

Phytobiotic effect of *Psidium guajava* leaf powder on productivity and quality of the egg of laying hens

Efecto fitobiótico del polvo de hojas de *Psidium guajava* en la productividad y calidad del huevo de gallinas ponedoras

Y. Martínez¹, R. Rodríguez², G.E. Pupo², O. Rosabal², C. Olmo², and M. Valdiviá³

¹Departamento de Ciencia y Producción Agropecuaria, Escuela Agrícola Panamericana. Zamorano, Honduras

²Centro de Estudios de Producción Animal, Facultad de Ciencias Agrícolas, Universidad de Granma. Bayamo, Granma 21, Cuba

³Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio, La Habana, Cuba.

Email: rrodriguez@udg.co.cu

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

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

G. E. Pupo: <https://orcid.org/0000-0002-8016-8780>

O. Rosabal: <https://orcid.org/0000-0001-9736-1985>

C. Olmo: <https://orcid.org/0000-0003-3517-3721>

M. Valdiviá: <https://orcid.org/0000-0002-8858-0307>

In order to evaluate the phytobiotic effect of *Psidium guajava* (guava) leaf powder on the productivity and quality of the egg of laying hens, a phytochemical screening of the leaves under study was previously developed. A total of 160 White Leghorn L-33 hens, of 27 weeks old, were randomly distributed for 70 days in four treatments, with 10 repetitions each, and four hens per repetition. The treatments consisted on a control diet (T0) and the addition of 0.5 (T1), 1.0 (T2) and 1.5 % (T3) of *Psidium guajava* leaf powder. Saponins, reducing sugars, quinones, triterpenes, free amino acids, anthocyanidins, tannins and flavonoids (++) were detected in *P. guajava* leaves. The addition with 0.5 % of *P. guajava* leaf powder improved ($P < 0.05$) the mass conversion (2.41 kg/kg), the production (83.46 %) and the egg weight (54.75 g) compared to the control, without notable changes ($P > 0.05$) for the food intake and the unfit eggs. In addition, this treatment (0.5 %) increased the shell thickness (0.26 mm) and the yolk color (7). However, the addition of 1.5 of *P. guajava* decreased ($P < 0.05$) the height of the white (5.97 mm) with respect to T0. The shell surface and yolk height did not change as a result of the experimental treatments ($P > 0.05$). The addition of 0.5 % of *P. guajava* leaf powder to laying hen diets is recommended to improve productivity and some indicators of egg quality.

Key words: additive, laying hen (ave de postura), guava, biological response

The use of antibiotics as additives in animal feeding, especially in birds and pigs, was a common practice from the 50s of the last century. However, the alarming increase in resistance to antibiotics is currently a matter of concern for the scientific community, due to the problem that this causes in the treatment of infectious diseases (Más *et al.* 2015). Besides, the growth promoter antibiotics (GPA) can increase the number of resistant strains, as well as transfer crossed resistance to other microorganisms (Ljubojević *et al.* 2016). Despite restrictions on the use of GPAs in the European Union, many countries still use them regularly in poultry production (FAO 2016).

Para evaluar el efecto fitobiótico del polvo de hojas de *Psidium guajava* (guayaba) en la productividad y calidad del huevo de gallinas ponedoras, se desarrolló previamente un tamizaje fitoquímico a las hojas en estudio. Un total de 160 gallinas White Leghorn L-33, de 27 semanas de edad, se distribuyeron aleatoriamente durante 70 días en cuatro tratamientos, con 10 repeticiones cada uno, y cuatro gallinas por repetición. Los tratamientos consistieron en una dieta control (T0) y la adición de 0.5 (T1), 1.0 (T2) y 1.5 % (T3) del polvo de hojas de *Psidium guajava*. En las hojas de *P. guajava* se detectaron saponinas, azúcares reductores, quinonas, triterpenos, aminoácidos libres, antocianidinas, taninos y flavonoides (++)). La adición con 0.5% de polvo de hojas de *P. guajava* mejoró ($P < 0.05$) la conversión masal (2.41 kg/kg), la producción (83.46%) y el peso del huevo (54.75 g) en comparación con el control, sin cambios notables ($P > 0.05$) para el consumo de alimento y los huevos no aptos. Además, este tratamiento (0.5 %) incrementó el grosor de la cáscara (0.26 mm) y el color de la yema (7). No obstante, la adición de 1.5% de *P. guajava* disminuyó ($P < 0.05$) la altura de la clara (5.97 mm) con respecto a T0. La superficie de la cáscara y altura de la yema no cambiaron por efecto de los tratamientos experimentales ($P > 0.05$). Se recomienda la adición de 0.5% del polvo de hojas de *P. guajava* en las dietas de gallinas ponedoras para mejorar la productividad y algunos indicadores de la calidad de huevo.

Palabras clave: aditivo, ave de postura, guayaba, respuesta biológica.

La utilización de los antibióticos como aditivos en la alimentación animal, sobre todo en aves y cerdos fue una práctica común a partir de los años 50 del siglo pasado. Sin embargo, en la actualidad es motivo de preocupación para la comunidad científica el alarmante incremento de la resistencia a los antibióticos, debido al problema que esto supone en el tratamiento de las enfermedades infecciosas (Más *et al.* 2015). Además, los antibióticos promotores de crecimiento (APC) pueden aumentar el número de cepas resistentes, así como transferir resistencias cruzadas a otros microorganismos (Ljubojević *et al.* 2016). A pesar de las restricciones del uso de los APC en la Unión Europea, todavía muchos países los utilizan regularmente en la

The current alternatives to the use of antibiotics are natural products (Vinus *et al.* 2018). In the poultry industry, prebiotics, probiotics and phytobiotics have been researched with the objective of improving health status, reducing pathogenic microorganisms and modulating a better immune response (Markowiak and Śliżewska 2018). Plant additives are considered an alternative to replace antibiotics, from the technical, economic and biological point of view, due to the safety of their inclusion and their null residuality (Castillo-López *et al.* 2017). Many benefits of medicinal plant powders have been reported in birds, such as the increase of nutrient digestibility, immune stability, competitive exclusion of microorganisms in the gastrointestinal tract, better intestinal health, and positive changes in the final product (egg and meat.) (Vinus *et al.* 2018).

The guava tree (*Psidium guajava*) is native of Tropical America. The archaeological remains place it in Brazil or somewhere between Mexico and Peru (Singh, 2018). Its leaves and bark are used as phytopreparations in animals and humans, due to their antibacterial, antiemetic, anti-inflammatory, anthelmintic, antiseptic, antitoxic, astringent, carminative, spasmodic and tonic properties (Naseer *et al.* 2018). Salazar *et al.* (2017) found improvements in egg production and mass conversion, when they included *P. guajava* powder as part of a mixture of medicinal plants.

Also, the crude extract of *P. guajava* leaves reduced the serum concentration of malondialdehyde (MDA) as an indicator of oxidative stress in laying hens (Boonthium *et al.* 2010). As well, Zargar *et al.* (2020) reported that the use of *P. guajava* leaves reduced histopathological lesions and cholesterol of the broiler carcass. Geidam *et al.* (2015) showed that with the use of the leaves of this medicinal plant the diarrheal syndrome in broilers with *E. coli* decreased. Despite the chemical benefits of *P. guajava*, few scientific studies have been performed to show its benefits as a zootechnical additive in diets destined for laying hens. The objective of this study was to evaluate the phytobiotic effect of *Psidium guajava* leaf powder on the productivity and quality of the egg of laying hens.

Materials and Methods

Phytochemical screening of Psidium guajava leaves. To prepare the sample, leaves of 20 *Psidium guajava* trees were taken, from the Cuban red dwarf variety, with approximately five years old, in Peralejo area Bayamo-Granma, Cuba. This region is characterized by a flat topography and brown carbonate soil. For the collection, the diversity of size, structure and optimal classification of leaves was considered, identified in the Departamento de Botánica, de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Granma.

After collecting, the impurities (mainly dust and

producción avícola (FAO 2016).

Las alternativas actuales al uso de los antibióticos son los productos naturales (Vinus *et al.* 2018). En la industria avícola se han investigado prebióticos, probióticos y fitobióticos con el objetivo de mejorar el estado de salud, disminuir los microorganismos patógenos y modular una mejor respuesta inmunitaria (Markowiak y Śliżewska 2018). Los aditivos de plantas se consideran una alternativa para reemplazar los antibióticos, desde el punto de vista técnico, económico y biológico, por la seguridad de su inclusión y su nula residualidad (Castillo-López *et al.* 2017). Se han informado muchos beneficios de los polvos de plantas medicinales en las aves, como el incremento de la digestibilidad de nutrientes, estabilidad inmunológica, exclusión competitiva de microorganismos en el tracto gastrointestinal, mejor salud intestinal y cambios positivos en el producto final (huevo y carne) (Vinus *et al.* 2018).

El árbol de la guayaba (*Psidium guajava*) es nativo de América Tropical. Los vestigios arqueológicos lo sitúan en Brasil o en algún lugar entre México y Perú (Singh 2018). Sus hojas y corteza se utilizan como fitopreparados en animales y humanos, por sus propiedades antibacterianas, antieméticas, antiinflamatorias, antihelmínticas, antisépticas, antitóxicas, astringentes, carminativas, espasmódicas y tónicas (Naseer *et al.* 2018). Salazar *et al.* (2017) encontraron mejoras en la producción de huevo y conversión masal, cuando incluyeron el polvo de *P. guajava* como parte de una mezcla de plantas medicinales.

Asimismo, el extracto crudo de las hojas de *P. guajava* redujo la concentración sérica del malondialdehído (MDA) como indicador del estrés oxidativo en las gallinas ponedoras (Boonthium *et al.* 2010). También, Zargar *et al.* (2020) informaron que el uso de las hojas de *P. guajava* redujo las lesiones histopatológicas y el colesterol de la canal de los pollos de ceba. Geidam *et al.* (2015) indicaron que con la utilización de las hojas de esta planta medicinal disminuyó el síndrome diarreico en pollos de engorde con *E. coli*. A pesar de las bondades químicas del *P. guajava*, pocos trabajos científicos se han realizado para demostrar sus beneficios como aditivo zootécnico en las dietas destinadas a gallinas ponedoras. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto fitobiótico del polvo de hojas de *Psidium guajava* en la productividad y calidad del huevo de gallinas ponedoras.

Materiales y Métodos

Tamizaje fitoquímico de las hojas de Psidium guajava. Para la preparación de la muestra se tomaron hojas de 20 árboles de *Psidium guajava*, de la variedad enana roja cubana, con aproximadamente cinco años de edad, en la zona de Peralejo Bayamo-Granma, Cuba. Esta región se caracteriza por una topografía llana y suelo pardo con carbonato. Para la recolección se consideró 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.

dirt) were removed from the leaves and they were dried in the sun for seven days. Then, the leaves were milled until obtaining a 1 mm powder (Martínez *et al.* 2012a).

Successive extractions. To achieve the highest depletion of the sample, the successive extraction scheme was used with solvents of increasing polarity: ethanol and water (Fajardo *et al.* 2018). The dry powder obtained from the guava leaves was taken. Then, 5 g were weighed on an analytical balance (BS 2202S SARTORIUS, China) and 50 mL of 70 % ethanol were added to make the alcoholic extract and 50 mL of distilled water to obtain the aqueous extract. Next, the extraction was carried out in a similar way (Más *et al.* 2017).

Phytochemical screening. The phytochemical analyzes were performed on the hydroalcoholic extract, according to the protocol proposed by Mijares *et al.* (2014) and Rodríguez *et al.* (2018). The tests of resins, Liebermann-Burchard (triterpenes and/or steroids), foam (saponins), ninhydrin (free amino acids), Dragendorff and Mayer (alkaloids), Baljet (coumarins), Fehling (reducing carbohydrates), ferric chloride (phenols or tannins), Borntrager (quinones), Shinoda (flavonoids) and anthocyanidins were tested. The phytochemical characterization was carried out at Centro de Estudio de Química Aplicada (CEQA), from Facultad de Ciencias Técnicas, belonging to Universidad de Granma, Cuba.

Experimental location. The *in vivo* experiment was carried out at the Antonio Maceo poultry farm, in Bayamo, Granma, Cuba. The average relative humidity was 78 %, the average minimum temperature was 26.3 °C and the average maximum was 30.6 °C.

Diets, animals and treatments. A total of 160 White Leghorn L-33 hens, 27 weeks old, were randomly distributed in four treatments and 10 repetitions per treatment during 70 d. The treatments consisted of a control diet (T0) and the addition of 0.5 (T1), 1.0 (T2) and 1.5 % (T3) of *Psidium guajava* leaf powder. The results of Más *et al.* (2016) and Aroche *et al.* (2018) to select the addition levels of *P. guajava* leaf powder were considered. In addition, the same control diet for laying hens was used, applied in a previous experiment (Rosabal *et al.* 2017), formulated from corn and soybean cake, as recommended by UECAN (2007).

Experimental conditions. The experimental unit consisted of a 40 x 40 cm metal cage, where four hens were housed. The birds received 110 g of food/hen/d. The water was supplied *ad libitum* through a nipple/cage and 16 hours of lighting were offered each day. The experiment had an adaptation period of 15 days (Martínez *et al.* 2012b). The experimental birds were not given medicine or therapeutic veterinary attention during the experimental period.

Productive indicators. The initial and final weights of

Posterior a la recolección, se eliminaron las impurezas (principalmente polvo y tierra) de las hojas y se secaron al sol durante siete días. Luego, las hojas se molieron hasta obtener un polvo de 1 mm (Martínez *et al.* 2012a).

Extracciones sucesivas. Para lograr el mayor agotamiento de la muestra, se utilizó el esquema de extracción sucesiva con solventes de polaridad creciente: etanol y agua (Fajardo *et al.* 2018). Se tomó el polvo seco, obtenido de las hojas de guayaba. Luego, se pesaron 5 g en una balanza analítica (BS 2202S SARTORIUS, China) y se adicionaron 50 mL de etanol al 70 % para la elaboración del extracto alcohólico y 50 mL de agua destilada para la obtención del extracto acuoso. Seguidamente, se realizó la extracción de forma análoga (Más *et al.* 2017).

Tamizaje fitoquímico. Los análisis fitoquímicos se realizaron en el extracto hidroalcohólico, según el protocolo propuesto por Mijares *et al.* (2014) y Rodríguez *et al.* (2018). Se hicieron los ensayos de resinas, Liebermann-Burchard (triterpenos y/o esteroides), espuma (saponinas), de ninhidrina (aminoácidos libres), Dragendorff y Mayer (alcaloides), Baljet (coumarinas), Fehling (carbohidratos reductores), cloruro férrico (fenoles o taninos), Borntrager (quinonas), Shinoda (flavonoides) y antocianidinas. La caracterización fitoquímica se realizó en el Centro de Estudio de Química Aplicada (CEQA), de la Facultad de Ciencias Técnicas, perteneciente a la Universidad de Granma, Cuba.

Ubicación experimental. El experimento *in vivo* se realizó en la granja avícola Antonio Maceo, en Bayamo, Granma, Cuba. La humedad relativa media fue de 78 %, la temperatura mínima promedio de 26.3 °C y la máxima promedio de 30.6 °C.

Diets, animales y tratamientos. Un total de 160 gallinas White Leghorn L-33, de 27 semanas de edad, se distribuyeron aleatoriamente en cuatro tratamientos y 10 repeticiones por tratamiento durante 70 d. Los tratamientos consistieron en una dieta control (T0) y la adición de 0.5 (T1), 1.0 (T2) y 1.5 % (T3) del polvo de hojas de *Psidium guajava*. Se consideraron los resultados de Más *et al.* (2016) y Aroche *et al.* (2018) para seleccionar los niveles de adición del polvo de hojas de *P. guajava*. Además, se utilizó la misma dieta control para gallinas ponedoras, aplicada en un experimento anterior (Rosabal *et al.* 2017), formulado a partir de maíz y torta de soya, según lo recomendado por la UECAN (2007).

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/d. El agua se suministró *ad libitum* mediante un niple/jaula y se ofertaron 16 horas de iluminación cada día. El experimento tuvo un período de adaptación de 15 días (Martínez *et al.* 2012b). A las aves en experimentación no se les suministró medicamento ni atención veterinaria terapéutica durante la etapa experimental.

Indicadores productivos. Los pesos inicial y final de

the laying hens were performed individually at 27 and 37 weeks of age on a SARTORIUS digital scale, model BL 1500, with precision ± 0.10 g. The egg weight was weekly carried out: 20 eggs/treatment, between 8:30 and 9:30 a.m. and the average weight was calculated.

For determining laying intensity, total egg production/week/treatment was considered and one egg/d/ housed bird was assumed as 100%. Mass conversion was calculated when considering food intake, egg weight per repetition and number of eggs laid. At the end of the experiment, the viability was also calculated. The percentage of unfit eggs (cracked, without an eggshell and broken) was calculated by the formula:

$$\%UE = \frac{UE * 100}{fit\ eggs}$$

External and internal quality of the egg. In week 37, a total of 20 eggs/treatment were sampled to determine the external and internal quality indicators of the egg. The egg weight was determined with an OHAUS® (China) digital scale with a precision of 0.01 g. To calculate the shape index (SI) the formula used was:

$$SI = \frac{Small\ diameter}{Big\ diameter} 100.$$

A Russian vernier with ± 0.01 mm precision was used for measuring the eggshell thickness at the egg's equator and at the upper and lower poles. The shell surface was determined according to Carter (1975) formula, where $Area = 3.9782 * egg\ weight^{0.7056}$.

The height of the dense white and the yolk was measured with a height gauge, with ± 0.01 mm accuracy. The yolk color was determined by Roche's range of 15 colors. The records of Haugh units (HU) were calculated by the relation between the egg weight (W) and the height (H) of the dense white using the formula: $HU = 100 * \log(h - 1.7W^{0.37} + 7.6)$ (Rosabal *et al.* 2017).

Statistical analysis. The data were processed by analysis of variance (Anova), one-way, in a totally random design. When necessary, Duncan (1955) Test was used to determine the multiple differences between means, according to the SPSS version 23.0 statistical program. The percentage of unfit eggs was analyzed by comparison of proportions using the COMPARPRO 1.0 program (Font *et al.* 2007).

Results and Discussion

The results of the phytochemical screening of *Psidium guajava* leaf extracts (table 1) show the diversity of secondary metabolites in the hydroalcoholic extract (mainly flavonoids), metabolites responsible for different biological activities when they are used in small concentrations in diets (Salazar *et al.* 2019 and Martínez *et al.* 2020). Also, there was not alkaloids, coumarins and resins in the hydroalcoholic extract of *P. guajava* leaves.

The tannins present in the *Psidium guajava* leaves have been described by Más *et al.* (2015) and

las gallinas ponedoras se realizaron de forma individual a las 27 y 37 semanas de edad en una balanza digital SARTORIUS, modelo BL 1500, con precisión ± 0.10 g. El peso del huevo se realizó semanalmente: 20 huevos/tratamiento, entre las 8:30 y 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/d/ave alojada. La conversión masal se calculó al considerar el alimento consumido, el peso del huevo por repetición y el número de huevos puestos. También se computó la viabilidad al finalizar el experimento. El porcentaje de los huevos no aptos (cascados, fáfara y roto) se calculó por la fórmula: % Huevos no aptos (HNA),

$$\% HNA = \frac{HNA * 100}{huevos\ aptos}$$

Calidad externa e interna del huevo. En la semana 37 se muestrearon 20 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 0.01 g. Para calcular el índice de forma (IF) se utilizó la fórmula:

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

Para medir el grosor de la cáscara en el ecuador y los polos superior e inferior del huevo se utilizó un pie de rey de fabricación rusa, con precisión de ± 0.01 mm. La superficie de la cáscara se determinó por la fórmula de Carter (1975), donde $Área = 3.9782 * peso\ del\ huevo^{0.7056}$.

La altura de la clara densa y de la yema se midió con un calibrador de altura, con exactitud de ± 0.01 mm. El color de la yema se determinó por el abanico de Roche, de 15 colores. 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: $UH = 100 * \log(h - 1.7W^{0.37} + 7.6)$ (Rosabal *et al.* 2017).

Análisis estadístico. Los datos se procesaron mediante análisis de varianza (Anova), de clasificación simple, en un diseño totalmente aleatorizado. En los casos necesarios, se empleó la dócima de Duncan (1955) para determinar las diferencias múltiples entre medias, según el programa estadístico SPSS versión 23.0. El por ciento de huevos no aptos se analizó por comparación de proporciones mediante el programa COMPARPRO 1.0 (Font *et al.* 2007).

Resultados y Discusión

Los resultados del tamizaje fitoquímico de los extractos de hojas de *Psidium guajava* (tabla 1) muestran la diversidad de metabolitos secundarios en el extracto hidroalcohólico (principalmente flavonoides), metabolitos responsables de diferentes actividades biológicas cuando se utilizan en pequeñas concentraciones en las dietas (Salazar *et al.* 2019 y Martínez *et al.* 2020). Además, no se observaron alcaloides, coumarinas y resinas en el extracto hidroalcohólico de las hojas de *P. guajava*.

Los taninos presentes en las hojas de *Psidium*

Table 1. Phytochemical screening of *P. guajava* leaves

Secondary metabolites	Hydroalcoholic extract
Mayer and Wagner (alkaloids)	-
Baljet (coumarines)	-
Foam (saponins)	+
Shinoda (flavonoids)	++
Fehling (reducing sugars)	+
Bortrager (quinones)	+
Liebermann-Burchard (triterpenes and steroids)	+
Ninhydrina (free amino acids)	+
Anthocyanidines	+
Ferric chloride (Phenols and tannins)	+
Resins	-

Legend:(-): Absence, (+): Presence, (++) : Abundant

Mapatac (2017) as anti-nutritional factors, when they are in excess in diets or drugs, because they limit the absorption of some nutrients such as iron and amino acids (Sobral-Souza *et al.* 2019). However, it has been reported that these polyphenolic compounds, in small concentrations, can be efficient anti-inflammatory, astringent, fungicidal, vasoconstrictive, and antioxidants (Xu *et al.* 2017). In this sense, Huang *et al.* (2018) reported that tannins can inhibit the growth of enterobacteriaceae and decrease the circulating cholesterol, when reducing the absorption of this lipid and expelling it through the feces.

In turn, the presence of flavonoids in the hydroalcoholic extract of the plant under study corroborates what was stated by Vargas *et al.* (2006), who detected that guava leaves are important sources of flavonoids. The extracts and leaves of guava (*Psidium guajava*) have a group of new components, only present in these plants, as is the case of gampyrone, which belong to the of glycosylated flavonoids subclass. Afzal *et al.* (2019) found that extracts from *P. guajava* leaves regulate the functioning of the enteric nervous system in the digestive system, showing its antidiarrheal function.

Jiménez-Escrig *et al.* (2001) reported that the leaves and the juice of the *P. guajava* fruit reduced the activity of the free radicals DPPH (2,2-Diphenyl-1-Picrylhydrazyl) in in vitro tests and the oxidation of low-density lipoproteins induced by the copper.

Other authors suggest that these compounds (flavonoids) have phytoestrogenic activity, since they are structurally similar to natural estrogens (17 beta estradiol) as well as synthetic ones (Yang *et al.* 2000). Ismail *et al.* (2012) had reported a decrease in the growth of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*, when using guava leaves with high flavonoid content in their diets.

The presence of anthocyanidines in the *Psidium guajava* powder is related to the decrease in oxidative stress and the stimulation of the immune system,

guajava han sido descritos por Más *et al.* (2015) y Mapatac (2017) como factores anti-nutricionales, cuando están en exceso en las dietas o fármacos, porque limitan la absorción de algunos nutrientes como el hierro y los aminoácidos (Sobral-Souza *et al.* 2019). No obstante, se ha informado que estos compuestos polifenólicos, en pequeñas concentraciones, pueden ser eficientes antiinflamatorios, astringentes, fungicidas, vasoconstrictores y antioxidantes (Xu *et al.* 2017). En este sentido, Huang *et al.* (2018) informaron que los taninos pueden inhibir el crecimiento de enterobacterias y disminuir el colesterol circulante, al reducir la absorción de este lípido y expulsarlo a través de las heces.

A su vez, la presencia de flavonoides en el extracto hidroalcohólico de la planta en estudio corrobora lo expuesto por Vargas *et al.* (2006), quienes detectaron que las hojas de guayaba son importantes fuentes de flavonoides. Los extractos y hojas de guayaba (*Psidium guajava*) poseen un grupo de nuevos componentes, solo presentes en estas plantas, como es el caso de las gampironas, que pertenecen a la subclase de flavonoides glicosilatos. Afzal *et al.* (2019) encontraron que los extractos de las hojas de *P. guajava* regulan el funcionamiento del sistema nervioso entérico en el sistema digestivo, lo que demuestra su función antidiarreica.

Jiménez-Escrig *et al.* (2001) informaron que las hojas y el jugo de la fruta *P. guajava* redujeron la actividad de los radicales libres DPPH (2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo) en pruebas in vitro y la oxidación de lipoproteínas de baja densidad inducida por el cobre. Otros autores plantean que estos compuestos (flavonoides) tienen actividad fitoestrogénica, ya que estructuralmente son similares a los estrógenos naturales (17 beta estradiol) como sintéticos (Yang *et al.* 2000). Ismail *et al.* (2012) habían señalado disminución del crecimiento de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, al utilizar las hojas de guayaba con altos contenidos de flavonoides en las dietas.

La presencia de antocianidinas en el polvo de *Psidium guajava* se relaciona con la disminución del estrés oxidativo y la estimulación del sistema inmune,

due to the proliferation of lymphocytes and the secretion of cytokinins (interleukin II) by the activated lymphocytes (Wu *et al.* 2018). Shipp and Abdel-Aal (2010) reported that anthocyanidins are natural water-soluble pigments, which can increase the color of the egg yolk as an added value to the product. According to these results, the beneficial secondary metabolites in *Psidium guajava* leaves could benefit the biological response in birds.

Although other secondary metabolites (saponins, reducing sugars, quinones, triterpenes and steroids), responsible for the biological activity, were identified by phytochemical screening, the results are not conclusive to relate them to a possible effect on the production and quality of the egg of laying hens.

Table 2 shows that different additions of *P. guajava* leaf powder did not statistically change ($P>0.05$) the viability, food intake, unfit eggs and the initial and final weight of laying hens. However, the addition of 0.5 % of this medicinal plant increased the laying intensity by 3.28% and the egg weight by 1.67 g; in addition to reducing the mass conversion by 0.14 kg / kg in relation to the control treatment and the other treatments with *P. guajava* leaf powder ($P<0.05$).

debido a la proliferación de linfocitos y la secreción de citocininas (interleucina II) por los linfocitos activados (Wu *et al.* 2018). Shipp y Abdel-Aal (2010) informaron que las antocianidinas son pigmentos hidrosolubles naturales, que pueden incrementar la coloración de la yema del huevo como un valor agregado al producto. De acuerdo con estos resultados, los metabolitos secundarios benéficos en las hojas de *Psidium guajava* podrían beneficiar la respuesta biológica en las aves.

A pesar de que se identificaron por tamizaje fitoquímico otros metabolitos secundarios (saponinas, azúcares reductores, quinonas, triterpenos y esteroides), responsables de la actividad biológica, los resultados no son concluyentes para relacionarlos con un posible efecto en la producción y calidad del huevo de gallinas ponedoras.

La tabla 2 muestra que diferentes adiciones de polvo de hojas de *P. guajava* no cambiaron estadísticamente ($P>0.05$) la viabilidad, el consumo de alimento, los huevos no aptos y el peso inicial y final de las gallinas ponedoras. Sin embargo, la adición de 0.5 % de esta planta medicinal incrementó la intensidad de puesta en 3.28 % y el peso del huevo en 1.67 g; además de disminuir la conversión masal en 0.14 kg/kg en relación con el tratamiento control y los otros tratamientos con

Table 2. Effect of *P. guajava* leaf powder on the productive performance of laying hens

Indicators	<i>P. guajava</i> leaf powder , %				SE±	P value
	Control	0.50	1.00	1.50		
Viability, %	100.00	100.00	100.00	100.00		
Initial live weight, g	1633.00	1625.00	1626.00	1625.00	5.849	0.411
Final live weight , g	1667.00	1660.00	1670.00	1686.00	9.519	0.143
Laying intensity, %	80.18 ^b	83.46 ^a	79.89 ^b	79.65 ^b	0.890	<0.001
Food intake , g/bird/d	110.00	110.00	110.00	110.00		
Mass conversion, kg/kg	2.61 ^a	2.41 ^b	2.62 ^a	2.58 ^a	0.033	<0.001
Egg weight, g	53.08 ^c	54.75 ^a	53.89 ^b	53.43 ^{bc}	0.260	0.023
Cracked eggs , %	0.22	0.21	0.22	0.22	0.098	0.060
Eggs without an eggshell, %	0.04	0.08	0.04	0.04	0.039	0.160
Broken eggs, %	0.00	0.00	0.00	0.00		

^{a,b,c} Means with different letters in the same row differ at $P<0.05$ (Duncan 1955)

The viability (100 %) showed the safety of the *Psidium guajava* leaf powder used up to 1.5 % in the diets of laying hens during 10 experimental weeks, without causing morbidity and mortality (table 2). Apparently, *P. guajava* leaf powder, added in small concentrations (up to 1.5 %) in the diet of laying hens, did not cause adverse effects, since the metabolites did not modify the viability, live weight and food intake.

It has been recognized that a high supplementation with phytochemicals can decrease the assimilation of nutrients, cause diarrhea and weight loss (Huang *et al.* 2018). Ni *et al.* (2016) reported that excessive intake of certain secondary metabolites can cause symptoms related to anti-nutritional factors in laying hens (lower food intake, low egg production and mortality).

polvo de hojas de *P. guajava* ($P<0.05$).

La viabilidad (100 %) mostró la inocuidad del polvo de hojas de *Psidium guajava* utilizado hasta 1.5 % en las dietas de gallinas ponedoras durante 10 semanas experimentales, sin provocar morbimortalidad (tabla 2). Al parecer, el polvo de hojas de *P. guajava*, adicionado en pequeñas concentraciones (hasta 1.5 %) en la dieta de gallinas ponedoras, no provocó efectos adversos, ya que los metabolitos presentes no modificaron la viabilidad, el peso vivo y el consumo de alimento.

Se ha reconocido que una alta suplementación con fitoquímicos puede disminuir la asimilación de los nutrientes, provocar diarreas y pérdidas de peso (Huang *et al.* 2018). Ni *et al.* (2016) informaron que un consumo excesivo de ciertos metabolitos secundarios

The increase in the laying intensity, with the addition of 0.5 % of *P. guajava* powder, showed the effectiveness of this medicinal plant as a promoter of egg production in laying hens. Ghasemi *et al.* (2010) reported similar responses when adding garlic (*Allium sativum*) and thyme (*Thymus vulgaris*) powders in the diets of laying hens, confirming the beneficial effect of natural products, such as *P. guajava* powder. The possible phytoestrogenic effects of the polyphenolic compounds detected in *P. guajava* powder (table 2) could also influence on the improvement of egg production and mass conversion (Purdom *et al.* 1994 and Ghasemi *et al.* 2010). Çiftci *et al.* (2012) found that a higher circulation of estrogens in blood improves egg production in laying hens. Regarding the secondary metabolites and their beneficial functions in *P. guajava* leaf powder, their direct effect on the productivity of laying hens can be affirmed, since they cannot synthesize them.

The higher egg weight (T1) with this medicinal plant could be associated with the ideal intestinal conditions of birds, which favor the increase and development of the beneficial flora, since the secondary metabolites present in the *P. guajava* leaves can decrease the pathogenic bacteria (Más *et al.* 2015) and contribute to the competitive exclusion of the gastrointestinal tract (GIT). This effect in the intestine favors the absorption of Ca in the diets and its incorporation in the shell formation (Sahin *et al.* 2018). Apparently, the tannins in the medicinal powder did not affect the absorption of sulfur amino acids, since these amino acids are the main promoters of egg weight. It should be highlighted that the higher addition (T2 and T3) of this natural product (*P. guajava*) decreased the productive response of laying hens compared to T0, perhaps due to the fact that the secondary metabolites exerted some antinutritional effects, without apparent affections in animals.

The eggs fit for intake were not affected by the supplementation of the natural product. Rosabal *et al.* (2017) and Salazar *et al.* (2017) reported similar results, when using small proportions of medicinal plants in the diets of laying hens. These data are important, if it is taken into account that larger eggs are more prone to shell break (Taylor *et al.* 2016), which shows that the additive increases the egg weight, without affecting its commercialization, since according to Jones *et al.* (2018) this indicator influences on the profitability of poultry activity.

Table 3 shows the effect of *P. guajava* powder on the external and internal quality of the eggs of laying hen. It was shown that the addition of *P. guajava* leaves did not modify the shape index, yolk height, shell surface, egg weight and Haugh unit, at 37 weeks of age. However, the shell thickness and the yolk color increased ($P < 0.05$) with the addition of 0.5 % with respect to the other experimental treatments. In

puede ocasionar síntomas relacionados con factores antinutricionales en las gallinas ponedoras (menor consumo de alimento, baja producción del huevo y mortalidad).

El incremento en la intensidad de puesta, con la adición de 0.5 % de polvo de *P. guajava*, demostró la efectividad de esta planta medicinal como promotora de la producción de huevos en gallinas ponedoras. Ghasemi *et al.* (2010) informaron respuestas similares al adicionar polvos de ajo (*Allium sativum*) y tomillo (*Thymus vulgaris*) en las dietas de gallinas ponedoras, lo que confirma el efecto benéfico de los productos naturales, como el polvo de *P. guajava*. Los posibles efectos fitoestrogénicos de los compuestos polifenólicos detectados en el polvo de *P. guajava* (tabla 2) también podrían influir en el mejoramiento de la producción de huevos y en la conversión masal (Purdom *et al.* 1994 y Ghasemi *et al.* 2010). Çiftci *et al.* (2012) encontraron que una mayor circulación de los estrógenos en sangre mejora la producción de huevo en gallinas ponedoras. En cuanto a los metabolitos secundarios y sus funciones benéficas en el polvo de hojas de *P. guajava*, se puede afirmar su efecto directo en la productividad de las gallinas ponedoras, ya que estas no los pueden sintetizar.

El mayor peso del huevo (T1) con esta planta medicinal pudo estar asociado a las condiciones idóneas intestinales de las aves, que favorecen el incremento y desarrollo de la flora benéfica, ya que los metabolitos secundarios presentes en las hojas de *P. guajava* pueden disminuir las bacterias patógenas (Más *et al.* 2015) y contribuir a la exclusión competitiva del tracto gastrointestinal (TGI). Este efecto en el intestino favorece la absorción del Ca presente en las dietas y su incorporación en la formación de la cáscara (Sahin *et al.* 2018). Al parecer, los taninos en el polvo medicinal no afectaron la absorción de los aminoácidos azufrados, ya que estos aminoácidos son los principales promotores del peso del huevo. Se debe destacar que la mayor adición (T2 y T3) de este producto natural (*P. guajava*) disminuyó la respuesta productiva de las gallinas ponedoras en comparación con el T0, quizás debido a que los metabolitos secundarios ejercieron algunos efectos antinutricionales, sin afecciones aparentes en los animales.

Los huevos aptos para el consumo no se afectaron por la suplementación del producto natural. Rosabal *et al.* (2017) y Salazar *et al.* (2017) informaron resultados similares, al utilizar pequeñas proporciones de plantas medicinales en las dietas de gallinas ponedoras. Estos datos son importantes, si se tiene en cuenta que huevos más grandes son más propensos a la rotura de la cáscara (Taylor *et al.* 2016), lo que demuestra que el aditivo incrementa el peso del huevo, sin afectar su comercialización, ya que según Jones *et al.* (2018) este indicador influye en la rentabilidad de la actividad avícola.

La tabla 3 muestra el efecto del polvo de *P. guajava* en la calidad externa e interna de los huevos de gallinas ponedoras. Se evidenció que la adición de las hojas de *P. guajava* no modificó el índice de forma, altura de la yema, superficie de la cáscara, peso del huevo y unidad Haugh, a las 37 semanas de edad. Sin embargo, el grosor

Table 3. Effect of the *P. guajava* leaf powder on the external and internal quality of the egg of laying hens (37 weeks)

Indicators	Addition of <i>P. guajava</i> powder, %				SE±	P value
	Control	0.50	1.00	1.50		
Egg weight, g	55.20	55.40	55.20	55.40	1.792	0.758
Shape index, %	73.75	75.07	77.89	75.74	0.005	0.201
Shell thickness, mm	0.20 ^c	0.26 ^a	0.22 ^{bc}	0.23 ^b	1.131	<0.001
Height of the dense white, mm	6.31 ^a	6.17 ^{ab}	6.03 ^{ab}	5.97 ^b	0.122	0.030
Yolk height, mm	6.93	6.99	7.00	6.96	0.235	0.052
Haugh unit	78.21	79.84	78.23	78.06	0.110	0.545
Shell surface, cm ²	44.90	44.44	45.75	45.01	0.874	0.456
Yolk color	6.00 ^b	7.00 ^a	6.00 ^b	6.00 ^b	0.567	0.003

^{a,b,c} Means with different letters in the same row differ at $P < 0.05$ (Duncan 1955)

addition, in T3 the height of the dense white decreased ($P < 0.05$) in relation to the control, without differences with the T1 and T2.

The highest thickness of the shell with T1 could be due that better intestinal health increased Ca absorption in the intestinal lumen, since according to Savón *et al.* (2007) ideal pH conditions are needed by the insolubility or instability of this mineral. In addition, the possible phytoestrogenic action of the secondary metabolites could increase the incorporation of calcium into the shell. According to Elaroussi *et al.* (1994), estrogens are the main transporters of calcium carbonate from the intestine to the bones and, in turn, enter to the homeostatic cycle of Ca. This can avoid the problems in the imbalance of this mineral in the bones, the incidence of problems in the legs and the shell thickness. However, further studies are necessary to validate this hypothesis. The T2 and T3 had results equivalent to the control, with worse results with respect to T1. According to Martínez *et al.* (2013), the beneficial effect of medicinal plants will depend on the chemical structure of the secondary metabolites, their concentration and level of addition in the bird diets.

Despite the beneficial effect of secondary metabolites of *P. guajava* leaves on the diets of laying hens, they did not improve the height of the dense white. On the contrary, this portion of the egg gradually decreased with the addition of *P. guajava* (table 3). Apparently, the intake of 1.65 g/bird/d of *P. guajava* (1.5 %) caused lower amino acid efficiency for the formation of this structure, since according to Keener *et al.* (2006) the amount of white depends on the balance in amino acids which provided by the diet protein. A deficiency in lysine or methionine reduces the weight of the albumen and decreases the concentration of all free amino acids. In addition, Rodríguez *et al.* (2011) reported that albumin is characterized by its homogeneity, given by the liquid and thick white. The proportion of this structure varies depending on many factors, particularly the age of the egg.

Although the height of the dense white showed statistical differences, this did not influence on the

de la cáscara y el color de la yema se incrementaron ($P < 0.05$) con la adición de 0.5 % con respecto a los otros tratamientos experimentales. Además, en T3 disminuyó ($P < 0.05$) la altura de la clara densa con relación al control, sin diferencias con el T1 y T2.

El mayor grosor de la cáscara con el T1 se pudo deber a que una mejor salud intestinal incrementó la absorción del Ca en el lumen intestinal, ya que según Savón *et al.* (2007) se necesitan condiciones idóneas de pH por la insolubilidad o inestabilidad de este mineral. Además, la posible acción fitoestrogénica de los metabolitos secundarios pudo incrementar la incorporación del calcio a la cáscara. Según Elaroussi *et al.* (1994), los estrógenos son los principales transportadores del carbonato cálcico del intestino a los huesos y, a su vez, entran al ciclo homeostático del Ca. Esto puede evitar los problemas en el desbalance de ese mineral en los huesos, la incidencia de problemas en las patas y el grosor de la cáscara. Sin embargo, estudios posteriores son necesarios para validar esta hipótesis. Los T2 y T3 tuvieron resultados equivalentes al control, con peores resultados con respecto al T1. Según Martínez *et al.* (2013), el efecto benéfico de las plantas medicinales dependerá de la estructura química de los metabolitos secundarios, su concentración y nivel de adición en las dietas de las aves.

A pesar del efecto benéfico de los metabolitos secundarios de las hojas de *P. guajava* en las dietas de las gallinas ponedoras, estos no mejoraron la altura de la clara densa. Al contrario, esta porción del huevo disminuyó de forma paulatina con la adición de *P. guajava* (tabla 3). Al parecer, el consumo de 1.65 g/ave/d de *P. guajava* (1.5 %) provocó menor eficiencia aminoacídica para la formación de esta estructura, ya que según Keener *et al.* (2006) la cantidad de clara depende del equilibrio en los aminoácidos que aporta la proteína de la dieta. Una deficiencia en lisina o metionina reduce el peso del albumen y disminuye la concentración de todos los aminoácidos libres. Además, Rodríguez *et al.* (2011) informaron que la albúmina se caracteriza por su homogeneidad, dada por la clara líquida y espesa. La proporción de esta estructura varía en función de muchos factores, en particular de la edad del huevo.

A pesar de que la altura de la clara densa mostró diferencias estadísticas, esto no influyó en las unidades

Haugh units, which did not vary with the addition of the medicinal plant. Similar results found Rosabal *et al.* (2017) and Salazar *et al.* (2017). However, they did not agree with Martínez *et al.* (2012b), who found an increase in this indicator when using up to 1.5 % of *Anacardium occidentale* leaf powder. Nematina *et al.* (2018) showed that the Haugh unit is at its maximum value, when the egg has just been laid or when it has cooled, which denotes a good degree of freshness.

The *P. guajava* leaf powder did not modify the yolk height, which corresponds to that reported by Martínez *et al.* (2012b), Más *et al.* (2015) and Salazar *et al.* (2017), when they used various probiotics in the diets of laying hens. This structure of the egg is determined by the lipid content. Apparently, the secondary metabolites in the medicinal plant did not modify the metabolism of this biomolecule. In addition, other factors can determine this portion of the egg, such as egg weight, productive stage, age, and breed (Grobas *et al.* 2001).

The addition of probiotic additives in the diets of laying hens can determine the intensity of the yolk color, without affecting the performance of the birds, which is acceptable for the table egg industry, bakeries and other industries (Odunsi 2003). However, it will depend on the concentration of the natural colorant in the plant material. In this study there was an increase in the yolk color with the addition of 0.5 % of *P. guajava* leaf powder, which could be due to the presence of anthocyanidins determined in the phytochemical screening (table 1). The natural colorant influences on the pigmentation of the yolk (Carrillo *et al.* 2005). However, the results show that the faster formation of the egg, with the addition of 0.5 % of *P. guajava* powder, could determine the highest deposition of pigments in the yolk, since in the treatments with 1 and 1.5 % there was a decrease of the yolk color (table 3).

The *P. guajava* leaf powder has a wide variety of secondary metabolites responsible for biological activity. The 0.5 % of *P. guajava* leaf powder is recommended in the diets of laying hens in their full laying peak to improve productivity and some indicators of egg quality.

Haugh, que no variaron con la adición de la planta medicinal. Resultados similares encontraron Rosabal *et al.* (2017) y Salazar *et al.* (2017). Sin embargo, no coincidieron con Martínez *et al.* (2012b), quienes encontraron aumento de este indicador al utilizar hasta 1.5 % del polvo de hojas de *Anacardium occidentale*. Nematina *et al.* (2018) indicaron que la unidad Haugh se encuentra en su valor máximo, cuando el huevo acaba de ser puesto o cuando se haya enfriado, lo que denota buen grado de frescura.

El polvo de hojas de *P. guajava* no modificó la altura de la yema, lo que se corresponde con lo informado por Martínez *et al.* (2012b), Más *et al.* (2015) y Salazar *et al.* (2017), cuando utilizaron varios fitobióticos en las dietas de gallinas ponedoras. Esta estructura del huevo está determinada por el contenido de lípidos. Al parecer, los metabolitos secundarios en la planta medicinal no modificaron el metabolismo de esta biomolécula. Además, otros factores pueden determinar esta porción del huevo, como el peso del huevo, la etapa productiva, la edad y raza (Grobas *et al.* 2001).

La adición de aditivos fitobióticos en las dietas de gallinas ponedoras puede determinar la intensidad del color de la yema, sin afectar el desempeño de las aves, lo que es aceptable para la industria de huevos de mesa, panaderías y otras industrias (Odunsi 2003). No obstante, estará en dependencia de la concentración del colorante natural en el material vegetal. En este estudio hubo incremento del color de la yema con la adición de 0.5 % de polvo de hojas de *P. guajava*, lo que se pudo deber a la presencia de antocianidinas determinadas en el tamizaje fitoquímico (tabla 1). El colorante natural influye en la pigmentación de la yema (Carrillo *et al.* 2005). No obstante, los resultados indican que la formación más rápida del huevo, con la adición de 0.5 % de polvo de *P. guajava*, pudo determinar la mayor deposición de pigmentos en la yema, ya que en los tratamientos con 1 y 1.5 % hubo disminución del color de la yema (tabla 3).

El polvo de hojas de *P. guajava* tiene amplia variedad de metabolitos secundarios responsables de actividad biológica. Se recomienda 0.5 % del polvo de hojas de *P. guajava* en las dietas de gallinas ponedoras en pleno pico de postura para mejorar la productividad y algunos indicadores de la calidad del huevo.

References

- Afzal, M., Iqbal, R., Mahmood, Z., Zeshan, B. & Wattoo, J.I. 2019. "Study of GC-MS and HPLC characterized metabolic compounds in guava (*Psidium guajava* L.) leaves". Pakistan Journal of Agricultural Sciences, 56(3): 709-713, ISSN: 0552-9034, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.btre.2020.e00536>.
- 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, ISSN: 2090-9063, DOI: <https://doi.org/10.1155/2018/4073068>.
- Boonthium, W., Isariyodom, S., Tongyai, S. & Sinbuathong, N. 2010. Supplementation of crude extract from guava leaves (*Psidium guajava* Linn.) in laying hen diets on egg production performance and quality, cholesterol levels and oxidative stress. In: Proceedings of the 48th Kasetsart University Annual Conference: Animals. Kasetsart, Thailand, pp. 41-52, ISBN: 978-616-7262-33-8, Available: <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=TH2010000087>.
- Carrillo, D., Carranco, M., Castillo, Castro, M., Ávila, E. & Pérez, G. 2005. "Cholesterol and n-3 and n-6 fatty acid content in eggs from laying hens fed with red crab meal (*Pleuroncodes planipes*)". Poultry Science, 84(1): 167-172, ISSN: 0032-5791, DOI: <https://doi.org/10.1093/ps/84.1.167>.

- 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, DOI: <https://doi.org/10.1080/00071667508416224>.
- Castillo-López, R.I., Gutiérrez-Grijalva, E.P., Leyva-López, N., López-Martínez, L.X. & Heredia, J.B. 2017. "Natural alternatives to growth-promoting antibiotics (GPA) in animal production". *The Journal of Animal and Plant Sciences*, 27(2): 349-359, ISSN: 1018-7081.
- Çiftçi, H.B. 2012. "Effect of estradiol 17 β on follicle stimulating hormone secretion and egg laying performance of Japanese quail". *Animal*, 6(12): 1955, ISSN: 1751-7311, DOI: <https://doi.org/10.1017/S1751731112000997>.
- Duncan, B. 1955. "Multiple ranges and multiple F test". *Biometrics*, 11(3): 1-42, ISSN: 1541-0420, DOI: <https://doi.org/10.2307/3001478>.
- Elaroussi, A., Forte, R., Eber, L. & Biellier, V. 1994. "Calcium homeostasis in the laying hen.: 1. Age and dietary calcium effects". *Poultry Science*, 73(10): 1581-1589, ISSN: 0032-5791, DOI: <https://doi.org/10.3382/ps.0731581>.
- Fajardo, L., Viera, Y., Rosabal, U.M., Rodríguez, S., Guardia, Y. & Morales, G. 2018. "Tamizaje fitoquímico, control de la calidad y actividad antibacteriana del clon UF-650 en extractos de *Theobroma cacao* L. (cacao)". *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 23(1): 1-12, ISSN: 1028-4796.
- FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura). 2016. El plan de acción de la FAO sobre la resistencia a los antimicrobianos 2016-2020. Ed. FAO. Roma, Italia, pp. 1-17, ISBN: 978-92-5-309392-2, Available: <http://www.fao.org/3/b-i5996s.pdf>.
- 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.
- Geidam, Y.A., Ambali, A.G., Onyeyili, P.A., Tijjani, M.B., Gambo, H.I. & Gulani, I.A. 2015. "Antibacterial efficacy of ethyl acetate fraction of *Psidium guajava* leaf aqueous extract on experimental *Escherichia coli* (O78) infection in chickens". *Veterinary World*, 8(3): 358-362, ISSN: 2231-0916, DOI: <https://doi.org/10.14202/vetworld.2015.358-362>.
- 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 Science*, 5(2): 1151-154, ISSN: 1557-4555.
- Grobas, S., Méndez, J., Lázaro, R., Blas, C. & Mateos, G. 2001. "Influence of source and percentage of fat added to diet on performance and fatty acid composition of egg yolks of two strains of laying hens". *Poultry Science*, 80(8): 1171-1179, ISSN: 0032-5791, DOI: <https://doi.org/10.1093/ps/80.8.1171>.
- Huang, Q., Liu, X., Zhao, G., Hu, T. & Wang, Y. 2018. "Potential and challenges of tannins as an alternative to in-feed antibiotics for farm animal production". *Animal Nutrition*, 4(2): 137-150, ISSN: 2405-6545, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2017.09.004>.
- Ismail, M., Minhas, P.S., Khanum, F., Sahana, V.M. & Sowmya, C. 2012. "Antibacterial activity of leaves extract of Guava (*Psidium guajava*)". *International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences*, 3(1): 1-2, ISSN: 2229-3701.
- Jiménez-Escrig, A., Rincón, M., Pulido, R. & Saura-Calixto, F. 2001. "Guava fruit (*Psidium guajava* L.) as a new source of antioxidant dietary fiber". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(11): 5489-5493, ISSN: 0021-8561, DOI: <https://doi.org/10.1021/jf010147p>.
- Jones, D.R., Ward, G.E., Regmi, P. & Karcher, D.M. 2018. "Impact of egg handling and conditions during extended storage on egg quality". *Poultry Science*, 97(2): 716-723, ISSN: 0032-5791, DOI: <https://doi.org/10.3382/ps/pex351>.
- Keener, K.M., McAvoy, K.C., Foegeding, J.B., Curtis, A., Anderson, K.E. & Osborne, J.A. 2006. "Effect of testing temperature on internal egg quality measure meets". *Poultry Science*, 85(10): 550-555, ISSN: 0032-5791, DOI: <https://doi.org/10.1093/ps/85.3.550>.
- Ljubojević, D., Puvrač, N., Pelić, M., Todorović, D., Pajić, M., Milanov, D. & Velhner, M. 2016. "Epidemiological significance of poultry litter for spreading the antibiotic-resistant strains of *Escherichia coli*". *World's Poultry Science Journal*, 72(3): 485-494, ISSN: 0043-9339, DOI: <https://doi.org/10.1017/S004393391600043X>.
- Mapatac, L.C. 2017. "Potency of medicinal leaves in the growth performance of broiler chicks". *Recoletos Multidisciplinary Research Journal*, 3(1): 197-206, ISSN: 2244-6710, DOI: <http://doi.org/10.32871/rmrj1503.01.16>.
- Markowiak, P. & Śliżewska, K. 2018. "The role of probiotics, prebiotics and synbiotics in animal nutrition". *Gut Pathogens*, 10(1): 21-41, ISSN: 1757-4749, <https://doi.org/10.1186/s13099-018-0250-0>.
- Martínez, Y., Escalona, A., Martínez, O., Olmo, C., Rodríguez, R., Iser, M., Betancur, C., Valdiviá, M. & Liu, G. 2012b. "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., Martínez, O., Escalona, A. Soto, F. & Valdiviá, M. 2012a. "Composición química y tamizaje fitoquímico del polvo de hojas y retoños del *Anacardium occidentale* L. (marañón)". *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 17(1): 1-10, ISSN: 1028-4796.
- Martínez, Y., Martínez, O., Liu, G., Ren, W., Rodríguez, R., Fonseca, Y., Olmo, C., Iser, M., Aroche, R., Valdiviá, M. & Nyachoti, C.M. 2013. "Effect of dietary supplementation with *Anacardium occidentale* on growth performance and immune and visceral organ weights in replacement laying pullets". *Journal of Food, Agriculture and Environment*, 13(3&4): 1352-1357, ISSN: 1459-0255. DOI: <https://doi.org/10.1234/4.2013.4855>.
- Martínez, Y., Más, D., Betancur, C., Gebeyew, K., Adebowale, T., Hussain, T., Lan, W. & Ding, X. 2020. "Role of the phytochemical compounds like modulators on gut microbiota and oxidative stress". *Current Pharmaceutical Design*, 26(22):

2642-2656, ISSN: 1381-6128, DOI: <http://doi.org/10.2174/1381612826666200515132218>.

- 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, DOI: <https://doi.org/10.19053/01228420.4348>.
- 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., Salazar, I., Aroche, R., López, B. & Marcella, D. 2016. "Efecto de la suplementación dietética de polvos de hojas de *Psidium guajava* y *Anacardium occidentale* en el comportamiento productivo e incidencia de diarrea de cerdos en pre y post-destete". *Revista Computadorizada de Producción Porcina*, 23(10): 106-113, ISSN: 1026-9053.
- Mijares, M., Torres, E. & Hermosilla, R. 2014. "Tamizaje fitoquímico de los extractos de *Famea occidentalis* (L.) A. Rich. (nabaco)". *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 19(4): 421-432, ISSN: 1028-4796.
- Naseer, S., Hussain, S., Naem, N., Pervaiz, M. & Rahman, M. 2018. "The phytochemistry and medicinal value of *Psidium guajava* (guava)". *Clinical Phytoscience*, 4(1): 1-8, ISSN: 2199-1197, DOI: <https://doi.org/10.1186/s40816-018-0093-8>.
- Nematinia, E. & Mehdizadeh, S.A. 2018. "Assessment of egg freshness by prediction of Haugh unit and albumen pH using an artificial neural network". *Journal of Food Measurement and Characterization*, 12(3): 1449-1459, ISSN: 2193-4134, DOI: <https://doi.org/10.1007/s11694-018-9760-1>.
- 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, Article ID: 1352146, 1-7, ISSN: 2314-6133, DOI: <https://doi.org/10.1155/2016/1352146>.
- Odunsi, A.A. 2003. "Assessment of lab (Lab pursuers) 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, DOI: <https://doi.org/10.3923/ijps.2003.71.74>.
- Purdum, C.E., Hardiman, P.A., Bye, V.V.J., Eno, N.C., Tyler, C.R. & Sumpter, J.P. 1994. "Estrogenic effects of effluents from sewage treatment works". *Chemistry and Ecology*, 8(4): 275-285, ISSN: 02757540, DOI: <https://doi.org/10.1080/02757549408038554>.
- Rodríguez, R., Cisneros, M., Valdivié, M. González, R. & Martínez, Y. 2011. "Efecto de una dieta con la inclusión de harina de caña proteica sobre la calidad de los huevos de gallinas ponedoras White Leghorn L33". *Revista de Producción Animal*, 23(1): 34-38, ISSN: 2224-7920.
- Rosabal, L.F., Tamayo, Y.V., Cordoví, U.R., Pérez, S.R., Puebla, Y.G. & Torres, G.M. 2018. "Tamizaje fitoquímico, control de calidad y actividad antibacteriana del clon UF-650 en los extractos de *Theobroma cacao* L.(cacao)". *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 23(1): 1-12, ISSN: 1028-4796.
- 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):30-35, ISSN: 1028-4796.
- Sahin, K., Orhan, C., Tuzcu, M., Hayirli, A., Komorowski, J.R. & Sahin, N. 2018. "Effects of dietary supplementation of arginine-silicate-inositol complex on absorption and metabolism of calcium of laying hens". *PloS One*, 13(1): e0189329, ISSN: 7885-2003, DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0189329>.
- 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.
- Salazar, I., Rodríguez, R., Betancur, C., Martínez, Y. & Guillaume, J. 2019. "Análisis de los metabolitos secundarios del polvo de hojas de *Origanum vulgare* y *Ficus pandurata*". *Revista de Producción Animal*, 31(2): 1-3, ISSN: 2224-7920.
- 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.
- Shipp, J. & Abdel-Aal, E.S.M. 2010. "Food applications and physiological effects of anthocyanins as functional food ingredients". *The Open Food Science Journal*, 4(1): 7-22, ISSN: 1874-2564, DOI: <https://doi.org/10.2174/187425640104010007>.
- Singh, K.K. 2018. A review: "Macro-propagation of guava (*Psidium guajava*)". *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 7(2): 2629-2634, ISSN: 2349-8234. DOI: <https://doi.org/10.15406/hij.2018.02.00097>.
- Sobral-Souza, C.E., Silva, A.R., Leite, N.F., Rocha, J.E., Sousa, A.K., Costa, J.G., Menendes I.R.A., Cunha, F.A.B., Rolim, L.A. & Coutinho, H.D. 2019. "*Psidium guajava* bioactive product chemical analysis and heavy metal toxicity reduction". *Chemosphere*, 216(2): 785-793, ISSN: 0045-6535, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.10.174>.
- Taylor, D., Walsh, M., Cullen, A. & O'Reilly, P. 2016. "The fracture toughness of eggshell". *Acta Biomaterialia*, 37: 21-27, ISSN: 1742-7061, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2016.04.028>.
- UECAN (Unión de Empresas del Centro Avícola Nacional). 2007. Aportes de los piensos avícolas. Ed. Ministerio de la Agricultura. La Habana, Cuba.
- Vargas, D., Soto, M., González, V.A., Engleman, E.M. & Martínez, Á. 2006. "Cinética de acumulación y distribución de flavonoides en guayaba (*Psidium guajava* L.)". *Agrociencia*, 40(1): 109-115, ISSN: 1405-3195.
- Vinus, R.D., Sheoran, N., Maan, N. & Tewatia, B. 2018. "Potential benefits of herbal supplements in poultry feed: A review". *The Pharma Innovation Journal*, 7(6): 651-6, ISSN: 2277-7695.
- Wu, H.Y., Yang, K.M. & Chiang, P.Y. 2018. "*Roselle anthocyanins*: Antioxidant properties and stability to heat and pH". *Molecules*, 23(6): 1357, ISSN: 1420-3049, DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules23061357>.
- Xu, Y., Liu, P., Xu, S., Koroleva, M., Zhang, S., Si, S. & Jin, Z. G. 2017. "Tannic acid as a plant-derived polyphenol exerts

vasoprotection via enhancing KLF2 expression in endothelial cells". *Scientific Reports*, 7(1): 1-9, ISSN: 2045-2322, DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-017-06803-x>.

Yang, K., Lamprecht, S.A. & Liu, Y. 2000. "Chemoprevention studies of the flavonoids quercetin and rutin in normal and azoxymethane-treated mouse colon". *Carcinogenesis*, 21(9): 1655-1660, ISSN: 1460-2180, DOI: <https://doi.org/10.1093/carcin/21.9.1655>.

Zargar, M.A., Pathak, A.K., Rahman, S., Sharma, R.K. & Daing, M.I. 2020. "Effect of *Eugenia jambolana* and *Psidium guajava* leaf meal mixture supplementation on performance, biochemical profile and histopathological changes of broiler chicks". *Journal of Animal Research*, 10(2): 221-230, ISSN: 2249-5290, DOI: <https://doi.org/10.30954/2277-940X.02.2020.9>.

Received: August 25, 2020

Accepted: October 4, 2020