


Efectos de la suplementación con hesperidina en la codorniz japonesa *Codonix codornix japonica* sobre la química sanguínea, la capacidad antioxidante, la histopatología intestinal y la microflora fecal



Abdullah Özbilgin ^{a*}

Mahmut Niyazi Moğulkoç ^b

Fusun Erhan Bayçumendur ^c

Nazlı Ercan ^d

^a Sivas Cumhuriyet University. Veterinary Faculty. Department of Animal Nutrition and Nutritional Disorders, Sivas, Turkey.

^b Sivas Cumhuriyet University. Veterinary Faculty. Department of Veterinary Microbiology, Sivas, Turkey.

^c Sivas Cumhuriyet University. Veterinary Faculty. Department of Veterinary Histology and Embriology, Sivas, Turkey.

^d Sivas Cumhuriyet University. Veterinary Faculty. Department of Veterinary Biochemistry, Sivas, Turkey.

*Autor de correspondencia: abdullahozbilgin@gmail.com

Resumen:

La hesperidina es un flavonoide derivado de los cítricos con usos potenciales en la alimentación animal. Se investigaron los efectos de la suplementación con hesperidina en dietas para codorniz japonesa (*Codonix codornix japonica*) sobre la química sanguínea, los niveles de enzimas antioxidantes en ciertos tejidos, la histomorfología intestinal y la microflora fecal. Se llevó a cabo un ensayo de alimentación durante 35 días utilizando 300 codornices. Se dividieron en tres tratamientos según la dieta administrada: Control (0 g de hesperidina/kg de alimento); HES1 (1 g de hesperidina/kg de alimento); y HES2 (2 g de hesperidina/kg de alimento). En cada tratamiento se llevaron a cabo cinco réplicas de veinte animales cada una. Al final del periodo de estudio, se tomaron muestras de heces, sangre, hígado y tejido muscular del muslo. En sangre, la alanina transaminasa

(ALT) y la lactato deshidrogenasa (LDH) fueron más bajas en HES1 que en el Control, pero aumentaron en HES2 ($P<0.05$). La aspartato transaminasa (AST) en la sangre aumentó en HES1, pero disminuyó en HES2 ($P<0.05$). La amilasa aumentó tanto en HES1 como en HES2 ($P<0.05$). Las enzimas antioxidantes GSH, CAT y SOD en los tejidos aumentaron ($P<0.05$). En el ciego y el colon, los tratamientos con hesperidina produjeron vellosidades más altas y criptas menos profundas que en el Control ($P<0.05$). La presencia de la hesperidina en la dieta para codornices no afectó la microflora en las heces. La adición de la hesperidina mostró efectos positivos en los niveles de enzimas antioxidantes en lípidos, muslos, hígado y suero, sobre la histomorfología intestinal y en la microflora fecal.

Palabras clave: Sangre, Heces, Flavonoides, Lípidos, Tejidos.

Recibido: 25/07/2022

Aceptado: 08/03/2023

Introducción

En años recientes, se ha incrementado el interés en la codorniz japonesa (*Coturnix coturnix japonica*) en la industria avícola debido a un aumento en la producción de su carne y huevos, particularmente en los países de Europa y de América Latina. Además, la codorniz se ha vuelto un modelo animal importante en la investigación científica ya que su ciclo de vida es corto y demuestra una gran resistencia a muchas enfermedades avícolas^(1,2).

En la producción animal ya es común agregar compuestos bioactivos de fuentes naturales al alimento. En comparación con otras fuentes naturales, los frutos cítricos tienen una ventaja ya que contienen compuestos bioactivos (flavonoides) ampliamente utilizados como componentes funcionales para brindar beneficios a la salud. Los bioflavonoides como la hesperidina y la naringenina abundan como subproductos de bajo costo del cultivo de cítricos⁽³⁾. Los flavonoides son metabolitos secundarios de origen vegetal llamados compuestos orgánicos heterocíclicos antioxidantes. Están clasificados en catorce subgrupos según su estructura química y las posiciones de los componentes en los anillos A, B y C⁽⁴⁾. La hesperidina (5, 7, 3'-trihidroxi-4'-metoxi-flavanona 7-ramnoglucósido) es uno de los principales flavonoides que se encuentran en los cítricos⁽⁵⁾. A partir de ella se forma la hesperitina y la rutinosa^(6,7), y demuestra varias propiedades biológicas, como son las actividades antimicrobianas, antioxidantes y vasculares⁽⁸⁾. Los flavonoides son capaces de prevenir o retrasar la oxidación de estructuras como las proteínas, los lípidos y los carbohidratos. También se pueden conjugar con ácido glucurónico; la formación de ésteres de sulfato o la O-metilación pueden facilitar esta conjugación. Este tipo de biotransformación ocurre en las partes inferiores del tracto

gastrointestinal. Además de otros compuestos, algunos de los flavonoides que no se absorben en el intestino delgado se secretan en la bilis. También contribuyen al proceso de degradación en el colon durante lo cual los microorganismos del sistema digestivo alteran las estructuras anulares de los flavonoides⁽⁹⁾. El conocimiento sobre la absorción intestinal de la hesperidina es insuficiente y su destino en el intestino aún no está claro⁽¹⁰⁾.

En la alimentación de codornices se agregan compuestos alternativos como la hesperidina. En estudios recientes se ha reportado que la agregación de hesperidina a las raciones de codorniz mejora la calidad de la carne al final de la engorda y afecta positivamente los ácidos grasos de la carne. Además, mejora los parámetros de calidad del huevo en las codornices ponedoras^(11,12). En otros estudios se ha encontrado que promueve la actividad de enzimas antioxidantes celulares como el superóxido dismutasa (SOD), la hemoxygenasa-1 (HO-1) y la catalasa (CAT)⁽¹³⁻¹⁷⁾.

Tomando en cuenta los múltiples efectos positivos de la hesperidina reportados en la codorniz, el objetivo del presente estudio fue documentar los efectos de la adición de la hesperidina en la dieta de las codornices sobre los parámetros sanguíneos, la concentración de antioxidantes en los tejidos, la histomorfología intestinal y la microflora fecal.

Material y métodos

Químicos

Se compró hesperidina en polvo (formula molecular: $C_{28}H_{34}O_{15}$, Cas #: 520-26-13, pureza: 91%) de un proveedor comercial (Chem-Impex International Company, USA).

Animales y tratamientos

Los animales experimentales fueron 300 *C. cordonix japonica* (peso: 40-45 g, edad: 1-2 semanas) obtenidos de criaderos en Sivas, Turquía (39°42'34.8" N; 37°01'13.0" E). Se alojaron los animales en jaulas de metal (Çimuka, Turquía) (altura: anchura: profundidad = 20:45:90 cm) por 35 d, con un régimen de 21 h de luz: 3 h de oscuridad y una temperatura promedio de 25 ± 2 °C. Se dividieron los animales en tres grupos de cien aves, según el tratamiento, y dentro de los grupos había cinco réplicas de veinte aves. En el primer tratamiento se alimentaron las aves con 0 g hesperidina/kg de la dieta basal (Control), en el segundo la tasa fue de 1 g hesperidina/kg de la dieta basal (HES1), y en el tercero fue de 2 g hesperidina/kg de la dieta basal (HES2). El protocolo del estudio se aprobó por el Comité Local de Ética en Experimentos Animales de la Universidad de Sivas Cumhuriyet (Comité de Ética Aprobación # 327/2022).

Se formularon las dietas siguiendo las recomendaciones del National Research Council (NRC)⁽¹⁸⁾ (Cuadro 1). Tanto el alimento granular como el agua estaban disponibles *ad*

libitum. Se implementó un periodo de adaptación al ambiente y al alimento de una semana anterior al comienzo del periodo de estudio. Las dosis de hesperidina administradas se calcularon basado en un estudio previo⁽³⁾. Se cuantificaron cuatro parámetros en cada tratamiento: química sanguínea, actividad antioxidante, histomorfología intestinal y conteo microbiológico fecal.

Cuadro 1: Composición de las dietas experimentales

Ingredientes (%)	Dietas ¹		
	Testigo	HES1	HES2
Maíz	44.29	44.29	44.29
Trigo	14.80	14.80	14.80
Harina de soya, % 48	37.65	37.65	37.65
Piedra caliza ²	0.81	0.71	0.61
Fosfato dicálcico	0.74	0.74	0.74
DL-methionina	0.50	0.50	0.50
L-threonina	0.50	0.50	0.50
Sal	0.42	0.42	0.42
L-lisina, clorhidrato	0.04	0.04	0.04
Mezcla de vitaminas-minerales ³	0.25	0.25	0.25
Hesperidina ⁴	0.00	0.10	0.20
Valores calculados			
Materia seca, %	89.73	89.63	89.53
Proteína cruda, %	24.05	24.05	24.05
Ether extracto, %	1.85	1.85	1.85
Cenizas, %	5.30	5.30	5.30
Celulosa, %	2.89	2.89	2.89
Energía metabolizable, kcal/kg	2.900	2.900	2.900
Methionina+Cystina, %	1.27	1.27	1.27
Lisina, %	1.31	1.31	1.31
Treonina, %	1.37	1.37	1.37
Triptófano, %	0.32	0.32	0.32
Calcio, %	0.61	0.57	0.53
Fósforo disponible, %	0.31	0.31	0.31

¹ Dietas: Testigo= dieta basal; HES1= Testigo + 1 g/kg hesperidina; HES2= Testigo + 2 g/kg hesperidina.

² En los tratamientos HES1 y HES2, la cantidad de hesperidina adicionada reemplazó una cantidad igual de piedra caliza.

³ Contenido por kg: retinol (vitamina A) 3 mg; tocoferol (vitamina E) 30 mg; menadiona (vitamina K₃) 5 mg; tiamina (vitamina B₁) 1 mg; riboflavina (vitamina B₂) 5 mg; piridoxina (vitamina B₆) 3 mg; ácido nicotínico 30 mg; ácido pantoténico 10 mg; ácido fólico 0.8 mg; ácido ascórbico (vitamina C) 10 mg; cloruro de colina 450 mg; Co 0.2 mg; I 0.5 mg; Se 0.3; Fe 25; Mn 120; Cu 10; Zn 100 mg; colecalciferol (vitamina D₃) 62.5 µg; cobalamina (vitamina B₁₂) 20 µg; biotina 100 µg.

⁴ Chem-Impex International (formula molecular: C₂₈H₃₄O₁₅, Cas No.: 520-26-13, pureza: 91%) (Chem-Impex, Wood Dale, IL, USA).

Recolección de muestras

Al final del periodo de estudio (35 días), se mantuvieron los animales en ayuno por seis horas antes de sacrificarlos. Un total de 24 animales (ocho de cada tratamiento) se sacrificaron y se procesaron en un rastro comercial bajo condiciones higiénicas. Se colectó muestra de sangre de cada animal en tubos de recolección y se centrifugó a 3,000 rpm por 10 min para separar el suero. El suero que se obtuvo se transfirió a tubos de microcentrifuga de 2 ml (Eppendorf, Alemania). Las muestras de suero se guardaron a -80 °C hasta llevar a cabo los análisis. Después de extraer los órganos internos, se guardaron los canales de manera individual en bolsas de plástico y se almacenaron a 4 °C por 24 h. Se tomaron muestras de suero sanguíneo, músculo (*Musculus gastrocnemius*) y tejido hepático de cada canal y se guardaron a -80 °C hasta llevar a cabo los análisis.

Parámetros de la sangre

Se procesaron las muestras de sangre con un analizador automático (Mindray BS200, China), midiendo los parámetros de Tchol (colesterol total); BUN (nitrógeno en urea de la sangre); ALT (alanina aminotransferasa); AST (aspartato aminotransferasa); GGT (gamma-glutamilttransferasa); ALP (fosfatasa alcalina); TP (proteína total); TG (triglicéridos); CK (creatinina quinasa); LDH (lactato deshidrogenasa); Ca (Calcio); Mg (Magnesio); P (Fósforo); urea; creatina; y albúmina.

Parámetros de los tejidos

Después de homogenizarse, tanto los tejidos hepáticos como los de los músculos se analizaron con kits (ELABSCIENCE): GSH (glutación reducido) (E-BC-K030-M); SOD (E-BC-K022-M); CAT (E-BC-K031-M); MDA (malondialdehído) (E-BC-K298-M); y LPO (peroxidación lipídica) (E-BC-K176-M), correspondientes a las absorbancias de las muestras de suero y tejidos calculadas.

Histomorfología intestinal

Se tomaron muestras de íleon, ciego y colon en recipientes de tejido para preparación histológica con una fórmula tampón al 10%. Se lavaron con un flujo constante de agua potable durante 48 h. Se tomaron secciones de 5 µm de espesor de los tejidos, las cuales se procesaron con un método histológico rutinario, y se suspendieron en parafina. Las secciones se tiñeron con hematoxilina-eosina para identificar las estructuras histológicas generales y llevar a cabo las mediciones histométricas⁽¹⁹⁾. Se observaron bajo un microscopio (Zeiss Primo Star, Alemania) y se tomaron imágenes. Usando el software de ImageJ, se midió la altura y el ancho de las vellosidades, y la profundidad de las criptas, de diez tramos de intestino ubicados en diferentes porciones de tres secciones de intestino de cada animal. La altura de las vellosidades se midió como la distancia vertical desde los puntos de las vellosidades hasta el inicio de las criptas, el ancho de las vellosidades se

midió a la altura media de las vellosidades, y la profundidad de la cripta se midió como la distancia vertical desde la unión entre la vellosidad y la cripta hasta el límite inferior de la cripta⁽²⁰⁾.

Conteos microbianos fecales

Se recogió de manera aséptica un gramo de contenido fecal de cada animal y se homogeneizó con 9 ml de agua con peptona al 0.1%. Se realizaron diluciones seriadas de diez veces en agua de peptona estéril de 10^{-1} a 10^{-6} , y 0.1 ml de las últimas tres diluciones se colocaron en placas por duplicado en los respectivos medios selectivos.

Los recuentos de *Escherichia coli* se realizaron en agar de triptona bilis x-glucurónido (TBX) y las placas se incubaron durante 24 h a 37 °C. Los enterococos se cultivaron en agar Slanetz Bartley (SB, Oxoid CM377, Inglaterra) y se enumeraron después de 24-48 h de incubación a 37 °C. Las enterobacterias se cultivaron en agar de bilis rojo violeta con glucosa (VRBG, Oxoid CM485, Inglaterra) mientras que los coliformes se cultivaron en agar de bilis rojo violeta (VRB, Oxoid CM107, Inglaterra). En ambos casos se utilizó la técnica de vertido en placa y se enumeraron después de 24-48 h de incubación a 37 °C. Se utilizó base de agar de triptosa sulfito cicloserina (TSC Agar) (Merck 1.11972, Alemania) para el recuento de *Clostridium*. Las placas se incubaron durante 24 h a 45 °C en condiciones anaeróbicas, y se incluyó el indicador anaeróbico (Mitsubishi Gas Chemical, America) para monitorear las condiciones atmosféricas. A las placas de Petri (90 mm x 15 mm) (Firat Plastic, Turquía) en que se observaron de 30 a 300 colonias se hicieron recuentos con un contador de colonias⁽²¹⁾. Los recuentos se expresaron como \log^{10} UFC por gramo de contenido fecal.

Análisis estadístico

Los resultados demostraron una distribución normal para todos los parámetros. Se analizaron los datos con un análisis de variación de una vía (ANOVA), y se hicieron comparaciones entre los grupos por medio de una prueba de comparaciones T2 de Bonferroni y Tamhane ($P < 0.05$). Todos los análisis estadísticos se hicieron con el paquete estadística SPSS 20.0.

Resultados

Parámetros del suero sanguíneo

Los niveles séricos de la alanina transaminasa (ALT) y la lactato deshidrogenasa (LDH) en los tratamientos HES1 y HES2 no fueron diferentes al Testigo ($P < 0.05$). La aspartato transaminasa (AST) disminuyó en HES2 en comparación al testigo y HES1 ($P < 0.05$). En contraste, la amilasa fue más alta en HES2 que en el testigo ($P < 0.05$) (Cuadro 2). No se

encontraron diferencias entre los tres tratamientos en los parámetros de Tchol, TG, GGT, ALP, CK, BUN, Albúmina, TP, Urea, Creatina, Glucosa, Ca, Mg y P ($P>0.05$).

Cuadro 2. Los efectos de la hesperidina en dietas para *C. cordonix japonica* sobre la bioquímica sanguínea

	Testigo	HES1	HES2	
	Media± EEM	Media± EEM	Media± EEM	P
Tchol, mg/dL	239.82±9.09	262.38±7.22	259.23±5.32	0.12
TG, mg/dL	265.35±24.77	248.40±25.59	247.43±26.77	0.86
ALT, U/L	5.50±0.65ab	4.25±0.48b	6.60±0.25a	0.01*
AST, U/L	237.50±6.89 ^a	243.00±5.51 ^a	194.60±9.66 ^b	0.001*
GGT, U/L	2.00±0.58	2.40±0.40	3.50±0.50	0.14
ALP, U/L	265.73±22.42	279.37±26.89	261.70±26.62	0.89
CK, U/L	2.422±197.57	2.614±211.07	2.650±242.93	0.78
LDH, U/L	711.93±36.69 ^{ab}	678.36±27.69 ^b	767.81±13.88 ^a	0.03*
Amilasa, U/L	243.50±15.50 ^b	302.75±12.15 ^{ab}	355.50±18.68 ^a	0.01*
BUN, mg/dL	4.00±0.00	4.67±0.33	4.71±0.36	0.26
Albúmina, g/dL	1.83±0.11	1.55±0.17	1.83±0.10	0.24
TP, g/dL	6.26±0.71	3.97±0.21	4.74±0.55	0.08
Creatina, mg/dL	0.18±0.02	0.16±0.01	0.19±0.04	0.82
Glucosa, mg/dL	56.58±9.66	61.60±5.40	59.20±2.20	0.93
Ca, mg/dL	10.52±0.20	8.87±0.76	9.99±0.10	0.16
Mg, mg/dL	7.58±0.64	6.18±0.50	7.56±0.24	0.09

Tchol= colesterol total; BUN= nitrógeno urea en sangre; ALT= alanina aminotransferasa; AST= aspartato aminotransferasa; GGT= gamma glutamiltransferasa; ALP= fosfatasa alcalina; TP= proteína total; TG= triglicéridos; CK= creatina quinasa; LDH= lactato deshidrogenasa; Ca= Calcio; Mg= magnesio.

* La diferencia estadística se indica por letras superíndices (^{a,b}) diferentes entre los tratamientos ($P<0.05$).

Parámetros de los tejidos

En el tratamiento HES1, el nivel de GSH aumentó en los tejidos de muslo, hígado y la sangre en HES1 en comparación con el Control ($P<0.05$). En cambio, el GSH disminuyó en el tejido del muslo en HES2. El nivel de LPO aumentó en el muslo y la sangre en el HES1. En HES2, este parámetro disminuyó en tejido del muslo, pero aumentó en la sangre. En el tejido hepático, la LPO fue más baja en HES1 y HES2 que en el testigo ($P<0.05$). En ambos tratamientos de hesperidina el nivel de CAT disminuyó en el tejido del muslo ($P<0.05$), pero aumentó en el tejido hepático ($P>0.05$). En la sangre, la CAT disminuyó en HES1 y aumentó en HES2 ($P<0.05$). El nivel de MDA disminuyó en los tres tejidos en ambos tratamientos ($P<0.05$). También en ambos tratamientos, el nivel de SOD en el tejido del muslo fue más bajo que en el testigo ($P<0.05$), pero en el tejido hepático fue más alto ($P<0.05$). Comparado con el testigo, el SOD en el tejido sérico disminuyó en HES1 y aumentó en HES2 ($P>0.05$) (Cuadro 3).

Cuadro 3. Efectos de la hesperidina en dietas para *C. cordonix japonica* sobre los parámetros oxidantes en los tejidos del muslo, el hígado y el suero

		Testigo	HES1	HES2	P
		Media± EEM	Media± EEM	Media± EEM	
GSH, µmol/L	Muslo	10.79±0.49	12.61±0.16	10.04±0.75	0.06
	Hígado	6.33±1.01 ^c	12.77±0.65 ^b	19.62±0.65 ^a	0.001*
	Suero	51.68±1.34 ^b	75.16±1.24 ^a	70.88±0.42 ^a	0.01*
SOD, U/ml	Muslo	1.03±0.04 ^a	0.81±0.04 ^b	0.85±0.07 ^b	0.02*
	Hígado	1.09±0.02	1.11±0.03	1.16±0.01	0.14
	Suero	0.37±0.12	0.32±0.13	0.42±0.11	0.84
CAT, U/ml	Muslo	211.62±0.72 ^a	101.55±1.16 ^b	61.56±0.91 ^c	0.001*
	Hígado	76.13±1.31 ^b	88.40±4.18 ^{ab}	96.69±3.43 ^a	0.01*
	Suero	54.30±1.06 ^{ab}	51.33±1.25 ^b	61.65±1.03 ^a	0.02*
MDA, µmol/L	Muslo	758.53±42.62 ^a	642.30±43.17 ^{ab}	379.71±40.09 ^b	0.02*
	Hígado	1.091.16±40.52 ^a	318.98±39.98 ^b	308.31±31.66 ^c	0.001*
	Suero	777.69±36.18 ^a	438.24±35.80 ^b	298.32±38.67 ^b	0.01*
LPO, µmol/L	Muslo	278.79±1.46 ^a	285.13±1.15 ^a	267.28±2.34 ^b	0.03*
	Hígado	257.09±1.39 ^a	241.16±0.78 ^b	249.30±1.29 ^a	0.01*
	Suero	241.56±1.56 ^b	279.88±1.42 ^a	284.71±1.52 ^a	0.001*

EEM = Error estándar de la media; GSH= glutatión reducido; SOD= superóxido dismutasa; CAT= catalasa; MDA= malondialdehído; LPO= peroxidación lipídica.

* La diferencia estadística se indica por letras superíndices (^{a,b}) diferentes entre los tratamientos ($P<0.05$).

Histomorfología intestinal

En los tejidos del íleon, ciego y colon, las vellosidades fueron más altas en HES1 y HES2 que en el Control ($P<0.05$) (Cuadro 4). Las criptas en el colon fueron más someras en HES1 y HES2 que en el Control ($P<0.05$) (Figura 1).

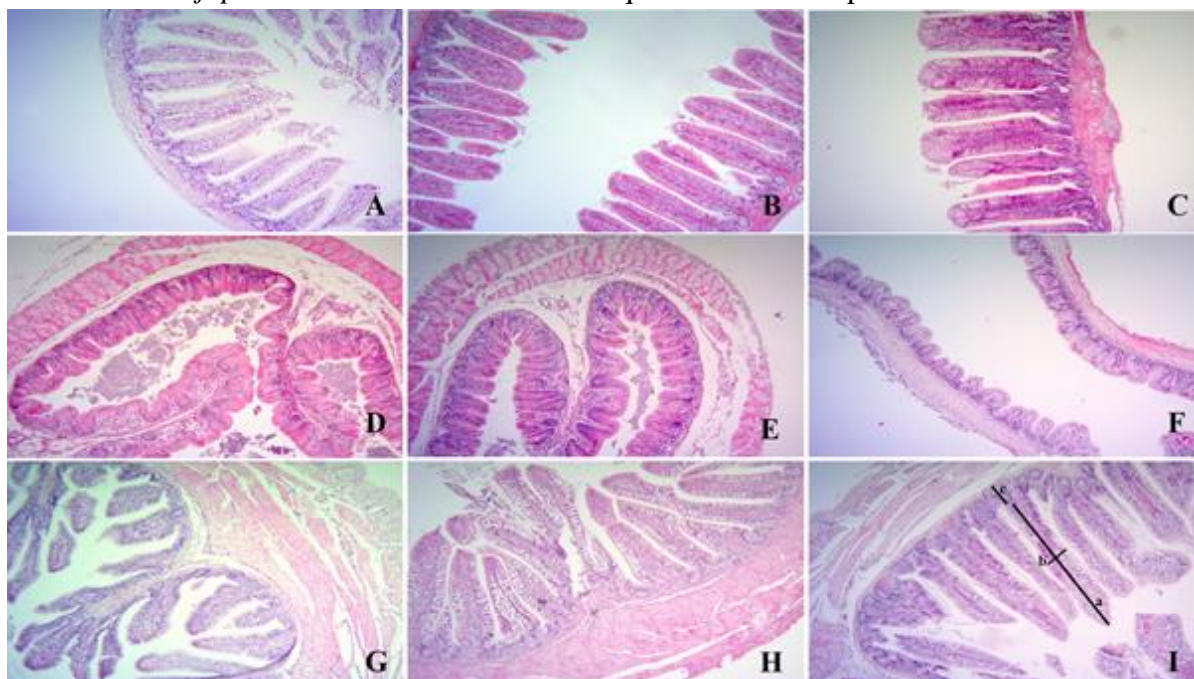
Cuadro 4. Efectos de la hesperidina en dietas para *C. cordonix japonica* sobre la altura y la anchura de las vellosidades, y la profundidad de las criptas en el íleon, ciego y colon

		Testigo	HES1	HES2	P
		Media±EEM	Media±EEM	Media±EEM	
Íleon	AltV	222.42±13.53	234.53±21.69	264.24±22.43	0.33
	AncV	67.21±1.97	64.70±5.47	67.10±2.54	0.86
	PC	30.50±1.24	31.71±1.82	35.02±3.55	0.41
Ciego	AltV	71.40±3.79 ^b	85.56±4.24 ^a	79.86±1.28 ^{ab}	0.03*
	AncV	41.33±2.47	42.76±1.28	47.81±1.55	0.06
	PC	44.45±3.45	38.15±1.78	41.80±1.58	0.22
Colon	AltV	226.38±18.2 ^b	298.58±22.10 ^{ab}	312.50±28.75 ^a	0.04*
	AncV	60.88±2.01 ^b	73.70±3.84 ^a	62.54±3.13 ^{ab}	0.02*
	PC	53.47±4.65 ^a	40.24±2.89 ^b	42.62±2.39 ^{ab}	0.04*

EEM = Error estándar de la media; AltV= altura de las vellosidades; AncV= anchura de las vellosidades; PC= profundidad de las criptas.

* La diferencia estadística se indica por letras superíndices (^{a,b}) diferentes entre los tratamientos ($P<0.05$).

Figura 1: Imágenes histológicas de los tejidos del íleon, ciego y colon en *C. cordonix japonica* alimentados con dietas que contenían hesperidina



Control: íleon (A), ciego (D) y colon (G); HES1: íleon (B), ciego (E) y colon (H); HES2: íleon (C), ciego (F) y colon (I). a: altura de las vellosidades, b: anchura de las vellosidades, c: profundidad de las criptas. Tinción hematoxilina-eosina x10.

Conteos microbianos fecales

En la microflora fecal, los conteos de *Clostridium* spp. fueron más bajos en HES2 que en el Control ($P < 0.05$) (Cuadro 5). No hubo diferencias entre los tratamientos en los conteos de *Escherichia coli*, *Enterococcus* spp., *Coliform* spp. y *Enterobacteriaceae* ($P > 0.05$).

Cuadro 5: Efectos de la hesperidina en dietas para *C. cordonix japonica* sobre las concentraciones microbianas (gram/Log¹⁰) en heces

	Testigo	HES1	HES2	
	Media± EEM	Media± EEM	Media± EEM	P
<i>Escherichia coli</i>	6.51±0.30	6.55±0.27	6.11±0.43	0.61
<i>Enterococcus</i> spp.	6.37±0.34	6.05±0.28	6.77±0.25	0.27
<i>Coliform</i> spp.	6.27±0.36	6.09±0.25	5.44±0.18	0.20
<i>Enterobacteriaceae</i>	6.43±0.24	5.65±0.26	6.65±0.24	0.88
<i>Clostridium</i> spp.	6.55±0.07 ^a	5.93±0.27 ^a	5.26±0.11 ^b	0.01*

EEM = Error estándar de la media

* La diferencia estadística se indica por letras superíndices (^{a,b}) diferentes entre los tratamientos ($P < 0.05$).

Discusión

Bioquímica sérica

Los suplementos antioxidantes en alimentos pueden mejorar la fisiología y las características de rendimiento en los animales al influenciar los procesos metabólicos⁽¹⁷⁾. Los flavonoides cítricos, como la hesperidina y la naringina, se obtienen de las frutas cítricas y sus jugos. Como suplementos se han asociado con niveles más bajos de colesterol y triglicéridos en animales^(22,23). El efecto hipocolesterolémico de la hesperidina está mediado por una disminución en la actividad de la HMG-Co A reductasa⁽²⁴⁾. En los presentes resultados la suplementación con hesperidina no bajó los niveles de triglicéridos ni de colesterol ($P>0.05$).

Las enzimas ALT, AST y LDH pueden afectar a la salud y están relacionadas con la función hepática; los niveles bajos son más deseables. Algunos suplementos alimenticios pueden reducir los niveles de estas enzimas. Por ejemplo, en ratas dosificadas con 5 g/kg de flavonoides de manera diaria se observó que las concentraciones de ALT y AST disminuyeron en comparación con un control⁽²⁵⁾. En gallinas ponedoras, se ha reportado que las actividades de AST y ALT se redujeron de manera significativa con la administración de propóleos a niveles de 250, 500 y 1000 mg/kg⁽²⁶⁾, y de 100 y 150 mg/kg⁽²⁷⁾. Este coincide con los presentes resultados ya que en los tratamientos que contenían la hesperidina los niveles de ALT, AST y LDH disminuyeron, aunque el motivo no está de todo claro.

Los compuestos antioxidantes en la dieta, como los bioflavonoides, pueden brindar cierta protección contra la etapa temprana de la diabetes y el desarrollo de sus complicaciones. Se ha informado que la hesperidina reduce de manera significativa la glucosa en la sangre⁽²⁸⁾. Sin embargo, a diferencia de estudios previos, la concentración de glucosa sérica en los presentes resultados aumentó ligeramente en los tratamientos con hesperidina ($P>0.05$). Investigaciones sobre la concentración de la insulina plasmática podría ayudar a entender mejor las causas tras este aumento.

Enzimas oxidantes y antioxidantes

Las concentraciones de la enzima SOD fueron más bajas en los muslos en los tratamientos con hesperidina que en el testigo, pero no demostraron cambios en el hígado. En términos generales, un descenso en este parámetro de oxidación en respuesta a la hesperidina indica que este flavonoide puede terminar la oxidación por medio del añadido de átomos de hidrógeno a los radicales libres. En las condiciones fisiológicas, la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) está regulada tanto de forma endógena como por la suplementación con antioxidantes^(29,30). Las principales enzimas antioxidantes endógenas son la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT) y la glutatión peroxidasa (GPX)⁽³¹⁾. La SOD convierte el peróxido de hidrógeno (uno de los radicales superóxido) en oxígeno

y agua en respuesta a la acción de CAT y/o GPX. Mientras que la SOD y la GPX se forman en muchos tejidos⁽³²⁾, la CAT está notablemente presente solo en el hígado, los tejidos renales y los glóbulos rojos⁽³³⁾. Las membranas de las células inmunitarias están compuestas de ácidos grasos altamente poliinsaturados, lo que las hace muy sensibles al estrés oxidativo⁽³⁴⁾. Por lo tanto, tienen altas concentraciones de enzimas antioxidantes porque la señalización relacionada con la membrana, y la expresión génica, son fundamentales para mantener la funcionalidad de las células inmunitarias⁽³²⁾. Los resultados del presente estudio sugieren que las concentraciones de GSH en la sangre y el muslo, y de CAT en la sangre y el hígado, aumentaron en relación con el nivel de la suplementación con la hesperidina. Algunos estudios previos apoyan este resultado. En un experimento que se realizó con ratas durante una prueba de fatiga, se reflejó la baja concentración de hesperidina en la actividad de SOD⁽³⁵⁾. En otros dos estudios, la adición de hesperidina y naringina (0.5-4.0 g/kg) a las raciones de pollos de engorde incrementó la concentración de SOD^(36,37).

Los resultados mostraron que la adición de la hesperidina a la alimentación de *C. cordonix japonica* disminuyó las concentraciones de la MDA en el muslo y la sangre. Estudios previos hechos con pollos de engorda coinciden con estos resultados. Cuando se adicionó pulpa de uva (1, 5, 3 y 6%) a la dieta de pollos las concentraciones de MDA bajaron en comparación con la dieta testigo^(38,39). En otro estudio, la adición de una mezcla comercial de aceites esenciales (0.05 % de la dieta), bajó la concentración de MDA en los músculos de la pechuga en un 22.4 %, y en los del muslo en un 62.3 %⁽⁴⁰⁾. Finalmente, la inclusión de hesperidina (0.15 y 0.3 %) en las raciones de pollos de engorda redujo la concentración de MDA en el músculo de la pechuga⁽⁴¹⁾. Debido a la disminución en los niveles de la MDA observada en el muslo y el hígado en los presentes resultados se esperaría una disminución de la LPO, un parámetro esencial para cuantificar el daño tisular. Esto se debe a que la composición de la grasa corporal de las codornices adultas es rica en ácidos grasos insaturados, y, en parte, eso se deba al aumento en el uso de la hesperidina en las dietas para codornices en los últimos años^(11,12).

Histomorfología intestinal

Después de la administración oral, los sulfatos de hesperidina se conjugan y se absorban en el duodeno y el íleon. Solo se puede absorber una pequeña cantidad de glucósidos flavonoides en el intestino delgado⁽⁴²⁾, y la ausencia del glucurónido en el tejido intestinal en los resultados puede deberse a una restricción en su penetración tisular⁽⁴³⁾.

La adición de la hesperidina al alimento de *C. cordonix japonica* promovió el crecimiento de vellosidades más altas, pero criptas más someras que en el testigo; esto se observó en el íleon, el ciego y el colon. Los flavonoides naturales (por ejemplo, las plantas ricas en flavonoides) y sus extractos tienen efectos positivos sobre la inmunomodulación y el intestino; incluso pueden aumentar la longitud de las vellosidades y la superficie del intestino delgado en los pollos de engorda⁽⁴⁴⁻⁴⁶⁾. En un estudio que coincide con los presentes resultados, la inclusión de hesperidina a raciones para pollos de engorda

incrementó tanto la longitud como el ancho de las vellosidades a los 21 y 42 días, y disminuyó la profundidad de la cripta a los 21 días (duodeno + íleon) y a los 42 días (solo duodeno)⁽²⁰⁾. Los compuestos flavonoides que mejoran la morfología intestinal, cuantificada en términos de la altura y el ancho de las vellosidades, pueden estimular la mitosis de las células epiteliales. Las vellosidades más largas o más gruesas están asociadas con la mitosis activa, y se cree que las vellosidades continúan absorbiéndose a largo plazo sin necesidad de regeneración y con una profundidad de cripta reducida. Se cree esto porque se considera la cripta como una fábrica de vellosidades, ya que una cripta grande presenta una rápida transformación tisular en respuesta a la inflamación causada por patógenos y/o toxinas^(47,48). Un aumento en la relación entre la longitud de las vellosidades y la profundidad de las criptas, como lo que se presentó en los presentes resultados, también se ha reportado con la adición de la genisteína y la hesperidina a dietas para pollos, y se puede considerar como una mejora en el sistema digestivo⁽⁴⁹⁾.

Conteos microbianos fecales

Los extractos de las plantas se utilizan de manera comercial en la producción animal por sus efectos antimicrobianos y el mejoramiento en el desempeño productivo. Por ejemplo, los compuestos fenólicos y los aceites esenciales de origen vegetal tienen efectos antimicrobianos^(16,50). La flora intestinal en el colon promueve la absorción de ciertos nutrientes, incluyendo a los polifenoles, de la dieta, y de ellos forman moléculas bioactivas y absorbibles a partir de sus compuestos⁽⁵¹⁾. Los metabolitos, que consisten tanto en polifenoles como en flora, pueden tener efectos positivos en la salud del animal⁽⁵²⁾. Los metabolitos de polifenoles derivados de la microflora en el huésped proveen numerosos beneficios⁽⁵³⁾.

La adición de la hesperidina a las dietas de las codornices en el presente estudio solo bajó los conteos de *Clostridium* spp. en HES2, sin afectar a las otras cepas probadas. El efecto levemente negativo observado en *Clostridium* spp. podría deberse a que los flavonoides demuestran una baja biodisponibilidad y una mala absorción en el tracto gastrointestinal, y desde luego pueden afectar a la salud intestinal^(54,55). De hecho, los compuestos fenólicos poseen propiedades bactericidas⁽⁵³⁾ y bacteriostáticas⁽⁵⁴⁾. Pueden minimizar la adhesión de bacterias patógenas (*E. coli*, *Clostridium* spp.) a la pared intestinal y prevenir las infecciones en el tracto digestivo, además de mejorar el uso de nutrientes y el rendimiento en los animales⁽⁵⁵⁻⁵⁸⁾.

Estudios previos sobre el efecto de suplementos bioactivos en dietas de animales en los conteos microbianos han tenido resultados mixtos. La adición de polifenoles a raciones para lechones no tuvo efecto sobre los conteos de *E. coli* y *Clostridia* spp. en heces a los 11 y 21 días⁽⁵⁹⁾; esto coincide de manera general con el presente estudio. En cambio, la inclusión del aceite de tomillo y/o el aceite de ajo en dietas para pollos de engorda causó una notada disminución en los conteos de *Clostridium* spp. en el íleon⁽⁶⁰⁾. Finalmente, la suplementación de extracto de arándano (80 mg/kg de alimento), una fuente de ácido fenólico, antocianina, flavonol y flavan-3-ol, a las raciones de pollos de engorda disminuyó los conteos de *Enterococcus* spp. a los 28 días⁽⁶¹⁾.

Conclusiones e implicaciones

La suplementación de hesperidina en la dieta de la codorniz japonesa (*Codornix codornix japonica*) tiene efectos positivos en algunos aspectos de la salud del animal. Los parámetros de la bioquímica sanguínea mejoraron, la actividad antioxidante fue más alta, la histomorfología del intestino demostró una estructura más desarrollada y no hubo efectos negativos en la microflora fecal.

Agradecimientos

Todos los autores participaron en la elaboración del estudio. AÖ planeó y llevó a cabo el experimento; NE hizo los análisis de los parámetros de los antioxidantes; FEB hizo la histomorfología intestinal; AÖ y MNM hicieron el análisis de microflora; y AÖ escribió y revisó el manuscrito.

Conflictos de interés

Los autores declaran que no hubo ningún conflicto de interés en el estudio.

Literatura citada:

1. Ikhlas B, Huda N, Noryati I. Chemical composition and physicochemical properties of meatballs prepared from mechanically deboned quail meat using various types of flour. *Int J Poult Sci* 2011;10:30–37.
2. Purohit AS, Reed C, Mohan A. Development and evaluation of quail breakfast sausage. *LWT* 2016;69:447–453.
3. Goliomytis M, Kartsonas N, Charismiadou MA, Symeon GK, Simitzis PE, Deligeorgis SG. The influence of naringin or hesperidin dietary supplementation on broiler meat quality and oxidative stability. *PLoS One* 2015;10(10):e0141652.
4. Cushnie TPT, Lamb AJ. Recent advances in understanding the antibacterial properties of flavonoids. *Int J Antimicrob Agents* 2011;38:99–107.
5. Cano A, Medina A, Bermej A. Bioactive compounds in different citrus varieties. Discrimination among cultivars. *J Food Compos Anal* 2008;21(5):377-381.
6. Cho J. Antioxidant and neuroprotective effects of hesperidin and its aglycone hesperetin. *Arch Pharm Res* 2006;29:699-706.
7. Kumar A, Lalitha S, Mishra J. Hesperidin potentiates the neuroprotective effects of diazepam and gabapentin against pentylenetetrazole-induced convulsions in mice: Possible behavioral, biochemical and mitochondrial alterations. *Indian J Pharmacol* 2014;46:309-315.

8. Martini ND, Katerere DRP, Eloff JN. Biological activity of five antibacterial flavonoids from *Combretum erythrophyllum* (Combretaceae). *J Ethnopharmacol* 2004;93:207–212.
9. Hollman PCH, Katan MB. Dietary flavonoids: intake, health effects and bioavailability. *Food Chem Toxicol* 1999;37:937-942.
10. Guo X, Li K, Guo A, Li E. Intestinal absorption and distribution of naringin, hesperidin, and their metabolites in mice. *J Funct Foods* 2020;74:104158.
11. Özbilgin A, Kara K, Gümüş R, Tekçe E. Fatty acid compositions and quality of egg and performance in laying quails fed diet with hesperidin. *Trop Anim Health Prod* 2021;53:518.
12. Özbilgin A, Kara K, Urcar Gelen S. Effect of hesperidin addition to quail diets on fattening performance and quality parameters, microbial load, lipid peroxidation and fatty acid profile of meat. *J Anim Feed Sci* 2021;30(4):367–378 .
13. Khedr NF. Protective effect of mirtazapine and hesperidin on cyclophosphamide-induced oxidative damage and infertility in rat ovaries. *Exp Biol Med* 2015;240(12): 1682–1689.
14. Roohbakhsh A, Parhiz H, Soltani F, Rezzee R, Iranshahi M. Molecular mechanisms behind the biological effects of hesperidin and hesperetin for the prevention of cancer and cardiovascular diseases. *Life Sci* 2015;1(124):64–74 .
15. Parhiz H, Roohbakhsh A, Soltani F, Rezaee R, Iranshahi M. Antioxidant and anti-inflammatory properties of the citrus flavonoids hesperidin and hesperetin: an updated review of their molecular mechanisms and experimental models. *Phyther Res* 2015;29(3):323–331.
16. Purba RAP, Yuangklang C, Paengkoum S, Paengkoum P. Milk fatty acid composition, rumen microbial population and animal performance in response to diets rich in linoleic acid supplemented with *Piper betle* leaves in Saanen goats. *Anim Prod Sci* 2020. <http://dx.doi.org/10.1071/AN20182>.
17. Purba RAP, Paengkoum S, Yuangklang C, Paengkoum P, Salem AZM, Liang JB. Mammary gene expressions and oxidative indicators in ruminal fluid, blood, milk, and mammary tissue of dairy goats fed a total mixed ration containing piper meal (*Piper betle* L.). *Ital J Anim Sci* 2022;21(1):129-141.
18. National Research Council (NRC). 1994. Nutrient requirements of poultry. 9th Edition, National Academy Press, Washington DC.
19. Bancroft JD, Gamble M. Theory and practice of histological techniques. 5th ed. Philadelphia PA. Elsevier Limited, 2002.

20. Kamboh AA, Zhu WY. Individual and combined effects of genistein and hesperidin on immunity and intestinal morphometry in lipopolysaccharide-challenged broiler chickens. *Poult Sci* 2014;93:9:2175–2183. <https://doi.org/10.3382/ps.2014-03971>.
21. Jin LZ, Ho YW, Abdullah N, Jalaludin S. Influence of dried *Bacillus subtilis* and lactobacilli cultures on intestinal microflora and performance in broilers. *Asian-Australas J Anim Sci* 1996;9:397-404.
22. Selvaraj P, Pugalendi KV. Efficacy of hesperidin on plasma, heart and liver tissue lipids in rats subjected to isoproterenol-induced cardiotoxicity. *Exp Toxicol Pathol* 2012;64(5):449-452.
23. Ohtsuki K, Abe A, Mitsuzumi H, Kondo M, Uemura K, Iwasaki Y, Kondo Y. Glucosyl hesperidin improves serum cholesterol composition and inhibits hypertrophy in vasculature. *J Nutr Sci Vitaminol* 2003;49(6):447-450.
24. Lee SJ, Yun YS, Lee IK, Ryoo IJ, Yun BS, Yoo ID. An antioxidant lignan and other constituents from the root bark of *Hibiscus syriacus*. *Planta Med* 1999;65:658–660.
25. Alghazeer R, Elgahmasi S, Elnfati AH, *et al.* Antioxidant activity and hepatoprotective potential of flavonoids from *Arbutus pavarii* against CCl₄ induced hepatic damage. *Biotechnol J Int* 2017;21(1):1–12.
26. Abdel-Kareem AA, El-Sheikh TM. Impact of supplementing diets with propolis on productive performance, egg quality traits and some haematological variables of laying hens. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)* 2017;101:441–448.
27. Galal A, Abd El-Motaal AM, Ahmed AMH, Zaki TG. Productive performance and immune response of laying hens as affected by dietary propolis supplementation. *Int J Poult Sci* 2008;7:272-278.
28. Jung UJ, Lee MK, Jeong KS, Chol MS. The hypoglycemic effects of hesperidin and naringin are partly mediated by hepatic glucose regulating enzymes in C57 BL/KsJ-db/db Mice. *J Nutr* 2004;134:2499–2503.
29. Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O. Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organ J* 2012;5:9–19.
30. Martemucci G, Costagliola C, Mariano M, D'andrea L, Napolitano P, D'Alessandro AG. Free radical properties, source and targets, antioxidant consumption and health. *Oxygen* 2022;2(2):48-78.
31. Pingitore A, Pace G, Lima P, Mastorci F, Quinones A, Iervasi G, Vassalle C. Exercise and oxidative stress: Potential effects of antioxidant dietary strategies in sports. *Nutr* 2015;31:916–922.
32. Griess B, Tom E, Domann F, Teoh-Fitzgerald M. Extracellular superoxide dismutase and its role in cancer. *Free Radic Biol Med* 2017;112:464–479.

33. Glorieux C, Calderon PB. Catalase, a remarkable enzyme: Targeting the oldest antioxidant enzyme to find a new cancer treatment approach. *Biol Chem* 2017;398:1095–1108.
34. Knight JA. Review: Free radicals, antioxidants, and the immune system. *Ann Clin Lab Sci* 2000;30:145–158.
35. Estruel-Amades S, Massot-Cladera PM, Garcia-Cerdà FJ, Pérez-Cano À, Franch M, Castell M, Camps-Bossacoma M. Protective effect of hesperidin on the oxidative stress induced by an exhausting exercise in intensively trained rats. *Nutrients* 2019;11(4):783.
36. Lien TF, Yeh HS, Su WT. Effect of adding extracted hesperetin, naringenin and pectin on egg cholesterol, serum traits and antioxidant activity in laying hens. *Arch Anim Nutr* 2008;62(1):33-43.
37. Ting S, Yeh HS, Lien TF. Effects of supplemental levels of hesperetin and naringenin on egg quality, serum traits and antioxidant activity of laying hens. *Anim Feed Sci Technol* 2011;163:59-66.
38. Brenes A, Viveros A, Goni I, Centeno C, Sayago-Ayerdy SG, Arija I, Saura-Calixto F. Effect of grape pomace concentrate and vitamin E on digestibility of polyphenols and antioxidant activity in chickens. *Poult Sci* 2008;87:307–316.
39. Goni I, Brenes A, Centeno C, Viveros A, Saura-Calixto F, Rebole A, Arija I, Estevez R. Effect of dietary grape pomace and vitamin E on growth performance, nutrient digestibility, and susceptibility to meat lipid oxidation in chickens. *Poult Sci* 2007;86:508–516.
40. Botsoglou NA, Christaki E, Florou-Paneri P, Giannenas I, Papageorgiou G, Spais AB. The effect of a mixture of herbal essential oils or α -tocopheryl acetate on performance parameters and oxidation of body lipid in broilers. *S Afr J Anim Sci* 2004;34:52–61.
41. Simitzis PE, Symeon GK, Charismiadou MA, Ayoutanti AG, Deligeorgis SG. The effects of dietary hesperidin supplementation on broiler performance and chicken meat characteristics. *Can J Anim Sci* 2011;91:275–282.
42. Escudero-Lopez B, Calani L, Fernandez-Pachon MS, Ortega A, Brighenti F, Crozier A, Del Rio D. Absorption, metabolism, and excretion of fermented orange juice (poly)phenols in rats. *Biofactors* 2014;40(3):327–335.
43. Joshi R, Kulkarni YA, Wairkar S. Pharmacokinetic, pharmacodynamic and formulations aspects of Naringenin: An update. *Life Sci* 2018;215:43–56. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2018.10.066>.

44. Hanieh H, Gerile C, Narabara K, Gu Z, Abe A, Kondo Y. *In vivo* immunomodulatory effects of dietary purple sweet potato after immunization in chicken. *Anim Sci J* 2010;81:116-121
45. Hassanpour H, Zamani MAK, Yazdani A, Cheraghchi BM. Evaluation of intestinal morphology and nitric oxide metabolites in broiler chickens supplemented by green tea. *Comp Clin Path* 2010;19:43-47.
46. Wallace J, Oleszek W, Franz C, Hahn I, Baser KH, Mathe A, Teichmann K. Dietary plant bioactives for poultry health and productivity. *Br Poult Sci* 2010;51:461-487.
47. Giannenas I, Tontis D, Tsalie E, Chronis EF, Doukas D, Kyriazakis I. Influence of dietary mushroom *Agaricus bisporus* on intestinal morphology and microflora composition in broiler chickens. *Res Vet Sci* 2010;89:78-84.
48. Awad WA, Ghareeb K, Bohm J. Evaluation of the chicory inulin efficacy on ameliorating the intestinal morphology and modulating the intestinal electrophysiological properties in broiler chickens. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)* 2011;95:65-72.
49. Hu Z, Guo Y. Effects of dietary sodium butyrate supplementation on the intestinal morphological structure, absorptive function and gut flora in chickens. *Anim Feed Sci Technol* 2007;132:240-249.
50. Cross DE, McDevitt RM, Hillman K, Acamovic T. The effect of herbs and their associated essential oils on performance, dietary digestibility and gut microflora in chickens from 7 to 28 days of age. *Br Poult Sci* 2007;48:496-506.
51. Danneskiold-Samsøe NB, Dias de Freitas QBH, Santos R, Bicas JL, Cazarin CBB, Madsen L, *et al.* Interplay between food and gut microbiota in health and disease. *Food Res Int* 2019;115:23-31.
52. Anhô FF, Nachbar RT, Varin TV, Trottier J, Dudonné S, Le Barz M, *et al.* Treatment with camu camu (*Myrciaria dubia*) prevents obesity by altering the gut microbiota and increasing energy expenditure in diet-induced obese mice. *Gut* 2019;68:453-464.
53. Chávez-Carbajal A, Nirmalkar K, Pérez-Lizaur A, Hernández-Quiroz F, Ramírez-Del-Alto S, García-Mena J, Hernández-Guerrero C. Gut microbiota and predicted metabolic pathways in a sample of Mexican women affected by obesity and obesity plus metabolic syndrome. *Int J Mol Sci* 2019;20:438.
54. Etxeberria U, Fernández - Quintela A, Milagro FI, Aguirre L, Martínez JA, Portill MP. Impact of polyphenols and polyphenol-rich dietary sources on gut microbiota composition. *J Agric Food Chem* 2013;61:9517-9533.
55. Brenes A, Viveros A, Chamorro S, Arija I. Use of polyphenol-rich grape by-products in monogastric nutrition. A review. *Anim Feed Sci Technol* 2016;211:1-17.

56. Gordon NC, Png K, Wareham DW. Potent synergy and sustained bactericidal activity of vancomycin-colistin combination versus multidrug-resistant strains of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2010;54:5316-5322.
57. Viveros A, Chamorro S, Pizarro M, Arija I, Centeno C, Brenes A. Effects of dietary polyphenol-rich grape products on intestinal microflora and gut morphology in broiler chicks. *Poult Sci* 2011;90:566–578.
58. Dueñas M, Muñoz - González I, Cueva C, Jiménez – Girón A, Sánchez - Patán F, Santos - Buelga C, Bartolomé B. A survey of modulation of gut microbiota by dietary polyphenols. *Biomed Res Int* 2015;2015:850902.
59. Zhang YS, Li Y, Wang Y, Sun SY, Qu XJ. Naringin, a natural dietary compound, prevents intestinal tumorigenesis in *apc* (min/+) mouse model. *J Cancer Res Clin Oncol* 2015;178(5):1-13. <http://dx.doi.org/10.1007/s00432-015-2097-9>.
60. Kırkpınar F, Ünlü KB, Özdemir G. Effects of oregano and garlic essential oils on performance, carcass, organ and blood characteristics and intestinal microflora of broilers. *Livest Sci* 2011;137:219-225.
61. Leusink G, Rempel H, Skura B, Berkyto M, White W, Yang Y, *et al.* Growth performance, meat quality, and gut microflora of broiler chickens fed with cranberry extract. *Poult Sci* 2010;89(7):1514–1523.