

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

UTILIZAÇÃO DE BLEND DE ÓLEOS ESSENCIAIS E
LEVEDURA AUTOLISADA NA ALIMENTAÇÃO DE
FRANGOS DE CORTE SUBMETIDOS A ESTRESSE
TÉRMICO CRÔNICO

Autora: Gabriela Hernandes Cangianelli
Orientadora: Prof.^a Dr.^a. Eliane Gasparino
Coorientadora: Prof.^a Dr.^a. Ana Paula Del Vesco

Maringá - PR
Julho - 2023

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

UTILIZAÇÃO DE BLEND DE ÓLEOS ESSENCIAIS E
LEVEDURA AUTOLISADA NA ALIMENTAÇÃO DE
FRANGOS DE CORTE SUBMETIDOS A ESTRESSE
TÉRMICO CRÔNICO

Autora: Gabriela Hernandez Cangianelli
Orientadora: Prof.^a Dr.^a. Eliane Gasparino
Coorientadora: Prof.^a Dr.^a. Ana Paula Del Vesco

Dissertação apresentada, como parte das exigências para obtenção do título de MESTRE EM ZOOTECNIA, no Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Estadual de Maringá - Área de Concentração Produção Animal

Maringá - PR
Julho - 2023

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá - PR, Brasil)

C222u

Cangianelli, Gabriela Hernandes

Utilização de blend de óleos essenciais e levedura autolisada na alimentação de frangos de corte submetidos a estresse térmico crônico / Gabriela Hernandes Cangianelli. -- Maringá, PR, 2023.

xiii, 91 f.: il. color., figs., tabs.

Orientadora: Profa. Dra. Eliane Gasparino.

Coorientadora: Profa. Dra. Ana Paula Del Vesco.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Zootecnia, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, 2023.

1. Avicultura. 2. Óleos essenciais. 3. Frango de corte - Alimentação. 4. Frango de corte - Aditivos alimentares. 5. Estresse térmico. I. Gasparino, Eliane, orient. II. Del Vesco, Ana Paula, coorient. III. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências Agrárias. Departamento de Zootecnia. Programa de Pós-Graduação em Zootecnia. IV. Título.

CDD 23.ed. 636.5

Elaine Cristina Soares Lira - CRB-9/1202



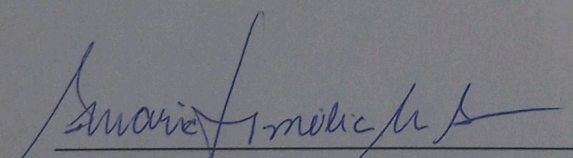
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

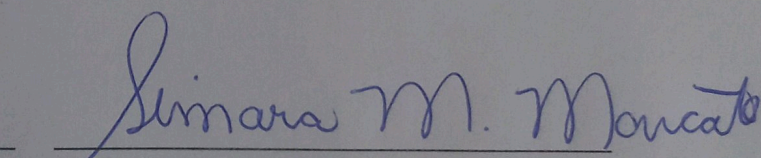
UTILIZAÇÃO DE BLEND DE ÓLEOS ESSENCIAIS E
LEVEDURA AUTOLISADA NA ALIMENTAÇÃO DE
FRANGOS DE CORTE SUBMETIDOS A ESTRESSE
TÉRMICO CRÔNICO

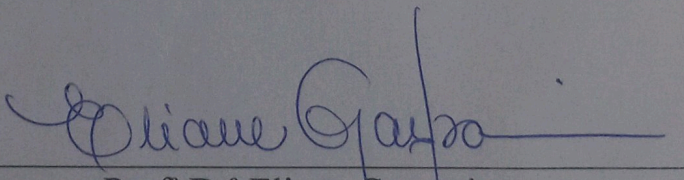
Autora: Gabriela Hernandez Cangianelli
Orientadora: Prof^ª Dr^ª Eliane Gasparino

TITULAÇÃO: Mestre em Zootecnia - Área de Concentração Produção
Animal

APROVADA em 11 de julho de 2023.


Prof^ª Dr^ª Maria Amélia Menck
Soares


Prof^ª Dr^ª Simara Marcia Marcato


Prof^ª Dr^ª Eliane Gasparino
Orientadora

“Seja o que você quer ser,
porque você possui apenas uma vida
e nela só se tem uma chance de fazer aquilo que quer.

Tenha felicidade bastante para fazê-la doce.
Dificuldades para fazê-la forte.
Tristeza para fazê-la humana.
E esperança suficiente para fazê-la feliz.

As pessoas mais felizes não têm as melhores coisas.
Elas sabem fazer o melhor das oportunidades que aparecem em seus
caminhos.

A felicidade aparece para aqueles que choram.
Para aqueles que se machucam.
Para aqueles que buscam e tentam sempre.
E para aqueles que reconhecem a importância das pessoas que passam
por suas vidas.”

Poema “O Sonho” de Clarice Lispector

Ao meu marido, Daniel Negreiros Cangianelli, por ser meu melhor amigo e parceiro de vida, que durante todos esses anos juntos, tem me apoiado, incentivado e inspirado.

Aos meus irmãos, Marcelo Hernandes Dias e Ricardo Hernandes Dias, por serem meu maior orgulho e alegria.

Aos meus pais, Sheila Hernandes Dias e Marcelo Capre Dias, por todo o esforço que me fizeram chegar até aqui.

Aos meus avós, Claudio Gaspar Hernandes e Izabel Escudeiro Hernandes, por terem feito as memórias de minha infância serem tão doces e repletas de amor.

Aos meus tios, Marcelo Escudeiro Hernandes e Elenice Rodrigues Hernandes, por terem me ajudado tanto durante toda a minha vida.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por iluminar meu caminho, por ter me dado forças quando mais precisei e por ser presente até nas coisas mais simples de minha vida.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), pela concessão da bolsa de estudos, que permitiu com que meu trabalho fosse desenvolvido.

A Universidade Estadual de Maringá (UEM) e ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia (PPZ), por ter possibilitado o desenvolvimento deste trabalho.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, por todo o ensinamento.

A Prof^a. Dr^a. Eliane Gasparino, por acreditar em mim, por ter me dado tantas oportunidades e ensinamentos, por ser uma inspiração como pesquisadora. Agradeço muito por todo o carinho e gentileza que a senhora teve comigo durante esse período.

A Universidade Federal de Viçosa (UFV), por permitirem que eu desenvolvesse meu experimento em sua estrutura.

Aos professores do Departamento de Zootecnia da UFV, em especial Prof^a. Dr^a. Simone Eliza Facioni Guimarães, Prof. Dr. Luiz Fernando Teixeira Albino e Prof. Dr. Jansler Luiz Genova, pelo acolhimento e por toda ajuda durante o desenvolvimento de meu experimento.

A empresa GRASP, pelo fornecimento do produto que foi estudado neste experimento.

Ao meu marido Daniel Negreiros Cangianelli, que desde o início da minha graduação, foi meu maior incentivador e apoiador. Muito obrigada por não medir esforços por nós. Muito obrigada por ter me acompanhado durante todos os momentos, para que

eu sempre estivesse amparada. Muito obrigada por ser um exemplo de dedicação, alegria e força. Essa conquista é nossa.

Ao meu irmão Marcelo Hernandes Dias, por sempre me alegrar, dar forças e ouvir quando preciso. Eu sempre estarei aqui por você, assim como você sempre esteve por mim. Ao meu irmão Ricardo Hernandes Dias, por ser um exemplo de superação e por tanto me amar. Vocês são meu orgulho.

Aos meus pais Sheila Hernandes Dias e Marcelo Capre Dias, por todo o esforço investido em meu desenvolvimento e educação. Serei eternamente grata ao amor de vocês.

Aos meus tios, Marcelo Escudeiro Hernandes e Elenice Rodrigues Hernandes. Por terem me levado para a universidade durante toda a graduação, terem me acolhido, por estarem sempre presentes. Muito obrigada por terem me dado primos maravilhosos, Laura Rodrigues Hernandes e Lucas Rodrigues Hernandes.

Aos meus avós, Claudio Gaspar Hernandes e Izabel Escudeiro Hernandes, que me faltam palavras para expressar o que significam em minha vida. Muito obrigada por tanto carinho, amor e dedicação. Muito obrigada por me trazerem conforto mesmo nos dias mais difíceis.

As amigas Gislaine Gonçalves de Oliveira e Keila Mileski Pontes, pelos momentos de alegria e incentivo. Um agradecimento especial a Vitoria Trindade dos Santos, por ter sido tão presente, por ter me apoiado tanto e ter sido uma parceira durante o mestrado.

Ao Dr. Walmir da Silva e os integrantes do Laboratório de Biotecnologia Animal (LABTEC) pelo auxílio no desenvolvimento do experimento e das análises.

A Rosa Aparecida Reis de Léo, pela ajuda no desenvolvimento do experimento e das análises.

A Dr^a. Angélica de Souza Khatlab, por toda ajuda e aprendizado.

Aos integrantes do grupo de pesquisa GeneZ, que sempre me auxiliaram nas atividades em campo.

Aos funcionários do Setor de Avicultura da UFV, por toda a ajuda na organização da estrutura e pelo auxílio no desenvolvimento de meu experimento.

Aos integrantes do Setor de Avicultura da UFV, por toda a ajuda no desenvolvimento de meu experimento.

Aos membros da banca por todas as incríveis e pertinentes contribuições.

BIOGRAFIA

GABRIELA HERNANDES CANGIANELLI, nasceu em Cianorte, Estado do Paraná, no dia 09 de julho de 1998.

Cursou graduação em Zootecnia na Universidade Estadual de Maringá, no período de 2016 a 2021.

Em março de 2021, iniciou no mestrado no Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Estadual de Maringá, área de concentração Produção Animal - Melhoramento Genético Animal, sob orientação da Prof.^a Dr.^a Eliane Gasparino e coorientação da Prof.^a Dr.^a Ana Paula Del Vesco.

No dia 11 de julho de 2023, submeteu-se à banca examinadora para a defesa de dissertação apresentada, como parte das exigências para obtenção do título de mestre em Zootecnia.

ÍNDICE

	Página
LISTA DE TABELAS.....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	ix
RESUMO.....	x
ABSTRACT.....	xii
I. INTRODUÇÃO.....	14
II. REVISÃO DE LITERATURA.....	16
1.0. Estresse térmico na produção de frangos de corte.....	16
2.0. Termorregulação das aves.....	18
3.0. Respostas ao estresse térmico.....	23
3.1. Respostas comportamentais.....	23
3.2. Respostas fisiológicas e metabólicas.....	25
3.3. Respostas neuroendócrinas.....	27
4.0. Efeitos do estresse térmico na saúde intestinal.....	28
5.0. Estresse térmico induz o estresse oxidativo	30
6.0. Efeitos do estresse térmico na composição corporal.....	31
7.0. Aditivos alimentares não antibióticos utilizados na produção de aves de corte..	32
7.1. Levedura de cana-de-açúcar autolisada e desidratada.....	33
7.2. Óleos essenciais.....	36
REFERÊNCIAS.....	38
III. OBJETIVOS GERAIS.....	50
VI. MICROENCAPSULATED SUGARCANE YEAST AND ESSENTIAL OILS ON PERFORMANCE, BODY COMPOSITION, INTESTINAL INTEGRITY AND OXIDATIVE STRESS IN BROILERS SUBMITTED TO CHRONIC HEAT STRESS.....	51
Abstract.....	51
Introduction.....	52
Materials and Methods.....	53
Results.....	60
Discussion.....	76
Conclusion.....	84
References.....	84

LISTA DE TABELAS

	Página
Table 1. Experimental diets and calculated nutrient contents.....	55
Table 2. Effects of environment and diet on performance of broilers in the starter period (1 to 21 days).....	62
Table 3. Effects of environment and diet on performance of broilers in grower and final period (22 to 42 days).....	63
Table 4. Effects of environment and diet on fat and lean mass of animals at 42 days of age.....	64
Table 5. Effects of environment and diet on Bone Mineral Content (BMC) and Bone Mineral Density (BMD) of animals at 42 days of age.....	65
Table 6. Effect of environment and blend inclusions on genes related to jejunum integrity.....	68
Table 7. Effect of environment and blend inclusions on genes related to oxidative stress in liver.....	69
Table 8. Effect of environment and blend inclusions on genes related to oxidative stress in jejunum.....	69
Table 9. Effect of the environment and blend inclusions on the oxidant-antioxidant state of the liver.....	72
Table 10. Effect of the environment and blend inclusions on the oxidant-antioxidant state of the jejunum.....	75

LISTA DE FIGURAS

	Página
Revisão bibliográfica	
Figura 1. Variações da temperatura corporal de um animal homeotérmico em função da temperatura ambiente.....	20
Figura 2. Representação da zona de temperatura ideal e das faixas de temperatura de conforto térmico na primeira e sexta semana de vida de frangos de corte.....	21
Figura 3. Estrutura da parede celular da levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	35
Artigo	
Figure 1. Image obtained by the DXA scanner of a 42-days-old broiler.....	57
Figure 2. Regression effect of blend inclusions on rectal temperatures of broilers from the second to sixth week of life.....	61
Figure 3. Effect of environment on spleen, heart and fat heart weight of 42-days-old broilers.....	66
Figure 4. Regression effect of blend inclusions on intestinal morphometry of 42-days-old broilers.....	64
Figure 5. Effect of environment and diet on <i>HSP70</i> gene expression in the jejunum and liver of 42 days old broiler chickens.....	70

RESUMO

O estresse térmico é um dos problemas que mais afeta a cadeia produtiva de aves, gerando prejuízos ao bem-estar dos animais, além de perdas econômicas. Existe uma tendência de aumento da temperatura global e, por isso, pesquisas com produtos que aumentem a tolerância dos animais frente a esse desafio, são muito importantes. A inclusão de aditivos na dieta tem sido amplamente estudada porque além de trazer efeitos benéficos ao organismo, melhora o aproveitamento de nutrientes. Podendo gerar retornos financeiros, uma vez que a alimentação é um dos fatores mais onerosos dentro do sistema de produção de aves. Os óleos essenciais são compostos derivados de plantas, que se destacam por atuarem na defesa contra patógenos, além de apresentarem efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios. A levedura de cana-de-açúcar autolisada, contribui com componentes de sua parede celular, como os mananoligossacarídeos (MOS), compostos que apresentam efeitos benéficos sobre a população de microrganismos intestinais. Nesse sentido, com este trabalho, objetivou-se avaliar o desempenho, a expressão de genes relacionados a integridade intestinal e estresse oxidativo, a morfometria intestinal e a atividade de enzimas antioxidantes em frangos de corte alimentados com dietas contendo diferentes níveis de um blend composto por levedura de cana-de-açúcar autolisada e de óleos essenciais (capsaicina, carvacrol, cinamaldeído e eugenol), submetidos a duas temperaturas ambientais: conforto (temperatura sugerida pelo manual da linhagem Cobb 500) e estresse por calor crônico (32°C) durante 42 dias de vida. Para isso, no primeiro dia de vida, 500 pintinhos machos foram distribuídos em um delineamento inteiramente ao acaso, em esquema fatorial 2 x 5, com cinco repetições e 10 animais em cada repetição. O primeiro fator avaliado foi o ambiente (Conforto e Estresse Térmico Crônico) e o segundo fator foram os diferentes níveis de inclusão do blend na dieta (0%, 0.75%, 1.5%, 2.25% e 3%). Dos 10 aos 42 dias, foram aferidas

temperaturas retais dos frangos, em dias alternados a cada 3 horas. Aos 21 dias, os animais e a ração fornecida foram pesados para a avaliação de desempenho inicial. Aos 42 dias, os animais foram pesados, assim como a ração fornecida para a avaliação de desempenho do período de crescimento e terminação. Foram selecionados 5 animais de cada tratamento, escolhidos com base no peso médio da repetição, para a avaliação da composição corporal. Também foram selecionados cinco animais de cada tratamento, escolhidos com base no peso médio da repetição, para a coleta de material para as análises de expressão gênica, morfometria intestinal e atividade enzimática, além de avaliação do peso relativo do baço, coração e gordura do coração. Os animais submetidos ao estresse térmico crônico apresentaram maior temperatura retal, do que os animais submetidos ao conforto. A inclusão de 1.5% do blend está associado a redução da temperatura retal dos animais. O desempenho, conteúdo mineral ósseo, densidade mineral óssea e peso do baço e coração foram afetados negativamente pela exposição ao estresse térmico crônico. O ambiente de temperatura elevada aumentou as porcentagens de gordura corporal e gordura cardíaca. Foi observado efeito de regressão linear para a morfometria intestinal. A maior altura de vilosidade foi calculada com 1.45% nos animais submetidos ao conforto e 0.12% para os animais submetidos ao estresse térmico crônico. O nível de 2.12% de inclusão está relacionado com a maior relação vilo/cripta para os animais do conforto e 1.57% para os animais que foram submetidos ao estresse por temperatura. O ponto ótimo de inclusão do blend para a área de superfície intestinal no conforto é 1.5% e no ambiente de estresse térmico crônico, é de 0.27%. O estresse térmico crônico aumentou a expressão gênica da catalase (CAT) no fígado dos animais, mas o aumento da inclusão do blend tende a reduzir a expressão desse gene. Foi observado efeito de interação dos fatores avaliados sobre a atividade da enzima superóxido dismutase (SOD), sendo que os animais que receberam 0% do blend no conforto e 3% do blend em ambos os ambientes, apresentaram as menores atividades da SOD no fígado e no jejuno.

Palavras-chave: aditivos alimentares; avicultura; estresse térmico; fitogênicos

ABSTRACT

Heat stress is one of the problems that most affect the poultry production chain, causing damage to animal welfare and economic losses. There is a tendency for global temperature to increase and, for this reason, research about products that increase the animals' tolerance to this challenge is very important. The additives inclusion in the diet has been widely studied because it brings beneficial effects to the body and improves the nutrients utilization. This can generate financial returns since feed is one of the most expensive factors in the poultry production system. Essential oils are compounds derived from plants, which are notable for acting in the defense against pathogens, besides having antioxidant and anti-inflammatory effects. The autolyzed sugarcane yeast contributes with components of its cell wall, such as mannan-oligosaccharides (MOS), compounds that have beneficial effects on the population of intestinal microorganisms. The objective of this study was to evaluate the performance, the genes expression related to intestinal integrity and oxidative stress, the intestinal morphometry, and the activity of antioxidant enzymes in broilers fed with diets containing different levels of a blend composed of autolyzed sugarcane yeast and essential oils (capsaicin, carvacrol, cinnamaldehyde, and eugenol), submitted to two environmental temperatures comfort (temperature suggested by the Cobb 500 strain manual) and chronic heat stress (CHS) (32°C) for 42 days of life. On the first day of life, 500 one-day-old male broilers were distributed in a completely randomized design, with a 2×5 factorial arrangement, with 5 replications composed of 10 birds per replicate. The first factor evaluated was the environment (Comfort and Chronic Thermal Stress) and the second factor was the inclusion of blend levels in the diet (0%, 0.75%, 1.5%, 2.25% and 3%). From 10 to 42 days, the rectal temperatures of the broilers were measured on alternate days every 3 hours. At 21 days, the animals were weighed, as well as the feed provided, for the initial performance evaluation. At 42 days,

the animals were weighed, as well as the feed provided, for the performance evaluation of the grower and final period. In addition, 5 animals from each treatment, chosen based on average repetition weight, were selected for body composition evaluation. Also, 5 animals from each treatment, chosen based on the average weight of the repetition, were selected for material collection for the analyses of gene expression, intestinal morphometry, and enzyme activity, as well as the evaluation of the relative weight of the spleen, heart, and heart fat. The animals submitted to CHS presented higher rectal temperatures, compared to the animals submitted to comfort. The 1.5% of blend inclusion is associated with reduced rectal temperature of the animals. Performance, bone mineral content, bone mineral density, spleen, and heart weight were negatively affected by exposure to CHS. In addition, the CHS environment increased the percentages of body fat and heart fat. A linear regression effect was observed for intestinal morphometry. The highest villus height was calculated at 1.45% for animals submitted to comfort and 0.12% for the animals submitted to CHS. The 2.12% inclusion level is related to the highest villus/crypt ratio for the comfort animals and 1.57% for the animals that were subjected to CHS. The optimal inclusion point for intestinal surface area in the comfort is 1.5% of the blend and in the CHS environment, it is 0.27%. CHS increased the catalase (CAT) gene expression in the liver of the animals but increasing the blend inclusion tended to reduce this gene expression. An interaction effect of the factors evaluated on the activity of the superoxide dismutase enzyme (SOD) was observed, and the animals that received 0% of the blend in the comfort and 3% of the blend in both environments had the lowest SOD activities in the liver and jejunum.

Keywords: food additives; heat stress; phytogenic; poultry production

I. INTRODUÇÃO

A produção de aves no Brasil tem destaque mundial pela prática de diversos fatores como o melhoramento genético, a nutrição, a sanidade, o bem-estar e a ambiência, além de investimentos em ciência e tecnologia aplicados ao setor. No ano de 2022 a produção brasileira de carne de frango atingiu mais de 14,5 milhões de toneladas, gerando mais de R\$ 110 bilhões. As exportações já passam de 4,8 milhões de toneladas de carne de frango, sendo que o Paraná foi responsável por 40,80% desse montante (ABPA, 2023). Apesar de tais valores de produção de aves terem alavancado ao longo dos anos, o aumento da população mundial demanda mais eficiência do setor avícola em produzir proteína alimentar de alta qualidade e que seja, ao mesmo tempo, de menor custo e segura ao consumo humano. Sendo assim, diversos estudos buscam melhorar e otimizar o sistema de produção, além de reduzir agentes estressores que possam afetar o animal ao longo de sua vida.

Sabe-se que diversas são as causas que podem acometer a saúde do animal, mas dos fatores ambientais, os extremos da temperatura ambiental é a que mais impacta negativamente todo o sistema de produção das aves (Nawab *et al.*, 2018). Essa situação apresenta efeitos diretos na termorregulação das aves, no sistema endócrino, no metabolismo geral, na produção e na reprodução, além de apresentar efeitos indiretos no controle de patógenos e na resistência do sistema imunológico dos animais (Collier *et al.*, 2019). Além disso, o enfrentamento do estresse causado pela temperatura ambiental desvia recursos biológicos que poderiam ser utilizados na manutenção, produção e reprodução dos animais (Shakeri e Le, 2022).

Apesar do sistema de produção de frangos de corte ser uma atividade extremamente eficiente, os animais são muito sensíveis a alterações de temperatura. A

seleção genética resultou em animais com alta taxa de crescimento em curto período de tempo, além de elevada eficiência alimentar, características que estão correlacionadas a altas taxas metabólicas e que aumentam a produção de calor metabólico, tornando ainda mais difícil a manutenção da homeotermia em situações de estresse térmico (Vandana *et al.*, 2021).

Mesmo que a cadeia produtiva avícola tenha se desenvolvido de maneira eficaz, a produção de frangos de corte em regiões tropicais e subtropicais quentes e úmidas ainda é afetada pelo estresse provocado pelo calor (He *et al.*, 2018a, Vandana *et al.*, 2021). A produção de aves é contínua durante o ano, sendo então mais propensas a variações das estações (Leishman, *et al.*, 2021). Relacionado a isso, é importante ressaltar que há tendência ao aumento da temperatura global por causa das mudanças climáticas, sendo de grande importância o estudo e os avanços tecnológicos que visam mitigar os impactos do estresse térmico na produção de aves (He *et al.*, 2018a).

De acordo com Beckford *et al.* (2020), mesmo que já existam tecnologias avançadas de refrigeração para o sistema de produção de aves, as temperaturas elevadas nos meses de verão geram ondas de calor e, nessa situação, os equipamentos de resfriamento podem não ser o suficiente ou ainda, sistemas que utilizam de resfriamento que dependem de água podem levar ao aumento da umidade ambiente, e torna-se um problema dentro da produção animal. Além do mais, existem países produtores de aves que ainda não possuem esse tipo de tecnologia de resfriamento, fazendo com que o estresse por calor seja grande desafio do sistema de produção.

Nesse sentido, manipulações dietéticas, como a inclusão de aditivos alimentares podem ser úteis durante o período de estresse térmico, minimizando os efeitos negativos que impactam o desempenho e geram prejuízos econômicos e a saúde dos animais (Abdel-Moneim *et al.*, 2021). Além disso, o uso indiscriminado e sem prescrição de antibióticos usado com finalidade preventiva e promoção de crescimento na produção animal gerou problema de resistência bacteriana de âmbito global. Dessa forma, são necessárias constantes pesquisas relacionadas às fontes alimentares alternativas em substituição aos promotores de crescimento, pois muitos países consumidores dos produtos avícolas do Brasil já proibiram o uso de antibióticos promotores de crescimento.

Os mananoligossacarídeos (MOS) são componentes da parede celular da levedura de cana-de-açúcar (*Saccharomyces cerevisiae*), e são liberados após a quebra dessa parede, que pode ser através de um processo físico, químico ou enzimático (Chacher *et al.*, 2017). Já foi relatado que o uso de MOS na dieta de frangos de corte melhoraram o

desempenho (Rehman *et al.*, 2020), peso relativo de órgãos linfoides e integridade intestinal (Tufail *et al.*, 2019).

Os óleos essenciais são produzidos através de diversas partes de plantas (Brenes e Roura, 2010). Eles apresentam propriedades antioxidantes, antimicrobianas e imunomoduladoras (Abd El-Hack *et al.*, 2022). Cada composto apresenta propriedades próprias de atividade e efeitos biológicos, por isso, esses compostos podem apresentar efeitos diversos (Zeng *et al.*, 2015). Estudar as combinações entre os óleos essenciais é importante para a determinação de suas atuações no organismo. Já foi relatado que o uso de mananoligossacarídeos (MOS) com óleos essenciais podem atuar em sinergia, melhorando a taxa de crescimento do animal e sendo ótima opção para substituição dos promotores de crescimento (Bozkurt *et al.*, 2009).

Tendo em vista a importância do estudo de aditivos melhoradores que, incluídos na dieta animal, podem melhorar a saúde de frangos sobre condições de estresse térmico, ao desenvolver este trabalho, tendo como objetivo avaliar o desempenho, a expressão de genes relacionados a integridade intestinal e estresse oxidativo, a atividade de enzimas antioxidantes e a morfometria intestinal em frangos de corte alimentados com dietas contendo diferentes níveis de um blend composto de levedura de cana-de-açúcar autolisada e desidratada e de óleos essenciais (capsaicina, carvacrol, cinamaldeído e eugenol) e submetidos a duas temperaturas ambientais: conforto (temperatura sugerida pela linhagem Cobb 500 em cada idade da ave) e estresse por calor crônico (32°C) durante 42 dias de vida.

II. REVISÃO DE LITERATURA

1.0. Estresse térmico na produção de frangos de corte

O estresse é determinado como uma resposta a uma ocorrência exterior que gera tensão e afeta o equilíbrio fisiológico ou a homeostase do animal (Lara e Rostagno, 2013). O estresse térmico é provocado em situação em que a temperatura ambiental, de forma elevada ou reduzida, fica fora da zona de conforto do animal, levando-o a alterar seu metabolismo basal para enfrentá-lo (Collier *et al.*, 2019). Nesse sentido, o estresse térmico pode ser definido como um estado que a ave não é capaz de manter equilíbrio entre a produção e a perda de calor corporal, pois a quantidade de calor produzida supera

a capacidade de dissipação de calor da ave para o ambiente (Akbarian *et al.*, 2016; Wasti *et al.*, 2020).

Na produção de aves, o estresse pela temperatura pode ser classificado de acordo com a duração da exposição. O estresse térmico crônico é caracterizado por persistir em período longo, podendo ser dias ou semanas (Akbarian *et al.*, 2016; Nawaz *et al.*, 2021). Pesquisas são desenvolvidas com esse tipo de estresse para avaliar efeitos sazonais ou de longo prazo dentro da cadeia de produção (Leishman *et al.*, 2021). O estresse crônico ainda pode ser classificado como cíclico ou constante, sendo que no primeiro caso há alternância entre temperatura elevada e de conforto ao longo do dia e, no caso do estresse crônico constante, a temperatura de estresse prevalece durante período contínuo (Akbarian *et al.*, 2016). Por outro lado, o estresse térmico agudo acontece quando ocorre aumento de temperatura, porém num período menor (Oladokun e Adewole, 2022). Estudos que têm o objetivo de avaliar flutuações de curto prazo ou variações no pré-abate, como durante o período de transporte por exemplo, utilizam esse tipo de estresse térmico (Leishman *et al.*, 2021). Porém, independente da classificação, o estresse térmico impacta negativamente em vários aspectos que vão desde o crescimento, produção, bem-estar e a qualidade do produto dentro da produção de aves (Lara e Rostagno, 2013).

Ampliar a exposição ao calor pode alterar o processo de termorregulação e gerar aumento da resistência do animal, através da adaptação ao ambiente (Xie *et al.*, 2014). Porém, mesmo que a aclimatação possa parecer positiva, o desempenho do animal ainda é prejudicado (Rodrigues *et al.*, 2018). Segundo Kang *et al.* (2019), quanto maior o período em que a ave for submetida a alta temperatura, maior será o dano causado à saúde do animal, e consequentemente maior serão as perdas econômicas.

Dentro da produção de aves, o estresse térmico pode ser ocasionado por um conjunto de fatores que vai além da temperatura ambiental, contemplando também seu conjunto com a incidência de luz solar, irradiação térmica, umidade e a velocidade do ar (Lara e Rostagno, 2013). Mesmo que a temperatura ambiental gerada artificialmente no alojamento dos animais esteja em condições ideais, o ambiente externo pode prejudicar a temperatura ou a umidade interna (Bohler *et al.*, 2021). A umidade relativa do ambiente exerce função significativa no estresse térmico. Ela é definida como a quantidade de vapor de água que está presente no ar em determinada temperatura, e está diretamente interligada com a variação da temperatura ambiente em situação de estresse para as aves (Xiong *et al.*, 2017; Oloyou e Ojerinde, 2019). A principal forma de dissipação de calor das aves é a evaporação através da respiração. Esse comportamento gera aumento da

umidade relativa do ar e por isso, ela é inversamente proporcional à habilidade da ave em tolerar alta temperatura (Oliveira *et al.*, 2006).

Lin *et al.* (2005a) demonstraram que para frangos com uma semana de vida, que a temperatura de conforto é perto de 30°C, alterações na umidade relativa levando os animais a ativar um mecanismo de redistribuição de calor pelo corpo e a alterar seus mecanismos de termorregulação. Lin *et al.* (2005b) concluíram que a alta umidade em conjunto com a alta temperatura afetam a transmissão de calor da ave para o ambiente, em frangos de corte de quatro semanas de vida. Esses resultados demonstram como a relação entre esses dois fatores ambientais geram estado de estresse térmico para frangos de corte, independentemente da idade.

Além dos fatores ambientais, as características intrínsecas do animal, como a taxa metabólica, os mecanismos de termorregulação, a idade, o genótipo, entre outros, podem influenciar no estado de estresse térmico (Lara e Rostagno, 2013; Mignon-Grasteau *et al.*, 2015). O frango de corte tem crescimento muito rápido e a sua zona de conforto térmico muda a cada semana. A produção de calor varia de acordo com a idade e o peso do animal, portanto animais mais jovens e mais leves necessitam de faixa de temperatura mais elevada do que animais mais velhos, pois produzem menos calor (Raza *et al.*, 2020). É evidente que o sistema de produção avícola, para manter em equilíbrio, depende de diversos fatores específicos e intrínsecos das aves, bem como de fatores extrínsecos como o controle do ambiente, uma vez que são fatores correlacionados. Sendo assim, para que o estresse térmico seja amenizado, é importante entender as respostas que a ave apresenta a essa situação.

2.0. Termorregulação das aves

O estresse é primeiramente interpretado no hipotálamo (Castillo *et al.*, 2018) e em seguida são geradas respostas imunológicas que, no caso de persistência, o corpo tende a adaptar-se, porém essa resposta sempre ocorrerá de acordo com a intensidade e o tempo de exposição ao fator estressante (Nawaz *et al.*, 2021). Fora da sua zona de conforto térmico, as aves buscam inúmeros mecanismos para regular a temperatura corporal e para isso utilizam do processo denominado de termorregulação. Ela é definida como a habilidade de manutenção da temperatura corporal para manter o normal funcionamento do organismo, mesmo quando a temperatura ambiental não é a ideal (Shakeri e Le, 2022). A termorregulação gera alterações fisiológicas ou comportamentais, que são reversíveis, mas que permitem que o organismo lide com as mudanças na temperatura por períodos

curtos ou longos (Ruuskanen *et al.*, 2021). Para tais finalidades, é necessário que o sistema de termorregulação esteja completamente desenvolvido e isso depende da combinação entre os sistemas nervoso e endócrino, além do controle de isolamento térmico e de produção de calor (Baarendse *et al.*, 2007). Após o nascimento, as aves possuem características similares a animais pecilotérmicos, adaptam sua temperatura corporal de acordo com a do ambiente e, apenas com quatro e cinco dias de idade que começam a apresentar características homeotérmicas (Gonzalez-Rivas *et al.*, 2020). De acordo com Nichelmann e Tzschentke (2002), para aves, que são animais que possuem desenvolvimento precocial, existem fases de desenvolvimento do sistema de termorregulação, mas só após os 10 dias de idade é que a temperatura corporal tende a manter-se constante, independente da temperatura ambiental, num estado de homeotermia completa.

Os processos fisiológicos vitais dos animais dependem de gasto de energia e por isso é importante o suprimento constante e adequado para o organismo, pois se o animal recebe energia excedente ou insuficiente, seu desenvolvimento ou sobrevivência podem ser afetados (Collier e Gebremedhin, 2015). Em momentos em que a temperatura ambiental está muito distante da faixa de temperatura ideal, a termorregulação torna-se uma atividade custosa para o animal (Shakeri e Le, 2022), tanto no calor como no frio, é exigido energia para a manutenção da homeotermia, e como resultado há menos energia disponível para produção (Habeeb, 2020). A Figura 1 ilustra as alterações da temperatura corporal das aves fora de sua zona de conforto térmico ou termoneutralidade. Abaixo da temperatura inferior de conforto térmico, as aves ativam um mecanismo de produção de calor metabólico, denominada de termogênese, e, acima da temperatura superior o animal busca perder calor para o ambiente, no processo chamado termólise (Bridi, 2010; Habeeb, 2020).

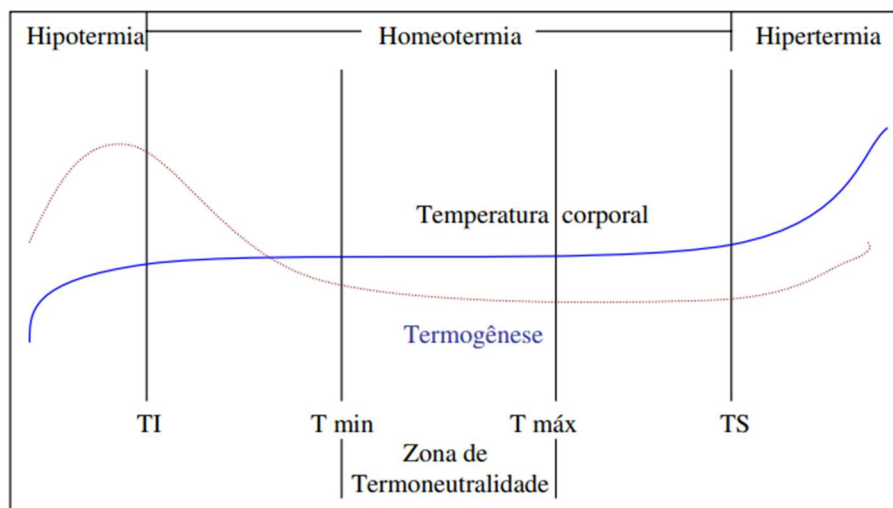


Figura 1. Variações da temperatura corporal de um animal homeotérmico em função da temperatura ambiente. TI: Temperatura inferior; T mín: Temperatura mínima; T máx: Temperatura máxima; TS: Temperatura superior. Fonte: Bridi, 2010.

Além da espécie, a idade da ave pode influenciar a zona de conforto térmico, que varia de temperatura crítica inferior até a superior. Diversos autores e os manuais das linhagens indicam as zonas de temperatura ideal de cada fase de desenvolvimento das aves. Porém, essas faixas podem sofrer alterações por conta de diversos fatores, tais como a densidade populacional, a evolução genética, e/ou as técnicas de manejo (Cassuce *et al.*, 2013). É importante ressaltar que pelo fato de os frangos de corte apresentarem crescimento rápido, produzem uma taxa elevada de calor metabólico, podendo agravar os eventos desencadeados no processo de termorregulação que podem ser irreversíveis (Yahav *et al.*, 2005; Syafwan *et al.*, 2011). A temperatura ambiente adequada para as aves jovens é considerada elevada para aves mais velhas (Figura 2). Dessa forma, cada estágio da vida de frangos de corte possui demanda de um ambiente de temperatura e umidade adequadas para que o animal expresse seu máximo potencial de produção (Cassuce *et al.*, 2013).

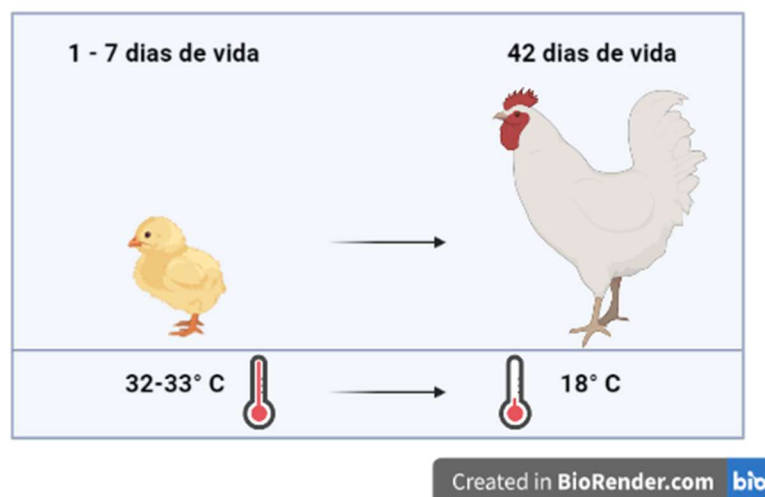


Figura 2. Representação da zona de temperatura ideal e das faixas de temperatura de conforto térmico na primeira e sexta semana de vida de frangos de corte. Dados de temperatura: Manual Cobb, 2008. Figura criada pela autora no site BioRender.com.

Quando a temperatura está abaixo do ideal, ocorre a ativação do centro termorregulatório da ave com o objetivo de aumentar o metabolismo do animal, na tentativa de aumentar e reter o calor corporal (Tavares *et al.*, 2022). Em relação ao estresse por temperatura elevada, existem quatro mecanismos de dissipação de calor das aves, são eles a condução, convecção, radiação e evaporação. A condução ocorre quando o animal transfere calor através do contato para uma superfície mais fria (Habeeb, 2020). Já a convecção ocorre com a troca de calor pela passagem de ar através do corpo do animal (Yahab *et al.*, 2005). A transferência de calor por radiação ocorre através da transmissão de radiação do corpo do animal para o ambiente, por conta da diferença de temperatura entre os dois meios (Yahab *et al.*, 2005). Esse tipo de transferência de calor só é possível porque corpos emitem e absorvem energia em forma de ondas magnéticas continuamente (Romanovsky, 2018). Esses três meios de transferência de calor são considerados sensíveis e operam quando há gradiente de temperatura entre o ambiente e o animal, sendo que quanto maior a temperatura ambiental, menor o gradiente entre o animal e o ar, conseqüentemente, menores serão as perdas de calor sensíveis (Collier e Gebremedhin, 2015).

Nas aves a dissipação de calor é prejudicada pela presença de penas, que atuam como um isolante térmico, e pela ausência de glândulas sudoríparas. Dessa forma, a evaporação, considerada perda de calor latente, ocorre através da eliminação da umidade pelo aumento da frequência respiratória (Habeeb, 2020). Nas aves, a liberação das excretas também ajuda a dissipação de pequena quantidade de calor (Weaver, 2001). As

perdas de calor sensíveis só são eficientes quando a temperatura ambiente está abaixo ou dentro da zona termoneutra das aves (Oloyo e Ajerinde, 2019). Dessa forma, aves em temperaturas superiores a ideal, aumentam a perda de calor através da evaporação (Oliveira *et al.*, 2006). Para que a ave inicie o processo de termorregulação e o desencadeamento das respostas fisiológicas, o organismo precisa identificar a temperatura ao seu redor. Independentemente de ser exposição curta ou prolongada ao calor ou ao frio, as respostas fisiológicas e comportamentais são rápidas e podem afetar todos os sistemas do organismo (Gracheva e Bagriantsev, 2015).

A percepção da temperatura ambiental é feita através de neurônios sensíveis, nos quais são expressos canais iônicos que respondem a alteração de temperatura (Bohler *et al.*, 2021). Esses canais, localizados na membrana celular de neurônios sensoriais, são chamados de termorreceptores, e possuem a função de captar variações de faixas de temperatura e transmitir as informações através dos neurônios (Caro *et al.*, 2012; Cristina-Silva *et al.*, 2022). Esses canais pertencem à família de canais de potencial receptor transiente (TRP) (Castillo *et al.*, 2018). Existem 7 subfamílias de canais TRP, sendo que cada canal é ativado em uma faixa de temperatura específica, e alguns já foram identificados nas aves, como por exemplo, os receptores de calor TRPV1 e TRPA1, e o de frio, o TRPM8 (Gracheva e Bagriantsev, 2015, Castillo *et al.*, 2018). Cristina-Silva *et al.* (2022), determinaram a presença de canais TRPV4 em frangos de corte e são ativados na faixa de 26-31°C, que são fisiologicamente importantes na fase adulta, quando essa faixa de temperatura está acima da temperatura de conforto.

A alteração de temperatura faz com que o canal iônico abra e impulsione a liberação de Na⁺ e Ca²⁺ para dentro do neurônio periférico sensorial (Nelson e Cox, 2014). Ocorrendo a despolarização dos neurônios, que causa um potencial de ação (Gracheva e Bagriantsev, 2015). Os impulsos nervosos gerados pelos neurônios sensoriais que levam a informação da temperatura ambiental são transmitidos por fibras nervosas do tipo Aδ e C (Castillo *et al.*, 2018). As fibras do tipo Aδ são pouco mielinizadas e de tamanho intermediário, enquanto as fibras do tipo C não são mielinizadas e são menores (Uemura, 2017). O diâmetro e a mielinização são fatores que influenciam na velocidade de condução do impulso nervoso, dessa forma, as fibras do tipo C possuem velocidade de condução mais lenta que as do tipo Aδ, que possuem uma condução um pouco mais rápida (Uemura, 2017; Feng, 2014). Esse potencial de ação segue o seu caminho até os terminais do axônio e libera um neurotransmissor que atua como sinal, que é interpretado pelo sistema nervoso central (SNC) (Nelson e Cox, 2014). Quem interpreta esses sinais são as

terminações nervosas localizadas no hipotálamo pré-óptico, responsáveis também pelas respostas de termorregulação do organismo (Caro *et al.*, 2012; Romanovsky, 2018), é a partir dele que ocorre a liberação de impulsos a neurônios que enviam mensagens a medula, gerando ativação de hormônios e do sistema nervoso autônomo (Navas *et al.*, 2016). A partir desses sinais, o animal apresentará diversas respostas ao fator de estresse em questão, gerando alterações comportamentais, fisiológicas e endócrinas. As alterações fisiológicas são consideradas como reações automáticas iniciais em defesa ao estresse térmico, e os animais tentam reduzir a temperatura interna corporal por meio de diversas ações (Shakeri e Le, 2022). Essas respostas podem ser comportamentais, fisiológicas e neuroendócrinas, e são contínuas, adaptativas e inter-relacionadas, além de geralmente gerarem diversos efeitos negativos ao organismo (Oladokun e Adewole, 2022), uma vez que reduzem o consumo de ração e o peso corporal, impactando negativamente a conversão alimentar, a qualidade de carne ou a produção de ovos no caso de poedeiras, além de aumentar a taxa de mortalidade, trazendo diversos prejuízos econômicos aos produtores (Wasti *et al.*, 2020).

3.0. Respostas ao estresse térmico

3.1. Respostas comportamentais

As aves mudam o seu comportamento normal no caso de estresse por calor, em resposta a estímulos enviados pelo hipotálamo para aumentar os mecanismos de perda de calor (Jiang *et al.*, 2021). Essas alterações comportamentais são a primeira linha de defesa na tentativa de manter a homeostase térmica (Oladokun e Adewole, 2022). As aves não possuem glândulas sudoríparas pelo corpo, dessa maneira, a evaporação por esse mecanismo não é uma opção na tentativa de dissipação de calor (Shakeri e Le, 2022). Eriçar as penas e abrir as asas na tentativa de expor áreas que não tenham penas (Rath *et al.*, 2015), em conjunto com a vasodilatação dos vasos sanguíneos superficiais de extremidades sem penas, como cristas e barbelas (Mutaf *et al.*, 2009; Jiang *et al.*, 2021) são comportamentos fundamentais no controle da temperatura corporal. Uma característica observada é o escurecimento da pele, uma vez que o sangue é destinado à extremidade da pele, na tentativa de dissipação de calor (Rath *et al.*, 2015).

Outro comportamento observado é a redução do nível de atividade física (Beckford *et al.*, 2020). Egbuniwe *et al.* (2018) em seus estudos com o uso de betaína e ácido ascórbico, demonstraram que animais do grupo sem suplementação dos antioxidantes e que passaram pelo estresse térmico, tiveram seu comportamento social

alterado, na tentativa de superar os efeitos adversos do calor, os indivíduos distanciam-se, reduzindo a motivação de interação social. Durante o estresse por calor, ainda podem ser observados aumento da sonolência e fechamento dos olhos e aumento do comportamento agressivo (Saaed *et al.*, 2023). Esses comportamentos são utilizados para a dissipação de calor através das trocas sensíveis.

O comportamento está diretamente relacionado com o desenvolvimento animal e suas alterações podem ter impacto no desempenho final (Neves *et al.*, 2014). Essas alterações comportamentais podem ser observadas em qualquer fase de vida do animal. Aves jovens possuem alta taxa de metabolismo e crescimento, mas em contrapartida, possuem baixa taxa de adaptabilidade a condições ambientais (Li *et al.*, 2015). Li *et al.* (2015) avaliaram as primeiras três semanas de vida de frangos de corte e foram observados que os animais submetidos a estresse térmico crônico ou agudo permaneceram mais tempo deitados, além de reduzirem a alimentação e aumentarem a procura pelo bebedouro. Porém, conforme as aves foram ficando mais velhas, foi observado que a ingestão de água tende a aumentar em situação de estresse térmico, além de terem maior dificuldade em lidar com temperaturas elevadas em comparação com as aves mais novas (Li *et al.*, 2015). Animais mais jovens possuem mais dificuldades em lidar com estresse agudo e os comportamentos de deitar, andar, ingerir alimento e água foram mais afetados do que no caso de aves submetidas a estresse crônico (Li *et al.*, 2015).

A falta de glândula sudoríparas também gera o aumento da frequência respiratória para dissipação de calor, através da perda de água pelos pulmões (Rath *et al.*, 2015). A respiração das aves é conduzida pelos sacos aéreos presentes em seus pulmões, e através da movimentação do ar por esse sistema, ocorre a evaporação da umidade, levando a perda de calor corporal (Shakeri e Le, 2022). Além disso, há aumento da produção de excretas como uma das estratégias das aves na perda de calor não evaporativo (Borges *et al.*, 2003). Porém, esses comportamentos levam a desidratação do animal (Yahav *et al.*, 2005). Nesse cenário, há aumento no consumo de água na tentativa de reduzir a temperatura corporal (Chaiyabutr, 2004). De acordo com o manual de manejo de frangos de corte COBB (2008), o consumo de água aumenta 6% para cada grau de temperatura em condições de conforto acima de 20°C. O aumento do consumo de água ainda pode prejudicar a qualidade da cama dos animais, pois há aumento da umidade fecal (Gamba *et al.*, 2015; Rodrigues *et al.*, 2019). Ocorre também a redução do apetite, que está relacionada com a tentativa de redução de ingestão de energia, mas em consequência,

gera a redução do consumo de ração e conseqüentemente a quantidade de nutrientes disponíveis para o crescimento e desenvolvimento animal (Ahmad *et al.*, 2009).

Existem também mudanças comportamentais que ocorrem com a exposição dos animais a temperatura inferior a ideal, como aumento da ingestão alimentar, redução do consumo de água, além da busca por locais secos, de maior temperatura e iluminação, na tentativa de aumentar a retenção de calor interno, compensando a sua perda para o meio externo (Tavares *et al.*, 2022). Além disso, abaixo da zona termoneutra, os termorreceptores sinalizam ao SNC para iniciar um comportamento de tremor (Beckford *et al.*, 2020). Essas respostas tentam compensar sua perda de calor para o meio externo (Tavares *et al.*, 2022).

3.2. Respostas fisiológicas e metabólicas

As respostas comportamentais iniciais são importantes são mecanismos que atuam na regulação da temperatura corporal, mas outros mecanismos biológicos também são necessários na tentativa da manutenção da temperatura corporal. A redução do consumo de ração é caracterizada como uma resposta comportamental, porém o que desencadeia esse comportamento são alterações fisiológicas (Oladokun e Adewole, 2022). O centro de controle do apetite e de interpretação da temperatura externa através dos TRPs, estão no hipotálamo (Chen *et al.*, 2021; Castillo *et al.*, 2018) e os TRPs são canais termorreceptores que sinalizam a elevação da temperatura ao hipotálamo. Eles geram sinais que são interpretados por neurônios, localizados no núcleo arqueado do hipotálamo, e que liberam o neuropeptídeo pró-opiomelanocortina (POMC) (Jeong *et al.*, 2018). O POMC é precursor do hormônio estimulante de melanócito α (α -MSH) e a sua liberação sinaliza aos demais neurônios para que haja a inibição do apetite (Nelson e Cox, 2014). Dessa forma, o aumento da temperatura ambiente sinaliza aos neurônios receptores que geram o POMC e conseqüentemente há a redução na alimentação, causando dessa forma, menor ganho de peso.

O metabolismo de carboidratos e lipídeos, o sistema endócrino e a expressão de adipocinas podem ser afetados pela exposição das aves ao calor (Bayraktar *et al.*, 2023). Adipocinas, como a leptina e a adiponectina são hormônios relacionados a alterações no metabolismo energético e no comportamento alimentar (Nelson e Cox, 2014). Por exemplo, a leptina é um hormônio secretado pelo tecido adiposo e tem a função de sinalizar a saciedade e reduzir o apetite (Goff, 2017). O trabalho desenvolvido por Morera *et al.* (2012), com ratos, indicou que o estresse térmico aumentou a secreção e a expressão

dos hormônios leptina e adiponectina. O aumento de outros hormônios, como a grelina e a colecistoquinina, também refletem na redução do apetite nas aves (Goel, 2021). Nesse sentido, o trabalho de He *et al.* (2018b) indicou que aumento dos níveis de hormônios que impactam a redução da ingestão de ração, como a colecistoquinina, somatostatina, polipeptídeo YY e grelina, em aves que foram expostas a temperaturas elevadas, inibem o apetite pela redução da motilidade intestinal e pelo aumento da saciedade. É importante ressaltar que nas aves, a grelina tem efeito de inibição da ingestão de alimentos, ao contrário do que acontece com os mamíferos (Kaiya *et al.*, 2013).

O aumento da taxa respiratória afeta o equilíbrio ácido-base das aves (Chaiyabutr, 2004), que é conhecido como balanço eletrolítico. Sendo definido pela diferença de concentração entre cátions e ânions (Vieites *et al.*, 2011) e reflete na contínua concentração de íons de hidrogênio (H^+), de modo que ácidos e bases são constantemente acrescentados a líquidos corporais, mantendo a homeostasia do organismo (Reece, 2014). As funções metabólicas e fisiológicas do animal dependem da manutenção deste equilíbrio (Vieites *et al.*, 2011). Essa constante manutenção de íons H^+ nos líquidos corporais são regulados pelos sistemas tampões, que são misturas de ácido fraco com a base conjugada, como por exemplo ácido carbônico (H_2CO_3) e íon bicarbonato (HCO_3^-), que compõem o sistema tampão de bicarbonato (Reece, 2014), fundamental na manutenção do pH das aves, que é levemente alcalino (7,2 a 7,57) (Tavares *et al.*, 2022). Quando o animal aumenta sua frequência respiratória, a excreção de CO_2 celular supera a produção, reduzindo a concentração de H_2CO_3 e íons H^+ , levando ao desequilíbrio do sistema ácido-base provocando a diminuição da pressão arterial parcial de dióxido de carbono (pCO_2) (Borges *et al.*, 2003; Santos *et al.*, 2018). Com a redução nas concentrações de H_2CO_3 e íons H^+ , há aumento da concentração de HCO_3^- , resultando na elevação do pH sanguíneo, afetando o equilíbrio ácido-base e tornando o sangue mais alcalino (Chaiyabutr, 2004; Wasti *et al.*, 2020), gerando um estado, chamado de alcalose respiratória, que prejudica o desempenho dos animais (Borges *et al.*, 2007).

Outra resposta emitida pela ave ao ser exposta a alta temperatura é o aumento da produção de proteínas conhecidas como proteínas de choque térmico (HSPs). Estas proteínas são produzidas pelas células que sofrem algum tipo de estresse, geralmente o estresse térmico, além de serem responsáveis pelo processo de apoptose das células que sofreram ação do estresse (Nawaz *et al.*, 2021). Das famílias das HSPs, as mais estudadas são a HSP70 e HSP90 (Xie *et al.*, 2014). A HSP70 é expressa em diversos órgãos, sangue e penas das aves, sendo que a sua síntese é desencadeada por uma variedade de

estressores, como infecção, exposição a toxinas, provação de água, estresse por transporte, e, por isso, é um biomarcador importante no monitoramento dos níveis de estresse nas aves (Greene *et al.*, 2019). Os genes *HSPs* aumentam a sua expressão rapidamente no fígado em animais expostos ao estresse térmico, pois essa é uma tentativa do organismo em gerar proteção celular, sendo esse um biomarcador da presença do estresse (Kang *et al.*, 2019), mas, a duração e a severidade do estresse enfrentado determinarão o nível de expressão desses genes (Xiu, *et al.*, 2014). As *HSPs* também atuam na mobilização das células imunes do organismo (Nawaz *et al.*, 2021). Elas participam do sistema endógeno de defesa e têm a função de reparar rapidamente danos ocorridos em proteínas, preservando a integridade de células frente a variedade de agressores, inclusive o estresse por temperatura (Moura *et al.*, 2018).

3.3. Respostas Neuroendócrinas

O estresse térmico desencadeia alterações endócrinas que podem comprometer o funcionamento normal do organismo. Os hormônios tireoidianos são importantes no processo de adaptação ao calor, tendo papel nos ajustes das taxas metabólicas em busca do equilíbrio térmico (Melesse *et al.*, 2011). O hormônio tiroxina (T4) é secretado pela glândula tireoide e é convertido em triiodotironina (T3) no fígado e em outros tecidos (Beckford *et al.*, 2020). Porém, em situações de temperatura elevada, os hormônios tireoidianos diminuem na tentativa de reduzir o desempenho das aves (Abhay *et al.*, 2015). Essa redução da atividade vem em conjunto com a redução do consumo de ração, causando menor taxa de metabolismo termogênico (Melesse *et al.*, 2011). A redução da produção do hormônio tireoideano está relacionada à deficiência da atividade da glândula hipófise durante o estresse, que reduz a produção do hormônio do crescimento (GH) (Tavares *et al.*, 2022). A redução dos hormônios tireoidianos reduz ainda o metabolismo de proteínas e lipídeos (Tavares *et al.*, 2022). Em seu estudo Beckford *et al.* (2020) demonstrou que em situações de estresse térmico, houve aumento da concentração de T4 e redução da concentração de T3.

Neurônios localizados no colículo inferior do núcleo paraventricular do hipotálamo sintetizam o hormônio liberador de corticotropina e vasopressina, resultando na síntese do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), após a identificação do estresse térmico (Chen *et al.*, 2021). O ACTH então ativa as células adrenocorticais para que ocorra a síntese e liberação da corticosterona (CORT) e das catecolaminas (Chen *et al.*, 2021). O principal hormônio relacionado ao estresse das aves é a corticosterona, que é

um glicocorticoide liberado pelo eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) e em situações de estresse térmico, as aves apresentam elevados níveis desse hormônio (Calefi *et al.*, 2017; Beckford *et al.*, 2020). Os glicocorticoides são hormônios que estão relacionados com o metabolismo de lipídeos, proteínas e carboidratos (Tavares *et al.*, 2022). Ao mesmo tempo, o sistema nervoso simpático libera as catecolaminas, epinefrina e norepinefrina (Calefi *et al.*, 2017).

De acordo com Quinteiro-Filho *et al.* (2010), a corticosterona pode afetar os núcleos hipotalâmicos de controle de alimentação e satisfação, reduzindo o consumo alimentar e por consequência, prejudicando o desempenho das aves. O aumento da corticosterona provoca um feedback negativo de produção de citocinas, suprimindo as respostas imunes dos animais (Wiegers *et al.*, 2005), ao mesmo tempo que o estresse térmico ainda pode aumentar os níveis de citocinas pró-inflamatórias (Rostagno, 2020).

4.0. Efeitos do estresse térmico na saúde intestinal

O intestino exerce papel importante no desempenho e na saúde do animal, efetuando a função de digestão e absorção de nutrientes. Segundo Neves *et al.* (2014), o sistema digestório das aves é simples e curto. O bico recolhe o alimento e o seleciona por meio de células táteis e pelo gosto, pois embora o número de papilas gustativas seja pequeno, elas estão presentes (Neves *et al.*, 2014). O alimento é engolido inteiro com pequena quantidade de saliva e é levado ao papo, e é acidificado pelo ácido láctico, posteriormente passa para o proventrículo, ocorrendo a ação de ácidos e pepsina sobre o alimento, que é então direcionado a moela sofrendo ação mecânica (Neves *et al.*, 2014). Só após isso, o alimento chega ao intestino, ocorrendo a digestão e absorção dos nutrientes. Conforme revisado por Rostagno (2020) o sistema digestivo comunica com o cérebro através do eixo cérebro-intestino, que envolve o sistema nervoso entérico e autônomo, além do HPA e SNC. A manutenção do epitélio intestinal íntegro e da saúde intestinal permite a absorção de nutrientes e macromoléculas e ao mesmo tempo, fornece proteção contra agressores, como as bactérias patogênicas por exemplo (Song *et al.*, 2014). Um epitélio intestinal saudável apresenta alta taxa de renovação celular, e as células epiteliais são rapidamente substituídas por novas, derivadas de células-tronco localizadas nas criptas (Santo *et al.*, 2014). Quando as células epiteliais intestinais estão intactas, é garantida a proteção contra a entrada de patógenos (Goel, 2020). Dessa forma, quando a mucosa intestinal é lesionada refletirá na redução da proteção da barreira

intestinal interferindo em funções do intestino como por exemplo, na absorção de nutrientes (Song *et al.*, 2014).

O estresse sofrido pelo animal pode causar infecções e inflamações no trato gastrointestinal (Rostagno, 2020). Em conjunto com o aumento da corticosterona, o aumento de espécies reativas de oxigênio (ROS), espécies reativas de nitrogênio (RNS) e citocinas inflamatórias circulantes afetam a homeostase intestinal (Hosseindoust *et al.*, 2022). Shakeri *et al.* (2019) em seus estudos, demonstraram que o estresse térmico compromete a barreira intestinal, reduzindo a área de superfície do vilão e a profundidade de cripta. Da mesma forma que Santos *et al.* (2014) concluíram que as aves submetidas a 4 dias de estresse térmico apresentaram alterações no tamanho dos vilos e das criptas do duodeno e jejuno.

Como já descrito anteriormente, uma das respostas fisiológicas das aves é a vasodilatação dos vasos sanguíneos superficiais (Jiang *et al.*, 2021) e a intensificação do fluxo sanguíneo para a pele, resultando na redução do fluxo sanguíneo de outros órgãos da ave, como os do sistema gastrointestinal, hepático e renal, tornando esses órgãos sensíveis ao estresse térmico (Shakeri e Le, 2022). A falta de fornecimento sanguíneo reduz o fluxo de oxigênio na mucosa intestinal, causando estresse oxidativo e nitrosativo, em conjunto com o aumento dos níveis de corticosterona e de catecolaminas, situações que favorecem o afrouxamento das junções epiteliais (Rostagno, 2020). Além disso, quando a ave reduz o consumo de ração em resposta ao estresse térmico, um impacto negativo na atividade secretória enzimática do intestino é observado, comprometendo a funcionalidade digestiva do órgão (Rostagno, 2020).

As aves possuem uma microbiota intestinal que é composta por bactérias, protozoários e fungos, que permanecem em equilíbrio (Lemos *et al.*, 2016). Porém, essa microbiota é sensível a efeitos ambientais, incluindo o estresse térmico (Rostagno, 2020). De acordo com Ahmad *et al.* (2022), o estresse térmico favorece o aumento da população de microrganismos patogênicos na comunidade microbiana intestinal das aves, porque a microbiota pode ser modificada por diversos fatores, como a ingestão de antibióticos, infecções por patógenos, ou fatores ambientais em que o hospedeiro é submetido (Kogut, 2019). Esse fato é prejudicial, uma vez que a microbiota benéfica presente no intestino da ave desempenha entre outras funções a prevenção de infecções oportunistas causadas por patógenos por mediar respostas imunes, competir por sítios de ligação, além de produzirem ação semelhante à de antibióticos (Chen *et al.*, 2022). Além disso, o aumento

do consumo de água, bem como a redução do consumo de ração podem modificar a população da microbiota intestinal (Ahmad *et al.*, 2022).

5.0. Estresse térmico induz o estresse oxidativo

O estresse oxidativo pode ser considerado como uma das principais respostas do estresse térmico das aves (Lin *et al.*, 2006; Goel, 2021). As espécies reativas de oxigênio (ROS) são radicais livres e peróxidos que quando produzidas em concentrações normais, são fundamentais para processos celulares, porém o excesso desses compostos é eliminado para fora das células (Wasti *et al.*, 2020). São moléculas que contêm radical livre capaz de oxidar componentes celulares (Emami *et al.*, 2020). Essas moléculas oxidadas roubam elétrons de outras moléculas, e se essas reações não forem controladas, danos teciduais são gerados (Akbarian *et al.*, 2016). O excedente de ROS intensifica o envelhecimento dos músculos, a degradação de proteínas e prejudica a função do DNA e RNA no organismo (Nawaz *et al.*, 2021), e quando a situação é mais prolongada, observa-se ainda apoptose ou necrose celular (Akbarian *et al.*, 2016). Em situações normais, ocorrem vazamentos de elétrons durante a fosforilação oxidativa da cadeia respiratória, mas as células são equipadas com sistemas enzimáticos, que atuam na redução de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), molécula que pode atingir diversas células e tecidos (Akbarian *et al.*, 2016). Esses sistemas podem ser não enzimáticos, como é o caso da vitamina C, ou enzimáticos, que são através das enzimas superóxido dismutase (SOD), sistema da glutathiona peroxidase (GSH-Px) e catalase (CAT), mas possuem um objetivo comum, que é tentar reduzir a taxa de oxidação, protegendo as células contra danos celulares (Akbarian *et al.*, 2016, Habashy *et al.*, 2019). O sistema de defesa enzimático converte as ROS em espécies menos reativas (Habashy *et al.*, 2019).

O estresse térmico afeta o funcionamento das mitocôndrias, pelo aumento da geração de ROS resultando em alterações metabólicas energéticas, pois essas organelas possuem papel importante no metabolismo energético, como a fosforilação oxidativa e a oxidação do substrato (Lu *et al.*, 2017). As mitocôndrias possuem fosfolipídeos com ácidos graxos poli-insaturados em suas membranas, e pela proximidade do local de geração de ROS, esses fosfolipídios são altamente predispostos aos danos oxidativos (Emami *et al.*, 2020), podendo ocorrer redução de seu potencial de membrana e redução da capacidade de desintoxicar ROS (Akbarian *et al.*, 2016). Lu *et al.* (2017), determinaram que o período de sete dias de exposição a estresse térmico crônico, causou danos irreversíveis às

mitocôndrias de aves. Habashy *et al.*, 2019 relatam que a exposição ao estresse por calor aumenta a peroxidação lipídica no músculo dos frangos de corte.

Contudo, no caso de estresse térmico crônico, existem adaptações do organismo que preservam as funções mitocondriais, e permitem que os tecidos se adaptem (Emami *et al.*, 2020). Por exemplo, Azad *et al.* (2010) demonstraram que as aves que foram expostas ao estresse térmico crônico apresentaram aumento da atividade da enzima SOD, mas não da GPx, evidenciando que o estresse térmico crônico pode não induzir a dano oxidativo de grandes extensões. Isso foi relatado por Pamok *et al.* (2009), quando houve aumento da atividade da enzima GPx no período inicial de exposição, mas que foi reduzido com o passar do tempo.

Existe um mecanismo mitocondrial que auxilia no controle da produção do radical superóxido, que é regulado pelas proteínas de desacoplamento (UCP), que pertencem à família das proteínas transportadoras mitocondriais (Pamplona e Costantini, 2011; Akbarian *et al.*, 2016). O aumento da expressão de UCP é induzido pela presença de ROS, e tende a neutralizar o estresse oxidativo (Emami *et al.*, 2020). O estresse térmico agudo regula negativamente a síntese de UCP em aves, e gera superprodução de ROS, mas o estresse térmico crônico funciona de maneira oposta e regula positivamente a síntese de UCP na tentativa de diminuir a produção de ROS (Akbarian *et al.*, 2016).

6.0. Efeitos do estresse térmico na composição corporal

Em relação a composição e qualidade de carne dos frangos de corte, o estresse térmico desencadeia diversos efeitos negativos, que são resultados de alterações fisiológicas e hormonais já citadas anteriormente. A perda na qualidade de carne dos animais está diretamente relacionada às perdas econômicas. A redução do consumo de ração é fator que impacta no peso e no rendimento da carcaça, mas não em alterações na composição corporal (Zhang *et al.*, 2020). Mas, os danos causados à qualidade de carne estão relacionados aos danos causados as mitocôndrias, uma vez que com a diminuição de suas atividades, há redução do metabolismo aeróbico de gordura e da glicose, além de aumentar a glicólise e a deposição da gordura intramuscular (Lu *et al.*, 2007). O aumento do nível de ROS impacta diretamente sobre a qualidade da carne de aves que foram submetidas a estresse por temperatura (Zaboli *et al.*, 2019). O trabalho de Lu *et al.* (2017), que avaliou os danos oxidativos causados pelo estresse térmico crônico, observaram que apesar de não serem observados danos na qualidade de carne após sete dias de exposição, danos mitocondriais foram observados, os quais geraram prejuízos a qualidade da carne

após 14 dias de exposição. Porque essa disfunção mitocondrial causa a diminuição na atividade metabólica de lipídeos e glicose, fatos que causam redução do pH e da força de cisalhamento, além de aumentar as perdas por gotejamento (Lu *et al.*, 2017).

Já foi reportado por De Antonio *et al.* (2017) que o aumento do teor da gordura na carcaça de frangos expostos a estresse por temperatura pode ser regulado por mecanismos distintos. Segundo os mesmos autores, a maior deposição de gordura na carcaça de animais que foram expostos a estresse térmico crônico, está relacionada a maior expressão do gene receptor do hormônio de crescimento (GHR), o qual está relacionado a redução do catabolismo do tecido adiposo e aumento da expressão do gene da proteína de ligação a elementos reguladores de esteróis 1c (SREBP-1), que por sua vez, relaciona-se com aumento da lipogênese. O aumento da deposição de gordura ainda pode estar relacionado a redução do metabolismo basal (Geraert *et al.*, 1996). O trabalho de Lu *et al.* (2007) concluiu que os frangos de corte, de uma linhagem de crescimento rápido, expostos a temperatura elevada apresentam maior deposição de gordura abdominal e reduz a proporção de músculo do peito, impactando negativamente sobre o rendimento de carne. Porque na fase de terminação, o estresse térmico crônico afeta a capacidade ribossômica impactando negativamente na síntese proteica (Zhang *et al.*, 2012).

7.0. Aditivos alimentares não antibióticos utilizados na produção de aves de corte

Dentro da cadeia produtiva de aves, a alimentação representa a maior porcentagem de custo de produção e, por isso, a inclusão de aditivos e outros produtos nutricionais na dieta são alternativas que melhoram a eficiência alimentar e a taxa de crescimento (Munglang e Vidarthi, 2019). Aditivos são incluídos na alimentação do animal com uma das finalidades de melhorar a saúde intestinal, pois um sistema digestório saudável resulta em melhor absorção dos nutrientes, estabilidade da microbiota, melhora na conversão alimentar, resultando em melhor desempenho, da mesma forma que, quando a saúde intestinal está afetada a absorção e utilização dos nutrientes também é afetada (Shakeri e Le, 2022). A inclusão de ingredientes que amenizam o estresse pelo calor pode melhorar o consumo de ração e, conseqüentemente, o desempenho das aves (Teeter *et al.*, 1985). De acordo com Santos *et al.* (2018), alterações estruturais nas instalações de aves são onerosas e alternativas nutricionais que busquem aliviar os efeitos do estresse térmico no desempenho das aves, estão sendo amplamente utilizadas. A manipulação da dieta pode auxiliar aves que enfrentam a alcalose respiratória durante exposições crônicas ou agudas

de estresse por temperatura, por exemplo (Teeter *et al.*, 1985). Por isso, estratégias na nutrição e a suplementação de nutrientes são muito importantes a fim de minimizar os efeitos negativos e melhorar o desempenho animal. A maior parte dos aditivos nutricionais tem a função de manter a homeostase intestinal, com o objetivo da manutenção da barreira intestinal (Chen *et al.*, 2022).

Um outro problema enfrentado não só pela cadeia produtiva de aves, mas também, pela produção das demais espécies de interesse zootécnico, é a resistência de bactérias a antibióticos utilizados como promotores de crescimento (AGPs), que ocorre pelo uso indevido desses compostos. Para isso, uma das soluções foi a proibição do uso dos antibióticos promotores de crescimento e utilização de produtos alternativos que continuassem a sustentar a eficiência que a cadeia produtiva de aves tem atualmente (Zhai *et al.*, 2018). Além disso, há crescente interesse dos consumidores por produtos isentos de antibióticos, e no ano de 2006 a União Europeia proibiu a comercialização e uso de antibióticos promotores de crescimento para animais de produção (Santovito *et al.*, 2018), evidenciando a necessidade de pesquisas que encontrem alternativas. Mesmo que os AGPs apresentem custo favorável para a produção, as proibições têm impulsionado pesquisas que os substituam (Lemos *et al.*, 2016).

Dessa forma, ácidos orgânicos, probióticos, prebióticos, enzimas e as vitaminas, são alguns dos exemplos de produtos que são estudados para atuar como substitutos aos AGPs (Salim *et al.*, 2018). Alguns produtos naturais como especiarias, extratos de plantas e ervas, e óleos essenciais, têm recebido atenção neste estudo na procura de alternativos (Krishan e Narang, 2014). Além disso, já foi relatado que prebióticos e probióticos, componentes que atuam na estabilização da microbiota, podem mitigar os efeitos do estresse térmico (Hosseindoust *et al.*, 2022).

7.1. Levedura de cana-de-açúcar autolisada e desidratada

De acordo com os dados da FAO (2022), o Brasil é o maior produtor de cana-de-açúcar do mundo, sendo responsável por 40% da produção mundial no ano de 2020. A indústria sucroalcooleira gera subprodutos que podem ser utilizados como alternativos, como é o caso da levedura de cana-de-açúcar (*Saccharomyces cerevisiae*) (Lopes *et al.*, 2015). *Saccharomyces cerevisiae* é um fungo unicelular aeróbio obrigatório ou anaeróbio facultativo, que é utilizado como levedura há muitos anos pelo homem na produção de alimentos e bebidas (Lemos *et al.*, 2016). Esse alternativo tem grande relevância na

nutrição de aves, por ser uma fonte proteica de alto valor biológico, além de atuar melhorando a absorção de nutrientes (Lopes *et al.*, 2017).

A levedura íntegra pode apresentar baixa digestibilidade pela presença da parede celular rígida, mas o processo de autólise é capaz de quebrar essa parede celular e ainda disponibilizar o conteúdo intracelular tornando-os disponíveis para utilização pelo animal (Kaewtapee *et al.*, 2022). Para esse fungo ser liberado, a parede celular da levedura precisa ser quebrada através de processos que podem ser físicos, químicos ou enzimáticos (Chacher *et al.*, 2017). Cerca de 25% da parede da *Saccharomyces cerevisiae* é composta por mananoproteínas ou proteínas da parede celular, glucanos, quitina e N-acetilglucosamina, sendo que da porção de proteínas da parede celular, de 50 a 90% são mananas (Chacher *et al.*, 2017). A parte externa da célula é composta pela parede celular, espaço periplasmático e pela membrana plasmática, componentes que ocupam cerca de 15% do volume total da célula de levedura (Liu *et al.*, 2016). As ligações do tipo β -2.6 e β 1.3 dos glucanos são as que garantem a resistência da parede celular (Liu *et al.*, 2016). Na forma autolisada, sua parede celular é quebrada e o conteúdo celular é liberado, podendo servir ainda como fonte de proteína para alimentação das aves (Moniruzzaman and Mollah, 2019).

Os MOS atuam por meio de duas formas (1) aderindo as bactérias patogênicas impedindo que iniciem a colonização no intestino do animal e (2) modulando o sistema imune, por se ligarem em receptores de macrófagos na superfície das células intestinais (Lemos *et al.*, 2016). No intestino das aves existem macrófagos, que são componentes do tecido linfóide associados ao intestino e são células que possuem a função de identificar os patógenos através de padrões moleculares associados a patógenos (PMAPs) (Chacher *et al.*, 2017). Mananos e glucanos, da parede celular de leveduras, assim como lipopolissacarídeos e peptidoglicanos, possuem PMAPs (Chacher *et al.*, 2017).

Bactérias gram-negativas como *Salmonella* e *E. coli*, possuem fímbrias do tipo 1 com lectina, que se ligam a manoses e quando se ligam aos MOS são impedidos de se ligar a manose intestinal (Benites *et al.*, 2008). As fímbrias do tipo 1 dessas bactérias possuem lectinas específicas a manoses, denominadas FimH, as quais possuem alta afinidade por resíduos de manoses que estão presentes no epitélio intestinal (Chacher *et al.*, 2017). Os MOS ligam-se às fímbrias dos patógenos, aglutinando a eles e impedindo a multiplicação (Figura 3) (Santovito *et al.*, 2018). Os componentes da parede celular são indigeríveis para os animais e seus benefícios de uso estão relacionados com o estímulo de crescimento da microflora benéfica do trato, e quando prevalecem impedem a adesão

de patógenos, gerando a melhora sob o estado de saúde dos frangos (Cueca *et al.*, 2022). Através dessa competição nos sítios de ligação, o MOS favorece a prevalência de bactérias benéficas, como *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* (Baurhoo *et al.*, 2009).

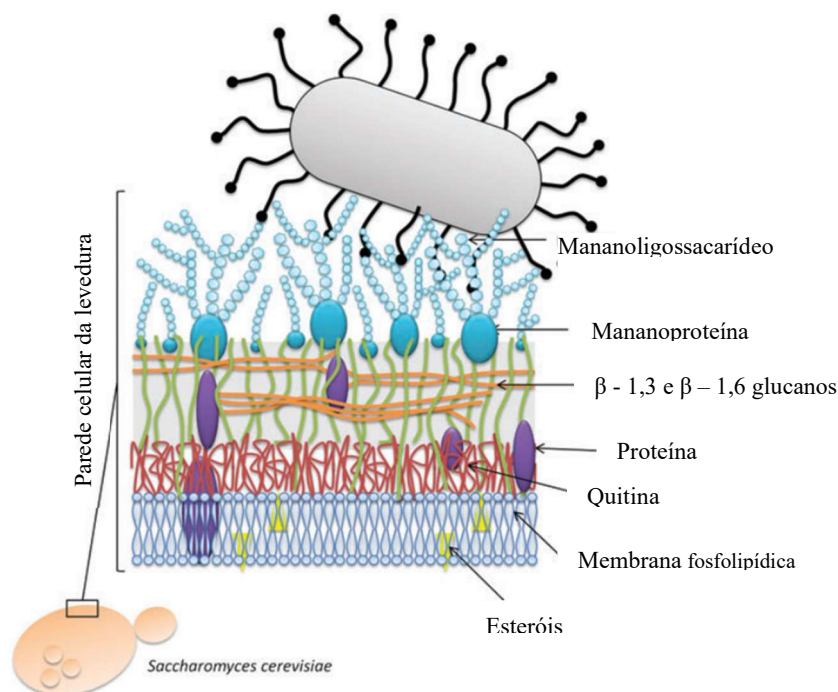


Figura 3. Estrutura da parede celular da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. (Fonte: adaptado de Santovito *et al.*, 2018).

Componentes da parede celular de leveduras têm se mostrado como bons alternativos melhoradores, que melhoram a microflora intestinal e imunidade do animal, impedindo a contaminação por bactérias patogênicas (Santovito *et al.*, 2018). O MOS também aumenta a fermentação da dieta, a produção de ácidos graxos de cadeia curta, que estão envolvidos na proliferação intestinal e na manutenção da mucosa intestinal, melhorando a saúde intestinal (Chacher *et al.*, 2017). Lopes *et al.* (2017) avaliaram a inclusão de levedura de cana-de-açúcar na dieta de aves na fase pré-inicial e concluíram que houve melhora na absorção nutrientes, pelo aumento na altura das vilosidades e profundidade de cripta do jejuno, além da melhora na relação vilo:cripta do íleo. Afsharmanesh *et al.* (2010) concluíram que a inclusão de *Saccharomyces cerevisiae* na dieta de frangos de corte, reduziu o teor de gordura abdominal e reduziu a população de coliformes no íleo dos animais. Sob efeitos de estresse imunológico, a inclusão de células da parede celular da levedura previne a involução da Bursa de Fabricius, auxiliando os animais a superarem os desafios microbianos (Moralez-Lopez e Brufau, 2013). Benites

et al. (2008) utilizaram MOS e observaram que a inclusão de 0.5kg/ton foi capaz de melhorar o desempenho de frangos de corte aos 42 dias de idade. Foi relatado por Sohail *et al.* (2012), que o uso de MOS ainda pode ajudar parcialmente na redução dos efeitos do estresse térmico crônico, reduzindo os níveis de corticosterona sérica. Pascual *et al.* (2020) demonstraram que a inclusão da parede celular de levedura auxiliou no aumento da secreção de glicoconjugados no intestino das aves, fato que pode auxiliar a combater a infecção por patógenos. De acordo com Baurhoo *et al.* (2009), MOS aumenta a produção de mucina no intestino. Esse processo é benéfico pois a contínua secreção de mucina, em conjunto com movimentos peristálticos, auxiliam a excreção de patógenos que podem estar aderidos a parede intestinal (Baurhoo *et al.*, 2009).

7.2. Óleos essenciais

Os óleos essenciais são compostos insolúveis em água, mas solúveis em álcool, éter e óleos (Dhifi *et al.*, 2016). Podem ser obtidos de diferentes partes da planta, como das flores, folhas, sementes, raízes e caules (Arlidogan *et al.*, 2002). Possuem odor característico da planta que são extraídos (Dhifi *et al.*, 2016). Os mais utilizados em aves de produção são os originados de plantas como orégano, alho, tomilho, alecrim, pimenta e sálvia (Munglang e Vidyarthi, 2019). Antioxidantes, como os compostos fenólicos e alcaloides (aldeídos) derivados dos extratos das plantas, ajudam na prevenção contra os efeitos negativos gerados pelo estresse oxidativo (Zhang *et al.*, 2020), além de apresentarem alta atividade antimicrobiana (Dhifi *et al.*, 2016).

Esses compostos são propensos a degradação no estômago, tendo baixa disponibilidade na porção absorptiva do intestino, por isso, a encapsulação é uma alternativa que protege contra essa degradação que pode ser causada por alterações no pH, variações de luz ou temperatura (Rossi *et al.*, 2020). Já foi relatado por Rossi *et al.* (2020) que os óleos essenciais podem apresentar efeitos antimicrobianos, anti-inflamatórios, antioxidantes e imunomoduladores. A redução no número de papilas gustativas faz com que as aves aceitem níveis de especiarias na ração sem reduzir o consumo, ou rejeitá-la, ao contrário do que acontece com mamíferos (Brenes e Roura, 2010). Segundo Hernandez *et al.* (2003), os extratos de plantas regulam a colonização de bactérias patogênicas e não patogênicas no intestino, assim como os antibióticos.

O carvacrol é o maior constituinte dos óleos essenciais de orégano e tomilho (Zotti *et al.*, 2013). Quando interage com os receptores TRPA1, o carvacrol reduz a produção e liberação de citocinas pró-inflamatórias e estresse oxidativo (Alvarenga *et al.*, 2016). Esse

composto ainda melhora a estrutura intestinal, aumentando a profundidade de cripta e a altura dos vilos (Alvarenga *et al.*, 2016). Além disso, o carvacrol inibe o crescimento e produção de toxinas de microrganismos patogênicos como *E. coli*, *Salmonella* e *B. cereus* (Sharifi-Rad *et al.*, 2018). O carvacrol desintegra a membrana plasmática de bactérias gram-positivas (Kachur e Suntres, 2020), uma vez que compostos presentes em sua estrutura interage com membranas celulares, afetando a estabilidade da bicamada lipídica, reduzindo a integridade das mesmas e gerando um fluxo de prótons por essas membranas (Na Arfa *et al.*, 2006). Já foi relatado que a suplementação de carvacrol, em conjunto com timol, melhora o desempenho, aumenta a atividade de enzimas antioxidantes SOD e GPx, reduz a oxidação lipídica e melhora a atividade de enzimas digestivas em frangos de corte (Hashemipour *et al.*, 2013). Já em relação ao desafio por lipopolissacarídeo (LPS), Liu *et al.* (2019) concluíram que a inclusão do carvacrol inibiu a secreção de citocinas inflamatórias, mostrando que esse composto apresenta potenciais funções anti-inflamatórias.

Já o eugenol, classificado como monoterpeneo, pode ser extraído de plantas como o cravo e manjeriço (Rossi *et al.*, 2020). Ele auxilia na manutenção da biodiversidade da microbiota intestinal e melhora a secreção de enzimas digestivas (Aljuwayd *et al.*, 2023). Foi relatado por Zhao *et al.* (2022) que a inclusão de eugenol na dieta de frangos de corte manteve a integridade intestinal e reduziu os efeitos de inflamação frente a um desafio sanitário de *Salmonella typhimurium*. Esse composto é capaz de romper a parede celular ou gerar lise celular de bactérias patogênicas (Di Pasqua *et al.*, 2007). No caso de *Enterobacter aerogenes*, o eugenol alterou o perfil de ácidos graxos de sua membrana celular, aumentando a pressão de turgor e danificando o sistema de transporte de íons desse patógeno (Panwar *et al.*, 2021).

Assim como os outros compostos já citados anteriormente, o cinamaldeído afeta a membrana celular bacteriana (Shreaz *et al.*, 2016), mas não a desintegra, e sim gera pequenos vazamentos de pequenos íons através da membrana (Friedman, 2017). Ele é o principal constituinte do óleo essencial de canela (Friedman, 2017). Lee *et al.* (2011) relataram que a inclusão de cinamaldeído na dieta de frangos de corte reduziu a infecção intestinal causada pela *Eimeria* e melhorou parâmetros de imunidade. Além disso, o cinamaldeído inibe a divisão celular de bactérias patogênicas, aderindo às proteínas FTsZ (Roberson *et al.*, 2011). Essas proteínas formam uma estrutura chamada de anel Z, estrutura que facilita o processo de divisão da célula (Doyle e Stephens, 2019). O trabalho de Shen *et al.* (2020) avaliou o uso de um blend contendo timol e cinamaldeído e

concluíram que houve melhora na saúde intestinal, pois foi observado aumento da atividade fagocítica de macrófagos, promovendo a remoção de patógenos, gerando melhora na barreira intestinal dos frangos.

A capsaicina é um monoterpreno, e é o componente com maior pungência do gênero *Capsicum* (Rossi *et al.*, 2020). Nos mamíferos, a capsaicina atua na ativação dos canais TRPV1 (Szolcsányi, 2015), mas nas aves as ações da capsaicina podem ser atribuídas a mecanismos independentes de TRPV1 (Mahmoud e Mahmoud, 2015). Esse fato é demonstrado por Nikami *et al.* (2008), que reportaram que a capsaicina previne hipotermia induzida por lipopolissacrídeo (LPS) de *E. coli*, mas por uma via independente de TRPV1. Porém, o sistema nervoso aviário não é completamente insensível a capsaicina e as aves podem apresentar respostas fisiológicas acionadas por ela, sem sentirem os efeitos relacionados a pungência e dor (Kirifides *et al.*, 2004). A capsaicina ainda regula a distribuição do tecido adiposo nas aves (Brenes e Roura, 2010). Segundo El-Hack *et al.* (2020), o uso da capsaicina na alimentação das aves pode aumentar a palatabilidade alimentar, aumentar a ingestão de alimento, estimular o sistema imune, aumentar o potencial antioxidante total, reduzir o colesterol, reduzir a taxa de linfócito e reduzir a corticosterona. Óleos essenciais são utilizados em combinações sinérgicas e eles têm sido utilizados como substituto aos antibióticos (Bozkurt *et al.*, 2009). Já foi reportado que a inclusão de um blend contendo carvacrol, capsaicina e cinamaldeído melhorou a digestibilidade dos nutrientes em frangos de corte aos 42 dias de idade (Hernandez *et al.*, 2004). Já Facchi *et al.* (2019) relatam que o uso de carvacrol e cinamaldeído melhoram a superfície intestinal e a energia metabolizável da dieta de frangos de corte.

REFERÊNCIAS

Abd El-Hack, M. E., S. A. Abdelnour, A. E. Taha, A. F. Khafaga, M. Arif, T. Ayasan, A. A. Swelum, M. H. Abukhalil, S. Alkahtani, L. Aleya, and M. M. Abdel-Daim. 2020. Herbs as thermoregulatory agents in poultry: An overview. *Science of the Total Environment* 703:134399. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134399>

Abd El-Hack, M. E., M. T. El-Saadony, A. M. Saad, H. M. Salem, N. M. Ashry, M. M. A. Ghanima, M. Shukry, A. A. Swelum, A. E. Taha, A. M. El-Tahan, S. F. AbuQamar, and K. A. El-Tarabily, K. A. 2022. Essential oils and their nanoemulsions as green alternatives to antibiotics in poultry nutrition: a comprehensive review. *Poultry science*, 101(2), 101584. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2021.101584>

Abdel-Moneim, A. M. E., A. M. Shehata, R. E. Khidr, V. K. Paswan, N. S. Ibrahim, A. A. El-Ghoul, S. A. Aldhumri, S. A. Gabr, N. M. Mesalam, M. M. Wakwak, M. M. and T. A. Ebeid. 2021. Nutritional manipulation to combat heat stress in poultry–

A comprehensive review. *Journal of Thermal Biology*, 98, 102915. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2021.102915>

Abhay, K., K. Tapan, C. C. David, and H. Sudipto. 2015. Effects of supplementation of betaine hydrochloride on physiological performances of broilers exposed to thermal stress. *Open Access Animal Physiology* 7:111-120.

ABPA – Associação Brasileira De Proteína Animal. Relatório Anual Da Avicultura. 2023. Acesso em Jul 2023. Online. Disponível em: [https:// https://abpa-br.org/wp-content/uploads/2023/04/Relatorio-Anual-2023.pdf](https://abpa-br.org/wp-content/uploads/2023/04/Relatorio-Anual-2023.pdf)

Afsharmanesh, M., M. Barani, and F. G. Silversides. 2010. Evaluation of wet-feeding wheat-based diets containing *Saccharomyces cerevisiae* to broiler chickens. *British poultry science* 51(6):776-783. <https://doi.org/10.1080/00071668.2010.531006>

Ahmad, T., T. Mushtaq, M. A. Khan, M. E. Babar, M. Yousaf, Z. U. Hasan, and Z. Kamran. 2009. Influence of varying dietary electrolyte balance on broiler performance under tropical summer conditions. *Journal of animal physiology and animal nutrition* 93(5):613-621. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0396.2008.00840.x>

Ahmad, R., Y. H. Yu, F. S. H. Hsiao, C. H. Su, H. C. Liu, I. Tobin, G. Zhang, and Y. H. Cheng. 2022. Influence of heat stress on poultry growth performance, intestinal inflammation, and immune function and potential mitigation by probiotics. *Animals*, 12(17): 2297. <https://doi.org/10.3390/ani12172297>

Akbarian, A., J. Michiels, J. Degroote, M. Majdeddin, A. Golian, and S. De Smet. 2016. Association between heat stress and oxidative stress in poultry; mitochondrial dysfunction and dietary interventions with phytochemicals. *Journal of animal science and biotechnology* 7(1):1-14. <https://doi.org/10.1186/s40104-016-0097-5>

Aljuwayd, M., I. A. Malli, and Y. M. Kwon. 2023. Application of Eugenol in Poultry to Control Salmonella Colonization and Spread. *Veterinary Sciences* 10(2):151. <https://doi.org/10.3390/vetsci10020151>

Alvarenga, E. M., L. K. Souza, T. S. Araújo, K. M. Nogueira, F. B. M. Sousa, A. R. Araújo, C. S. Martins, D. M. Pacifico, G. A. C. Brito, E. P. Souza, D. P. Sousa, and J. V. R. Medeiros. 2016. Carvacrol reduces irinotecan-induced intestinal mucositis through inhibition of inflammation and oxidative damage via TRPA1 receptor activation. *Chemico-biological interactions* 260:129-140. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2016.11.009>

Andoğan, B. C., H. Baydar, S. Kaya, M. Demirci, D. Özbaşar, and E. Mumcu. 2002. Antimicrobial activity and chemical composition of some essential oils. *Archives of pharmacal research*, 25:860-864. <https://doi.org/10.1007/BF02977005>

Azad, M. A. K., M. Kikusato, T. Maekawa, H. Shirakawa, and M. Toyomizu. 2010. Metabolic characteristics and oxidative damage to skeletal muscle in broiler chickens exposed to chronic heat stress. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 155(3):401-406. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2009.12.011>

Baarendse, P. J. J., M. Debonne, E. Decuyper, B. Kemp, and H. Van Den Brand. 2007. Ontogeny of avian thermoregulation from a neural point of view. *World's Poultry Science Journal* 63(2):267-276. <https://doi.org/10.1017/S0043933907001456>

Baurhoo, B., F. Goldflus, and X. Zhao. 2009. Purified cell wall of *Saccharomyces cerevisiae* increases protection against intestinal pathogens in broiler chickens. *International Journal of Poultry Science* 8(2):133-137.

Bayraktar, B., E. Tekce, S. Bayraktar, G. Büyük, Ç. Takma, V. Aksakal, M. Genç, H. Kaya, U. Ülker, and A. B. Gürbüz. 2023. Investigation of endocrine response of thyroid and intestinal and adipose tissues due to the addition of *Moringa oleifera* essential oil in diet for quails exposed to heat stress. *Revista Brasileira de Zootecnia* 52. <https://doi.org/10.37496/rbz5220210040>

Beckford, R. C., L. E. Ellestad, M. Proszkowiec-Weglarz, L. Farley, K. Brady, R. Angel, H. C. Liu, and T. E. Porter. 2020. Effects of heat stress on performance, blood chemistry, and hypothalamic and pituitary mRNA expression in broiler chickens. *Poultry science* 99(12): 6317-6325. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2020.09.052>

Ben Arfa, A., S. Combes, L. Preziosi-Belloy, N. Gontard, and P. Chalier. 2006. Antimicrobial activity of carvacrol related to its chemical structure. *Letters in applied microbiology* 43(2):149-154. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2006.01938.x>

Benites, V., R. Gilharry, A. G. Gernat, and J. G. Murillo. 2008. Effect of dietary mannan oligosaccharide from Bio-Mos or SAF-Mannan on live performance of broiler chickens. *Journal of Applied Poultry Research* 17(4): 471-475. <https://doi.org/10.3382/japr.2008-00023>

Bohler, M. W., V. S. Chowdhury, M. A. Cline, and E. R. Gilbert. 2021. Heat Stress Responses in Birds: A Review of the Neural Components. *Biology* 10(11): 1095. <https://doi.org/10.3390/biology10111095>

Borges, S. A., A. Maiorka, and A. V. F. D. Silva. 2003. Fisiologia do estresse calórico e a utilização de eletrólitos em frangos de corte. *Ciência Rural* 33: 975-981. <https://doi.org/10.1590/S0103-84782003000500028>

Borges, S. A., A. F. Da Silva, and A. Maiorka. 2007. Acid-base balance in broilers. *World's Poultry Science Journal*, 63(1), 73-81. <https://doi.org/10.1017/S0043933907001286>

Bozkurt, M., K. Küçükyılmaz, A. U. Çatlı, and M. Çınar. 2009. Effect of dietary mannan oligosaccharide with or without oregano essential oil and hop extract supplementation on the performance and slaughter characteristics of male broilers. *South African Journal of Animal Science* 39(3). <https://doi.org/10.4314/sajas.v39i3.49157>

Brenes, A. and E. Roura. 2010. Essential oils in poultry nutrition: Main effects and modes of action. *Animal feed science and technology*, 158:1-14. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2010.03.007>

Bridi, A. M. 2010. Adaptação e aclimatação animal. UEL, Londrina.

Calefi, A. S., W. M. Quinteiro-Filho, A. J. P. Ferreira, and J. Palermo-Neto. 2017. Neuroimmunomodulation and heat stress in poultry. *World's Poultry Science Journal* 73(3):493-504. <https://doi.org/10.1017/S0043933917000472>

Caro, S. P., S. V. Schaper, G. F. Ball, and M. E. Visser. 2012. The unresolved causal influence of temperature on seasonal timing in homeotherms. *Seasonal timing in a changing climate* 137.

Cassuce, D. C., I. D. F. Tinôco, F. C. Baêta, S. Zolnier, P. R. Cecon, and M. D. F. Vieira. 2013. Thermal comfort temperature update for broiler chickens up to 21 days of age. *Engenharia Agrícola* 33:28-36.

Castillo, K., I. Diaz-Franulic, J. Canan, F. Gonzalez-Nilo, and R. Latorre. 2018. Thermally activated TRP channels: molecular sensors for temperature detection. *Physical biology* 15(2):021001. [10.1088/1478-3975/aa9a6f](https://doi.org/10.1088/1478-3975/aa9a6f)

Chacher, M. F. A., Z. Kamran, U. Ahsan, S. Ahmad, K. C. Koutoulis, H. G. Qutab Ud Din, and Ö. Cengiz. 2017. Use of mannan oligosaccharide in broiler diets: an overview of underlying mechanisms. *World's Poultry Science Journal* 73(4):831-844. <https://doi.org/10.1017/S0043933917000757>

Chaiyabutr, N. 2004. Physiological reactions of poultry to heat stress and methods to reduce its effects on poultry production. *The Thai Journal of Veterinary Medicine* 34(2):17-30.

Chen, S., Y. Yong, and X. Ju. 2021. Effect of heat stress on growth and production performance of livestock and poultry: Mechanism to prevention. *Journal of Thermal Biology* 99:103019. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2021.103019>

Chen, Q., Z. Wang, D. Shao, and S. Shi. 2022. Effects of heat stress on the intestinal microorganisms in poultry and its nutritional regulations: a review. *World's Poultry Science Journal* 78(4):935-952. <https://doi.org/10.1080/00439339.2022.2106344>

Cobb, V. B. 2008. *Manual de manejo de frangos de corte*. Guapiaçu: Cobb Vantress.

Collier, R. J. and K. G. Gebremedhin. 2015. Thermal biology of domestic animals. *Annu. Rev. Anim. Biosci.* 3:513-532.

Collier, R. J., L. H. Baumgard, R. B. Zimbelman, and Y. Xiao. 2019. Heat stress: physiology of acclimation and adaptation. *Animal Frontiers* 9(1): 12-19. <https://doi.org/10.1093/af/vfy031>

Cristina-Silva, C., L. Amaral-Silva, K. M. Santos, G. M. Correa, W. C. da Silva, M. H. M. R. Fernandes, G. S. F. da Silva, L. H. Gargaglioni, M. C. Almeida, and K. C. Bicego. 2022. Cutaneous TRPV4 Channels Activate Warmth-Defense Responses in Young and Adult Birds. *Frontiers in Physiology*, 1351. <https://doi.org/10.3389/fphys.2022.892828>

Cuenca, M., J. Chauca, C. García, and H. Sigüencia. 2022. *Saccharomyces cerevisiae* as a replacement alternative to growth-promoting antibiotics in animal feed. *Archivos de zootecnia* 71(273):61-69.

De Antonio, J., M. F. Fernandez-Alarcon, R. Lunedo, G. H. Squassoni, A. L. J. Ferraz, M. Macari, R. L. Furlan, and L. R. Furlan. 2017. Chronic heat stress and feed restriction affects carcass composition and the expression of genes involved in the control of fat deposition in broilers. *The Journal of Agricultural Science* 155(9):1487-1496. <https://doi.org/10.1017/S0021859617000624>

Di Pasqua, R., G. Betts, N. Hoskins, M. Edwards, D. Ercolini, and G. Mauriello. 2007. Membrane toxicity of antimicrobial compounds from essential oils. *Journal of agricultural and food chemistry* 55(12):4863-4870. <https://doi.org/10.1021/jf0636465>

Dhifi, W., S. Bellili, S. Jazi, N. Bahloul, and W. Mnif. 2016. Essential oils' chemical characterization and investigation of some biological activities: A critical review. *Medicines* 3(4):25. <https://doi.org/10.3390/medicines3040025>

Doyle, A. A. and J. C. Stephens. 2019. A review of cinnamaldehyde and its derivatives as antibacterial agents. *Fitoterapia* 139:104405. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2019.104405>

Egbuniwe, I. C., J. O. Ayo, M. U. Kawu, and A. Mohammed. 2018. Behavioral and hematological responses of broiler chickens administered with betaine and ascorbic acid during hot-dry season. *Journal of Applied Animal Welfare Science* 21(4):334-346. <https://doi.org/10.1080/10888705.2018.1426000>

Emami, N. K., U. Jung, B. Voy, and S. Dridi. 2020. Radical response: effects of heat stress-induced oxidative stress on lipid metabolism in the avian liver. *Antioxidants* 10(1):35. <https://doi.org/10.3390/antiox10010035>

Facchi, C. S., F. D. A. Valentini, E. Aniecevski, F. Leite, G. Rossatto, A. Dal Santo, G. Zaccaraon, G. E. Bosetti, K. L. Henkes, A. S. da Silva, F. C. Tavernari, and T. G. Petrolli. 2019. Carvacrol e cinnamaldeído microencapsulados melhoram o aproveitamento dos nutrientes e mantem a integridade da mucosa intestinal de frangos de corte. *Avicultura industrial* 9:14-17.

FAO. 2022. *World Food and Agriculture – Statistical Yearbook 2022*. Rome. <https://doi.org/10.4060/cc2211en>

Feng, Q. 2014. Temperature sensing by thermal TRP channels: thermodynamic basis and molecular insights. *Current topics in membranes* 74:19-50. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800181-3.00002-6>

Friedman, M. 2017. Chemistry, antimicrobial mechanisms, and antibiotic activities of cinnamaldehyde against pathogenic bacteria in animal feeds and human foods. *Journal of agricultural and food chemistry* 65(48):10406-10423. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b04344>

Gamba, J. P., M. M. Rodrigues, M. Garcia Neto, S. H. V. Perri, M. D. A. Faria Júnior, and M. F. Pinto. 2015. The strategic application of electrolyte balance to minimize heat stress in broilers. *Brazilian Journal of Poultry Science* 17:237-245. <https://doi.org/10.1590/1516-635x1702237-246>

Geraert, P. A., J. C. F Padilha, and S. Guillaumin. 1996. Metabolic and endocrine changes induced by chronic heat exposure in broiler chickens: growth performance, body composition and energy retention. *British Journal of Nutrition* 75(2):195-204. <https://doi.org/10.1017/BJN19960124>

Goel, A. 2021. Heat stress management in poultry. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 105(6):1136-1145. <https://doi.org/10.1111/jpn.13496>

Goff, J. P. 2017. Sistema Endócrino. In: *Dukes Fisiologia dos Animais Domésticos*. Reece, W. O., Erickson, H. H., Goff, J. P., Uemura, E. E. 13 Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.

Gomes, A. R. A., F. H. Litz, H. R. Morais, R. P. de Oliveira, and M. R. B. de Mattos Nascimento. 2012. Estresse por calor na produção de frangos de corte. *Pubvet* 6:Art-1466. <https://doi.org/10.11606/d.10.2013.tde-18112013-112533>

Gonzalez-Rivas, P. A., S. S. Chauhan, M. Ha, N. Fegan, F. R. Dunshea, and R. D. Warner. 2020. Effects of heat stress on animal physiology, metabolism, and meat quality: A review. *Meat Science* 162:108025. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2019.108025>

Gracheva, E. O. and S. N. Bagriantsev. 2015. Evolutionary adaptation to thermosensation. *Current opinion in neurobiology* 34:67-73. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2015.01.021>

Greene, E. S., H. Rajaei-Sharifabadi, and S. Dridi. 2019. Feather HSP70: a novel non-invasive molecular marker for monitoring stress induced by heat exposure in broilers. *Poultry Science* 98(9):3400-3404. <https://doi.org/10.3382/ps/pez120>

Habashy, W. S., M. C. Milfort, R. Rekaya, and S. E. Aggrey. 2019. Cellular antioxidant enzyme activity and biomarkers for oxidative stress are affected by heat stress. *International journal of biometeorology* 63:1569-1584. <https://doi.org/10.1007/s00484-019-01769-z>

Habeeb, A. A. M. 2020. Symptoms of Heat Stress in Tropical and Subtropical Regions on Farm Animals. *European Journal of Agriculture and Food Sciences* 2(6).

Hashemipour, H., H. Kermanshahi, A. Golian, and T. Veldkamp. 2013. Effect of thymol and carvacrol feed supplementation on performance, antioxidant enzyme activities, fatty acid composition, digestive enzyme activities, and immune response in broiler chickens. *Poultry science* 92(8):2059-2069. <https://doi.org/10.3382/ps.2012-02685>

He, S. P., M. A. Arowolo, R. F. Medrano, S. Li, Q. F. Yu, J. Y. Chen, and J. H. He. 2018a. Impact of heat stress and nutritional interventions on poultry production. *World's Poultry Science Journal* 74(4):647-664. <https://doi.org/10.1017/S0043933918000727>

He, X., Z. Lu, B. Ma, L. Zhang, J. Li, Y. Jiang, G. Zhou, and F. Gao. 2018b. Effects of chronic heat exposure on growth performance, intestinal epithelial histology, appetite-related hormones and genes expression in broilers. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 98(12):4471-4478. <https://doi.org/10.1002/jsfa.8971>

Hernandez, F., J. Madrid, V. Garcia, J. Orengo, and M. D. Megias. 2004. Influence of two plant extracts on broilers performance, digestibility, and digestive organ size. *Poultry science* 83(2):169-174. <https://doi.org/10.1093/ps/83.2.169>

Hosseindoust, A., H. K. Kang, and J. S. Kim. 2022. Quantifying heat stress; the roles on metabolic status and intestinal integrity in poultry, a review. *Domestic Animal Endocrinology* 81:106745. <https://doi.org/10.1016/j.domaniend.2022.106745>

Jeong, J. H., D. K. Lee, S. M. Liu, S. C. Chua Jr, G. J. Schwartz, and Y. H. Jo. 2018. Activation of temperature-sensitive TRPV1-like receptors in ARC POMC neurons reduces food intake. *PloS Biology*,16(4):e2004399. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2004399>

Jiang, S., F. F. Yan, J. Y. Hu, A. Mohammed, and H. W. Cheng. 2021. *Bacillus subtilis*-based probiotic improves skeletal health and immunity in broiler chickens exposed to heat stress. *Animals* 11(6):1494. <https://doi.org/10.3390/ani11061494>

Kachur, K. and Z. Suntres. 2020. The antibacterial properties of phenolic isomers, carvacrol and thymol. *Critical reviews in food science and nutrition* 60(18):3042-3053. <https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1675585>

Kaewtapee, C., N. Jantra, K. Petchpoung, C. Rakangthong, and C. Bunchasak. 2022. Chemical composition and standardized ileal digestibility of crude protein and amino acid in whole yeast and autolyzed yeast derived from sugarcane ethanol production fed to growing pigs. *Animal Bioscience* 35(9):1400-1407. <https://doi.org/10.5713/ab.21.0540>

Kaiya, H., K. Kangawa, and M. Miyazato. 2013. Update on ghrelin biology in birds. *General and Comparative Endocrinology* 190:170-175. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2013.04.014>

Kang, D., J. Park, and K. Shim. 2019. Heat treatment at an early age has effects on the resistance to chronic heat stress on broilers. *Animals* 9(12):1022. <https://doi.org/10.3390/ani9121022>

Kirifides, M. L., M. P. Kurnellas, L. Clark, and B. P. Bryant. 2004. Calcium responses of chicken trigeminal ganglion neurons to methyl anthranilate and capsaicin. *Journal of experimental biology* 207(5):715-722. <https://doi.org/10.1242/jeb.00809>

Kogut, M. H. 2019. The effect of microbiome modulation on the intestinal health of poultry. *Animal feed science and technology* 250:32-40. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2018.10.008>

Krishan, G. and A. Narang. 2014. Use of essential oils in poultry nutrition: A new approach. *Journal of Advanced Veterinary and Animal Research* 1(4):156-162.

Lara, L. J. and M. H. Rostagno. 2013. Impact of heat stress on poultry production. *Animals* 3(2):356-369. <https://doi.org/10.3390/ani3020356>

Lee, S. H., H. S. Lillehoj, S. I. Jang, K. W. Lee, M. S. Park, D. Bravo, and E. P. Lillehoj. 2011. Cinnamaldehyde enhances in vitro parameters of immunity and reduces in vivo infection against avian coccidiosis. *British Journal of Nutrition* 106(6):862-869. <https://doi.org/10.1017/S0007114511001073>

Leishman, E. M., J. Ellis, N. van Staaveren, S. Barbut, R. J. Vanderhout, V. R. Osborne, B. J. Wood, A. Harlander-Matauschek, and C. F. Baes. 2021. Meta-analysis to predict the effects of temperature stress on meat quality of poultry. *Poultry science* 100(11):101471. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2021.101471>

Lemos, M. J. D., L. F. L. Calixto, K. A. A. Torres-Cordido, and T. L. Reis. 2016. Uso de aditivo alimentar equilibrador da flora intestinal em aves de corte e de postura. *Arquivos do Instituto Biológico* 83. <https://doi.org/10.1590/1808-1657000862014>

Li, M., J. Wu, and Z. Chen. 2015. Effects of heat stress on the daily behavior of 44irst44e44 chickens. *Brazilian Journal of Poultry Science* 17:559-566. <https://doi.org/10.1590/1516-635X1704559-566>

Lin, H., H. F. Zhang, H. C. Jiao, T. Zhao, S. J. Sui, X. H. Gu, Z. Y. Zhang, J. Buyse, and E. Decuypere. 2005a. Thermoregulation responses of broiler chickens to humidity at different ambient temperatures. I. One week of age. *Poultry Science* 84(8): 1166-1172. <https://doi.org/10.1093/ps/84.8.1166>

Lin, H., H. F. Zhang, R. Du, X. H. Gu, Z. Y. Zhang, J. Buyse, and E. Decuypere. (2005b). Thermoregulation responses of broiler chickens to humidity at different ambient temperatures. II. Four weeks of age. *Poultry science* 84(8):1173-1178. <https://doi.org/10.1093/ps/84.8.1173>

Lin, H., E. Decuypere, and J. Buyse. 2006. Acute heat stress induces oxidative stress in broiler chickens. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 144(1):11-17. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2006.01.032>

Liu, D., L. Ding, J. Sun, N. Boussetta, and E. Vorobiev. 2016. Yeast cell disruption strategies for recovery of intracellular bio-active compounds—A review. *Innovative food science & emerging technologies* 36:181-192. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2016.06.017>

Liu, S. D., M. H. Song, W. Yun, J. H. Lee, H. B. Kim, and J. H. Cho. 2019. Effect of carvacrol essential oils on immune response and inflammation-related genes expression in broilers challenged by lipopolysaccharide. *Poultry* 44irst44e 98(5):2026-2033. <https://doi.org/10.3382/ps/pey575>

Lopes, C. C., C. B. V. Rabello, W. M. Dutra Júnior, W. R. L. Medeiros, R. V. Silva Júnior, L. R. Custódio, R. C. Lira, M. C. M. M. Ludke, E. N. R. Barbosa, and T. S. Lima. 2015. Energia metabolizável da levedura de cana-de-açúcar submetida a diferentes temperaturas e tempos de secagem para frangos de corte e poedeiras. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* 67:1711-1720. <https://doi.org/10.1590/1678-4162-8001>

Lopes, C. D. C., C. B. V. Rabello, J. D. C. R. D. Silva, E. M. F. D. Arruda, M. D. C. M. M. Ludke, and W. M. Dutra. 2017. Sugarcane yeast inclusion for broilers at post-hatch. *Revista Brasileira de Zootecnia* 46:924-928. <https://doi.org/10.1590/S1806-92902017001200008>

Lu, Q., J. Wen, and H. Zhang. 2007. Effect of chronic heat exposure on fat deposition and meat quality in two genetic types of chicken. *Poultry science* 86(6):1059-1064. <https://doi.org/10.1093/ps/86.6.1059>

Lu, Z., X. He, B. Ma, L. Zhang, J. Li, Y. Jiang, G. Zhou, and F. Gao. 2017. Chronic heat stress impairs the quality of breast-muscle meat in broilers by affecting redox status and energy-substance metabolism. *Journal of agricultural and food chemistry* 65(51):11251-11258. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b04428>

Mack, L. A., J. N. Felver-Gant, R. L. Dennis, and H. W. Cheng. 2013. Genetic variations alter production and behavioral responses following heat stress in 2 strains of laying hens. *Poultry science* 92(2):285-294. <https://doi.org/10.3382/ps.2012-02589>

Mahmoud, M. E. and F. A. Mahmoud. 2015. Desensitization of Nociceptive and Serotonergic Thermoregulatory Responses by Capsaicin in Chicken: Role of Capsaicin-Sensitive Subtype-1 Vanilloid Receptor-Independent Mechanisms. *Global Veterinaria* 15(1):10-18. 10.5829/idosi.gv.2015.15.01.95314

Melesse, A., S. Maak, R. Schmidt, and G. Von Lengerken. 2011. Effect of long-term heat stress on key enzyme activities and T3 levels in commercial layer hens. *Int. J. Livest. Prod* 2(7):107-116.

- Mignon-Grasteau, S., U. Moreri, A. Narcy, X. Rousseau, T. B. Rodenburg, M. Tixier-Boichard, and T. Zerjal. 2015. Robustness to chronic heat stress in laying hens: a meta-analysis. *Poultry science* 94(4):586-600. <https://doi.org/10.3382/ps/pev028>
- Moniruzzaman, M. and M. B. R. Mollah. 2019. Autolyzed *Saccharomyces cerevisiae* as a single cell protein for broiler diet. *Bangladesh Journal of Animal Science* 48(1):1-8. <https://doi.org/10.3329/bjas.v48i1.44551>
- Morales-Lopez, R. and J. Brufau. 2013. Immune-modulatory effects of dietary *Saccharomyces cerevisiae* cell wall in broiler chickens inoculated with *Escherichia coli* lipopolysaccharide. *British Poultry Science* 54(2):247-251. <https://doi.org/10.1080/00071668.2013.782386>
- Morera, P., L. Basirico, K. Hosoda, and U. Bernabucci. 2012. Chronic heat stress up-regulates leptin and adiponectin secretion and expression and improves leptin, adiponectin and insulin sensitivity in mice. *Journal of molecular endocrinology* 48(2):129. <http://dx.doi.org/10.1530/JME-11-0054>
- Moura, C. S., P. C. B. Lollo, P. N. Morato, and J. Amaya-Farfan. 2018. Dietary nutrients and bioactive substances modulate heat shock protein (HSP) expression: a review. *Nutrients* 10(6):683. <https://doi.org/10.3390/nu10060683>
- Mutaf, S., N. Seber Kahraman, and M. Z. 45irst. 2009. Intermittent partial surface wetting and its effect on body-surface temperatures and egg production of white and brown domestic laying hens in Antalya (Turkey). *British poultry science* 50(1):33-38. <https://doi.org/10.1080/00071660802592399>
- Munglang, N. N. and V. K. Vidyarthi. 2019. Hot red pepper powder supplementation diet of broiler chicken-a review. *Livestock Research International* 7(3):159-167.
- Navas, T. D. O., H. D. Oliveira, F. D. Carvalho, J. H. Stringhini, M. B. Café, and P. Hellmeister Filho. 2016. Estresse por calor na produção de frangos de corte. *Revista Nutritime* 13:4550-4557.
- Nawab, A., F. Ibtisham, G. Li, B. Kieser, J. Wu, W. Liu, Y. Zhao, Y. Nawab, K. Li, M. Xiao, and L. Na. 2018. Heat stress in poultry production: Mitigation strategies to overcome the future challenges facing the global poultry industry. *Journal of Thermal Biology* 78:131-139. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2018.08.010>
- Nawaz, A. H., K. Amoah, Q. Y. Leng, J. H. Zheng, W. L. Zhang, and L. Zhang. 2021. Poultry response to heat stress: its physiological, metabolic, and genetic implications on meat production and quality including strategies to improve broiler production in a warming world. *Frontiers in Veterinary Science* 8:14. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.699081>
- Nelson, D. and M. M. Cox. 2014. *Princípios de Bioquímica de Lehninger*. 6^a Edição. Porto Alegre: Artmed.
- Neves, D. P., T. M. Banhazi, and I. A. Nääs. 2014. Feeding behaviour of broiler chickens: a review on the biomechanical characteristics. *Brazilian Journal of Poultry Science* 16:01-16. <https://doi.org/10.1590/1516-635x16021-16>
- Nichelmann, M. and B. Tzschentke. 2002. Ontogeny of thermoregulation in precocial birds. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 131(4):751-763. [https://doi.org/10.1016/S1095-6433\(02\)00013-2](https://doi.org/10.1016/S1095-6433(02)00013-2)
- Nikami, H., M. E. Mahmoud, Y. Shimizu, T. Shiina, H. Hirayama, M. Iwami, R. M. Dosoky, M. M. Ahmed, and T. Takewaki. 2008. Capsaicin pretreatment attenuates LPS-induced hypothermia through TRPV1-independent mechanisms in chicken. *Life sciences* 82:1191-1195. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2008.04.003>
- Oladokun, S. and D. I. Adewole. 2022. Biomarkers of heat stress and mechanism of heat stress response in Avian species: Current insights and future perspectives from

poultry science. Journal of Thermal Biology 103332.
<https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2022.103332>

Oliveira, R. F. M. D., J. L. Donzele, M. L. T. D. Abreu, R. A. Ferreira, R. G. M. V. Vaz, and P. S. Cella. 2006. Efeitos da temperatura e da umidade relativa sobre o desempenho e o rendimento de cortes nobres de frangos de corte de 1 a 49 dias de idade. *Revista Brasileira de Zootecnia* 35:797-803. <https://doi.org/10.1590/S1516-35982006000300023>

Oloyo, A. and A. Ojerinde. 2019. Poultry housing and management. *Poultry-An Advanced Learning*. DOI: 10.5772/intechopen.83811

Pamok, S., W. Aengwanich, and T. Komutrin. 2009. Adaptation to oxidative stress and impact of chronic oxidative stress on immunity in heat-stressed broilers. *Journal of Thermal Biology* 34(7):353-357.
<https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2009.06.003>

Pamplona, R. and D. Costantini. 2011. Molecular and structural antioxidant defenses against oxidative stress in animals. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 301(4):R843-R863.
<https://doi.org/10.1152/ajpregu.00034.2011>

Panwar, H., C. Sharma, and E. Lichtfouse. 2020. Sustainable Agriculture Reviews 46: Mitigation of Antimicrobial Resistance Vol 1 Tools and Targets. Springer International Publishing.

Pascual, A., M. Pauletto, M. Giantin, G. Radaelli, C. Ballarin, M. Birolo, C. Zomeño, M. Dacasto, M. Bortoletti, M. Vascellari, G. Xiccato, and A. Trocino. 2020. Effect of dietary supplementation with yeast cell wall extracts on performance and gut response in broiler chickens. *Journal of Animal Science and Biotechnology* 11:1-11.
<https://doi.org/10.1186/s40104-020-00448-z>

Quinteiro-Filho, W. M., A. Ribeiro, V. Ferraz-de-Paula, M. L. Pinheiro, M. Sakai, L. R. M. D. Sá, A. J. P. Ferreira, and J. Palermo-Neto. 2010. Heat stress impairs performance parameters, induces intestinal injury, and decreases macrophage activity in broiler chickens. *Poultry science* 89(9):1905-1914. <https://doi.org/10.3382/ps.2010-00812>

Rath, P., N. Behura, S. Sahoo, P. Panda, K. Mandal, and P. Panigrahi. 2015. Amelioration of heat stress for poultry welfare: a strategic approach. *International Journal of Livestock Research* 5(3):1-9. <http://dx.doi.org/10.5455/ijlr.20150330093915>

Raza, H. M., H. Ashraf, K. Shahzad, M. Sultan, T. Miyazaki, M. Usman, R. R. Shamshiri, Y. Zhou, and R. Ahmad. 2020. Investigating applicability of evaporative cooling systems for thermal comfort of poultry birds in Pakistan. *Applied Sciences* 10(13):4445. <https://doi.org/10.3390/app10134445>

Reece, W. O. 2017. Princípios Básicos do Equilíbrio Acidobásico. In: *Dukes Fisiologia dos Animais Domésticos*. Reece, W. O., Erickson, H. H., Goff, J. P., Uemura, E. E. 13 Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.

Rehman, A., M. Arif, N. Sajjad, M. Q. Al-Ghadi, M. Alagawany, M. E. Abd El-Hack, A. R. Alhimaidi, S. S. Elners, B. O. Almutairi, R. A. Amran, E. O. S. Hussein, and A. A. Swelum. (2020). Dietary effect of probiotics and prebiotics on broiler performance, carcass, and immunity. *Poultry Science*, 99(12), 6946-6953.

Robertson, A., A. Riemensperger, and B. Holding. 2011. Satisfying the demands of the highly developed modern broiler. *International Poultry Production* 19(3):15-17.

Rodrigues, M. M., M. Garcia, S. H. V. Perri, D. G. Sandre, M. J. A. Faria, P. M. Oliveira, M. P. Pinto, and R. P. Cassiano. 2019. Techniques to minimize the effects of acute heat stress or chronic in broilers. *Brazilian Journal of Poultry Science* 21. <https://doi.org/10.1590/1806-9061-2018-0962>

Romanovsky, A. A. 2018. The thermoregulation system and how it works. *Handbook of clinical neurology* 156:3-43. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63912-7.00001-1>

Rossi, B., A. Toschi, A. Piva, and E. Grilli. 2020. Single components of botanicals and nature-identical compounds as a non-antibiotic strategy to ameliorate health status and improve performance in poultry and pigs. *Nutrition Research Reviews* 33(2):218-234. <https://doi.org/10.1017/S0954422420000013>

Rostagno, M. H. 2020. Effects of heat stress on the gut health of poultry. *Journal of Animal Science* 98(4):skaa090. <https://doi.org/10.1093/jas/skaa090>

Ruuskanen, S., B. Y. Hsu, and A. Nord. 2021. Endocrinology of thermoregulation in birds in a changing climate. *Molecular and Cellular Endocrinology* 519:111088. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2020.111088>

Saad, H. F., S. M. Alsudany, S. K. AL-hummod, and A. A. Jaffar. 2023. The impact of high temperatures on the productive performance (behavioral, physiological, and immunological) of poultry. *Texas Journal of Agriculture and Biological Sciences* 14:52-57.

Salim, H. M., K. S. Huque, K. M. Kamaruddin, and A. Haque Beg. 2018. Global restriction of using antibiotic growth promoters and alternative strategies in poultry production. *Science progress* 101(1):52-75. <https://doi.org/10.3184/003685018X15173975498947>

Santos, R. R., A. Awati, P. J. Roubos-van den Hil, M. H. Tersteeg-Zijderfeld, P. A. Koolmees, and J. Fink-Gremmels. 2015. Quantitative histo-morphometric analysis of heat-stress-related damage in the small intestines of broiler chickens. *Avian Pathology* 44(1):19-22. <https://doi.org/10.1080/03079457.2014.988122>

Santos, M. M., J. B. F. Souza-Junior, and A. M. V. de Arruda. 2018. Balanço eletrolítico em dietas de aves poedeiras. *Multidisciplinary Reviews* 1:e2018008-e2018008. <https://doi.org/10.29327/multi.2018008>

Santovito, E., D. Greco, A. F. Logrieco, and G. Avantaggiato. 2018. Eubiotics for food security at farm level: Yeast cell wall products and their antimicrobial potential against pathogenic bacteria. *Foodborne Pathogens and Disease* 15(9):531-537. <https://doi.org/10.1089/fpd.2018.2430>

Shakeri, M., J. J. Cottrell, S. Wilkinson, W. Zhao, H. H. Le, R. McQuade, J. B. Furness, and F. R. Dunshea. 2019. Dietary betaine improves intestinal barrier function and ameliorates the impact of heat stress in multiple vital organs as measured by evans blue dye in broiler chickens. *Animals* 10(1):38. <https://doi.org/10.3390/ani10010038>

Shakeri, M. and H. H. Le. 2022. Deleterious Effects of Heat Stress on Poultry Production: Unveiling the Benefits of Betaine and Polyphenols. *Poultry* 1(3):147-156. <https://doi.org/10.3390/poultry1030013>

Sharifi-Rad, M., E. M. Varoni, M. Iriti, M. Martorell, W. N. Setzer, M. del Mar Contreras, B. Salehi, A. Soltani-Nejad, S. Rajabi, M. Tajbakhsh, and J. Sharifi-Rad. 2018. Carvacrol and human health: A comprehensive review. *Phytotherapy Research* 32(9):1675-1687. <https://doi.org/10.1002/ptr.6103>

Shen, C., L. G. Christensen, S. Y. Bak, N. Christensen, and K. Kragh. (2020). Immunomodulatory effects of thymol and cinnamaldehyde in chicken cell lines. *Journal of Applied Animal Nutrition* 8(1):21-30. <https://doi.org/10.3920/JAAN2020.0001>

Shreaz, S., W. A. Wani, J. M. Behbehani, V. Raja, M. Irshad, M. Karched, I. Ali, W. A. Siddiqi, and L. T. Hun. 2016. Cinnamaldehyde and its derivatives, a novel class of antifungal agents. *Fitoterapia* 112:116-131. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2016.05.016>

Sohail, M. U., M. E. Hume, J. A. Byrd, D. J. Nisbet, A. Ijaz, A. Sohail, M. Z. Shabbir, and H. Rehman. 2012. Effect of supplementation of prebiotic mannan-

oligosaccharides and probiotic mixture on growth performance of broilers subjected to chronic heat stress. *Poultry science* 91(9):2235-2240. <https://doi.org/10.3382/ps.2012-02182>

Song, J., K. Xiao, Y. L. Ke, L. F. Jiao, C. H. Hu, Q. Y. Diao, B. Shi, and X. T. Zou. 2014. Effect of a probiotic mixture on intestinal microflora, morphology, and barrier integrity of broilers subjected to heat stress. *Poultry science* 93(3):581-588. <https://doi.org/10.3382/ps.2013-03455>

Syafwan, S., R. P. Kwakkel, and M. W. A. Verstegen. 2011. Heat stress and feeding strategies in meat-type chickens. *World's Poultry Science Journal* 67(4):653-674. <https://doi.org/10.1017/S0043933911000742>

Szolcsányi, J. 2015. Effect of capsaicin on thermoregulation: an update with new aspects. *Temperature* 2(2):277-296. <https://doi.org/10.1080/23328940.2015.1048928>

Tavares, B., G. S. S. Corrêa, E. M. Figueiredo, J. G. C. Júnior, A. B. Corrêa, and A. P. D. Libera. 2022. Estratégias nutricionais para frangos de corte submetidos ao estresse térmico. *Zootecnia [livro eletrônico]: tópicos atuais em pesquisa*. 1^o Edição. Editora Científica Digital Ltda. Guarujá – SP.

Teeter, R. G., M. O. Smith, F. N. Owens, S. C. Arp, S. Sangiah, and J. E. Breazile. 1985. Chronic heat stress and respiratory alkalosis: occurrence and treatment in broiler chicks. *Poultry Science* 64(6):1060-1064. <https://doi.org/10.3382/ps.0641060>

Tufail, M., N. Chand, A. S. Rafiullah, R. U. Khan, M. Mobashar, and S. Naz. (2019). Mannanligosaccharide (MOS) in broiler diet during the finisher phase: 2. Growth traits and intestinal histomorphology. *Pakistan Journal of Zoology*, 51(2), 597-602.

Uemura, E. E. 2017. Tecido Nervoso. In: *Dukes Fisiologia dos Animais Domésticos*. Reece, W. O., Erickson, H. H., Goff, J. P., Uemura, E. E. 13 Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.

Vandana, G. D., V. Sejian, A. M. Lees, P. Pragna, M. V. Silpa, and S. K. Maloney. 2021. Heat stress and poultry production: impact and amelioration. *International Journal of Biometeorology* 65(2):163-179. <https://doi.org/10.1007/s00484-020-02023-7>

Vieites, F. M., A. L. Fraga, G. H. K. Moraes, J. G. Vargas Júnior, R. P. Nalon, G. S. S. Corrêa, and R. V. Nunes. 2011. Cálcio, fósforo e proteína total no sangue de frangos de corte em função de níveis de balanço eletrolítico da ração. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 63, 887-894. <https://doi.org/10.1590/S0102-09352011000400014>

Wasti, S., N. Sah, and B. Mishra. 2020. Impact of heat stress on poultry health and performances, and potential mitigation strategies. *Animals* 10(8):1266. <https://doi.org/10.3390/ani10081266>

Weaver, W. D. Cap. 8. Poultry Housing. In: Bell, D. D.; Weaver, W. D. and North, M. O. 2001. *Commercial chicken meat and egg production*. Springer Science & Business Media.

Wieggers, G. J., I. E. Stec, P. Sterzer, and J. M. Reul. 2005. Glucocorticoids and the immune response. In *Techniques in the Behavioral and Neural Sciences* 15: 175-191. [https://doi.org/10.1016/S0921-0709\(05\)80055-0](https://doi.org/10.1016/S0921-0709(05)80055-0)

Yahav, S., D. Shinder, J. Tanny, and S. Cohen. 2005. Sensible heat loss: the broiler's paradox. *World's Poultry Science Journal* 61(3):419-434. <https://doi.org/10.1079/WPS200453>

Xie, J., L. Tang, L. Lu, L. Zhang, L. Xi, H. C. Liu, J. Odle, and X. Luo. 2014. Differential expression of heat shock transcription factors and heat shock proteins after acute and chronic heat stress in laying chickens (*Gallus gallus*). *PloS one* 9(7):e102204. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0102204>

Xiong, Y., Q. S. Meng, G. A. O. Jie, X. F. Tang, and H. F. Zhang. 2017. Effects of relative humidity on animal health and welfare. *Journal of integrative agriculture* 16(8):1653-1658. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(16\)61532-0](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(16)61532-0)

Zaboli, G., X. Huang, X. Feng, and D. U. Ahn. 2019. How can heat stress affect chicken meat quality?—a review. *Poultry science* 98(3):1551-1556. <https://doi.org/10.3382/ps/pey399>

Zeng, Z., S. Zhang, H. Wang, and X. Piao. 2015. Essential oil and aromatic plants as feed additives in non-ruminant nutrition: a review. *Journal of animal science and biotechnology*, 6(1), 1-10.

Zhai, H., H. Liu, S. Wang, J. Wu, and A. M. Klunter. 2018. Potential of essential oils for poultry and pigs. *Animal nutrition* 4(2):179-186. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2018.01.005>

Zhang, Z. Y., G. Q. Jia, J. J. Zuo, Y. Zhang, J. Lei, L. Ren, and D. Y. Feng. 2012. Effects of constant and cyclic heat stress on muscle metabolism and meat quality of broiler breast fillet and thigh meat. *Poultry science* 91(11):2931-2937. <https://doi.org/10.3382/ps.2012-02255>

Zhang, M., F. R. Dunshea, R. D. Warner, K. DiGiacomo, R. Osei-Amponsah, and S. S. Chauhan. 2020. Impacts of heat stress on meat quality and strategies for amelioration: A review. *International journal of biometeorology* 64:1613-1628. <https://doi.org/10.1007/s00484-020-01929-6>

Zhao, X., S. Zheng, S. Wei, Q. Tian, Y. Tao, R. Bo, M. Liu, and J. Li. 2022. The protective effect and potential mechanisms of eugenol against *Salmonella* in vivo and in vitro. *Poultry Science* 101(5):101801. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2022.101801>

Zotti, M., M. Colaianna, M. G. Morgese, P. Tucci, S. Schiavone, P. Avato, P. and L. Trabace. 2013. Carvacrol: from ancient flavoring to neuromodulatory agent. *Molecules* 18(6):6161-6172. <https://doi.org/10.3390/molecules18066161>

III. OBJETIVOS GERAIS

Objetivos Gerais:

Avaliar o desempenho, composição corporal, expressão de genes relacionados a integridade intestinal e estresse oxidativo, atividade enzimática e a morfometria do jejuno, em frangos de corte alimentados com dietas contendo diferentes níveis de blend composto por levedura autolisada de cana-de-açúcar e óleos essenciais (capsaicina, carvacrol, cinamaldeído e eugenol) submetidos a duas temperaturas ambientais, conforto térmico (conforme o manual da linhagem) e estresse por calor crônico (32°C) por 42 dias.

AUTOLIZED YEAST AND ESSENTIAL OILS ON PERFORMANCE, BODY COMPOSITION, INTESTINAL INTEGRITY AND OXIDATIVE STRESS IN BROILERS SUBMITTED TO CHRONIC HEAT STRESS

(Journal of Animal Science)

Abstract: The objective was to evaluate the effects of a blend containing autolyzed sugarcane yeast and essential oils, composed of carvacrol, cinnamaldehyde, eugenol and capsaicin, on performance parameters, body composition, intestinal integrity and oxidative stress of animals that were subjected to chronic heat stress (CHS) of 32°C for 42 days of life. The experiment was organized in a completely randomized design, with a 2 × 5 factorial arrangement, where the first factor was environment (Comfort and CHS) and the second factor was the blend inclusion levels in diet: Control Group, 0.75%, 1.5%, 2.25% and 3%. At 42 days of age, the animals were slaughtered by cervical dislocation and tissue samples were collected for morphological analysis, gene expression and antioxidant enzymes analysis. It was observed only effect of the environment for performance parameters, body composition and organ weight. In relation to the regression analysis of rectal temperature made through the weeks, the inclusion of 1.5% tended to reduce the rectal temperature of animals submitted to both environments. CHS reduces body and organ weight and increases body fat deposition. Heat shock protein 70 kDa (*HSP70*) gene expression increased in animals that were submitted to CHS in the liver and jejunum and, the control group and 1.5% of inclusion reduced the expression of this gene in both organs. Heat stress increased the catalase (*CAT*) enzyme activity in the jejunum and *CAT* gene expression in the liver. But in relation to the diet, the 3% level was able to reduce *CAT* gene expression related to the other treatments in the liver. An interaction effect between the environment and the different blend inclusions was observed in the superoxide dismutase (*SOD*) enzyme activity in the liver and jejunum of the animals. In the comfort, control group and 3% of inclusion, and 3% of inclusion in CHS reduced this enzyme activity for both environments. The 3% inclusion of the blend reduced the *GPXI* and *GSS* genes expression in the liver of animals that were subjected to comfort, and the 1.5% inclusion reduced these genes expression in the CHS. The thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) jejunum content decreased with the inclusion of a 3% blend in birds under comfort and with the inclusion of 1.5% CHS. As

for the regression analysis of intestinal histology, the 1.5% of inclusion seems to improve the parameters evaluated.

Keywords: blend, feed additives, phytogenics, poultry, *Saccharomyces cerevisiae*

Introduction

Heat stress is one of the problems that most affect the health and production of poultry, leading to poor welfare and economic losses. Alternatives that mitigate the impacts of this problem are important since the rise in global temperature has a direct impact on poultry production, because it increases the heat stress possibility (Shakeri and Lee, 2022). The absence of sweat glands and a body covered in feathers makes chickens extremely vulnerable to temperature stress (Zhang et al., 2017a), because in this scenario, the birds are not able to maintain a balance between development and heat loss (Wasti et al., 2020). During the thermoregulation process, animals undergo behavioral, physiological and neuroendocrine changes, which are continuous, adaptive and interrelated, and usually generate several negative effects on the organism (Oladokun and Adewole, 2022). Identifying these changes is very important to mitigate them.

To dissipate heat, broilers increase their respiratory rate, leading to a state of respiratory alkalosis (Goel et al., 2021). Additionally, intestinal permeability is impacted, which can facilitate pathogen contamination (Lara and Rostagno, 2013). Heat stress is also responsible for inducing an overproduction of reactive oxygen species (ROS), leading to a state of oxidative stress, which can lead to damage to proteins, lipids, DNA, and impair energy generation (Akbarian et al., 2016). The appetite is reduced, which directly impacts the growth of the animals and increases the mortality rate (Xu et al., 2018). In the case of chronic heat stress, it may lead to responses that seek to adapt to a prolonged stress situation (Jastrebski et al., 2017).

Animals submitted to heat stress become more sensitive to injuries, such as contamination by pathogens, for example. Related to this, there is a current concern regarding the use of antibiotic growth promoters (AGP) and the resistance of bacteria to these products. Products such as phytogenic, organic acids, enzymes, prebiotics, and probiotics are candidate substitutes for AGPs (Ruff et al., 2021) and alleviate the negative effects of heat stress in poultry production. Sugarcane yeast (*Saccharomyces cerevisiae*), as live strains, in the form of probiotics, or their cell wall derivatives, in the form of prebiotics, are great candidates as alternatives, providing nutrients such as amino acids, proteins, besides enzymes like glucanases, mannanases, amylases, proteases and lipases

(Ahiwe et al., 2021). *Saccharomyces cerevisiae* has high levels of β -glucans and mannan-oligosaccharides (MOS) present in the cell wall, and during the autolysis process, these compounds act to prevent pathogenic bacteria from infecting the digestive tract of poultry (Roto et al., 2015; Chacher et al., 2017), act to modulate the immune system (Chen et al., 2016; Kiarie et al., 2022), improve nutrient digestibility, bird performance (Ahiwe et al., 2021) and reduce cortisol levels in heat-challenged animals (Mahmoud et al., 2017).

Phytochemicals are bioactive compounds derived from plants, such as essential oils (Gholami-Ahangaran et al., 2022). Essential oils are natural products that have great potential for improving the gastrointestinal system of poultry (Abd El-Hack et al., 2022). In general, essential oils exhibit beneficial antimicrobial, anti-inflammatory, immunomodulatory, and antioxidant effects (Krishan and Narang, 2014). The combination of these various essential oils can bring synergistic effects (Rossi et al., 2020), but it is necessary to study the effects on animal production. It has already been reported that the combination of essential oils generates beneficial effects on performance (Ertas et al., 2005), gut health and immune system of poultry (Jang et al., 2007; Tiisonen et al., 2010; Awaad et al., 2014), pathogen resistance (Lillehoj et al., 2011), increase in digestive enzymes (Yang et al., 2018) and improvement of carcass parameters (Peng et al., 2016).

This study was proposed under the hypothesis that chronic heat stress can cause damage to the animal performance by inducing oxidative stress and damage to the intestinal mucosa of animals, and that supplementation of the blend of autolyzed sugarcane yeast and essential oils (capsaicin, carvacrol, cinnamaldehyde and eugenol) in chicken diets could minimize the negative effects of stress by acting in different ways in the animal's body. To test this hypothesis, broilers were exposed to chronic heat stress of 32° C from the 1st to the 42nd day of life, and in this period, the animals received diets with different levels of the blend, through performance evaluation, antioxidant enzyme activity and the expression of genes related to intestinal integrity, responses to heat stress and oxidative stress in the jejunum and liver of 42-days-old chickens.

Materials and Methods

All animal experiments were approved by the Ethics Committee on Use of Production Animals of the Universidade Federal de Viçosa, Brazil (n°. 49/2022).

Experimental Design and Animals

The experiment was carried out in the Laboratory of Animal Bioclimatology of the Department of Animal Science, located in the Center of Agricultural Sciences of the Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, Brazil.

A total of 500 one-day-old male broilers (Cobb 500) were used in the experiment. On the first day, the birds were weighed and distributed in a completely randomized design, with a 2×5 factorial arrangement, with 5 replications composed of 10 birds per replicate. The first factor was the environment: Chronic Heat Stress (CHS), where the animals had a chronic stress of 32°C during all life; and Comfort, where the ambient temperature was initially set at 32°C and gradually decreased according to bird age, following the recommendations for the Cobb 500 strain. The second factor was the different inclusions of the microencapsulated blend composed of autolyzed sugarcane yeast and essential oils in the diet: Control Group, 0.75%, 1.5%, 2.25% and 3% of inclusion. At 21 days, the animals were weighed for animal performance analyses. After this period, five animals, selected by the average weight of the replicate, were kept until the end of the experiment in each replicate. The birds were housed in suspended cages (1 m²) with droppings trays in a controlled environment under a 24 h light photoperiod.

Birds had free access to feed and water throughout the experiment. Diets were based on corn and soybean meal and were formulated according to Rostagno et al. (2017). Feed composition and calculated nutrient contents are given in Table 1.

Table 1. Experimental diets and calculated nutrient contents.

Ingredients	Starter period (1-21 days)					Grower and final period (22-42 days)				
	Control	0.75%	1.50%	2.25%	3%	Control	0.75%	1.50%	2.25%	3%
Corn 7.8% CP	573.82	573.82	573.82	573.82	573.82	638.12	638.12	638.12	638.12	638.12
Soy oil	24.81	24.81	24.81	24.81	24.81	36.43	36.43	36.43	36.43	36.43
Soy bean meal 46.0% CP	352.22	352.22	352.22	352.22	352.22	281.15	281.15	281.15	281.15	281.15
Salt	5.52	5.52	5.52	5.52	5.52	5.02	5.02	5.02	5.02	5.02
Calcareous 38%	13.83	13.83	13.83	13.83	13.83	12.98	12.98	12.98	12.98	12.98
Dicalcium phosphate 20%	15.85	15.85	15.85	15.85	15.85	14.35	14.35	14.35	14.35	14.35
<i>DL</i> -Methionine 99%	3.83	3.83	3.83	3.83	3.83	2.99	2.99	2.99	2.99	2.99
<i>L</i> -Threonine (98%)	1.15	1.15	1.15	1.15	1.15	0.74	0.74	0.74	0.74	0.74
<i>L</i> -Valine	0.53	0.53	0.53	0.53	0.53	0.29	0.29	0.29	0.29	0.29
<i>L</i> -Lysine HCL 78%	3.46	3.46	3.46	3.46	3.46	2.93	2.93	2.93	2.93	2.93
Mineral-vitamin premix ¹	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00
Blend ²	-	0.75	1.50	2.25	3.00	-	0.75	1.50	2.25	3.00
Inert filler	3.00	2.25	1.50	0.75	-	3.00	2.25	1.50	0.75	-
Composition Calculated (%)										
AME (kcal/kg)	3000	3000	3000	3000	3000	3150	3150	3150	3150	3150
Calcium	0.966	0.966	0.966	0.966	0.966	0.882	0.882	0.882	0.882	0.882
Available phosphorus	0.460	0.460	0.460	0.460	0.460	0.420	0.420	0.420	0.420	0.420
Sodium	0.240	0.240	0.240	0.240	0.240	0.220	0.220	0.220	0.220	0.220

¹The diets in the initial period (1 to 21 days) provided the following components (per kg): vitamin A, 2.270,00 UI; vitamin E, 8.330 UI; vitamin B1, 591 mg; vitamin B2, 1.490 mg; vitamin B6, 858 mg; vitamin B12, 3.500 mcg; vitamin K3, 450 mg; calcium pantothenate, 2.976 mg; niacin, 8.820 mg; folic acid, 200 mg; biotin, 20 mg; choline, 86 mg; zinc, 19 mg; iron, 14 mg; manganese, 20 mg; copper, 3.040 mg; iodine, 290 mg; cobalt, 50 mg; selenium, 88 mg; ethoxyquin, 25 mg; BHA, 20 mg. The diets in the growing and final periods (22 to 42 days) provided the following components (per kg): vitamin A, 2.250,00 UI; vitamin D3, 500.000 UI; vitamin E, 7.000 UI; vitamin B1, 450 mg; vitamin B2, 1.000 mg; vitamin B6, 450 mg; vitamin B12, 3.500 mcg; vitamin K3, 420 mg; calcium pantothenate, 2.500 mg; niacin, 7.000 mg; folic acid, 180 mg; biotin, 15 mg; choline, 55 mg; zinc, 12 mg; iron, 12 mg; manganese, 15 mg; copper, 3.000 mg; iodine, 250 mg; cobalt, 50 mg; selenium, 72 mg; ethoxyquin, 40 mg; BHA, 40 mg.

²Blend composed of autolyzed sugarcane yeast and essential oils (capsaicin, carvacrol, cinnamaldehyde and eugenol).

Rectal temperature

For rectal temperature measurement, a flexible digital thermometer (Relax Medic) was used, inserted at 3 cm in the cloaca of the birds, for 10 seconds, to stabilize it and obtain the temperature value. In each measurement, one bird per replicate was randomly selected for the rectal temperature measurement. The measurements were taken from 10 to 42 days of age. During this period, measurements were taken on alternate days, with a three-hour interval between each measurement.

Animal performance analysis

For performance analysis, the starter period (from 1 to 21 days) and the grower and the final period (from 22 to 42 days) were evaluated. In the starter period, each replicate with 10 animals was considered an experimental unit ($n = 10$). Subsequently, in the grower and final period, each replicate with 5 animals was considered as an experimental unit ($n = 5$).

At the end of each evaluated period, animals were weighed after a 6-hour fasting period, during which they had free access to water. The animals were weighed individually to determine the average body weight (ABW). Body weight gain (BWG) was determined as the difference in measurements at the beginning and end of the starter period (1 to 21 days) and the grower and the final period (22 to 42 days). Feed intake (FI) was obtained by the difference between the amount of feed provided and consumed in the starter period (from 1 to 21 days) and the grower and final period (from 22 to 42 days). The feed conversion ratio (FCR) was calculated as the ratio of FI to BWG. These parameters were corrected for mortality.

Body composition analysis

The body composition was estimated using dual-energy x-ray absorptiometry (DXA) (GE[®] Healthcare, MA, USA). For this analysis, five birds from each treatment were chosen based on the average weight of the replicate. The animals were fasted for 6 hours but had free access to water during this period. The birds were euthanized by cervical dislocation. The birds were positioned in ventral decubitus with their limbs open on the DXA scanner, as shown in Figure 1. For variables determination, the software Lunar Prodigy Advance (GE[®] Healthcare software version 18) was used. The measures of Bone Mineral Density (BMD) (g/cm^2), Bone Mineral Content (BMC) (g), Lean Mass (g) and Fat Mass (g) were determined.



Figure 1. Image obtained by the DXA scanner of a 42-days-old broiler.

Relative weight of organs

At 42 days of age, chickens were fasted for 6 h and then killed by cervical dislocation. For analysis of relative organ weight, each bird was considered an experimental unit ($n = 5$). Birds were selected according to the body weight average of each replicate. The spleen and heart were collected and weighed. After weighing the total heart, the fat was removed and weighed separately. The relative weight of the spleen and heart was calculated using the equation: $\text{organ weight/body weight} \times 100$. The relative weight of the fat heart was calculated using the equation: $\text{fat heart weight/heart weight} \times 100$.

Histological analysis of the liver and jejunum

At 42 days of age, five animals of each treatment ($n = 5$) were slaughtered by cervical dislocation. Jejunal fragments were collected immediately after slaughter. The fragments were fixed in 10% formalin solution for 24 h at room temperature, and then kept in 70° alcohol until processing. The fragments were dehydrated in an alcohol gradient and embedded in paraffin. Sections of 5 μm thickness were obtained with the aid of a rotary microtome (RM 2255, Leica Biosystems, Nussloch, German) and stained with hematoxylin-eosin (HE). To avoid repetitive analyses of the same histological area, sections were obtained in a semi-serial manner, using 1 every 10 sections. Ten histological sections were prepared randomly for each animal and captured using the 4 \times objective. The images were obtained using an optical microscope (Olympus BX-53, Tokyo, Japan) connected to a digital camera (Olympus DP73, Tokyo, Japan).

For the evaluation of the jejunal mucosa, the villus length and width, as well as the crypt depth were determined using the software Image-Pro[®] Plus (version 4.5.0.29). The villus surface area was determined using the equation suggested by Nain et al. (2012):

$$\text{Villus surface area (mm}^2\text{)} = 2\pi \times (\text{width}/2) \times \text{length}/10^6$$

Gene expression analysis

For gene expression analysis, five 42-day-old broilers from each treatment were slaughtered by cervical dislocation. Animals were chosen based on the average body weight of each replicate group, and their jejunum (from the distal end of the duodenum to Meckel's diverticulum) and liver were collected, washed with cold sterile saline, and added to a microtube containing 1 mL of TRIzol (Invitrogen, Carlsbad CA, USA), being subsequently stored in a -80°C freezer until the time of analysis. Total RNA was extracted using the TRIzol reagent, following the manufacturer's recommendations. Total RNA was quantified using the NanoDrop 2000-c spectrophotometer (ThermoFisher Scientific), in wavelength of 260 nm, and its purity was analyzed using ratio 260/280. Total RNA was treated with the DNase I amplification grade kit (Invitrogen, Carlsbad CA, USA), according to the instructions of the manufacturer. Complementary DNA (cDNA) synthesis was performed using the SuperScript III First-Strand Synthesis SuperMix kit (Invitrogen Corporation, Brazil), according to the manufacturer's instructions. The chain reactions of real-time polymerase (qPCR) were performed using SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, USA) following the recommendations of the manufacturer. The genes occludin (*OCLN*, Gene ID: 396026), mucin 2 (*MUC2*, Gene ID: 423101), heat shock protein 70 kDa (*HSP70*, Gene ID: 423504), catalase (*CAT*, Gene ID: 423600), glutathione peroxidase 1 (*GPXI*, Gene ID: 100857115) and glutathione synthetase (*GSS*, Gene ID: 428135) were designed based on the sequences of the genes filed with the National Center for Biotechnology Information - NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov). The β -actin gene (*ACTB*, Gene ID: 396526) was used as an endogenous control. The analyzes were performed in duplicates and the relative quantification of gene expression was calculated using the $2^{-\Delta CT}$ method, according to Livak and Schmittgen (2001). The results are expressed as arbitrary units (AU).

Analysis of the antioxidant enzymes superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT), total antioxidant capacity (TAC) and thiobarbituric acid reactive substances (TBARS)

Five birds from each treatment, chosen based on the average body weight of each replicate group, were killed at 42 days. The liver and jejunum were collected, frozen in liquid nitrogen, and stored at -80 °C until analysis. Before being frozen, the jejunum was washed with cold sterile physiological saline.

The liver supernatants to perform the analyses of enzymatic activity of SOD, CAT, total antioxidant capacity and TBARS were obtained according to the protocol described by Khatlab et al. (2019).

The activity of the enzyme SOD was measured according to its ability to inhibit the autoxidation of pyrogallol, which generates superoxide anion. The increase in absorbance of the samples was verified at a wavelength of 420 nm for 180 seconds in a microplate reader (VersaMax™, Molecular Devices). The reaction to measure SOD enzyme activity was performed as described by Khatlab et al. (2019). The liver and jejunum supernatant were added to 0.2 mol/L Tris-HCl buffer containing 0.002 mol/L EDTA, pH 8.2, and 0.015 mol/L pyrogallol. The analysis was performed in duplicate at room temperature. A unit of SOD (U) was defined as the amount of enzyme required to inhibit the autoxidation rate of pyrogallol by 50%. SOD activity was expressed as U/mg of protein (Marklund and Marklund, 1974).

CAT activity was assessed by evaluating the ability of the enzyme to convert hydrogen peroxide (H₂O₂) to water and molecular oxygen. Twenty microliters of supernatant were added to 980 µL of the reaction mixture (1 mol/L Tris buffer containing 0.005 mol/L EDTA, pH 8.0, and H₂O₂). Enzyme activity was monitored using an Evolution™ 300 UV-VIS spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific™), and readings were performed at 240 nm for 60 s. CAT activity was expressed as the amount of H₂O₂ consumed per minute per milligram of protein ($\epsilon = 33.33 \text{ mol/L}\cdot\text{cm}$) (Aebi, 1984).

Total antioxidant capacity (TAC) was measured by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH, Sigma–Aldrich) radical scavenging assay, according to the method described by Brand-Williams et al. (1995), with modifications. The reactions to measure the total antioxidant capacity of the liver and jejunum were performed as reported by Khatlab et al. (2019). Samples were read at 515 nm using the Evolution™ 300 UV-VIS spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific™). The antioxidant capacity of each sample was calculated as follows: % Antioxidant activity = $[1 - (\text{absorbance of the sample} / \text{absorbance of DPPH})] \times 100$.

Lipid peroxidation was assessed as described by Buege and Aust (1978), based on the ability of thiobarbituric acid to bind to oxidized lipids. Samples were read at 535 nm using the Evolution™ 300 UV-VIS spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific™). TBARS content was determined using a molar extinction coefficient of $1.56 \times 10^5 \text{ mol/L}\cdot\text{cm}$, according to the Beer–Lambert law. Results were expressed as nmol TBARS/mg of protein.

The Bradford method (Bradford, 1976) was used to determine total protein content and correct CAT, SOD and TBARS results.

Determination of total reactive oxygen species (ROS)

The determination of total ROS in the liver and jejunum was performed as described by Jambunathan (2010). The fluorescence readings of the samples were performed in a spectrofluorometer RF-5301PC (Shimadzu, Kyoto, Japan), at wavelengths of 504 nm and wavelengths of 504 nm and 526 nm for excitation and emission, respectively. The total ROS content was expressed as a relative unit of fluorescence/mg of protein. The total protein content of the liver and jejunum samples was determined by the Bradford method (Bradford, 1976).

Statistics Analysis

The UNIVARIATE procedure was applied to check the normality of the data. Two-way ANOVA was used, considering in the model the effects of the environment and the inclusion of the blend in the diet, as well as their interaction. The statistical model used was: $Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \tau_j + \alpha\tau_{ij} + e_{ijk}$, where Y_{ijk} is the dependent/response variable, μ is the overall mean, α_i is the main effect of environment challenge ($i = \text{comfort or high temperature}$), τ_j is the different blend inclusion levels main effect ($j = \text{Control Group, 0.75\%, 1.5\%, 2.25\% and 3\% of inclusion}$), $\alpha\tau_{ij}$ is the interaction effect interaction between environment \times inclusions of the blend and e_{ijk} is the residual error term. When the interaction between the environment and inclusions of the blend is significant, the means are compared by the Tukey test ($P < 0,05$). When there is only the effect of the environment the means were compared by Student's t test ($P < 0.05$) (SAS, 2002 version 9.00, SAS Inst. Inc., Cary, NC). When there is only the effect of the diet, the means were compared by Tukey test ($P < 0,05$) and regression analysis ($P < 0.05$) (SAS, 2002 version 9.00, SAS Inst. Inc., Cary, NC).

Results

Rectal temperature

The regression effects for rectal temperatures are illustrated in Figure 2. In week 2, a quadratic regression effect was observed for CHS environment, in which the equation is $y = 0.1905x^2 - 0.4674x + 41.306$ ($R^2 = 0.9213$), and the optimum inclusion point is 1.23% inclusion. In week 3, a quadratic regression effect was observed in the CHS

environment, but no regression effect was observed in the blend inclusion levels for the comfort environment. The equation for the high temperature environment is $y = 0.1054x^2 - 0.2029x + 41.313$ ($R^2 = 0.8267$). The lowest value of rectal temperature was found at the level of 1.5% inclusion and the optimum point is calculated at 0.96% blend inclusion. A quadratic regression effect was observed for the rectal temperature in CHS environment at week 4, which the equation is $y = 0.0762x^2 - 0.1752x + 41.666$ ($R^2 = 0.8022$), the calculated optimum point is at the blend inclusion level of 1.15%.

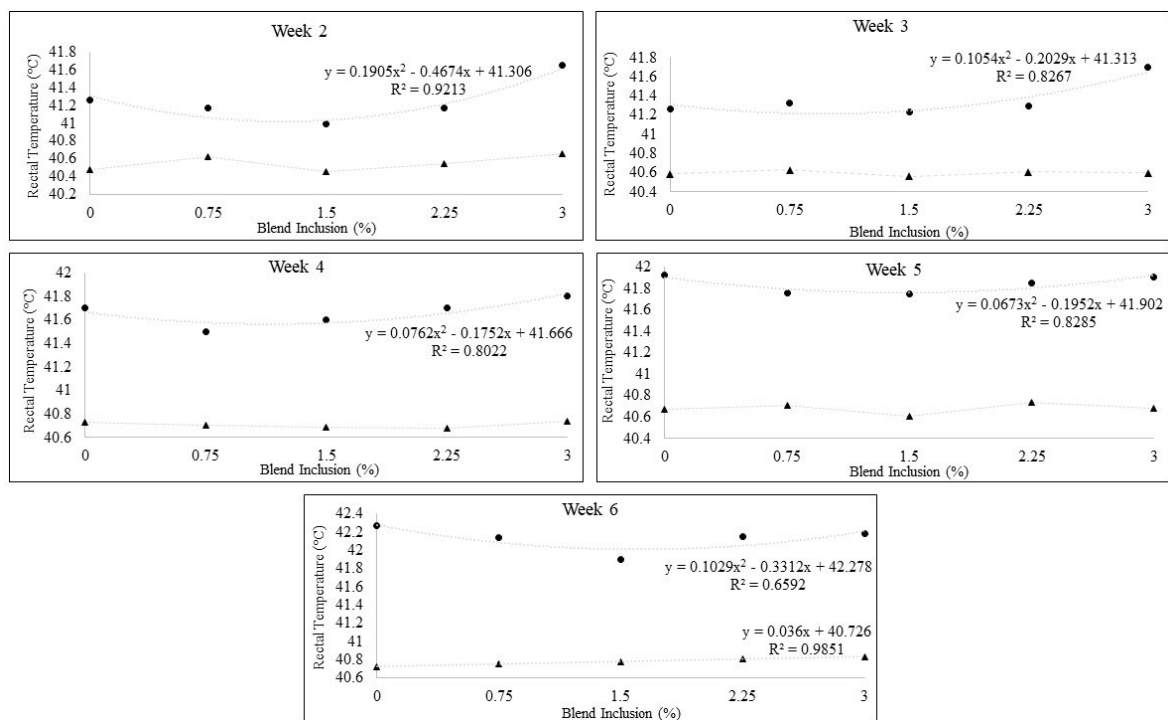


Figure 2. Regression effect of different inclusions of the blend on rectal temperatures of broilers from the second to sixth week of life. The triangle (\blacktriangle) represents the means of rectal temperature of the animals submitted to comfort and the circle (\bullet) represents the means of rectal temperature of the animals submitted to CHS.

At week 5, no regression effect was observed for the means observed in the comfort environment. However, in the CHS environment, a quadratic effect was observed, with the equation $y = 0.0673x^2 - 0.1952x + 41.902$ ($R^2 = 0.8285$). The lowest rectal temperature was observed at the 1.5% inclusion and the point was calculated at the 1.45% inclusion. At week 6, a quadratic effect was observed for the CHS environment, in which the equation is $y = 0.1029x^2 - 0.3312x + 42.278$ ($R^2 = 0.6592$). The lowest temperature was found with the inclusion of 1.5%. The optimum point was calculated at a 1.6% inclusion level. For the comfort environment, a linear effect was observed, with

the equation $y = 0.036x + 40.726$ ($R^2 = 0.9851$), where the rectal temperature increases with increasing levels of blend inclusion. Considering all the weeks evaluated, the inclusion of 1.5% of the blend favors the reduction in the rectal temperature of animals submitted to comfort and CHS.

Animal performance

Animal performance was evaluated in two periods, from the starter period and the grower and final period. Table 2 shows the results of animal performance in the starter period. The different blend inclusions and the environment did not show an interaction effect on the animal performance parameters. But, at 21 days, the environment had a significant effect on ABW ($P = <.0001$), FI ($P = <.0001$) and BWG ($P = <.0001$). It was observed during this period that the comfort animals had higher ABW, FI and BWG, compared to the animals submitted to the CHS environment.

Table 2. Effects of environment and diet on performance of broilers in starter period (1 to 21 days).

		ABW, kg		FI, kg		BWG, kg		FCR	
		Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
Comfort	Control	1.05	0.04	1.30	0.05	1.00	0.04	1.30	0.02
	0.75%	1.04	0.03	1.27	0.06	0.99	0.04	1.28	0.02
	1.50%	1.02	0.03	1.26	0.05	0.97	0.03	1.30	0.03
	2.25%	1.07	0.04	1.30	0.06	1.01	0.03	1.29	0.06
	3%	1.03	0.02	1.26	0.02	0.98	0.02	1.29	0.04
CHS	Control	0.93	0.02	1.12	0.03	0.87	0.02	1.29	0.03
	0.75%	0.91	0.05	1.08	0.05	0.86	0.05	1.26	0.03
	1.50%	0.94	0.05	1.11	0.04	0.87	0.05	1.28	0.03
	2.25%	0.90	0.01	1.10	0.02	0.85	0.01	1.29	0.03
	3%	0.88	0.01	1.07	0.02	0.84	0.01	1.28	0.02
<i>Main Effects</i>									
Environment	Comfort	1.04 ^a	0.03	1.28 ^a	0.05	0.99 ^a	0.03	1.29	0.03
	CHS	0.91 ^b	0.04	1.10 ^b	0.04	0.86 ^b	0.03	1.28	0.03
Diet	Control	0.99	0.07	1.21	0.10	0.93	0.07	1.29	0.02
	0.75%	0.97	0.08	1.18	0.11	0.92	0.08	1.27	0.03
	1.50%	0.98	0.06	1.19	0.09	0.92	0.07	1.29	0.03
	2.25%	0.98	0.09	1.20	0.12	0.93	0.09	1.29	0.04
	3%	0.95	0.08	1.17	0.10	0.91	0.08	1.28	0.03
<i>p-Value</i>									
Environment		<.0001		<.0001		<.0001		0.3654	
Diet		0.1714		0.1899		0.4421		0.5365	
Environment x Diet		0.0783		0.7191		0.4041		0.9234	

^{a,b}Means in the same column followed by different letters differ significantly by Student's t test, $P < 0.05$. Results are presented as mean \pm standard deviation, SD. Each cage was considered an experimental unit, $n = 10$.

ABW: Average Body Weight, FI: Feed Intake, BWG: Body Weight Gain, FCR: Feed Conversion Rate.

In addition, at 42 days of age, the environment had a significant effect on ABW ($P = <.0001$), FI ($P = <.0001$), BWG ($P = <.0001$) and FCR ($P = <.0001$). Animals in the comfort also had higher AWB, FI and higher BWG, but in this period, they present lower FCR, as shown in Table 3.

Table 3. Effects of environment and diet on performance of broilers in grower and final period (22 to 42 days).

		AWG, kg		FI, kg		BWG, kg		FCR	
		Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
Comfort	Control	3.25	0.15	3.81	0.20	2.20	0.14	1.73	0.04
	0.75%	3.29	0.13	3.71	0.09	2.15	0.10	1.73	0.08
	1.50%	3.24	0.18	3.78	0.12	2.19	0.13	1.73	0.12
	2.25%	3.26	0.21	3.75	0.16	2.17	0.27	1.74	0.14
	3%	3.19	0.23	3.56	0.14	2.14	0.24	1.67	0.13
CHS	Control	2.32	0.11	2.55	0.10	1.36	0.10	1.88	0.08
	0.75%	2.10	0.19	2.31	0.19	1.18	0.19	1.98	0.29
	1.50%	2.14	0.26	2.36	0.23	1.20	0.22	1.99	0.18
	2.25%	2.08	0.23	2.25	0.26	1.15	0.12	1.96	0.22
	3%	2.15	0.11	2.38	0.18	1.24	0.10	1.92	0.07
<i>Main Effects</i>									
Environment	Comfort	3.25 ^a	0.17	3.72 ^a	0.16	2.17 ^a	0.17	1.72 ^b	0.10
	CHS	2.16 ^b	0.19	2.37 ^b	0.21	1.23 ^b	0.16	1.95 ^a	0.18
Diet	Control	2.79	0.50	3.18	0.68	1.78	0.46	1.81	0.10
	0.75%	2.70	0.65	3.01	0.75	1.66	0.53	1.86	0.24
	1.50%	2.69	0.61	3.07	0.76	1.70	0.55	1.86	0.20
	2.25%	2.67	0.65	3.00	0.82	1.66	0.57	1.85	0.21
	3%	2.67	0.57	2.97	0.64	1.69	0.51	1.80	0.16
<i>p-Value</i>									
Environment		<.0001		<.0001		<.0001		<.0001	
Diet		0.6246		0.074		0.5393		0.8132	
Environment x Diet		0.4867		0.2701		0.7779		0.9093	

^{a,b}Means in the same column followed by different letters differ significantly by Student's t test, $P < 0.05$. Results are presented as mean \pm standard deviation, SD. Each cage was considered an experimental unit, $n = 5$.
 ABW: Average Body Weight, FI: Feed Intake, BWG: Body Weight Gain, FCR: Feed Conversion Rate.

Body composition

For the fat and lean mass of broiler chickens at 42 days of age, no interaction effect was observed between the different blend inclusions and the environment (Table 4). However, an effect of the environment was observed on fat and lean mass. The animals submitted to comfort had a lower percentage of fat mass (13.09%), compared to the animals submitted to the CHS environment (14.18%). As for lean mass, the animals in the comfort environment had a higher percentage (86.93%), compared to the animals that were subjected to the CHS environment (85.83%).

Table 4. Effects of environment and diet on fat and lean mass of animals at 42 days of age.

		Fat mass, %		Lean mass, %	
		Mean	SD	Mean	SD
Comfort	Control	13.00	1.08	86.99	1.06
	0.75%	12.95	1.20	87.14	1.37
	1.50%	13.14	1.59	86.88	1.60
	2.25%	13.12	1.80	86.89	1.78
	3%	13.16	1.95	86.85	1.94
CHS	Control	14.58	1.87	85.43	1.88
	0.75%	14.07	2.69	85.93	2.69
	1.50%	14.08	2.18	85.93	2.17
	2.25%	14.75	1.20	85.25	1.16
	3%	13.39	1.69	86.61	1.69
<i>Main Effects</i>					
Environment	Comfort	13.09 ^b	1.46	86.93 ^a	1.47
	CHS	14.18 ^a	1.84	85.83 ^b	1.83
Diet	Control	13.88	1.70	86.12	1.69
	0.75%	13.59	2.11	86.45	2.16
	1.50%	13.61	1.87	86.41	1.87
	2.25%	13.94	1.68	86.07	1.66
	3%	13.27	1.73	86.73	1.72
<i>p-Value</i>					
Environment		0.0472		0.0443	
Diet		0.9355		0.9356	
Environment x Diet		0.9115		0.9131	

^{a,b}Means in the same column followed by different letters differ significantly by Student's t test, $P < 0.05$. Results are presented as mean \pm standard deviation, SD.

The densitometry analysis indicated that there was no interaction between the different blend inclusions and the environment to which the animals were submitted for the variables Bone Mineral Content (BMC) and Bone Mineral Density (BMD) (Table 5). Again, it was observed that the environment influenced these parameters and the animals submitted to comfort had a higher BMC (42.33 g) in relation to the animals submitted to CHS (27.54 g). Similarly, to the BMD, the animals submitted to comfort presented 0.169 g/cm², while the animals submitted to stress presented 0.141 g/cm².

Table 5. Effects of environment and diet on Bone Mineral Content (BMC) and Bone Mineral Density (BMD) of animals at 42 days of age.

		BMC, g		BMD, g/cm ²	
		Mean	SD	Mean	SD
Comfort	Control	41.90	3.16	0.17	0.01
	0.75%	41.85	3.59	0.17	0.01
	1.50%	43.30	3.70	0.17	0.01
	2.25%	44.43	2.58	0.17	0.01
	3%	40.18	3.90	0.17	0.01
CHS	Control	28.08	3.72	0.14	0.01
	0.75%	30.45	2.58	0.15	0.01
	1.50%	27.68	6.20	0.14	0.01
	2.25%	26.18	5.71	0.14	0.02
	3%	25.66	4.94	0.14	0.01
<i>Main Effects</i>					
Environment	Comfort	42.33 ^a	3.38	0.17 ^a	0.01
	CHS	27.54 ^b	4.61	0.14 ^b	0.01
Diet	Control	34.22	7.98	0.15	0.02
	0.75%	36.15	6.75	0.16	0.01
	1.50%	35.49	9.60	0.16	0.02
	2.25%	35.30	10.58	0.16	0.02
	3%	32.11	8.74	0.15	0.02
<i>p-Value</i>					
Environment		<.0001		<.0001	
Diet		0.5749		0.6825	
Environment x Diet		0.5850		0.5253	

^{a,b}Means in the same column followed by different letters differ significantly by Student's t test, $P < 0.05$. Results are presented as mean \pm standard deviation, SD.

Relative weight of organs

Spleen, heart, and fat heart weights of 42-day-old birds were evaluated (Figure 3). There was no interaction effect for the parameters evaluated. However, there was an effect of the environment on the organs weight evaluated ($P = <.0001$). The animals submitted to comfort environment presented higher spleen (1.035%) and heart (5.095%) relative weight, compared to the animals that were submitted to CHS (0.542% and 3.317%, respectively). Regarding the relative weight of heart fat, the CHS animals presented higher fat deposition in the heart (0.132%) than the animals submitted to comfort (0.083%).

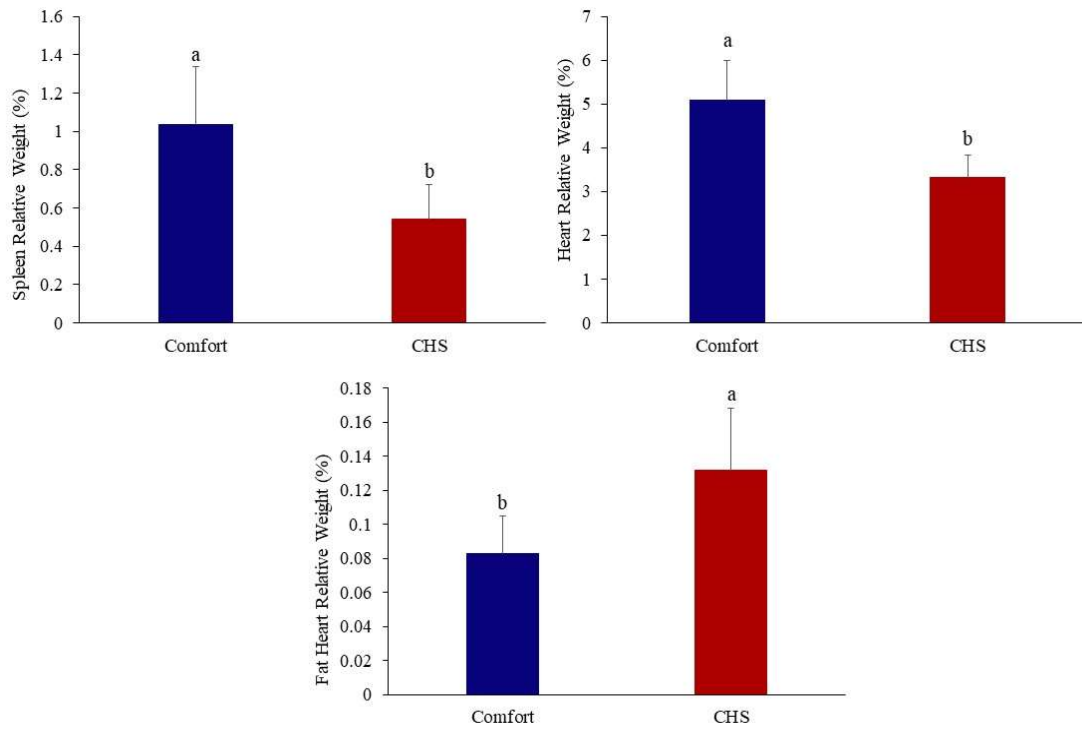


Figure 3. Effect of environment on the spleen, heart, and fat heart relative weight of 42-days-old broilers.

Intestinal morphometry

The regression effects of intestinal morphometry parameters are illustrated in Figure 4. A quadratic regression effect was observed for villus length for the comfort and CHS environments. In the comfort environment, the equation is $y = -70.813x^2 + 205.59x + 1277.7$ ($R^2 = 0.9529$). The highest villus length at comfort is calculated from the maximum point of the regression equation. In the comfort environment, 1.45% of blend inclusion showed a higher villus length. Regarding villus width, a quadratic regression effect was also observed for CHS environment, which equation is $y = -3.2114x^2 - 1.695x + 151.83$ ($R^2 = 0.9759$).

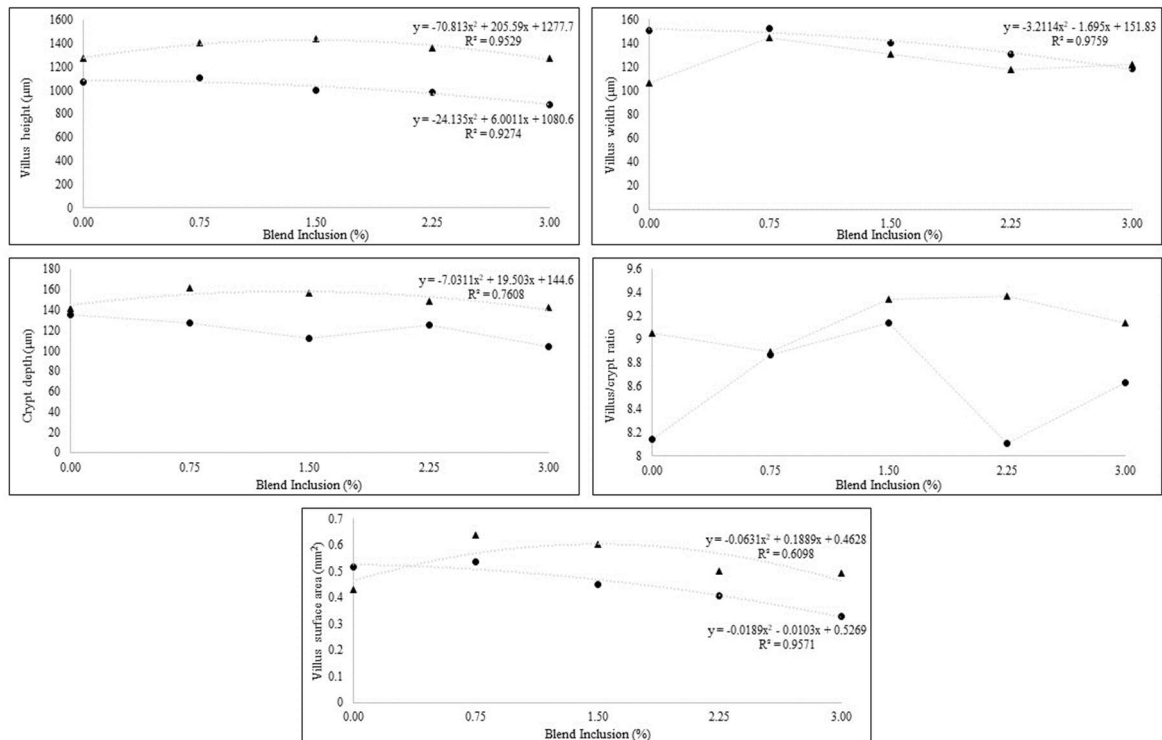


Figure 4. Regression effect of different inclusions of the blend on intestinal morphometry of 42-days-old broilers. The triangle (▲) represents the means of rectal temperature of the animals submitted to comfort and the circle (●) represents the means of rectal temperature of the animals submitted to CHS.

A quadratic regression effect was observed for crypt depth in the comfort environment. The equation is $y = -7.0311x^2 + 19.503x + 144.6$ ($R^2 = 0.7608$) and the optimum point was calculated with 1.39 % of inclusion. In the villus/crypt ratio, no regression effect was observed for both environments evaluated. A quadratic regression effect was observed for the villus surface area of the jejunum for the comfort and high temperature environments. In the comfort environment, the equation is $y = -0.0631x^2 + 0.1889x + 0.4628$ ($R^2 = 0.6098$) and the higher villus surface area is calculated with the inclusion of 1.5% of the blend. In the CHS environment, the equation is $y = -0.0189x^2 - 0.0103x + 0.5269$ ($R^2 = 0.9571$). In CHS, the increase of blend inclusion tends to reduce the villus surface area. Considering all the parameters evaluated, the inclusion of 1.5% of the blend seems to improve the intestinal morphometry of the chickens at 42 days.

Genes related to intestinal integrity

To evaluate the intestinal integrity of the animals, it was analyzed the expression of occludin (*OCN*) and mucin 2 (*MUC2*) genes in the jejunum of 42-day-old broilers.

No interaction effect was observed for the expression of the genes evaluated. Also, it was not observe any effect of environment and diet on these genes expression (Table 6).

Table 6. Effect of environment and blend inclusions on genes related to jejunum integrity.

		<i>OCN</i> , AU		<i>MUC2</i> , AU	
		Mean	SD	Mean	SD
Comfort	Control	0.314	0.316	1.487	0.990
	0.75%	0.536	0.733	1.784	0.844
	1.50%	0.164	0.153	1.911	1.461
	2.25%	1.140	1.769	2.909	2.031
	3%	1.265	2.125	2.520	1.699
CHS	Control	5.310	13.494	4.341	6.533
	0.75%	0.733	0.797	1.575	0.661
	1.50%	1.233	1.621	1.586	1.658
	2.25%	0.378	0.455	3.028	1.001
	3%	0.475	0.685	3.340	2.052
<i>Main Effects</i>					
Environment	Comfort	0.706	1.354	2.132	1.493
	CHS	1.712	6.210	2.810	3.446
Diet	Control	2.646	9.206	2.914	4.727
	0.75%	0.648	0.748	1.680	0.731
	1.50%	0.663	1.201	1.761	1.497
	2.25%	0.886	1.479	2.953	1.667
	3%	0.920	1.661	2.898	1.838
<i>p-Value</i>					
Environment		0.3228		0.2777	
Diet		0.6949		0.5322	
Environment x Diet		0.3699		0.5024	

Results are expressed as arbitrary units, AU, and are presented as mean \pm standard deviation, SD.

Genes related to oxidative stress

Interaction between diet and environment on *GPXI* and *GSS* gene expression was observed in the liver (Table 7). In the comfort environment, 3% of blend inclusion in the diets reduced these genes expression (*GPXI* and *GSS*) in the liver of the animals. But in the CHS environment, animals that received 1.5% of blend inclusion had the lowest *GPXI* and *GSS* gene expression in the liver.

The effect of environment and diet on *CAT* expression was observed. The animals submitted to comfort had lower *CAT* gene expression. As for diet, *CAT* expression decreases with the blend inclusion in diet, and the lower expression was observed with 3% of inclusion.

Table 7. Effect of environment and blend inclusions on genes related to oxidative stress in liver.

		CAT, AU		GPXI, AU		GSS, AU	
		Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
Comfort	Control	5.49	0.84	0.06 ^a	0.02	0.05 ^{ab}	0.01
	1.5%	4.27	1.12	0.04 ^{ab}	0.01	0.04 ^b	0.02
	3%	3.43	0.73	0.03 ^b	0.02	0.03 ^c	0.02
CHS	Control	6.72	1.00	0.05 ^a	0.02	0.06 ^{ab}	0.02
	1.5%	6.45	2.01	0.04 ^{ab}	0.01	0.04 ^b	0.01
	3%	5.44	2.13	0.06 ^a	0.02	0.06 ^a	0.02
<i>Main Effects</i>							
Environment	Comfort	4.41 ^b	1.22	0.040	0.02	0.039	0.02
	CHS	6.24 ^a	1.72	0.054	0.02	0.053	0.02
Diet	Control	6.11 ^a	1.09	0.054	0.02	0.056	0.02
	1.5%	5.36 ^{ab}	1.91	0.044	0.10	0.037	0.02
	3%	4.34 ^b	1.78	0.045	0.02	0.045	0.02
<i>P-value</i>							
Environment		0.0008		0.0158		0.0315	
Diet		0.0245		0.3335		0.0443	
Environment x Diet		0.6867		0.0221		0.0394	

^{a,b}Means in the same column followed by different letters differ significantly by the Tukey test, $P < 0.05$, for diet and environment x diet effects. ^{a,b}Means in the same column followed by different letters differ significantly by the Student's t test, $P < 0.05$, for environment effect. Results are expressed as arbitrary units, AU, and are presented as mean \pm standard deviation, SD.

In the jejunum, no interaction and main effects were observed for the expression of oxidative stress-related genes, as shown in Table 8.

Table 8. Effect of environment and blend inclusions on genes related to oxidative stress in jejunum.

		CAT, AU		GPXI, AU		GSS, AU	
		Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
Comfort	Control	0.505	0.80	0.015	0.02	0.021	0.01
	1.5%	0.571	0.53	0.007	0.01	0.024	0.02
	3%	0.538	0.22	0.008	0.01	0.014	0.00
CHS	Control	0.586	0.46	0.005	0.01	0.026	0.03
	1.5%	0.403	2.75	0.010	0.01	0.019	0.01
	3%	0.648	1.02	0.022	0.02	0.036	0.03
<i>Main Effects</i>							
Environment	Comfort	0.540	0.56	0.010	0.01	0.020	0.01
	CHS	0.579	1.60	0.013	0.01	0.027	0.02
Diet	Control	0.546	0.65	0.010	0.01	0.023	0.02
	1.50%	0.520	1.94	0.009	0.01	0.021	0.01
	3%	0.597	0.83	0.015	0.01	0.025	0.02
<i>P-value</i>							
Environment		0.9548		0.5577		0.1716	
Diet		0.8207		0.3837		0.8429	
Environment x Diet		0.6863		0.0506		0.1289	

^{a,b}Means in the same column followed by different letters differ significantly by the Tukey test, $P < 0.05$, for diet and environment x diet effects. ^{a,b}Means in the same column followed by different letters differ significantly by the Student's t test, $P < 0.05$, for environment effect. Results are expressed as arbitrary units, AU, and are presented as mean \pm standard deviation, SD.

The factors of different blend inclusions on diet and environment showed no interaction effect for *HSP70* gene expression on jejunum and liver of 42 days old broiler chickens. Environmental effect was observed in the liver ($P = 0.0013$) and jejunum ($P = 0.0162$). CHS increased *HSP70* expression in both organs (Figure 5a). The effect of diet was also observed on *HSP70* liver expression ($P = 0.0035$) and jejunum ($P = 0.0077$). The control group and 1.5% of blend inclusion in diet, showed lower levels of *HSP70* gene expression in jejunum and liver (Figure 5b), indicating that animals that consumed diets with these levels of inclusion had a better capacity to tolerate heat stress than animals that consumed 3% of inclusion.

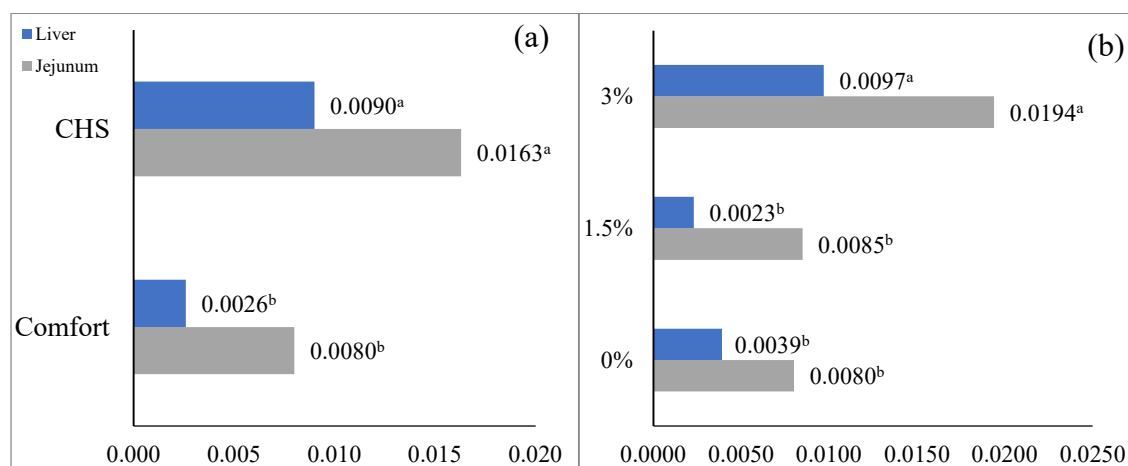


Figure 5. Effect of environment (a) and diet (b) on *HSP70* gene expression in the jejunum (in grey) and liver (in blue) of 42 days old broiler chickens. Results are presented as mean. ^{a,b} Different letters represent significant differences by the Student's test, $P < 0.05$.

Analysis of the antioxidant enzymes superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT), total antioxidant capacity (TAC), thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) and reactive oxygen species (ROS).

Table 9 shows the oxidant-antioxidant state of the liver. Our results show that in the liver, an interaction effect was observed for SOD enzyme activity ($P = 0.0002$). The 3% of blend inclusion in both environments and the control group in comfort reduced the SOD activity in the liver. It was observed no interaction effect for the enzyme CAT ($P = 0.8748$), total antioxidant capacity ($P = 0.5785$), TBARS content ($P = 0.8886$) and ROS ($R = 0.3651$). The environment and the different blend inclusions did not affect the CAT

and TAC activity in the liver. But the animals that were subjected to CHS showed a higher TBARS and ROS content. Animals that received 1.5% of the blend showed higher TBARS content.

Table 9. Effect of the environment and different blend inclusions on the oxidant-antioxidant state of the liver.

		SOD		CAT		TAC		TBARS		ROS	
		Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
Comfort	Control	2.29 ^d	0.29	116.84	57.46	54.43	6.72	1.57	0.42	2721.95	1047.02
	1.50%	3.44 ^a	0.39	106.56	30.67	58.06	3.82	2.02	0.44	2937.86	1066.61
	3%	2.60 ^{cd}	0.38	114.81	33.76	57.51	7.71	1.54	0.29	2494.26	656.61
CHS	Control	2.98 ^b	0.13	102.44	22.36	52.40	2.93	2.13	0.39	4569.88	2216.22
	1.50%	2.92 ^{bc}	0.11	91.47	34.52	50.37	3.53	2.51	0.24	3479.04	1311.90
	3%	2.37 ^d	0.23	113.59	14.80	54.08	7.99	2.19	0.38	4604.74	729.76
<i>Main Effects</i>											
Environment	Comfort	2.78	0.60	112.74	39.49	56.67	6.06	1.71 ^b	0.42	2718.02 ^b	892.52
	CHS	2.72	0.34	103.98	23.70	52.53	5.50	2.26 ^a	0.36	4292.93 ^a	1490.18
Diet	Control	2.64	0.42	109.64	41.80	53.42	5.00	1.85 ^b	0.48	3645.91	1902.29
	1.50%	3.21	0.39	99.85	31.31	54.64	5.33	2.23 ^a	0.43	3178.38	1138.24
	3%	2.47	0.31	114.15	23.79	55.64	7.67	1.90 ^b	0.47	3645.43	1285.88
<i>P-value</i>											
Environment		0.5765		0.4907		0.0718		0.0004		0.0022	
Diet		<.0001		0.6132		0.6568		0.0422		0.7871	
Environment x Diet		0.0002		0.8748		0.5785		0.8886		0.3651	

^{a,b}Means in the same column followed by different letters differ significantly by the Tukey test, $P < 0.05$, for diet and environment x diet effects. ^{a,b}Means in the same column followed by different letters differ significantly by the Student's t test, $P < 0.05$, for environment effect. Results are presented as mean \pm standard deviation, SD.

SOD: superoxide dismutase activity, expressed as U of SOD/mg protein; CAT: catalase expressed as the amount of hydrogen peroxide consumed/min/mg protein; TAC: total antioxidant capacity, expressed as %; TBARS: thiobarbituric acid reactive substances, expressed as nmol TBARS/mg of protein; ROS: reactive oxygen species, expressed as relative unit of fluorescence/mg of protein.

The oxidant-antioxidant state of the jejunum is shown in Table 10. There was an interaction effect for the enzyme SOD ($P = 0.0022$). Like liver, the blend inclusion of 3% in both environments and the control group in comfort reduced the SOD activity in the jejunum. No interaction effect was observed for the CAT enzyme and the TAC. However, it was observed that the animals that were subjected to high temperature stress showed higher CAT enzyme activity. There was an interaction effect for TBARS content in the jejunum of the animals ($P = 0.0003$). The highest TBARS content was observed at the blend inclusion of 1.5% in the comfort environment, and the lowest content was observed at the 3% inclusion, also in the comfort environment. There was an effect of diet on the ROS content in the jejunum of the broilers. The animals that received 1.5% and 3% of the blend had higher levels of ROS, compared to the animals that did not receive the blend.

Table 10. Effect of the environment and different blend inclusions on the oxidant-antioxidant state of the jejunum.

		SOD		CAT		TAC		TBARS		ROS	
		Média	DP	Média	DP	Média	DP	Mean	SD	Mean	SD
Comfort	Control	3.49 ^b	0.26	27.27	9.71	58.42	4.35	1.72 ^{ab}	0.17	3049.42	856.76
	1.50%	4.18 ^a	0.32	15.44	7.68	64.70	9.28	1.84 ^a	0.20	3945.69	578.05
	3%	3.53 ^b	0.29	22.17	14.80	60.72	7.53	1.10 ^c	0.13	3613.77	293.04
CHS	Control	4.43 ^a	0.38	54.84	22.12	55.15	2.81	1.67 ^{ab}	0.30	3023.33	630.80
	1.50%	4.49 ^a	0.31	53.10	43.94	58.27	2.08	1.52 ^b	0.19	4236.54	981.71
	3%	3.37 ^b	0.26	65.11	55.31	63.99	5.61	1.67 ^{ab}	0.24	4659.88	757.17
<i>Main Effects</i>											
Environment	Comfort	3.73	0.42	21.63 ^b	11.47	61.28	7.31	1.55	0.37	3536.29	690.21
	CHS	4.10	0.61	57.68 ^a	39.94	59.14	5.18	1.62	0.24	3973.25	1033.56
Diet	Control	3.96	0.58	41.06	21.69	56.78	3.86	1.69	0.23	3036.38 ^b	709.42
	1.50%	4.34	0.34	34.27	35.75	61.49	7.19	1.68	0.25	4091.11 ^a	774.82
	3%	3.45	0.27	43.64	44.37	62.35	6.50	1.38	0.35	4136.82 ^a	772.63
<i>P-value</i>											
Environment		0.0032		0.0042		0.3256		0.4075		0.1084	
Diet		<.0001		0.7884		0.0933		0.0047		0.0029	
Environment x Diet		0.0022		0.8562		0.1890		0.0003		0.2492	

^{a,b}Means in the same column followed by different letters differ significantly by the Tukey test, $P < 0.05$, for diet and environment x diet effects. ^{a,b}Means in the same column followed by different letters differ significantly by the Student's t test, $P < 0.05$, for environment effect. Results are presented as mean \pm standard deviation, SD.

SOD: superoxide dismutase activity, expressed as U of SOD/mg protein; CAT: catalase expressed as the amount of hydrogen peroxide consumed/min/mg protein; TAC: total antioxidant capacity, expressed as %; TBARS: thiobarbituric acid reactive substances, expressed as nmol TBARS/mg of protein; ROS: reactive oxygen species, expressed as relative unit of fluorescence/mg of protein.

Discussion

Poultry are homeothermic animals that can maintain constant body temperature. Thus, one of the indicators of heat stress in birds is rectal temperature, which reflects the changes that occur internally in the animals (Lan et al., 2022). It was evaluated the rectal temperature of animals from the second to the sixth week of life and observed an increase in the body temperature of animals that were subjected to CHS of 32°C in all the weeks evaluated. Corroborating with our results, Lan et al. (2022) observed higher rectal temperature with the increasing of age broilers that were submitted to temperature stress.

The MOS inclusion in broilers' diet can act by reducing the body temperature of the birds and the negative effects that can be generated in the animals (Cheng et al., 2019). It was previously reported by Sohail et al. (2012) that the MOS inclusion in the diet of birds submitted to CHS normalized serum corticosterone levels. The increase in corticosterone is related to the activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis, which is responsible for generate responses in a stress situation (Sohail et al., 2012). Essential oils also have beneficial effects on the regulation of body temperature in birds. Some essential oils can activate transient receptor potential (TRP) channels, which can be activated by thermal, chemical, or physical stimuli and act as thermoreceptors, allowing the animal to accurately sense the environmental temperature (Rossi et al., 2020; Saito et al., 2014). This is because, the entire gastrointestinal tract has highly expressed TRPs (Alvarenga et al., 2016). Some of the examples of channels already identified in chickens are TRPA1 which is activated by carvacrol and cinnamaldehyde, while TRPV3 is activated by carvacrol, eugenol, and thymol (Rossi et al., 2020; Saito et al., 2014). In mammals, TRPV1 channels are activated by capsaicin (Szolcsányi, 2015), but in birds, these channels are insensitive to capsaicin (Nikami et al., 2008). It has been shown previously that the effects that capsaicin has on birds are independent of TRPV1 channels (Mahmoud et al., 2007). Thus, this compound appears to assist thermoregulation in birds via an alternative route, without activating the thermoreceptor. Capsaicin contributes to vitamin C (Abd El-Hack et al., 2019), which has a protective function against oxidative damage and enhances the immune system of animals in the face of temperature stress (Shakeri et al., 2020).

Long exposure to high temperatures causes several losses to animal performance. In our results, feed intake and weight gain were negatively affected by temperature stress in both phases. Broilers are animals with high metabolic heat production (Vandana et al.,

2021) and one of the mechanisms for reducing metabolic heat production is reducing feed intake (Nawaz et al., 2021). This relationship can be explained because in the hypothalamus, where the interpretation of external temperature occurs, through the activation of transient receptor potential channels (TRPs) (Castillo et al., 2018), it is also located the appetite control center (Chen et al., 2021; Goel, 2021; Ahmad et al., 2022). Other research has also reported that chronic heat stress affects feed intake in broilers and, consequently, animal performance (Ahmed-Farid et al., 2021; Teyssier et al., 2022). In our study, in the period from 22 to 42 days, higher feed conversion was observed for animals in the CHS environment. Different from what happened at the end of the third week, where there was no difference in feed conversion in the different environments. The stress proved to be more aggressive for older animals, feed intake must have been further affected, affecting the feed conversion ratio in this phase. According to Del Vesco et al. (2017) when subjected to acute heat stress, 21-day-old chickens show higher antioxidant capacity than 42-day-old animals. These results indicate that younger animals are more tolerant to heat stress.

It was observed that the different blend inclusions of autolyzed and dehydrated sugarcane yeast and essential oils had no effect on the performance parameters. One of the benefits of using sugarcane yeast is the reduction of intestinal pathogen contamination. Mannan-oligosaccharides can bind to gram-negative pathogenic bacteria, such as *Salmonella* sp. and *Escherichia coli* (Świątkiewicz et al., 2014). The improvement of intestinal health benefits the performance of the animals. The study of Sohail et al. (2012), concluded that the MOS inclusion for animals that were submitted to chronic heat stress improved weight gain and feed conversion, relative to animals that did not receive the same product. Similarly, Ahiwe et al. (2020) concluded that the inclusions of autolyzed yeast and yeast cell wall products improved weight gain and feed conversion. However, Yalçinkaya et al. (2008), reported that MOS inclusions of 0.05%, 0.10% and 0.15% from *Saccharomyces cerevisiae* were statistically equal to animals that were not supplemented in the parameters of weight gain, feed intake and feed conversion. The contradictions between results found in the literature from research using sugarcane yeast can be explained by differences in yeast processing, methods used and inclusion levels.

The use of essential oils helps to improve the digestive system, because such compounds have antioxidant, antimicrobial and immunomodulatory functions and can help in the health of birds submitted to stress, combating pathogens, and assisting the immune system (Abd El-Hack et al., 2022; Qui, 2023). Cristo et al. (2022) tested two

blend inclusions containing carvacrol, cinnamaldehyde and eugenol (100 and 150 g/ton), and observed no differences in weight gain, feed intake and feed conversion parameters when compared to a control diet and a growth-promoting antibiotic. Li et al. (2022) tested the inclusions of 2, 4 and 6 mg/kg of microencapsulated capsaicin in the diet of broiler and observed no differences in average daily gain and average daily feed consumption. On the other hand, Karadas et al. (2014), using a 100 g/ton of a blend with 5% carvacrol, 3% cinnamaldehyde and 2% capsaicin, observed an improvement in weight gain and feed conversion in 21-day-old broilers.

Regarding body composition, the DXA scan showed that animals submitted to comfort had higher values of bone mineral content and bone mineral density. The integrity of the bone structure in chickens is related to welfare and directly affects performance and meat quality. It has been previously reported that high levels of corticosterone slow down bone growth, chondrocyte proliferation and differentiation, and synthesis of type X collagen (Luo et al., 2013). Besides that, reduced feed intake may have impaired the bone composition of animals subjected to temperature stress.

In our results, it was observed that the fat percentage and heart fat deposition increase in CHS. One of the changes observed during heat stress in poultry is increased fat deposition (De Antonio et al., 2017; Lu et al., 2019). This is because heat exposure reduces basal metabolism and the level of physical activity, leading to a greater energy accumulation, which would be available for growth but is stored in the form of abdominal and subcutaneous fat (Baziz et al., 1996). In addition, there are several factors that regulate lipid deposition in poultry, such as hormones, miRNAs, and their target genes involved in lipogenesis, adipogenesis, and triacylglycerol synthesis, for example (Nematbakhsh et al., 2021). Besides that, CHS reduced *mTOR* gene expression in chicken breast muscle, reducing protein synthesis, amino acid transport, and breast yield (Ma et al., 2018), a fact that may impair the deposition of muscle tissue under high temperature stress.

Under heat stress, during the thermoregulatory process, birds search for ways to maintain stable body temperature to ensure the functioning of vital organs (Shakeri et al., 2020). One of these organs that can be affected is the spleen, an essential lymphoid organ for the immune system of birds, and its atrophy may be related to losses in the defense system. Our results show that animals submitted to CHS had an involution of the spleen. Ohtsu et al. (2015) reported in their research an involution of the spleen in birds that experienced heat stress of 34°C for a period of 15 days, a fact that was related to an

increase in the interleukin-4 and interleukin-12 expression and reduction of interferon-gamma. Quintero-Filho et al. (2010) also reported a reduction in the spleen weight of animals that were submitted to heat stress of 36°C from 35 to 42 days of age. The authors suggest that the HPA axis activation and serum levels of corticosterone were responsible for the spleen involution. In our results, no effect of the blend inclusion on spleen weight was observed.

As external temperature increases, an elevation in heart rate occurs to maintain blood supply to vital organs, but this can damage heart tissues (Xu et al., 2018). Zhang et al. (2017b) evaluated the cardiac parameters of two chicken strains, one fast-growing and one slow-growing, subjected to heat stress. The authors concluded that the fast-growing strain had reduced heart size because of heat stress. This is because there is an increase in cardiac dysfunction in modern broiler chickens that can be caused by reduced relative weight of organs, increased heart rate and contractions (Zhang et al., 2017b). Our results corroborate with the cited authors since it was observed lower heart weight of animals that were subjected to temperature stress. No differences were observed between the blend inclusions on heart weight. Sarangi et al. (2016), also found no difference in heart weight in 42-day-old birds supplemented with MOS compared to the control group. On the other hand, Osita et al. (2020) concluded that the inclusion of 1.2 g/kg of *Saccharomyces cerevisiae* increased the relative heart weight of 56-day-old broilers. Related to the use of phytogetic in poultry diets, Barreto et al. (2008) evaluated a cinnamon, clove, oregano, and pepper extract and observed no effect of supplementation on heart weight compared to the control group or the group that was supplemented with an AGP. Similarly, Awaad et al. (2014), tested the use of carvacrol, cinnamaldehyde, and *Capsicum* oleoresin in broiler chickens, and found no supplementation effect on the heart weight of the animals.

Animal health and welfare are directly linked to gut health. The best utilization of feed and absorption of nutrients is directly linked to maintaining the intestinal health of animals (Ducatelle et al., 2018). In our study, we evaluated the intestinal integrity of 42-day-old birds through morphometry of the jejunum and expression of the *OCN* and *MUC2* genes. In our study, quadratic regression effects were found for villus length, villus width, crypt depth, and villus surface area.

In comfort, the animals showed a high value of villus length compared to animal submitted to CHS. Regarding villus width, in the comfort environment, the highest value was calculated with 1.52% of inclusion of the blend, but in the CHS, villus width tended

to decrease with increase of blend inclusion in the diet. The higher crypt depth is shown in the comfort environment. This indicates that this level of inclusion favors a greater replacement of epithelial cells in the villi. Stem cells located in the crypts migrate to the top of the villi and, during this process, differentiate to act in the absorption of nutrients, in the form of epithelial cells, which coat the intestinal lumen layer (Ducatelle et al., 2018). The highest villus surface area was observed with the 1.5% inclusion of the blend in the diet of the animals that were submitted to comfort. In CHS, the increase in levels of inclusion of the blend tends to reduce the villus surface area. The inclusion of levels around 1.5% seems to improve the parameters of intestinal morphometry in the comfort environment. However, the use of the blend for animals submitted to CHS does not seem to present beneficial effects on intestinal morphometry.

It was also evaluated the *OCN* and *MUC2* genes expression in the jejunum of the animals. The membrane of the intestinal epithelium is formed by epithelial cells, joined by adherence junctions, tight junctions, and desmosomes, and when these structures are affected, it may occur the penetration of pathogens into the organism (Goel, 2021). The tight junction proteins, occludin and claudin, form a physical barrier that protects the intestinal epithelium of birds (Tabler et al., 2020). Heat stress can affect these junctions, which compromises intestinal integrity (Goel, 2021). One of the protective mechanisms of intestinal tissue occurs with the production and secretion of mucus by the goblet cells, because the mucus layers act to protect against the pathogenic microbiota colonization (Kim and Ho, 2010; Patra and Kar, 2021). In our study, it was found no significant effect of diet and environment on *OCN* expression. The results of Goo et al. (2019) corroborate our results. The authors indicated that heat stress did not affect *OCN* expression in the jejunum of 35-day-old broilers submitted to 2 weeks of heat stress. According to Chen et al. (2020), the MOS use increased villus length and the *OCN* and *MUC2* expression. The study of Cheng et al. (2019), on the other hand, evaluated cyclic stress, and concluded that heat stress not only reduced the villus length, but also reduced the *OCN* and *MUC2* expression. These contradictions may be due to the different types of stress that the animals may have been subjected to. It has been reported previously that chronic stress generates an adaptation in the animals subjected to it (Jastrebski et al., 2017).

During the state of heat stress, changes in the gut microbiota can be caused by the reduction of feed intake and the increase of corticosterone levels, factors that can impair the activity of the immune system (Patra and Kar, 2021). Furthermore, bacteria are sensitive to temperature changes and the increase in external temperature can also cause

changes in the intestinal microbiota (Patra and Kar, 2021). It has been previously reported by Baurhoo et al. (2007) that the MOS inclusion in poultry diets increases populations of beneficial bacteria such as *Lactobacilli* and *Bifidobacterial*, resulting in benefits for gut health, such as villus length and the number of goblet cells. This is very important since *Lactobacillus* spp. reduces the number of pathogenic bacteria through competition (Vidanarachchi et al., 2005) and produces bacteriocins, which are protein compounds that bind to the walls of microorganisms and cause ionic imbalances (Svetoch et al., 2011). The mode of action of essential oils is similar. Carvacrol, for example, can disintegrate the membrane of bacteria (Gopi et al., 2013). According to Windisch et al. (2009), the results found in the literature with the use of phytogetic additives are not standardized and this can be attributed to the hypothesis that while essential oils present beneficial effects that improve the intestinal surface, they can also cause irritation in the intestinal tissue. This may explain the fact that the blend inclusion levels did not favor the parameters of intestinal morphometry in the CHS environment. The animals probably already had some level of irritation caused by CHS, and the essential oils were not able to reduce this. Thus, the effects of essential oils on intestinal morphometry depend on the balance between the beneficial effects and the irritation that can be generated in the intestinal tissue (Zeng et al., 2015).

Oxidative stress in cells and tissues causes an imbalance in free radical production, in a state where reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS) production is higher than elimination, causing injuries such as lipid peroxidation, DNA damage, and apoptosis (Mishra and Jha, 2019). Antioxidant enzymes, such as catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GPx) and their related enzymes, have the role of antioxidant defense, protecting cellular structures from the effects generated by ROS (Roushdy et al., 2018). This enzymatic defense system eliminates ROS, converting them into less reactive species (Habashy et al., 2019). Within the antioxidant defense levels, heat shock proteins (HSP) are part of the third level of repair (Surai et al., 2019). HSPs are proteins that are synthesized by the organism in response to environmental stress, thus these genes expression increases in a temperature stress situation (Roushdy et al., 2018) and the increased synthesis of this protein is linked to the process of adaptation to temperature stress conditions (Surai and Kochish, 2017).

To understand the effects of the blend under the CHS challenge, it was evaluated the expression of catalase (*CAT*), glutathione peroxidase 1 (*GPXI*) and glutathione synthetase (*GSS*) genes, in the liver and jejunum of broilers at 42 days, as well as the

activity of the enzyme's SOD and CAT, and total antioxidant activity in the same organs. SOD acts in the conversion of superoxide anion into hydrogen peroxide (Rehman et al., 2018), which is subsequently converted into water and molecular oxygen by CAT and GPx (Hajati et al., 2018; Emani et al., 2020). For this conversion, GPx uses two H⁺ molecules from glutathione (GSH), which is converted to glutathione disulfide (GSSG) (Habashy et al., 2019). This process is very important since hydrogen peroxide is more stable than ROS (Emani et al., 2020). Thus, the capacity of the tissue in detoxification and its tolerance to cellular oxidation, can be estimated through SOD activity (Habashy et al., 2019). The SOD activity depends on the duration of exposure to high temperatures and the variation of activity in the different organs, and in the liver, its activity increases during chronic heat stress (Habashy et al., 2019).

Our results indicate that exposure to CHS increase TBARS and ROS content in the liver of the animals. It was also observed an increase in CAT gene expression in the liver of animals subjected to heat stress. Even with a higher CAT expression to deal with CHS, it was not enough to reduce the levels of TBARS and ROS. However, considering only the effect of the diet, 3% of blend inclusion is related with the reduced CAT expression in the liver. The blend was probably able to help in the antioxidant defense, not requiring a higher CAT production.

In the liver, an interaction effect between environment and levels of blend inclusion was observed for SOD activity and *GPXI* and *GSS* gene expression. It was observed that the inclusion of 1.5% increased the SOD activity in a comfort environment. This possibly indicates that in the comfort, this inclusion level makes this enzyme be more active in the liver to reduce the oxidative stress effects, compared to animals of control group and that received 3% of blend inclusion. In comfort environment, the increase in the blend inclusion seems to reduce the *GPXI* and *GSS* expression in animals' livers. Thus, in comfort, the blend inclusion of 3% seems to help combat oxidative stress, without increasing the activity of the enzymatic defense systems. Regarding the animals that were submitted to CHS, the 3% inclusion reduced the SOD level, but the lowest *GPXI* and *GSS* gene expression was observed with 1.5% of blend inclusion in CHS.

An interaction effect between environment and blend inclusion levels was observed for SOD activity and TBARS in the jejunum of animals. In the comfort environment, the animals that received the 1.5% inclusion showed the highest SOD activity and TBARS content. But the blend inclusion of 3% in comfort reduced the SOD and TBARS levels in the jejunum. The animals that received a 3% of blend inclusion in

the CHS, showed the lowest SOD activity, compared to other treatments. Considering the environment, in our results, it was observed that in the jejunum, there was higher CAT activity in the CHS compared to the comfort environment, evidencing that in CHS, the enzyme CAT needed to increase its activity to reduce the effects caused by oxidative stress. Considering only the diet effect, the blend inclusion of 1.5% and 3% increased the amount of ROS in the jejunum of the animals compared to the animals that did not receive the blend.

There was no interaction effect between the blend inclusions on diet and environment for *HSP70* gene expression on jejunum and liver of 42 days old broiler chickens. But high temperature environment increased *HSP70* expression in both organs. Animals of control group and that received 1.5% of the blend, showed lower levels of *HSP70* gene expression in jejunum and liver, indicating that animals that consumed these inclusion levels had a better capacity to tolerate heat stress than animals that consumed 3% of inclusion. According to the research of Hasan Siddiqui et al. (2020) the *HSP70* gene expression in the jejunum was elevated after 12 hours of acute heat stress exposure, but the *HSP70* protein expression in the jejunum was high after 6 hours of exposure and reduce as the exposure time increased. After a certain period of exposure, the HSPs expression levels decreased, indicating that an adaptation mechanism was generated (Hasan Siddiqui et al., 2020).

Our results indicate that the blend acted in different ways on the evaluated organs and the environments. In comfort, the inclusion of 3% tends to reduce TBARS and ROS content. This is followed by a reduction in the activity and expression of components that participate in the enzymatic defense system. Phenols, present in essential oils, inhibit lipid peroxidation by sequestering peroxy radicals, reducing singlet oxygen and acting as hydrogen donors (Miguel, 2010). That way, the use of dietary herbs reduces lipid peroxidation, increases the antioxidant system, and strengthens the immune system (Salen et al., 2018). In addition, Cheng et al. (2019) reported that the MOS use improves the antioxidant capacity of animals that were subjected to cyclic heat stress, reducing the levels of jejunal malondialdehyde concentration. On the other hand, despite the benefits mentioned above, in our results, 3% blend inclusion in CHS reduces the SOD activity, the main enzymatic antioxidant defense system, but does not act on ROS and TBARS production. This may indicate that the stress chronic was so severe that it caused a depletion in the activity of this enzyme.

Conclusion

Chronic heat stress had a negative impact on animal performance, organ weights and body composition. The animals had less weight gain and feed intake compared to animals submitted to comfort. Animals submitted to heat stress had worse feed conversion. The spleen and heart weight reduced, but the fat deposited in the heart increased. As well as body fat deposition, which was higher in animals subjected to CHS. The inclusion of 1.5% of the blend containing autolyzed sugarcane yeast and essential oils, composed of carvacrol, cinnamaldehyde, eugenol and capsaicin had a positive impact on *HSP70* gene expression and rectal temperature of animals submitted to CHS. The inclusion of 1.5% seems to improve intestinal morphometric parameters.

References

- Abd El-Hack, M. E., M. Alagawany, and S. Abdelnour. 2019. Responses of growing rabbits to supplementing diet with a mixture of black and red pepper oils as a natural growth promoter. *Journal of animal physiology and animal nutrition* 103(2): 509-517. <https://doi.org/10.1111/jpn.13045>
- Abd El-Hack, M. E., M. T. El-Saadony, A. M. Saad, H. M. Salem, N. M. Ashry, M. M. A. Ghanima, M. Shukry, A. A. Swelum, A. E. Taha, A. M. El-Tahan, S. F. AbuQamar, and K. A. El-Tarabily, K. A. 2022. Essential oils and their nanoemulsions as green alternatives to antibiotics in poultry nutrition: a comprehensive review. *Poultry Science* 101(2): 101584. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2021.101584>
- Aebi H. 1984. Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 105:121–6. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(84\)05016-3](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(84)05016-3)
- Ahiwe, E. U., M. E. Abdallah, E. P. Chang'a, A. A. Omede, M. Al-Qahtani, H. Gausi, H. Graham, and P. A. Iji, P. A. 2020. Influence of dietary supplementation of autolyzed whole yeast and yeast cell wall products on broiler chickens. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* 33(4): 579. doi: 10.5713/ajas.19.0220
- Ahiwe, E. U., T. T. Dos Santos, H. Graham, and P. A. Iji. 2021. Can probiotic or prebiotic yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) serve as alternatives to in-feed antibiotics for healthy or disease-challenged broiler chickens?: a review. *Journal of Applied Poultry Research* 30(3): 100164. <https://doi.org/10.1016/j.japr.2021.100164>
- Ahmad, R., Y. H. Yu, F. S. H. Hsiao, C. H. Su, H. C. Liu, I. Tobin, G. Zhang, and Y. H. Cheng. 2022. Influence of heat stress on poultry growth performance, intestinal inflammation, and immune function and potential mitigation by probiotics. *Animals*, 12(17): 2297. <https://doi.org/10.3390/ani12172297>
- Ahmed-Farid, O. A., A. S. Salah, M. A. Nassan, and M. S. El-Tarabany. 2021. Effects of chronic thermal stress on performance, energy metabolism, antioxidant activity, brain serotonin, and blood biochemical indices of broiler chickens. *Animals* 11(9): 2554. <https://doi.org/10.3390/ani11092554>
- Akbarian, A., J. Michiels, J. Degroote, M. Majdeddin, A. Golian, and S. De Smet. 2016. Association between heat stress and oxidative stress in poultry; mitochondrial dysfunction and dietary interventions with phytochemicals. *Journal of animal science and Biotechnology* 7(1): 1-14. <https://doi.org/10.1186/s40104-016-0097-5>

Alvarenga, E. M., L. K. Souza, T. S. Araújo, K. M. Nogueira, F. B. M. Sousa, A. R. Araújo, C. S. Martins, D. M. Pacífico, G. A. de C. Brito, E. P. Souza, D. P. Souza, and J. V. R. Medeiros. 2016. Carvacrol reduces irinotecan-induced intestinal mucositis through inhibition of inflammation and oxidative damage via TRPA1 receptor activation. *Chemico-biological interactions* 260: 129-140. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2016.11.009>

Awaad, M. H. H., M. Elmenawey, and K. A. Ahmed. 2014. Effect of a specific combination of carvacrol, cinnamaldehyde, and on the growth performance, carcass quality and gut integrity of broiler chickens. *Veterinary World* 7(5). [10.14202/vetworld.2014.284-290](https://doi.org/10.14202/vetworld.2014.284-290)

Barreto, M. S. R., J. F. M. Menten, A. M. C. Racanicci, P. W. Z. Pereira, and P. V. Rizzo. 2008. Plant extracts used as growth promoters in broilers. *Brazilian Journal of Poultry Science* 10: 109-115. <https://doi.org/10.1590/S1516-635X2008000200006>

Baurhoo, B., L. Phillip, and C. A. Ruiz-Feria. 2007. Effects of purified lignin and mannan oligosaccharides on intestinal integrity and microbial populations in the ceca and litter of broiler chickens. *Poultry Science* 86(6): 1070-1078. <https://doi.org/10.1093/ps/86.6.1070>

Baziz, H. A., P. A. Geraert, J. C. F. Padilha, and S. Guillaumin. 1996. Chronic heat exposure enhances fat deposition and modifies muscle and fat partition in broiler carcasses. *Poultry Science* 75(4): 505-513. <https://doi.org/10.3382/ps.0750505>

Bradford M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72: 248–54. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)

Brand-Wiliams W, M. E. Cuvelier, C. Berset. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Sci Technol.* 28: 25–30. [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5)

Buege, J. A., e S. D. Aust. 1978. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 52:302-310. doi: 10.1016/s0076-6879(78)52032-6

Castillo, K., I. Diaz-Franulic, J. Canan, F. Gonzalez-Nilo, and R. Latorre. 2018. Thermally activated TRP channels: molecular sensors for temperature detection. *Physical Biology* 15(2): 021001. doi: 10.1088/1478-3975/aa9a6f

Chacher, M. F. A., Z. Kamran, U. Ahsan, S. Ahmad, K. C. Koutoulis, H. G. Qutab Ud Din, and Ö. Cengiz. 2017. Use of mannan oligosaccharide in broiler diets: an overview of underlying mechanisms. *World's Poultry Science Journal* 73(4): 831-844. <https://doi.org/10.1017/S0043933917000757>

Chen, L., T. Jiang, X. Li, Q. Wang, Y. Wang, and Y. Li. 2016. Immunomodulatory activity of β -glucan and mannan-oligosaccharides from *Saccharomyces cerevisiae* on broiler chickens challenged with feed-borne *Aspergillus fumigatus*. *Pakistan Veterinary Journal* 36(3): 297-301.

Chen, Y., Y. Cheng, C. Wen, and Y. Zhou. 2020. Protective effects of dietary mannan oligosaccharide on heat stress-induced hepatic damage in broilers. *Environmental Science and Pollution Research* 27: 29000-29008. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-09212-2>

Chen, S., Y. Yong, and X. Ju. 2021. Effect of heat stress on growth and production performance of livestock and poultry: Mechanism to prevention. *Journal of Thermal Biology* 99:103019. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2021.103019>

Cheng, Y. F., Y. P. Chen, R. Chen, Y. Su, R. Q. Zhang, Q. F. He, Q. F., K. Wang and Y. M. Zhou. 2019. Dietary mannan oligosaccharide ameliorates cyclic heat stress-induced damages on intestinal oxidative status and barrier integrity of broilers. *Poultry Science* 98(10): 4767-4776. <https://doi.org/10.3382/ps/pez192>

Cristo, A. B. D., J. M. Schmidt, C. E. Benito, R. Buzim, L. A. D. M. Pinto, L. A. M. and J. I. Fernandes. 2022. Effect of the supplementation of plant extracts-based additive in broiler chicken diets on productive performance, carcass yield, and meat quality. *Brazilian Journal of Poultry Science*, 24. <https://doi.org/10.1590/1806-9061-2021-1528>

De Antonio, J., M. F. Fernandez-Alarcon, R. Lunedo, G. H. Squassoni, A. L. J. Ferraz, M. Macari, R. L. Furlan and L. R. Furlan. 2017. Chronic heat stress and feed restriction affects carcass composition and the expression of genes involved in the control of fat deposition in broilers. *The Journal of Agricultural Science*, 155(9): 1487-1496. <https://doi.org/10.1017/S0021859617000818>

Del Vesco, A. P., A. S. Khatlab, E. S. R. Goes, K. S. Utsunomiya, J. S. Vieira, A. O. Neto, and E. Gasparino. 2017. Age-related oxidative stress and antioxidant capacity in heat-stressed broilers. *Animal* 11(10): 1783-1790. <https://doi.org/10.1017/S1751731117000386>

Deng, K., C. W. Wong, and J. V. Nolan, J. V. 2005. Carry-over effects of dietary yeast RNA as a source of nucleotides on lymphoid organs and immune responses in Leghorn-type chickens. *British poultry science* 46(6): 673-678. <https://doi.org/10.1080/00071660500395426>

Ducatelle, R., E. Goossens, F. De Meyer, V. Eeckhaut, G. Antonissen, F. Haesebrouck, and F. Van Immerseel. 2018. Biomarkers for monitoring intestinal health in poultry: present status and future perspectives. *Veterinary research* 49(1): 1-9. <https://doi.org/10.1186/s13567-018-0538-6>

Emami, N. K., U. Jung, B. Voy, and S. Dridi. 2020. Radical response: effects of heat stress-induced oxidative stress on lipid metabolism in the avian liver. *Antioxidants* 10(1): 35. <https://doi.org/10.3390/antiox10010035>

Ertas, O. N., Guler, T., Çiftçi, M., Dalkılıç, B., & Simsek, U. G. (2005). The effect of an essential oil mix derived from oregano, clove and anise on broiler performance. *International Journal of Poultry Science* 4(11): 879-884.

Gholami-Ahangaran, M., A. Ahmadi-Dastgerdi, S. Azizi, A. Basiratpour, M. Zokaei, and M. Derakhshan. 2022. Thymol and carvacrol supplementation in poultry health and performance. *Veterinary Medicine and Science* 8(1): 267-288. <https://doi.org/10.1002/vms3.663>

Goel, A. 2021. Heat stress management in poultry. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 105(6): 1136-1145. <https://doi.org/10.1111/jpn.13496>

Goo, D., J. H. Kim, G. H. Park, J. B. Delos Reyes, and D. Y. Kil. 2019. Effect of heat stress and stocking density on growth performance, breast meat quality, and intestinal barrier function in broiler chickens. *Animals* 9(3): 107. <https://doi.org/10.3390/ani9030107>

Gopi, M., K. Karthik, H. V. Manjunathachar, P. Tamilmahan, M. Kesavan, M. Dashprakash, M., and M. R. Purushothaman, M. R. 2014. Essential oils as a feed additive in poultry nutrition. *Adv. Anim. Vet. Sci* 2(1): 1-7.

Habashy, W. S., M. C. Milfort, R. Rekaya, and S. E. Aggrey. 2019. Cellular antioxidant enzyme activity and biomarkers for oxidative stress are affected by heat stress. *International journal of biometeorology* 63: 1569-1584. <https://doi.org/10.1007/s00484-019-01769-z>

Hajati, H., A., Hassanabadi, A. Golian, H. Nassiri-Moghaddam, and M. R. Nassiri, M. R. 2018. The effect of grape seed extract supplementation on performance, antioxidant enzyme activity, and immune responses in broiler chickens exposed to chronic heat stress. *Iranian Journal of Applied Animal Science* 8(1): 109-117.

Hasan Siddiqui, S., D. Kang, J. Park, H. W. Choi, and K. Shim. 2020. Acute heat stress induces the differential expression of heat shock proteins in different sections of the small intestine of chickens based on exposure duration. *Animals* 10(7): 1234. <https://doi.org/10.3390/ani10071234>

Jang, I. S., Y. H. Ko, S. Y. Kang, and C. Y. Lee. 2007. Effect of a commercial essential oil on growth performance, digestive enzyme activity and intestinal microflora population in broiler chickens. *Animal Feed Science and Technology* 134(3-4): 304-315. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2006.06.009>

Jambunathan, N. 2010. Determination and detection of reactive oxygen species (ROS), lipid peroxidation, and electrolyte leakage in plants. In: Sunkar, R. (eds) *Plant Stress Tolerance. Methods in Molecular Biology* 639: 291-297. Humana Press. doi: 10.1007/978-1-60761-702-0_18

Jastrebski, S. F., S. J. Lamont, and C. J. Schmidt. 2017. Chicken hepatic response to chronic heat stress using integrated transcriptome and metabolome analysis. *PLoS One* 12(7): e0181900. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0181900>

Karadas, F., V. Pirgozliev, S. P. Rose, D. Dimitrov, O. Oduguwa, and D. Bravo, D. 2014. Dietary essential oils improve the hepatic antioxidative status of broiler chickens. *British Poultry Science* 55(3): 329-334. <https://doi.org/10.1080/00071668.2014.891098>

Khatlab, A. D. S., A. P. Del Vesco, A. R. de Oliveira Neto, R. P. M. Fernandes, and E. Gasparino, E. 2019. Dietary supplementation with free methionine or methionine dipeptide mitigates intestinal oxidative stress induced by *Eimeria* spp. challenge in broiler chickens. *Journal of Animal Science and Biotechnology* 10(1): 1-17. <https://doi.org/10.1186/s40104-019-0353-6>

Kiarie, E. G., M. Mohammadigheisar, and H. Schulze. 2022. Effects of early feeding of enzymatically treated yeast on growth performance, organ weights, intestinal histomorphology, and ceca microbial metabolites in broiler chickens subjected to *Eimeria* challenge. *Poultry Science* 101(8): 101967. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2022.101967>

Kim, Y. S. and S. B. Ho. 2010. Intestinal goblet cells and mucins in health and disease: recent insights and progress. *Current gastroenterology reports* 12: 319-330. <https://doi.org/10.1007/s11894-010-0131-2>

Krishan, G. and A. Narang. 2014. Use of essential oils in poultry nutrition: A new approach. *Journal of Advanced Veterinary and Animal Research* 1(4):156-162.

Lan, R., Y. Wang, L. Wei, F. Wu, and F. Yin. 2022. Heat stress exposure changed liver lipid metabolism and abdominal fat deposition in broilers. *Italian Journal of Animal Science* 21(1): 1326-1333. <https://doi.org/10.1080/1828051X.2022.2103461>

Lara, L. J. and M. H. Rostagno, M. H. 2013. Impact of heat stress on poultry production. *Animals* 3(2): 356-369. <https://doi.org/10.3390/ani3020356>

Li, Z., J. Zhang, T. Wang, J. Zhang, L. Zhang, and T. Wang. 2022. Effects of capsaicin on growth performance, meat quality, digestive enzyme activities, intestinal morphology, and organ indexes of broilers. *Frontiers in Veterinary Science* 9: 841231. <https://doi.org/10.3389/fvets.2022.841231>

Lillehoj, H. S., D. K. Kim, D. M. Bravo, and S. H. Lee. 2011. Effects of dietary plant-derived phytonutrients on the genome-wide profiles and coccidiosis resistance in the broiler chickens. In *BMC proceedings* 5 (4): 1-8. BioMed Central. <https://doi.org/10.1186/1753-6561-5-S4-S34>

Livak K. J. and T. D. Schmittgen 2011. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods* 25: 402-8.

Lu, Z., X. F. He, B.B. Ma, L. Zhang, J. L. Li, Y. Jiang, and F. Gao. 2019. Increased fat synthesis and limited apolipoprotein B cause lipid accumulation in the liver

of broiler chickens exposed to chronic heat stress. *Poultry Science* 98(9): 3695-3704. <https://doi.org/10.3382/ps/pez056>

Luo, J. W., Z. L. Zhou, H. Zhang, R. S. Ma, and J. F. Hou. 2013. Bone response of broiler chickens (*Gallus gallus domesticus*) induced by corticosterone. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 164(2): 410-416. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2012.12.001>

Ma, B., X. He, Z. Lu, L. Zhang, J. Li, Y. Jiang, Y. and F. Gao. 2018. Chronic heat stress affects muscle hypertrophy, muscle protein synthesis and uptake of amino acid in broilers via insulin like growth factor-mammalian target of rapamycin signal pathway. *Poultry Science* 97(12): 4150-4158. <https://doi.org/10.3382/ps/pey291>

Mahmoud, M. E. and F. A. Mahmoud. 2015. Desensitization of Nociceptive and Serotonergic Thermoregulatory Responses by Capsaicin in Chicken: Role of Capsaicin-Sensitive Subtype-1 Vanilloid Receptor-Independent Mechanisms. *Global Veterinaria* 15(1):10-18. 10.5829/idosi.gv.2015.15.01.95314

Marklund S, and G. Marklund. 1974. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur J Biochem.* 47: 469–74.

Miguel, M. G. 2010. Antioxidant activity of medicinal and aromatic plants. A review. *Flavor and Fragrance Journal* 25(5): 291-312. <https://doi.org/10.1002/ffj.1961>

Mishra, B., and R. Jha. 2019. Oxidative stress in the poultry gut: potential challenges and interventions. *Frontiers in Veterinary Science*, 6: 60. <https://doi.org/10.3389/fvets.2019.00060>

Nawaz, A. H., K. Amoah, Q. Y. Leng, J. H. Zheng, W. L. Zhang, and L. Zhang. 2021. Poultry response to heat stress: its physiological, metabolic, and genetic implications on meat production and quality including strategies to improve broiler production in a warming world. *Frontiers in Veterinary Science* 8:14. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.699081>

Nematbakhsh, S., C. Pei Pei, J. Selamat, N. Nordin, L. H. Idris, and A. F. Abdull Razis 2021. Molecular regulation of lipogenesis, adipogenesis and fat deposition in chicken. *Genes*,12(3): 414. <https://doi.org/10.3390/genes12030414>

Nikami, H., M. E. Mahmoud, Y. Shimizu, T. Shiina, H. Hirayama, M. Iwami, R. M. Dosoky, M. M. Ahmed, and T. Takewaki. 2008. Capsaicin pretreatment attenuates LPS-induced hypothermia through TRPV1-independent mechanisms in chicken. *Life Sciences* 82:1191-1195. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2008.04.003>

Ohtsu, H., M. Yamazaki, H. Abe, H. Murakami, and M. Toyomizu. 2015. Heat stress modulates cytokine gene expression in the spleen of broiler chickens. *The Journal of Poultry Science* 52(4): 282-287. <https://doi.org/10.2141/jpsa.0150062>

Oladokun, S. and D. I. Adewole. 2022. Biomarkers of heat stress and mechanism of heat stress response in Avian species: Current insights and future perspectives from poultry science. *Journal of Thermal Biology* 103332. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2022.103332>

Osita, C. O., A. O. Ani, L. C. Ugwuowo, E. A. Akuru, and S. Njoku. 2020. Organ weights and biochemical indices of broiler chickens fed diets containing *Saccharomyces cerevisiae*. *Agro-Science* 19(4): 14-17. doi: 10.4314/as.v19i4.3

Patra, A. K., and I. Kar. 2021. Heat stress on microbiota composition, barrier integrity, and nutrient transport in gut, production performance, and its amelioration in farm animals. *Journal of Animal Science and Technology* 63(2): 211. doi: 10.5187/jast.2021.e48

Peng, Q. Y., J. D. Li, Z. Li, Z. Y. Duan, and Y. P. Wu, Y. 2016. Effects of dietary supplementation with oregano essential oil on growth performance, carcass traits and

jejunal morphology in broiler chickens. *Animal Feed Science and Technology* 214: 148-153. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2016.02.010>

Qui, N. H. 2023. Recent advances of using organic acids and essential oils as in-feed antibiotic alternative in poultry feeds. *Czech Journal of Animal Science* 68(4): 141-160. doi: 10.17221/99/2022-CJAS

Quinteiro-Filho, W. M., A. Ribeiro, V. Ferraz-de-Paula, M. L. Pinheiro, M. Sakai, L. R. M. D. Sá, A. J. P. Ferreira, and J. Palermo-Neto. 2010. Heat stress impairs performance parameters, induces intestinal injury, and decreases macrophage activity in broiler chickens. *Poultry Science* 89(9): 1905-1914. <https://doi.org/10.3382/ps.2010-00812>

Rehman, Z. U., C. Meng, Y. Sun, A. Safdar, R. H. Pasha, M. Munir, and C. Ding, C. 2018. Oxidative stress in poultry: lessons from the viral infections. *Oxidative medicine and cellular longevity*. <https://doi.org/10.1155/2018/5123147>

Rossi, B., A. Toschi, A. Piva, and E. Grilli. 2020. Single components of botanicals and nature-identical compounds as a non-antibiotic strategy to ameliorate health status and improve performance in poultry and pigs. *Nutrition Research Reviews* 33(2):218-234. <https://doi.org/10.1017/S0954422420000013>

Rostagno, H. S., L. F. T. Albino, M. I. Hannas, J. L. Donzele, N. K. Sakomura, F. G. Perazzo, A. Saraiva, M. L. T. Abreu, P. B. Rodrigues, R. F. Oliveira, S. L. T. Barreto, e C. L. Brito. 2017. Brazilian tables for birds and pigs: composition of foods and nutritional requirements. 4th rev. ed. UFV:Viçosa, Minas Gerais, BR.

Roto, S. M., P. M. Rubinelli, and S. C. Ricke, S. C. 2015. An introduction to the avian gut microbiota and the effects of yeast-based prebiotic-type compounds as potential feed additives. *Frontiers in Veterinary Science* 2: 28. <https://doi.org/10.3389/fvets.2015.00028>

Roushdy, E. M., A. W. Zagloul, and M. S. El-Tarabany. 2018. Effects of chronic thermal stress on growth performance, carcass traits, antioxidant indices and the expression of HSP70, growth hormone and superoxide dismutase genes in two broiler strains. *Journal of thermal biology*: 74: 337-343. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2018.04.009>

Ruff, J., G. Tellez Jr, A. J. Forga, R. Señas-Cuesta, C. N. Vuong, E. S. Greene, X. Hernandez-Velasco, A. J. Uribe, B. C. Martínez, J. A. Angel-Isaza, S. Dribi, C. J. Maynard, C. M. Owens, B. M. Hargis and G. Tellez-Isaias. 2021. Evaluation of three formulations of essential oils in broiler chickens under cyclic heat stress. *Animals*, 11(4): 1084. <https://doi.org/10.3390/ani11041084>

Saito, S., N. Banzawa, N. Fukuta, C. T. Saito, K. Takahashi, T. Imagawa, T. Ohta and M. Tominaga. 2014. Heat and noxious chemical sensor, chicken TRPA1, as a target of bird repellents and identification of its structural determinants by multispecies functional comparison. *Molecular biology and evolution* 31(3): 708-722. <https://doi.org/10.1093/molbev/msu001>

Saleh, A. A., T. A. Ebeid, and A. M. Abudabos. 2018. Effect of dietary phytochemicals (herbal mixture) supplementation on growth performance, nutrient utilization, antioxidative properties, and immune response in broilers. *Environmental Science and Pollution Research* 25: 14606-14613. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-1685-z>

Sarangi, N. R., L. K. Babu, A. Kumar, C. R. Pradhan, P. K. Pati, and J. P. Mishra. 2016. Effect of dietary supplementation of prebiotic, probiotic, and synbiotic on growth performance and carcass characteristics of broiler chickens. *Veterinary World* 9(3): 313. doi: 10.14202/vetworld.2016.313-319

Shakeri, M., E. Oskoueian, H. H. Le, and M. Shakeri. 2020. Strategies to combat heat stress in broiler chickens: Unveiling the roles of selenium, vitamin E and vitamin C. *Veterinary sciences* 7(2): 71. <https://doi.org/10.3390/vetsci7020071>

Shakeri, M. and H. H. Le. 2022. Deleterious Effects of Heat Stress on Poultry Production: Unveiling the Benefits of Betaine and Polyphenols. *Poultry* 1(3):147-156. <https://doi.org/10.3390/poultry1030013>

Sohail, M. U., M. E. Hume, J. A. Byrd, D. J. Nisbet, A. Ijaz, A. Sohail, M. Z. Shabbir, and H. Rehman. 2012. Effect of supplementation of prebiotic mannan-oligosaccharides and probiotic mixture on growth performance of broilers subjected to chronic heat stress. *Poultry Science* 91(9): 2235-2240. <https://doi.org/10.3382/ps.2012-02182>

Surai, P. F., and I. I. Kochish. 2017. Antioxidant systems and vitagenes in poultry biology: heat shock proteins. *Heat Shock Proteins in Veterinary Medicine and Sciences*: 123-177. https://doi.org/10.1007/978-3-319-73377-7_5

Surai, P. F., I. I. Kochish, V. I. Fisinin, and M. T. Kidd. 2019. Antioxidant defence systems and oxidative stress in poultry biology: An update. *Antioxidants* 8(7): 235. <https://doi.org/10.3390/antiox8070235>

Svetoch, E. A., B. V., Eruslanov, V. P. Levchuk, V. V. Perelygin, E. V. Mitsevich, I. P. Mitsevich, J. Stepanshin, I. Dyatlov, B. B. Seal and N. J. Stern. 2011. Isolation of *Lactobacillus salivarius* 1077 (NRRL B-50053) and characterization of its bacteriocin, including the antimicrobial activity spectrum. *Applied and environmental microbiology*, 77(8): 2749-2754. <https://doi.org/10.1128/AEM.02481-10>

Świątkiewicz, S., A. Arczewska-Włosek, and D. Józefiak. 2014. Immunomodulatory efficacy of yeast cell products in poultry: a current review. *World's Poultry Science Journal* 70(1): 57-68. <https://doi.org/10.1017/S0043933914000051>

Szolcsányi, J. 2015. Effect of capsaicin on thermoregulation: an update with new aspects. *Temperature* 2(2): 277-296. <https://doi.org/10.1080/23328940.2015.1048928>

Tabler, T. W., E. S. Greene, S. K. Orłowski, J. Z. Hiltz, N. B. Anthony, and S. Dridi. 2020. Intestinal barrier integrity in heat-stressed modern broilers and their ancestor wild jungle fowl. *Frontiers in Veterinary Science* 7: 249. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.00249>

Teyssier, J. R., A. Preynat, P. Cozannet, M. Briens, A. Mauromoustakos, E. S. Greene, C. M. Owens, S. Dridi, and S. J. Rochell. 2022. Constant and cyclic chronic heat stress models differentially influence growth performance, carcass traits and meat quality of broilers. *Poultry Science* 101(8): 101963. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2022.101963>

Tiihonen, K., H. Kettunen, M. H. L. Bento, M. Saarinen, S. Lahtinen, A. C. Ouwehand, H. Schulze and N. Rautonen. 2010. The effect of feeding essential oils on broiler performance and gut microbiota. *British poultry science* 51(3): 381-392. <https://doi.org/10.1080/00071668.2010.496446>

Vandana, G. D., V. Sejian, A. M. Lees, P. Pragna, M. V. Silpa, and S. K. Maloney. 2021. Heat stress and poultry production: impact and amelioration. *International Journal of Biometeorology* 65(2):163-179. <https://doi.org/10.1007/s00484-020-02023-7>

Vidanarachchi, J. K., L. L. Mikkelsen, I. Sims, P. A. Iji, and M. Choct. 2005. Phytobiotics: alternatives to antibiotic growth promoters in monogastric animal feeds. *Recent Advances in Animal Nutrition in Australia* 15: 131-144.

Wasti, S., N. Sah, and B. Mishra. 2020. Impact of heat stress on poultry health and performances, and potential mitigation strategies. *Animals* 10(8): 1266. <https://doi.org/10.3390/ani10081266>

Windisch W., E. Rohrer, and K. Schedle. 2009. Phytogenic feed additives to young piglets and poultry: Mechanisms and application. In *Phytogenics in Animal*

Nutrition: Natural Concepts To Optimize Gut Health and Performance, edited by Steiner T. Nottingham University Press: 19–39.

Xu, Y., X. Lai, Z. Li, X. Zhang, and Q. Luo. 2018. Effect of chronic heat stress on some physiological and immunological parameters in different breed of broilers. *Poultry Science* 97(11): 4073-4082. <https://doi.org/10.3382/ps/pey256>

Yalcinkaya, I., T. Guengoer, M. Bařalan, and E. Erdem. 2008. Mannan oligosaccharides (MOS) from *Saccharomyces cerevisiae* in broilers: Effects on performance and blood biochemistry. *Turkish Journal of Veterinary & Animal Sciences* 32(1): 43-48.

Yang, X., H. Xin, C. Yang, and X. Yang. 2018. Impact of essential oils and organic acids on the growth performance, digestive functions and immunity of broiler chickens. *Animal Nutrition* 4(4): 388-393. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2018.04.005>

Zeng, Z., S. Zhang, H. Wang, and X. Piao. 2015. Essential oil and aromatic plants as feed additives in non-ruminant nutrition: a review. *Journal of Animal Science and Biotechnology* 6(1): 1-10. <https://doi.org/10.1186/s40104-015-0004-5>

Zhang, C., X. H. Zhao, L. Yang, X. Y. Chen, R. S. Jiang, S. H. Jin, and Z. Y. Geng. (2017a). Resveratrol alleviates heat stress-induced impairment of intestinal morphology, microflora, and barrier integrity in broilers. *Poultry Science* 96(12): 4325-4332. <https://doi.org/10.3382/ps/pex266>

Zhang, J., C. J. Schmidt, and S. J. Lamont. (2017b). Transcriptome analysis reveals potential mechanisms underlying differential heart development in fast-and slow-growing broilers under heat stress. *BMC Genomics* 18(1): 1-15. <https://doi.org/10.1186/s12864-017-3675-9>