

## Stevia (*Stevia Rebaudiana Bertoni*): una alternativa natural en reemplazo de los Antibióticos Promotores del Crecimiento en pollos de carne

### STEVIA (*Stevia Rebaudiana Bertoni*): a natural alternative to replace Antibiotic Growth Promoters in broilers

Nilson, Armando; Grosso, Viviana; Mañas, Fernando; Soltermann, Arnaldo; Miazzo, Raúl D.; Peralta, María Fernanda

#### Armando Nilson

Unidad de Investigación Aviar, UNRC, Argentina

#### Viviana Grosso

Laboratorio de Vinculación Tecnológica, Facultad de Cs Exactas, Físico-Químicas y Naturales; UNRC, Argentina

#### Fernando Mañas

Farmacología, Facultad de Agronomía y Veterinaria, UNRC, Argentina

#### Arnaldo Soltermann

Laboratorio de Vinculación Tecnológica, Facultad de Cs Exactas, Físico-Químicas y Naturales; UNRC, Argentina

#### Raúl D. Miazzo

Unidad de Investigación Aviar, Argentina

#### María Fernanda Peralta

mperalta@ayv.unrc.edu.ar

Unidad de Investigación Aviar, Argentina

#### Ab intus FAV-UNRC

Universidad Nacional de Río Cuarto, Argentina

ISSN-e: 2618-2734

Periodicidad: Semestral

vol. 1, núm. 11, 2023

abintus@ayv.unrc.edu.ar

Recepción: 15 Abril 2023

Aprobación: 03 Mayo 2023

URL: <http://portal.amelica.org/ameli/journal/820/8204136002/>

DOI: <https://doi.org/10.5281/zenodo.7963014>

#### Financiamiento

Fuente: Foncyt: proyecto

Nº de contrato: 3120-2019

#### Financiamiento

Fuente: Pío 2020

Nº de contrato: 2020

**Resumen:** Objetivo: determinar los efectos de Extracto de Stevia (ES) líquido, *in vitro* (actividad microbiana) e *in vivo* (niveles de lipoperoxidación plasmática, variables productivas, inmunológicas y salud intestinal) en pollos parrilleros durante los primeros 15 días de vida. La actividad microbiana se determinó mediante la técnica de difusión en disco. Ensayo *in vivo*: 100 pollos parrilleros machos, 1 día de vida, fueron divididos en: Tratamiento 1 (T1): sin ES; T2: 0,5 % ES; T3: 0,75 % ES y T4: 1 % ES. El ES se adicionó al agua. Se determinó el Índice de Conversión (IC) y al final del ensayo se midió la lipoperoxidación plasmática (evaluando las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico), se extrajo timo, bolsa de Fabricio e intestino, que fueron procesados para el estudio histomorfológico. En intestino se calculó: altura de vellosidad/profundidad de la cripta (AV/PC). Resultados: la actividad antimicrobiana y lipoperoxidación plasmática fueron semejantes en todas las aves ( $p \leq 0,05$ ). El IC fue mejor en T4 y T2 ( $p \leq 0,05$ ) que T3 y T1. En timo y bolsa de Fabricio el ES generó adelanto de la madurez inmunológica. En intestino, el rango AV/PC fue  $T4 < T3 < T2 < T1$  ( $p \leq 0,05$ ) y se observó aumento en el número de células plasmáticas y caliciformes y mayor tamaño del mucus en los pollos que recibieron ES. Conclusión: ES (0,5-1%) administrado en el agua durante los primeros quince días de vida adelantó la madurez inmunológica en los órganos linfoides primarios y mejoró la salud intestinal, esto se reflejó en un mejor IC, principalmente cuando SE fue administrada al 1 %.

**Palabras clave:** stevia, parrilleros, parámetros productivos, parámetros inmunológicos, salud intestinal.

**Abstract:** Objective: to determinate Stevia Extract (SE) effects, *in vitro* (antimicrobial activity) and *in vivo* (lipoperoxidacion levels, productive and immunological variables and intestinal health) in broilers during the first fifteen days of life. *In vitro* assay: SE antimicrobial activity was determined using the disc diffusion technic. *In vivo* assay: One hundred male (1-day broilers chicks) were divided into four groups: Treatment 1 (T1) (without SE), T2: 0.5 % SE; T3: 0.75 % SE and T4: 1 % SE. SE was added to drinking water. The following productive

variable were determinate: conversion index. At the end of assay, plasma concentrations of thiobarbituric acid-reactive substances (TBARs) were measured, thymus, Fabricius bursa and gut were removed and processed for the histomorphometric study. In the gut was measured villi height/crypt deep relation (VH/CD ratio). Results: antimicrobial activity, TBARs and productive variables were similar in all broilers ( $p \leq 0,05$ ). CI was better in T4 and T2 ( $p \leq 0,05$ ) than T3 and T1. In all groups received SE, an increased immunology mature of thymus and Fabricius bursa was observed together with an increase in plasmatic (IgA producers) and goblet cells number and in the mucus layer height. In the gut, HV/CD ratio were:  $T4 < T2 < T3 < T1$  ( $p \leq 0,05$ ). Conclusion: SE (0.5-1 %) administered in drinking water to broilers during the first fifteen days of life, increased immunology maturity in primary lymphoid organs and intestinal health, it was reflex in better CI, mainly when SE was administered at 1 %.

**Keywords:** phytobiotic extracts, chicken, productive parameters, immunological parameters, intestinal health.

## INTRODUCCION

En nutrición aviar, las legislaciones nacionales e internacionales han disminuido el uso de Antibióticos Promotores del Crecimiento. Esas regulaciones y los requerimientos de los consumidores actuales, que buscan pollos de carne y/o subproductos libres de antibióticos, han dirigido las investigaciones hacia la búsqueda de aditivos naturales como promotores de crecimiento (Roberts *et al.*, 2015; Peralta *et al.*, 2016, 2018a; Taha-Abdelaziz *et al.*, 2018). Dentro de este grupo, se pueden incluir numerosas sustancias como prebióticos, probióticos, simbióticos, ácidos orgánicos, enzimas, péptidos antimicrobianos y fitogénicos, con diferentes mecanismos de acción que aumentan la performance de los animales de interés productivo (Kyoung-Woo *et al.*, 2016, De Gussem, 2018, Latek *et al.*, 2021).

Los fitogénicos son sustancias bioactivas naturales, derivadas de hierbas o plantas (aceites esenciales) con funciones antioxidantes, antimicrobianas, antihelmínticas y también estimulan la inmunidad y la eficiencia productiva (Gaddet *et al.* 2017, Robert, 2021). Dentro de este grupo, se puede mencionar la Stevia (S) (*Stevia rebaudiana Bertoni*), planta perenne nativa de Paraguay y Brasil que se utiliza como endulzante en humanos, propiedad originada por los esteviósidos y rebaudiósidos (glicósidos de esteviol) presentes en hojas y ramas (Christaki *et al.*, 2013; Grosso *et al.*, 2012). Además de sus efectos endulzantes, esta tiene numerosas propiedades menos conocidas como antioxidantes, antimicrobianas y antitumorales, cuyos mecanismos de acción aún no están totalmente aclarados (Ghosh *et al.*, 2008; Jayaraman *et al.*, 2008; Christaki *et al.*, 2013; Shukla *et al.*, 2015, Peralta *et al.*, 2018a, Pirgozliev, *et al.*, 2021).

Las investigaciones referidas al uso de S en aves comerciales son escasas, por ese motivo, nuestro grupo de trabajo desde hace unos cinco años está realizando estudios con este fitogénico, en diferentes dosis y presentaciones, con resultados positivos. Por ejemplo, en un ensayo de orientación, la adición de extracto de

Stevia (ES) (0,5-1 %) en el agua ó en la dieta a pollos de carne de 15 días de vida, tuvo efectos positivos en las variables productivas, lográndose un mejor Índice de Conversión. Asimismo[F1] , en investigaciones posteriores en pollos de carne, usando dosis similares, se analizaron variables asociadas con la salud intestinal e inmunológicas, lográndose una mejora en ambas variables en las aves que habían consumido S (Raheem, *et al.*, 2022; Peralta *et al.*, 2018b; 2019a, b, 2020, Vaquero *et al.*, 2022). Coincidiendo con estos resultados, en otra investigación en pollos parrilleros de 15 días de vida, la administración de 0,13 % de hojas molidas de S o 0,13 % de stevidiósidos puros, durante 4 semanas, mejoró la ganancia de peso de las aves durante las primeras dos semanas del ensayo, pero la eficiencia productiva medida al final de la investigación no se modificó, registrándose un aumento significativo en la grasa abdominal de los animales (Atteh *et al.*, 2008; 2011). Igualmente, en otra investigación en aves adultas (pollos parrilleros y gallinas ponedoras), la administración de steviósidos (0,6 % durante 2 semanas) no modificó la performance productiva de los parrilleros ni se registraron cambios en la producción de los huevos ó la composición de los mismos (Geuns, 2003). En contraposición a esto, en otro estudio en pollos de carne, la adición de hojas de S molida (0,5-2 %) en la dieta durante los primeros 21 días, mejoró la eficiencia productiva y algunos parámetros relacionados con la salud intestinal de las aves, midiéndose dichas variables a los 42 días (Quezada Figueroa, 2011). Como se puede deducir de las distintas investigaciones, en aves hay diferentes resultados, que dependen del compuesto bioactivo utilizado (hoja, tallo, extracto de hojas), del tipo de ave empleado: pollos parrilleros o ponedoras, la dosis usada, la edad del animal en ensayo, entre otras variables. Entonces, parecería que el efecto positivo de este fitobiótico pudo manifestarse cuando es administrado a las aves de carne durante los primeros 14-21 días de vida, momento en que se establece la funcionalidad gastrointestinal. Esto involucra aparato digestivo, sistema inmune y microbiota, que están en íntima asociación e interaccionan durante las primeras 2-3 semanas de vida y mediante la liberación de diferentes mediadores celulares y complejos mecanismos, logran la homeostasis intestinal (Peralta, 2016a,b; Peralta *et al.*, 2017, 2018a). En los sistemas de producción intensivos, como la producción de los pollos de carne, un tracto gastrointestinal saludable es esencial para lograr un óptimo índice de conversión mediante la utilización de nutrientes de forma eficiente. Esto es de importancia crucial en la primeras semanas de vida, momento en que crece y se desarrolla el sistema digestivo. Conjuntamente, la microbiota coloniza el intestino e interacciona con el aparato digestivo y el sistema inmune asociado a intestino (SIAI). Finalmente, aproximadamente a los 15 días de vida, se da la maduración del SIAI con la microbiota y los estímulos de las dietas, evento que culmina cuando los pollos de carne alcanzan su potencial productivo (Lammers *et al.*, 2010; Maynard *et al.*, 2012; Lamichhane *et al.*, 2014, Peralta *et al.*, 2016a,b; 2017, 2018a)

De este modo, la S, como integrante de los promotores de crecimiento naturales, podría surgir como una buena opción con efectos benéficos sobre la interacción entre el intestino, SIAI y microbiota, aumentando la funcionalidad intestinal y consecuentemente, mejorando la performance productiva de las aves de carne.

Así, el objetivo de esta investigación fue determinar los efectos del extracto de S en ensayos *in vitro* (actividad antimicrobiana) e *in vivo* (peroxidación lipídica,

parámetros productivos, e inmunológicos y de la salud intestinal) administrado en el agua de bebida de pollos de carne durante los primeros 15 días de vida.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Preparación del Extracto de Stevia (ES):** Se cultivaron las plantas de S en el campo de docencia y experimentación de la Facultad de Agronomía y Veterinaria de la Universidad Nacional de Río Cuarto (UNRC) (Camdocecx-Sector Norte) y cuando las plantas presentaron el estado fenológico de prefloración se cortaron. Luego se procesaron en el Laboratorio de Vinculación Tecnológica, donde se secaron las hojas y se molieron (malla entre 40 y 200  $\mu$ ) y se ubicaron en un extractor semi industrial vertical sólido-liquido tipo Soxhlet Figmay M8 (Figmay, Argentina), cargando no más de 2,0 litros de agua destilada a 90 °C al extractor y se agregó alcohol etílico al balón para extraer el compuesto bioactivo de la S (4 a 6 h). El extracto obtenido luego fue evaporado a presión reducida, hasta que el alcohol y parte del agua fueron removidos y luego se concentró con un Evaporador rotatorio Figmay RV 1 (Figmay, Argentina). La solución con el ES bioactivo fue almacenado en frío para luego ser usado en el ensayo *in vivo*, en las concentraciones correspondientes. El contenido de glicósidos de steviol fue monitoreado por HPLC usando un Cromatógrafo Prostar 325 UV-Visible / longitud de onda simple (Varian, Estados Unidos) y Columna HPLC cromsep Varian 55 (150 x 4.6 mm) microsorb 100-5 Amino (Varian, Estados Unidos). Para la fase móvil fue usado Acetonitrilo: agua (80:20) a un rango de flujo de 1.0 ml/min a temperatura ambiente. La detección fue realizada a 210 nm. (Kolb *et al.*, 2001). El acetonitrilo calidad HPLC usado fue marca Sintorgan, Argentina.

Las soluciones del ES fueron normalizadas con respecto a su contenido de esteviósidos: una concentración de 1,5 % significa 1,5 % p/p de esteviósidos en el extracto dejando todos los otros componentes extraídos relativos a esa cantidad.

### *Ensayo in vitro:*

**Determinación de la actividad antimicrobiana:** la actividad del ES fue testada contra los siguientes microorganismos: *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* ATCC 25212, *Staphylococcusepidermidis*, *Micrococcus luteus* ATCC 9341, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella sp* (y) *Pseudomonas aeruginosa*. Los microorganismos fueron obtenidos del Dep. de Microbiología, UNRC. Los tubos conteniendo caldo con tripteína de soja (CTS) inoculados con los microorganismos fueron incubados durante 18 hs, a 37 °C. Se hicieron diluciones de 1/10 hasta que fue alcanzado una densidad óptica (DO) de 0,04 (10. UFC/ml). En este ensayo fue usado ES caliente (100 °C) a dos niveles: 1mg/ml y 45 mg/ml.

**Método de difusión en disco:** 100 ml de cada inóculo fue sembrado en las cápsulas de Petri conteniendo Agar Mueller-Hinton (AMH); los discos de papel de filtro (6 mm de diámetro), impregnados con 10  $\mu$ l de ES, (1 mg/ml y 45 mg/ml) fueron ubicados en la superficie del medio. Las cápsulas se dejaron 30 min. a temperatura ambiente, para permitir la difusión del ES, y luego se

incubaron a 37°C durante 24 hs. Transcurrido ese tiempo, se midió la zona de inhibición alrededor del disco con un calibre. Cada experimento fue realizado por duplicado, según la metodología de De Pooter *et al.* (1995).

*Ensayo in vivo:*

**Aves y diseño experimental:** Se usaron 100 pollos de carne machos (Ross) de un día de vida, desde el nacimiento hasta los 15 días de vida. Las aves fueron alojadas en jaulas, en el Módulo de Ambiente Controlado de la Unidad de Investigación Aviar (UIA), Producción Avícola, en la UNRC. Tanto el manejo de las aves como los procedimientos experimentales fueron realizados siguiendo las normas aprobadas por el Comité de Ética de la Investigación (CoEdI) de la UNRC.

Los pollos fueron pesados al día 1° día de vida y distribuidos al azar dentro de 4 grupos (Tratamientos): Tratamiento 1 (T1) (sin ES), T2: ES (0,5 %), T3: ES (0,75 %) y T4: ES (1 %). El ES fue administrado en el agua de bebida. Cada grupo fue subdividido en 5 réplicas de 5 aves c/u. Tanto el agua como el alimento fueron ofrecidos *ad libitum*. Las aves recibieron una dieta pre-iniciadora del día 1-7 con 24 % PB y 2950 EM Kcal/kg e iniciadora (día 8 hasta el 15) con 21,5% PB y 3100 EM Kcal/kg (Rostagno, 2017), dichas dietas fueron elaboradas en la Planta Experimental de Alimentos Balanceados de la UIA, según Tabla 1.

**Tabla 1**  
Composición g/kg dieta y análisis proximal de la dieta basal de pollos parrilleros durante los primeros 15 días de vida

Ingredientes y composición	Pre-iniciador g/kg dieta	Iniciador g/kg dieta
Maíz	506	564
Harina de soja	357.3	210
Poroto de soja (desactivado)	60	150
Harina de carne (45)	55	54.5
Núcleo vitamínico mineral <sup>1</sup>	5	5
NaCl	4	3
DL-metionina	4	3
Lisina	4	3
Conchilla	4,7	5
Total	1000	1000
Análisis/kg dieta		
Proteína cruda	240	214
Calcio	9.5	9.5
Grasa	4	5
Fibra	2	2.5
Lisina	14	12.5
Metionina	6	5.5
Triptófano	2.9	2.3
Energía Metabólica (Kcal/Kg)	2950	3150

<sup>1</sup> 1Núcleo vitamínico mineral (por kg alimento): Vitamina: A 10x106 UI, D3 3x106 UI, E 30 g, K3 3 g. Acido fólico:1 g, Colina 250 g. Minerales: Cu 10 g, Zn 75 g, Se 300 mg, I 1g, Co 100 mg, Fe 40 g, B1 1.2 g, B2 5.5 g, B6 3 g, B12 14 mg, Biotina 110 mg, Acido nicotínico:40 g, Acido Pantotenico: 12 g (Rostagno, 2017).

### *Variables Productivas*

Durante el período experimental, se midieron las siguientes variables: Ganancia Media Diaria (GMD) (g/ave/día), Consumo Medio Diario (CMD) (g/ave/día) e Índice de Conversión (IC).

El CMD se determinó dividiendo el consumo total de alimento durante 15 días, considerando el número de pollos en cada repetición. La GMD se determinó por pesaje grupal de todos los pollos dividiendo los pesos totales de cada réplica de cada tratamiento durante 15 días, considerando el número de pollos. El IC se determinó por tratamiento mediante el cociente entre el consumo de alimento y el peso final ganado durante 15 días (Peralta *et al.*, 2020).

### *Análisis de Sustancias Reactivas al ácido Tiobarbitúrico (TBARs)*

Al final del ensayo, en todas las aves se les extrajeron 5 ml de sangre de la vena yugular bajo condiciones asépticas, para medir las sustancias Reactivas al Acido Barbitúrico (TBARs) en el plasma. Cada muestra de sangre fue centrifugada a 3000 RPM (centrífuga Arcano, modelo 802b, China) y el plasma removido fue preservado a -20°C para su posterior análisis. La cuantificación de TBARs fue llevada a cabo siguiendo el protocolo de Buege y Aust (1978), modificado por Marcincak *et al.* (2003), usando como sustancia de referencia Malondialdehído (MDA). Todas las determinaciones se realizaron por duplicado y cada muestra fue cuantificada por triplicado, los resultados fueron expresados en términos de nmol MDA/g proteína

**Variables inmunológicas y relacionadas con la salud intestinal:** Al final del experimento, inmediatamente después del sacrificio, se procedió a la extracción del timo, la bolsa de Fabricio y del intestino para el análisis histomorfométrico. Las muestras fijadas en formol bufferado fueron procesadas según la técnica convencional y teñidos posteriormente con hematoxilina/eosina para luego ser analizadas con un microscopio óptico. Para el estudio de las variables asociadas a la salud intestinal, se midieron la altura de las vellosidades intestinales (AV) ( $\mu$ ) y la profundidad de las criptas (PC) ( $\mu$ ) con el programa Axio Vision Release (Carl Zeiss, Alemania). Para esta determinación, se utilizó un microscopio óptico (Axiophot, Carl Zeiss, Alemania) con una cámara digital anexada (AXio Cam Erc 5x Rev.2, Carl Zeiss, Alemania) (Peralta *et al.*, 2017).

Los datos fueron analizados mediante análisis de varianza, con test a posteriori paramétricos (Tukey). La significación estadística se establece para  $p \leq 0,05$ . (Di Rienzo *et al.*, 2016)

## **RESULTADOS**

### **Ensayos *in vitro*: efecto de ES en la actividad antimicrobiana**

La determinación de la actividad antimicrobiana mostró que el ES, tanto a 1 mg/ml como a 45 mg/ml, no tuvieron potencial antibacteriano ya sea contra Gram + como Gram -.

**Ensayos in vivo:**

**Efectos de ES sobre las variables productivas:** las aves que recibieron ES, en las dosis más altas (T2 y T4), tuvieron significativamente mejor IC que el resto (T1 y T3) ( $p \leq 0,05$ ).

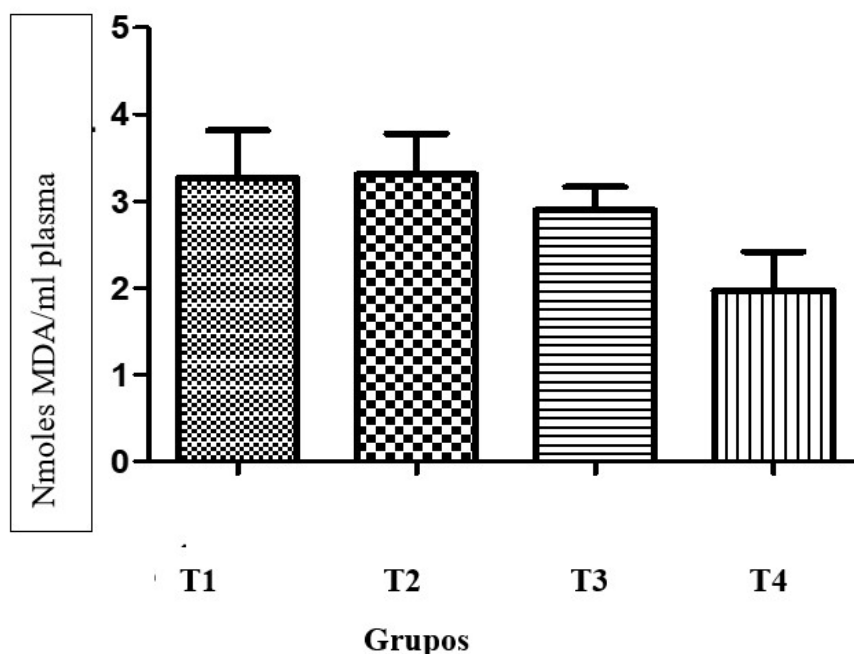
**Tabla 2**  
Variables productivas en pollos de carne que recibieron ES en el agua durante 15 días

Grupo	T1(0% ES)	T2(0,5 % ES)	T3(0,75% ES)	T4(1% ES)
GMD	24,20 ±	25,27 ±	25,38	25,66 ±
(g/ave/día)	1,10	0,90	±1,2	1,15
CMD	30,10 ±	30,20 ±	30,90 ±	30,10 ±
(g/ave/día)	2,40	1,30	2,80	1,5
IC	1,24a	1,19b	1,22a	1,17b

Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas: a, b:  $p \leq 0.05$

Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas: a, b:  $p \leq 0.05$

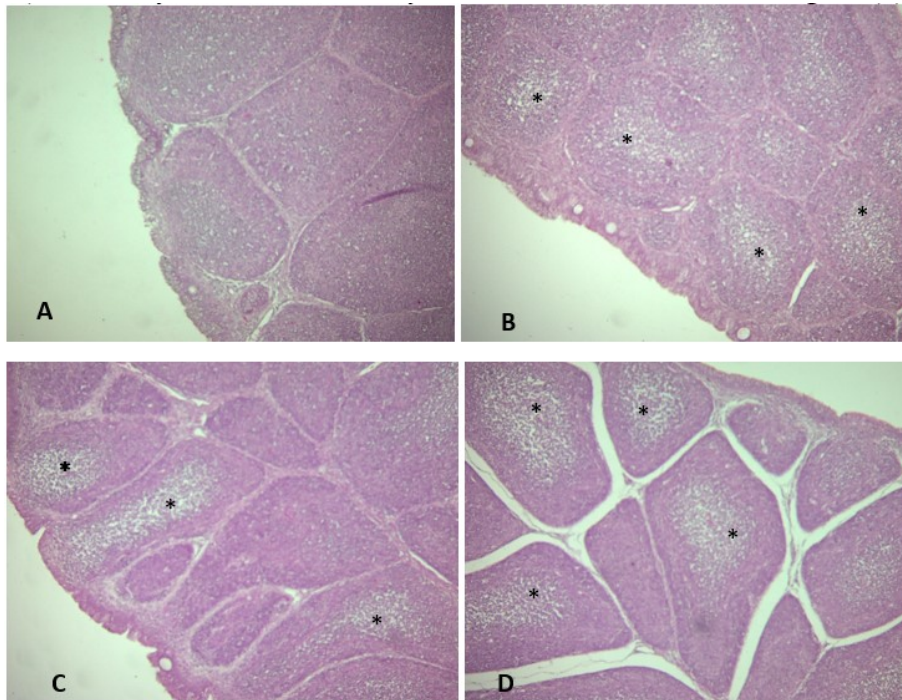
**Efectos de ES sobre los niveles de lipoperoxidación en sangre:** la evaluación de las TBARs no mostraron diferencias significativas entre los grupos (Figura 1).



**Figura 1**  
Concentraciones de MDA plasmáticas en pollos de carne que recibieron Extracto de Stevia en distintas dosis en el agua de bebida durante quince días

**Efectos de ES sobre las variables inmunológicas:** la adición de SE, principalmente a niveles de 0,75 % aumentó la maduración inmunológica tanto del timo como de la bolsa de Fabricio. Dentro del timo, se observaron zonas con mayor desarrollo medular y en la bolsa de Fabricio, se notó aumento en el

desarrollo folicular en las aves que recibieron este fitogénico, principalmente el grupo T3 (Figura 2).



**Figura 2**

Sección histológica de bolsa de Fabricio en pollos de carne que recibieron Extracto de Stevia en distintas dosis en el agua de bebida durante quince días.

(A): Grupo T1: Control; (B): T2: 0,5 % ES; (C): T3: 0,75 % ES; (D): T4: 1 % ES. (10 X). En B, C y D se muestra el mayor desarrollo folicular de este órgano (\*).

**Efecto de SE sobre la salud intestinal:** el estudio histomorfométrico intestinal mostró una relación HV/CD:  $T4 < T2 < T3 < T1$ . Esto se originó por un aumento significativo en AV del grupo T3 ( $p \leq 0.05$ ) respecto a los otros grupos (T1, T2 and T4). Igualmente, la PC fue significativamente mayor en T3 y T4 con respecto a T1 y T2 ( $p \leq 0.05$ ) (Tabla 3).

**Tabla 3**

Variables histomorfométricas intestinales en pollos de carne que recibieron ES en el agua durante 15 días

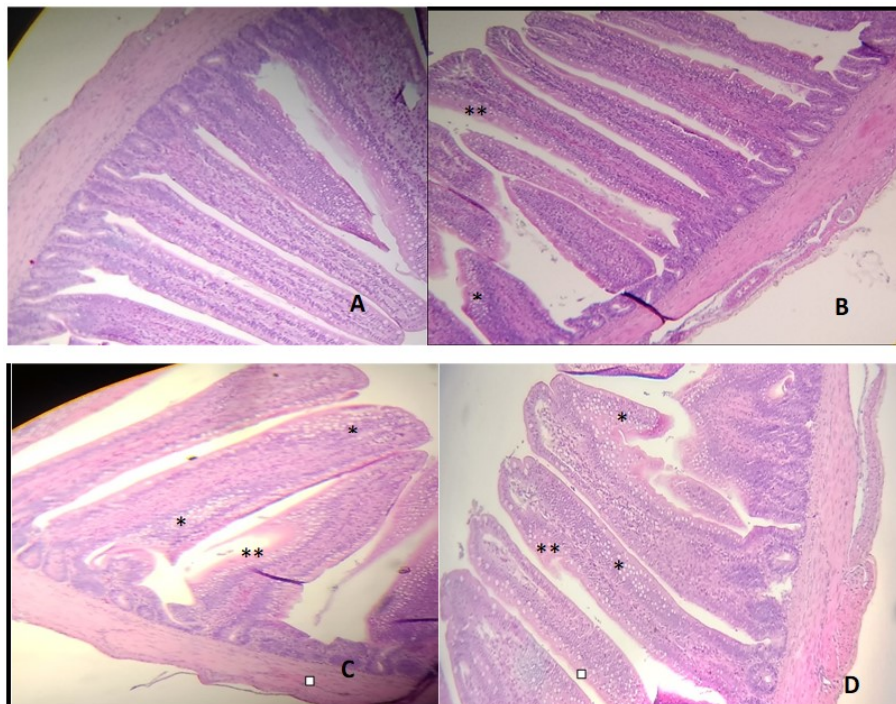
Grupo	T1(0% ES)	T2(0,5 % ES)	T3(0,75% ES)	T4(1% ES)
AV(μ)	928,08 ± 6,11a	968,06 ± 7,07b	1018,82 ± 5,44 c	1049,79 ± 6,36 d
PC (μ)	81,86 ± 3,01 a	91,50 ± 6,03 a	97,36 ± 7,01b	99,43 ± 6,09 b
AV/PC	11,33 ± 0,06 a	10,57 ± 0,01 b	10,46 ± 0,02 b	10,55 ± 0.18 b

Altura de la vellosidad intestinal (AV) (μ), profundidad de la cripta (PC) (μ) y relación AV/PC.

Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas: a, b, c, d:  $p \leq 0.05$

Además, se notó un aumento en el número de células plasmáticas (productoras de IgA) y células calciformes, esto último se reflejó en una mayor capa mucosa en las aves que recibieron ES (Figura 3).





**Figura 3**

**Secciones histológicas de intestino aviar**

A): Grupo T1: Control; (B): T2: 0,5 % ES; (C): T3: 0,75 % ES; (D): T4: 1 % ES. (10 X). En B, C y D se muestra un incremento en el número de células caliciformes (\*) y mayor altura de la capa mucosa (\*\*) en las vellosidades intestinales.

## DISCUSIÓN

En esta investigación, el ensayo *in vitro* mostró que ES, tanto a 1mg/ml como a 45 mg/ml no tuvo efecto como antibacteriano contra los microorganismos Gram + o Gram – testeados.

En contraposición a estos resultados, en otra investigación *in vitro* se encontró que ES tenía potencial antibacteriano contra los microorganismos testeados, aunque dichos autores usaron otro método para obtener ES (Jayaraman, *et al*, 2008). En esa investigación se usó etil acetato, acetona, cloroformo y agua para obtener el ES, y nosotros una metodología que utiliza agua, aproximadamente 2 litros, con lo cual el sistema es más eficiente, más económico y no daña el medio ambiente. Coincidentemente con nuestros resultados, cuando Jayaraman,*et al*, 2008 usaron agua para obtener ES, no registraron potencial antibacteriano efectivo.

Con respecto a los ensayos *in vivo*, la evaluación de los niveles de lipoperoxidación en plasma de los pollos de carne, mostraron una tendencia (no significativa) a efectos benéficos sobre el balance oxidativo en los grupos que recibieron la adición del ES en las dosis más altas (T3 y T4) respecto a los otros dos grupos (T1 y T2). Coincidiendo parcialmente con estos resultados, en una investigación realizada en pollos de carne, que recibieron steviósidos (0,25 %) durante los primeros 21 días de vida, se encontró disminución en el daño redox aumentando la capacidad antioxidante total y la actividad de las enzimas antioxidativas (Jiang, *et al*, 2021). Si bien en dicha investigación se administraron steviósidos puros, y en la nuestra ES, se puede notar el efecto

antioxidante de la S, aunque serían necesarios más estudios relacionados con niveles de lipoperoxidación no sólo en sangre, sino también en músculo (pechuga, por ejemplo) y en la grasa abdominal, a fin de aclarar este ítem.

En esta investigación, las variables productivas mostraron que las aves que recibieron ES, tanto a 0,5 como 1 % tuvieron mejor IC que el grupo control y el grupo que recibió ES (0,75 %). Esto se debió a que las aves consumieron casi lo mismo, pero ambos grupos que recibieron ES ganaron 1-1,3 g/diario más de peso que el resto. Coincidiendo con estos resultados, en otra investigación se encontró mejor performance productiva durante los primeros quince días, no así al final del ensayo (40 días), en pollos de carne que recibieron la adición de hojas de S molidas (0-2%) o esteviósidos puros (130 ppm) en dieta iniciadora y terminadora (Atteh *et al.*, 2008; 2011). Igualmente, en otra investigación, se encontró mejor performance productiva en pollos parrilleros de 49 días, que recibieron hojas de S molidas durante los primeros 21 días de vida (0,5-1,5 %) (Quesada Figueroa, 2011). El efecto positivo de S (presentada como extracto u hojas molidas) se produciría durante los primeros 15-21 días de vida, cuando se establece la funcionalidad gastrointestinal, madurando e interrelacionándose tanto el sistema digestivo, como el SIAI y la microbiota intestinal.

El sistema inmune, junto con un intestino saludable, son claves para obtener una alta performance productiva en pollos de carne, que tienen alto rango de crecimiento (40-45 días de vida) (Gaddet *et al.*, 2017; Smet, 2016; Peralta *et al.*, 2016a y b, 2018a). Junto con esas variables, la nutrición cumple un rol fundamental en este proceso, con lo cual los promotores de crecimiento naturales pueden contribuir en forma positiva a ese alto rango de crecimiento, aumentando la funcionalidad intestinal (Peralta *et al.*, 2019).

En esta investigación, la adición de ES, principalmente en los niveles más altos (0,75 y 1 %) adelantaron la madurez inmunológica en los órganos inmunes primarios, tanto inmunidad humoral (bolsa de Fabricio) como celular (timo). Este es un hallazgo relevante, ya que la maduración temprana es fundamental en estos animales que no sólo tienen exigencias de crecimiento altas, sino que también están sometidos a estrés desde su nacimiento. Coincidiendo parcialmente con este resultado, en otra investigación fue detectado un aumento en las proteínas antiinflamatorias y la respuesta inmune humoral (IgY) en pollos parrilleros que recibieron esteviósidos (0,003 %) en dietas terminadoras (21-42 días) (Daneshyar *et al.*, 2011). Si bien en nuestra investigación se adicionó SE en el agua (0,5-1 %) en aves jóvenes (0-15 días de vida) y en la otra investigación se adicionó esteviósidos (0,003 % en la dieta) en aves adultas (21-42 días de vida), en ambas investigaciones se registró estimulación del Sistema inmune humoral. Los ES contienen componentes que inciden positivamente aumentando las variables inmunológicas, como ácidos grasos monoinsaturados y sacáridos funcionales principalmente, junto con otros componentes (ácido oleico, fructuooligosacáridos, por ejemplo) (Christaki *et al.*, 2013, Peralta *et al.*, 2018a). Efectivamente, la inulina, un fructuooligosacárido presente en ES, ha sido asociado con las propiedades prebióticas, antioxidante, antiinflamatoria y antimicrobiana que inciden en el sistema inmune (Christaki *et al.*, 2013).

El intestino, es un órgano importante en las producciones intensivas como los pollos parrilleros, asociado íntimamente con la nutrición, ya que los nutrientes pueden ser absorbidos y utilizados correctamente si el ave presenta

una buena funcionalidad intestinal. Esta se establece los primeros 15 días de vida a partir de la relación entre intestino, SIAI, y microbiota. Por ejemplo, cambios en la microestructura intestinal, particularmente en la mucosa, pueden reducir la asimilación de nutrientes, cambiando el metabolismo del pollo y su producción de energía. Esto podría afectar la salud intestinal entonces, la utilización eficiente de nutrientes y de sustancias bioactivas es fundamental. Esto se refleja en una modificación positiva o negativa del crecimiento, del desarrollo y ambos se ven reflejados en el índice de conversión y otros parámetros económicos importantes en la industria avícola. Dentro del intestino, el epitelio intestinal está constantemente expuesto a la microbiota y antígenos, ambos son esenciales para el desarrollo de la inmunidad. La microbiota interactúa con los enterocitos, la capa mucosa y el tejido inmune (SIAI) afectando la composición y funcionamiento intestinal (Peralta *et al.*, 2018a, b).

En esta investigación, el estudio histomorfométrico mostró que la relación AV/PC fue significativamente mejor en los grupos que recibieron ES, debido a un incremento de aproximadamente el 10 % tanto en AV como en PC, excepto T2 que tuvo un 5% mayor AV y 10 % de PC respecto a T1. El aumento en AV se asocia a un epitelio intestinal maduro, con la función absorbente aumentada, porque contiene mayor área de absorción (Awad *et al.*, 2009; Brummer *et al.*, 2010; Peralta *et al.*, 2018b). De la misma manera, el incremento en PC, registrado en las aves que recibieron este fitobiótico se asocia a una capacidad de regeneración aumentada, con rápido recambio celular en las vellosidades, evento relevante cuando los patógenos intestinales contactan y penetran dentro de las vellosidades, requiriéndose un recambio celular acelerado (Peralta *et al.*, 2018b).

Concordando con estos resultados se registraron aumentos en AV en pollos de carne que habían recibido hojas de S molidas en la dieta (0,5-1,5 %) durante las 3 primeras semanas de vida y sacrificados a los 49 días de vida (Quesada Figueroa, 2011). La presencia de ácidos monoinsaturados y sacáridos funcionales presentes en la S, junto con fenoles, flavonoides, vitamina C y Zn que se encuentran en el ES mediante diferentes mecanismos podrían haber modificado directa o indirectamente el intestino, SIAI y/o la microbiota. Esto podría haber llevado a lograr la homeostasis intestinal, que se reflejó en una mayor salud intestinal y mejor performance productiva en estas aves (Peralta *et al.*, 2018a).

Además, en el estudio histológico intestinal, se notó un incremento del 50 % en el número de las células plasmáticas (productoras de IgA) dentro de las vellosidades de las aves que recibieron ES. Estos mismos resultados se registraron en investigaciones anteriores, en pollos de carne que recibieron hojas de Stevia molida (0,5-2 %) (Vaquero *et al.*, 2022). La IgA es la principal inmunoglobulina presente en la capa mucosa intestinal, la primera línea de defensa de la inmunidad humoral dentro del intestino (SIAI) contra la penetración de patógenos entéricos y otras toxas que podrían penetrar junto con el alimento. A su vez, la IgA contribuye a la regulación del balance ecológico entre microbiota, intestino y SIAI, favoreciendo la funcionalidad gastrointestinal (Peralta *et al.*, 2017).

Junto a estos resultados, en las vellosidades intestinales de las aves que recibieron ES fueron detectados un aumento en el número de células caliciformes, que producen mucina, el principal componente de la capa mucosa, primera barrera física de defensa del intestino. Además de esa importante función, a través de la subcapa interna, la capa mucosa permite alojar a la IgA y a

través de la subcapa externa, permite el intercambio de nutrientes, sobre todo en los primeros quince días de vida, momento en que se produce la maduración del sistema gastrointestinal (Peralta, 2016b).

## CONCLUSIONES

El ES (0,5-1 %) adicionado al agua de bebida en pollos de carne durante los primeros quince días de vida, produce una estimulación inmunológica en los órganos inmunes primarios y a nivel intestinal mejora la relación altura de vellosidad/profundidad de la cripta, incrementa tanto el número de las células precursoras de IgA como la altura de la capa mucosa principalmente a dosis de 0,75 y 1 %, lo que se ve reflejado en una mejor salud intestinal y mejor conversión alimenticia en las aves, aunque sólo el grupo que recibió 1 % de Stevia.

## Agradecimientos

Los autores agradecen al Fondo Nacional de Ciencia y Técnica (Foncyt, proyecto PICT 3120-2019), al Ministerio de Ciencia y Tecnología de la Provincia de Córdoba (PIO 2020) y Cluster Industrial y Agroalimentario de la Provincia de Córdoba por los subsidios y el apoyo que permitieron realizar esta investigación.

## Referencias

- Evaluation of supplementary stevia (*Stevia rebaudiana*, Bertoni) leaves and stevioside in broiler diets: effects on feed intake, nutrient metabolism, blood parameters, and growth performance.
- Atteh, J. O., Onagbesan, O. M., Tona, K., Decuypere, E., Geuns, J., Buyse, J. 2011. Potential use of *Stevia Rebaudiana* in animal feeds. *Arch. de Zootechnia* 60(229): 133-136. doi: 10.4321/S0004-05922011000100015
- Awad, A., Ghareeb, K., Abdel-Rahem, S., Bohm, J. 2009. Effects of dietary inclusion of probiotic and synbiotic on growth performance, organ weights, and intestinal histomorphology of broiler chickens. *Poultry Sci.* 88, 49-55. doi.org/10.3382/ps.2008-00244.
- Brummer, M., Jansern Van Rensburg, C., Moran, C. A. 2010. *Saccharomyces cerevisiae* cell wall products: The effects on gut morphology and performance of broiler chickens. *S. Afr. J. Anim. Sci.* 40, 43-50. doi.org/10.4314/sajas.v40i1.54125
- Buege, J.A., S.D. Aust, 1978. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol.*, 52: 302-310. doi: 10.1016/S0076-6879(78)52032-6.
- Christaki, E., Bonos, E., Giannenas, I., Karatzia, M. A. Florou-Paneri, P. C. 2013. *Stevia rebaudiana* as a novel source of food additives. *J. Food and Nutrit. Res.* 52(4): 195-202.
- Daneshyar, M., Geuns, J. M. C., Willemsen, H., Ansari, Z., Darras, V. M., Buyse, J. G. Everaert, N. 2011. Evaluation of dietary stevioside supplementation on anti-human serum albumin immunoglobulin G, Alpha-1-glycoprotein, body weight and thyroid hormones in broiler chickens. *J. Anim. Physiol. and Anim. Nutrit.* 96(4): 627-633. doi: 10.1111/j.1439-0396.2011.01188.x
- De Gussem, M. 2018. Gut health in poultry: a holistic approach. In *Gut Health, a special edition in World Poultry*, p. 7-10.

- De Pooter, H. L., Aboutabl, E. A, El-Shabrawy, A. O. 1995. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil of leaf, stem and rhizome of *Alpinia speciosa*. *Flavour and Fragrance Journal* 10 (2):63-67. doi.org/10.1002/ffj.273010020
- Di Rienzo J.A., Casanoves F., Balzarini M.G., Gonzalez L., Tablada M., Robledo C.W. InfoStat versión 2016. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>.
- Gaddet, U., Kim, W. H., Lillehoj, H. S. 2017. Alternatives to antibiotics for maximizing growth performance and feed efficiency in poultry: a review. *Anim. Health and Res. Review* 18(1):26-45. doi: 10.1017/S1466252316000207.
- Geuns, J. M. C. 2003. Steviosides. *Phytochemistry* 64(5): 913-921. doi:10.1016/S0031-9422(03)00426-6
- Ghosh, S., Subudhi, E., Nayak, S. 2008. Antimicrobial assay of *Stevia rebaudiana* Bertoni leaf extracts against 10 pathogens. *Int. J. Integrative Biol.* 2(1): 27-31.
- Grosso, V., Podetti, J., Soltermann, A. 2012. *Stevia Rebaudiana Bertoni*. Cuadernillo de Divulgacion del Laboratorio de Desarrollo y Vinculacion Tecnologica. UniRio Editora, p. 24. ISBN:978-987-688-017-6.
- Jayaraman, S., Manoharan, M. S., Illanchezian, S. 2008. In vitro antimicrobial and antitumor activities of *Stevia rebaudiana* (Asteraceae) leaf extracts. *Tropical J. Pharmac. Res.* 7(4):1143-1149. doi: doi.org/10.4314/tjpr.v7i4.14700
- Kolb, N., J. L. Herrera, D. J. Ferreira, R. F. Uliana. 2001. Analysis of Sweet diterpene Glycosides from *Stevia rebaudiana*: Improved HPLC Method. *J. Agric. and Food Chem.*, 49: 4538-4541
- Kyoung-Woo, L., Lillehoj, H. 2016. An update on direct-fed microbial in broiler chickens in the postantibiotic era. *Anim. Prod. Sc.* 57(8): 1575-1581. doi: 10.1071/AN15666
- Lammers, A., Wieland, W., Kruijt, L., Jansma, A., Straetemans, T., Schots, A., Den Hartog, G., Parmentier, H. 2010. Successive immunoglobulin and cytokine expression in the small intestine of juvenile chicken. *Dev. And Comp. Immunol.* 34: 1254-1262. doi: 10.1016/j.dci.2010.07.001.
- Lamichhane, A., Azegami, T Kiyono, H. 2014. The mucosal immune system for vaccine development. *Vaccine* 32: 6711-6732. doi:10.1016/j.vaccine.2014.08.089
- Latek, U., Chlopecka, M., Karlic, M., Mendel, M. 2021. Phytogetic compounds for enhancing intestinal barrier function in poultry – a review. *Planta Med* 2021. Thieme. doi: 10.1055/a-1524-0358
- Marcincak, S., J. Sokol, P. Turek, H. Rozanska, Z. Dicakova et al., 2003. Comparative evaluation of analytical techniques to quantify malondialdehyde in broiler meat. *Bull. Vet. Inst.Pulawy*, 47: 491-496
- Maynard, C. L., Elson, C. O., Hatton, R. D. , Weaver, C. T. 2012. Reciprocal interactions of the intestinal microbiota and immune system. *Nature* 489: 231-241. doi: 10.1038/nature11551
- Peralta M, Danelli, MG, Vivas A. 2016a. Rediscovering the importance of mucosal immune system (MIS) in poultry. *Acad J Biotechnol* 4(3):91–5. doi:10.15413/ajb.2015.0238
- Peralta, M. F. 2016b. Sistema Inmune Asociado a Mucosas y a Intestino en gallinas inmunizadas con *Escherichia coli* K88(p.157). Tesis Doctoral. Universidad Nacional de Rio Cuarto.
- Peralta, M. F., Magnoli, A., Alustiza, F., Nilson, A., Miazzo, R., Vivas, A. 2017. Gut associated lymphoid tissue: a key tissue inside the mucosal immune system of

- hens immunized with *Escherichia coli* F4. *Frontiers in Immunology* 8:568. doi: 10.3389/fimmu.2017.00568
- Peralta, M. F., Nilson, A., Grosso, V., Soltermann, A., Miazzo, R. D. 2018a. *Stevia* (*Stevia rebaudiana* Bertoni): un nuevo aditivo natural en avicultura? *Rev. Ciencias Vet.* 36 (1):7-19, E-ISSN: 2215-4507, enero-junio, 2018. doi:10.15359/rcv.36-1.2.
- Peralta, M. F., Nilson, A., Grosso, V., Soltermann, A y Miazzo, R. D. 2018b. Salud intestinal y parámetros inmunológicos en pollos de carne que recibieron *Stevia* (*Stevia rebaudiana* Bertoni). *Morfovirtual* 2018. Disponible en línea <http://morfovirtual2018.sld.cu/index.php/morfovirtual/2018/paper/viewPaper/305/595> Convención Internacional de Ciencias Morfológicas. La Habana, Cuba, 10/11 al 2/12/18. 16 p.
- Peralta, M. F., A. Nilson y R. Miazzo. 2019a. Nutrición aviar: alternativas naturales para optimizar la funcionalidad gastrointestinal . *AbIntus* 4(2):103-109-ISSN 2618-2734.
- Peralta, M. F., A. Nilson y R. Miazzo. 2019a. Nutrición aviar: alternativas naturales para optimizar la funcionalidad gastrointestinal . *AbIntus* 4(2):103-109-ISSN 2618-2734.
- Peralta, M. F., Nilson, A. Grosso, V., Soltermann, A., Miazzo, R.D. 2019b. Gut histomorphometry in broilers fed *Stevia*. *Biocell* 43(4): A44. ISSN: 0327-9545, ISSN 1667-5746 (versión on line).
- Peralta, M. F., Nilson, A. Grosso, V., Senz, A., Soltermann, A., Miazzo, R.D. 2020. *Stevia* (*Stevia rebaudiana* Bertoni): a natural alternative in broilers nutrition. *Applied Science and Innovate Research* 4(4): 38-49. doi:10.22158/asir.v4n4p38
- Pirgozliev, V., Kljak, K., Whiting, I., Rose, S., Mansbridge, S., Enchev, S., Atanasov, A., Stringhini, J. 2021. Feeding dry *Stevia* leaf (*Stevia rebaudiana*) or xylanase improves the hepatic antioxidative status of broiler chickens. *Res. In Veterinary Sci.* 136: 227-229. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2021.03.001>
- Quesada-Figueroa, J. 2011. Utilización de tres niveles de *Stevia rebaudiana* en alimentación de broilers y su influencia en flora y desarrollo intestinal. Tesis para obtener el título de Ingeniero Agrónomo. Salgolqui, Ecuador. 102 pag.
- Raheem, D.; Soltermann, A.T.; Tamiozzo, L.V.; Cogo, A.; Favén, L.; Punam, N.J.; Sarmiento, C.R.; Rainosaló, E.; Picco, F.; Morla, F.; Nilson, A., Stammler-Gossmann. 2022. Partnership for International Development: Finland–Argentina Conference on Circular Economy and Bioeconomy with Emphasis on Food Sovereignty and Sustainability. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 19,1773, p. 14. doi.org/10.3390/ijerph19031773
- Robert, F. 2021. Demedication inspired by nature. CCPA's way. En *Antibiotic Reduction*, edición especial de *All About Feed*. P. 54-55.
- Roberts, T. Wilson, J., Gurthrie, A., Cookson, K., Vancraeynest, D., Schaeffer, J., Moody, R., Clark, S. 2015. New issues and science in broiler chicken intestinal health: Emerging technology and alternative interventions. *J. Appl. Poult. Res.* 24:257–266. doi:10.1017/S004393391500027
- Rostagno, H.S. 2017. Cap. 2: Exigencias nutricionais das Aves. Pag: 259-398. En: *Tabelas brasileiras para Aves e suínos*. 4º Ed. ISBN: 978-85-8179-120-3. Univ. Federal de Viçosa. Viçosa-Brasil
- Shukla, S., Mehta, A. 2015. Comparative phytochemical analysis and in vivo immunomodulatory activity of various extracts of *Stevia rebaudiana* leaves in experimental animal model. *Frontiers in Life Science* 8(1): 55-63. doi.org/10.1080/21553769.2014.961615
- Smet, S. 2016. Enhance intestinal

- health and improve performance. In Gut Health, a special edition in World Poultry, p. 16-19.
- Taha-Abdelaziz, K., Hodgins, D., Laamers, A., Alkie, T., Sharif, F. 2018. Effects of early feeding and dietary interventions on development of lymphoid organs and immune competence in neonatal chickens: A review. Vet. Immunol. and Immunopathol, 21, 1-11. doi: 10.1016/j.vetimm.2018.05.001
- Vaquero, M., Nilson, A. Grosso, V., Soltermann, A., Miazzo, R.D., Peralta, M. F. 2022. Natural Additives in Broilers: Stevia (*Stevia Rebaudiana Bertoni*) as an Innovator Growth Promotor. EC Veterinary Science 7.5: 1-9.