.
- Van Der Klis, J.D., Van Voorst A., Van Cruyningen C. Effect of soluble polysaccharide (carboxy methyl cellulose) on the physicochemical conditions in the gastrointestinal tract of broilers. *Br. Poult. Sci.* 1993, 34: 971-983.
- Van Milgen, J. y Dourmad, J. Y. Concept and application of ideal protein for pigs. *Journal of Animal Science and Biotechnology.* 2015; 6, 15-25.
- Van Rensburg CEJ, Naude PJW. Potassium humate inhibits the production of inflammatory cytokines and complement activation in vitro. *Inflammation* 2009, 32(4): 270–276.
- Van Rensburg, C. E. The Antiinflammatory properties of humic substances: A mini review.

Phytotherapy Research, 2015, 29: 791–795. doi:10.1002/ptr.5319

- Vigneault, B., Percot, A., Lafleur, M. and Campbell, P.G.C. Permeability changes in model and phytoplankton membranes in the presence of aquatic humic substances, *Environ. Sci. Technol.* 2000, 34: 3907-3913.
- Vigors, S., O'Doherty, J. V., Kelly, A. K., O'Shea, C. J., Sweeney, T. The effect of divergence in feed efficiency on the intestinal microbiota and the intestinal immune response in both unchallenged and lipopolysaccharide challenged ileal and colonic explants. *Plos One*, 2016, 11(2), e0148145. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0148145>
- Vischer, C.; Hankel, J.; Nies, A.; Keller, B.; Galvez, E.; Strowig, T.; Keller, C.; Breves, G. Performance, Fermentation Characteristics and Composition of the Microbiome in the Digest of Piglets Kept on a Feed With Humic Acid-Rich Peat. *Front. Vet. Sci.* 2019, 6 (29),1-10.
- Wang, K.; Chen, G.; Cao, G.; Xu, Y.; Wang, Y.; Yang, C. Effects of *Clostridium butyricum* and *Enterococcus faecalis* on growth performance, intestinal structure, and inflammation in lipopolysaccharide-challenged weaned piglets. *J. Anim. Sci.* 2019, 4140–4151; doi:10.1093/jas/skz235
- Wang, M.; Wang, L.; Tan, X., et al. The developmental changes in intestinal epithelial cell proliferation, differentiation, and shedding in weaning piglets. *Animal Nutrition (Zhongguo xu mu Shou yi xue Hui)*. 2022, 9:214-222. DOI: 10.1016/j.aninu.2021.11.006. PMID: 35600553; PMCID: PMC9092860.
- Wang, Q.; Chen, YJ.; Yoo, JS.; Kim, HJ.; Cho, JH.; Kim, IH. Effects of supplemental humic substances on growth performance, blood characteristics and meat quality in finishing pigs. *Livest. Sci.* 2008, 117, 270-274.
- Wang, Q., Ying J. F., Zou, P., Zhou, Y. H., Wang, B. K., & Yu, D. Y. Effects of dietary supplementation of humic acid sodium and zinc oxide on growth performance, immune status and antioxidant capacity of weaned piglets. *Animals*, 2020, 10, 2104. <https://doi.org/10.3390/ani10112104>.
- Wang, W.; Zeng, X.; Mao, X.; Wu, G.; Qiao, S. Optimal Dietary True Ileal Digestible Threonine for Supporting the Mucosal Barrier in Small Intestine of Weanling Pigs. *J. Nutr.* 2010, 140, 981–986.
- Wang, X., Hao, Y., Shan, A., Jin, Y., Fang, H., Zhao, Y., Shen, J., Zhou, C., Zhou, Y., Fu, Y., Wang, J., Zhang, J. Toxic effects of Zearalenone on intestinal microflora and intestinal mucosal immunity in mice. *Food and Agricultural Immunology*, 2018, 29: 1002–1011. doi:10.1080/09540105.2018.1503233.
- Weber, TE.; van Sambeek, DM.; Gabler, NK.; Kerr, BJ.; Moreland, S.; Edmonds, MS. Effects of dietary humic and butyric acid on growth performance and response to lipopolysaccharide in young pigs. *J. Anim. Sci.* 2014, 92, 4172–4179.

- Wei, H. K.; Xue, H. X.; Zhou, Z. X.; & Peng, J. A carvacrol-thymol blend decreased intestinal oxidative stress and influenced selected microbes without changing the messenger RNA levels of tight junction proteins in jejunal mucosa of weaning piglets. *Animal*, 2017, 11, 193-201. <https://doi.org/10.1017/S1751731116001397>
- Windisch, W; Schedle, K; Plitzner, C and Kroismayr, A. Use of phytogetic products as feed additives for swine and poultry. *J. Anim. Sci.* 2008, 86: E140-E148. doi: 10.2527/jas.2007-0459. Epub 2007 Dec 11. PMID: 18073277.
- Woolhouse, M.; Ward, M.; van Bunnik, B.; Farrar, J. Antimicrobial Resistance in Humans, Livestock and the Wider Environment. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 2015, 370 (1670),20140083. <https://doi.org/10.1098/rstb.2014.0083>.
- Xu, J.; Xu, C.; Chen, X.; Cai, X.; Yang, S.; Sheng, Y.; Wang, T. Regulation of an antioxidant blend on intestinal redox status and major microbiota in early weaned piglets. *Nutrition*. 2014; 30(5):584-589. doi: 10.1016/j.nut.2013.10.018.
- Yarkova T.A. Chemical modification of humic acids by the introduction of indole-containing fragments. *Solid Fuel Chem.*, 2011. 45: 261–266.
- Yasar, S.; Gokcimen, A.; Altuntas, I.; Yonden, Z.; Petekkaya, E. Performance and Ileal Histomorphology of Rats Treated with Humic Acid Preparations. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 2002, 86, 257–264.
- Yasar, S. Performance, gut size and ileal digesta viscosity of broiler chickens fed with a whole wheat added diet and the diets with different particle size. *Internat. J. Poult. Sci.* 2003, 2(1): 75-82.
- Zralý, Z., Písaříková, B. Effect of Sodium Humate on the Content of Trace Elements in Organs of Weaned Piglets. *Acta Vet. Brno* 2010, 79: 73-79; doi:10.2754/avb201079010073.