

# Phytobiotic effect of mixed powder of medicinal plants on productivity and egg quality of laying hens

## Efecto fitobiótico del polvo mixto de plantas medicinales en la productividad y calidad del huevo de gallinas ponedoras

R. Rodríguez<sup>1</sup>, R. Aroche<sup>2</sup>, Dalilis Donatién<sup>1</sup> and Y. Martínez<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup>*Centro de Estudios de Producción Animal, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de Granma, Bayamo, Granma, Cuba*

<sup>2</sup>*Departamento de Zootecnia, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de Granma, Bayamo, Granma, Cuba*

<sup>3</sup>*Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad de Fondwa, Leogane, Haití*

Email: ceoyordan@hotmail.com

R. Rodríguez: <https://orcid.org/0000-0003-2641-1767>

R. Aroche: <https://orcid.org/0000-0002-3940-1026>

Dalilis Donatién: <https://orcid.org/0000-0002-5053-5738>

Y. Martínez: <https://orcid.org/0000-0003-2167-4904>

To evaluate the phytobiotic effect of the mixed powder of medicinal plants on the productivity and egg quality of laying hens, 120 White Leghorn birds (Hybrid L-33), 27 weeks old, were used. For 10 weeks, the animals were placed according to a completely randomized design with three treatments, 10 repetitions per treatment and four birds per repetition. The experimental treatments consisted of a basal diet (T1) and the addition of 0.5 (T2) and 1.0 % (T3) of the mixed powder of leaves of medicinal plants (40 % of *Anacardium occidentale*, 20 % of *Psidium guajava*, 20 % of *Moringa oleifera* and 20 % of *Morinda citrifolia*). T3 improved ( $P<0.05$ ) laying intensity (80.18 to 85.53 %) and mass conversion (2.73 to 2.52) and reduced ( $P<0.05$ ) the percentage of cracked eggs (0.22 to 0.08 %) in relation to the other experimental groups. However, diets did not change ( $P>0.05$ ) the body weight of hens, egg weight, feed intake and broken, shell-less and dirty eggs, as well as external (shape index, weight, thickness, and surface area of the shell) and internal (albumen and yolk height, Haugh units and yolk color) quality of the egg of laying hens. Dietary addition of 1.0 % of mixed powder of medicinal plants (40 % *A. occidentale*, 20 % *P. guajava*, 20 % *M. oleifera* and 20 % *M. citrifolia*) is recommended to improve productive efficiency and reduce cracked eggs from laying hens.

Keywords: *laying hen, medicinal powder, productive efficiency, final product*

Although scientific evidence shows that the use of subtherapeutic antibiotics can increase microbial resistance and cross-resistance to other microorganisms, as well as bioaccumulate in muscles and organs (Evangelista *et al.* 2022), still these synthetic products are commonly used for birds (Burnett *et al.* 2021) in Latin America. Even though poultry industry focuses more on the use and study of growth-promoting antibiotics in broilers, their inclusion in laying hens corresponds to the most critical stages, such as the beginning of laying and laying peak (Sharma *et al.* 2022). Recent studies demonstrated that several natural alternatives to preventive antibiotics can be used efficiently in diets

Para evaluar el efecto fitobiótico del polvo mixto de plantas medicinales en la productividad y calidad de huevo de gallinas ponedoras, se utilizaron 120 aves White Leghorn (Híbrido L-33), de 27 semanas de edad. Durante 10 semanas, las aves se ubicaron según diseño totalmente aleatorizado con tres tratamientos, 10 repeticiones por tratamiento y cuatro aves por repetición. Los tratamientos experimentales consistieron en una dieta basal (T1) y la adición de 0.5 (T2) y 1.0 % (T3) del polvo mixto de hojas de plantas medicinales (40 % de *Anacardium occidentale*, 20 % de *Psidium guajava*, 20 % de *Moringa oleifera* y 20 % de *Morinda citrifolia*). El T3 mejoró ( $P<0.05$ ) la intensidad de puesta (80.18 a 85.53 %) y la conversión masal (2.73 a 2.52) y redujo ( $P<0.05$ ) el porcentaje de huevos cascados (0.22 a 0.08 %) con relación a los otros grupos experimentales. Sin embargo, las dietas no cambiaron ( $P>0.05$ ) el peso vivo de las gallinas, peso del huevo, consumo de alimento y los huevos rotos, fáfara y sucios, así como la calidad externa (índice de forma, peso, grosor y superficie de la cáscara) e interna (altura de la yema y albumen, unidades Haugh y color de la yema) del huevo de gallinas ponedoras. Se recomienda la adición dietética de 1.0 % del polvo mixto de plantas medicinales (40 % de *A. occidentale*, 20 % de *P. guajava*, 20 % de *M. oleifera* y 20 % de *M. citrifolia*) para mejorar la eficiencia productiva y reducir los huevos cascados de gallinas ponedoras.

Palabras clave: *ave de postura, polvo medicinal, eficiencia productiva, producto final*

A pesar de que las evidencias científicas demuestran que el uso de los antibióticos subterapéuticos puede aumentar la resistencia microbiana, y la resistencia cruzada a otros microorganismos, así como bioaccumularse en músculos y órganos (Evangelista *et al.* 2022), todavía en Latinoamérica estos productos sintéticos se emplean comúnmente en las aves (Burnett *et al.* 2021). Aunque la industria avícola se enfoca más en el uso y estudio de los antibióticos promotores de crecimiento en pollos de ceba, su inclusión en gallinas ponedoras corresponde a las etapas más críticas, como el inicio de la puesta y el pico de postura (Sharma *et al.* 2022). Estudios recientes demostraron que varias alternativas naturales a los antibióticos preventivos se pueden utilizar con eficiencia en las dietas y en el agua de

and drinking water, such as prebiotics, probiotics, symbiotics, organic acids and medicinal plants (Torres *et al.* 2005 and Vlaicu *et al.* 2021). These natural products improve intestinal health, antioxidant capacity, immune status and productivity of laying hens (Khan *et al.* 2020).

Specifically, medicinal plants have some beneficial secondary metabolites that, included in low concentrations in chicken diets, can modify productive indicators and egg quality (Kim *et al.* 2011 and Wasilewski *et al.* 2015). Martínez *et al.* (2012, 2020) demonstrated that dietary supplementation with *Anacardium occidentale* and *Psidium guajava* leaf powder promoted egg production and quality. Also, Más *et al.* (2015) reported that the inclusion of 1.0 % of *Morinda citrifolia* leaf powder increased egg weight, shell thickness and yolk color, without decreasing the productivity of laying hens. Likewise, Olmo *et al.* (2013), by including up to 1.5 % of *Moringa oleifera* leaf powder in diets, found improvements in the productive indicators of hens at laying peak.

Más *et al.* (2017) reported that the mixtures of several medicinal plants such as *Anacardium occidentale*, *Psidium guajava*, *Morinda citrifolia* and *Moringa oleifera* modified the secondary metabolites in the hydro-alcoholic extract and several biologically important phytochemical compounds were identified. Salazar *et al.* (2017) noted that a mixture of medicinal plants improved the productivity of laying hens, perhaps due to the synergy of secondary metabolites. Despite these studies, it is necessary to continue research with other proportions of the mixtures of medicinal plants and verify their possible beneficial action in poultry. The objective of this study was to evaluate the phytobiotic effect of the mixed powder of these medicinal plants on productivity and quality of laying hens.

## Materials and Methods

### *Experimental location and climatic characteristics.*

The work was carried out at the UEB Antonio Maceo, which is located on the Manzanillo highway km 12, in the town of La William Soler, Bayamo municipality, Granma province, Cuba. Mean relative humidity was 78 %, mean minimum temperature was 26.3 °C and mean maximum temperature was 30.6 °C.

*Sample taking and preparing.* An amount of 20 kg of leaves of *P. guajava*, *A. occidentale*, *M. oleifera* and *M. citrifolia* were collected from 20 trees approximately five years old in the peri-urban areas of Bayamo municipality, Granma. This territory is characterized by a flat topography and brown carbonated soil. Size diversity, structure and optimal classification of leaves were features considered for the collection, and were identified in the Department of Botany of the Faculty of Agricultural Sciences of the University of Granma, Cuba.

bebida, como prebióticos, probióticos, simbióticos, ácidos orgánicos y plantas medicinales (Torres *et al.* 2005 y Vlaicu *et al.* 2021). Estos productos naturales mejoran la salud intestinal, la capacidad antioxidante, el estatus inmune y la productividad de las gallinas ponedoras (Khan *et al.* 2020).

Específicamente, las plantas medicinales poseen algunos metabolitos secundarios benéficos que, incluidos en bajas concentraciones en las dietas de las gallinas, pueden modificar los indicadores productivos y la calidad del huevo (Kim *et al.* 2011 y Wasilewski *et al.* 2015). Martínez *et al.* (2012, 2020) demostraron que la suplementación dietética con el polvo de hojas de *Anacardium occidentale* y *Psidium guajava* promovió la producción y la calidad del huevo. Además, Más *et al.* (2015) informaron que la inclusión de 1.0 % del polvo de hojas de *Morinda citrifolia* incrementó el peso del huevo, grosor de la cáscara y color de la yema, sin disminuir la productividad de gallinas ponedoras. Asimismo, Olmo *et al.* (2013) al incluir en las dietas hasta 1.5 % del polvo de hojas de *Moringa oleifera* encontraron mejoras en los indicadores productivos de gallinas en pico de postura.

Más *et al.* (2017) informaron que las mezclas de varias plantas medicinales como *Anacardium occidentale*, *Psidium guajava*, *Morinda citrifolia* y *Moringa oleifera* modificaron los metabolitos secundarios en el extracto hidro-alcohólico y se identificaron varios compuestos fitoquímicos de importancia biológica. Salazar *et al.* (2017) señalaron que una mezcla de plantas medicinales mejoró la productividad de las aves de postura, quizás debido a la sinergia de los metabolitos secundarios. A pesar de estos estudios, es necesario continuar las investigaciones con otras proporciones de mezclas de plantas medicinales y comprobar su posible acción benéfica en las aves. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto fitobiótico del polvo mixto de estas plantas medicinales en la productividad y calidad de gallinas ponedoras.

## Materiales y Métodos

### *Ubicación experimental y características climáticas.*

El trabajo se realizó en la UEB Antonio Maceo, que se localiza en la carretera Manzanillo km 12, en la localidad de La William Soler, municipio Bayamo, provincia de Granma, Cuba. La humedad relativa media fue de 78 %, la temperatura mínima promedio de 26.3 °C y la temperatura máxima promedio de 30.6 °C.

*Toma y preparación de las muestras.* Se recolectaron 20 kg de hojas de *P. guajava*, *A. occidentale*, *M. oleifera* y *M. citrifolia*, de 20 árboles de aproximadamente cinco años de edad en las zonas periurbanas del municipio Bayamo, Granma. Este territorio se caracteriza por una topografía llana y suelo pardo con carbonato. Se tuvo en cuenta para la recolección, la diversidad del tamaño, estructura y la clasificación óptima de las hojas, identificadas en el Departamento de Botánica de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Granma, Cuba.

Las hojas se deshidrataron durante siete días a la

The leaves were dehydrated for seven days in the shade, on perforated cardboard sheets and removed twice a day. Then, they were placed in an oven (WSU 400, Germany) with air recirculation for 1 h at 60 °C. They were ground in a hammer mill with parallel blades, at 1 mm of size. Samples were stored at room temperature ( $26 \pm 2$  °C) in amber bottles to avoid decomposition of the active substances due to light. To prepare the mixed powder, the dry product obtained from leaves was taken and 40 % of *A. occidentale*, 20 % of *P. guajava*, 20 % of *M. oleifera* and 20 % of *M. citrifolia* were mixed, according to the results of the phytochemical screening performed by Más *et al.* (2017).

*Diets, animals and treatments.* A total of 120 White Leghorn laying hens (Hybrid L-33), 27 weeks of age, were placed, for 10 weeks, according to a completely randomized design with three treatments, 10 repetitions per treatment and four animals per repetition. The experimental treatments consisted of a basal diet (T1) and the addition of 0.5 (T2) and 1.0 % (T3) of mixed powder of leaves of medicinal plants (40 % *A. occidentale*, 20 % *P. guajava*, 20 % of *M. oleifera* and 20 % of *M. citrifolia*). The results of Rosabal *et al.* (2017) and Aroche *et al.* (2018) were considered to select the

sombra, en planchas de cartón perforadas y se removieron dos veces por día. Seguidamente se depositaron en una estufa (WSU 400, Alemania) con recirculación de aire durante 1 h a 60 °C. Luego se trituraron en un molino de martillo de cuchillas paralelas, a 1 mm de tamaño de partículas. Las muestras se conservaron a temperatura ambiente ( $26 \pm 2$  °C) en frascos ámbar para evitar la descomposición de las sustancias activas por acción de la luz. Para la elaboración del polvo mixto se tomó el producto seco obtenido de las hojas y se mezcló 40 % de *A. occidentale*, 20 % de *P. guajava*, 20 % de *M. oleifera* y 20 % de *M. citrifolia*, según los resultados del tamizaje fitoquímico realizado por Más *et al.* (2017).

*Dietas, animales y tratamientos.* Un total de 120 gallinas ponedoras White Leghorn (Híbrido L-33) de 27 semanas de edad, se ubicaron durante 10 semanas, según diseño totalmente aleatorizado con tres tratamientos, 10 repeticiones por tratamiento y cuatro aves por repetición. Los tratamientos experimentales consistieron en una dieta basal (T1) y la adición de 0.5 (T2) y 1.0 % (T3) del polvo mixto de hojas de plantas medicinales (40 % de *A. occidentale*, 20 % de *P. guajava*, 20 % de *M. oleifera* y 20 % de *M. citrifolia*). Se consideraron los resultados de Rosabal *et al.* (2017) y Aroche *et al.*

Table 1. Composition and contribution of the diet of laying hens (27-37 weeks)

Ingredients	Inclusion level, %
Corn meal	67.70
Soy cake meal	21.00
Salt	00.33
DL-methionine	00.10
Monocalcium phosphate	01.34
Calcium carbonate	09.16
Choline chloride	00.07
Premix <sup>1</sup>	00.30
Calculated contribution (%)	
ME (MJ/kg)	11.64
CP	15.50
Ca	03.80
Total P	00.66
Available P	00.40
Lysine	00.73
Methionine	00.33
Methionine+cystine	00.61
Tryptophan	00.20
Threonine	00.56
Ether extract	01.67
Linoleic acid	00.80
Crude fiber	02.40

<sup>1</sup>Each kg contains: Vit. A  $10 \times 10^6$  IU; vit. D<sup>3</sup>  $1.5 \times 10^6$  IU; vit. K<sub>3</sub> 2,100 mg; vit. E 10,000 mg; thiamine 800 mg; riboflavin 2,500 mg; pantothenic acid 10,000 mg; pyridoxine 2,500 mg; folic acid 250 mg; biotin 100 mg; vit. B<sub>12</sub> 15 mg; manganese 60,000 mg; copper 8,000 mg; iron 60,000 mg; zinc 50,000 mg; selenium 200 mg; iodine 800 mg; cobalt 500 mg; antioxidant 125,000 mg.

addition levels of mixed medicinal plant powder. In addition, the nutritional requirements recommended by UECAN (2007) were used for formulating the basal diet (table 1).

*Experimental conditions.* The experimental unit consisted of a 40 x 40 cm metal cage, where four hens were housed. The animals received 110 g of feed/hen/day. Water was supplied ad libitum through a nipple per cage and 16 hours of lighting was provided each day. The experiment had an adaptation of 14 d (Martínez *et al.* 2012). During the experimental stage, the birds were not given any medication or therapeutic veterinary care.

*Productive indicators.* Laying hens were weighed individually at 27 and 37 weeks of age on a SARTORIUS digital scale, BL 1500 model, with precision  $\pm 0.10$  g. Egg weight was recorded weekly at 25 eggs/treatment, between 8:30 to 9:30 a.m. and mean weight was calculated. To determine laying intensity, total egg production/week/treatment was considered and one egg/day/housed bird was assumed as 100 %. Mass conversion was calculated considering the feed consumed, egg weight per repetition and the number of laid eggs. Viability of hens was computed at the end of the experiment. The percentage of unsuitable eggs (cracked, shell-less, broken and dirty eggs) was calculated by the formula:

$$\% \text{ Unsuitable Eggs (UE), } \% \text{ UE} = \frac{\% \text{ UE} = \text{UE} * 100}{\text{Good eggs}}$$

*External and internal quality of eggs.* In week 37, 30 eggs/treatment were sampled to determine their external and internal quality indicators. Egg weight was determined with an OHAUS® (China) digital scale, with  $\pm 0.01$  g of precision.

The following formula was used for calculating shape index (SI):

$$SI = \frac{\text{Minimum diameter}}{\text{Maximum diameter}} * 100$$

To measure shell thickness at the equator and at upper and lower poles of the egg, a Russian-made caliper was used, with an accuracy of  $\pm 0.01$  mm. Shell surface was determined by Carter's (1975) formula:

$$\text{Area} = 3.9782 * \text{Egg weight}^{0.7056}$$

Albumin and yolk height was measured with a height caliper with an accuracy of  $\pm 0.01$  mm. Yolk color was determined by Roche color fan of 15 colors (Odunsi 2003). The records of Haugh units (HU) were calculated by the relationship between egg weight (W) and albumin height (H) using the formula: (Rosabal *et al.* 2017).

$$HU = 100 * \log (h - 1.7W^{0.37} + 7.6)$$

*Statistical analysis.* Data was processed using simple classification analysis of variance (ANOVA), in a completely randomized design. In necessary cases,

(2018) para seleccionar los niveles de adición del polvo mixto de plantas medicinales. Además, se utilizaron los requerimientos nutricionales recomendados por la UECAN (2007) para formular la dieta basal (tabla 1).

*Condiciones experimentales.* La unidad experimental consistió en una jaula metálica de 40 x 40 cm, donde se alojaron cuatro gallinas. Las aves recibieron 110 g de alimento/gallina/día. El agua se suministró ad libitum a través de un niple/jaula y se ofertó 16 horas de iluminación cada día. El experimento tuvo una adaptación de 14 d (Martínez *et al.* 2012). Durante la etapa experimental, las aves no recibieron ningún medicamento ni atención veterinaria terapéutica.

*Indicadores productivos.* Las gallinas ponedoras se pesaron de forma individual a las 27 y 37 semanas de edad en una balanza digital SARTORIUS, modelo BL 1500, con precisión  $\pm 0.10$  g. El peso del huevo se registró semanalmente a 25 huevos/tratamiento, entre las 8:30 a 9:30 a.m. y se calculó el peso promedio. Para determinar la intensidad de puesta, se consideró la producción total de huevos/semana/tratamiento y se asumió como 100 % un huevo/día/ave alojada. La conversión masal se calculó teniendo en cuenta el alimento consumido, peso del huevo por repetición y el número de huevos puestos. Se computó la viabilidad de las aves al finalizar el experimento. El porcentaje de los huevos no aptos (cascados, fáfara, rotos y sucios) se calculó por la fórmula:

$$\% \text{ Huevos no aptos (HNA), } \% \text{ HNA} = \frac{\text{HNA} * 100}{\text{Huevos aptos}}$$

*Calidad externa e interna del huevo.* En la semana 37 se muestrearon 30 huevos/tratamiento para determinar los indicadores de calidad externa e interna del huevo. El peso del huevo se determinó con una balanza digital OHAUS® (China), con precisión de  $\pm 0.01$  g.

Para calcular el índice de forma (IF), se utilizó la fórmula:

$$IF = \frac{\text{Diámetro mayor}}{\text{Diámetro menor}} * 100$$

huevo, superior e inferior, se utilizó un pie de rey de fabricación rusa, con precisión de  $\pm 0.01$  mm. La superficie de la cáscara se determinó por la fórmula de Carter (1975):

$$\text{Área} = 3.9782 * \text{Peso del huevo}^{0.7056}$$

La altura de la clara densa y de la yema se midió con un calibrador de altura con una exactitud de  $\pm 0.01$  mm. El color de la yema se determinó por el abanico de Roche de 15 colores (Odunsi 2003). Los registros de las unidades Haugh (UH) se calcularon por la relación entre el peso del huevo (W) y la altura de la clara densa (H) mediante la fórmula:

$$UH = 100 * \log (h - 1.7W^{0.37} + 7.6)$$

*Análisis estadísticos.* Los datos se procesaron mediante análisis de varianza (ANOVA) de clasificación simple, en un diseño totalmente aleatorizado. En los casos necesarios,

Duncan (1955) test was applied to determine multiple differences between means, according to the SPSS version 23.0 statistical program. The percentage of unsuitable eggs (cracked, dirty, broken and egg-shell) was analyzed by comparison of proportions using the COMPARPRO 1.0 program (Font *et al.* 2007).

### Results and Discussion

Table 2 shows the effect of mixed leaf powder of *A. occidentale* (40 %), *P. guajava* (20 %), *M. citrifolia* (20 %) and *M. oleifera* (20 %) on the growth performance of laying hens. (27 to 37 weeks). Viability, body weight (initial and final), egg weight and dirty and shelled eggs did not show differences ( $P>0.05$ ) among experimental treatments. However, the addition of 1.0 % of the mixed powder of medicinal plant decreased the percentage of cracked eggs and improved laying intensity and mass conversion ( $P<0.05$ ) compared to the other treatments. The birds, in all treatments, consumed 100 % of the feed provided and no broken eggs were found.

se aplicó la décima de Duncan (1955) para determinar las diferencias múltiples entre medias, según el programa estadístico SPSS versión 23.0. El porcentaje de huevos no aptos (cascados, rotos sucios y en f rfara) se analizó por comparación de proporciones mediante el programa COMPARPRO 1.0 (Font *et al.* 2007).

### Resultados y discusión

La tabla 2 muestra el efecto del polvo mixto de hojas de *A. occidentale* (40 %), *P. guajava* (20 %), *M. citrifolia* (20 %) y *M. oleifera* (20 %) en el comportamiento productivo de gallinas ponedoras (27 a 37 semanas). La viabilidad, peso vivo (inicial y final), peso del huevo y los huevos sucios y en f rfara no mostraron diferencias ( $P>0.05$ ) entre los tratamientos experimentales. Sin embargo, la adición de 1.0 % del polvo mixto de plantas medicinales disminuyó el porcentaje de huevos cascados y mejoró la intensidad de puesta y la conversión masal ( $P<0.05$ ) comparado con los otros tratamientos. Las aves en todos los tratamientos consumieron 100 % del alimento suministrado y no se encontraron huevos rotos.

Table 2. Phytobiotic effect of mixed powder from leaves of medicinal plants on the productive performance of laying hens (27 to 37 weeks)

Indicators	Experimental treatments			SE $\pm$	P value
	Control	0.5 %	1.0 %		
Initial body weight, g	1638.00	1593.00	1650.00	23.20	0.0603
Laying intensity, %	80.18 <sup>b</sup>	81.18 <sup>b</sup>	85.53 <sup>a</sup>	00.93	0.0011
Egg weight, g	53.80	53.21	53.74	00.27	0.1903
Feed intake, g/bird/d	115.00	115.00	115.00		
Mixed powder intake	0.00	0.55	1.10		
<i>A. occidentale</i> intake, g/animal/d	0.00	0.22	0.44		
<i>P. guajava</i> intake, g/animal/d	0.00	0.11	0.22		
<i>M. citrifolia</i> intake, g/animal/d	0.00	0.11	0.22		
<i>M. oleifera</i> intake, g/ animal /d	0.00	0.11	0.22		
Mass conversion, kg/kg	2.73 <sup>a</sup>	2.71 <sup>a</sup>	2.52 <sup>b</sup>	00.03	0.0015
Cracked eggs, %	0.22 <sup>a</sup>	0.18 <sup>a</sup>	0.08 <sup>b</sup>	00.01	0.0014
Shell-less eggs, %	0.09	0.00	0.04	00.03	0.1009
Dirty eggs, %	0.45	0.48	0.38	00.03	0.7004
Final body weight, g	1667.00	1648.0	1656.00	25.31	0.2605

<sup>a,b</sup> Means with different letters in the same line, differ at  $P<0.05$ , Duncan (1955)

Poultry viability (100 %) demonstrated the safety of mixed powder used during the 70 experimental days. Similar results were reported by Martínez *et al.* (2020), Rabelo-Ruiz *et al.* (2021) and Ruesga-Gutiérrez *et al.* (2022), who demonstrated that phytobiotic additives used in small concentrations do not cause morbidity and mortality in birds. Likewise, increasing levels of the medicinal mixed powder did not modify feed intake, previously verified by Más *et al.* (2015) and Rosabal *et al.* (2017) when they used up to 1.0 % of the leaf powder of *A. occidentale* and *M. citrifolia*, respectively in the diets for laying hens.

La viabilidad de las aves (100 %) demostró la inocuidad del polvo mixto empleado durante los 70 d experimentales. Similares resultados informaron Martínez *et al.* (2020), Rabelo-Ruiz *et al.* (2021) y Ruesga-Gutiérrez *et al.* (2022), quienes informaron que los aditivos fitobióticos utilizados en pequeñas concentraciones no provocan morbimortalidad en las aves. Asimismo, los niveles crecientes del polvo mixto medicinal no modificaron el consumo de alimento, anteriormente comprobado por Más *et al.* (2015) y Rosabal *et al.* (2017) cuando utilizaron hasta 1.0 % del polvo de hojas de *A. occidentale* y *M. citrifolia*,

Likewise, the results of hen weight, egg weight and the percentage of shell-less and dirty eggs could be due to the fact that the secondary metabolites of the plants for the mixed powder did not cause symptoms related to anti-nutritional factors (table 2). As reported by Savón *et al.* (2007) and Ni *et al.* (2016) an excess of anti-nutritional factors can decrease body weight, productive behavior, absorption of amino acids (mainly sulfur) and shell thickness. However, the mixed powder of medicinal plants (1 %) reduced cracked eggs by 0.14 % compared to the control (table 2). Mosayyeb *et al.* (2023) found a lower percentage of unsuitable eggs when using phytobiotics in the diets of laying hens. These authors inferred that this effect was a result of the improvement of intestinal health and nutrient absorption.

Laying intensity increased ( $P < 0.05$ ) with the supplementation of 1.0 % of the medicinal mixed powder, demonstrating that small concentrations of these medicinal powders, rich in secondary metabolites, promote egg production (5.35 %) in hens at full peak of posture. In this sense, Más *et al.* (2017) identified metabolites responsible for biological activity such as triterpenes, steroids, saponins, coumarins, quinones and anthocyanidins in the mixture of *A. occidentale* (40 %), *P. guajava* (20 %), *M. oleifera* (20 %) and *M. citrifolia* (20 %).

Salazar *et al.* (2017) reported that inclusion of 1.0 % of the mixture of *P. guajava* (40 %), *M. oleifera* (20 %), *A. occidentale* (20 %) and *M. citrifolia* (20 %) increased egg production at 3.75 %, although without modifying the other productive indicators. Kong *et al.* (2006) found that the dietary use of a mixture of several Chinese medicinal plants improved productivity and immune status of broilers, the authors demonstrated the synergy of the chemical compounds in this phytobiotic product researched. Likewise, Chen *et al.* (2003) reported that the mixture of medicinal plants (synergistic effect) improved cellular immunity and productivity in fast-growing birds. It should be considered that the secondary metabolites identified in the leaves of the medicinal mixed powder have antioxidant, anti-inflammatory and antimicrobial properties (Rafeeq *et al.* 2023), which had a positive effect on animal response.

Also, the inclusion of 1.0 % of the mixed powder of medicinal plants promoted productive efficiency (mass conversion), due to the increase in egg production, with equal feed intake among treatments (table 2). According to Hidayat *et al.* (2021), extracts or bioactive compounds from plants used in animal feed have an anti-inflammatory and antimicrobial effect, which modifies intestinal permeability and villi structure and, consequently, increases productive efficiency of birds.

Saleh *et al.* (2019) recommended the use of phytochemical products to improve productivity,

respectivamente en las dietas para gallinas ponedoras.

De igual forma, los resultados del peso de las aves, peso del huevo y los huevos rotos, sucios y en fáfara se podrían deber a que los metabolitos secundarios de las plantas para conformar el polvo mixto, no provocaron síntomas relacionados con factores antinutricionales (tabla 2). Según lo informado por Savón *et al.* (2007) y Ni *et al.* (2016) un exceso de factores antinutricionales se puede disminuir el peso corporal, el comportamiento productivo, la absorción de aminoácidos (principalmente azufrados) y el grosor de la cáscara. No obstante, el polvo mixto de plantas medicinales (1.0 %) redujo los huevos cascados en 0.14 % con relación al control (tabla 2). Mosayyeb *et al.* (2023) encontraron menor porcentaje de huevos no aptos al utilizar fitobióticos en las dietas de gallinas ponedoras. Estos autores justificaron dicho efecto al mejoramiento de la salud intestinal y la absorción de los nutrientes.

La intensidad de puesta incrementó ( $P < 0.05$ ) con la suplementación de 1.0 % del polvo mixto medicinal, lo que demuestra que pequeñas concentraciones de estos polvos medicinales ricos en metabolitos secundarios promueven la producción de huevos (5.35 %) en gallinas en pleno pico de postura. En este sentido, Más *et al.* (2017) identificaron en la mezcla de *A. occidentale* (40 %), *P. guajava* (20 %), *M. oleifera* (20 %) y *M. citrifolia* (20 %), metabolitos responsables de actividad biológica como triterpenos, esteroides, saponinas, cumarinas, quinonas y antocianidinas.

Salazar *et al.* (2017) informaron que la inclusión de 1.0 % de la mezcla de *P. guajava* (40 %), *M. oleifera* (20 %), *A. occidentale* (20 %) y *M. citrifolia* (20 %) incrementó la producción de huevos en 3.75 %, aunque sin modificar los otros indicadores productivos. Kong *et al.* (2006) encontraron que el uso dietético de una mezcla de varias plantas medicinales chinas mejoró la productividad y el estatus inmune de los pollos de ceba, los autores demostraron la sinergia de los compuestos químicos en este producto fitobiótico investigado. Asimismo, Chen *et al.* (2003) informaron que la mezcla de plantas medicinales (efecto sinérgico) mejoró la inmunidad celular y la productividad de aves de crecimiento rápido. Se debe considerar que los metabolitos secundarios identificados en las hojas del polvo mixto medicinal tienen propiedades antioxidantes, antiinflamatorios y antimicrobianas (Rafeeq *et al.* 2023), lo que tuvo un efecto positivo en la respuesta animal.

La inclusión de 1.0 % del polvo mixto de plantas medicinales promovió la eficiencia productiva (conversión masal), debido al incremento de la producción de huevos, con igual consumo de alimento entre tratamientos (tabla 2). Según Hidayat *et al.* (2021), los extractos o compuestos bioactivos de plantas usadas en la alimentación animal tienen efecto antiinflamatorio y antimicrobiano, lo que modifica la permeabilidad intestinal y la estructura de las vellosidades y por ende incrementa la eficiencia productiva de las aves.

Saleh *et al.* (2019) recomendaron el empleo de

immune activity and ovarian development in laying hens. However, Ghasemi *et al.* (2010) found no changes in mass conversion when they used a mixture of garlic and thymol.

Table 3 shows that the experimental diets did not modify ( $P>0.05$ ) the external and internal quality of eggs of laying hens (37 weeks). According to Martínez *et al.* (2020), different effects can be elucidated when medicinal plants are used orally, because it will depend on the chemical structure of secondary metabolites, their concentration and addition level in poultry diets. Thus, eggshell thickness and surface area did not change due to the effect of experimental diets ( $P>0.05$ ). This shows that the phytobiotic used up to 1.0 % does not affect the absorption of calcium, phosphorus or other minerals. However, studies by Salazar *et al.* (2017) showed that the inclusion of 1.0 % of a medicinal mixed powder increased eggshell thickness in laying hens.

productos fitoquímicos para mejorar la productividad, la actividad inmune y el desarrollo ovárico en gallinas ponedoras. Sin embargo, Ghasemi *et al.* (2010) no encontraron cambios en la conversión masal cuando utilizaron una mezcla de ajo y timol.

La tabla 3 muestra que las dietas experimentales no modificaron ( $P>0.05$ ) la calidad externa e interna del huevo de gallinas ponedoras (37 semanas). Según Martínez *et al.* (2020), diferentes efectos pueden ser dilucidados cuando se utilizan oralmente las plantas medicinales, porque dependerá de la estructura química de los metabolitos secundarios, su concentración y nivel de adición en las dietas de las aves. Así, el grosor y la superficie de la cáscara del huevo no cambió debido al efecto de las dietas experimentales ( $P>0.05$ ). Esto demuestra que el fitobiótico utilizado hasta 1.0 % no afecta la absorción del calcio, fósforo u otros minerales. Sin embargo, estudios de Salazar *et al.* (2017) mostraron que la inclusión de 1.0 % de un polvo mixto medicinal incrementó el grosor de la cáscara

Table 3. Effect of dietary supplementation of mixed powder of leaves of medicinal plants on the external and internal quality of the egg of laying hens (37 weeks)

Indicators	Experimental treatments			SE±	P value
	0 %	0.5 %	1.0 %		
Egg weight, g	59.40	62.20	58.40	1.26	0.1291
Shape index, %	74.48	76.41	73.18	1.50	0.3475
Eggshell weight, g	7.80	7.92	8.06	0.34	0.8661
Eggshell thickness, mm	0.27	0.26	0.27	0.01	0.8046
Eggshell surface area, cm <sup>2</sup>	47.28	48.83	46.72	0.70	0.1275
Dense white height, mm	6.19	6.28	6.32	0.10	0.6748
Yolk height, mm	7.35	7.29	7.39	0.14	0.8829
Haugh units	78.21	77.90	79.43	0.83	0.4172
Yolk color	6.00	6.00	6.00		

The secondary metabolites present in the medicinal mixed powder did not modify ( $P>0.05$ ) the albumin height and the Haugh units (table 3). This structure of the egg depends on the balance of amino acids to form albumin proteins, such as albumin, conalbumin, ovomucin and lysozyme.

The deficiency of essential amino acids reduces albumin height and Haugh units (Ullah *et al.* 2022). Salazar *et al.* (2017) and Martínez *et al.* (2022) found no changes in albumen height and Haugh units when they used up to 1.0 % of a mixed powder of medicinal plants and *P. guajava* leaf powder in laying hens, respectively. The groups with the phytobiotic did not modify yolk height, apparently, the secondary metabolites to make up the medicinal powder did not alter the metabolism of lipids, rich in this structure of the egg, although other studies are necessary to verify this hypothesis. Other experiments with phytobiotics in hens indicated a similar effect (Más *et al.* 2015 and Salazar *et al.* 2017).

del huevo de gallinas ponedoras.

Los metabolitos secundarios presentes en el polvo mixto medicinal no modificaron ( $P>0.05$ ) la altura del albumen y las unidades Haugh (tabla 3). Esta estructura del huevo depende del equilibrio de los aminoácidos para formar las proteínas del albumen, como albúmina, conalbumina, ovomucina y lisozima.

El déficit de aminoácidos esenciales reduce la altura del albumen y las unidades Haugh (Ullah *et al.* 2022). Salazar *et al.* (2017) y Martínez *et al.* (2022) no encontraron cambios en la altura del albumen y las unidades Haugh cuando utilizaron hasta 1.0 % de un polvo mixto de plantas medicinales y del polvo de hojas de *P. guajava* en gallinas ponedoras, respectivamente.

Los grupos con el fitobiótico no modificaron la altura de la yema, al parecer, los metabolitos secundarios en las plantas para conformar el polvo medicinal no alteraron el metabolismo de los lípidos, rico en esta estructura del huevo, aunque son necesarios otros estudios para comprobar esta hipótesis. Otros experimentos con

This phytobiotic derived from a mixture of medicinal plants did not modify yolk color. All experimental groups indicated the same feed intake and, therefore, of yellow corn, rich in zeaxanthin (tables 1 and 2), as the main pigment in the diet (Calvo-Brenes and O'Hare 2020). However, Más *et al.* (2015) reported that the supplementation of *A. occidentale* and *M. citrifolia* leaf powder pigmented the egg yolk, compared to the control treatment, due to the presence of anthocyanidins. Apparently, the low level of inclusion of these medicinal plants in the mixture, or perhaps a possible antagonism of several secondary metabolites in the mixed powder, inhibited the action of this natural dye. Other studies are necessary to elucidate this possible antagonism.

### Conclusions

It is concluded that the addition of 1 % of mixed powder of medicinal plants in diets for laying hens improves the growth performance such as laying intensity and mass conversion and decreases the percentage of cracked eggs without affecting egg quality.

#### Conflict of interests

The authors declare that there is no conflict of interest among them.

#### Contribution of authors

R. Rodríguez: Conceptualization, Investigation, Data curation, Formal analysis, Methodology, Writing of the original draft

R. Aroche: Data Curation

Dalilis Donatién: Data Curation

Y. Martínez: Conceptualization, Investigation, Data curation, Formal analysis, Methodology, Writing of the original draft

fitobióticos en gallinas indicaron un efecto similar (Más *et al.* 2015 y Salazar *et al.* 2017).

Este fitobiótico derivado de una mezcla de plantas medicinales no modificó el color de la yema. Todos los grupos experimentales indicaron el mismo consumo de alimento y por ende de maíz amarillo rico en zeaxantina (tablas 1 y 2), como el principal pigmentante de la dieta (Calvo-Brenes y O'Hare 2020). Sin embargo, Más *et al.* (2015) refirieron que la suplementación del polvo de hojas de *A. occidentale* y *M. citrifolia* pigmentó la yema del huevo, con respeto al tratamiento control, debido a la presencia de antocianidinas. Al parecer, el menor nivel de inclusión de estas plantas medicinales en la mezcla, o quizás un posible antagonismo de varios metabolitos secundarios en el polvo mixto, inhibió la acción de este colorante natural. Otros estudios son necesarios para dilucidar este efecto.

### Conclusiones

Se concluye que la adición de 1.0 % del polvo mixto de plantas medicinales en dietas para gallinas ponedoras mejora la intensidad de puesta y la conversión masal y disminuye el porcentaje de huevos cascados, sin afectar la calidad externa e interna del huevo.

#### Conflicto de intereses

Los autores declaran que no existe conflicto de intereses entre ellos.

#### Contribución de los autores

R. Rodríguez: Conceptualización, Investigación, Curación de datos, Análisis formal, Metodología, Redacción del borrador original.

R. Aroche: Curación de datos

Dalilis Donatién: Curación de datos

Y. Martínez: Conceptualización, Investigación, Curación de datos, Análisis formal, Metodología, Redacción del borrador original.

### References

- Aroche, R., Martínez, Y., Ruan, Z., Guan, G., Waititu, S., Nyachoti, C. M., Más, D. & Shile L. 2018. "Dietary inclusion of a mixed powder of medicinal plant leaves enhances the feed efficiency and immune function in broiler chickens". *Journal of Chemistry*, 2018(394): 1-6, ISSN: 2090-9071. <https://doi.org/10.1155/2018/4073068>.
- Burnett, E., Ishida, M., De Janon, S., Naushad, S., Duceppe, M.O., Gao, R. & Vinueza-Burgos, C. 2021. "Whole-genome sequencing reveals the presence of the bla CTX-M-65 Gene in Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase-producing and multi-drug-resistant clones of *Salmonella serovar* Infantis isolated from broiler chicken environments in the Galapagos islands". *Antibiotics*, 10(3): 267, ISSN: 0021-8820. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10030267>.
- Calvo-Brenes, P. & O'Hare, T. 2020. "Effect of freezing and cool storage on carotenoid content and quality of zeaxanthin-biofortified and standard yellow sweet-corn (*Zea mays* L.)". *Journal of Food Composition and Analysis*, 86(3): 103353, ISSN: 0889-1575. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2019.103353>.
- Carter T.C. 1975. "The hen's egg: Estimation of shell superficial area and egg volume using measurement of fresh egg weight and breadth alone or in combination". *British Poultry Science*, 16: 541-543, ISSN: 1466-1799. <https://doi.org/10.1080/00071667508416224>.
- Chen, H.L., Li, D.F., Chang, B.Y., Gong, L.M., Dai, J.G. & Yi, G.F. 2003. "Effects of Chinese herbal polysaccharides on the immunity and growth performance of young broilers". *Poultry Science*, 82(3): 364-370, ISSN: 0032-5791. <https://doi.org/10.1093/ps/82.3.364>.
- Duncan, B. 1955. "Multiple ranges and multiple F test". *Biometrics*, 11(3): 1-42, ISSN: 1541-0420. <https://doi.org/10.2307/3001478>.
- Evangelista, A.G., Corrêa, J.A.F., Pinto, A.C.S.M. & Luciano, F.B. 2022. "The impact of essential oils on antibiotic use in animal production regarding antimicrobial resistance—a review". *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 62(19):



- 5267-5283, ISSN: 1549-7852. <https://doi.org/10.1080/10408398.2021.1883548>.
- Font, H., Noda, A., Torres, V., Herrera, M., Lizazo, D., Sarduy, L. & Rodríguez, L. 2007. "COMPARPRO: Comparación de Proporciones, Versión: 1.0". Departamento de Biomatemática, Instituto de Ciencia Animal, San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba.
- Ghasemi, R., Zarei, M. & Torki, M. 2010. "Adding medicinal herbs including garlic (*Allium sativum*) and thyme (*Thymus vulgaris*) to diet of laying hens and evaluating productive performance and egg quality characteristics". American Journal of Animal and Veterinary Sciences, 5(2): 151-154, ISSN: 1557-4563. <https://doi.org/10.3844/ajavsp.2010.151.154>.
- Hidayat, R., Yunianto, V. D., Sukamto, B. & Sugiharto, S. 2021. "Effect of dietary supplementation of probiotic, phytobiotics or their combination on performance, blood indices and jejunal morphology of laying hens during post peak production". Online Journal of Animal and Feed Research, 11(1): 8-12, ISSN: 2228-7701. <https://dx.doi.org/10.51227/ojafr.2021.2>.
- Khan, S., Moore, R. J., Stanley, D. & Chousalkar, K.K. 2020. "The gut microbiota of laying hens and its manipulation with prebiotics and probiotics to enhance gut health and food safety". Applied and Environmental Microbiology, 86(13): e00600-20, ISSN: 0099-2240. <https://doi.org/10.1128/AEM.00600-20>.
- Kim, G.-B., Seo, Y.M., Kim, C.H. & Paik, I.K. 2011. "Effect of dietary prebiotic supplementation on the performance, intestinal microflora, and immune response of broilers". Poultry Science, 90: 75-82, ISSN: 0032-5791. <https://doi.org/10.3382/ps.2010-00732>.
- Kong, X. F., Hu, Y.L., Yin, Y.L., Wu, G.Y., Rui, R., Wang, D.Y. & Yang, C.B. 2006. "Chinese herbal ingredients are effective immune stimulators for chickens infected with the Newcastle disease virus". Poultry Science, 85(12): 2169-2175, ISSN: 0032-5791. <https://doi.org/10.1093/ps/85.12.2169>.
- Martínez, Y., Escalona, A., Martínez, O., Olmo, C., Rodríguez, R., Iser, M., Betancur, C., Valdiviá, M. & Liu, G. 2012. "The use of *Anacardium occidentale* as nutraceutical in hypoprotein diets for laying hens". Cuban Journal of Agricultural Science, 46(4): 395-401, ISSN: 2079-3480.
- Martínez, Y., Rodríguez, R., Pupo, G.E., Rosabal, O., Olmo, C. & Valdiviá, M. 2020. "Phytobiotic effect of *Psidium guajava* leaves powder on egg productivity and quality of laying hens". Cuban Journal of Agricultural Science, 54(4): 1-12, ISSN: 2079-3480.
- Más, D., Martínez, Y., Rodríguez, B., Pupo, G., Rosabal, O. & Olmo, G. 2017. "Análisis preliminar de los metabolitos secundarios de polvos mixtos de hojas de plantas medicinales". Revista Cubana de Plantas Medicinales, 22(1): 1-9, ISSN: 1028-4796.
- Más, D., Martínez, Y., Rodríguez, R., Betancur, C. & Rosabal, O. 2015. "Effect of dietary supplementation with *Morinda citrifolia* on productivity and egg quality of laying hens". Ciencia y Agricultura, 12(2): 7-12, ISSN: 0122-8420. <http://dx.doi.org/10.19053/01228420.4348>.
- Mosayyeb, A., Mirghelenj, S.A., Hasanlou, P. & Shakouri Alishah, H. 2023. "Effects of pennyroyal (*Mentha pulegium* L.) supplementation on production performance, egg quality traits, and biochemical parameters of blood and egg in laying hens at later stages of the production period". Veterinary Medicine and Science, 9(1): 242-251, ISSN: 2053-1095. <https://doi.org/10.1002/vms3.1031>.
- Ni, H., Martínez, Y., Guan, G., Rodríguez, R., Más, D. & Liu, G. 2016. "Analysis of the impact of isoquinoline alkaloids, derived from *Macleaya cordata* extract, on the development and innate immune reaction in swine and poultry". BioMed Research International, 2016(11): 1-7, ISSN: 2314-6133. <https://doi.org/10.1155/2016/1352146>.
- Odunsi, A.A. 2003. Assessment of Lablab (*Lablab purpureus*) leaf meal as a feed ingredient and yolk colouring agent in the diet of layers. International Journal of Poultry Science, 2(1):71-74. ISSN: 1682-8356. <https://citeseerx.ist.psu.edu/document?repid=rep1&type=pdf&doi=484feebc56b8f970f0acc27e4d75a7f6bdd45758>
- Olmo, C., Martínez, Y., Rodríguez, R., Rosabal, O., Pupo, G., Más, D., Donatién, D., Fonseca, R., Hidalgo, G. & Aguilar, N. 2013. Efecto promotor del polvo de hojas de *Moringa oleifera* en la producción y calidad del huevo de gallinas White Leghorn L-33. Taller de Generalización Avícola. Granma, Cuba.
- Rabelo-Ruiz, M., Ariza-Romero, J. J., Zurita-González, M.J., Martín-Platero, A.M., Baños, A., Maqueda, M. & Peralta-Sánchez, J.M. 2021. "Allium-based phytobiotic enhances egg production in laying hens through microbial composition changes in ileum and cecum". Animals, 11(2): 448, ISSN: 2076-2615. <https://doi.org/10.3390/ani11020448>.
- Rafeeq, M., Bilal, R.M., Batool, F., Yameen, K., Farag, M.R., Madkour, M. & Alagawany, M. 2023. "Application of herbs and their derivatives in broiler chickens: a review". World's Poultry Science Journal, 79(1): 1-23, ISSN: 0043-9339. <https://doi.org/10.1080/00439339.2022.2151395>.
- Rosabal, O., Martínez, Y., Rodríguez, R., Pupo, G., Olmo, C. & Más, D. 2017. "Efecto fitobiótico del polvo de hojas de *Anacardium occidentale* L. en las dietas de gallinas ponedoras". Revista Cubana de Plantas Medicinales, 22(1): 1-12, ISSN: 1028-4796.
- Ruesga-Gutiérrez, E., Ruvalcaba-Gómez, J. M., Gómez-Godínez, L.J., Villagrán, Z., Gómez-Rodríguez, V.M., Heredia-Nava, D. & Arteaga-Garibay, R.I. 2022. "Allium-based phytobiotic for laying hens' supplementation: effects on productivity, egg quality, and fecal microbiota". Microorganisms, 10(1): 117, ISSN: 2076-2607. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10010117>.
- Salazar, I., Martínez, Y., Rodríguez, R., Olmo, C., Aroche, R., Pupo, G., Rosabal, O. & Más, D. 2017. "Efecto de la suplementación dietética con polvo mixto de plantas medicinales en la productividad y calidad del huevo de gallinas ponedoras". Revista de Producción Animal, 29(3): 1-5, ISSN: 2224-7920.
- Saleh, A.A., Kirrella, A. A., Dawood, M. A. & Ebeid, T. A. 2019. "Effect of dietary inclusion of cumin seed oil on the performance, egg quality, immune response and ovarian development in laying hens under high ambient temperature". Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition, 103(6): 1810-1817, ISSN: 1439-0396. <https://doi.org/10.1111/jpn.13206>.
- Savón, L., Scull, I. & Martínez, M. 2007. "Integral foliage meals of three tropical legumes for poultry feeding. Chemical composition, physical properties and phytochemical screening". Cuban Journal of Agricultural Science, 41(1): 359-341,

ISSN: 2079-3480.

- Sharma, M.K., White, D.L., Singh, A. K., Liu, H., Tan, Z., Peng, X. & Kim, W.K. 2022. "Effect of dietary supplementation of probiotic *Aspergillus niger* on performance and cecal microbiota in Hy-Line W-36 laying Hens". *Animals*, 12(18): 2406, ISSN: 2076-2615. <https://doi.org/10.3390/ani12182406>.
- Torres, A., Sartor, C., Higgins, S., Wolfenden, A. D., Bielke, L., Pixley, C., Sutton, L., Tellez, G. & Hargis, B. 2005. " Effect of *Aspergillus* meal prebiotic (Fermacto) on performance of broiler chickens in the starter phase and fed low protein diets". *The Journal of Applied Poultry Research*, 14: 665–669, ISSN: 1537-0437. <https://doi.org/10.1093/japr/14.4.665>.
- UECAN (Unión de Empresas del Centro Avícola Nacional). 2007. *Aportes de los piensos avícolas*. Ed. Ministerio de la Agricultura. La Habana, Cuba.
- Ullah, S., Ditta, Y.A., King, A. J., Pasha, T.N., Mahmud, A. & Majeed, K.A. 2022. "Varying isoleucine level to determine effects on performance, egg quality, serum biochemistry, and ileal protein digestibility in diets of young laying hens". *PloS One*, 17(1): e0261159, ISSN: 1932-6203. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0261159>.
- Vlaicu, P.A., Panaite, T.D. & Turcu, R.P. 2021. "Enriching laying hens' eggs by feeding diets with different fatty acid composition and antioxidants". *Scientific Reports*, 11(1): 20707, ISSN: 2045-2322. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-00343-1>.
- Wasilewski, A., Zielińska, M., Storr, M. & Fichna, J. 2015. " Beneficial effects of probiotics, prebiotics, symbiotics, and psychobiotics in inflammatory bowel disease ". *Inflammatory Bowel Diseases*, 21(7): 1674-1682, ISSN: 1536-4844. <https://doi.org/10.1097/MIB.0000000000000364>.