



Efecto del propóleo y aceite de orégano sobre parámetros productivos, leucocitos, metabolitos y estabilidad oxidativa de la pechuga de pollo



José Inés Ibarra-Espain ^a

Carlos Alfredo Carmona-Gasca ^a

Francisco Escalera-Valente ^a

Fidel Avila-Ramos ^{b*}

^aUniversidad Autónoma de Nayarit. Unidad Académica de Medicina Veterinaria y Zootecnia. km 3.5 Carretera Chapalilla-Compostela. 63700, Compostela, Nayarit. México.

^bUniversidad de Guanajuato, Departamento de Veterinaria y Zootecnia. Irapuato, Guanajuato. México.

* Autor de correspondencia: ledifar@hotmail.com

Resumen:

Se estudió el efecto de propóleo (P) y aceite de orégano (A) sobre parámetros productivos, leucocitos, compuestos químicos en sangre y la estabilidad oxidativa de la carne de pechuga. Los pollos (n= 480) fueron distribuidos en cuatro tratamientos con cuatro repeticiones de 30 pollos. Se probaron cuatro niveles de aditivos: TES= 0, P= 100 mg de propóleos, A= 100 mg de aceite de orégano y AP= 50 mg de A + 50 mg de P por kilo de alimento. A los 42 días dos aves por repetición se sacrificaron y su pechuga se colectó para determinar su estabilidad oxidativa midiendo el malondialdehído (MDA). El aceite de orégano contenía 43.47 % de timol y 29.16 % de carvacrol, los propóleos 5.6 mg de flavonoides, 840 µg de fenoles y 138 µg equivalentes de Trolox® por gramo de propóleo. El consumo de alimento, ganancia de peso, conversión alimenticia y mortalidad no aumentaron por efecto de los aditivos. En aves de tres semanas incrementaron los eosinófilos con AP ($P \leq 0.05$), en aves de seis semanas aumentaron los triglicéridos con A ($P \leq 0.05$) y la oxidación de las grasas fue mayor en carne de aves que recibieron AP ($P \leq 0.05$). En conclusión, el aceite de orégano y propóleos no

aumentaron los parámetros productivos, pueden estimular la respuesta inmune, en dietas bajas en grasa aumentan los triglicéridos en sangre y su combinación afecta la estabilidad oxidativa de la carne de pechuga.

Palabras clave: Aceites esenciales, Aditivos naturales, Pollo de engorda, Estabilidad oxidativa.

Recibido: 03/05/2018

Aceptado: 13/12/2018

Introducción

En la actualidad, las sustancias naturales son evaluadas en producción animal como estimulantes de crecimiento debido a las restricciones para usar sustancias sintéticas^(1,2). Los aditivos naturales pueden aumentar el nivel productivo, la respuesta inmune, el estado de salud y disminuir la oxidación de las grasas en la carne de pollo^(3,4).

El aceite de orégano es un conservador en la industria de los alimentos debido a que evita el crecimiento de microorganismos⁽⁵⁻⁷⁾. Sus compuestos principales son el timol y el carvacrol que puede representar hasta el 80 % de su contenido, y son los responsables de su actividad biológica^(8,9).

El propóleo es una goma producida por las abejas a partir de las resinas colectadas en árboles, arbustos y plantas; para estos insectos es un antiséptico, evita el crecimiento de microorganismos en su nido. En los propóleos se han identificado más de 300 sustancias, sobresalen los ácidos aromáticos, diterpenos, los fenoles y los flavonoides⁽¹⁰⁻¹³⁾. Compuestos bioactivos con capacidad anticancerígena, antiinflamatoria, bactericida, viricida, inmunoestimuladora y antioxidante *in vivo* e *in vitro*⁽¹⁴⁻¹⁶⁾.

En la actualidad, el aceite de orégano y los propóleos son una alternativa para la industria avícola debido a su precio, facilidad para usarlos y beneficios, pero los resultados varían debido al origen de los aditivos⁽¹⁷⁻¹⁹⁾. Es posible que los compuestos naturales puedan combinarse para favorecer su efecto biológico e incrementar la respuesta en las aves. Por lo tanto, el objetivo de la investigación fue determinar si el aceite de orégano sólo o combinado con propóleos pueden tener efecto sobre las variables productivas, leucocitos, linfocitos, elementos químicos en sangre y la estabilidad oxidativa de la carne en la pechuga.

Material y métodos

Todos los procedimientos presentados en el estudio están dentro de los lineamientos para el bienestar de los animales y fueron aprobados por el comité Institucional de cuidado y uso de animales de la Universidad de Nayarit (Tepic, México).

Composición del aceite esencial de orégano

Los compuestos del aceite de orégano se identificaron con un cromatógrafo de gases (CG; Hewlett Packard P-6890, California, EUA) acoplado a un espectrómetro de masas (EM; Hewlett Packard 7953, California, EUA). La temperatura del puerto de inyección fue de 240 °C; se utilizó una columna capilar Hewlett Packard 5ms® (30 m de longitud, 0.25 mm de diámetro interno y 0.25 µm de espesor de la película, California, EUA). La temperatura inicial del horno fue de 50 °C, por 5 min, después incrementó 10 °C por minuto hasta llegar a 260 °C; se utilizó helio como gas acarreador. El EM se operó en modo scan (rango m/z: 30-550) con ionización electrónica (70 eV) y flujo de 1.0 ml/min.

Cantidad de flavonoides, fenoles y capacidad antioxidante de los propóleos

El contenido de flavonoides se realizó con el método cloruro de aluminio, el de fenoles totales con el método de folin-ciocalteu y la capacidad antioxidante se realizó con el radical 2,2-Difenyl-1-picrilhidrazil (DPPH)⁽²⁰⁾.

Ubicación del experimento

a investigación se realizó en la granja avícola de la Unidad Académica de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de Nayarit ubicada en el km. 3.5 de la carretera Compostela – Chapalilla, Municipio de Compostela, Estado de Nayarit, México.

Aves y dietas experimentales

Se utilizaron 480 pollos de la línea Ross de un día de edad distribuidos aleatoriamente en cuatro tratamientos con cuatro repeticiones de 30 pollos (TES= testigo, P= 100 mg de propóleos, A= 100 mg de aceite de orégano y PA= 50 mg de propóleos más 50 mg de aceite de orégano por kilo de alimento). La dieta se elaboró a base de maíz - pasta de soya en harina para iniciación y finalización (Cuadro 1) proporcionada *ad libitum* a las aves durante los 42 días; los dos aditivos se adicionaron a la fuente concentrada de energía durante la elaboración del alimento.

Cuadro 1: Composición de la dieta en porcentaje

Ingrediente	Iniciación	Crecimiento y finalización
Maíz	65.41	72.16
Pasta de soya	29.22	22.11
Aceite de soya crudo	1.00	1.86
Bicarbonato de calcio (38%)	1.64	1.52
Fosfato dicálcico (18/21)	1.49	1.30
Sal	0.30	0.30
Pre mezcla minerales y vitaminas ¹	0.30	0.30
DL-Metionina	0.30	0.18
HCL-Lisina	0.29	0.19
Xantofilas ²	0.00	0.03
Cocciostato	0.05	0.05
	100.00	100.00
Composición nutrimental:		
Mcal/kg	3.00	3.10
Proteína cruda	20.06	17.00
Calcio	1.00	0.90
Lisina	1.30	1.00
Metionina + Cistina	0.95	0.75
Metionina	0.50	0.40
Fósforo disponible	0.45	0.45
Histidina	0.51	0.43
Triptófano	0.27	0.23
Treonina	0.84	0.73
Arginina	1.31	1.08
Ácido linoleico	1.90	2.46

¹Cantidad en mg por kg de alimento: vitamina A, 10,000 UI; vitamina D₃, 2,500 UI; vitamina K₃, 2 mg; tiamina, 2 mg; riovflavina, 7 mg; ácido pantoténico, 10 mg; piridoxina, 4 mg; ácido fólico, 1 mg; vitamina B₁₂, 0.015 mg; y biotina, 0.010 mg (Vipresa®), Tepatitlán de Morelos, México. Cantidad en mg por kg de alimento: Se, 0.20; I, 0.30; Cu, 7; Fe, 65; Zn, 75; Mn, 65; y Co, 0.4 (Vipresa®), Tepatitlán de Morelos, México.

²Cantidad en mg por kg de alimento: 90 ppm de *Tagetes erecta* (Florafil-93 Powder, Industrias Vepinsa S.A. de C.V. Los Mochis Sinaloa, México).

Parámetros productivos y muestras de sangre

Los parámetros productivos se midieron cada siete días y la mortalidad cuando sucedió, además, se tomó una muestra de sangre en la vena braquial a dos aves por repetición a los 21

y los 42 días (1.8 mg de ácido etilendiaminotetraacético por mililitro) para hacer las extensiones de sangre, teñirlas con tinción Wright y medir los metabolitos de la sangre (Easy-Vet, Desego).

Sacrificio de aves y colecta de carne

A dos aves por repetición se les retiró el alimento para tener un ayuno de 6 h antes de sacrificarlas seccionando su vena yugular y arteria carótida, cumpliendo con la Norma Oficial Mexicana NOM-033-SAG/ZOO-2014⁽²¹⁾; se desangraron durante 2 min y se colocaron en agua (60 °C) durante 120 seg para retirar sus plumas manualmente. La canal se enfrió en agua con hielo durante una hora (0 °C), a la pechuga se le quitó la piel y grasa visible para envasarla en alto vacío y mantenerla congelada (-20 °C) durante ~1 mes.

Estabilidad oxidativa de la carne

A una muestra de 30 g de carne se le adicionan 30 ml de agua destilada y 0.2 ml de BHT al 7% (2,6-di-ter-butyl-4-methyl-phenol, Sigma-Aldrich, Toluca, México) diluido en alcohol metílico al 96% (CH₃CH₂OH). La muestra se trituró durante 30 seg (Licuadora Oster, M4655-813/465-42) y filtró a través de una malla plástica de 0.84 mm para reposar 30 min a 25 °C en la oscuridad. Se tomó 1 ml de la capa superior de la muestra y se adicionan 2 ml de ácido tiobarbitúrico 0.02 M (Sigma-Aldrich, Toluca, México) combinado con ácido tricloroacético (TCA) al 15% en agua destilada. La solución se agitó 10 seg, se mantuvo en agua a 80 °C durante 10 min, finalmente se colocó a 0 °C (10 min). Se mide la absorbancia de la muestra a 532 nm (Biotek, Epoch, EUA), los valores obtenidos se multiplicaron por 7.8 para expresar mg de malondialdehído por kilo de carne⁽²²⁾.

Análisis estadístico

Los datos obtenidos se analizaron con un diseño experimental completamente al azar usando el Procedimiento Lineal Generalizado (GLM) de SAS; las medias se compararon con la prueba Tukey y los efectos se consideraron significativos a una $P \leq 0.05$. Los datos de mortalidad se transformaron usando la función arco seno y se presentaron en porcentaje. El modelo estadístico usado fue:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + \varepsilon_{ij}$$

Donde:

Y_{ij} consumo de alimento, ganancia de peso, conversión alimenticia, mortalidad de las aves, leucocitos, variables químicas y malondialdehído (MDA) por kilo de carne;

μ es la media general;

T_i es el efecto del aceite de orégano, de propóleos, aceite de orégano más propóleos;

E_{ij} es el error aleatorio.

Resultados y discusión

Aceite de orégano

Los compuestos más abundantes en el aceite de orégano fueron timol (43.47 %), carvacrol (29.16 %), eucaliptol (6.96 %), cariofileno (5.38 %) y tetrametil (2.96 %). El aceite de orégano disminuye el crecimiento de bacterias debido al timol y carvacrol contenido, compuestos variables de acuerdo a su lugar de origen, época de corte y madurez de la planta. Sin embargo, en todas las etapas fenológicas de la planta de orégano son los compuestos más abundantes; el aceite de orégano puede contener hasta el 80 % de ambos compuestos^(23,24). La cantidad de timol y carvacrol en el aceite fue del 72 %, aceite de orégano de buena calidad comparado con otros que sólo contienen el 30 % de ambos compuestos^(25,26).

Propóleos

En los propóleos el contenido de flavonoides fue de 5.6 mg equivalentes de quercetina, de fenoles 840 μ g equivalentes de ácido caféinico y 138 μ g equivalentes de Trolox® determinados por el radical DPPH• (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo) por gramo de propóleo. Los compuestos de los propóleos varían de acuerdo a su región de origen, existen reportes de China, India, Macedonia e Irán indicando contenidos de 8 a 188 mg de flavonoides y de 42.9 a 329.0 mg de fenoles por gramo de propóleos^(10,24,25). En México se han reportado propóleos con 379.2 mg de flavonoides, 500.9 mg de fenoles y 54.4 mg equivalentes de Trolox por gramo de propóleo⁽²⁰⁾. Usando estos valores como referencia, el propóleo usado en la investigación contenía una limitada cantidad de compuestos activos comparado con propóleos de otras regiones de México y el mundo.

Parámetros productivos

En parámetros productivos no hubo efecto de los tratamientos sobre consumo de alimento, ganancia de peso, conversión alimenticia y mortalidad (Cuadro 2). Los resultados al adicionar aceite de orégano o propóleos en las dietas de aves son variables. Existen reportes que adicionan 25, 50, 300 y 600 ppm de propóleos por kilo de alimento sin tener efectos en las aves^(27,28). Sólo adicionando 15,000 y 20,000 ppm de aceite de orégano las aves aumentaron sus rendimientos productivos⁽²⁹⁾. Las aves no aumentaron sus parámetros productivos debido a las dosis de propóleos que no aportaron suficientes compuestos activos para estimular secreciones de enzimas digestivas. Sólo dosis altas o cantidades mayores de

compuestos activos pueden estimular las secreciones digestivas, por lo tanto, las aves pueden aprovechar los nutrientes y aumentar su rendimiento⁽³⁰⁾. Generalmente las investigaciones no reportan la cantidad de compuestos activos contenidos en los propóleos o aceites usados y esta información es esencial para comparar los resultados obtenidos en otras investigaciones.

Cuadro 2: Parámetros productivos (kg) en aves de tres y seis semanas de edad

Tratamientos	Consumo de alimento	Ganancia de peso	Conversión alimenticia	Mortalidad (%)
Aves de 3 semanas				
TES	0.68 ± 0.03	0.43 ± 0.02	1.58	4.20
A	0.66 ± 0.01	0.42 ± 0.02	1.59	7.50
P	0.67 ± 0.01	0.43 ± 0.01	1.58	10.00
AP	0.69 ± 0.01	0.43 ± 0.01	1.59	9.20
EEM	0.004	0.003	0.011	0.453
Aves de 6 semanas				
TES	3.99 ± 0.16	2.01 ± 0.02	1.99	3.30
A	3.74 ± 0.14	1.89 ± 0.12	1.98	1.70
P	3.65 ± 0.24	1.80 ± 0.14	2.03	1.70
AP	3.79 ± 0.09	1.89 ± 0.09	2.01	5.00
EEM	0.049	0.030	0.017	0.181

TES= testigo; A= aceite de orégano 100 mg kg⁻¹ de alimento; P= propóleos 100 mg kg⁻¹ de alimento; AP= aceite de orégano 50 mg + propóleos 50 mg kg⁻¹ de alimento.

EEM= Error estándar de la media.

Leucocitos

En aves de tres semanas disminuyó la cantidad de linfocitos con el tratamiento P comparado con el TES ($P \leq 0.05$), aumentaron los eosinófilos con el tratamiento combinado AP ($P \leq 0.05$), seguido por el tratamiento P ($P \leq 0.05$), los tratamientos TES y A fueron similares (Cuadro 3). Los linfocitos mantienen la respuesta inmune al enfrentarse a microorganismos invasores del cuerpo. Reportes de investigación indican menos linfocitos en aves cuando adicionaron propóleos a la dieta^(31,32) como sucedió en nuestro experimento, los compuestos activos de los propóleos inhiben el desarrollo de los linfocitos T. En una investigación indican que 5 µg de propóleos por mililitro tienen efectos negativos *in vitro* y los flavonoides son los compuestos responsables⁽³³⁾.

Los eosinófilos son células vinculadas con el desarrollo de linfocitos T, sus poblaciones disminuyen cuando la edad de las aves incrementa⁽³⁴⁾. Sin embargo, cuando mejora el desarrollo del aparato digestivo la cantidad de eosinófilos aumenta; aves alimentadas con

aceite de orégano o propóleos mejoran su flora intestinal y estimulan citosinas que inducen la proliferación de los eosinófilos⁽³⁵⁾.

Cuadro 3: Porcentaje de leucocitos en sangre de aves de tres y seis semanas de edad

Tratamiento	Linfocitos	Heterófilos	Eosinófilos	Basófilos	Monocitos
Aves de tres semanas					
TES	68.8 ± 3.1 a	29.8 ± 2.4	0.0 ± 0.0 c	0.5 ± 0.5	0.3 ± 0.5
A	61.8 ± 2.9 ab	36.9 ± 13.3	0.0 ± 0.0 c	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
P	55.2 ± 3.3 b	43.2 ± 3.1	1.5 ± 1.4 b	0.3 ± 0.5	0.0 ± 0.0
AP	57.9 ± 8.9 ab	38.5 ± 10.1	3.6 ± 1.3 a	0.4 ± 0.5	0.0 ± 0.0
EEM	1.65	1.67	0.313	0.083	0.043
Aves de 6 semanas					
TES	42.0 ± 10.2	19.6 ± 4.4	27.3 ± 8.0	2.8 ± 2.6	8.4 ± 7.7
A	38.4 ± 12.4	18.1 ± 7.8	31.0 ± 11.3	3.6 ± 2.9	12.0 ± 6.1
P	45.3 ± 10.1	14.8 ± 3.0	3.5 ± 2.3	3.5 ± 2.3	12.9 ± 3.9
AP	51.6 ± 9.4	17.5 ± 10.2	43.9 ± 63.0	2.4 ± 2.6	6.4 ± 4.6
EEM	1.869	1.154	5.558	0.730	1.504

TES= testigo; A= aceite de orégano 100 mg kg⁻¹ de alimento; P= propóleos 100 mg kg⁻¹ de alimento; AP= aceite de orégano 50 mg + propóleos 50 mg kg⁻¹ de alimento.

EEM= Error estándar de la media.

^{abc} Superíndices diferentes entre filas indican diferencias ($P < 0.05$).

Metabolitos en sangre

En aves de seis semanas de edad aumentó la cantidad de triglicéridos con el tratamiento A ($P \leq 0.05$) comparado con AP, los tratamientos TES y P fueron iguales (Cuadro 4). Los componentes químicos en sangre indican el estado general de salud. Existen reportes indicando niveles bajos de colesterol y triglicéridos cuando adicionan 300 ppm de propóleos a la dieta⁽³⁶⁾, sin embargo, no siempre se obtienen los mismos resultados⁽³⁷⁾. Por ejemplo, cuando los animales consumen dietas con niveles de grasa del 6 % y se adicionan propóleos a la dieta, se reportan bajos niveles de colesterol y triglicéridos⁽³⁸⁾. En ensayos con niveles de energía menores no es posible observar hipocolesterolemia e hipolipidemia adicionando propóleos o aceite de orégano a la dieta como sucedió en este experimento.

Cuadro 4: Metabolitos en sangre de aves

Metabolito	TES	A	P	AP	EEM
Aves de tres semanas					
Glucosa	137.8 ± 41.3	111.8 ± 58.4	106.3 ± 38.6	105.1 ± 49.5	8.00
Urea	6.2 ± 2.7	5.9 ± 1.5	4.8 ± 2.1	3.9 ± 0.9	0.00
Ácido úrico	5.6 ± 1.3	4.1 ± 1.4	5.6 ± 2.4	5.3 ± 2.2	0.00
Creatinina	0.5 ± 0.2	0.3 ± 0.1	0.4 ± 0.1	0.4 ± 0.0	0.00
Colesterol	234.6 ± 22.5	229.9 ± 41.6	237.3 ± 36.0	263.3 ± 35.6	6.00
Triglicéridos	96.9 ± 23.4	84.5 ± 21.0	84.3 ± 12.9	78.4 ± 9.4	3.00
Aves de 6 semanas					
Glucosa	284.8 ± 55.6	265.9 ± 58.8	313.8 ± 84.0	279.6 ± 27.4	10.478
Urea	3.1 ± 1.8	3.1 ± 3.1	2.9 ± 1.9	2.9 ± 1.4	0.356
Ácido úrico	7.4 ± 3.2	11.0 ± 7.3	7.7 ± 5.4	7.6 ± 2.2	1.000
Creatinina	0.2 ± 0.1	0.3 ± 0.1	0.3 ± 0.0	0.3 ± 0.0	0.200
Colesterol	170.4 ± 26.3	189.0 ± 51.4	186.5 ± 37.5	167.8 ± 30.6	0.516
Triglicéridos	55.1 ± 10.0 ab	68.8 ± 22.9 a	50.3 ± 6.4 ab	45.0 ± 11.5 b	2.836

TES= testigo; A= aceite de orégano 100 mg kg⁻¹ de alimento; P= propóleos 100 mg kg⁻¹ de alimento; AP= aceite de orégano 50 mg + propóleos 50 mg kg⁻¹ de alimento.

EEM= Error estándar de la media.

^{ab} Superíndices diferentes entre columnas indican diferencias ($P < 0.05$).

Estabilidad oxidativa de la carne de pechuga

La oxidación de la carne de pechuga aumentó al combinar los aditivos AP ($P \leq 0.05$) comparado con los tratamientos A, P y TES (Cuadro 5). Los propóleos y el aceite de orégano tienen capacidad antioxidante *in vitro* e *in vivo*^(16,39). Sin embargo, su efecto puede variar al mezclarse con otros ingredientes de la dieta; por ejemplo, el aceite de orégano combinado con aceite de soya acidulado no tiene efecto antioxidante⁽³⁹⁾. Existen reportes indicando que 200 ppm de propóleos disminuyen la cantidad de MDA en la carne de pollo⁽⁴⁰⁾. Los propóleos al ingerirse a través de los alimentos se distribuyen en el cuerpo y se acumulan en las membranas celulares para protegerlas de la oxidación^(33,36). Efecto no observado debido a que el aceite de orégano y propóleos no son compatibles, su combinación acelera el proceso oxidativo en la carne, al administrarse de forma independiente no presentaron niveles altos de MDA.

Cuadro 5: Estabilidad oxidativa de la pechuga de pollo malondialdehído por kilogramo de carne)

Tratamiento	Media \pm desviación estándar
TES	0.849 \pm 0.34 b
A	1.116 \pm 0.41 b
P	0.670 \pm 0.39 b
AP	1.864 \pm 0.58 a
EEM	0.262

TES= testigo; A= aceite de orégano 100 mg kg⁻¹ de alimento; P= propóleos 100 mg kg⁻¹ de alimento; AP= aceite de orégano 50 mg + propóleos 50 mg kg⁻¹ de alimento.

EEM= Error estándar de la media.

^{ab} Superíndices diferentes entre filas indican diferencias estadísticas ($P < 0.05$).

Conclusiones e implicaciones

El aceite de orégano con 43.47 % de timol y 29.16 % de carvacrol o propóleos con 840 μ g de fenoles, 5.6 mg de flavonoides y 138 μ g equivalentes de trolox® sólo o combinados en la dieta no aumentan el rendimiento productivo de las aves. En pollo de tres semanas disminuyen la cantidad de leucocitos, pero aumentan las poblaciones de eosinófilos, en pollo de finalización aumentan la cantidad de triglicéridos en dietas bajas en grasas y la combinación aceite de orégano y propóleos aumenta la oxidación de la carne de pechuga. Es necesario continuar investigando la dosis o la combinación de compuestos naturales que permitan mejores resultados sobre la productividad y salud de las aves.

Agradecimientos

Se agradece a la Secretaria de Educación Pública el apoyo económico recibido a través del proyecto PRODEP (DSA/103.5/15/7007) para realizar la investigación.

Literatura citada:

1. Castañón JIR. History of the use of antibiotic as growth promoters in European poultry feeds. *Poult Sci* 2007;86(11):2466-2471.
2. Theuretzbacher, U. Global antibacterial resistance: the never-ending story. *JGAR* 2013;1(2):63-69.
3. Avila-Ramos F, Pro-Martínez A, Sosa-Montes E, Cuca-García JM, Becerril-Pérez CM, Figueroa-Velasco JL, Narciso-Gaytán C. Effects of dietary oregano essential oil and vitamin E on the lipid oxidation stability of cooked chicken breast meat. *Poult Sci* 2012; 91(2):505-511.

4. Mahmoud UT, Cheng HW, Applegate TJ. Functions of propolis as a natural feed additive in poultry. *Worlds Poult Sci J* 2016;72(1):37-48.
5. Arcila-Lozano CC, Loarca-Piña G, Lecomte-Urbe S, González-Mejía E. El orégano: propiedades, composición y actividad biológica de sus componentes. *Arch Latinoam Nutr* 2004;54(1):100-111.
6. Özkalp B, Sevgi F, Özcan M, Özcan MM. The antibacterial activity of essential oil of oregano (*Origanum vulgare* L.). *J Food Agric Environ* 2010;8(2):6-8.
7. Arana-Sánchez A, Estarrón-Espinosa M, Obledo-Vázquez EN, Padilla-Camberos E, Silva-Vázquez R, Lugo-Cervantes E. Antimicrobial and antioxidant activities of Mexican oregano essential oils (*Lippia graveolens* H. B. K.) with different composition when microencapsulated in beta-cyclodextrin. *Lett Appl Microbiol* 2010;50(6):585-590.
8. Figiel A, Szumny A, Gutiérrez-Ortíz A, Carbonell-Barrachina AA. Composition of oregano essential oil (*Origanum vulgare*) as affected by drying method. *J Food Eng* 2010;98(2):240-247.
9. Soković M, Glamočlija J, Marin PD, Brkić D, Van Griensven LJ. Antibacterial effects of the essential oils of commonly consumed medicinal herbs using an *in vitro* model. *Molecules* 2010;15(11):7532-7546.
10. Laskar RA, Ismail Sk, Nayan R, Naznin AB. Antioxidant activity of Indian propolis and its chemical constituents. *Food Chem* 2010;(122):2332-2237.
11. Huang S, Zhang, CP, Wang K, Li GQ, Hu FL. Recent advances in the chemical composition of propolis. *Molecules* 2014;19(12):19610-19632.
12. Choia YM, Nohb DO, Choc SY, Suhd HJ, Kimd KM, Kimd JM. Antioxidant and antimicrobial activities of propolis from several regions of Korea. *LWT* 2006;(29):756-761.
13. Hashemi JM. Biological effect of bee propolis: a review. *European J Appl Sci* 2016;8(5):311-318.
14. Çetin E, Silici C, Çetin N, Güçlü B. K. Effects of diets containing different concentrations of propolis on hematological and immunological variables in laying hens. *Poult Sci* 2010;89(8):1703-1708.
15. Frozza CO, Garcia CS, Gambato G, de Souza MD, Salvador M, Moura S *et al.* Chemical characterization, antioxidant and cytotoxic activities of Brazilian red propolis. *Food Chem Toxicol* 2013;(52):137-142.
16. Kalogeropoulos N, Konteles SJ, Troullidou E, Mourtzinis L, Karathanos VT. Chemical

- composition, antioxidant activity and antimicrobial properties of propolis extracts from Greece and Cyprus. *Food Chem* 2009;116(2):452-461.
17. Toghyani M, Toghyani M, Gheisari A, Ghalamkari G, Eghbalsaied S. Evaluation of cinnamon and garlic as antibiotic growth promoter substitutions on performance, immune responses, serum biochemical and haematological parameters in broiler chicks. *Livest Sci* 2011;138(1-3):167-173.
 18. Eyng C, Murakami AE, Santos TC, Silveira TGV, Pedroso RB, Lourenço DAL. Immune responses in broiler chicks fed propolis extraction residue-supplemented diets. *Asian-Australas J Anim Sci* 2015;28(1):135-142.
 19. Zamora ZG, Durán MLA, Hume ME, Vázquez RS. Performance, blood parameters, and carcass yield of broiler chickens supplemented with Mexican oregano oil. *R Bras Zootec* 2017;46(6):515-520.
 20. Hernández-Zarate MS, Abraham-Juárez MR, Cerón-García A, Ozuna-López C, Gutiérrez- Chávez JA, Segoviano-Garfias JIN, Avila-Ramos F. Flavonoids, phenolic content, and antioxidant activity of propolis from various areas of Guanajuato, Mexico. *Food Sci Technol Campinas* 2018;38(2):210-215.
 21. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. 1995. Norma Oficial Mexicana NOM- 033-SAG/ZOO-2014. Sacrificio humanitario de los animales domésticos y silvestres. SAGARPA.
 22. Tarladgis BG, Watts BM, Younathan MT, Dugan LJr. A distillation method for the quantitative determination of malonaldehyde in rancid foods. *J Am Oil Chem Soc* 1960;37(1):44-48.
 23. Abu-Lafi S, Odeh I, Dewik H, Qabajah M, Hanus LO, Dembitsky VM. Thymol and carvacrol production from leaves of wild Palestinian *Majorana syriaca*. *Bioresour Technol* 2008;99(9):3914-3918.
 24. Bouyahya A, Dakka N, Talbaoui A, Et-Touys A, El-Boury H, Abrini J, Bakri Y. Correlation between phenological changes, chemical composition and biological activities of the essential oil from Moroccan endemic Oregano (*Origanum compactum Benth*). *Ind Crops Prod* 2017;(108):729-737.
 25. Ahn M, Kumazawa S, Usui Y, Nakamura J, Matsuka M, Zhu F, Nakayama T. Antioxidant activity and constituents of propolis collected in various areas of China. *Food Chem* 2007;101(4):1383-1392.
 26. Mechergui K, Jaouadi W, Coelho JP, Khouja ML. Effect of harvest year on production, chemical composition and antioxidant activities of essential oil of oregano (*Origanum*

- vulgare* subsp glandulosum (Desf.) Ietswaart) growing in North Africa. Ind Crops Prod 2016;(90):32-37.
27. Jang IS, Ko YH, Kang SY, Lee CY. Effect of a commercial essential oil on growth performance, digestive enzyme activity and intestinal microflora population in broiler chickens. Anim Feed Sci Technol 2007;134(3-4):304-315.
 28. Kırkpınar F, Ünlü HB, 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(1-3):219-225.
 29. Abdel-Wareth AAA, Kehraus S, Hippenstiel F, Südekum KH. Effects of thyme and oregano on growth performance of broilers from 4 to 42 days of age and on microbial counts in crop, small intestine and caecum of 42-day-old broilers. Anim Feed Sci Technol 2012;178(3-4):198-202.
 30. Lee KW, Everts H, Kappert HJ, Frehner M, Losa R, Beynen AC. Effects of dietary essential oil components on growth performance, digestive enzymes and lipid metabolism in female broiler chickens. Br Poult Sci 2003;44(3):450-457.
 31. Márquez N, Sancho R, Macho A, Calzado MA, Fiebich BL, Muñoz E. Caffeic acid phenethyl ester inhibits T-cell activation by targeting both nuclear factor of activated T-cells and NF-kappaB transcription factors. J Pharmacol Exp Ther 2004;308(3):993-1001.
 32. Dantas AP, Olivieri BP, Gomes FH, De Castro SL. Treatment of *Trypanosoma cruzi*-infected mice with propolis promotes changes in the immune response. J Ethnopharmacology 2006;103(2):187-193.
 33. Sá-Nunes A, Faccioli LH, Sforcin JM. Propolis: lymphocyte proliferation and IFN-gamma production. J Ethnopharmacol 2003;87(1):93-97.
 34. Huang H, Liu Y, Hou Y, Wen L, Ge H, Peng K, Liu H. Distribution patterns of stromal eosinophil cells in chick thymus during postnatal development. Vet Immunol Immunopathol 2016;153(1-2):123-127.
 35. Buonomo EL, Cowardin CA, Wilson MG, Saleh MM, Pramoongjago P, Petri WA. Microbiota-regulated il-25 increases eosinophil number to provide protection during clostridium difficile infection. Cell Rep 2016;16(2):432-443.
 36. Attia YA, Ibrahim Abd, AE, Ibrahim MS, Al-Harhi MS, Bovera F, Elnaggar ASH. Productive performance, biochemical and hematological traits of broiler chickens supplemented with propolis, bee pollen and, mannan oligosaccharides continuously or intermittently. Livest Sci 2014;(164):87-95.

37. Denli M, Cankaya S, Silici F, Okan A, Uloucak N. Effect of dietary addition of turkish propolis on the growth performance, carcass characteristics and serum variables of quail (*Coturnix coturnix japonica*). Asian-Australas J Anim Sci 2005;18(6):848-854.
38. Althnaian T. Influence of dietary supplementation of Garden cress (*Lepidium sativum* L.) on liver histopathology and serum biochemistry in rats fed high cholesterol diet. J Adv Vet Anim Res 2014;1(4):216-223.
39. Avila-Ramos F, Pro-Martinez A, Sosa-Montes E, Cuca-Garcia JM, Becerril-Perez C, Figueroa-Velasco JL, Ruiz-Feria CA, Hernandez-Cazares AS, Narciso-Gaytan C. Dietary supplemented and meat-added antioxidants effect on the lipid oxidative stability of refrigerated and frozen cooked chicken meat. Poult Sci 2013;92(1):243-249.
40. Haščík P, Trembecká L, Bobko M, Kačániová M, Čuboň J, Kunová S, Bučko O. Effect of diet supplemented with propolis extract and probiotic additives on performance, carcass characteristics and meat composition of broiler chickens. Potravinarstvo 2016;10(1):223-231.