

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Campus de Botucatu

**ÓLEO DE PEQUI (*Caryocar brasiliense* Camb.) NA ALIMENTAÇÃO
DE FRANGOS DE CORTE**

JÉSSICA MORAES CRUVINEL

Tese apresentada ao Programa de
Pós-graduação em Zootecnia como
parte dos requisitos para obtenção ao
título de Doutorado

BOTUCATU – SP

2021

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Campus de Botucatu

**ÓLEO DE PEQUI (*Caryocar brasiliense* Camb.) NA ALIMENTAÇÃO
DE FRANGOS DE CORTE**

JÉSSICA MORAES CRUVINEL

Zootecnista

ORIENTADOR: Prof. Dr. Antonio Celso Pezzato

Tese apresentada ao Programa de
Pós-graduação em Zootecnia como
parte dos requisitos para obtenção ao
título de Doutorado

BOTUCATU – SP

junho – 2021

C957o

Cruvinel, Jéssica Moraes

Óleo de pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) na alimentação de frangos de corte / Jéssica Moraes Cruvinel. -- Botucatu, 2021

132 p. : il., tabs., fotos

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu

Orientador: Antonio Celso Pezzato

1. Nutrição animal. 2. Frango de corte. 3. Aditivo fitogênico. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

BIOGRAFIA

Jéssica Moraes Cruvinel, nasceu em Jataí, Estado de Goiás, em 29 de julho de 1991. Ingressou na Universidade Federal de Goiás (UFG – Campus de Jataí), graduando-se em Zootecnia em 2015. Em 2016 ingressou no Mestrado pelo *Programa de Pós-Graduação em Zootecnia – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia* (FMVZ – UNESP – Botucatu/SP), na Área de Produção Animal, com foco em Avicultura de Postura, atuando principalmente nos seguintes temas: Manejo e Produção de Poedeiras Comerciais, Codornas Japonesas, debicagem, bem-estar e qualidade de ovos. Em 2018 ingressou no Doutorado pelo *Programa de Pós-Graduação em Zootecnia – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia* (FMVZ – UNESP – Botucatu/SP), na Área de Nutrição Animal, com foco em Avicultura de corte, atuando principalmente nos temas: formulação de ração, compostos bioativos, antioxidantes, desempenho de frangos de corte, aditivos fitogênicos, biossegurança e sustentabilidade.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais,

Nilva Aparecida de Moraes Cruvinel e Moacir dos Santos Cruvinel

Por todo amor, paciência e apoio que são, inegavelmente, o alicerce sobre o qual minha vida tem sido construída.

Aos amigos e parceiros,

Gilson de Campos e Walter Jorge Júnior

Incentivadores incondicionais de minha caminhada em Botucatu.

Com amor e carinho *DEDICO!*

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Ao meu orientador, *Prof. Dr. Antonio Celso Pezzato* pelo encorajamento, conselhos e paciência. Obrigada pela confiança, disponibilidade, incentivo, amizade e orientação, o que possibilitou que esta pesquisa fosse realizada.

Ao *Prof. Dr. Otto Mack Junqueira* que me guiou para o caminho da pesquisa. Tive o privilégio de sua contribuição na minha formação acadêmica como zootecnista e sua contribuição generosa no meu desenvolvimento pessoal.

*Vocês são e serão parte de minha vida, sempre que eu transmitir os conhecimentos que recebi!
Muito Obrigada. Eu admiro-os muito!*

Aos amigos: *Cassio, Fernanda, Priscila, Tatiane, Igor e William*. Agradeço imensamente pelo companheirismo durante esta longa fase, pela amizade, pelas conversas e divertidos momentos.

AGRADECIMENTOS

À *Deus* por me dares a mão como um Pai amoroso que jamais abandona seus filhos.

Ao *Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP/ Botucatu*, pela oportunidade e suporte para a obtenção do título de Doutora.

À *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) – código de financiamento 001*, pela concessão de bolsa de estudo.

À *Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)* pela concessão do auxílio regular que permitiu a realização desta pesquisa, processo: 2018/25363-2

Aos professores e funcionários do *Departamento de Melhoramento e Nutrição Animal* da FMVZ/UNESP/Botucatu pelo acolhimento e ajuda oferecida.

Ao *Dr. Leonardo Henrique Zanetti* por ser o incentivador deste estudo.

Aos *Funcionários da Supervisão de Fazendas de Ensino, Pesquisa e Produção* da FMVZ/UNESP/Botucatu e da *Fábrica de Ração* pelos serviços prestados.

Ao *Laboratório de Bromatológica* da FMVZ-UNESP/Botucatu pelo auxílio nas análises e disponibilidade no processamento das amostras.

A equipe de trabalho do *Laboratório de Nutrição de frangos de corte (LabAves)* da FMVZ/UNESP/Botucatu Prof. Dr. José Roberto Sartori, Cássio, Julianna, Erica, Tatiane, Priscila, Fernanda, Giovanna e Andrey pela ajuda, apoio e parceria.

Ao *Wanderley Thiago da Silva*, Técnico do LabAves, que muito contribuiu para a execução deste trabalho, além de todo apoio para nossa equipe.

Aos estagiários do *Laboratório de Nutrição de frangos de corte (LabAves)* da FMVZ/UNESP/Botucatu, entre novos e antigos pela participação, ajuda e aos bons momentos.

Ao *Laboratório AquaNutri* pela contribuição nas análises experimentais e pela amizade construída.

A *Prof. Dra. Margarida Maria Barros* pôr ceder seu laboratório para realização das análises de enzimas do sistema antioxidante.

Ao *Prof. Dr. Roberto de Oliveira Roça* pôr ceder seu laboratório para realização das análises de qualidade de carne. Agradeço em especial *Dr. Carolina, Evelyn e Iasmin* por toda ajuda durante este processo de análise.

Aos alunos de iniciação científica *Beatriz, Murillo e Pedro* pela ajuda durante o processo experimental e sem dúvida, pela disponibilidade de aprendizado e interesse à pesquisa.

Ao *Prof. Dr. Samir Moura Kadri* pelo incentivo, disponibilidade e participação nas coletas e análises de expressão gênica.

Ao Instituto de tecnologia (*IBTEC*) e *Prof. Dr. Paulo Eduardo Martins Ribolla* pelo suporte e por ceder o laboratório para análise

A *Prof. Camila Renata Corrêa* pelo auxílio e apoio total nas análises de composição de carotenoides.

Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação da FMVZ/UNESP/Botucatu, *Ellen Cassemiro Guilhen e Cláudia Cristina Moreci*, pela paciência, consideração e esclarecimentos.

Aos professores *Margarida Maria Barros e Marcos Livio Panhoza Tse* por todas as contribuições no Exame Geral de Qualificação.

Aos professores *Lucio Francelino Araújo, Leonardo Henrique Zanetti, Samir Moura Kadri, José Roberto Sartori* por todas as contribuições na banca de defesa.

E aos meus *irmãos* de vida pela união e amor em cada caminhada nesses cinco anos em Botucatu, *Evelyn, Raimundo, Andressa, Igor, Willian, Caio, Tatiane, Guilherme, Iasmin, Marcone, Lucas, Vinicius, Patrícia, Priscila, Cássio, Andrey, Bruna, Fernanda, Bismarck, Gilson, Walter, Matheus, Edgar, Carol, Leonardo, Carlos, Alana.*

Muito obrigada a todos!



E eu apenas Floresci

RESUMO GERAL

O pequi (*Caryocar brasiliense* camb.) é um fruto nativo do cerrado brasileiro e do qual pode-se extrair o óleo de pequi, apresentando coloração alaranjada e alto teor de carotenoides com propriedades antioxidantes. Diante disso, dois ensaios experimentais foram realizados com o objetivo de avaliar os efeitos da adição do óleo de pequi na alimentação de frangos de corte como aditivo antioxidante e alternativo ao uso de antibióticos como melhoradores de desempenho (AGP). No **Ensaio I** foram utilizados 400 pintainhos ($47,5 \pm 1.27$ g) machos, da linhagem Cobb® 500, os quais foram alojados em duas câmaras climáticas. O delineamento foi inteiramente casualizado, em arranjo fatorial 2 x 5, duas salas com temperatura controlada (sala termoneutra - TN; sala de estresse por calor – HS 8h/dia) e 5 níveis de óleo de pequi (PO): 0,0; 1,5; 3,0; 4,5 e 6,0 g/kg da deita, com 8 repetições e 5 aves cada. No **Ensaio II** foram utilizados 1440 pintainhos ($43,70 \pm 0.70$ g), machos Cobb®500 criados de 1 a 42 dias de idade, distribuídos em um delineamento inteiramente casualizado, com 6 tratamentos: controle positivo (com AGP; sem PO), negativo (sem AGP; sem PO) e quatro níveis de inclusão de PO de 1,5; 3,0; 4,5; 6,0 g/kg, e 8 repetições com 30 aves por unidade experimental. **Ens. I:** Não houve interação dos fatores nos parâmetros sanguíneos. A concentração plasmática de glicose, triglicerídeos e HDL foram maiores nas aves submetidas ao HS aos 21 dias de idade. As aves alimentadas com PO reduziram linearmente AST (aspartato aminotransferase) e ALT (alanina aminotransferase), e os níveis de MDA foram reduzidos linearmente nas aves submetidas ao HS. Além disso, o PO reduziu em 92% a expressão de Hsp70 no fígado em comparação ao tratamento TN sem PO, principalmente no nível de 6,0 g / kg PO. Os níveis de Nrf2 no fígado foram superiores (58,5%) no tratamento 6,0 g / kg de nível de PO, em comparação com o tratamento HS sem PO. **Ens. II:** A conversão alimentar e o Índice de Produtividade Europeu foram linearmente melhores com níveis crescentes de PO. Os tratamentos não influenciaram o perfil bioquímico sérico, peso de órgão, função hepática, rendimento de cortes e a qualidade de carne, e estes parâmetros foram semelhantes ao tratamento com AGP. Os frangos de corte alimentados com PO, independentemente do nível, reduziram a concentração de MDA no plasma, e reduziu linearmente a peroxidação lipídica da carne de peito avaliada após 90 dias de armazenando sob refrigeração. Em conclusão, os níveis de PO, principalmente o nível 6,0g/kg, aliviaram a peroxidação lipídica no plasma e na carne, o que também está relacionado com a modulação na expressão dos genes Hsp70 e Nrf2 pelo PO, desta forma, o óleo de pequi pode ser utilizado como um promissor aditivo antioxidante e alternativo ao uso de antibióticos em rações para frangos de corte.

Palavra-chave: antibióticos, carotenoides, estresse térmico, expressão gênica, peroxidação lipídica

ABSTRACT

Pequi (*Caryocar brasiliense* camb.) is a native fruit of the Brazilian cerrado and from which pequi oil can be extracted, showing orange color and high content of carotenoids with antioxidant properties. Therefore, two experimental studies were carried out in order to evaluate the effects of adding pequi oil to broiler chicken diet as an antioxidant additive and alternative to the use of antibiotics growth promoter (AGP). **Experiment I-** A total of 400 one-day-old male broiler chicks (Cobb 500) were randomly assigned in 2×5 factorially arranged treatments: two temperature-controlled rooms (thermoneutral - TN or heat stress - HS for 8 h/day) and five dietary PO levels (0, 1.5, 3.0, 4.5, or 6.0 g/kg diet) for 42 days. Each treatment consisted of eight replicates of five birds. **Experiment II-** A total of 1,440 one-day-old Cobb500 broilers were randomly distributed into six dietary treatments with eight replicate pens per treatment and 30 birds per pen. The dietary treatments were as follows: 1) basal diet + Avilamycin at 0.05 g/kg diet and no PO (AGP- antimicrobial growth promoter), 2) basal diet without antibiotic and PO (control, CON), 3) CON + 1.5 g/kg PO, 4) CON + 3.0 g/kg PO, 5) CON + 4.5 g/kg PO, and 6) CON + 6.0 g/kg PO. **Exp I:** There was no interaction of factors on blood parameters. The plasma concentrations of glucose, triglycerides and HDL were higher in birds submitted to HS at 21 days of age. Birds fed with PO linearly reduced AST (aspartate aminotransferase) and ALT (alanine aminotransferase), and MDA levels were linearly reduced in birds subjected to HS. In addition, PO reduced Hsp70 expression in liver by 92% compared to TN treatment without PO, mainly at the level of 6.0 g/kg PO. Liver Nrf2 levels were up-regulated (58.5%) in the 6.0 g/kg PO level treatment compared to the HS treatment without PO. **Exp II:** feed conversion ratio and the European Performance Index improved linearly with levels of dietary PO. The treatments did not influence the serum biochemical profile, organ weight, liver function, carcass yield and meat quality, and these parameters were similar to the treatment with AGP. Broilers fed with PO, regardless of the level, reduced the concentration of MDA in plasma, and linearly reduced the lipid peroxidation of breast meat evaluated after 90 days of storage under refrigeration. In conclusion, the PO levels, mainly the 6.0g/kg level, alleviated lipid peroxidation in plasma and meat, which is also related to the modulation in the expression of the Hsp70 and Nrf2 genes by PO, thus, the pequi oil can be used as a promising potential feed additive in broiler production.

Keywords: antibiotics, carotenoids, heat stress, gene expression, lipid peroxidation

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

REVISÃO DE LITERATURA

Figura 1 Caracterização física do pequi (<i>Caryocar brasiliense</i> camb.) Fonte: Leão, et al. (2017)	23
Figura 2- Obtenção do óleo de pequi (<i>Caryocar brasiliense</i> camb.) Fonte: Cooperativa Grande Sertão - Montes Claros /MG)	26
Figura 3- Estrutura química de carotenoides. Adaptado de Ribeiro et al., 2018	29
Figura 4 – Produção de EROS mitocondrial e sistemas antioxidantes. Adaptado de Donegan, Braganza e Shiva, 2020	32
Figura 5 – Reações de peroxidação lipídica. Adaptado de ZHANG et al., (2020).....	34
Figura 6 – Aditivos fitogênicos como indutores da via de transcrição Nrf-2 em frangos de corte. Adaptado de CARDOZO et al., (2013).....	49
Tabela 1 - Composição de carotenoides na polpa de pequi (<i>C. brasiliense</i> camb.).....	28
Gráfico 1 - Produção extrativista do Pequi no Brasil.....	24

CAPÍTULO 2

Figure 1. Effect of PO on Hsp 70(A) and Nrf2(B) expression in broiler liver at 42 days. Each bar represents the mean±SEM (n=4). Bars not sharing the same letters (a-c) are significantly different according to Kruskal-Wallis test at $P \leq 0.05$. 0.0 TN=normal temperature + a control diet; 0.0 HS=high ambient temperature + a control diet; PO=pequi oil; 1.5 HS=high ambient temperature + a control diet supplemented with 1.5 g PO/kg diet; 3.0 HS=high ambient temperature + a control diet supplemented with 3.0 g PO/kg diet; 4.5 HS=high ambient temperature + a control diet supplemented with 4.5 g PO/kg diet; 6.0 HS=high ambient temperature + a control diet supplemented with 6.0 g PO/kg diet.....	100
--	-----

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2

Table 1. Fatty acid and carotenoid composition of pequi oil (<i>C. brasiliense</i> Camb.)... 88	88
Table 2. Ingredients and chemical composition of the experimental diets (pre-starter diets, provided during days 1–7; Starter diets, provided during days 8–21)..... 89	89
Table 3. Ingredients and chemical composition of the experimental diets (grower diets, provided during days 22–35; finisher diets, provided during days 36–42)..... 90	90
Table 4. Averages and standard deviations for temperature and relative humidity in the thermoneutral (TN) and heat stress (HS) ambient temperature environments 91	91
Table 5. Primer sequences used for real-time PCR 92	92
Table 6. Effects of temperature and dietary pequi oil (PO) level on serum biochemical indices in broilers exposed to heat stress 93	93
Table 7. Effects of temperature and dietary pequi oil (PO) level on blood leukocyte profile in broilers exposed to heat stress at 42 days of age 95	95
Table 8. Effects of temperature and dietary pequi oil (PO) level on relative organ weights (%) in broilers exposed to heat stress 96	96
Table 9. Effects of temperature and dietary pequi oil (PO) level on antioxidant enzyme activity in broilers exposed to heat stress at 42 days of age 98	98
Table 10. Effects of temperature and dietary pequi oil (PO) level on serum MDA concentration in broilers exposed to heat stress at 42 days of age 99	99

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 3

Table 1. Ingredients and chemical composition of the experimental diets (Pre-starter diets, provided during days 1–7; Starter diets, provided during days 8–21).....	121
Table 2. Ingredients and chemical composition of the experimental diets (Grower diets, provided during days 22–35; Finisher diets, provided during days 36–42).....	122
Table 3. Effect of dietary pequi oil (PO) levels on growth performance of broiler chickens	123
Table 4. Effects of dietary pequi oil (PO) levels on serum biochemical indices and serum oxidation in broiler chickens	124
Table 5. Effect of dietary pequi oil (PO) levels blood leukocyte profile of broiler chickens	125
Table 6. Effects of dietary pequi oil (PO) levels on the relative organ weights of broilers chickens	126
Table 7. Effects of dietary Pequi oil levels on carcass characteristics of broilers chickens	127
Table 8. Effect of dietary pequi oil (PO) levels on breast meat quality of broiler chickens at 42-days	128
Table 9. Effect of dietary pequi oil (PO) levels on lipid oxidation of breast meat of broilers chickens after storage	129

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
CAPÍTULO 1.....	18
REVISÃO DE LITERATURA	18
1. A excelência avícola mundial e brasileira	19
2. Pequi: o ouro do cerrado	22
3. Óleo de pequi – ação antioxidante	25
3.1 <i>Carotenoides</i>	28
3.2 <i>Espécies reativas de oxigênio e Peroxidação Lipídica</i>	30
3.3 <i>Ação antioxidante dos CARS frente aos EROS</i>	35
4. Uso de Aditivos fitogênicos na alimentação de frangos de corte	37
4.1 <i>Qualidade de carne</i>	39
5. Estresse térmico na produção avícola – aditivos fitogênicos como estratégia nutricional	40
5.1 <i>Aditivos fitogênicos como estratégia nutricional ao estresse térmico</i>	44
6. Técnicas moleculares na área da nutrição avícola	45
6.1 <i>Hsp 70 e Nrf-2</i>	46
7. Objetivo Geral	50
7.1 <i>Objetivos específicos</i>	50
8. Referências	51
CAPÍTULO 2.....	65
“Pequi Oil (<i>Caryocar brasiliense</i> camb.) Attenuates Adverse Effects of Cyclical Heat Stress and Modulates Oxidative Stress-Related Genes in Broiler Chickens”	66
INTRODUCTION	67
MATERIALS AND METHODS	69
<i>Pequi oil (<i>Caryocar brasiliense</i> camb.)</i>	69
<i>Chicks, Housing and Management</i>	70
<i>Experimental Diets and Heat challenge</i>	70
<i>Blood Parameters and Determination of Serum MDA</i>	71
<i>Organ Weight</i>	72
<i>Measuring Activities of Antioxidant Enzymes in the Liver</i>	73

<i>RNA Extraction and Quantitative Real-Time PCR Analysis</i>	73
<i>Statistical Analysis</i>	74
RESULTS	75
<i>Blood Parameters</i>	75
<i>Relative Organ Weight</i>	76
<i>Antioxidant Activities of Liver Enzymes and Serum Lipid Peroxidation</i>	76
<i>Heat Shock Protein 70 and Nrf2 Expression in the Liver</i>	77
DISCUSSION	77
REFERENCES	82
CAPÍTULO 3	101
“Growth Performance, Blood Indices, Antioxidant Status, Relative Organ Weights, Carcass Yield and Meat Quality in Broiler Chickens Fed Pequi Oil (<i>Caryocar brasiliense</i> camb.)”	102
1. Introduction	103
2. Materials and methods	105
2.1 <i>Composition of Pequi Oil</i>	105
2.2 <i>Birds, Experimental Design, Housing, and Diets</i>	105
2.3 <i>Growth Performance</i>	106
2.4 <i>Blood Biochemical Indices and Organ Weight</i>	107
2.5 <i>Leukocyte Profile and Plasma Oxidative Status</i>	107
2.6 <i>Carcass Yield and Breast Meat Quality</i>	108
2.7. <i>Lipid Oxidation Evaluation</i>	109
2.8 <i>Statistical Analysis</i>	109
3. Results	110
3.1 <i>Effects of Pequi Oil on Broiler Growth Performance</i>	110
3.2 <i>Effects of Pequi Oil on Serum Biochemical Indices, Blood Leukocyte Profile, and Oxidative Status</i>	111
3.3 <i>Effects of Pequi Oil on Relative Organ Weights, Carcass Yield, and Breast Meat Quality</i>	111
3.4 <i>Effect of Pequi Oil on MDA Concentrations of Breast Meat in Broilers after Storage</i>	111
4. Discussion	112
<i>Growth performance</i>	112
<i>Blood Indices, Relative Organ Weigh and Serum MDA Concentrations</i>	112

<i>Carcass Yield, Meat Breast Quality and Meat MDA Concentration</i>	113
5. Conclusions	115
References	115
CAPÍTULO 4.....	130
IMPLICAÇÕES	131

1. INTRODUÇÃO

O Brasil tem grande participação mundial na indústria de carne de frango, classificando-se como terceiro maior produtor com 13,845 milhões de toneladas e líder absoluto na exportação com 4,231 milhões de toneladas de carne exportadas no ano de 2020 (ABPA, 2021), portanto é um seguimento que constantemente busca aperfeiçoar o melhoramento, a sanidade, a ambiência e o bem-estar dos animais no sistema produtivo, e conseqüentemente, a qualidade do alimentos e seus subprodutos oferecidos ao mercado consumidor.

A proibição do uso de antimicrobianos (antibióticos e quimioterápicos) em rações para animais monogástricos pela União Europeia desde 2006 e a preocupação pública com a segurança do alimento impulsionaram a pesquisa por ingredientes alternativos como por exemplo, o uso de aditivos alternativos, que suplementados como parte das dietas de frangos de corte podem melhorar a eficiência alimentar, manter o equilíbrio redox, auxiliar na estabilidade oxidativa da carne, principalmente inibindo a oxidação lipídica de ácidos graxos insaturados, resultando em maior vida útil durante o armazenamento (*shelf-life*), além de contribuir na manutenção da saúde das aves (MEHDI et al., 2018; MUNEKATA et al., 2020).

Assim nesse contexto, o óleo de pequi se destaca por apresentar características zootécnicas desejáveis associado à sua alta capacidade antioxidante em função da presença de significativos teores de carotenoides (MIRANDA-VILELA et al., 2014; COMUNIAN et al., 2020). O pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) é um fruto típico do cerrado brasileiro distribuído em regiões do centro-oeste, sudeste, sul e nordeste (LIMA et al., 2007). Tem-se atribuído resultados positivos da utilização desse óleo na saúde humana, no qual foram observados seu potencial contra os danos oxidativos, entretanto, esse ingrediente ainda não foi estudado na alimentação e nutrição animal.

Diante do exposto, este estudo foi realizado para avaliar o óleo de pequi como aditivo fitogênico e antioxidante natural, no desempenho, perfil bioquímico sérico, função hepática, características de carcaça, qualidade de carne e na estabilidade oxidativa da carne de peito de frangos de corte. Para explorar os mecanismos subjacentes aos efeitos antioxidantes do óleo de pequi, a atividade das enzimas antioxidantes, concentrações de malonaldeído, e expressão de Nrf2 e Hsp 70, também foram determinados, diante de aves submetidas a altas temperaturas, situações estas comumente enfrentadas em todo o mundo.

CAPÍTULO 1

REVISÃO DE LITERATURA

1. A excelência avícola no cenário mundial e brasileiro

A avicultura de corte é o segmento da produção animal que mais se desenvolveu ao longo dos anos (GONZALEZ-RIVAS et al., 2020), e esses resultados estão expressos na alta eficiência alimentar e crescimento rápido dos frangos de corte, produzindo carne saborosa, nutritiva e de baixo custo comparada as carnes bovinas e suínas (CONAB, 2021).

A produção mundial de carne de frango em 2020 segundo o relatório anual da Associação Brasileira de Proteína Animal (ABPA, 2021) foram próximos aos 100,43 milhões de toneladas, representando um aumento de 1,8% em relação a 2019 (98,59 milhões de toneladas). Os cinco maiores produtores mundiais pela ordem são EUA (20,23 Mil ton), China (14,60 Mil ton), Brasil (13,85 Mil ton), União Europeia (12,20 Mil ton) e Rússia (4,71 Mil ton). O Brasil é o maior exportador de carne de frango do mundo com um total de 4,231 milhões de toneladas de carne exportadas no ano de 2020 (ABPA, 2021), seguido pelos EUA, União Europeia e Tailândia. Apesar de o maior exportador de carne de frango, o Brasil tem o mercado interno como principal comprador. A produção de carne de frango no ano passado foi de 13,85 milhões de toneladas, deste volume, 69,9% foram para o consumo dos brasileiros (45,2kg/hab). Os 30,1% restantes foram as 4,2 milhões de toneladas exportadas.

Segundo as primeiras previsões da FAO (2021) estima-se um aumento de 1,3% para a produção e a exportação mundiais da carne de frangos. Os números apontam que a carne de frango permanece na liderança em comparação as carnes bovinas e suínas, tanto na produção como na exportação, respondendo por, respectivamente, 39,12% e 37,23% do total mundial. De acordo com a CONAB (2021), a produção total brasileira poderá atingir a ordem de 14,4 milhões de toneladas e exportações próximas de 4,3

milhões de toneladas em 2021, resultados recordes advindos das circunstâncias inéditas vividas no agronegócio mundial em face da pandemia de COVID-19.

Alinhado a este panorama e perspectiva mundial, já é de conhecimento que os avanços na produção animal são consequências dos investimentos nos avanços na área de melhoramento genético, nutrição e manejo para tender a demanda do mercado (DECKER; PARK 2010; GONZALEZ-RIVAS et al., 2020), entretanto, outros conceitos estão presentes e cooperam no progresso 4.0 da avicultura atual, como os conceitos de segurança, exigências de mercado e inovação.

Sem dúvida o Brasil é destaque no cenário mundial, segue ocupando 33% do mercado mundial de carne de frangos (ABPA, 2021), além disso, ocupa um grande espaço no mercado mundial de commodities como milho e soja (CONAB, 2021), conseqüentemente, estes dados demonstram o papel internacional crucial do Brasil como fornecedor de alimento tendo a responsabilidade de alimentar o mundo. Incluso a isso, a *segurança dos produtos*, inocuidade e qualidade são constantemente reforçadas pelos inúmeros cuidados tomados por toda cadeia produtiva brasileira de alimentos.

De modo concomitante, as características de interesse social são levadas em consideração nos sistemas de melhoramento e produção avícola, além dos indicadores de sucesso econômico como conversão alimentar e ganho de peso, por exemplo. A cadeia de produção animal estão sendo ajustadas para atender as complexas *expectativas dos mercados*, como está em destaque nas metas de desenvolvimento sustentável das Nações Unidas (KEELING et al., 2019; VISSEREN-HAMAKERS, 2020), dentre as quais, podemos destacar as metas também direcionadas na redução de gases de efeito estufa na agropecuária; uso sustentável das matérias-primas; produção ética e melhoria do bem-estar animal; proteção dos recursos naturais; redução da perda

e desperdício de alimentos e a redução do uso de antibióticos como promotores de crescimento (*antibiotic growth promoter* -AGP).

A resistência a antimicrobianos (RAMs) proveniente do uso irracional de antibióticos na produção animal é uma temática amplamente discutida globalmente e tratada como questão de saúde única, estabelecendo interdependência da saúde animal, saúde humana e saúde do ecossistema (KEELING et al., 2019; OIE, 2021). Diante desta importância, a Organização Mundial da Saúde Animal (OIE), Organização Mundial de Saúde (OMS) e Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO) se uniram em uma aliança tripartite no tratamento desta temática de forma conjunta nos últimos anos por meio do Plano de Ação Global. O Brasil segue a linha de muitos países que já tomaram medidas para o uso responsável e prudente de AGPs em animais destinados a produção animal, formalizada pela instrução normativa nº41/2017 pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), instituindo o programa AgroPrevine e PAN-BR-AGRO.

Tais abordagens, encoraja a constante *inovação* nos segmentos da cadeia produtiva pelas boas práticas veterinária e zootécnicas para contribuir na saúde e prevenção, e na ciência baseada nos estudos de aditivos fitogênicos que auxiliam neste processo. E o Brasil, país rico em biodiversidades e excelente produtor de alimento para o mundo, deverá levar a temática da RAMs e as questões de impacto ambiental seriamente em consideração, pois avançar neste tema também é avançar nas relações comerciais.

2. Pequi: o ouro do cerrado

O cerrado brasileiro é uma formação de savana neotropical na América marcado pela grande diversidade de fauna e flora (BATLLE-BAYER et al., 2010). É o segundo maior bioma do Brasil que ocupa 22% do território nacional, e o pequi (*Caryocar brasiliense* camb.) é fruto nativo e considerado uma das espécies representativas deste bioma, com maior incidência e de interesse econômico (ARAÚJO, 1995; MACHADO et al., 2013).

O Pequizeiro é uma planta arbórea que pode atingir até 12 metros de altura, produzindo de 500 a 2000 frutos (pequi) por planta (SILVA; MEDEIROS FILHO, 2006; BAETA, 2013). O período de floração e frutificação podem variar conforme os gradientes climáticos, no entanto, geralmente ocorre no período seco entre julho a outubro. E a maturação dos frutos acontece após floração coincidindo com a chegada da época chuvosa. O pico da safra está entre os meses dezembro a janeiro (OLIVEIRA et al., 2006). O pequizeiro é protegido por lei através da portaria nº54 de 03/03/87-IBAMA que impede o corte e comercialização de sua madeira em todo o território nacional.

O pequi é constituído pelo exocarpo (1- casca de cor esverdeada), mesocarpo externo (2- parte interna da casca, que envolve um a quatro caroços), mesocarpo interno (3- polpa, amarelada/alaranjada), endocarpo espinhoso (4- marrom, coberto por uma camada fina de espinhos) e amêndoa ou semente (5- branca, inclui o embrião, tegumento e endosperma) (**Figura 1**).

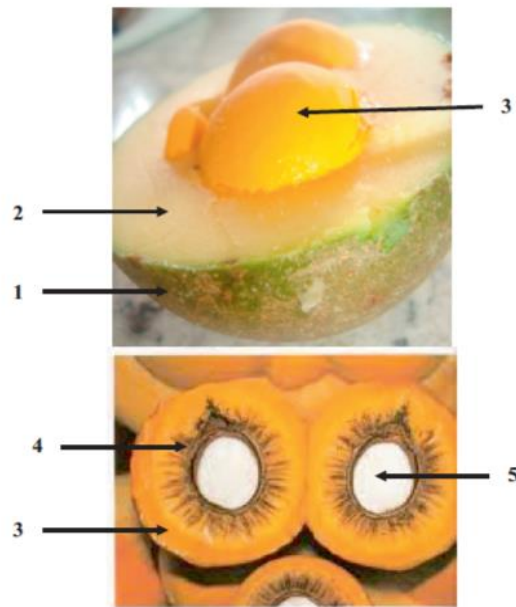


Figura 1- Caracterização física do pequi (*Caryocar brasiliense* camb.). 1- Exocarpo; 2- Mesocarpo externo; 3- Mesocarpo interno(polpa); 4- Endocarpo espinhoso; 5- Amêndoa ou semente. Fonte: Leão et al., 2017.

A polpa do fruto também conhecido popularmente como piqui ou pequiá é composta principalmente por ácidos graxos poli-insaturados como ácido oleico (ômega 9), representado aproximadamente 54% do total de ácidos graxos (MIRANDA-VILELA et al., 2008). Apresenta em torno de 7,5mg/100g de carotenoides (LIMA et al., 2007), 209mg/100g de compostos fenólicos (KUSKOSKI et al., 2005), 0,11mg/100g de vitamina E (CARDOSO et al., 2013) e 6,26-11,5mg/100g de provitamina A (MIRANDA-VILELA et al., 2009), sendo comum no tratamento de inflamações, resfriados, infecções bronco-pulmonares e doenças oftalmológicas pela população do cerrado (SOUZA et al., 2011; LEÃO et al., 2017). Além disso, é amplamente utilizado na culinária obtendo-se da polpa produtos como licores, doces, conservas de frutas, óleo de pequi, e atual uso na indústria de cosméticos e bio-lubrificantes (ARAÚJO, 1995; COMUNIAN et al., 2020).

Desde de 2015, por meio dos dados de Extração Vegetal e Silvicultura do IBGE (2018), a produção extrativista do pequi cresce acentuadamente, sendo de 26,6 % maior no ano de 2017 comparado ao período anterior, como pode ser observado no gráfico abaixo (**Gráfico 1**). No último levantamento, no ano de 2018, a produção extrativista do pequi atingiu 21,495 mil toneladas (18,5 milhões de reais), 1,95% a baixo do obtido em 2017 (21,915 mil toneladas). Apesar da ligeira redução na produção, é possível notar o avanço dessa atividade, e devido as suas características, o pequi pode ser aplicado em uma ampla variedade de produtos (ARAÚJO, 1995; FERREIRA; JUNQUEIRA, 2007).

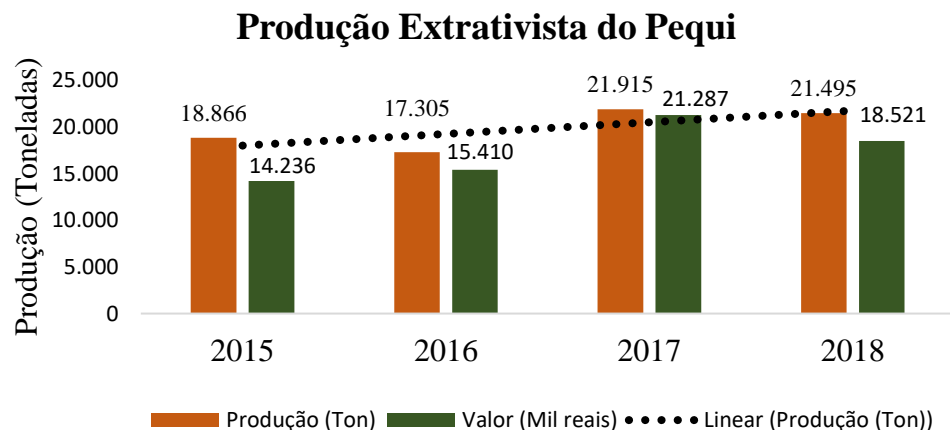


Gráfico 1 - Produção extrativista do Pequi no Brasil

O custo de produção para um quilo de pequi é, em média, R\$ 0,67 e a caixa com 32kg iniciou novembro de 2019 sendo comercializada em torno de R\$ 30,00 (Companhia Nacional de Abastecimento – CONAB, 2020). O fruto faz parte da Política de Garantia de Preços Mínimos para Produtos da Sociobiodiversidade (PGPM-Bio), executada pela Conab. A PGPM-Bio oferece subsídio aos produtos coletados na floresta, garantindo o preço mínimo aos extrativistas e promovendo o uso sustentável dos recursos naturais. O pequi é o produto com maior participação no volume de incentivo pago até o momento. Segundo a CONAB, no ano de 2020 foram destinados

R\$ 6,6 milhões para esta cultura, totalizando 21,2 mil toneladas e contemplando 2.696 produtores.

3. Óleo de pequi – ação antioxidante

A polpa do pequi (mesocarpo interno) é a parte consumida e do qual também é extraído o óleo do pequi. A extração do óleo da polpa do pequi é feita com os frutos colhidos *in natura* geralmente realizada pelas comunidades ou cooperativas locais (RIBEIRO, 2000). O processo de extração do óleo é fundamentalmente artesanal por meio de intensa fervura e maceração dos frutos sem casca (mistura de polpa macerada mais água). Conforme descreve Oliveira (2009), durante esse processo ocorre a formação de porções aglomeradas de óleo na superfície da mistura aquosa devido a insolubilidade em água (**Figura 2**). O óleo extraído é líquido à temperatura ambiente e possui forte coloração amarelo/alaranjado devido a presença de carotenoides (LIMA et al., 2007; PINTO et al., 2018). O produto mantém o aroma e sabor característicos do pequi da forma *in natura* (RIBEIRO, 2000; SIMÕES, 2004).



Figura 2- Obtenção do óleo de pequi (*Caryocar brasiliense* camb.). Fonte: Cooperativa Grande Sertão, 2019 - Montes Claros /MG

De acordo com Lima et al. (2007) e Miranda-Vilela et al. (2009), os ácidos graxos insaturados representam a maior proporção de lipídios encontrados na polpa do pequi (58 % a 60%). Os principais ácidos graxos são o ácido oleico (C18:1 ω -9) e o ácido palmítico (C16:0), no qual, o ácido oleico encontra-se na maior proporção, 53,9% a 55,87%, seguido pelo ácido palmítico, 35,17% a 41,78% (LIMA et al., 2007; MIRANDA-VILELA et al., 2009). Tradicionalmente o ômega 9 é considerado um monoinsaturado importante na saúde. Diversos estudos investigaram sua ação anti-inflamatória e antioxidante no organismo, pois apresentam capacidade de reduzir níveis de citocinas (Interleucina-6) e atenuar a geração de espécies reativas de oxigênio (GALÁN-ARRIERO et al., 2017; PALOMER et al., 2018). Outros ácidos graxos também são encontrados na polpa do pequi, entretanto, em menor proporção tais como os ácidos palmitoléico, linoléico, linolênico e esteárico (MIRANDA-VILELA et al., 2008; MALACRIDA et al., 2018).

Atualmente, diversas pesquisas têm sido conduzidas revelando o potencial do pequi (óleo de pequi) para várias finalidades, e a atividade biológica mais estudada é sua ação antioxidante atribuída aos carotenoides (MIRANDA-VILELA et al., 2014; TORRES et al., 2016; LEÃO et al., 2017; COMUNIAN et al., 2020).

Segundo Ramos et al. (2001), os carotenoides identificados na polpa foram anteraxantina, zeaxantina, beta-caroteno, gama-caroteno, critoflavina, mutatoxantina e, em maior quantidade, beta-criptoxantina. Entretanto, Oliveira et al. (2006) e Geocze (2011) observaram que o beta-caroteno é o carotenoide predominante na polpa do fruto. Na **Tabela 1** está a composição de carotenoides encontrados em estudos anteriores. Os autores atribuem as variações nas concentrações devido a época do ano, condições do solo, radiação solar, pluviosidade e local de obtenção do produto.

Avaliando o papel dos carotenoides, vários experimentos *in vitro* comprovaram que beta-caroteno, beta-criptoxantina, luteína e licopeno exibiram capacidade de proteção neutralizando oxigênio reativo ou compostos nitrogenados reativos, o que contribui para a defesa antioxidante do corpo, induzindo a longevidade, a manutenção das membranas celulares e o reparo do DNA (KIM; VAZIRI, 2010; SUN et al., 2018). Além das propriedades oxidativas, muitos estudos também têm sido realizados para avaliar suas propriedades farmacológicas contra diferentes doenças, como diabetes, doenças cardiovasculares e tumores (MIRANDA-VILELA et al., 2014; COLOMBO et al., 2015; TRAESEL et al., 2017).

Tabela 1 - Composição de carotenoides na polpa de pequi (*C. brasiliense* camb.)

Composição de carotenoides (µg/g)			
Carotenoides	Ramos et al.(2001)¹	Geocze (2011)²	Malacrida et al.(2018)³
Anteraxantina	79,14		
Zeaxantina	4,32	10,48	4,37
β-caroteno	9,35	67,19	7,20
β-criptoxantina	93,67	44,35	5,36
ζ-caroteno	17,79		
Mutatoxantina	14,68		
Viloxantina		2,35	
Neoxantina		9,31	
Luteína		0,60	

Expressos na base seca

¹ Metodologia de extração de acordo com Rodriguez et al. (1976)

² Metodologia de extração de acordo com Ferruzzi et al. (2006). Valores da cidade de Montes Claros.

³ Metodologia de extração de acordo com De Rosso e Mercadante, (2007)

3.1 Carotenoides

Os carotenoides (CARs) são pigmentos naturais responsáveis por cores em plantas e frutas que variam de amarelo, laranja e vermelho, biossintetizados em todos os organismos fotossintéticos e também em algumas bactérias, leveduras e fungos não fotossintéticos (CONCEPTION et al., 2018; SUN et al., 2018). Os organismos fotossintetizantes utilizam os CARs como pigmentos de coleta de luz no fotossistema II, além de participar de transferência de elétrons e impedir a formação de oxigênio *singlet* (STAHL; SIES, 2003), sem dúvida, essenciais para a montagem e manutenção desse sistema.

A maioria dos CARs possui estrutura composta de 40 átomos de carbonos formados pela condensação de unidades de isoprenos que contém um número variado de ligações duplas conjugadas, classificando-os como tetraterpenóides (C₄₀), biossintetizados a partir do fitoeno (BRITTON; KHACHIK, 2009; CONCEPTION et al., 2018). Os CARs podem ser classificados conforme sua composição química em

carotenos e xantofilas. Os carotenos apresentam em sua estrutura apenas átomos de carbono e hidrogênio, como exemplo nessa categoria: alfa-caroteno, beta-caroteno e licopeno. As xantofilas apresentam oxigênio em sua estrutura, como por exemplo: luteína, zeaxatina e beta-criptoxantina. As estruturas de alguns CARs são apresentadas na **Figura 3**.

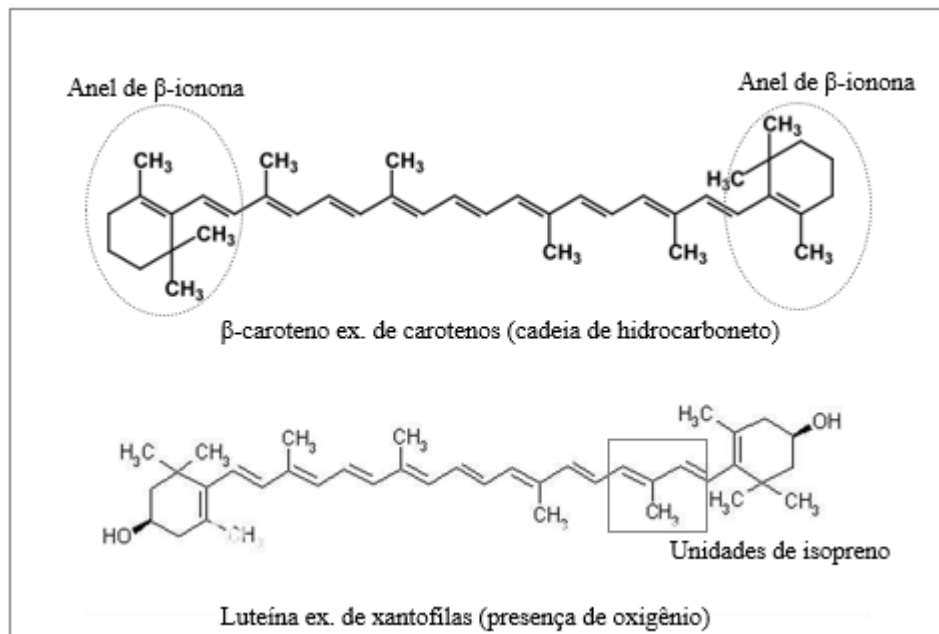


Figura 3 - Estrutura química dos carotenoides. Adaptado de Ribeiro et al., 2018.

As aves dependem da ingestão de CARs dos alimentos de origem vegetal para que os tenha disponíveis. Como moléculas hidrofílicas, são absorvidos no terço inicial do intestino delgado, junto com ácidos graxos e vitaminas lipossolúveis (ROCHA; MAIORKA, 2017). Desta forma, podem ser carregados até outros tecidos para atender as necessidades fisiológicas, como atividade pigmentante (pele e gema), antioxidante e ou armazenados no fígado (KOUTSOS et al., 2003; SURAI et al., 2003). Alguns CARs são precursores da vitamina A (retinol), são eles: alfa-caroteno, beta-caroteno, alfa e beta-criptoxantina. Sua estrutura química composta por pelo menos um grupamento de beta-

ionona nas extremidades e cadeias de isopreno, assemelha-se a estrutura química do retinol (vitamina A), logo, podem ser clivados no duodeno e adquirirem a forma comum de retinol. Cada CAR possui um padrão individual de absorção, transporte e metabolismo (RIBEIRO et al., 2018).

Dentro das células, os CARs são associados a vários tipos de membranas biológicas, no qual, são encontrados em ambientes lipofílicos (fase lipídica) e interfaces lipídica/aquosa (JOMOVA; VALKO, 2013; BRITTON, 2020) de membranas celulares, mitocôndrias, núcleo, lisossomos entre outros. Como consequência, desempenham um papel importante na proteção das membranas contra danos oxidativos, uma vez que, são dispostos a doar elétrons (ou átomo de hidrogênio) para qualquer espécie oxidada (JOMOVA; VALKO, 2013; KAULMANN; BOHN, 2014), e são desativadores eficazes de moléculas eletronicamente excitadas (oxigênio *singlet*) que estão envolvidas na geração de radicais livres (BERNEBURG et al., 1999; STAHL; SIES, 2003).

3.2 Espécies reativas de oxigênio e peroxidação lipídica

As mitocôndrias são consideradas a principal fonte de espécies reativas de oxigênio (EROS), cuja a formação é inevitável durante o metabolismo oxidativo (DONEGAN; BRAGANSA; SHIVA, 2020). As EROS têm funções fisiológicas na sinalização celular, apoptose e crescimento celular (DONEGAN; BRAGANSA; SHIVA, 2020; WARRAICH; HUSSAIN; KAYANI, 2020). Contudo, a superprodução de EROS seja por fatores exógenos (altas densidade de criação, estresse por calor) ou endógenos (patologias) resulta em um estado de estresse oxidativo, promovendo alterações na integridade das membranas celulares, danos no DNA, proteínas, lipídios e carboidratos (HALLIWEL; GUTTERDGE, 1989; KIM; VAZIRI, 2010; WARRAICH; HUSSAIN; KAYANI, 2020). No geral, o local de produção de EROS é sobre ou nas

bicamadas lipídicas transformando os lipídeos como as primeiras biomoléculas alvo para oxidação (YALCINKAYA, 2019).

Os sistemas antioxidantes contribuem para a regulação da concentração das EROS nas organelas e compreende diferentes tipos de componentes, nos quais podem ser classificados como antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos (STAHL; SIES, 2003; PANDYA; HOWELL; PILLAI, 2013; WARRAICH; HUSSAIN; KAYANI, 2020). As enzimas antioxidantes são superóxido dismutase (SOD); catalase (CAT); glutaciona peroxidase (GPx); glutaciona redutase (GR); glutaciona-s-transferases (GSTs). Os antioxidantes não enzimáticos incluem glutaciona reduzida (GSH); vitamina C (ácido ascórbico); vitamina E (alfa-tocoferol); minerais (selênio, cobre, zinco, por exemplo); ácido úrico; albumina; ceruloplasmina; flavonoides; carotenoides, dentre outros (PANDYA; HOWELL; PILLAI, 2013; BARBOSA et al., 2020).

Fisiologicamente, a concentração de espécies reativas é regulada pela atividade do sistema de defesa antioxidante, em que os antioxidantes (menor potencial redox) doam elétrons ou átomo de hidrogênio a qualquer espécie oxidada (maior potencial redox) formando uma molécula estável incapaz de danificar as células, e essas reações mantem o equilíbrio oxidativo celular (**Figura 4**). Os componentes de defesa interna do organismo funcionam em diferentes compartimentos celulares e são complementares entre si, ou seja, desempenham funções (inibindo, capturando ou restaurando) de forma sinérgica (PETRUK et al., 2018; WARRAICH; HUSSAIN; KAYANI, 2020).

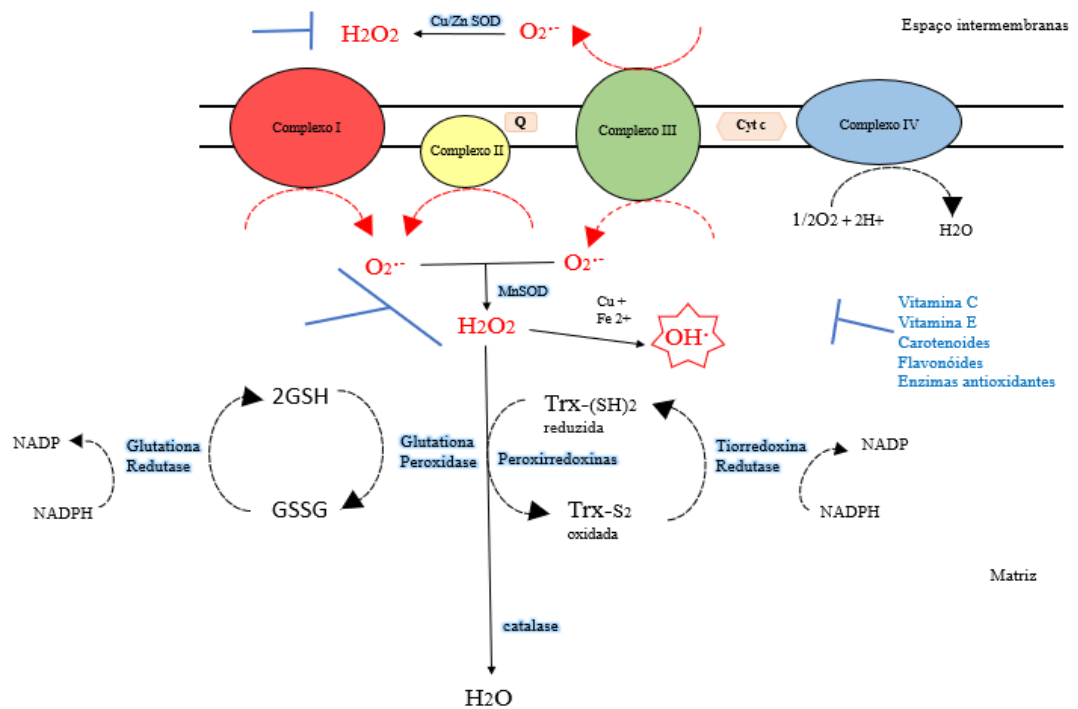


Figura 4 - Produção de ROS mitocondrial e sistemas antioxidantes. Em vermelho são destacados as principais EROS gerados e em azul são destacados os principais sistemas envolvidos na proteção celular contra os danos oxidativos. O ânion superóxido é dismutado pela superóxido dismutase no espaço intermembranas ou na matriz mitocondrial em peróxido de hidrogênio. As reações de fenton podem ativar o peróxido de hidrogênio e formar o radical hidroxila. Também na matriz mitocondrial estão os sistemas Glutaciona peroxidase, Glutaciona redutase, e catalase. Os sistemas tiorredoxinas e peroxirredoxinas se sobrepõem na matriz e no citosol. O H₂O₂ oxida um resíduo de cisteína no sítio catalítico da peroxirredoxina, que forma uma ponte dissulfeto com a cisteína vizinha. O poder redutor da Trx reduz a peroxirredoxina por reação de troca de dissulfeto e a Trx é então reduzida pela tiorredoxina redutase. O NaDPH renova esses sistemas antioxidantes com seu potencial redutor. Vitaminas, carotenóides e flavonóides podem contribuir neste sistema doando elétrons ou átomos de hidrogênio para os RO neutralizando-os. Abreviações: H₂O₂ – peróxido de hidrogênio; O₂^{•-} - ânion superóxido; OH[•] - radical hidroxila; H₂O – água. O₂ – oxigênio; Q – ubiquinona; Cyt c – Citocromo c; Cu⁺ - cobre; Fe²⁺ ferro ferroso; MnSOD – Superóxido dismutase citosólica; Cu/Zn SOD – Superóxido dismutase mitocondrial; 2GSH – glutaciona reduzida; GSSG – Glutaciona oxidada; Trx-S₂ – Tiorredoxina oxidada; Trx-(SH)₂ reduzida. Adaptado de Donegan, Braganza e Shiva, 2020.

Como muito bem relatado em estudos anteriores, o intermediário primário produzido no metabolismo oxidativo é o ânion superóxido (O₂^{•-}) classificado como EROS, e que pode ser rapidamente dismutado para peróxido de hidrogênio (H₂O₂). Por definição, a EROS também inclui o radical hidroxila (OH[•]), radical peroxil lipídico (LOO[•]), espécie não radicais como H₂O₂ e oxigênio *singlet* (¹O₂), dentre outros (LAMBERT; BRAND, 2009; CUI; KONG; ZANG, 2012; ZHAO et al., 2019).

O $O_2^{\cdot-}$ gerado a partir do oxigênio molecular pela adição de elétrons é uma espécie pouco reativa e incapaz de atravessar as membranas celulares, portanto, está retido no compartimento onde foi produzido (DONEGAN; BRAGANSA; SHIVA, 2020). As moléculas de $O_2^{\cdot-}$ são facilmente dismutadas em H_2O_2 com auxílio da enzima superóxido dismutase (SOD mitocondrial ou citosólica), este intermediário contribui na geração de outras EROS ou ainda, de espécies reativas de nitrogênio (ERN) (STAHL; SIES, 2003; JOMOVA; VALKO, 2013). Ao contrário do $O_2^{\cdot-}$, o H_2O_2 é estável e sem carga, por isso, são capazes de atravessar a membrana e mediar a transdução de sinais celulares, por exemplo (SHADEL; HORVATH, 2015; DONEGAN; BRAGANSA; SHIVA, 2020). A concentração de H_2O_2 é regulada por pelo menos três sistemas de enzimas antioxidantes, por meio da glutathione peroxidase (GPx), catalase (CAT) e sistema tiorredoxina (Trx) (DONEGAN; BRAGANSA; SHIVA, 2020; HOU et al., 2020).

Quando o H_2O_2 não é metabolizado pelo sistema antioxidante, podem gerar o OH^{\cdot} por meio de ativação pelo ferro (Fe^{2+}) na reação de Fenton e Haber-Weiss (BOKARE; CHOI, 2014; TANG; WANG, 2018). Além disso, outros metais, como cobre (Cu^{2+}), manganês (Mn^{2+}) e intermediários como radical hidroperoxil (HO_2^{\cdot}) também podem ativar o H_2O_2 para produzir radicais OH^{\cdot} (BOKARE; CHOI, 2014; WANG; WANG, 2020). Devido sua forte reatividade e instabilidade (meia-vida curta), os OH^{\cdot} são considerados os mais deletérios as biomoléculas e, frequentemente iniciam processos de peroxidação lipídica (YALCINKAYA, 2019; BARBOSA et al., 2020). Da mesma forma, o estado eletronicamente excitado do oxigênio molecular (oxigênio *singlet* - 1O_2), são moléculas altamente seletivas oxidando compostos orgânicos insaturados (MONTILLET et al., 2004).

A peroxidação lipídica é provavelmente o evento mais explorado na pesquisa quando se trata de EROS. Os ácidos graxos poli-insaturados (PUFAS) são excelentes alvos de ataques de EROS devido suas duplas ligações as quais conferem alta redutibilidade (YALCINKAYA, 2019). Isso resulta em danos nas funções de proteínas ligadas a membrana, danos na fluidez e permeabilidade, prejuízos no transporte de solutos, produção de intermediários tóxicos (HALLIWEL; GUTTERDGE, 1989; ZHAO et al., 2019), ocasionando morte celular.

O processo de peroxidação lipídica ocorre inicialmente com a abstração de átomo de hidrogênio dos PUFAS pelas EROS como por exemplo $\text{OH}\cdot$ e/ou $^1\text{O}_2$. Esta etapa inicial leva a formação do radical lipídico ($\text{L}\cdot$) que reage rapidamente com o O_2 para formar o radical peroxil lipídico ($\text{LOO}\cdot$). Este radical tem a habilidade de capturar um outro átomo de hidrogênio de um lipídio vizinho para se tornar hidroperóxido de hidrogênio (LOOH). Nesta reação, um novo $\text{L}\cdot$ é gerado, podendo ser continuamente convertido em LOOH até que esta reação de propagação seja interrompida (CHAN, 1982; YALCINKAYA, 2019). Além disso, diferentes produtos da peroxidação lipídica podem ser gerados nas reações de propagação, como cetonas e aldeídos, entre os quais, o malonaldeído (MDA) foi mais extensivamente estudado (CHAN, 1982; DEL; STEWART; PELLEGRINI, 2005; BARBOSA et al., 2020).

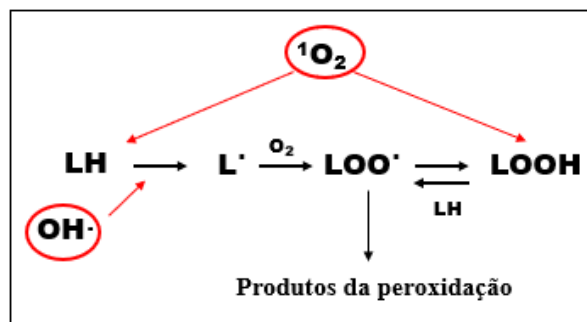
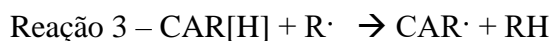
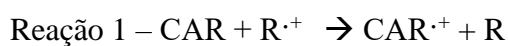


Figura 5 – Reações de peroxidação lipídica. Adaptado de ZHANG et al., (2020).

A fase de terminação da peroxidação envolve a autodestruição do $\text{LOO}\cdot$ ou por meio de antioxidantes como vitamina E, vitamina C, SOD, CAT, compostos fenólicos e carotenoides (CHAN, 1982; YALCINKAYA, 2019). Os carotenoides (CARs) são antioxidantes importantes na desativação de $^1\text{O}_2$ por transferência de energia, produzindo oxigênio no estado fundamental (JOMOVA; VALKO, 2013). E também, na eliminação de radicais $\text{LOO}\cdot$ e $\text{OH}\cdot$ (STAHL; SIES, 2003; CONCEPTION et al., 2018). Estando, portanto, envolvidos na prevenção e proteção das membranas celulares e na homeostase oxidativa (PANDYA; HOWELL; PILLAI, 2013).

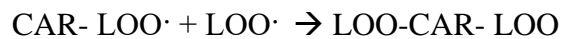
3.3 Ação antioxidante dos CARs frente aos EROS

As propriedades de eliminação de EROS pelos CARs, em especial radicais peroxila e oxigênio *singlet*, envolvem mecanismos de oxidação, redução, abstração de hidrogênio e reações de adição, como descrito por Ribeiro et al. (2018). Em termos práticos, os CARs ricos em elétrons reagem prontamente com uma forma de oxigênio ou outros radicais oxidantes ($\text{R}\cdot^+$) para formar cátions de radical CAR (Reação 1 - oxidação). Os CARs podem ainda serem reduzidos por espécies reativas resultando na formação de um ânion radical CAR (Reação 2 - redução). Ou podem doar um átomo de hidrogênio no radical oxidante (Reação 3 - abstração), originando em um radical estável.



Em outras reações, espécies reativas como $\text{LOO}\cdot$ e $\text{OH}\cdot$ são adicionadas as cadeias de polieno dos CARs formando um composto como $\text{CAR}-\text{LOO}\cdot$, por exemplo. E este

composto pode reagir com outra espécie de radical $\text{LOO}\cdot$, e formar um produto não radical (Reação 4 - adição).



É razoável supor que o óleo de pequi, rico em carotenoides (LIMA et al., 2007; MIRANDA-VILELA et al., 2009; PINTO et al., 2018), possa auxiliar na prevenção ou interrupção das reações em cadeia da peroxidação lipídica (fase de terminação), bem como, na integridade das células contra os danos oxidativos. Os estudos de Colombo et al. (2015) mostraram que a suplementação oral com óleo de pequi diminuiu os danos ao DNA e a peroxidação lipídica em um modelo de carcinogênese pulmonar induzida quimicamente *in vivo*. Miranda-Vilela et al. (2014) demonstraram que o óleo de pequi foi capaz de reduzir drasticamente os efeitos das EROS nas células hepáticas. Como modelo experimental, utilizaram quimioterápicos, que causam aumento do estresse oxidativo no fígado. Seguindo estas premissas, Vale et al. (2018), comprovaram que o grupo de ratos *Wistar* sob protocolo de exercícios extenuante (alta produção de EROS) consumindo óleo de pequi, apresentaram apenas leves danos teciduais hepáticos comparado ao grupo controle, e isto, também foi caracterizado por menor concentração de MDA.

Nesse contexto, o óleo de pequi se destaca por apresentar características zootécnicas desejáveis. Como visto acima, o óleo tem sido significativamente estudado em ensaios pré-clínicos e clínicos direcionados a saúde humana, todavia, com tantas propriedades benéficas, o produto puramente brasileiro, ainda não foi estudado na nutrição animal.

4. Uso de aditivos fitogênicos na alimentação de frangos de corte

A resistência bacteriana a antibióticos tem sido objeto de estudo (DIARRA et al., 2010; FORGETTA et al., 2012; BARTKIENE et al., 2020). Ao longo dos últimos 50 anos, o uso de antibióticos na alimentação animal combinado com medidas de biossegurança (MEHDI et al., 2018), contribuiu no combate a doenças infecciosas e no estímulo ao crescimento (antibiótico como promotor de crescimento - AGP). A indústria avícola utiliza os AGPs para proteger a saúde das aves, principalmente pelo controle de infecções gastrointestinais (BERMUDEZ, 2003; PENG et al., 2016) e consequentemente, melhorar a eficiência alimentar e a produção de carne (ENGBERG et al., 2000). No entanto, evidências científicas sugerem que seu uso em larga escala levou a adaptação contínua das bactérias aos antibióticos (resistência antimicrobianos), resíduos nos alimentos (carne e ovos) e no meio ambiente, particularmente no ecossistema aquático (FORGETTA et al., 2012; RONQUILLO; HERNANDEZ, 2017; MENZ; OLSSON; KÜMMERER, 2019). O que leva a um problema de saúde pública (KEMPER, 2008; DIARRA et al., 2010).

A pressão e a preocupação global dos consumidores a produção de caráter não sustentável, aos efeitos nocivos de resíduos de AGPs (MENZ; OLSSON; KÜMMERER, 2019) e além disso, associado a proibição completa de todos os AGPs em rações animais desde janeiro de 2006 pela União Europeia (grande mercado consumidor do frango brasileiro), levaram os pesquisadores a buscarem alternativas eficazes ao uso de antibióticos por meio de produtos naturais (ENGBERG et al., 2000; TOGHYANI et al., 2011; GHASEMI; KASANI; TAHERPOUR, 2014). Inúmeros produtos naturais têm sido cada vez mais avaliados como alternativas aos AGPs em dietas avícolas, entre eles, probióticos, prebióticos, enzimas, ácidos orgânicos, óleos

essenciais, imunoestimulantes e aditivos fitogênicos (GHEISAR; KIM, 2018; MEHDI et al., 2018). Conforme apontado por Mehdi et al. (2018), o objetivo dessas alternativas é manter bom nível de produção animal, preservando o meio ambiente e saúde do consumidor.

Os aditivos fitogênicos de maneira geral são ervas, especiarias, óleos essenciais, óleos funcionais e ou misturas essenciais (WINDISCH et al., 2008). E seu uso na alimentação animal tem sido bem-sucedido para melhorar o desempenho, pois os compostos bioativos presentes nestes produtos, podem atuar estimulando o crescimento benéfico da microbiota ou inibindo a proliferação de bactérias patogênicas (por exemplo, *Escherichia coli* e *Clostridium perfringens*) no trato gastrointestinal (REIS et al., 2018); estimulando a secreção endógena de enzimas digestivas (KIRUBAKARAN et al., 2016); modulando o sistema imunológico (KHAFAGA et al., 2019); combatendo espécies reativas de oxigênio - EROS e ou espécies reativas de nitrogênio - NOS (HOSSEINI-VASHAN; GOLIAN; YAGHOBFAR, 2015).

Resultados recentes mostraram que os aditivos fitogênicos foram boas alternativas aos AGPs. No estudo de Peng et al. (2016), a inclusão de 600mg/kg de óleo de orégano na dieta teve efeito positivo no desempenho aos 21 dias (932 vs 902 g) e aos 42 dias de idade (3046 vs 2899 g) comparado a dieta avilamicina (AGP). Corroborando com estes resultados, Chowdhury, Mandal e Patra (2018), observaram que os frangos alimentados com 0,3g/kg óleo de canela tiveram eficiência alimentar semelhante a dieta com bacitracina (AGP) e superior ao grupo controle. Neste aspecto, o óleo de pequi pode ser explorado como aditivo fitogênico na alimentação de aves em alternativa a AGPs.

4.1 *Qualidade de carne*

Indispensável e de baixo custo, a carne de frango tem representado atualmente uma das mais importantes fontes proteicas para população mundial. Com a população projetada para 9,8 bilhões em 2050 (UNITED NATIONS, 2017), há uma pressão intensa sobre a pecuária para aumentar a produção e atender à crescente demanda por proteína animal de alta qualidade (DECKER; PARK 2010; GONZALEZ-RIVAS et al., 2020). Além disso, características sensorias como cor, textura e sabor representam fatores fundamentais na escolha de compra dos consumidores, e o processamento, transporte e armazenamento continuam a desempenhar papel vital na *shelf-life* (ZHANG et al., 2016; MUNEKATA et al., 2020). E mais recentemente, a preocupação com a origem dos produtos (ausência de conservantes sintéticos e AGPs), sustentabilidade e composição natural da carne também foram incluídos como aspectos relevantes na compra (DECKER; PARK, 2010).

O uso de produtos naturais para melhorar a qualidade da carne é promissor e bem aceito pelos consumidores. Estes produtos podem influenciar a composição da carne ao ser suplementados na dieta, por meio da modificação no perfil de ácidos graxos da carne, ou ao mesmo tempo, retardar os processos das reações oxidativas (peroxidação lipídica) da carne e seus produtos (SKIEPKO et al., 2016; MUNEKATA et al., 2020). A carne e derivados são susceptíveis aos processos de oxidação dos lipídios e deterioração da qualidade da carne durante o armazenamento, devido as altas concentrações de PUFA's (WENK, 2003). A disponibilidade de oxigênio é o fator mais crítico no desenvolvimento da peroxidação (JO; LEE; AHN, 1999), provocando mudanças indesejáveis nas características sensoriais e nutricionais da carne, menor tempo de prateleira e prejuízos econômicos as indústrias.

Conforme relatado na literatura científica, a estabilidade oxidativa da carne de frango pode ser melhorada com uso de aditivos fitogênicos (ZHANG et al., 2017; HECK et al., 2019). Um estudo importante sobre o uso de compostos naturais na longevidade da *shelf-life* de carnes foi relatado por Sevcikova; Srivan e Dlouhá, (2008). Nesta pesquisa, os autores observaram que a suplementação da dieta de frangos de corte com licopeno (carotenoide) reduziu os níveis de MDA na carne de peito após três e cinco dias de armazenamento sob refrigeração. Por outro lado, Pozzo et al. (2013) demonstraram que a alta concentração de licopeno (500mg/kg) na dieta de frangos de corte não afetou as concentrações de MDA na carne de peito. Estes resultados conflitantes foram sugeridos como consequência dos diferentes níveis dos compostos bioativos, potencial ação pró-oxidante, ingredientes utilizados na formulação e condições de alojamento das aves (MERCENDANTE et al., 2010). Portanto, é importante que as possíveis implicações, tanto positivas quanto negativas, da suplementação dietética com aditivos fitogênicos sobre esses parâmetros de produção pós-abate, também sejam avaliadas.

5. Estresse térmico na produção avícola – aditivos fitogênicos como estratégia nutricional

A seleção genética das linhagens comerciais de frangos de corte proporcionou animais de rápido crescimento, especialmente de músculo peitoral para fornecimento de carne (GONZALEZ-RIVAS et al., 2020). Em contrapartida, levou a alterações na eficiência alimentar (alto consumo de ração) e no metabolismo energético (elevada produção de calor metabólico), afim de atender a maior demanda dos tecidos envolvidos na produção, o que não foi acompanhado pelos sistemas viscerais como cardiorrespiratório, afetando a termorregulação diante de estresse térmico (BÍCEGO;

SCARPELLINI; GARGAGLIONI, 2017). O estresse térmico por calor se tornou um sério desafio na indústria avícola (LIN et al., 2006; FARAG; ALAGAWANY, 2018), principalmente em países tropicais e subtropicais, como o Brasil, em que no verão a média de temperatura pode ultrapassar os 35°C em várias regiões.

Nas aves, quando a temperatura ambiente está acima da zona termoneutra (18°C a 25°C), resulta no início do estresse por calor (EC) e ativação de mecanismos de perda para restabelecer a homeostase. Nestas circunstâncias, a quantidade de calor produzido pela ave ultrapassa sua capacidade de dissipar o calor extra para o ambiente circulante (BÍCEGO; SCARPELLINI; GARGAGLIONI, 2017). Este desequilíbrio pode ser intensificado pela umidade relativa do ar, taxa metabólica, irradiação térmica, temperatura e velocidade do ar (LARA; ROSTAGNO, 2013). De acordo com Farag e Alagawany (2018), o EC pode ser distinguido em duas categorias. A primeira em estresse por calor agudo, que se refere ao aumento curto e rápido da temperatura ambiente, e o outro, estresse por calor crônico, em que a alta temperatura persiste por um longo período (dias ou semanas).

Ambos os tipos de EC causam impactos deletérios na fisiologia e imunologia das aves afetando negativamente o bem-estar e a produtividade (LIN et al., 2006). Em estudos anteriores foi relatado aumento da temperatura corporal (YAHAV; RATH; SHINDER, 2004), comprometimento na produtividade por meio do declínio na taxa de crescimento (PUVADOLPIROD; THAXTON, 2000), efeitos adversos no equilíbrio eletrolítico (MONGIN, 1981), redução no consumo de ração (POST; REBEL; TERHUUNE, 2003), alterações nas funções metabólicas e na disponibilidade e absorção de nutrientes, em consequência da modificação na estrutura e função do epitélio intestinal, bem como, na microbiota (ZHANG et al., 2017). Supressão das atividades fagocíticas

dos leucócitos (ALTAN et al., 2003), redução na síntese de anticorpos (MASHALY et al., 2004), alterações nas funções endócrinas, aumento nos níveis de corticosterona e cortisol (LARA; ROSTAGNO, 2013) e estresse oxidativo (LIN et al., 2006).

Provavelmente, a consequência mais pronunciada do estresse por calor é a alteração das funções metabólicas que inicialmente, parecem estar focadas na mobilização ou produção de glicose para fornecer energia necessária ao organismo, com o propósito de restabelecer a homeostase na presença do estressor (HABIBU et al., 2018). Diante disso, Puvadolpirod e Thaxton (2000) afirmaram que as respostas ao estresse em frangos de corte incluem aumento plasmático de glicose, colesterol total e triglicerídeos, sendo subsídio a demanda energética dos tecidos. Foi sugerido que durante o estresse, os animais criam hierarquia de prioridade de tecido pela qual os nutrientes são conduzidos com base na ordem de importância, como tecido neural, visceral, ósseo, muscular e adiposo (HAMMOND, 1952). Zulkifli et al. (2009), também observaram maior concentração sérica de aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT) em frangos de corte submetidos ao estresse térmico prolongado (32°C) durante cinco semanas, tal fato foi atribuído a disfunção hepática e ou muscular, possivelmente devido a alterações na permeabilidade das membranas.

O perfil hematológico é indicador importante de mudanças fisiológicas nos animais e pode colaborar na avaliação do estresse térmico (LARA; ROSTAGNO, 2013). Em aves, o aumento na relação heterofilo/linfócito é um biomarcador ou indicativo de estresse (MCFARLANE; CURTIS, 1989; ALTAN et al., 2003), isto porque, a ativação das respostas do sistema nervoso autônomo (adrenalina e noradrenalina) e a liberação de adrenocorticoídes (ACTH, corticosterona e cortisol), podem ocasionar a involução de tecidos linfoides (timo, Bursa de Fabricius e baço)

levando a uma diminuição na biossíntese e proliferação de linfócitos. Como já foi demonstrado em estudos com frangos de corte após a administração de corticosterona ou ACTH (hormônio adrenocorticotrófico) (PUVADOLPIROD; THAXTON, 2000; POST; REBEL; TER-HUUNE, 2003).

A combinação de peroxidação lipídica, dano oxidativo e estresse por calor nos sistemas biológicos frente as altas temperaturas já foram bem documentados (ALTAN et al., 2003; MUJAHID et al., 2007; SAHIN et al., 2016). Com o aumento na temperatura, as atividades das enzimas antioxidantes no fígado e no soro são positivamente reguladas, isto é, o aumento na produção de EROS ativa a expressão das enzimas antioxidantes em resposta protetora ao estresse oxidativo (THOMAS, 2000; PANDYA; HOWELL; PILLAI, 2013). A atuação das altas temperaturas como indutor de EROS em frangos de corte foi reconhecido por Lin et al. (2006).

Aves submetidas a altas temperaturas mostraram aumento significativo na concentração de MDA (biomarcador de peroxidação lipídica) de maneira dependente da temperatura (TAN et al., 2010). Ismail; Al-Busadah e El-Bahr (2013) relataram que a alta temperatura ambiente (39°C) aumentou a peroxidação lipídica, diminuiu as atividades de SOD e CAT no soro de frangos de corte. Seguindo as mesmas tendências, Sahin et al. (2016), observaram redução nas atividades de GPx e SOD, aumento na peroxidação lipídica em frangos mantidos a 34°C/8 horas.

Tendo em vista as futuras demandas de proteína animal e as exigências mercadológicas, é aconselhável explorar novas estratégias nas práticas avícolas, como seleção genética, ambientação em conjunto à nutrição para mitigar os efeitos nocivos do estresse térmico.

5.1 Aditivos fitogênicos como estratégia nutricional ao estresse térmico

A modulação dietética pode amenizar os impactos adversos do estresse térmico em aves (MOHAMED et al., 2019), incluindo a adição dietética de vitaminas, minerais, aminoácidos e aditivos fitogênicos nas rações (SAHIN et al., 2009; KHAN et al., 2012; HOSSEINI-VASHAN; GOLIAN; AGHOB FAR, 2015), dentre eles, os aditivos fitogênicos tem destaque no cenário atual (KIRUBAKARAN et al., 2016; FARGHLY; ALAGAWANY; ABD EL-HACK, 2018; MEHDI et al., 2018).

A eficiente ação antioxidante dos aditivos fitogênicos é capaz de prevenir e proteger as células contra o estresse oxidativo (WANG et al., 2008; ZHANG et al., 2015), assim, em situações de altas temperaturas, frequentemente enfrentadas nas criações avícolas em todo o mundo, os compostos bioativos presentes nos aditivos naturais podem melhorar o desempenho das aves, qualidade e quantidade de carne, bem-estar e sem dúvida, diminuir perdas econômicas (MOHAMED et al., 2019).

Como demonstrado anteriormente, os carotenoides são poderosos anti-estressores e antioxidantes naturais e podem aliviar os impactos adversos do estresse por calor. Na pesquisa de Sahin et al. (2016), demonstraram que a suplementação de *Solanum lycopersicum* (tomate/licopeno) na dieta de aves submetidas as altas temperaturas teve ação antioxidante, anti-inflamatória, efeito reforço imunológico, melhor eficiência alimentar e qualidade de carne e ovos. Roesler, Lorencini e Pastore (2010) demonstraram *in vitro* que extratos etanólicos da polpa de pequi (óleo), inibiram a peroxidação de lipídeos de membrana de forma dose dependente, efeito este, atribuído aos carotenoides presentes no óleo, assim sendo, a adição de óleo de pequi pode ser uma estratégia nutricional ao estresse térmico.

Adicionalmente, o uso de produtos naturais na alimentação animal está associado a preocupação mundial com a saúde e segurança alimentar, que atualmente é intensificada em face da pandemia de COVID-19. O Brasil desempenha um papel internacional crucial como fornecedor de alimentos nos setores agrícola e animal, o que, em conjunto com sua enorme biodiversidade, o torna um ator-chave para o desenvolvimento em questões de compostos naturais e aditivos fitogênicos, particularmente na pecuária. É também importante notar que as relações comerciais com a União Europeia e as pautas de resistência a antimicrobianos (RAMs) são seriamente levadas em consideração e fazer avançar estes assuntos significa também fazer avançar nas relações comerciais.

6. Técnicas moleculares na área da nutrição avícola

Na última década, devido ao avanço da tecnologia ômica, nossa compreensão do efeito da nutrição sobre os mecanismos reguladores em níveis celulares e moleculares aumentou de modo expressivo (MULLER, 2009; MAHMODUL; SOHEL, 2020). A combinação de pesquisa nutricional e tecnologias ômicas melhorará nosso entendimento básico das interações gene-nutrição que, em última instância, suscitam o desenvolvimento de novos métodos para produção animal e controle de doenças (MUTCH; WAHLI; WILLIAMSON, 2005; PEREIRA; MENTEN; COUTINHO, 2017; MAHMODUL; SOHEL, 2020). O uso de PCR em tempo real quantitativo (qRT-PCR) tornou-se importante e atual nos estudos dos impactos nutricionais da dieta na expressão gênica, pois é uma ferramenta poderosa na compreensão da expressão de genes alvo em tecidos específicos de humanos e animais (PEREIRA; MENTEN; COUTINHO, 2017).

A nutrição das aves tradicionalmente tem avaliado o consumo de nutrientes e seus efeitos no desempenho zootécnico, qualidade da carne, estresse oxidativo,

características histológicas do intestino, entre outros. Entretanto, com a evolução constante da ciência da nutrição na avicultura moderna aliado aos avanços obtidos em melhoramento genético, controle sanitário e ambiental, demanda uma compreensão mais detalhada do efeito de alguns nutrientes nos processos metabólicos e as suas interações genômicas (PEREIRA; MENTEN; COUTINHO, 2017). Neste sentido, alimentos, nutrientes ou compostos bioativos podem modular o metabolismo na resposta alimentar e na expressão gênica, o que permite compreender as respostas fisiológicas, metabólicas e imunes do hospedeiro (ZHANG et al., 2018; MAHMODUL; SOHEL, 2020). A partir desta temática, tem-se a abordagem da nutrigenômica que em termos gerais, refere-se a nutrientes ou componentes bioativos da dieta que podem influenciar a expressão de diversos genes (ORDOVAS; CORELLA, 2004).

6.1 Hsp 70 e Nrf-2

Os compostos antioxidantes presentes em alguns aditivos fitogênicos utilizados na nutrição de frangos de corte podem interagir de forma sinérgica com atividade de enzimas antioxidantes, assim como podem atuar na regulação de genes envolvidos no equilíbrio do sistema redox (PEREIRA; MENTEN; COUTINHO, 2017).

As *Heat Shock Proteins (Hsps)* ou proteínas de choque térmico são uma família de chaperonas moleculares (acompanhantes) sintetizadas em todas as células em resposta a estresses físicos, químicos ou biológicos, incluído a exposição a altas temperaturas (MOSSER et al., 2000; RAJDEV; SHARP, 2000). As Hsps têm por objetivo facilitar a síntese, conformação e renovação de outras proteínas, reparar células danificadas, inibir oxidação e apoptoses, assim no nível de respostas celulares, Hsps são consideradas agentes citoprotetores (MAHMOUD et al., 2004). Além disso, as Hsps estão envolvidas em processos de sinalização celular, inibição de fatores pró-

inflamatórios (NF- κ B, TNF- α), e também estão relacionados a proteção contra a superprodução de EROS e peroxidação lipídica (MAHMOUD et al., 2004; AKBARIAN et al., 2014). As Hsps são classificadas de acordo com seu tamanho molecular (kDa) e categorizadas em 5 famílias: Hsps pequenas (15-45kDa), Hsps 60, Hsps 70, Hsps 90 e Hsps grandes (100-110kDa). Dentre todas as Hsps, as de peso molecular 70kDa são as mais estudadas na avicultura, pois são as proteínas mais resistentes ao calor e por isto consideradas o termômetro celular (MAHMOUD et al., 2004; MING et al., 2010).

Desta forma, pesquisas com estresse oxidativo vem sendo conduzidas para mensurar a relação entre oxidação e alterações nos padrões de expressão do gene Hsp 70 (MAHMOUD et al., 2004; AKBARIAN et al., 2014). Em resultados anteriores, a expressão do gene Hsp70 em aves submetidas ao estresse por calor alimentadas com licopeno (SAHIN et al., 2016), minerais selênio, cromo ou zinco (RAJKUMAR et al., 2018), e probióticos (JIANG et al., 2020) eram menor que as aves controle. Semelhantemente, a suplementação de *Curmuma xanthorrhiza* (açafraão javanês) provocou a diminuição na concentração de MDA e de mRNA de Hsp70 (HOSSEINI et al., 2016). Portanto, a suplementação com antioxidantes pode regular a expressão do gene Hps70 e aliviar o estresse oxidativo em frangos de corte, principalmente considerando as criações em ambientes de alta temperatura.

O Nrf-2 (Fator Nuclear eritroide 2 relacionado ao fator 2) é um fator de transcrição nuclear responsável pelo equilíbrio redox, que atua no mecanismo de defesa celular contra o dano oxidativo, por meio da regulação da expressão de diversas enzimas de desintoxicação e do sistema antioxidante (BALOGUN et al., 2003; ZHANG et al., 2018; TONGA et al., 2020). Normalmente, o Nrf-2 está localizado no citosol e é mantido inativo por uma proteína chamada de keap 1 (proteína 1 associada à ECH do

tipo Kelch). A Keap1 apresenta um grupo sulfidril que atua como sensor de estresse oxidativo celular, e ainda direciona o Nrf-2 para ser degradado no proteossoma (CARDOZO et al., 2013).

Em resposta a mudanças covalentes ou EROS, ocorre uma interrupção da interação entre o Nrf2 e o Keap1, com consequente acúmulo de Nrf-2 e sua translocação nuclear (TAKAYA et al., 2012; CARDOZO et al., 2013). Uma vez no núcleo, Nrf-2 se liga ao elemento responsivo antioxidante (ARE) que está presente na região promotora de muitos genes que codificam enzimas antioxidantes e de desintoxicação de fase II, tais como: NAD (P) H, quinona oxidoreductase 1 (NQO1), glutathione S-transferase (GST), heme oxigenase-1 (HO-1), glutathione peroxidase (GSH-Px), glutamato cisteína ligase (GCL), catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), UDP glucuronosiltransferase e o sistema tiorredoxina / peroxirredoxina, que desempenham um papel crucial na defesa celular melhorando a remoção de EROS (KIM; VAZIRI, 2010; SINGH et al., 2010; ZHANG et al., 2018). Neste aspecto, o Nrf2 ativa processos de defesa celular, aumentando desta forma a capacidade geral das células para se desintoxicar e eliminar substâncias prejudiciais (SUZUKI; YAMAMOTO, 2015; FARKHONDEH et al., 2020).

Uma variedade de compostos naturais foi associada a efeitos citoprotetores por interferir via sinalização Nrf-2, como curcumina, resveratrol, licopeno, luteína, compostos fenólicos, entre outros, como pode ser observado na **Figura 6** (SAHIN et al., 2012; ZHANG et al., 2018). De modo semelhante a estes compostos, as EROS também antagonizam a interação do fator de transcrição Nrf-2 e o Keap1 o que leva à ativação do Nrf-2, e esse fator altera a taxa de transcrição de DNA à RNA no núcleo através de sua ligação à região promotora ARE do genes-alvo (TAKAYA et al., 2012; CARDOZO

et al., 2013). O ARE contém sequências específicas de DNA que respondem aos estímulos nutricionais ou ao estresse aumentando a produção de proteínas envolvidas na defesa antioxidante, no metabolismo xenobiótico e anti-inflamatório (CARDOZO et al., 2013;

ZHAN

G et

al.,

2018).

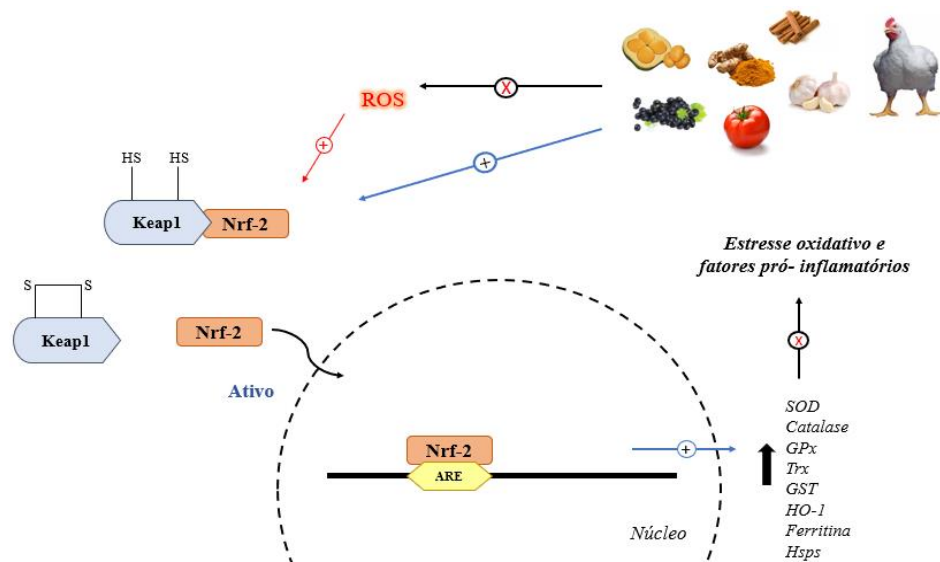


Figura 6– Aditivos fitogênicos como indutores da via de transcrição Nrf-2 em frangos de corte. Os compostos bioativos induzem a via Nrf-2 e protegem as células dos danos oxidativos pelas espécies reativas. Uma vez ativado, o Nrf-2 transloca-se para o núcleo e se liga ao elemento responsivo antioxidante (ARE) presente na região promotora de diversos genes, tais como: glutathione S-transferase (GST), heme oxigenase-1 (HO-1), glutathione peroxidase (GPx), catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), glucuronosiltransferase (UDP) e o sistema tiorredoxina (Trx). Isso resulta em uma maior taxa de transcrição, tradução e produção de proteínas envolvidas na resposta antioxidante, desintoxicante e anti-inflamatórias. Adaptado de Cardozo et al. 2013.

Nos estudos de Sahin et al. (2012), codornas submetidas a altas temperaturas (34°C 8h/dia) aumentaram NF-kB e Hsp70 e reduziram a expressão do Nrf-2 e HO-1 no fígado. Em resposta ao aumento do nível de curcumina na dieta (200 ou 400mg/kg), houve aumentos lineares na expressão do Nrf-2 e HO-1 e diminuições dos genes NF-kB e Hsp70. Os resultados sugerem que a suplementação com curcumina induziu a transcrição e produção de proteínas envolvidas no sistema antioxidante para neutralizar os danos oxidativos causado pelo estresse térmico. Corroborando com estes resultados,

na pesquisa de Sahin et al. (2006) os níveis de licopeno (200 ou 400 mg/kg) na dieta de frangos de corte suprimiu a expressão de Keap1 muscular (40%) e aumentou a expressão de Nrf-2 muscular (150%) em resposta ao estresse térmico (34°C 8h/ dia). Com base nas considerações acima, a alteração no padrão de expressão dos genes Hsp70 e Nrf-2 podem ser usadas como ferramenta analítica para compreender os mecanismos antioxidantes nas aves alimentadas com nutrientes ou compostos naturais de interesse zootécnico, e elucidar os efeitos diante de agentes estressores como as altas temperaturas.

7. Objetivo Geral

O objetivo deste estudo foi avaliar a adição do óleo de pequi na dieta de frangos de corte no desempenho, sistema antioxidante e qualidade de carne.

7.1 Objetivos específicos

- a) Avaliar o desempenho, peso de órgãos, rendimento de carcaça e cortes nobres de frangos de corte alimentados com níveis crescentes de óleo de pequi.
- b) Avaliar o efeito no perfil bioquímico sérico, perfil leucocitário e estabilidade oxidativa do plasma nos frangos de corte alimentados com os níveis de óleo de pequi.
- c) Avaliar a função hepática e estabilidade oxidativa da carne de peito de frangos de corte.
- d) Avaliar as enzimas antioxidantes e a modulação da expressão dos genes Nrf2 e Hsp 70 em frangos alimentados com os níveis de óleo de pequi e submetidos ao estresse por calor.
- e) Avaliar o potencial uso do óleo de pequi na nutrição de frangos de corte em substituição aos antibióticos.

Capítulo 2, intitulado “**Pequi Oil (*Caryocar brasiliense* camb.) Attenuates Adverse Effects of Cyclical Heat Stress and Modulates Oxidative Stress-Related Genes in Broiler Chickens**” foi redigido de acordo com as normas editoriais do periódico “*Poultry Science*” (ISSN 0032-5791; Impact fator: 2,659);

Capítulo 3, intitulado “**Growth Performance, Blood Indices, Antioxidant Status, Relative Organ Weights, Carcass Yield and Meat Quality in Broiler Chickens Fed Pequi Oil (*Caryocar brasiliense* camb.)**” foi redigido de acordo com as normas editoriais do periódico “*Animal Feed Science and Technology*” (ISSN 0377-8401; Impact Factor: 2,582);

8. Referências

ABPA – Associação Brasileira de Proteína Animal. **Relatório Animal 2021**. São Paulo/SP: ABPA, 2021. Disponível em: <https://abpa-br.org/wp-content/uploads/2021/04/ABPA_Relatorio_Anual_2021_web.pdf> Acesso em: 24 de maio de 2021.

AKBARIAN, A. *et al.* Gene expression of heat shock protein 70 and antioxidant enzymes, oxidative status, and meat oxidative stability of cyclically heat-challenged finishing broilers fed *Origanum compactum* and *Curcuma xanthorrhiza* essential oils. **Poultry Science**, Champaign, v. 93, p. 1930-1941, 2014. doi: [10.3382/ps.2014-03896](https://doi.org/10.3382/ps.2014-03896)

ALTAN, Ö. *et al.* Effect of heat stress on oxidative stress, lipid peroxidation and some stress parameters in broilers. **British Poultry Science**, London, v. 44, n. 4, p. 545-550, 2003. Doi: [10.1080/00071660310001618334](https://doi.org/10.1080/00071660310001618334)

ARAÚJO, F. D. A review of *Caryocar brasiliense* (Caryocaraceae) — Na economically valuable species of the central Brazilian cerrados. **Economic Botany**, Bronx, v.49, n.1, p. 40–48, 1995.

BAETA, Danielli dos Santos. **Avaliação de características físico-químicas e bioquímicas do pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) em suas diversas formas de armazenamento**. 2013. 123 f. Dissertação (mestrado em Biotecnologia) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Instituto de Química de Araraquara, São Paulo, 2013. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/88020>>.

BALOGUN, E. *et al.* Curcumin activates the haem oxygenase-1 gene via regulation of Nrf2 and the antioxidant-responsive element. **Biochemical Journal**, London, v. 371, n. 3, p. 887–895, 2003. Doi: [10.1042/BJ20021619](https://doi.org/10.1042/BJ20021619)

BARBOSA, M. L. *et al.* Oxidative stress, antioxidant defense and depressive disorders: A systematic review of biochemical and molecular markers. 2020. **Neurology, Psychiatry and Brain Research**, Chicago, v.36, n., p. 65–72, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.npbr.2020.02.006>

BARTKIENE, E. *et al.* Study of the antibiotic residues in poultry meat in some of the countries and selection of the best compositions of lactic acid bacteria and essential oils against *Salmonella enterica*, **Poultry Science**, Champaign, v. 99, n. 1, p. 4065–4076, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2020.05.002>

BATLLE-BAYER, L.; BATJES, N. H.; BINDRABAN, P. S. (2010). Changes in organic carbon stocks upon land use conversion in the Brazilian Cerrado: A review. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, Amsterdam, v.137, n.2, p. 47–58, 2010.<https://doi.org/10.1016/j.agee.2010.02.003>

BERMUDEZ, A.J. Principles of disease prevention: diagnosis and control. *In*: SAIF, Y.M. **Diseases of poultry**. ed. Ames, Ia, USA: Iowas State University Press, 2003. p. 3-60

BERNEBURG, M. *et al.* Singlet oxygen mediates the UVA-induced generation of the photoaging-associated mitochondrial common deletion. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 274, n. 22, p. 15345–15349, 1999.
Doi: [10.1074/jbc.274.22.15345](https://doi.org/10.1074/jbc.274.22.15345)

BÍCEGO, K. C.; SCARPELLINI, C. da S.; GARGAGLIONI, L.H. Termorregulação. *In*: MACARI, M.; MAIORKA, A. (org.). **Fisiologia de Aves Comerciais**. Jaboticabal: FUNEP, 2017. p. 423-456.

BOKARE, A.D.; CHOI, W. Review of iron-free Fenton-like systems for activating H₂O₂ in advanced oxidation processes, **Journal Hazardous Material**, v. 275, n. 1, p.121-135, 2014.<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2014.04.054>

BRITTON, G. Carotenoid research: History and new perspectives for chemistry in biological systems. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids**, Amsterdam, v. 1865, n.11, p. 1586-1599, 2020.<https://doi.org/10.1016/j.bbailip.2020.158699>

BRITTON, G.; KHACHIK, F. Carotenoids in Food. *In* BRITTON, G.; PFANDER, H.; LIAAEN-JENSEN, S. (eds.). 2009. **Carotenoids**. Amsterdam: Birkhäuser Basel, 2009. p 45–66.

CARDOSO, L. M. *et al.* Chemical characteristics and bioactive compounds of cooked pequi fruits (*Caryocar brasiliense* Camb) from the Brazilian Cerrado. **Fruits**, Cambridge, v.68, n. 1, p. 3–14, 2013. <https://doi.org/10.1051/fruits/2012047>

CARDOZO, L. F. M. F. *et al.* Nutritional strategies to modulate inflammation and oxidative stress pathways via activation of the master antioxidant switch Nrf2. **Biochimie**, Paris, v. 95, n. 1, p. 1525-1533, 2013.<http://dx.doi.org/10.1016/j.biochi.2013.04.012>

CHAN, H.W.S. *et al.* Oxidative reactions of unsaturated lipids. **Food Chemistry**, London, v.9, n.1, p. 21-34, 1982. [https://doi.org/10.1016/0308-8146\(82\)90066-8](https://doi.org/10.1016/0308-8146(82)90066-8)

CHOWDHURY, S.; MANDAL, G.P.; PATRA, A. K, Different essential oils in diets of chickens: 1. Growth performance, nutrient utilization, nitrogen excretion, carcass traits and chemical composition of meat animal. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 236, n.6, p. 86-97, 2018.
<https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2017.12.002>

COLOMBO, N. B. R. *et al.* Caryocar brasiliense camb protects against genomic and oxidative damage in urethane-induced lung carcinogenesis. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v.48, n.9, p. 852-862, 2015.
<http://dx.doi.org/10.1590/1414-431x20154467>

COMUNIAN, T.A. *et al.* Reducing carotenoid loss during storage by co encapsulation of pequi and buriti oils in oil-in-water emulsions followed by freeze-drying: Use of heated and unheated whey protein isolates as emulsifiers. **Food Research International**, Barking, v.130, n. 1, p., 1-9, 2020.
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108901>

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. 2020. Brasília -DF: CONAB, 2020. Disponível em: < <https://www.conab.gov.br/ultimas-noticias/3491-pgpm-bio-paga-r-10-9-milhoes-em-subvencoes-a-cerca-de-5-mil-extrativistas-no-primeiro-semester>>. Acesso em: 08 set. 2020.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. 2021. Brasília -DF: CONAB, 2021. Disponível em: < <https://www.conab.gov.br/info-agro/analises-do-mercado-agropecuario-e-extrativista/analises-do-mercado/oferta-e-demanda-de-carnes>>. Acesso em: 12 jun. 2021.

CONCEPCION, M. R. *et al.* A global perspective on carotenoids: Metabolism, biotechnology, and benefits for nutrition and health. **Progress in Lipid Research**, Oxford, v.70, n.1, p.62-93, 2018. Doi: [10.1016/j.plipres.2018.04.004](https://doi.org/10.1016/j.plipres.2018.04.004)

CUI, H.; KONG, Y.; ZHANG, H. 2012. Oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and aging. **Journal of Signal Transduct**, v. 2012, p. 6454-6463, 2012.
[Doi:10.1155/2012/646354](https://doi.org/10.1155/2012/646354)

DECKER, E. A.; PARK, Y. Healthier meat products as functional foods. **Meat Science**, Barking, v. 86, n. 1, p. 49–55, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2010.04.021>.

DEL R. D.; STEWART, A.J.; PELLEGRINI, N. A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. **Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases**, San Diego, v. 15, n.4, p. 316–28, 2005. [Doi: 10.1016/j.numecd.2005.05.003](https://doi.org/10.1016/j.numecd.2005.05.003).

DIARRA, M.S. *et al.* Distribution of antimicrobial resistance and virulence genes in enterococcus spp. and characterization of isolates from broiler chickens. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 76, n. 24, p. 8033-8043, 2010.
[Doi: 10.1128/AEM.01545-10](https://doi.org/10.1128/AEM.01545-10)

DONEGAN, D.N.; BRAGANZA, A.; SHIVA, S. Mitochondrial electron transport chain: Oxidative phosphorylation, oxidant production, and methods of measurement. **Redox Biology**, v.37, p., 1016-1074, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2020.101674>.

ENGBERG, R. M. *et al.* Effect of zinc bacitracin and salinomycin on intestinal microflora and performance of broilers. **Poultry Science**, Champaign, v.79, n.1, p.1311-1319, 2000. <https://doi.org/10.1093/ps/79.9.1311>

FAO. 2021. Food Outlook: Biannual Report on Global Food Markets. Rome. <https://doi.org/10.4060/cb4479en>

FARAG, M.R.; ALAGAWANY, M. Physiological alterations of poultry to the high environmental temperature, **Journal of Thermal Biology**, Oxford, v. 76, n. 1, p. 101-106, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2018.07.012>

FARGHLY, M.F.A.; ALAGAWANY, M.; ABD EL-HACK, M.E. Feeding time can alleviate negative effects of heat stress on performance, meat quality and health status of turkey. **British Poultry Science**, London, v. 59, n.2, p. 205-210. 2018.
Doi: [10.1080/00071668.2017.1413233](https://doi.org/10.1080/00071668.2017.1413233)

FARKHONDEH, T. *et al.* The therapeutic effect of resveratrol: Focusing on the Nrf2 signaling Pathway. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, Paris, v.127, n.1, p. 1102-11034, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110234>

FERREIRA, L. C.; JUNQUEIRA, R. G. Microbiological evaluation of pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) preserves made from a typical Brazilian fruit. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Oxford, v. 23, n.1, p. 1179–1181, 2007. <https://doi.org/10.1007/s11274-006-9335-x>

FORGETTA, V. *et al.* Pathogenic and multidrug-resistant *Escherichia fergusonii* from broiler chicken. **Poultry Science**, Champaign, v.91, n.2, p. 512-525, 2012.
Doi: [10.3382/ps.2011-01738](https://doi.org/10.3382/ps.2011-01738)

GALÁN-ARRIERO, I. *et al.* The role of Omega-3 and Omega-9 fatty acids for the treatment of neuropathic pain after neurotrauma. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v.1629, n.9, p.1629-1635, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2017.05.003>

GEOCZE, K. C. Análise explanatória de carotenoides, óleo essencial e triglicérides do pequi (*Caryocar brasiliense* Camb) de Municípios Brasileiros situados no Bioma Cerrado. 2011. Tese (Doutorado em Agroquímica). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2011.

GHASEMI, H.A.; KASANI, N.; TAHERPOUR, K. Effects of black cumin seed (*nigella sativa* L.), a probiotic, a prebiotic and a synbiotic on growth performance, immune response and blood characteristics of male broilers. **Livestock Science**, v.164, n. 1, p.128-134, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2014.03.014>

GHEISAR, M. M.; KIM, I.H. Phytobiotics in poultry and swine nutrition – a review. **Italian Journal of Animal Science**, Bologna, v.17, n.1, p. 92-99, 2018. Doi: 10.1080/1828051X.2017.1350120

GONZALEZ-RIVAS, P.A. *et al.* Effects of heat stress on animal physiology, metabolism, and meat quality: A review, **Meat Science**, Barking, v. 162, n.1, p. 108-125, 2020. https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2019.108025

HABIBU, B. *et al.* Haematological changes and plasma fluid dynamics in livestock during thermal stress, and response to mitigative measures. **Livestock Science**, v.14, n.1, p. 189-201, 2018. Doi: 10.1016/j.livsci.2018.05.023

HALLIWEL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 2eds. Oxford: Clarendon Press, 1989, p. 543.

HAMMOND, J. Physiological limits to intensive production on animals. **Br. Agric. Bull**, v. 4, p. 222–225, 1952.

HECK, B.T. *et al.* Hydrogelled emulsion from chia and linseed oils: a promising strategy to produce low-fat burgers with a healthier lipid profile. **Meat Science**, Barking, v.156, n.1, p.74-182, 2019. https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2019.05.034

HOSSEINI, S. M. *et al.* Effects of mannan oligosaccharide and Curcuma xanthorrhiza essential oil on the intestinal morphology and stress indicators of broilers subjected to cyclic heat stress. **Archives Animal Breeding**, v.59, n. 2, p. 285–291, 2016. doi:10.5194/aab-59-285-2016

HOSSEINI-VASHAN, S. J.; GOLIAN, A.; YAGHOBFAR, A. Growth, immune, antioxidant, and bone responses of heat stress exposed broilers fed diets supplemented with tomato pomace. **International Journal of Biometeorology**, Lisse, v. 60, n. 8, p. 1183-1192, 2015. doi:10.1007/s00484-015-1112-9.

HOU, L. *et al.* Selenium-enriched *Saccharomyces cerevisiae* improves the meat quality of broiler chickens via activation of the glutathione and thioredoxin systems. **Poultry Science**, Champaign, v., n., 2020. https://doi.org/10.1016/j.psj.2020.07.043

IBGE. Produção da Extração Vegetal e da Silvicultura - PEVS 2018. 2018. Rio de Janeiro: IBGE, 2018. Disponível em: <<https://www.ibge.gov.br/estatisticas-novoportal/economicas/agricultura-epecuaria/9105-producao-da-extracao-vegetal-e-dasilvicultura.html>>. Acesso em: 18 ago, 2020.

ISMAIL, I. B.; AL-BUSADAH, K. A.; EL-BAHR, S. M. Oxidative stress biomarkers and biochemical profile in broilers chicken fed zinc bacitracin and ascorbic acid under hot climate. **American Journal Biochemistry and Molecular Biology**, v. 3, n. 2, p. 202-214, 2013. Doi: 10.3923/ajbmb.2013.202.214

JIANG, S. *et al.* Effect of synbiotics on thyroid hormones, intestinal histomorphology, and heat shock protein 70 expression in broiler chickens reared under cyclic heat stress.

Poultry Science, Champaign, v. 99, n. 1, p.142–150, 2020.
<https://doi.org/10.3382/ps/pez571>

JO, C.; LEE, J.; AHN, D. Lipid oxidation, color changes and volatiles production in irradiated pork sausage with different fat content and packaging during storage. **Meat Science**, Barking, v. 51 n. 4, p.355-361, 1999. [doi: 10.1016/s0309-1740\(98\)00134-x](https://doi.org/10.1016/s0309-1740(98)00134-x)

JOMOVA, K.; VALKO, M. Health protective effects of carotenoids and their interactions with other biological antioxidants. **European Journal of Medicinal Chemistry**, Paris, v.70, n. 9, p.102-110, 2013. [Doi: 10.1016/j.ejmech.2013.09.054](https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2013.09.054)

KAULMANN, A.; BOHN, T. Carotenoids, inflammation, and oxidative stress—implications of cellular signaling pathways and relation to chronic disease prevention. **Nutrition Research**, Tarrytown, v. 34, n. 11, p. 907-929, 2014.
[doi: 10.1016/j.nutres.2014.07.010](https://doi.org/10.1016/j.nutres.2014.07.010)

KEELING, L. et al. Animal Welfare and the United Nations Sustainable Development Goals. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 6, n. 336, p. 1-12, 2019. [doi: 10.3389/fvets.2019.00336](https://doi.org/10.3389/fvets.2019.00336)

KEMPER, N. Veterinary antibiotics in the aquatic and terrestrial environment. **Ecological Indicators**, v. 8, n. 1, p.1–13, 2008. [doi:10.1016/j.ecolind.2007.06.002](https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2007.06.002)

KHAFAGA, A. F. M. E. *et al.* The potential modulatory role of herbal additives against Cd toxicity in human, animal and poultry: a review. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 26, n. 5, p. 4588–4604, 2019. [doi: 10.1007/s11356-018-4037-0](https://doi.org/10.1007/s11356-018-4037-0)

KHAN, R.U. *et al.* Potential applications of ginger (*Zingiber officinale*) in poultry diets. **World's Poultry Science Journal**, Ithaca, v. 68, 2, p. 183-190, 2012.
<https://doi.org/10.1017/S004393391200030X>

KIM, H.J.; VAZIRI, N.D. Contribution of impaired Nrf2/Keap1 pathway to oxidative stress and inflammation in chronic renal failure. **American Journal of Physiology: Renal Physiology**, Bethesda, v. 298, n. 3, p. 662-67, 2010.
[doi: 10.1152/ajprenal.00421.2009](https://doi.org/10.1152/ajprenal.00421.2009)

KIRUBAKARAN, A. *et al.* Influence of combinations of fenugreek, garlic, and black pepper powder on production traits of the broilers. **Veterinary World**, v.9, n. 5, p. 470-474, 2016. [doi: 10.14202/vetworld.2016.470-474](https://doi.org/10.14202/vetworld.2016.470-474)

KOUTSOS, E. *et al.* Maternal carotenoid status modified the incorporation of dietary carotenoids into immune tissue of growing chickens (*Gallus gallus domesticus*). **Journal of Nutrition**, Rockville, v.133, 1132– 1138, 2003. [doi: 10.1093/jn/133.4.1132](https://doi.org/10.1093/jn/133.4.1132)

KUSKOSKI, E. M. *et al.* Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante em pulpa de frutos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.25, n.4, p.726-732, 2005. <http://dx.doi.org/10.1590/S0101-20612005000400016>

LAMBERT A.J.; BRAND M.D. Reactive Oxygen Species Production by Mitochondria. *In*: Stuart J.A. (2 ed.). **Mitochondrial DNA: Methods in Molecular**. Humana Press, 2009.

LARA, L. J.; ROSTAGNO, M. H. Impact of heat stress on poultry production. **Animals**, v. 3, n. 2, p. 356–369, 2013. [doi: 10.3390/ani3020356](https://doi.org/10.3390/ani3020356)

LEÃO, D. P. *et al.* Physicochemical characterization, antioxidant capacity, total phenolic and proanthocyanidin content of flours prepared from pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) fruit by-products. **Food Chemistry**, London, v. 225, n.1, p. 146-153, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.01.027>

LIMA, A. *et al.* Composição química e compostos bioativos presentes na polpa e da amêndoa do pequi (*Caryocar brasiliense*, Camb.) **Revista Brasileira Fruticultura**, Jaboticabal, v. 29, n. 3, p. 695-698, 2007. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-29452007000300052>

LIN, H. *et al.* Strategies for preventing heat stress in poultry. **World's Poultry Science Journal**, Ithaca, v. 62, n. 1, p. 71–86, 2006. <https://doi.org/10.1079/WPS200585>

MACHADO, M.T.C.; MELLO, B.C.B.S.; HUBINGER, M.D. Study of alcoholic and aqueous extraction of pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) natural antioxidants and extracts concentration by nanofiltration. **Journal of Food Engineering**, Essex, v.117, n. 4, p.450–457, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2012.12.007>

MAHMODUL, M. D.; SOHEL, H. Macronutrient modulation of mRNA and microRNA function in animals: A review. **Animal Nutrition**, Mount Morris, v. 6, n. 3, p.258-268, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2020.06.002>

MAHMOUD, K. Z. *et al.* Ascorbic acid decreases heat shock protein 70 and plasma corticosterone response in broilers (*Gallus gallus domesticus*) subjected to cyclic heat stress. **Comparative Biochemistry and Physiology**, New York, v. 137, n. 1, p. 35-42, 2004. [doi:10.1016/j.cbpc.2003.09.013](https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2003.09.013)

MALACRIDA, C. R. *et al.* Effect of the application of an enzymatic pretreatment on bioactive compounds of *Caryocar brasiliense* Camb pulp oil. 2018. **Journal of Food Processing Preservation**, local, v. 42, n. 12, p. 1-6, 2018. <https://doi.org/10.1111/jfpp.13828>.

MCFARLANE, J. M.; CURTIS, S. E. Multiple concurrent stressors in chicks. 3. Effects on plasma corticosterone and the heterophil: lymphocyte ratio. **Poultry Science**, Champaign, v. 68, n. 4, p. 522-527, 1989. <https://doi.org/10.3382/ps.0680522>

MEHDI, Y. *et al.* Use of antibiotics in broiler production: Global impacts and Alternatives. **Animal Nutrition**, Mount Morris, v. 4, n. 1, p. 170-178, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2018.03.002>

MENZ, J.; OLSSON, O.; KÜMMERER, K. Antibiotic residues in livestock manure: Does the EU risk assessment sufficiently protect against microbial toxicity and selection of resistant bacteria in the environment?. **Journal of Hazardous Materials**, Amsterdam, v.379, n. 1, p. 1-9 2019. [doi:10.1016/j.jhazmat.2019.120807](https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2019.120807)

MERCENDANTE, A. Z. *et al.* Effect of natural pigments on the oxidative stability of sausages stored under refrigeration. **Meat Science**, Barking, v. 84, n.4, p. 718–726, 2010. [doi: 10.1016/j.meatsci.2009.10.031](https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2009.10.031)

MING, J. *et al.* Molecular cloning and expression of two HSP70 genes in the Wuchang bream (*Megalobrama amblycephala* Yih). **Fish & Shellfish Immunology**, v. 28, n. 3, p. 407–418, 2010. [doi: 10.1016/j.fsi.2009.11.018](https://doi.org/10.1016/j.fsi.2009.11.018)

MIRANDA-VILELA, A. L. *et al.* Oil rich in carotenoids instead of vitamins C and E as a better option to reduce doxorubicin-induced damage to normal cells of Ehrlich tumor-bearing mice: Hematological, toxicological and histopathological evaluations. **Journal of Nutritional Biochemistry**, Stoneham, v.25, n.1, p. 1161-1176, 2014. [doi: 10.1016/j.jnutbio.2014.06.005](https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2014.06.005)

MIRANDA-VILELA, A. L. *et al.* Characterization of the major nutritional components of Caryocar brasiliense fruit pulp by nmr spectroscopy. **Química Nova [online]**, vol.32, n.9, p.2310-2313, 2009. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422009000900013>

MIRANDA-VILELA, A. L.; RESCK, I. S.; GRISOLIA, C. K. Antigenotoxic activity and antioxidant properties of organic and aqueous extracts of pequi fruit (*Caryocar brasiliense* Camb.) pulp. **Genetics and Molecular Biology**, São Paulo, v. 31, n.4, p. 956-963, 2008. <http://dx.doi.org/10.1590/S1415-47572008000500025>

MOHAMED, E. *et al.* Herbs as thermoregulatory agents in poultry: An overview, **Science of the Total Environment**, Amsterdam v. 703, n.1, p. 1343-1399, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134399>

MONGIN, P. Recent advances in dietary cation-anion balance: applications in poultry. **Proceedings of the Nutrition Society**, London, v. 40, n. 3, p, 285-294, 1981. Doi: [10.1079/pns19810045](https://doi.org/10.1079/pns19810045)

MONTILLET, J. L. *et al.* The upstream oxylipin profile of *Arabidopsis thaliana*: a tool to scan for oxidative stresses. **The Plant Journal**, v.40, n.3, p. 439–451, 2004. Doi: [10.1111/j.1365-3113X.2004.02223.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-3113X.2004.02223.x)

MOSSER, D. D. *et al.* The chaperone function of hsp70 is required for protection against stress-induced apoptosis. **Molecular and Cellular Biology**, Washington, v. 20, n.19, p. 7146-7159, 2000. Doi: [10.1128/mcb.20.19.7146-7159.2000](https://doi.org/10.1128/mcb.20.19.7146-7159.2000)

MUJAHID, A. *et al.* Mitochondrial oxidative damage in chicken skeletal muscle induced by acute heat stress. **The Journal of Poultry Science**, v. 44, n. 4, p. 439–44, 2007. <https://doi.org/10.2141/jpsa.44.439>

MULLER, M. Nutrigenomics: understanding nutritional mechanisms and identification of biomarkers for organ vitality. **Annals of nutrition and metabolism**, Basel, v. 55, n. 1, p.4, 2009.

MUNEKATA, P.E.S. *et al.* Addition of plant extracts to meat and meat products to extend shelf-life and health-promoting attributes: an overview. **Current Opinion in Food Science**, v.31, n. 1, p. 81–87, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2020.03.003>

MUTCH, D. M.; WAHLI, W.; WILLIAMSON, G. Nutrigenomics and nutrigenetics the emerging faces of nutrition. **FASEB Journal**, Bethesda, v. 19, n. 12, p. 1602–1616, 2005. [doi: 10.1096/fj.05-3911rev](https://doi.org/10.1096/fj.05-3911rev).

OIE. Protecting animals, preserving our future. Disponível em: <
<https://www.oie.int/en/what-we-do/global-initiatives/antimicrobial-resistance/#:~:text=PVS%20Pathway,The%20OIE%20promotes%20the%20responsible%20and%20prudent%20use%20of%20antimicrobial,and%20guidelines%20in%20this%20field.>> Acesso em: 13 jun. 2021.

OLIVEIRA, M. N. S. *et al.* Estágio de maturação dos frutos e fatores relacionados aos aspectos nutritivos e de textura da polpa de pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v. 28, n. 3, p. 380-386, 2006. <https://doi.org/10.1590/S0100-29452006000300010>

OLIVEIRA, Washington Luis de. **Ecologia populacional e extrativismo de frutos de *Caryocar brasiliense* Camb. no Cerrado no Norte de Minas Gerais**. 2009. 82f. Dissertação (Mestrado em Ecologia). Universidade de Brasília. Brasília, DF. 2009

ORDOVAS, J.M.; CORELLA, D. Nutritional genomics. **Annual Review of Genomics and Human Genetics**, V. 5, n.1, p. 71–118, 2004. [doi: 10.1146/annurev.genom.5.061903.180008](https://doi.org/10.1146/annurev.genom.5.061903.180008)

PALOMER, X. *et al.* Palmitic and Oleic Acid: The Yin and Yang of Fatty Acids in Type 2 Diabetes Mellitus. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, New York, v. 29, n. 3, p. 178-190, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2017.11.009>

PANDYA, C.; HOWELL, K.; PILLAI, A. Antioxidants as potential therapeutics for neuropsychiatric disorders. **Progress in Neuro-psychopharmacology & Biological Psychiatry**, Oxford, v. 46, n.1, p. 214–223, 2013. [doi: 10.1016/j.pnpbp.2012.10.017](https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2012.10.017)

PENG, Q.Y. *et al.* Effects of dietary supplementation with oregano essential oil on growth performance, carcass traits and jejunal morphology in broiler chickens. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 214, n. 1, p.148-153, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2016.02.010>

PEREIRA, R.; MENTEN, J.F. M.; COUTINHO, L. L. Nutrigenômica. *In*: MACARI, M.; MAIORKA, A. (org.). **Fisiologia de Aves Comerciais**. Jaboticabal: FUNEP, 2017. p. 792-799.

PETRUK, G. *et al.* Antioxidants from plants protect against skin photoaging. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2018, n.1, p. 1-11 2018.

Doi: [10.1155/2018/1454936](https://doi.org/10.1155/2018/1454936)

PINTO, M. R. M. R. *et al.* Encapsulation of carotenoid extracts from pequi (*Caryocar brasiliense* Camb) by emulsification (O/W) and foam-mat drying. **Powder Technology**, local, v. 339, n. 1, p. 939–946, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2018.08.076>

POST, J.; REBEL, J.M.; TER-HUURNE, A. A. H. M. Physiological effects of elevated plasma corticosterone concentrations in broiler chickens. An alternative means by which to assess the physiological effects of stress. **Poultry Science**, Champaign, v. 82, n. 8, p.1313–1318, 2003. doi: [10.1093/ps/82.8.1313](https://doi.org/10.1093/ps/82.8.1313)

POZZO, L. *et al.* Adverse effects in broiler chickens fed a high lycopene concentration supplemented diet. **Canadian Journal of Animal Science**, Ottawa, v. 93, n. 2, p. 231–24, 2013. <https://doi.org/10.4141/cjas2012-081>

PUVADOLPIROD, S.; THAXTON, J.P. Model of physiological stress in chickens: 1. Response parameters. **Poultry Science**, Champaign, v. 79, n. 3, p. 363–369, 2000. <https://doi.org/10.1093/ps/79.3.363>

RAJDEV, S.; SHARP, F.R. Stress proteins as molecular markers of neurotoxicity. **Toxicologic Pathology**, Jena, v. 28, n.1, p. 105–112, 2000. doi: [10.1177/019262330002800113](https://doi.org/10.1177/019262330002800113)

RAJKUMAR, U. *et al.* Effect of Supplemental Trace Minerals on Hsp-70 mRNA Expression in Commercial Broiler Chicken. **Animal Biotechnology**, New York, v. 29, n. 1, p. 20-25, 2018. doi: [10.1080/10495398.2017.1287712](https://doi.org/10.1080/10495398.2017.1287712)

RAMOS, M. I. L. *et al.* Efeito do cozimento convencional sobre os carotenóides pró-vitamínicos ‘A’ da polpa do piqui (*Caryocar brasiliense* Camb). **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos (CEPPA)**, v. 19, n. 1, p. 23-32, 2001.

REIS, J.H. *et al.* Effects of phytogetic feed additive based on thymol, carvacrol and cinnamic aldehyde on body weight, blood parameters and environmental bacteria in broilers chickens, **Microbial Pathogenesis**, London, v.125, n. 1, p. 168-176,2018. doi: [10.1016/j.micpath.2018.09.015](https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.09.015).

RIBEIRO, D. *et al.* Antioxidant and pro-oxidant activities of carotenoids and their oxidation products, **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v.120, n., p.681-699, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.07.060>

RIBEIRO, R.F. **Pequi: o rei do cerrado**. Belo Horizonte: Rede Cerrado, 2000.62 p.

- ROCHA, C.; MAIORKA, A. Lipídeos: digestão e Absorção. *In*: MACARI, M.; MAIORKA, A. (org.). **Fisiologia das Aves comerciais**. Jaboticabal: FUNEP, 2017. p. 254-271.
- ROESLER, R.; LORENCINI, M.; PASTORE, G. Brazilian cerrado antioxidant sources: cytotoxicity and phototoxicity in vitro. **Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas v. 30, n. 3, p. 814-821, 2010. <http://dx.doi.org/10.1590/S0101-20612010000300038>
- RONQUILLO, M. G.; HERNANDEZ, J. C. A. Antibiotic and synthetic growth promoters in animal diets: Review of impact and analytical methods. **Food Control**, Guildford, v. 72, n. 1, p. 255-267, 2017. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.03.001>
- SAHIN, K. *et al.* Lycopene activates antioxidant enzymes and nuclear transcription factor systems in heat stressed broilers. **Poultry Science**, Champaign, v. 95, n. 5, p.1088–1095, 2016. [doi: 10.3382/ps/pew012](https://doi.org/10.3382/ps/pew012)
- SAHIN, K. *et al.* Curcumin ameloriates heat stress via inhibition of oxidative stress and modulation of Nrf2/HO-1 pathway in quail. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v.50, n. 11, p.4035–4041, 2012. [doi: 10.1016/j.fct.2012.08.029](https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.08.029)
- SAHIN, K. *et al.* Role of dietary zinc in heat stressed poultry: a review. **Poultry Science**, Champaign, v. 88, n.10, p. 2176–2183, 2009. [doi: 10.3382/ps.2008-00560](https://doi.org/10.3382/ps.2008-00560)
- SAHIN, K. *et al.* Effects of lycopene supplementation of antioxidant status, oxidative stress, and performance and carcass characteristics in heat-stressed Japanese quail. **Journal of Thermal Biology**, Oxford, v. 31, n. 4. P. 307–312, 2006. [doi:10.1016/j.jtherbio.2005.12.006](https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2005.12.006)
- SEVCIKOVA, S.; SRIVAN, M.; DLOUHÁ, G. The effect of lycopene supplementation on lipid profile and meat quality of broiler chickens. **Czech Journal of Animal Science**, v. 53, n. 10, p. 431–440, 2008. <https://doi.org/10.17221/350-CJAS>
- SHADEL, G.S.; HORVATH, T. L. Mitochondrial ROS signaling in organismal homeostasis, **Cell**, v. 163, n.3, p. 560–569, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.10.001>
- SILVA, M.A.P.; MEDEIROS FILHO, S. Morfologia de frutos, sementes e plântulas de Piqui (*Caryocar brasiliense* Wittm). **Revista ciência Agronomica**, Ceará, v. 37, n. 3, p. 320-325, 2006.
- SIMÕES, M. O. M. Avaliação das características organolépticas e microbiológicas de diversos tipos de conserva da polpa de pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) e de diferentes formas de congelamento dos putâmens. Montes Claros, 2004. (Relatório de projeto de pesquisa apresentado a Fundação de Amparo a Pesquisa de Minas Gerais – FAPEMIG)
- SINGH, S. *et al.* Nrf2-ARE stress response mechanism: a control point in oxidative stress-mediated dysfunctions and chronic inflammatory diseases. **Free Radical**

Research, London, v. 44, n. 11, p. 1267-1288, 2010.
DOI: [10.3109/10715762.2010.507670](https://doi.org/10.3109/10715762.2010.507670)

SKIEPKO, N. *et al.* Fatty acid profile, total cholesterol, vitamin content, and TBARS value of turkey breast muscle cured with the addition of lycopene. **Poultry Science**, Champaign, v. 95, n. 5, p. 1182–1190, 2016. <http://dx.doi.org/10.3382/ps/pew005>

SOUZA, A. G. O. *et al.* Nutritional quality and protein value of exotic almonds and nut from the Brazilian Savanna compared to peanut. **Food Research International**, Barking, v.44, n. 7, p. 2319-2325, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.02.013>

STAHL, W.; SIES, H. Antioxidant activity of carotenoids. **Molecular Aspects of Medicine**, Elmsford v. 24, n. 6, p. 345–35, 2003. Doi: [10.1016/s0098-2997\(03\)00030-x](https://doi.org/10.1016/s0098-2997(03)00030-x)

SUN, T.Y. *et al.* Carotenoid Metabolism in Plants: The Role of Plastids. **Molecular Plant**, Oxford, v. 11, n.1, p. 58-74, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2017.09.010>

SURAI, A.P. *et al.* Effect of canthaxanthin content of maternal diet on the antioxidant system of the developing chick. **British Poultry Science**, Londres, v,44, n.1, p.612-619, 2003. doi: [10.1080/00071660310001616200](https://doi.org/10.1080/00071660310001616200)

SUZUKI, T.; YAMAMOTO, M. Molecular basis of the Keap1–Nrf2 system. **Free Radical Biology and medicine**, New York, v. 88, p. 93–100, 2015. doi: [10.1016/j.freeradbiomed.2015.06.006](https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.06.006)

TAKAYA, K. *et al.* Validation of the multiple sensor mechanism of the Keap1e Nrf2 system. **Free Radical Biology and medicine**, New York, v. 53, n. 4, p. 817-827, 2012. doi: [10.1016/j.freeradbiomed.2012.06.023](https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2012.06.023)

TAN, G.Y. *et al.* Effects of different acute high ambient temperatures on function of hepatic mitochondrial respiration, antioxidative enzymes, and oxidative injury in broiler chickens. **Poultry Science**, Champaign, v. 89, n.1, p. 115- 122, 2010. <https://doi.org/10.3382/ps.2009-00318>

TANG, J.; WANG, J. Metal organic framework with coordinatively unsaturated sites as efficient Fenton-like catalyst for enhanced degradation of sulfamethazine. **Environmental Science & Technology**, Easton, v. 52, n. 9, p. 5367-5377, 2018. doi: [10.1021/acs.est.8b00092](https://doi.org/10.1021/acs.est.8b00092)

THOMAS, M. J. The role of free radicals and antioxidants. **Nutrition**, Pleasantville, v.16, n.7-8, p. 716–718, 2000. doi: [10.1016/s0899-9007\(00\)00343-9](https://doi.org/10.1016/s0899-9007(00)00343-9)

TOGHYANI, M. *et al.* Evaluation of cinnamon and garlic as antibiotic growth promoter substitutions on performance, immune responses, serum biochemical and haematological parameters in broiler chicks. **Livestock Science**, v.138, n. 3, p.167-173, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2010.12.018>

TONGA, C. *et al.* Selenium-rich yeast attenuates ochratoxin A-induced small intestinal injury in broiler chickens by activating the Nrf2 pathway and inhibiting NF-KB

activation. **Journal of Functional Foods**, local, v. 66, n. 1, p.1037-1084, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2020.103784>

TORRES, L. R.O. *et al.* Physicochemical and antioxidant properties of the pequi (Caryocar brasiliense Camb.) almond oil obtained by handmade and cold-pressed processes. **International Food Research Journal**, v.23, n.4, p. 1541-1551, 2016.

TRAESEL, G. K. *et al.* Evaluation of embryotoxic and teratogenic effects of the oil extracted from Caryocar brasiliense Cambess pulp in rats. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 110, n.1, p. 74 – 82, 2017. doi: [10.1016/j.fct.2017.10.018](https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.10.018)

UNITED NATIONS. World population prospects: the 2017 revision in: department of economic and social affairs, P.D. 2017.

VALE, A. F. *et al.* Antioxidant effect of the pequi oil (Caryocar brasiliense) on the hepatic tissue of rats trained by exhaustive swimming exercises. **Brazilian Journal of Biology**, São Carlos, v. 79, n. 2, p. 257-262 2018. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.180015>

VISSEREN-HAMAKERS, I.J. The 18th Sustainable Development Goal. **Earth System Governance**, v. 3, p. 1-5. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.esg.2020.100047>

WANG, J.; WANG, S. Reactive species in advanced oxidation processes: Formation, identification and reaction A, **Chemical Engineering Journal**, Lausanne, v. 401, n.1, p.1258-1261, 2020. doi: <https://doi.org/10.1016/j.cej.2020.126158>

WANG, L. *et al.* Effects of forsythia suspensa extract on growth performance, nutrient digestibility, and antioxidant activities in broiler chickens under high ambient temperature. **Poultry Science**, Champaign, v. 87, n. 7, p.1287–1294, 2008. doi: [10.3382/ps.2008-00023](https://doi.org/10.3382/ps.2008-00023)

WARRAICH, U. A.; HUSSAIN,F.; KAYANI, A. U. R. Aging - Oxidative stress, antioxidants and computational modeling.2020. **Heliyon**, v. 6, n. 5, p. 1-11, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e04107>.

WENK, C. Herbs and botanicals as feed additives in monogastric animals. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v.16, n. 2, p. 282-289, 2003. Doi: <https://doi.org/10.5713/ajas.2003.282>

WINDISCH, W. *et al.* Use of phytogetic products as feed additives for swine and poultry. **Journal Animal Science**, v. 86, n. 14, p.140–148, 2008. doi: [10.2527/jas.2007-0459](https://doi.org/10.2527/jas.2007-0459)

YAHAV, S.; RATH, R.S.; SHINDER, D. The effect of thermal manipulations during embryogenesis of broiler chicks (*Gallus domesticus*) on hatchability, body weight and thermoregulation after hatch. **Journal of Thermal Biology**, Oxford, v. 29, n 4-5, p. 245-250, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2004.03.002>

YALCINKAYA, T. *et al.* Lipid peroxidation-derived reactive carbonyl species (RCS): Their interaction with ROS and cellular redox during environmental stresses. **Environmental and Experimental Botany**, Elmsford, v. 165, n. 1, p. 139-149, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2019.06.004>

ZHANG, C. *et al.* Resveratrol beneficially affects meat quality of heat_stressed broilers which is associated with changes in muscle antioxidant status, **Animal Science Journal**, Tokyo, v.88, n.10, p.1569-1574, 2017.<https://doi.org/10.1111/asj.12812>

ZHANG, J. *et al.* Effect of black pepper essential oil on the quality of fresh pork during storage. **Meat Science**, Barking, v. 117, n. 1, p. 130-136, 2016. Doi: [10.1016/j.meatsci.2016.03.002](https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2016.03.002)

ZHANG, J. *et al.* Effect of various levels of dietary curcumin on meat quality and antioxidant profile of breast muscle in broilers. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v.63, n.15, p. 3880–3886, 2015. Doi: <https://doi.org/10.1021/jf505889b>.

ZHANG, J. F. *et al.* Curcumin attenuates heat-stress-induced oxidant damage by simultaneous activation of GSH-related antioxidant enzymes and Nrf2-mediated phase II detoxifying enzyme systems in broiler chickens. **Poultry Science**, Champaign, v. 97, n. 4, p.1209–1219, 2018. <http://dx.doi.org/10.3382/ps/pex408>

ZHANG, S. *et al.* Reactive oxygen species and their applications toward enhanced lipid accumulation in oleaginous microorganisms. **Bioresource Technology**, Essex, v, 307, p.123-234, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123234>

ZHAO, R. Z. *et al.* Mitochondrial electron transport chain, ROS generation and uncoupling (Review). **Internacional Jornal of Molecular Medicine**, v. 44, n.1, p. 3–13, 2019. doi: [10.3892/ijmm.2019.4188](https://doi.org/10.3892/ijmm.2019.4188)

ZULKIFLI A. A. *et al.* Crating and heat stress influence blood parameters and heat shock protein 70 expression in broiler chickens showing short or long tonic immobility reactions. **Poultry Science**, Champaign, v. 88, n. 3, p. 471-476, 2009. doi: [10.3382/ps.2008-00287](https://doi.org/10.3382/ps.2008-00287)

Capítulo 2

Pequi Oil (*Caryocar brasiliense* camb.) Attenuates Adverse Effects of Cyclical Heat Stress and Modulates Oxidative Stress-Related Genes in Broiler Chickens

ABSTRACT

The present study was conducted to determine the possible antioxidant protection of pequi oil (PO) against cyclic heat stress in broiler chickens, and highlight the application of PO as a promising additive in broiler feed. A total of 400 one-day-old male broiler chicks (Cobb 500) were randomly assigned in 2×5 factorially arranged treatments: two temperature-controlled rooms (thermoneutral -TN or heat stress - HS for 8 h/day) and five dietary PO levels (0, 1.5, 3.0, 4.5, or 6.0 g/kg diet) for 42 days. Each treatment consisted of eight replicates of five birds. The results showed that HS increased glucose (P=0.006), triglycerides (P<0.001), and HDL (P=0.042) at 21 days and reduced (P=0.005) serum total cholesterol at 42 days. The results also showed that HS increased the content of alanine aminotransferase (AST) and aspartate aminotransferase (ALT). In contrast, PO linearly decreased AST (P=0.048) and ALT (P=0.020) at 21 and 42 days, respectively. The heterophil-to-lymphocyte ratio in the birds under HS was higher than in those in the TN environment (P=0.046). Heat stress decreased (P=0.032) the relative weight of liver at 21 days. Superoxide dismutase activity increased (P=0.010) in the HS treatments compared with the TN, while glutathione peroxidase activity in the liver decreased (P<0.001) at 42 days, however, the activity of catalase had no significant effects. Meanwhile, increasing dietary PO levels linearly decreased plasma malondialdehyde (P<0.001) in birds in the HS environment. In addition, PO reduced by 92% (P=0.027) the expression of Hsp 70 in the liver when compared to the TN treatment without PO, mainly at the 6.0 g/kg diet level. The

expression of Nrf2 was up-regulated by 58.5% ($P=0.049$) in response to PO at 6.0 g/kg diet compared to the HS treatment without PO. In conclusion, PO supplementation alleviates adverse effects of HS on broilers due to its antioxidant action and as it modulates genes related to oxidative stress, providing insights into its application as a potential phyto-genic feed additive in broiler production.

Keywords: antioxidant, carotenoids, oxidative damage, shock protein

INTRODUCTION

Heat stress (HS) in poultry farming is a worldwide issue, particularly in tropical and subtropical areas (Lara and Rostagno, 2013; Wang et al., 2020). In addition, the high efficiency in meat production due to genetic advancements makes broiler chickens have a rapid metabolic rate and, consequently, high heat production, which makes them susceptible to HS (Lin et al., 2006). Under such conditions, the balance between the generation and elimination of reactive oxygen species (ROS) may be compromised, leading to depletion of antioxidant defenses and, in turn, inducing cellular oxidative stress (Galicia-Moreno and Gutierrez-Reyes, 2014; Miao et al., 2020).

Animal cells have developed a sophisticated defense system able to neutralize ROS (Jaeschke et al., 2012; Zhang et al., 2018) featuring antioxidant enzymes (e.g. catalase, dismutase superoxide, and glutathione peroxidase), non-enzymatic antioxidants (e.g., vitamins, minerals, carotenoids, glutathione), and modulation of the expression of cytoprotective genes such as thermal shock proteins (Hsp 70) and the nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2). However, such system is effective up

to a certain stage, especially in face of chronic exposure to heat, which is often the case in poultry farming and leads to large economical losses as it depletes antioxidant defenses and, consequently, compromises animal productivity (Luo et al., 2017). In those situations, a greater supply of antioxidants to recover the equilibrium of the redox system and prevent oxidative damage becomes essential in the productive system. That makes the use of natural products in broiler nutrition a possible strategy to mitigate HS, besides regulating the expression of important genes to the redox system and increasing cellular defense capability (Mahmoud et al., 2004; Zhang et al., 2018; Miao et al., 2020).

Pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) is an oily fruit native to the Brazilian cerrado biome and is considered one of the species of greatest socioeconomic relevance in the region (Roesler et al., 2010). Pequi trees tolerate long periods of direct insolation, are resistant to moisture, drought, and heat, and can adapt to a variety of soils (Lima et al., 2007). Its fruits (pequi) contain one or more seeds covered by fleshy and aromatic pulp of slightly sweet taste (Malacrida et al., 2018). The oil extracted from the pulp (yellow/orange color) is rich in unsaturated fatty acids (e.g., oleic acid; ω 9) and carotenoids such as β -carotene, lycopene, and lutein (Lima et al., 2007, Miranda-Vilela et al., 2009; Malacrida et al., 2018). Antioxidant, anti-inflammatory, cytoprotective, and antitumoral properties of pequi oil (PO) have been reported in animal models and/or *in vitro* studies (Roesler et al., 2010; Miranda-Vilela et al., 2014). Among those, antioxidant properties have been particularly appealing since PO has high carotenoid content.

Carotenoids are natural pigment molecules that are also able to inactivate electronically excited molecules involved in the generation of radicals (singlet oxygen)

and in the regeneration of biomolecules damaged by oxidative lesion (Ribeiro et al., 2018). Miranda-Vilela et al. (2014) showed that PO was able to reduce the effects of oxidative stress induced by chemotherapy drugs in liver cells of mice with Ehrlich tumor, an effect even greater than experimental models of vitamins C and E. Likewise, Vale et al. (2018) reported that oral administration of PO to Wistar rats alleviated oxidative stress induced by exhaustive physical exercise, maintaining levels of non-enzymatic antioxidants and inhibiting lipid peroxidation, characterized by lower a concentration of malondialdehyde (MDA). However, up to date, the effects of dietary supplementation with PO have not been investigated in broiler chickens or other domestic animal species.

Therefore, the current study was conducted to investigate the effects of graded levels of PO supplementation on plasma biochemical indices, relative organ weights, antioxidant status, and gene expression of Hsp 70 and Nrf2 in broiler chickens subjected to cyclic heat stress. The results of this research could provide guidance and reference for further application of PO as a promising phytogetic feed additive in broiler feed.

MATERIALS AND METHODS

All experimental procedures were approved by the Animal Ethics Committee of the Veterinary and Animal Science College, São Paulo State University, Botucatu, SP, Brazil (protocol 0192/2018 – CEUA).

Pequi Oil (Caryocar brasiliense camb.)

C. brasiliense fruits were collected during the harvesting period in January 2019. The oil was extracted from the pulp in a manual process employing hot water and was

purchased from Grande Sertão Cooperative (Montes Claros, MG, Brazil). Pequi oil composition is shown in **Table 1**.

Chicks, Housing and management

A total of 400 one-day-old commercial male broiler chicks (Cobb 500) with average initial body weight of 47.5 ± 1.27 g were obtained from a local commercial hatchery (Pluma, Descalvado, SP, Brazil). The broilers were vaccinated at hatch for Marek's disease, infectious bronchitis, and Gumboro disease. On day 1, broiler chicks were assigned in a fully randomized design with a 2×5 factorial arrangement to treatments with two temperature-controlled rooms (thermoneutral room - TN; heat stress room - HS) and five dietary pequi oil (PO) levels with eight replicates of five birds each. The experimental period lasted for 42 days (October to December 2019).

In each of the temperature-controlled rooms, the birds were housed in 40 battery cages (eight cages/treatment) with wire floors ($0.4 \times 0.5 \times 0.6$ m, height \times length \times width) for an initial density of 4 m^2 per chick. Water was supplied in nipple drinkers and trough feeders made of galvanized steel were placed in front of the cages. The experimental diets (in mash form) and fresh water were provided *ad libitum*. The lighting program was applied according to the management guides and recommendations of the company (Cobb 500 Management Guide, 2018).

Experimental Diets and Heat challenge

The experimental diets were prepared by including levels of PO into the basal diet. The five dietary treatments were as follows: control diet (CON; basal diet without PO), CON + 1.5 g PO/kg diet; CON + 3.0 g PO/kg diet; CON + 4.5 g PO/kg diet, and CON + 6.0 g PO/kg diet. The PO was first mixed intensively with the associated soybean oil

and then gradually added to the diet. The basal diet was formulated to correspond to nutrient requirements that were equal to or slightly lower than those recommended by Rostagno et al. (2017) for broilers and the feeding program consisted of pre-starter (days 1 to 7), starter (days 8 to 21), grower (days 22 to 35), and finisher (days 36 to 42) (**Table 2** and **Table 3**). The formulation of the diets considered the apparent metabolizable energy (AME) of PO (7,370 kcal/kg) in natural matter based on data from a previous study.

The birds were reared in temperature-controlled rooms with independent temperature control. During the experimental period (from 1 to 42 days of age), all broiler chickens in the thermoneutral room (TN) were reared under temperature conditions recommended by the Cobb Broiler Management Guide, but adapted to the Brazilian context. The broilers from the remaining groups were kept in another room and exposed daily to 8 h (8:00 a.m. to 4:00 p.m.) of cyclical heat stress (HS), after which the temperature was lowered to the same level as that of the TN group for the remaining 16 h over the 42 days of the experiment. Each room was equipped with portable automatically controlled electric heaters (1,500 W) provided with a fan for circulation of hot air. Temperature and relative humidity were recorded daily and average temperature and relative humidity were calculated. The temperature scheme is shown in **Table 4**.

Blood Parameters and Determination of Serum MDA

At 21 and 42 days of age, blood samples were collected from broiler chicks (n=8 birds per treatment) in clean sterile tubes and left to coagulate before being centrifuged at 3,500 rpm for 15 min to separate the serum. Serum samples were stored in Eppendorf tubes at -20 °C until analysis. The following parameters were determined

spectrophotometrically in serum using commercial reagent kits (LaborLab, Guarulhos, SP, Brazil) via a semi-automated biochemical analyzer (BIO-200S, *Bioplus Produtos para Laboratórios* Ltda, Barueri, SP, Brazil): glucose (mg/dL; no. K133), total cholesterol - CHO (mg/dL; no. K083), triglycerides - TG (mg/dL; no. K117), high-density lipoprotein - HDL (mg/dL; no. K071), aspartate aminotransferase - AST (U/L; no. K048), and alanine aminotransferase - ALT (U/L; no. K049).

On day 42, one bird per cage (n=8 birds per treatment) was sampled at random. Blood samples were taken with a 23-gauge needle from the jugular vein and collected in two tubes. The first tube, containing EDTA, was centrifuged (3,500 rpm, 15 min) to obtain plasma for determination of leukocyte profile. The second tube, containing heparin, was used to obtain serum malondialdehyde (MDA) concentrations and was centrifuged at 3,500 rpm for 15 min at 4 °C before being stored at -80 °C until further analysis. For leukocyte population, blood samples were stained according to Lucas and Jamroz (1961); subsequently, 100 leukocytes per sample were counted using an optical microscope (BX51; Olympus, Tokyo). The heterophil-to-lymphocyte ratio (H/L) for each bird was also calculated. Serum MDA concentration was determined using the TBA (thiobarbituric acid) method with absorbance at 532 nm, according to Buege and Aust (1978). The results were expressed as nanomole per liter (nmol/L) and each sample was analyzed in duplicate.

Organ weight

At 21 and 42 days, one bird per cage (n=8 per treatment) was euthanized by cervical dislocation and the whole spleen, bursa of Fabricius, thymus, pancreas, and liver were immediately removed and weighed. The relative weights of those organs were expressed as percentages of the live weight of birds.

Measuring Activities of Antioxidant Enzymes in the Liver

On day 42, the broilers were slaughtered by cervical dislocation and liver samples were collected (n=8 samples per treatment), immediately immersed in liquid nitrogen, and stored at -80 °C until determination of activity of antioxidant enzymes (SOD, CAT, and GSH-Px). For the activities of SOD (superoxide dismutase; EC 1.15.1.1), CAT (catalase; EC 1.11.1.6), and GSH-Px (glutathione peroxidase; EC 1.11.1.9), 1 g of liver sample was homogenized in 5 mL of 0.05 M phosphate buffer (pH=7.0). The homogenate was centrifuged at 5,000 rpm for 20 min at 4 °C. The supernatant was used for enzyme activity and protein content analyses. The activities of SOD, CAT, and GSH-Px were determined as previously described by Vicente et al. (2019). Absorbance was read in a spectrophotometer at 560 nm, 610 nm, and 420 nm, respectively. For all antioxidant enzyme assays, total protein concentration was determined using the method by Bradford (1976) with Coomassie Brilliant Blue G-250 dye using bovine serum albumin as a standard.

RNA Extraction and Quantitative Real-Time PCR Analysis

RNA was extracted from a 50 mg liver sample from four birds per treatment (Zhao et al., 2013). Extraction was performed using the Trizol method with 500 µL of TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, California, USA) for each sample to disrupt cells and release their contents. The extraction product was visualized on 1% agarose gel and quantified using a NanoDrop 1000 spectrophotometer (ThermoFisher Scientific, USA). Next, all samples were stored at -80°C until ready to use. Samples were then treated with DNase, and cDNA synthesis reaction was set as follows: a mix of 0.75 mM oligo(dT) solution (n=18); 0.15 mM random oligonucleotides (n=8); 0.75 mM dNTP, and 11 µL RNA treated with DNase in the previous step was prepared and incubated at 65 °C for 5 min

and then placed on ice for 1 min. To this preparation, 0.5 mM DTT, 40 U RNaseOUT, and 100 U of SuperScript III were added. The reaction was then incubated at 50 °C for 1 h and then at 70 °C for 15 min.

After that, real-time PCR analysis (RT-PCR) was performed using an Applied Biosystems StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) and a SYBR Green PCR Master Mix kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The primer sequences for the target and reference genes are listed in Table 5. The PCR cycle parameters were as follows: one cycle at 50 °C for 2 min, one cycle at 94 °C for 10 min, and 40 cycles of 94 °C for 15 s and 60 °C for 1 min. The dissociation curve was obtained as follows: 95 °C for 15 s, 60 °C for 30 s, and 95 °C for 15 s. To calculate the efficiency for the oligonucleotides used, four dilutions of cDNA samples were made at 1:5, 1:25, 1:125, and 1:625. Efficiency (E) was calculated using the formula $E=10^{-1/\text{slope}}$. The relative levels of mRNA expression were calculated using the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method (Pfaffl, 2001), which normalized to the reference mRNA level of β -actin. Each sample was analyzed in triplicate.

Statistical Analysis

Data were analyzed as a completely randomized design by the Proc. Mixed procedure of the software SAS (version 9.2, SAS Institute Inc. Cary, NC, USA). The model used was $y_{ij}=\mu + T_i + PO_j + (T*PO)_{ij} + e_{ij}$, where y =response variable, μ =population mean, T_i =main effect of temperature, PO_j =main effect of dietary pequi oil level, $T*PO$ =interaction effect of temperature by dietary pequi oil levels, and e_{ij} =residual error. Orthogonal polynomial contrasts were also applied to determine the linear and quadratic responses to different levels of PO supplementation. Significant

differences among the treatment means were compared using Tukey's test. The data of relative expression of each target gene, i.e., Hsp 70 and Nrf2, in the HS treatments were compared to the treatment with no PO under thermoneutral ambient conditions (TN; control). Significant differences among the treatment means were compared using Kruskal-Wallis test. Statistical significance was considered at $P < 0.05$. Results were presented as means with their pooled standard errors.

RESULTS

Blood Parameters

No effect of the interaction of dietary PO levels with environmental temperature was found on serum biochemical parameters (**Table 6**). On day 21, heat stress (HS) significantly increased serum glucose ($P=0.006$), TG ($P<0.001$), and HDL ($P=0.042$) concentrations compared with the birds housed in the thermoneutral (TN) condition. Additionally, variations in serum CHO in response to dietary PO levels were independent of environmental temperature ($P=0.003$). On day 42, the HS condition significantly reduced ($P=0.005$) serum CHO and did not change plasma glucose, TG, or HDL concentrations. Furthermore, birds challenged by HS had increased serum enzyme activity of ALT at day 21 ($P=0.020$) and increased activities of AST ($P=0.012$) and ALT ($P=0.015$) at day 42 compared to the TN condition. Supplementation with PO linearly reduced the serum enzyme activities of AST (linear: $P=0.048$) and ALT (linear: $P=0.020$) at days 21 and 42, respectively

Data on leukocyte subsets are shown in **Table 7**. On day 42, no differences were observed in blood leukocyte profile among all experimental treatments, except for

basophil counts in response to dietary PO levels ($P=0.022$). However, increases in H/L in response to environmental temperature were independent of dietary PO level ($P=0.046$).

Relative Organ Weight

Table 8 summarizes relative organ weights of birds subjected to different environmental temperatures and fed diets containing different PO levels. Compared with the TN condition, exposure to HS had no significant effect on the relative weight of spleen, bursa of Fabricius, thymus, or pancreas, but decreased ($P=0.032$) the relative weight of liver at day 21. Dietary PO levels had no significant effect on relative organ weights.

Antioxidant Activities of Liver Enzymes and Serum Lipid Peroxidation

No effect was found of the interaction between environmental temperature and dietary PO levels on the antioxidant activity of enzymes in broilers (**Table 9**). SOD activity increased ($P=0.010$) in response to exposure to HS, whereas GSH-Px activity decreased ($P<0.001$) when compared with the birds housed under the TN condition. No significant difference was observed ($P>0.05$) in hepatic CAT activity among all treatments. However, serum MDA concentration responses to increasing dietary PO levels in birds housed in either TN or HS conditions were different (interaction effect: $P=0.012$). Serum MDA content was 42.5% lower in broilers that received supplementation with 6.0 PO under the HS condition than in those that were only challenged with HS (18.99 vs. 10.93 nmol/L). Furthermore, the reduction in MDA concentration was more notable in the HS environment with broilers supplemented with

PO than in the TN environment. Increasing dietary PO levels linearly decreased MDA concentration (linear HS: $P < 0.001$) in birds housed in the HS condition (**Table 10**).

Heat Shock Protein 70 and Nrf2 Expression in the Liver

Figure 1 shows the relative RNA expression of Nrf2 and Hsp 70 in the liver of birds. Compared to the TN treatment without PO, the expression levels of the Hsp 70 gene were significantly up-regulated ($P = 0.027$) in response to the HS environment. Dietary PO levels reduced liver Hsp 70 levels by 92% compared to birds reared under the HS environment, mainly at the 6.0 g PO/kg diet level (4.02 vs. 0.32 relative gene expression). In addition, hepatic Nrf2 levels were not affected in the HS groups compared to the TN treatments. However, compared to the HS treatment without PO, the treatment using 6.0 g PO/kg diet enhanced liver Nrf2 expression by 58.5% ($P = 0.049$; 2.06 vs. 1.30 relative gene expression).

DISCUSSION

The present study was carried out to investigate the hypothesis that supplementation with pequi oil (PO) alleviates alterations in the antioxidant system caused by heat stress (HS) in broiler chickens. The high cyclical temperatures during the day in the HS rooms were above the recommendations for the lineage according to the rearing phases (Cobb 500 Management Guide, 2018). In addition, the panting behavior and the longer time of rest observed suggest the broilers were submitted to HS conditions during this experiment.

The results of this study show the birds under HS had higher plasma concentration of glucose, triglyceride, and HDL at 21 days of age, which corroborates the results

observed by Puvadolpirod and Thaxton (2000). Animals under HS use glucose and gluconeogenic precursors (e.g., glycerol, glucogenic amino acids, lactate) as well as the cleavage of reserve triglycerides as their main sources of energy (Post et al., 2003; Campbell et al., 2009; Ma et al., 2021), which is a strategy for the organism to re-establish homeostasis via energy adjustment and to maintain body temperature. However, such data were not impacted at 42 days of age. It can be reasoned that the stress initiated since one day of age may have induced thermotolerance in face of transformations in the hypothalamic regions, as proposed by Yahav and McMurtry (2001) and Kisliouk et al. (2011).

Levels of ALT and AST in circulation may be high when liver damage occurs, thus, those enzymes are employed as a sensitive marker of hepatocellular lesions (Zulkifli et al., 2009). The present study observed that HS led to an increase in serum levels of ALT and AST in broiler chickens, which suggests liver lesions were induced. However, PO had a hepatoprotective effect under HS conditions in face of the linear reduction in serum levels of ALT and AST. Consistent with such finding, Miranda-Vilella et al. (2014) and Colombo et al. (2015) reported that oral supplementation of PO in rats treated with chemotherapy drugs to induce oxidative stress reduced liver lesions caused by high ROS concentration.

The heterophil-lymphocyte ratio (H/L) is a primary indicator of stress in birds (Lara and Rostagno, 2013). In agreement with several studies (Mahmoud et al., 2013; Chand et al., 2014), it was observed that broilers exposed to high temperature exhibited increased H/L, however, PO levels did not impact other blood parameters. Variations were observed in the amount of basophils in PO levels. Nonetheless, such data are not correlated with any specific PO dose and basophil values are within the range expected

for the lineage studied as described by Sturkie (1986) and Bounous and Stedman (2000).

Some studies have shown HS decreased the relative weight of immunologic organs (thymus, spleen, and bursa of Fabricius in chickens (Lara and Rostagno, 2013; He et al., 2019). The present study found that HS only significantly decreased the relative weight of the liver at 21 days of stress, similarly to the results obtained by Zhang et al. (2018). The relative weight of an organ may reflect its growth and development to some degree. In addition, some phytogetic additives act indirectly by inactivating free radicals, thus allowing for the mitigation of negative effects and, consequently, maintaining adequate immune status under high temperature conditions (Kulkarni et al., 2007). Given the lack of alterations in relative weight of organs in the present study, further investigations are suggested under different conditions to assess the action of PO on cellular and humoral immunity.

As temperature increased, the activities of antioxidant enzymes in the liver and plasma may be up-regulated as a protective response against oxidative stress (Tan et al., 2010). Likewise, it was observed that HS increased SOD activity in the liver. The greater SOD activity in the HS group was likely due to the high production of superoxide anion, which is considered the primary product of the ROS production system (Lambert and Brand, 2009). Superoxide anion is easily dismutated into hydrogen peroxide in a reaction catalyzed by SOD. The breakdown of hydrogen peroxide (H_2O_2) into water is catalyzed by the CAT and GSH-Px enzymes, but GSH-Px activity was reduced by HS in this study. That allows inferring that H_2O_2 is taking part in the formation of more reactive radicals, such as the hydroxyl radical in Fenton reactions (Bokare and Choi, 2014). It might be the case that HS causes protein

denaturation, since GSH-Px is associated with protein protection via a mechanism known as protein S-glutathionylation (Amiri et al., 2019). Such sequence of reactions may partially explain the alterations in concentration of those antioxidant enzymes in the liver.

The antioxidant action of PO was able to linearly reduce lipid peroxidation in broilers submitted to HS, a result of the decrease in MDA content, particularly at the PO level of 6.0 g/kg diet (18.99 vs. 10.93 nmol/L). In accordance with this finding, Vale et al. (2018) reported that diets supplemented with PO (400 mg/five weeks) in a group of Wistar rats under an strenuous exercise protocol significantly depressed lipid peroxidation. In other studies, Sahin et al. (2016) and Rajput et al. (2013) showed that supplementation with lutein (200 mg/kg) and lycopene (200 or 400 mg/kg), respectively, in chicken diets were able to reduce serum concentrations of MDA. MDA is a byproduct of lipid peroxidation and its serum concentration can be used as an indicator of cellular peroxidation and ROS accumulation (Lin et al., 2006; Yang et al., 2010). It is assumed the results obtained in the present research are associated with antioxidant compounds (carotenoids) present in PO, shown in Table 1. That table shows the quantification of carotenoids in PO, characterizing it as an excellent source of antioxidant compounds, mainly beta-carotene, lycopene, and lutein, which act in ROS neutralization (Sahin et al., 2012; Zhang et al., 2014). Those lipophilic molecules exert their protective effects associated with proteins and lipoprotein structures in cell membranes via mechanisms to reduce oxidants (Jomova and Valko, 2013; Concepcion et al., 2018), regenerating biomolecules, in the prevention and interruption of the lipid peroxidation cascade (Ribeiro et al., 2018).

Exposure to HS up-regulates the synthesis of Hsps (heat shock proteins) produced in all cells and tissues in response to stress aiming at facilitating production, conformation, and renovation of other proteins (Akbarian et al., 2014; Jiang et al., 2020). The expression of Hsp 70 is a classical sign of stress due to high temperatures in birds (Craig, and Gross, 1991; Felver-Gant et al., 2012). On the other hand, ROS overproduction is also involved in inducing Hsp 70 synthesis (Mahmoud et al., 2004). Pequi oil levels were able to act in the regulation of Hsp 70 expression since PO supplementation decreased liver levels of that gene in birds under HS, particularly at the PO level of 6.0 g/kg diet. Such finding is another indication that PO acts as a cytoprotective agent in broiler chickens submitted to high temperature.

To further explore the mechanisms subjacent to the antioxidant effects of PO, Nrf2 expression in the liver was determined. Nrf2 is a sensitive redox transcription factor that regulates numerous genes that code phase-II detoxifying enzymes and antioxidant enzymes such as GSH-Px, SOD, CAT, heme oxygenase-1, and glutathione-S-transferase (Zhang et al., 2018). The present study found that the PO level of 6.0 g/kg diet increased Nrf2 expression (58.5%) in broiler chickens under HS compared with those not supplemented with PO in HS conditions. Thus, the bioactive compounds in PO stimulated the transcription and translation of cytoprotective proteins in liver cells. Sahin et al. (2016) and Zhang et al. (2018) reported that the activation of the liver Nrf2 level increased in a dose-dependent manner in birds supplemented with lycopene (200 or 400 mg/kg) and turmeric (50, 100, or 200 mg/kg), respectively, under high-temperature conditions. The antioxidant properties of several natural properties are able to modulate the Nrf2 system, aiding in maintaining health and the overall cell oxidation-reduction equilibrium, however, the mechanisms of each compound involved are not

well established (Zhang et al., 2018). Further research to explain the effects of PO in animal production is relevant. Nevertheless, the results of the present study suggest PO inclusion starting at 6.0 g/kg diet would be a promising dietary additive in broiler feed.

In conclusion, adding PO, especially at a level of 6.0 g/kg diet, alleviated oxidative stress induced by high ambient temperature and had a hepatoprotective effect in broiler chickens. Moreover, PO supplementation resulted in low levels of Hsp 70 expression and induced the expression of Nrf2-mediated genes. Overall, such results suggest supplementing broiler chickens with PO at 6.0 g/kg diet may activate the mechanisms of defense of the organism, thus decreasing molecular oxidative effects. Such antioxidant action of PO alleviates the negative effects of HS, particularly when the birds are exposed to stress in hot climates, acting as an excellent antioxidant additive in poultry production.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was made possible by a sponsored (2018/25363-2) from the São Paulo Research Foundation (FAPESP). The authors would like to thank the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brazil (CAPES) for financial (student grant - Finance Code 001) support of this research.

REFERENCES

- Akbarian, A., J. Michiels, A. Golian, J. Buyse, Y. Wang, and S. De Smet. 2014. Gene expression of heat shock protein 70 and antioxidant enzymes, oxidative status, and meat oxidative stability of cyclically heat-challenged finishing broilers fed *Origanum compactum* and *Curcuma xanthorrhiza* essential oils. *Poult. Sci.* 93 :1930–1941. <http://dx.doi.org/10.3382/ps.2014-03896>
- Amiri, M., H. A. Ghasemi, and I. H. A. H. K. Farahani. 2019. Efficacy of guanidinoacetic acid at different dietary crude protein levels on growth performance, stress indicators, antioxidant status, and intestinal morphology in broiler chickens subjected to cyclic heat stress. *Anim Feed Sci Tech.* 254:114208.

<https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2019.114208>

Bradford, M. M. 1976. A rapid method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein binding. *Anal. Biochem.* 72:248–254.
[https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)

Bokare, A.D., and W. Choi. 2014. Review of iron-free Fenton-like systems for activating H₂O₂ in advanced oxidation processes. *J. Hazard. Mater.* 275:121-135, 2014.
<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2014.04.054>

Bounous, D.I., and N. Stedman. 2000. Normal avian hematology: chicken and turkey. In: Feldman, B. F., J. G. Zinkl, N. C. Jain. *Schalm's Veterinary Hematology*. 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.

Buege, J.A., and S. D. Aust. 1978. Microsomal lipid peroxidation. *Methods in Enzymology*, New York.

Campbell, J. E., T.J. Hawke, and M.C. Riddell. 2009. Glucocorticoids are capable of stimulating both lipolysis and adipogenesis in 3T3-L1 adipocytes. *Can. J. Diabetes.* 33:302-303. doi: 10.1016/S1499-2671(09)33296-7

Chand, N., S. Naz, A. Khan, S. Khan, and R. U. Khan. 2014. Performance traits and immune response of broiler chicks treated with zinc and ascorbic acid supplementation during cyclic heat stress. *Int. J. Biometereol.* 58:2153-2157. Doi: 10.1007/s00484-014-0815-7.

Cobb-Vantress, 2018. *Broiler Management Guide*. Arkansas, USA. Accessed Apr. 2019. <https://www.cobbvantress.com/products/cobb500>.

Colombo, N.B.R., M.P. Rangel, V. Martins, M. Hage, D.P. Gelain, D.F. Barbeiro, C.K. Grisolia, E.R. Parra, and V.L. Capelozzi. 2015. *Caryocar brasiliense* camb protects against genomic and oxidative damage in urethane-induced lung carcinogenesis. *Braz J Med Biol Res.*48:852-862. <https://doi.org/10.1590/1414-431x20154467>.

Concepcion, M. R., J. Avalos, M. L. Bonet, and A. Boronat. 2018. A global perspective on carotenoids: Metabolism, biotechnology, and benefits for nutrition and health. *Prog Lipid Res.*70:62-93. doi 10.1016/j.plipres.2018.04.004

Correa, C. R., C.Y.O. Chen, G. Aldini, H. Rasmussen, C. F. Ronchi, C. B. Ronchi, S. M. Cho, J. B. Blumberg, and K. J. Yeum. 2014. Bioavailability of plant pigment phytochemicals in *Angelica keiskei* in older adults: A pilot absorption kinetic study. *Nutr Res Pract.* 8:550-557. <https://doi.org/10.4162/nrp.2014.8.5.550>

Craig, E.A., and C. A. Gross. 1991. Is hsp70 the cellular thermometer? *Trends Biochem. Sci.* 16:135–140. [https://doi.org/10.1016/0968-0004\(91\)90055-Z](https://doi.org/10.1016/0968-0004(91)90055-Z)

Galicia-moreno, M., and G. Gutiérrez-reyes. 2014. The role of oxidative stress in the development of alcoholic liver disease. *Rev. Gastroenterol. Mex.* 79:135–144. <https://doi.org/10.1016/j.rgmxen.2014.06.007>

- Felver-Gant, J. N., L. A. Mack, R. L. Dennis, S. D. Eicher, and H. W. Cheng. 2012. Genetic variations alter physiological responses following heat stress in 2 strains of laying hens. *Poult. Sci.* 91:1542–1551. doi: 10.3382/ps.2011-01988
- Hartman, L., R. C. Lago. 1973. Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. *Lab. Pract.* 22 :475-476.
- He, S., S. Li, M. A. Arowolo, Q. Yu, F. Chen, R. Hu, and J. He. 2019. Effect of resveratrol on growth performance, rectal temperature and serum parameters of yellow-featherbroilers under heat stress. *Anim. Sci. J.* 90:401-411. doi: 10.1111/asj.13161.
- Jaeschke, H., M. R. McGill, and A. Ramachandran. 2012. Oxidant stress, mitochondria, and cell death mechanisms in drug-induced liver injury: Lessons learned from acetaminophen hepatotoxicity. *Drug Metab. Rev.* 44:88–106. doi: 10.3109/03602532.2011.602688.
- Jiang, S., A. A. Mohammed, J. A. Jacobs, T. A. Cramer, and H. W. Cheng. 2020. Effect of synbiotics on thyroid hormones, intestinal histomorphology, and heat shock protein 70 expression in broiler chickens reared under cyclic heat stress. *Poult. Sci.* 99:142–150. <http://dx.doi.org/10.3382/ps/pez571>
- Jomova, K., and M. Valko. 2013. Health protective effects of carotenoids and their interactions with other biological antioxidants. *Eur. J. Med. Chem.* 70:102-110. doi: 10.1016/j.ejmech.2013.09.054
- Kisliouk, T., S. Yosefi, and N. Meiri. 2011. MiR-138 inhibits EZH2 methyltransferase expression and methylation of histone H3 at lysine 27, and affects thermotolerance acquisition. *Eur J Neurosc.* 33:224-235. doi: 10.1111/j.1460-9568.2010.07493.x
- Kulkarni, R.R., V.R. Parreira, S. Sharif, and J. F. Prescott. 2007. Immunization of broiler chickens against *Clostridium perfringens* induced necrotic enteritis. *Clin. Vaccine Immunol.* 14:1070–1077. doi: 10.1128/CVI.00162-07
- Lambert, A.J., and M. D. Brand. 2009. Reactive Oxygen Species Production by Mitochondria. In: Stuart J.A. 2nd. ed. *Mitochondrial DNA: Methods in Molecular.* Humana Press.
- Lara, L., and M. H. Rostagno. 2013. Impact of heat stress on poultry production. *Animals* 3:356–369. doi: 10.3390/ani3020356
- Lima, A., A. M. O. Silva, R. A. Trindade, R. P. Torres, and J. Macini-Filho. 2007. Composição química e compostos bioativos presentes na polpa e da amêndoa do pequi (*Caryocar brasiliense*, Camb.). *Rev. Bras. Frutic.* 29 :695-698. <https://doi.org/10.1590/S0100-29452007000300052>
- Lin, H., H.C. Jiao, J. Buyse, and E. Decuypere. 2006. Strategies for preventing heat stress in poultry. *World's Poult. Sci. J.* 62:71– 86. <https://doi.org/10.1079/WPS200585>

- Lucas, A. M., and C. Jamroz, 1961. Atlas of Avian Hematology. Agriculture Monograph 25, United States Department of Agriculture.
- Luo, J., J. Song, L. Liu, B. Xue, G. Tian, and Y. Yang. 2017. Effect of epigallocatechin gallate on growth performance and sérum biochemical metabolites in heat-stressed broilers. *Poult. Sci.* 97:599–606. doi: 10.3382/ps/pex353
- Ma, B., L. Zhang, J. Li, T. Xing, Y. Jiang, and Feng Gao. 2021. Heat stress alters muscle protein and amino acid metabolism and accelerates liver gluconeogenesis for energy supply in broilers. *Poult. Sci.* 100:215–233. doi: <https://doi.org/10.1016/j.psj.2020.09.090>
- Mahmoud, K. Z., F. W. Edens, E.J. Eisen, and G.B. Havenstein. 2004. Ascorbic acid decreases heat shock protein 70 and plasma corticosterone response in broilers (*Gallus gallus domesticus*) subjected to cyclic heat stress. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* 137: 35-42. doi:10.1016/j.cbpc.2003.09.013
- Mahmoud, U.T., Abdel-Rahman, M.A. Darwish, M.H.A., and G. M. Mosaad. 2013. The effect of heat stress on blood picture of Japanese quail. *J. Adv. Vet. Res.* 3:69-76.
- Malacrida, C.R., I. C. F, Moraes, V. V de Rosso, C. E. da C. Rodrigues, and A. C. de Souza. 2018. Effect of the application of an enzymatic pretreatment o bioactive compounds of *Caryocar brasiliense* Camb pulp oil. *J. Food Process. Preserv.* 42:1-6. <https://doi.org/10.1111/jfpp.13828>
- Miao, Q., X. Si, Y. Xie, L. Chen, Z. Liu, L. Liu, X. Tang, and Hongfu Zhang. 2020. Effects of acute heat stress at different ambient temperature on hepatic redox status in broilers. *Poult. Sci.* 99:4113–4122. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2020.05.019>
- Miranda-Vilela, A. L., C. K. Grisolia, I. Sabioni, and M. A. Mendonca. 2009. Characterization of the major nutritional components of *Caryocar brasiliense* fruit pulp by nmr spectroscopy. *Quím. Nova.* 32:2310-2313. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422009000900013>.
- Miranda-Vilela, A. L., C. K. Grisolia, J. P. F. Longo, R. C. A. Peixoto, M. C. de Almeida, L. C. P. Barbosa, M. M Roll, F. A. Portilho, L. L. C. Estevanato, A. L. Bocca, S. N. Bão, and G. M. Lacava. 2014. Oil rich in carotenoids instead of vitamins C and E as a better option to reduce doxorubicin-induced damage to normal cells of Ehrlich tumor-bearing mice: Hematological, toxicological and histopathological evaluations. *J Nutr Biochem.* 25:1161-1176. doi: 10.1016/j.jnutbio.2014.06.005
- Pfaffl, M. W. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RTPCR. *Nucleic Acids Res.* 9: 29-45. doi: 10.1093/nar/29.9.e45
- Post, J., J. M Rebel, and A. A. H. M. Ter-Huurne. 2003. Physiological effects of elevated plasma corticosterone concentrations in broiler chickens. An alternative means

by which to assess the physiological effects of stress. *Poult. Sci.* 82:1313–1318.
doi: 10.1093/ps/82.8.1313

Puvadolpirod, S., and J.P. Thaxton. 2000. Model of physiological stress in chickens: 1. Response parameters. *Poult. Sci.* 79:363–369, 2000. <https://doi.org/10.1093/ps/79.3.363>

Rajput, N., M. Naeem, S. Ali, J. F. Zhang, L. Zhang, and T. Wang. 2013. The effect of dietary supplementation with the natural carotenoids curcumin and lutein on broiler pigmentation and immunity. *Poult. Sci.* 92:1177–1185. <http://dx.doi.org/10.3382/ps.2012-02853>

Ribeiro, D., M. Freitas, A. M. S. Silva, F. Carvalho, and E. Fernandes. 2018. Antioxidant and pro-oxidant activities of carotenoids and their oxidation products. *Food Chem. Toxicol.* 120:681-699. doi: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.07.060>

Roesler, R., M. Lorencini, and G. Pastore. 2010. Brazilian cerrado antioxidant sources: cytotoxicity and phototoxicity in vitro. *Ciên. Tecnol. Aliment.* 30:814-821, 2010. <http://dx.doi.org/10.1590/S0101-20612010000300038>

Rostagno, H. S., L. F. T. Albino, M. I. Hannas, J. L. Donzete, N. K. Sakomura, F. G. Perazzo, A. Saraiva, M. L. Teixeira, P. B. Rodrigues, R. F. de Oliveira, S. L. de T. Barreto, and C. O. Brito. 2017. *Tabelas Brasileiras para Aves e Suínos: composição de alimentos e exigências nutricionais*. 4th. ed. Animal Science Department, Federal University of Viçosa, MG.

Sahin, K., C. Orhan, M. Tuzcu, N. Shain, A. Hayirli, S. Bilgili, and O. Kucuk. 2016. Lycopene activates antioxidant enzymes and nuclear transcription factor systems in heat-stressed broilers. *Poult. Sci.* 95:1088-1095. doi: <http://dx.doi.org/10.3382/ps/pew012>

Sahin, K., C. Orhan, Z. Tuzcu, M. Tuzcu, and N. Sahin. 2012. Curcumin ameliorates heat stress via inhibition of oxidative stress and modulation of Nrf2/HO-1 pathway in quail. *Food Chem. Toxicol.* 50:4035–4041. doi: 10.1016/j.fct.2012.08.029

SAS Institute. *SAS User's guide: Statistics*. Version 9.2. Cary, NC, 2008

Sturkie, P. D. 1986. Heart and circulation: anatomy, hemodynamics, blood pressure, blood flow. In: *Avian Physiology*, 4th. ed. Pring Verlag. New York.

Tan, G.Y., L. Yang, Y. Q. Fu, J. H. Feng, and M. H. Zhang. 2010. Effects of different acute high ambient temperatures on function of hepatic mitochondrial respiration, antioxidative enzymes, and oxidative injury in broiler chickens. *Poult. Sci.* 89:115-122. doi: 10.3382/ps.2009-00318

- Vale, A. F., H. H. Ferreira, E. J. Benetti, A. C. S. Rebelo, A. C. R. Figueiredo, E. C. Barbosa, and K. Simões. 2018. Antioxidant effect of the pequi oil (*Caryocar brasiliense*) on the hepatic tissue of rats trained by exhaustive swimming exercises. *Braz. J. Biol.* 79: 257-262. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.180015>
- Vicente, I. S.T., L. F. Fleuri, P. L. P. F. Carvalho, M. G. Guimarães, R. F. Naliato, H. de C. Müller, M. M. P. Sartori, L. E. Pezzato, and M. M. Barros. 2019. Orange peel fragment improves antioxidant capacity and haematological profile of Nile tilapia subjected to heat/dissolved oxygen-induced stress. *Aquac.Res.* 50:80–92. <https://doi.org/10.1111/are.13870>
- Wang, Y., L. Xia, T. Guo, C. Heng, L. Jiang, D. Wang, J. Wang, K. Li, and X. Zhan. 2020. Research Note: Metabolic changes and physiological responses of broilers in the final stage of growth exposed to diferente environmental temperatures. *Poult. Sci.* 99:2017–2025. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2019.11.048>
- Yahav, S., and J.P. McMuey. 2001. Thermotolerance Acquisition in Broiler Chickens by Temperature Conditioning Early in Life—The Effect of Timing and Ambient Temperature. *Poult. Sci.* 80:1662–1666. <https://doi.org/10.1093/ps/80.12.1662>
- Yang, L., G. Y. Tan, Y. Q. Fu, J. H. Feng, and M. H. Zhang MH. 2010. Effects of acute heat stress and subsequent stress removal on function of hepatic mitochondrial respiration, ROS production and lipid peroxidation in broiler chickens. *Comp Bioch Phys Part C: Toxicol Pharmacol.* 151:204-208. doi: 10.1016/j.cbpc.2009.10.010.
- Zhang, J., X. Hou, H. Ahmad, H. Zhang, L. Zhang, and T. Wang. 2014. Assessment of free radicals scavenging activity of seven natural pigments and protective effects in AAPH-challenged chicken erythrocytes. *Food Chemi.* 145:57–65. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.08.025>
- Zhang, J. F., K. W. Bai, W. P. Su, A. A. Wang, L. L. Zhang, K. H. Huang, and T. Wang. 2018. Curcumin attenuates heat-stress-induced oxidant damage by simultaneous activation of GSH-related antioxidant enzymes and Nrf2-mediated phase II detoxifying enzyme systems in broiler chickens. *Poult. Sci.* 97:1209-1219. Doi: <http://dx.doi.org/10.3382/ps/pex408>
- Zhao, F. Q., Z. W. Zhang, C. Wang, B. Zhang, H. D. Yao, S. Li, and S. W. Xu. 2013. The role of heat shock proteins in inflammatory injury induced by cold stress in chicken hearts. *Cell Stress and Chaperones.* 18: 773–783. doi: 10.1007/s12192-013-0429-8
- Zulkifli, I., A. Al-Aqil, A. R. Omar, A. Q. Sazili, and M. A. Rajion. 2009. Crating and heat stress influence blood parameters and heat shock protein 70 expression in broiler chickens showing short or long tonic immobility reactions. *Poult. Sci.* 88:471-476. doi: 10.3382/ps.2008-00287

Table 1 - Fatty acid and carotenoid composition of pequi oil (*C. brasiliense* Camb.)

Fatty acid (%) ^a					Carotenoids (µg/dL) ^b			
Saturated		Monounsaturated		Polyunsaturated	β-carotene	Lutein	Lycopene	
Palmitic	37.03	Oleic (ω 9)	52.98	Linoleic (ω 6)	1.42	167.16	19.57	3.76
Lauric	2.28	Palmitoleic	0.17	Linolenic (ω 3)	1.01			
Stearic	0.31							
Araquidic	0.23							

^a Method described by Hartman and Lago (1973). ^b Method described by Correa et al. (2014).

Table 2 - Ingredients and chemical composition of the experimental diets (pre-starter diets, provided during days 1–7; Starter diets, provided during days 8–21)

Ingredients (%)	<i>Levels of pequi oil</i>									
	Pre-starter					Starter				
	CON	1.5	3.0	4.5	6.0	CON	1.5	3.0	4.5	6.0
Soybean meal (CP 46%)	42.235	42.244	42.253	42.261	42.270	39.249	39.258	39.266	39.275	39.284
Corn	51.792	51.743	51.693	51.644	51.594	54.994	54.945	54.895	54.845	54.796
Soybean oil	1.776	1.667	1.558	1.449	1.340	1.929	1.820	1.711	1.602	1.494
Pequi oil	-	0.150	0.300	0.450	0.600	-	0.150	0.300	0.450	0.600
DL-Methionine (99%)	0.336	0.336	0.336	0.336	0.336	0.315	0.315	0.315	0.315	0.315
L-Lysine-HCL (99%)	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.139	0.139	0.139	0.139	0.139
L-Threonine (98.5%)	0.058	0.058	0.058	0.058	0.058	0.056	0.056	0.056	0.056	0.056
Dicalcium phosphate	1.872	1.872	1.872	1.872	1.872	1.604	1.604	1.604	1.604	1.604
Limestone	0.886	0.886	0.886	0.886	0.886	0.826	0.826	0.826	0.826	0.826
Coccidiostat (Coxistac 12%) ³	0.055	0.055	0.055	0.055	0.055	0.055	0.055	0.055	0.055	0.055
Choline chloride (60%)	0.100	0.100	0.100	0.100	0.100	0.100	0.100	0.100	0.100	0.100
Vitamin premix ¹	0.100	0.100	0.100	0.100	0.100	0.100	0.100	0.100	0.100	0.100
Mineral premix ²	0.100	0.100	0.100	0.100	0.100	0.100	0.100	0.100	0.100	0.100
Sodium bicarbonate	0.114	0.114	0.114	0.114	0.114	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083
Salt	0.450	0.450	0.450	0.450	0.450	0.450	0.450	0.450	0.450	0.450
Total	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Calculation of nutrientes										
Metabolizable energy, kcal/kg	2,950	2,950	2,950	2,950	2,950	3,000	3,000	3,000	3,000	3,000
Crude Protein, %	24.07	24.07	24.07	24.07	24.07	22.93	22.93	22.93	22.93	22.93
Calcium, %	0.96	0.96	0.96	0.96	0.96	0.86	0.86	0.86	0.86	0.86
Phosphorus (Available), %	0.47	0.47	0.47	0.47	0.47	0.41	0.41	0.41	0.41	0.41
Potassium, %	0.94	0.94	0.94	0.94	0.94	0.89	0.89	0.89	0.89	0.89
Sodium, %	0.22	0.22	0.22	0.22	0.22	0.21	0.21	0.21	0.21	0.21
Chlorine, %	0.34	0.34	0.34	0.34	0.34	0.34	0.34	0.34	0.34	0.34
Lysine (digestible), %	1.43	1.43	1.43	1.43	1.43	1.36	1.36	1.36	1.36	1.36
Methionine (digestible), %	0.68	0.68	0.68	0.68	0.68	0.64	0.64	0.64	0.64	0.64
Methionine+Cystine (digestible), %	1.06	1.06	1.06	1.06	1.06	1.01	1.01	1.01	1.01	1.01
Threonine (digestible), %	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.94	0.94	0.94	0.94	0.94

¹Provided per kg of diet: Vitamin A (min) 10000 U.I.; Vitamin D3 (min) 2500 U.I.; Vitamin E (min) 17.5 U.I.; Vitamin K3 (min) 2 mg; Thiamin (min) 1.5 mg; Riboflavin (min) 7.5 mg; Niacina (min) 25 mg; Pantothenic acid (min) 15 mg; Pyridoxine, (min) 2 mg; Folic acid (min) 0,5 mg; Biotin (min) 60 mcg; B12 (min) 15 mcg. ²Provided per kg of diet: Iron (min) 30 mg; Copper (min) 6 mg; Manganese (min) 70 mg; Zinc (min) 50 mg; Iodine (min) 1 mg. Selenium (min) 0,35 mg; Cobalt (min) 0,2 mg. ³ Salinomycin (66 ppm).

Table 3. Ingredients and chemical composition of the experimental diets (grower diets, provided during days 22–35; finisher diets, provided during days 36–42)

Ingredients (%)	Levels of pequi oil									
	Grower					Finisher				
	CON	1.5	3.0	4.5	6.0	CON	1.5	3.0	4.5	6.0
Soybean meal (CP 46%)	32.239	32.248	32.256	32.265	32.274	26.969	26.977	26.986	26.995	27.003
Corn	61.977	61.927	61.878	61.828	61.778	68.121	68.071	68.021	67.972	67.922
Soybean oil	2.273	2.164	2.055	1.946	1.837	1.920	1.812	1.703	1.594	1.485
Pequi oil	-	0.150	0.300	0.450	0.600	-	0.150	0.300	0.450	0.600
DL-Methionine (99%)	0.279	0.279	0.279	0.279	0.279	0.239	0.239	0.239	0.239	0.239
L-Lysine-HCL (99%)	0.194	0.194	0.194	0.194	0.194	0.218	0.218	0.217	0.217	0.217
L-Threonine (98.5%)	0.064	0.064	0.064	0.064	0.064	0.058	0.058	0.058	0.058	0.058
Dicalcium phosphate	1.423	1.423	1.423	1.423	1.423	1.048	1.048	1.048	1.048	1.048
Limestone	0.697	0.697	0.697	0.697	0.697	0.667	0.667	0.667	0.667	0.666
Coccidiostat (Coxistac 12%) ³	0.055	0.055	0.055	0.055	0.055	-	-	-	-	-
Choline chloride (60%)	0.100	0.100	0.100	0.100	0.100	0.100	0.100	0.100	0.100	0.100
Vitamin premix ¹	0.100	0.100	0.100	0.100	0.100	0.100	0.100	0.100	0.100	0.100
Mineral premix ²	0.100	0.100	0.100	0.100	0.100	0.100	0.100	0.100	0.100	0.100
Sodium bicarbonate	0.050	0.050	0.050	0.050	0.050	0.011	0.011	0.011	0.011	0.011
Salt	0.450	0.450	0.450	0.450	0.450	0.450	0.450	0.450	0.450	0.450
Total	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Calculation of nutrientes										
Metabolizable energy, kcal/kg	3,100	3,100	3,100	3,100	3,100	3,150	3,150	3,150	3,150	3,150
Crude Protein, %	20.25	20.25	20.25	20.25	20.25	18.28	18.28	18.28	18.28	18.28
Calcium, %	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75	0.62	0.62	0.624	0.62	0.62
Phosphorus (Available), %	0.37	0.37	0.37	0.37	0.37	0.29	0.29	0.291	0.29	0.29
Potassium, %	0.79	0.79	0.79	0.79	0.79	0.71	0.71	0.712	0.71	0.71
Sodium, %	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.19	0.19	0.194	0.19	0.19
Chlorine, %	0.34	0.34	0.34	0.34	0.34	0.34	0.34	0.343	0.34	0.34
Lysine (digestible), %	1.22	1.22	1.22	1.22	1.22	1.10	1.10	1.101	1.10	1.10
Methionine (digestible), %	0.57	0.57	0.57	0.57	0.57	0.51	0.51	0.512	0.51	0.51
Methionine+Cystine (digestible), %	0.90	0.90	0.90	0.90	0.90	0.81	0.81	0.814	0.81	0.81
Threonine (digestible), %	0.84	0.84	0.84	0.84	0.84	0.76	0.76	0.759	0.76	0.76

¹ Provided per kg of diet: Vitamin A (min) 10,000 U.I.; Vitamin D3 (min) 2,500 U.I.; Vitamin E (min) 17.5 U.I.; Vitamin K3 (min) 2 mg; Thiamin (min) 1.5 mg; Riboflavin (min) 7.5 mg; Niacin (min) 25 mg; Pantothenic acid (min) 15 mg; Pyridoxine (min) 2 mg; Folic acid (min) 0.5 mg; Biotin (min) 60 mcg; B12 (min) 15 mcg. ² Provided per kg of diet: Iron (min) 30 mg; Copper (min) 6 mg; Manganese (min) 70 mg; Zinc (min) 50 mg; Iodine (min) 1 mg; Selenium (min) 0.35 mg; Cobalt (min) 0.2 mg. ³ Salinomycin (66 ppm).

Table 4 - Averages and standard deviations for temperature and relative humidity in the thermoneutral (TN) and heat stress (HS) ambient temperature environments

Items	Average±standard deviation	
	Temperature	Relative humidity
1 to 7 days		
TN-room	30.97±0.63	64.45±4.42
HS-room	34.51±1.1	53.57±4.09
8 to 21 days		
TN-room	27.30±0.93	71.05±3.90
HS-room	31.73±0.97	59.57±3.38
22 to 35 days		
TN-room	24.06±0.86	73.23±3.79
HS-room	30.76±1.19	62.14±2.69
36 to 42 days		
TN-room	24.60±1.27	77.20±2.14
HS-room	29.07±1.68	68.88±1.65

Table 5- Primer sequences used for real-time PCR¹

Gene	Primers sequences (5'-3')	Gene bank number	Product size (bp)
Hsp 70	F:CGGGCAAGTTTGACCTAA R:TTGGCTCCCACCCTATCTCT	NM_001006685.1	145
Nrf2	F:GGAAGAAGGTGCTTTTCGGAGC R:GGGCAAGGCAGATCTCTTCCAA	NM_205117.1	171
β -actina	F: TGCTGTGTTCCCATCTATCG R:TTGGTGACAATACCGTGTTCA	NM_205518.1	150

¹Hsp 70 = Heat shock protein 70; Nrf2 = nuclear factor erythroid 2-related factor 2;

F: Forward primer; R: Reverse primer.

Table 6 - Effects of temperature and dietary pequi oil (PO) level on serum biochemical indices in broilers exposed to heat stress

Temperature ¹	PO ² level (g/kg)	21d						42d					
		Glucose (mg/dL)	CHO (mg/dL)	TG (mg/dL)	HDL (mg/dL)	AST (U/L)	ALT (U/L)	Glucose (mg/dL)	CHO (mg/dL)	TG (mg/dL)	HDL (mg/dL)	AST (U/L)	ALT (U/L)
TN		207.22 ^b	121.050	43.625 ^b	118.908 ^b	215.011	4.845 ^b	226.032	124.039 ^a	149.193	126.726	327.785 ^b	3.478 ^b
HS		219.91 ^a	121.550	68.325 ^a	140.578 ^a	218.032	5.936 ^a	220.037	103.371 ^b	162.911	116.710	382.578 ^a	4.764 ^a
SEM		3.07	2.48	2.71	13.34	6.88	0.28	5.21	5.14	9.66	8.68	13.16	0.34
	CON	212.481	117.812 ^{ab}	53.937	144.314	239.390	4.910	217.056	112.562	149.045	98.722	364.175	4.656
	1.5	211.250	112.687 ^b	54.562	163.760	223.168	5.456	212.237	126.660	166.821	133.051	369.800	4.689
	3.0	214.210	130.500 ^a	51.375	128.793	202.762	5.128	230.369	101.562	148.169	128.422	344.400	4.427
	4.5	216.137	117.250 ^{ab}	56.062	132.471	205.375	5.675	220.013	121.187	139.937	123.406	350.466	3.741
	6.0	213.744	128.250 ^a	63.937	104.380	211.911	5.784	235.500	106.553	176.287	123.836	347.066	3.093
SEM		4.63	3.37	4.71	19.72	9.22	0.41	8.01	7.96	15.15	13.67	20.73	0.55
TN	CON	202.550	118.250	40.500	139.911	263.143	4.146	226.300	131.625	131.714	119.028	355.300	4.074
	1.5	211.062	113.750	43.625	128.606	216.512	5.893	194.537	128.571	156.500	108.992	335.940	3.143
	3.0	202.112	127.000	43.750	119.518	180.500	3.928	236.720	107.250	143.625	152.553	315.150	4.490
	4.5	210.262	117.750	43.375	112.068	196.863	5.020	230.150	140.500	143.750	116.955	327.000	3.243
	6.0	210.112	128.500	46.875	94.440	218.037	5.238	242.450	112.250	170.375	133.796	305.533	2.444
HS	CON	222.412	117.375	67.375	148.717	215.637	5.675	207.813	93.500	166.375	78.416	373.050	5.238
	1.5	211.437	111.625	65.500	148.915	229.825	5.020	229.937	124.750	177.143	157.109	403.660	6.237
	3.0	226.312	134.000	59.000	138.036	225.025	6.329	224.012	95.875	152.714	104.291	373.650	4.365
	4.5	222.012	116.750	68.750	152.873	213.887	6.330	209.875	101.875	136.125	129.857	373.933	4.240
	6.0	217.375	128.000	81.000	114.321	205.786	6.329	228.550	100.857	182.200	113.877	388.600	3.741
SEM		6.77	5.03	5.89	30.43	13.12	0.62	10.76	10.46	21.75	18.53	30.57	1.86
P-value (factorial design)													
Temperature		0.006	0.880	<0.001	0.042	0.486	0.024	0.400	0.005	0.337	0.432	0.012	0.015
PO levels		0.969	0.003	0.392	0.436	0.141	0.725	0.218	0.178	0.491	0.495	0.913	0.230
Interaction effect		0.461	0.909	0.701	0.874	0.073	0.247	0.081	0.388	0.902	0.087	0.963	0.348
Effect of PO level ³													
Linear		0.655	0.277	0.084	0.115	0.048	0.173	0.087	0.538	0.659	0.484	0.685	0.020
Quadratic		0.864	0.930	0.752	0.496	0.104	0.354	0.692	0.709	0.418	0.253	0.513	0.537

¹TN=Thermoneutral; HS=Broiler chickens raised under cyclical heat stress for 8 h/day from 1 to 42 days of age;

²CON (basal diet without PO); 1.5 (basal diet containing 1.5 g PO/kg diet); 3.0 (basal diet containing 3.0 g PO/kg diet); 4.5 (basal diet containing 4.5 g PO/kg diet); 6.0 (basal diet containing 6.0 g PO/kg diet).

^{a,b} Means (n=8) within each column with no common superscript letter differ (P<0.05).

CHO=total cholesterol; TG=triglycerides; HDL=High-density lipoprotein. AST=aspartate aminotransferase; ALT=alanine aminotransferase; SEM=standard error of the mean.

³Orthogonal polynomials were used to evaluate linear and quadratic responses to PO inclusion levels.

Table 7 - Effects of temperature and dietary pequi oil (PO) level on blood leukocyte profile in broilers exposed to heat stress at 42 days of age

Temperature ¹	PO ² level (g/kg)	Heterophil (%)	Lymphocyte (%)	Eosinophils (%)	Basophils (%)	Monocytes (%)	H/L
TN		32.200	52.500	6.675	3.875	4.775	0.638 ^b
HS		34.750	50.225	5.675	4.425	4.925	0.758 ^a
SEM		1.14	1.46	0.78	0.43	0.73	0.042
	CON	31.813	52.25	7.625	2.75 ^b	5.562	0.654
	1.5	36.500	46.812	6.312	5.25 ^a	5.125	0.833
	3.0	31.187	52.625	5.437	5.312 ^a	5.500	0.616
	4.5	34.937	51.437	6.062	3.187 ^{ab}	4.375	0.746
	6.0	32.927	53.687	5.437	4.25 ^{ab}	3.687	0.641
SEM		1.78	2.29	1.19	0.64	1.14	0.07
TN	CON	28.500	54.875	6.375	3.000	7.250	0.539
	1.5	32.000	50.375	9.125	5.125	3.375	0.654
	3.0	32.000	51.375	5.500	4.750	6.500	0.662
	4.5	35.750	52.625	4.750	2.625	4.250	0.693
	6.0	32.750	53.250	7.625	3.875	2.500	0.641
HS	CON	35.125	49.625	8.875	2.500	3.875	0.768
	1.5	41.000	43.250	3.500	5.375	6.875	1.012
	3.0	30.375	53.875	5.375	5.875	4.500	0.570
	4.5	34.125	50.250	7.375	3.750	4.500	0.799
	6.0	33.125	54.125	3.250	4.625	4.875	0.641
SEM		2.37	3.14	1.46	0.91	1.52	0.09
P-value (factorial design)							
Temperature		0.105	0.280	0.360	0.359	0.886	0.046
PO levels		0.177	0.277	0.702	0.022	0.755	0.127
Interaction effect		0.099	0.565	0.050	0.898	0.204	0.136
Effect of PO level ³							
Linear		0.904	0.311	0.250	0.651	0.230	0.606
Quadratic		0.524	0.339	0.544	0.415	0.651	0.392

¹TN=Thermoneutral; HS=Broiler chickens raised under cyclical heat stress for 8 h/day from 1 to 42 days of age;

²CON (basal diet without PO); 1.5 (basal diet containing 1.5 g PO/kg diet); 3.0 (basal diet containing 3.0 g PO/kg diet); 4.5 (basal diet containing 4.5 g PO/kg diet); 6.0 (basal diet containing 6.0 g PO/kg diet).

^{a,b}Means (n=8) within each column with no common superscript letter differ (P<0.05).

H/L=heterophil-to-lymphocyte ratio; SEM=standard error of the mean.

³Orthogonal polynomials were used to evaluate linear and quadratic responses to PO inclusion levels.

Table 8- Effects of temperature and dietary pequi oil (PO) level on relative organ weights (%) in broilers exposed to heat stress

Temperature ¹	PO level ² (g/kg)	21 days					42 days				
		Spleen	Bursa	Thymus	Pancreas	Liver	Spleen	Bursa	Thymus	Pancreas	Liver
TN		0.077	0.226	0.436	0.298	2.239 ^a	0.108	0.136	0.303	0.151	1.777
HS		0.079	0.211	0.383	0.308	2.149 ^b	0.103	0.130	0.274	0.154	1.804
SEM		0.003	0.009	0.020	0.007	0.030	0.004	0.007	0.018	0.004	0.035
	CON	0.078	0.206	0.379	0.303	2.204	0.101	0.130	0.265	0.155	1.784
	1.5	0.080	0.227	0.382	0.294	2.132	0.108	0.147	0.284	0.147	1.722
	3.0	0.077	0.222	0.458	0.307	2.175	0.108	0.120	0.290	0.145	1.714
	4.5	0.079	0.217	0.400	0.300	2.197	0.104	0.135	0.296	0.153	1.879
	6.0	0.077	0.220	0.428	0.311	2.263	0.105	0.134	0.309	0.162	1.856
SEM		0.004	0.013	0.031	0.010	0.048	0.007	0.011	0.029	0.053	0.007
TN	CON	0.077	0.252	0.388	0.307	2.361	0.114	0.142	0.316	0.165	1.844
	1.5	0.081	0.215	0.393	0.280	2.163	0.111	0.139	0.300	0.144	1.678
	3.3	0.072	0.234	0.523	0.304	2.190	0.110	0.125	0.346	0.151	1.683
	4.5	0.076	0.213	0.407	0.303	2.222	0.110	0.128	0.275	0.137	1.856
	6.0	0.081	0.218	0.466	0.299	2.258	0.093	0.148	0.278	0.160	1.827
HS	CON	0.079	0.159	0.369	0.300	2.047	0.088	0.117	0.213	0.146	1.724
	1.5	0.079	0.239	0.370	0.307	2.101	0.105	0.155	0.268	0.150	1.766
	3.3	0.082	0.211	0.393	0.311	2.160	0.106	0.116	0.234	0.138	1.744
	4.5	0.083	0.222	0.393	0.298	2.171	0.099	0.142	0.315	0.170	1.902
	6.0	0.073	0.222	0.390	0.324	2.268	0.012	0.119	0.339	0.164	1.884
SEM		0.065	0.019	0.042	0.015	0.063	0.009	0.016	0.039	0.009	0.075
P-value (factorial design)											
Temperature		0.653	0.198	0.065	0.356	0.032	0.449	0.544	0.265	0.694	0.594
PO levels		0.976	0.841	0.337	0.847	0.379	0.943	0.625	0.864	0.379	0.128
Interaction effect		0.633	0.251	0.634	0.752	0.108	0.113	0.566	0.120	0.058	0.687
Effect of PO level ³											
Linear		0.822	0.680	0.243	0.521	0.235	0.826	0.924	0.285	0.364	0.084
Quadratic		0.793	0.481	0.481	0.626	0.164	0.534	0.934	0.911	0.086	0.223

¹TN=Thermoneutral; HS=Broiler chickens raised under cyclical heat stress for 8 h/day from 1 to 42 days of age;

²CON (basal diet without PO); 1.5 (basal diet containing 1.5 g PO/kg diet); 3.0 (basal diet containing 3.0 g PO/kg diet); 4.5 (basal diet containing 4.5 g PO/kg diet); 6.0 (basal diet containing 6.0 g PO/kg diet).

^{a,b}Means (n=8) within each column with no common superscript letter differ ($P < 0.05$).

SEM=standard error of the mean.

³Orthogonal polynomials were used to evaluate linear and quadratic responses to PO inclusion levels.

Table 9- Effects of temperature and dietary pequi oil (PO) level on antioxidant enzyme activity in broilers exposed to heat stress at 42 days of age

Temperature ¹	PO level ² (g/kg)	SOD (U/mg protein)	CAT (U/mg protein)	GPx (U/mg protein)
TN		31.04 ^b	1.494	8.199 ^a
HS		33.61 ^a	1.672	5.553 ^b
SEM		0.730	0.130	0.190
	CON	32.870	1.670	7.090
	1.5	31.830	1.731	6.697
	3.0	32.235	1.663	6.500
	4.5	32.010	1.486	7.522
	6.0	32.677	1.378	6.660
SEM		1.23	0.50	0.99
TN	CON	32.489	1.366	8.167
	1.5	29.850	1.755	8.187
	3.0	29.651	1.495	6.990
	4.5	31.938	1.738	9.645
	6.0	31.252	1.115	8.004
HS	CON	33.251	1.948	6.015
	1.5	33.805	1.706	5.028
	3.0	34.819	1.831	6.006
	4.5	32.080	1.234	5.399
	6.0	34.102	1.640	5.319
SEM		1.64	0.31	0.78
P-value (factorial design)				
Temperature		0.010	0.363	<0.001
PO levels		0.956	0.790	0.572
Interaction effect		0.438	0.392	0.211
Effect of PO level ³				
Linear		0.521	0.309	0.974
Quadratic		0.848	0.587	0.873

¹TN=Thermoneutral; HS=Broiler chickens raised under cyclical heat stress for 8 h/day from 1 to 42 days of age;

²CON (basal diet without PO); 1.5 (basal diet containing 1.5 g PO/kg diet); 3.0 (basal diet containing 3.0 g PO/kg diet); 4.5 (basal diet containing 4.5 g PO/kg diet); 6.0 (basal diet containing 6.0 g PO/kg diet).

^{a,b}Means (n=8) within each column with no common superscript letter differ (P<0.05).

SOD=superoxide dismutase; CAT=catalase; GPx=glutathione peroxidase; SEM=standard error of the mean.

³Orthogonal polynomials were used to evaluate linear and quadratic responses to PO inclusion levels.

Table 10 - Effects of temperature and dietary pequi oil (PO) level on serum MDA concentration in broilers exposed to heat stress at 42 days of age

Temperature ¹	PO level ² (g/kg)	Serum MDA (nmol/L)
TN		8.950 ^b
HS		13.42 ^a
SEM		0.71
	CON	13.686
	1.5	10.718
	3.0	10.655
	4.5	10.294
	6.0	10.583
SEM		1.16
TN	CON	8.382 ^b
	1.5	9.328 ^b
	3.0	8.907 ^b
	4.5	7.899 ^b
	6.0	10.235 ^b
HS	CON	18.991 ^a
	1.5	12.108 ^{ab}
	3.0	12.402 ^{ab}
	4.5	12.689 ^{ab}
	6.0	10.931 ^b
SEM		1.30
P-value (factorial design)		
Temperature		<0.001
PO level		0.091
Interaction effect		0.012
Effect of PO level ³		
Linear TN		0.649
Quadratic TN		0.707
Linear HS		0.001
Quadratic HS		0.051

¹TN=Thermoneutral; HS=Broiler chickens raised under cyclical heat stress for 8 h/day from 1 to 42 days of age;

²CON (basal diet without PO); 1.5 (basal diet containing 1.5 g PO/kg diet); 3.0 (basal diet containing 3.0 g PO/kg diet); 4.5 (basal diet containing 4.5 g PO/kg diet); 6.0 (basal diet containing 6.0 g PO/kg diet).

^{a,b}Means (n=8) within each column with no common superscript letter differ (P<0.05).

MDA=malondialdehyde; SEM=standard error of the mean.

³Orthogonal polynomials were used to evaluate linear and quadratic responses to PO inclusion levels.

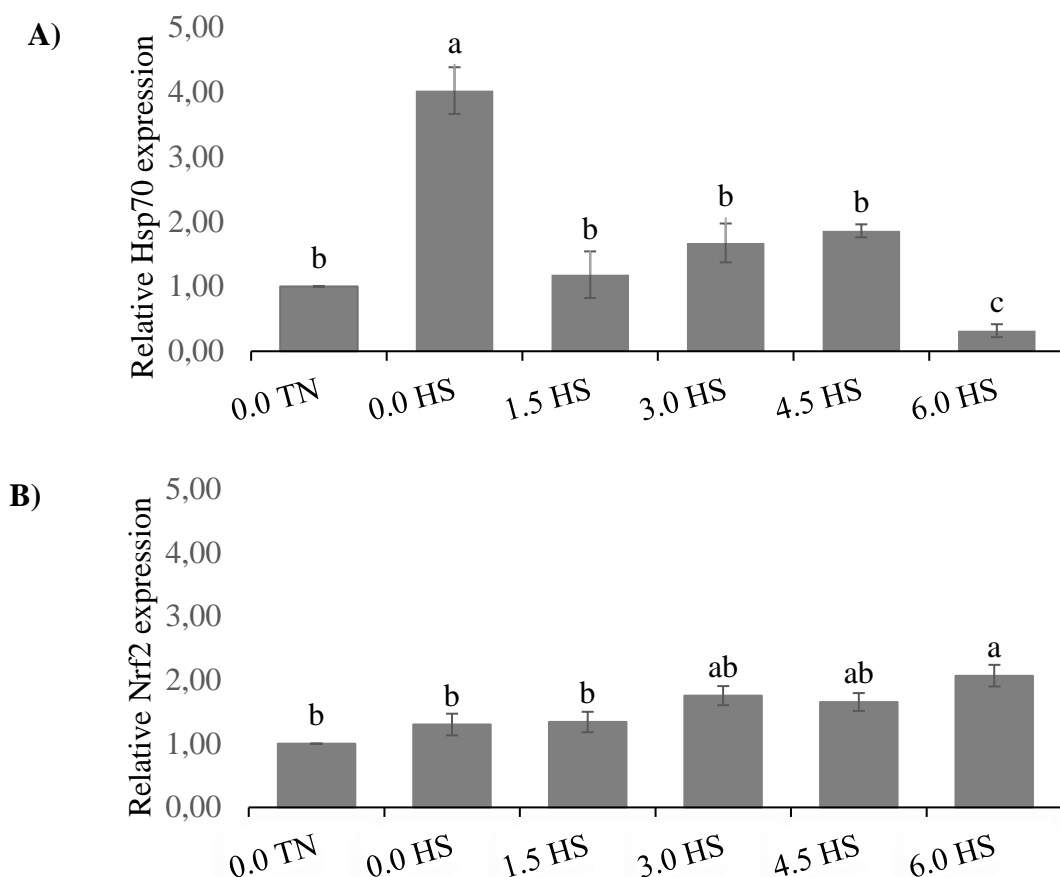


Figure 1. Effect of PO on Hsp 70(A) and Nrf2(B) expression in broiler liver at 42 days. Each bar represents the mean \pm SEM (n=4). Bars not sharing the same letters (a-c) are significantly different according to Kruskal-Wallis test at $P\leq 0.05$. 0.0 TN=normal temperature + a control diet; 0.0 HS=high ambient temperature + a control diet; PO=pequi oil; 1.5 HS=high ambient temperature + a control diet supplemented with 1.5 g PO/kg diet; 3.0 HS=high ambient temperature + a control diet supplemented with 3.0 g PO/kg diet; 4.5 HS=high ambient temperature + a control diet supplemented with 4.5 g PO/kg diet; 6.0 HS=high ambient temperature + a control diet supplemented with 6.0 g PO/kg diet.

Capítulo 3

Growth Performance, Blood Indices, Antioxidant Status, Relative Organ Weights, Carcass Yield and Meat Quality in Broiler Chickens Fed Pequi Oil (*Caryocar brasiliense* camb.)

Abstract

The aim of the current research was to investigate the effects of increasing levels of pequi oil (PO) as a potential substitute for antibiotics and natural antioxidants on growth, blood indices, relative organ weight, carcass yield, antioxidant status, and meat quality of broilers over a 42-day production period. A total of 1,440 one-day-old Cobb500 broilers were randomly distributed into six dietary treatments with eight replicate pens per treatment and 30 birds per pen. The dietary treatments were as follows: 1) basal diet + Avilamycin at 0.05 g/kg diet and no PO (AGP- antimicrobial growth promoter), 2) basal diet without antibiotic and PO (control, CON), 3) CON + 1.5 g/kg PO (1.5 PO), 4) CON + 3.0 g/kg PO (3.0 PO), 5) CON + 4.5 g/kg PO (4.5 PO), and 6) CON + 6.0 g/kg PO (6.0 PO). Dietary PO levels linearly decreased body weight (BW) and average daily gain (ADG) ($P=0.025$; $P=0.022$, respectively) and quadratically increased feed conversion ratio (FCR) between days 1 and 21 of the trial ($P=0.001$). Moreover, 6.0g/kg PO level reduced average daily feed intake (ADFI) compared with the AGP diet ($P=0.037$). However, dietary PO levels linearly improved the FCR ($P=0.036$) in the overall experimental period. ADG and ADFI were not affected by increasing PO levels and were similar when compared with the AGP diet in the overall experimental period ($P>0.05$). At 42 days, the European performance index improved linearly ($P=0.046$) with levels of dietary PO. All treatments had no effect on biochemical or leukocyte blood profile or on relative organ weights. Plasma oxidation (malondialdehyde concentration) of broilers fed PO was reduced compared with broilers fed the AGP diet without PO ($P<0.001$). Increasing PO level decreased redness (a^*), cooking loss, and shear force quadratically ($P<0.05$). During 90 days of storage, the meat malondialdehyde content of broilers linearly decreased ($P=0.049$) with increasing PO levels. The results indicated that PO supplementation

had a positive effect on growth performance. PO levels did not cause any adverse effect on blood indices, liver function, relative organ weight, carcass yield, or meat quality of broilers. Furthermore, PO levels alleviated lipid peroxidation in plasma and breast muscle, indicating that PO may be a promising alternative to antibiotic growth promoters.

Keywords: antibiotics, carotenoid, lipid peroxidation, phytogetic feed additives

Abbreviations: PO, pequi oil; AGP, antimicrobial growth promoter; BW, body weight; ADG, average daily gain; ADFI, average daily feed intake; FCR, feed conversion ratio; EPI, European performance index; CHO, total cholesterol; TG, triglycerides; HDL, high-density lipoprotein; ALT, alanine aminotransferase, AST, aspartate aminotransferase; H/L, heterophil to lymphocyte ratio; MDA, malondialdehyde; TBARS, thiobarbituric acid-reactive substance; PUFAs, polyunsaturated fatty acids.

1. Introduction

It is estimated that more than 1×10^5 tons of antibiotics are consumed globally each year and nearly two thirds of this amount is destined for livestock (Manzetti and Ghisi, 2014; Van Boeckel et al., 2015; Bartkiene et al., 2020). The use of antibiotics as antimicrobial growth promoters (AGPs) combined with measures of biosecurity and genetics has guaranteed productive improvement in the poultry industry over time through the modulation of intestinal microbiota (Fung et al., 2013), avian disease prevention (Lee et al., 2004), and improved growth performance and health (Engberg et al., 2000; Gadde et al., 2018).

Conversely, the irrational use of AGPs has become a global challenge due to antimicrobial resistance to antibiotics (De Oliveira et al., 2005; Forgetta et al., 2012), and the presence of antibiotic residues in food (meat and eggs) and the environment (Carvalho and Santos, 2016; Ronquillo and Hernandez, 2017). Against the background of this controversy,

consumer worries for food safety and environmental sustainability, associated with the ban on AGP use in the European Union in 2006, have prompted the need to find alternatives through natural agents in animal nutrition (e.g., probiotics, prebiotics, organic acids, enzymes, phytogenic feed additives) with similar or superior beneficial effects on animal response (Mehdi et al., 2018).

Pequi (*Caryocar brasiliense* camb.) is a fruit found in the Brazilian cerrado, a biome that occupies 23% of the land surface of Brazil (200 million hectares) and features great diversity of flora and fauna, of which pequi is considered one of the most representative species (Machado et al., 2015). Pequi fruit yields a yellow-orange oil rich in unsaturated fatty acids, such as oleic (ω -9; 52.98%), linoleic (ω -6; 1.42%), and linolenic (ω -3; 1.01%) (Material and Methods section). Additionally, it is rich in bioactive compounds such as carotenoids, the main of which are β -carotene, lutein, and lycopene, whose bioactive molecules have antioxidant properties (Malacrida et al., 2018).

Due to its nutritional properties, previous studies have reported pequi oil (PO) decreased DNA damage and led to hepatoprotective effects (Miranda-Vilela et al., 2009), inhibition of membrane lipid peroxidation (Miranda-Vilela et al., 2014; Vale et al., 2018), significant reduction of the inflammatory processes (Montalvão et al., 2016), and effects on skin repair (Oliveira et al., 2006). However, the effects of *C. brasiliense* have been demonstrated in laboratory animals, humans, and *in vitro* models, but are untapped in animal nutrition, raising our interest to research the use of this natural product in the poultry industry as potential alternatives to AGPs.

The antioxidant effects of PO are of particular interest to improve the growth performance and stability of meat products in animals and may contribute to antioxidant defenses in their tissues, hence, it plays a key role in meat stability and shelf life. The aim of

this study was to investigate the effects of increasing levels of PO as a potential substitute for antibiotics and a natural antioxidant in promoting growth performance, blood indices, carcass yield, antioxidant status, and meat quality of growing broilers from one to six weeks of age.

2. Materials and methods

Animal management and procedures have been approved and conducted following the ethical principles for animal tests established by the Animal Ethics Committee of the São Paulo State University, College of Veterinary Medicine and Animal Sciences (CEUA - FMVZ - UNESP, protocol no. 0192/2018). This study was conducted from August to September 2019.

2.1. Composition of Pequi Oil

C. brasiliense fruits were collected during the harvest period in January 2019. The oil is manually extracted from the pulp by employing hot water and was purchased from the Grande Sertão cooperative (Montes Claros, MG, Brazil). Fatty acid content was analyzed by gas chromatography (Hartman and Lago, 1973) while carotenoid content was determined by HPLC analysis (Correa et al., 2014). The main fatty acid contents of the pequi oil (PO) were as follows: oleic acid (ω -9; 52.98%), palmitic acid (37.03%), linoleic acid (ω -6; 1.42%), and linolenic acid (ω -3; 1.01%). The contents of carotenoids, in turn, were as follows: β -carotene (167.16 $\mu\text{g}/\text{dL}$), lutein (19.57 $\mu\text{g}/\text{dL}$), and lycopene (3.76 $\mu\text{g}/\text{dL}$).

2.2. Birds, Experimental Design, Housing, and Diets

A total of 1,440 one-day-old male broiler chicks (Cobb500) were obtained from a local hatchery (Pluma, Descalvado, Brazil) with initial weights of 43.70 ± 0.70 g and vaccinated against Gumboro disease, Marek's disease, and infectious bronchitis. Chicks were distributed in a completely randomized design into 48 floor pens (2 m² each) with reused wood shavings as bedding material, and assigned to six dietary treatments. Each treatment had eight replicates with 30 birds per pen, representing an initial density of 15 birds/m². The birds were

housed in an experimental negative pressure shed equipped with four exhaust fans and nebulization system between 1-42 days of age. Supplemental heat was provided with a heating lamp (250 W) per pen, which was withdrawn when the birds were 14 days old. The temperature and lighting programs were set following the Cobb500 Management Guide (2018).

The dietary treatments consisted of: 1) basal diet + Avilamycin (Surmax 200) at the dose rate of 0.05 g/kg diet and no PO (AGP), 2) basal diet without antibiotic and PO (control, CON), 3) CON + 1.5 g/kg PO (1.5 PO), 4) CON + 3.0 g/kg PO (3.0 PO), 5) CON + 4.5 g/kg PO (4.5 PO), and 6) CON + 6.0 g/kg PO (6.0 PO). All birds had *ad libitum* access to feed (in mash form) and water provided by tube feeders and nipple drinkers (five per pen), respectively. The experimental diets were fed in four phases: pre-starter (days 1-7), starter (days 8-21), grower (days 22-35), and finisher (days 36-42). The diets were isoproteic and isocaloric based on corn and soybean meal, and the metabolizable energy value of PO was 30.84 MJ kg⁻¹ in natural matter (data from previous study). Tables 1 and 2 shows the formulation and composition of the diets according to Rostagno et al. (2017).

2.3. Growth Performance

During the experimental period of 42 days, birds were weighed per pen and feed intake was recorded on days 1, 21, and 42, while final body weight (BW), average daily gain (ADG), average daily feed intake (ADFI), and feed conversion ratio (FCR) were calculated. Mortality was checked daily and dead birds were recorded and weighed to adjust estimates of gain, intake, and FCR, as appropriate. The European broiler index (EPI) was calculated at 42 days, according to the following formula: $EPI = [(\% \text{ livability} \times \text{average gained/day (kg)}) \times 100] / FCR$.

2.4. Blood Biochemical Indices and Organ Weight

On the 21st and 42nd days of the experimental period, blood samples from one broiler per replicate (eight birds per pen) were collected through jugular venipuncture in clean sterile tubes and left to coagulate after 2 h of fast. They were then centrifuged at 3,500 rpm for 15 min to separate the serum and stored at -20 °C for analysis. The serum was collected for measurement of total cholesterol (CHO, mg/dL; no. K083), triglycerides (TG, mg/dL; no. K117), high-density lipoprotein (HDL, mg/dL; no. K071), aspartate aminotransferase (AST, U/L; no. K048), and alanine aminotransferase (ALT, U/L; no. K049) using commercial detection kits (LaborLab, Guarulhos, SP, Brazil) in a semi-automated biochemical analyzer (BIO-200S semi-automated, Bioplus Produtos para Laboratórios Ltda., Barueri, SP, Brazil).

Immediately after blood sampling, the broilers were slaughtered via cervical dislocation and the whole spleen, bursa of Fabricius, thymus, pancreas, and liver were removed and weighed. The relative weights of those organs were expressed as percentages of the live weight of the birds.

2.5. Leukocyte Profile and Plasma Oxidative Status

On day 42, blood samples were collected via the jugular vein from one broiler chicken in each replicate pen representative of the average BW of the pen after a 2 h fasting period. From this, the blood samples were carefully moved into tubes containing EDTA-K₃ to determine leukocyte profile and plasma malondialdehyde (MDA) concentrations (stored at -80 °C until further analysis). For leukocyte population, blood samples were stained according to Lucas and Jamroz (1961). Subsequently, 100 leukocytes per sample were counted using an optical microscope (BX51, Olympus, Tokyo, Japan). The heterophil-to-lymphocyte ratio (H/L) for each bird was also calculated. Malondialdehyde content was determined using the thiobarbituric acid-reactive substance (TBARS) method with absorbance at 532 nm (Buege

and Aust, 1978). The results were expressed as nanomole per liter (nmol/L) and each sample was analyzed in duplicate.

2.6. Carcass Yield and Breast Meat Quality

At the end of the feeding trial, after an 8 h fasting period, two birds per treatment (n=16) with body weights close to the average value were selected, individually weighed, and humanely slaughtered via electrical stunning. Head, neck, feet, and abdominal fat (fat surrounding the cloaca and gizzard) were removed from the broilers and then the carcasses were manually eviscerated (removing all of the viscera) to obtain the carcass yield. Carcass yield was calculated from the difference between the eviscerated carcass and the live weight. Abdominal fat was weighed and expressed relative to live weight. Breast muscle, back, wings, thigh, and drumstick were removed and weighed to calculate the cut yield based on eviscerated weight.

Meat quality of the right and left *pectoralis major* was evaluated from two birds per pen. The pH was determined directly in the center of the right-side breast muscle at 24 h postmortem using a pH meter (HI8314, HANNA Instrument Science and Technology Co., Ltd., Beijing, China) equipped with an insertion electrode that was calibrated in buffers at pH 4 and 7 at ambient temperature. Each sample was measured three times and their average value was taken as the final result. Meat color, comprising lightness (L*), redness (a*), and yellowness (b*) values, was measured using a colorimeter (Minolta CR-400, Konica Minolta Sensing, Osaka, Japan). The measurements were performed in triplicate for each right-side muscle sample and were taken from three locations on the surface of each individual sample.

The drip loss of breast meat was determined as described by Christensen (2003). In brief, the left-side meat was cut into slices, each with a thickness of 2.5 cm. Two cylindrical cuts (dorsal position) were made with a fixed blade knife of 25 mm diameter. Each sample (two

per breast) was weighed (W1) and placed in a special EZ-DripLoss container (Danish Meat Research Institute, Taastrup, DEN). After 48 h, the samples were reweighed (W2). Drip loss was then calculated as a percentage, where drip loss (%) = $(W1 - W2) / W1 \times 100\%$. The right-side *pectoralis major* muscles were analyzed for cooking loss and shear force. For cooking loss (water-holding capacity), meat samples were packaged in a plastic bag under vacuum, cooked in a water bath at 85 °C until the internal temperature reached 75 °C as described by Honikel (1998), cooled, and removed of residual moisture using paper towels before reweighing. Cooking loss was calculated as the percentage of weight lost by the sample. Then, shear force was measured perpendicular to the axis of muscle fibers in five replicates for each sample using a TA-CT3 texture analyzer (Brookfield, MA, USA). Measurements were recorded as newtons of shear force strength (N).

2.7. Lipid Oxidation Evaluation

Lipid oxidation of breast meat (eight samples per treatment) was evaluated based on MDA contents at 30, 60, and 90 days of storage at -20 °C according to Tarladgis et al. (1960) with absorbance at 532 nm and expressed as mg MDA/kg meat. Each sample was assayed in duplicate. The TBARS number (mg MDA/kg) was determined using the following equation described by AMSA (Meat Color Measurement Guidelines) (2012): TBARS number (mg MDA/kg) = sample $A_{532} \times (1 \text{ M TBA chromagen}/156,000) \times [(1 \text{ mol/L/M}] \times (0.003 \text{ L}/0.5 \text{ g meat}) \times (72.07 \text{ g MDA/mol MDA}) \times 1,000 \text{ mg/g}) \times 1,000 \text{ g/kg}$.

2.8. Statistical Analysis

Data were checked for normality using the PROC UNIVARIATE procedure of the SAS software (version 9.2; SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) and were analyzed by one-way ANOVA using the PROC GLM procedure of the same software. Dunnett's range test was performed to compare the AGP treatment with the other treatments. Linear and quadratic

effects of dietary PO inclusion levels were studied using polynomial contrasts, excluding the AGP treatment. The standard error of the mean was also calculated. Statistical significance was determined at $P < 0.05$.

3. Results

3.1 Effects of Pequi Oil on Broiler Growth Performance

Dietary inclusion of PO significantly influenced the BW of broilers on day 21 and ADG, ADFI, and FCR between days 1 and 21 as shown in Table 3. The BW and ADG of broilers linearly decreased ($P=0.025$; $P=0.022$, respectively) among PO treatments. The inclusion of 1.5 and 4.5 g/kg of PO provided the best results ($P > 0.05$ according to Dunnett's test), similar to the broilers fed the AGP diet (Avilamycin). The ADFI of the 6.0 g/kg PO group was lower compared with the AGP diet ($P=0.037$ according to Dunnett's test). Pequi oil levels quadratically increased ($P=0.001$) feed FCR, with the highest value measured in the 3.0 g/kg PO group, and significantly differed when compared with the AGP diet according to Dunnett's test.

However, in the overall period (days 1 to 42), FCR and EPI improved linearly ($P=0.036$; $P=0.046$, respectively) as the levels of dietary PO increased. Values for ADG and ADFI did not significant differ ($P > 0.05$). The broilers fed the AGP diet (from days 1 to 42 of age) exhibited no differences in performance parameters compared with the others treatments ($P > 0.05$ according to Dunnett's test). Finally, no significant differences were observed regarding livability over the whole trial period.

3.2. Effects of Pequi Oil on Serum Biochemical Indices, Blood Leukocyte Profile, and Oxidative Status

The levels of PO inclusion did not affect total cholesterol, triglycerides, HDL, or concentration of hepatic enzymes (AST and ALT) on days 21 and 42, nor did they affect blood leukocyte profile, as shown in Tables 4 and 5, respectively. However, the plasma oxidation (MDA concentration) of broilers fed PO was lower ($P < 0.001$ according to Dunnett's test) compared with broilers fed the AGP diet without PO (Table 4).

3.3. Effects of Pequi Oil on Relative Organ Weights, Carcass Yield, and Breast Meat Quality

Relative organ weights on days 21 and 42, and carcass and cut yields on day 42 were not affected ($P > 0.05$) by dietary PO levels, as shown in Tables 6 and 7, respectively. Those parameters were similar to those of the broilers fed the AGP diet ($P > 0.05$ by Dunnett's test). Dietary treatments did not influence ($P > 0.05$) pH 24 h postmortem, lightness (L^*), or yellowness (b^*) (Table 8). Increasing PO level decreased redness (a^*), cooking loss, and shear force quadratically ($P < 0.05$).

3.4. Effect of Pequi Oil on MDA Concentrations of Breast Meat in Broilers after Storage

Table 9 shows the breast meat MDA concentration on days 30, 60, and 90 of refrigerated storage. Dietary inclusion of PO significantly influenced meat MDA values of broilers on day 30 of storage, with the lowest MDA measured in the 3.0 g/kg PO group when compared with the AGP diet according to Dunnett's test ($P = 0.027$). Over 90 days of storage, the meat MDA of broilers linearly decreased ($P = 0.049$) with increasing PO levels.

4. Discussion

Growth Performance

In general, the inclusion of essential oils and herbal extracts in broiler feed has been shown to improve FCR (Windisch et al., 2008; Peng et al., 2016; Chowdhury et al., 2018), whereas the effect on BW and ADFI can remain unchanged (Brenes and Roura, 2010). Similarly, the FCR of the chickens in the present study improved linearly with PO inclusions in the overall period. In addition, there was an increase in EPI with PO levels, which is attributed to the higher ADG and/or lower FCR and mortality rate in the respective experimental diets, an important index used to evaluate the growing performance of broilers. Although not significant, the final BW of chickens supplemented with 6.0 g/kg PO in the diet was 2.41% higher compared to the AGP diet (3,317 vs. 3,239 g), which is favorable for the greatest economic gain in production. Thus, the beneficial effects observed can be attributed to the bioactive components in PO (carotenoids) that have antioxidant action (Zhang et al., 2014; Malacrida et al., 2018) on the health of the intestinal mucosa (Moreno et al., 2016) and in anti-inflammatory and immunomodulatory activities (Miranda-Vilela et al., 2014). That contributes to better performance and these results indicate that PO can be used as a potential substitute for AGPs in broiler diets.

Blood Indices, Relative Organ Weigh and Serum MDA Concentrations

The results of leukocyte profile and the relative weight of organs corroborate previous studies which found no differences in these parameters with the use of essential oils, antioxidant pigments, or herbal extracts in the diets of chickens reared under normal environmental conditions (Chowdhury et al., 2018; Zhang et al., 2018). PO levels did not affect the indicators of liver function (i.e., AST and ALT), which indicates that the oil did not induce a toxic or adverse effect. ALT and AST are intracellular enzymes whose plasma concentrations increase with hepatocellular lesion (Hosseini et al., 2019). The serum

concentrations of CHO, TG, and HDL were not altered in chickens supplemented with PO levels. In contrast to our results, Cho et al. (2014) reported that the dietary addition of phytogetic additives (mix) decreased serum levels of CHO and TG and increased HDL. Certainly, some compounds are more often associated with hypocholesterolemic properties (Lee et al., 2004). The discrepancy in the results can be attributed to differences in the composition of phytogetic feed additives and their bioactive molecules (Hong et al., 2012; Mehdi et al., 2018).

Malonaldehyde is a secondary marker of lipid peroxidation (Del et al., 2005). In the present study, the inclusion of PO in chicken diets reduced the concentration of serum MDA and these results are in agreement with previous studies by Miranda-Vilela et al. (2014), Colombo et al. (2015), and Sahin et al. (2016). It is reasonable to assume that the results are related to the presence of β -carotene, lycopene, and lutein in PO, as these compounds have strong antioxidant activity (Zhang et al., 2014). Carotenoids are hydrophobic molecules exercising their functions in biological membranes (Jomova and Valko, 2013), therefore, they are capable of neutralizing ROS by preventing and interrupting lipid peroxidation reactions (Stahl and Sies, 2003; Britton, 2020).

Carcass Yield, Meat Breast Quality and Meat MDA Concentration

In this study, PO levels did not influence carcass or cut yields, as well as abdominal fat. In addition, diets containing AGP (Avilamycin) were shown to be similar. This result is promising since residual limits to the use of AGPs in animal products (Ronquillo and Hernandez, 2017), and their impact on public health (Diarra et al., 2010) and on the ecosystem (Menz et al., 2019) have already been discussed. In addition, changes in habits influenced by the current circumstances of the COVID-19 pandemic will sharply readjust, undoubtedly, food security and the demand for healthier and more natural products by

consumers. Therefore, investigations for new natural products such as PO are fundamental and necessary in poultry production.

Sensory characteristics such as color, drip loss, cooking loss, and shear force are fundamental factors in the choice and acceptance of meat products by consumers (Jiang and Xiong, 2016; Silva et al., 2020). In our study, dietary supplementation with PO reduced the values of a^* (redness), cooking loss, and shear force at the highest levels of PO. Similarly, a study by Aljumaah et al. (2020), with phytogetic additives, found reductions in cooking loss and shear force. The mode of action of these additives, however, is not clear. Nonetheless, the values observed in this study are within the acceptable range for meat characteristics, thus meeting current market requirements (Allen et al., 1998; Petracci et al., 2015).

Meat products are susceptible to lipid oxidation processes and deterioration of meat quality during storage due to high concentrations of PUFAs (Lin et al., 1989; Wenk, 2003), causing undesirable changes in the sensory and nutritional characteristics of meat, and consequently, generating economic losses to industries (Jiang and Xiong, 2016). In this perspective, the use of natural compounds with antioxidant activity is desirable and can play a vital role in shelf life, besides increasing the nutritional value of meat for health benefits to consumers (Zhang et al., 2016). In this research, we noticed that the PO levels reduced the concentration of MDA in breast meat compared to the diets without PO (AGP and CON), however, this reduction was significantly linear at 90 days of storage, similar to the results found with phytogetic feed additives by Sevcikova et al. (2008) and Ashour et al. (2020). Therefore, PO levels demonstrated potential action to protect against lipid peroxidation in the meat of broilers fed diets enriched with pequi oil, probably due to the presence of carotenoids that enter the circulatory system and are distributed and retained in muscles and other tissues, (Koutsos et al., 2003; Surai et al., 2003), which also confirms the reduction in serum MDA in this study.

5. Conclusions

Our results suggest that PO in the diet contributed to improving performance during the experimental period. PO did not cause any adverse effect on blood profile, liver function, carcass yield, or meat quality. In addition, PO inclusion alleviated oxidative stress in plasma and in breast muscle, thus it can improve the health and quality of broiler meat. Therefore, dietary supplementation with PO may be a promising alternative to the use of AGPs such as Avilamycin to improve poultry production.

Acknowledgments

This study was made possible by a sponsored (2018/25363-2) from the São Paulo Research Foundation (FAPESP). The authors would like to thank the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brazil (CAPES) for financial (student grant - Finance Code 001) support of this research.

References

- Aljumaah M.R., Suliman, G.M., Alabdullatif, A., Abudabos A.M., 2020. Effects of phytobiotic feed additives on growth traits, blood biochemistry, and meat characteristics of broiler chickens exposed to *Salmonella typhimurium*. *Poult. Sci.* <https://doi.org/10.1016/j.psj.2020.07.033>.
- Allen, C.D., Fletcher, D.L., Northcutt, J.K., Russell, S.M., 1998. The relationship of broiler breast color to meat quality and shelf-life. *Poult. Sci.* 77,361-366.
- Amad, A.A., Manner, K., Wendler, K.R., Neumann, K., Zentek, J., 2011. Effects of a phytogenic feed additive on growth performance and ileal nutrient digestibility in broiler chickens. *Poult. Sci.* 90, 2811-2816
- AMSA - American Meat Science Association. Meat Color Measurement Guidelines 2012. Champaign, Illinois USA. 100p.
- Ashour, E.A., Jumah, M.B., Sayed-Ahmed, E.T.A., Osman, A.O., Taha, A.E., Momenah, M.A., Allam, A.A., Swelum, A.A., El-Hack, M.E.A., 2020. Effects of dried okra fruit (*Abelmoschus esculentus* L.) powder on growth, carcass characteristics, blood indices, and

- meat quality of stored broiler meat. *Poult. Sci.* 99, 3060-3069. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2020.03.009>
- Bartkiene, E., Ruzauskas, M., Bartkevics, V., Pugajeva, I., Zavistanaviciute, P., Starkute, V., Zokaityte, E., Lele, V., Dauksiene, A., Grashorn, M., Hoelzle, L.M., Mendybayeva, A., Ryshyanova, R., Gruzauskas, R., 2020. Study of the antibiotic residues in poultry meat in some of the EU countries and selection of the best compositions of lactic acid bacteria and essential oils against *Salmonella enterica*. *Poult. Sci.* 99, 4065–4076. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2020.05.002>.
- Brenes, A., Roura, E., 2010. Essential oils in poultry nutrition: main effects and modes of action. *Anim Feed Sci Tech* 158,1-14. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2010.03.007>
- Britton, G., 2020. Carotenoid research: History and new perspectives for chemistry in biological systems. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids.* 1865,1586-1599. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2020.158699>
- Buege, J.A., Aust, S.D., 1978. Microsomal lipid peroxidation. *Methods in Enzymology*, New York
- Cobb-Vantress, 2018. Broiler Management Guide. Arkansas, USA. Accessed Apr. 2019. <https://www.cobbvantress.com/products/cobb500>.
- Carvalho, I.T, Santos, L., 2016. Antibiotics in the aquatic environments: a review of the European scenario. *Environ Int.* 94,736-757. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2016.06.025>
- Chistensen, L.B., 2003. Drip loss sampling in porcine m. longissimus dorsi. *Meat Sci.* 63,469-477. [https://doi.org/10.1016/S0309-1740\(02\)00106-7](https://doi.org/10.1016/S0309-1740(02)00106-7)
- Cho, J.H., Kim, H.J., Kim, I.H., 2014. Effects of phytogetic feed additive on growth performance, digestibility, blood metabolites, intestinal microbiota, meat color and relative organ weight after oral challenge with *Clostridium perfringens* in broilers. *Livest. Sci.* 160,82-88. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2013.11.006>
- Chowdhury, S., Mandal, G.P., Patra, A.K., 2018. Different essential oils in diets of chickens: 1. Growth performance, nutriente utilization, nitrogen excretion, carcass traits and chemical composition of meat *Animal. Anim. Feed Sci. Technol.* 236, 86-97. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2017.12.002>
- Correa, C.R., Chen, C.Y.O., Aldini, G., Rasmussen, H., Ronchi, C.F., Ronchi, C.B., Cho, S.M., Blumberg, J.B., Yeum, K.J., 2014. Bioavailability of plant pigment phytochemicals in *Angelica keiskei* in older adults: A pilot absorption kinetic study. *Nutr Res Pract.* 8,550-557. <https://doi.org/10.4162/nrp.2014.8.5.550>
- Colombo, N.B.R., Rangel, M.P., Martins, V., Hage, M., Gelain, D.P., Barbeiro D.F, Grisolia, C.K., Parra, E.R., Capelozzi, V.L. 2015. Caryocar brasiliense camb protects against genomic and oxidative damage in urethane-induced lung carcinogenesis. *Braz J Med Biol Res.*48,852-862. <https://doi.org/10.1590/1414-431x20154467>

- Del R.D., Stewart, A.J., Pellegrini, N., 2005. A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 15, 316–28, 2005. Doi: 10.1016/j.numecd.2005.05.003
- De Oliveira, S. D., Flores, F. S., Dos Santos, L. R., Brandelli, A., 2005. Antimicrobial resistance in *Salmonella enteritidis* strains isolated from broiler carcasses, food, human and poultry-related samples. *Int. J. Food Microbiol.* 97, 297–305. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.04.022>
- Diarra, M.S., Rempel, H., Champagne, J., Pritchard, J., Topp, E., 2010. Distribution of antimicrobial resistance and virulence genes in enterococcus spp. and characterization of isolates from broiler chickens. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 8033-8043. Doi: 10.1128/AEM.01545-10
- Engberg, R. M., Hedemann, M.S., Leser, T.D., Jensen, B.B., 2000. Effect of zinc bacitracin and salinomycin on intestinal microflora and performance of broilers. *Poult. Sci.* 79,1311-1319. <https://doi.org/10.1093/ps/79.9.1311>
- Forgetta, V., Rempel, H., Malouin, F., Vaillancourt, Jr R., Topp, E., Dewar, K., Diarra, M.S., 2012. Pathogenic and multidrug-resistant *Escherichia fergusonii* from broiler chicken. *Poult. Sci.* 91,512-525. <https://doi.org/10.3382/ps.2011-01738>
- Fung, S., Rempel, H., Forgetta, V., Dewar, E.T.K., Diarra, M.S., 2013. “Ceca microbiome of mature broiler chickens fed with or without salinomycin,” in the gut microbiome: the effector/regulatory immune network conference (B3). Keystone symposia onmolecular and cellular biology (Taos). New Mexico, USA.
- Gadde, U. D., Oh, S., Lillehoj, H. S., Lillehoj, E. P., 2018. Antibiotic growth promoter’s virginiamycin and bacitracin methylene disalicylate alter the chicken intestinal metabolome. *Sci. Rep.* 8, 3592. doi:10.1038/s41598-018-22004-6
- Hartman, L., Lago, L.R., 1973. Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. *Lab. Pract.* 22 ,475-476.
- Hong, J.C., Steiner, T., Aufy, A., Lein, T.F., 2012. Effects of supplemental essential oil on growth performance, lipid metabolites and immunity, intestinal characteristics, microbiota and carcass traits in broiler. *Livest. Sci.* 144, 253-262. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2011.12.008>
- Honikel, K.O., 1998. Reference methods for the assessment of physical characteristics of meat. *Meat Sci.* 49, 447-457.
- Jang, I.S., Ko, Y.H., Kang, S.Y., Lee, C.Y., 2007. Effect of a commercial essential oil on growth performance, digestive enzyme activity and intestinal microflora population in broiler chickens. *Anim. Feed Sci. Technol.* 134, 304-315.
- Jiang, J., Xiong, Y.L., 2016. Natural antioxidants as food and feed additives to promote health benefits and quality of meat products: A review. *Meat Sci.* 120,107-117. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2016.04.005>

- Jomova, K., Valko, M., 2013. Health protective effects of carotenoids and their interactions with other biological antioxidants. *Eur. J. Med. Chem.* 70,102-110.
Doi: 10.1016/j.ejmech.2013.09.054
- Koutsos, E.A. Clifford, A.J., Calvert, C.C., Klasing, K.C., 2003. Maternal Carotenoid Status Modifies the Incorporation of Dietary Carotenoids into Immune Tissues of Growing Chickens (*Gallus gallus domesticus*). *J. Nutr.* 133,1132-1138. <https://doi.org/10.1093/jn/133.4.1132>
- Lee, K.W., Everts, H., Kappert, H.J., Beynen, A.C., 2004. Growth Performance of Broiler Chickens Fed a Carboxymethyl Cellulose Containing Diet with Supplemental Carvacrol and/or Cinnamaldehyde. *Int.J. Poult. Sci.*3,619–622. Doi: 10.3923/ijps.2004.619.622
- Lin, C.F., Gray, J.I., Asghar, A., Buckleg, D.J., Booren, A.M., Flegal, C.J., 1989. Effects of dietary oils and a -tocopherol supplementation on lipid composition and stability of broiler meat. *J. Food Sci.* 54: 1457–1460.
- Lucas, A. M., and C. Jamroz, 1961. *Atlas of Avian Hematology*. Agriculture Monograph 25, United States Department of Agriculture.
- Machado, M.T.C., Mello, B.C.B.S., Hubinger, M.D., 2015. Evaluation of pequi (*Caryocar Brasiliense* Camb.) aqueous extract quality processed by membranes. *Food Bioprod. Process.* 95, 304-312. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2014.10.013>
- Malacrida, C.R., Moraes I.C.F., de Rosso, V.V., Rodrigues C. E. da C., de Souza, A.C., 2018. Effect of the application of an enzymatic pretreatment o bioactive compounds of *Caryocar brasiliense* Camb pulp oil. *J. Food Process. Preserv.* 42,1-6.
<https://doi.org/10.1111/jfpp.13828>
- Manzetti, S., Ghisi, R., 2014. The environmental release and fate of antibiotics. *Mar Pollut.* 79, 7-15. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2014.01.005>
- Mehdi, Y., Letourneau-Montminy, M.P., Gaucher, M.L., Chorfi, Y., Suresh, G., Rouissi, T., Brar, S.K., Côté, C., Ramirez, A.A., Godbout, S., 2018. Use of antibiotics in broiler production: Global impacts and Alternatives. *Anim. Nutr.* 4, 170-178.
<https://doi.org/10.1016/j.aninu.2018.03.002>
- Menz, J., Olsson, O., Kümmerer, K., 2019. Antibiotic residues in livestock manure: Does the EU risk assessment sufficiently protect against microbial toxicity and selection of resistant bacteria in the environment?. *J. Hazar Mater.* 379,1-9. Doi:10.1016/j.jhazmat.2019.120807
- Miranda-Vilela, A.L., Grisolia, C.K., Sabioni, I., Mendonca, M.A., 2009. Characterization of the major nutritional components of *Caryocar brasiliense* fruit pulp by nmr spectroscopy. *Quím. Nova.* 32,2310-2313. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422009000900013>.
- Miranda-Vilela, A.L., Grisolia, C.K., Longo, J.P.F., Peixoto, R.C.A., de Almeida, M.C., Barbosa, L.C.P., Roll, M.M., Portilho, F.A., Estevanato, L.L.C., Bocca, A.L., Bão, S.N., Lacava, G.M., 2014. Oil rich in carotenoids instead of vitamins C and E as a better option to reduce doxorubicin-induced damage to normal cells of Ehrlich tumor-bearing mice:

Hematological, toxicological and histopathological evaluations. *J Nutr Biochem.* 25,1161-1176. doi: 10.1016/j.jnutbio.2014.06.005

Montalvão, T.M., Miranda-Vilela, A.L., Grisolia, C., Neto, L.S., Miranda-Vilela, L., 2016. Antioxidant Pequi (*Caryocar Brasiliense*) Oil Capsules and Antioxidant Effect of Vitamin D and Physical Activity on Systemic Lupus Erythematosus Patients. *J. Rheum. Dis. Treat.* 2, 1-7. Doi: 10.23937/2469-5726/1510029

Oliveira, M.N.S., Gusmão, E., Lopes, P.S.N., Simões, M.O.M., Ribeiro, L.M., Dias, B.A.S., 2006. Estágio de maturação dos frutos e fatores relacionados aos aspectos nutritivos e de textura da polpa de pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.). *Revs. Braz. Frutic.* 28, 80-386. <https://doi.org/10.1590/S0100-29452006000300010>

Peng, Q.Y., Li, J.D., Duan, Z.Y., Wu, Y.P., 2016. Effects of dietary supplementation with oregano essential oil on growth performance, carcass traits and jejunal morphology in broiler chickens. *Anim Feed Sci Tech.* 214,148-153. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2016.02.010>

Petracci, M., Mudalal, S., Soglia, f., Cavani, C., 2015. Meat quality in fast-growing broiler chickens. *Worlds Poult Sci J.* 7, 363-374, 2015. <https://doi.org/10.1017/S0043933915000367>

Ronquillo, G. M., Hernandez, J.C. A., 2017. Antibiotic and synthetic growth promoters in animal diets: review of impact and analytical methods. *Food Contr.* 72, 255-267. Part B. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.03.001>

Rostagno, H.S., Albino, L.F.T., Hannas, M.I., Donzete, J.L., Sakomura, N.K., Perazzo, F. G., Saraiva, A., Teixeira, M.L., Rodrigues, P.B., de Oliveira, R.F., Barreto, S. L de T., Brito, C.O., 2017. Tabelas Brasileiras para Aves e Suínos: composição de alimentos e exigências nutricionais. 4th. ed. Animal Science Department, Federal University of Viçosa, MG.

Sahin, K., Orhan, O., Tuzcu, M., Sahin, N., Hayirli, A., Bilgili, A., Kucuk., O., 2016. Lycopene activates antioxidant enzymes and nuclear transcription factor systems in heat stressed broilers. *Poult. Sci.* 95, 1088-1095. <https://doi.org/10.3382/ps/pew012>

SAS Institute. SAS User's guide: Statistics. Version 9.2. Cary, NC, 2008

Sevcikova, S., Srivan, M., Dlouhá, G., 2008. The effect of lycopene supplementation on lipid profile and meat quality of broiler chickens. *Czech J. Anim. Sci.* 53,431-440. <https://doi.org/10.17221/350-CJAS>

Silva, J. S., Rodriguez, F.D., Trettel, M. Abal, R.T., Lima, C.G., Yoshikawa, C.Y.C., Zanetti, M.A., 2020. Performance, carcass characteristics and meat quality of nellore cattle supplemented with supranutritional doses of sodium selenite or seleniumenriched. *Animal.* 14, 215-222. <https://doi.org/10.1017/S1751731119001265>

Stahl, W., sies, H., 2003. Antioxidant activity of carotenoids. *Mol. Aspects. Med.* 24, 345-35. [https://doi.org/10.1016/S0098-2997\(03\)00030-X](https://doi.org/10.1016/S0098-2997(03)00030-X)

Surai, A.P., Surai, P.F., Steinberg, W., Wakeman, W.G., Speake, B.K., Sparks, N.H.C., 2003. Effect of canthaxanthin content of maternal diet on the antioxidant system of the developing chick. *Br. Poult. Sci.* 44, 612-619. <https://doi.org/10.1080/00071660310001616200>

Tarladgis, B. G., Watts, B.M., Younathan. M.T., 1960. A distillation method for the quantitative determination of malonaldehyde in rancid foods. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 37,44–48

Vale, A. F., Ferreira, H.H., Benetti, E.J., Rebelo, A.C.S., Figueiredo, A.C.R., Barbosa, E.C., Simões, K., 2018. Antioxidant effect of the pequi oil (*Caryocar brasiliense*) on the hepatic tissue of rats trained by exhaustive swimming exercises. *Braz. J. Biol.* 79, 257-262. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.180015>

Van Boeckel, T.P., Brower, C., Gilbert, M., Grenfell, B.T., Levin, S.A., Robinson, T. P., Teillant, A., Laxminaraya, R., 2015. Global trends in antimicrobial use in food animals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 112, 5649–5654. <https://doi.org/10.1073/pnas.1503141112>

Wenk, C., 2003. Herbs and botanicals as feed additives in monogastric animals. *Asian. Australas J. Anim. Sc.* 16, 282–289. <https://doi.org/10.5713/ajas.2003.282>

Windisch, W.M., Schedle, K., Plitzner, C., Kroismayr, A., 2008. Use of phytogetic products as feed additives for swine and poultry. *J Anim. Sci.* 86, 140–148, 2008. doi: 10.2527/jas.2007-0459

Zhang, J., Hou, X., Ahmad, H., Zhang, H., Zhang, L., Wang T., Zhang, J., Hou, X., Ahmad, H., Zhang, H., Zhang, L., Wang, T., 2014. Assessment of free radicals scavenging activity of seven natural pigments and protective effects in AAPH-challenged chicken erythrocytes. *Food Chem.* 145, 57-65. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.08.025>

Zhang, J.F., Bai, K.W., Su, W.P., Wang, A.A., Zhang, L.L., Huang, K.H., Wang, T., 2018. Curcumin attenuates heat-stress-induced oxidant damage by simultaneous activation of GSH-related antioxidant enzymes and Nrf2-mediated phase II detoxifying enzyme systems in broiler chickens. *Poult. Sci.* 97, 1209–1219. <http://dx.doi.org/10.3382/ps/pex408>

Zhang, J., Wang, Y., Pan, D.D., Cao, J.X., Shao, F., Chen, Y.J., Sun, Y.Y., Ou, C.R., 2016. Effect of black pepper essential oil on the quality of fresh pork during storage. *Meat Sci.* 117, 130-136. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2016.03.002>

Zhang, K.Y., Yan, F., Keen, C.A., Waldroup, P.W., 2005. Evaluation of microencapsulated essential oils and organic acids in diets for broiler chickens. *Int. J. Poult. Sci.* 4, 612–619. Doi: 10.3923/ijps.2005.612.619

Table 1. Ingredients and chemical composition of the experimental diets (Pre-starter diets, provided during days 1–7; Starter diets, provided during days 8–21) 121

Ingredients (g/kg)	Levels of pequi oil											
	Pre -starter						Starter					
	AGP	CON	1.5	3.0	4.5	6.0	AGP	CON	1.5	3.0	4.5	6.0
Corn	517.82	517.92	517.43	516.93	516.44	515.94	549.84	549.94	549.45	548.95	548.45	547.96
Soybean meal (CP 46%)	422.37	422.35	422.44	422.53	422.61	422.70	392.51	392.49	392.58	392.66	392.75	392.84
Soybean oil	17.80	17.76	16.67	15.58	14.49	13.40	19.33	19.29	18.20	17.11	16.02	14.94
Pequi oil	-	-	1.50	3.00	4.50	6.00	-	-	1.50	3.00	4.50	6.00
DL-Methionine (99%)	3.36	3.36	3.36	3.36	3.36	3.36	3.15	3.15	3.15	3.15	3.15	3.15
L-Lysine-HCL (99%)	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25	1.39	1.39	1.39	1.39	1.39	1.39
L-Threonine (98,5%)	0.58	0.58	0.58	0.58	0.58	0.58	0.56	0.56	0.56	0.56	0.56	0.56
Dicalcium phosphate	18.72	18.72	18.72	18.72	18.72	18.72	16.04	16.04	16.04	16.04	16.04	16.04
Limestone	8.86	8.86	8.86	8.86	8.86	8.86	8.26	8.26	8.26	8.26	8.26	8.26
Cocciostat (Coxistac 12%) ³	0.55	0.55	0.55	0.55	0.55	0.55	0.55	0.55	0.55	0.55	0.55	0.55
Choline chloride (60%)	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Vitamin premix ¹	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Mineral premix ²	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Sodium bicarbonate	1.14	1.14	1.14	1.14	1.14	1.14	0.83	0.83	0.83	0.83	0.83	0.83
Salt	4.50	4.50	4.50	4.50	4.50	4.50	4.50	4.50	4.50	4.50	4.50	4.50
Antibiotic growth promoter ⁴	0.05	-	-	-	-	-	0.05	-	-	-	-	-
Total	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000
Calculation of nutrientes												
Metabolizable energy, MJ/kg	12.35	12.35	12.35	12.35	12.35	12.35	12.56	12.56	12.56	12.56	12.56	12.56
Crude Protein, g/kg	240.7	240.7	240.7	240.7	240.7	240.7	229.3	229.3	229.3	229.3	229.3	229.3
Calcium, g/kg	9.6	9.6	9.6	9.6	9.6	9.6	8.6	8.6	8.6	8.6	8.6	8.6
Phosphorus (Available), g/kg	4.7	4.7	4.7	4.7	4.7	4.7	4.1	4.1	4.1	4.1	4.1	4.1
Potassium, g/kg	9.4	9.4	9.4	9.4	9.4	9.4	8.9	8.9	8.9	8.9	8.9	8.9
Sodium, g/kg	2.2	2.2	2.2	2.2	2.2	2.2	2.1	2.1	2.1	2.1	2.1	2.1
Chlorine, g/kg	3.4	3.4	3.4	3.4	3.4	3.4	3.4	3.4	3.4	3.4	3.4	3.4
Lysine (digestible), g/kg	14.3	14.3	14.3	14.3	14.3	14.3	13.6	13.6	13.6	13.6	13.6	13.6
Methionine (digestible), g/kg	6.8	6.8	6.8	6.8	6.8	6.8	6.4	6.4	6.4	6.4	6.4	6.4
Methionine+Cystine (digestible), g/kg	10.6	10.6	10.6	10.6	10.6	10.6	10.1	10.1	10.1	10.1	10.1	10.1
Threonine (digestible), g/kg	9.9	9.9	9.9	9.9	9.9	9.9	9.4	9.4	9.4	9.4	9.4	9.4

¹Provided per kg of diet: Vitamin A (mín) 10000 U.I.; Vitamin D3 (mín) 2500 U.I.; Vitamin E (mín) 17.5 U.I.; Vitamin K3 (mín) 2 mg; Thiamin (mín) 1.5 mg; Riboflavin (mín) 7.5 mg; Niacina (mín) 25 mg; Pantothenic acid (mín) 15 mg; Pyridoxine, (mín) 2 mg; Folic acid (mín) 0,5 mg; Biotin (mín) 60 mcg; B12 (mín) 15 mcg. ²Provided per kg of diet: Iron (mín) 30 mg; Copper (mín) 6 mg; Manganese (mín) 70 mg; Zinc (mín) 50 mg; Iodine (mín) 1 mg. Selenium (mín) 0,35 mg; Cobalt (mín) 0,2 mg. ³ Salinomycin (66 ppm). ⁴ Avilamycin (10ppm).

Table 2. Ingredients and chemical composition of the experimental diets (Grower diets, provided during days 22–35; Finisher diets, provided during days 36–42)¹²²

Ingredients (g/kg)	Levels of pequi oil											
	Grower						Finisher					
	AGP	CON	1.5	3.0	4.5	6.0	AGP	CON	1.5	3.0	4.5	6.0
Corn	619.67	619.77	619.27	618.78	618.28	617.78	681.21	681.21	680.71	680.21	679.72	679.22
Soybean meal (CP 46%)	322.41	322.39	322.48	322.56	322.65	322.74	269.69	269.69	269.77	269.86	269.95	270.03
Soybean oil	22.77	22.73	21.64	20.55	19.46	18.37	19.20	19.20	18.12	17.03	15.94	14.85
Pequi oil	-	-	1.50	3.00	4.50	6.00	-	-	1.50	3.00	4.50	6.00
DL-Methionine (99%)	2.79	2.79	2.79	2.79	2.79	2.79	2.39	2.39	2.39	2.39	2.39	2.39
L-Lysine-HCL (99%)	1.94	1.94	1.94	1.94	1.94	1.94	2.18	2.18	2.18	2.18	2.18	2.18
L-threonine (98,5%)	0.64	0.64	0.64	0.64	0.64	0.64	0.58	0.58	0.58	0.58	0.58	0.58
Dicalcium phosphate	14.23	14.23	14.23	14.23	14.23	14.23	10.48	10.48	10.48	10.48	10.48	10.48
Limestone	6.97	6.97	6.97	6.97	6.97	6.97	6.67	6.67	6.67	6.67	6.67	6.67
Cocciostat (Coxistac 12%) ³	0.55	0.55	0.55	0.55	0.55	0.55	-	-	-	-	-	-
Choline chloride (60%)	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Vitamin Premix ¹	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Mineral Premix ²	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Sodium bicarbonate	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.11	0.11	0.11	0.11	0.11	0.11
Salt	4.50	4.50	4.50	4.50	4.50	4.50	4.50	4.50	4.50	4.50	4.50	4.50
Antibiotic growth promoter ⁴	0.05	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Total	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000
Calculation of nutrients												
Metabolizable energy, MJ/kg	12.98	12.98	12.98	12.98	12.98	12.98	13.19	13.19	13.19	13.19	13.19	13.19
Crude Protein, g/kg	202.5	202.5	202.5	202.5	202.5	202.5	182.8	182.8	182.8	182.8	182.8	182.8
Calcium, g/kg	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	6.2	6.2	6.2	6.2	6.2	6.2
Phosphorus (Available), g/kg	3.7	3.7	3.7	3.7	3.7	3.7	2.9	2.9	2.9	2.9	2.9	2.9
Potassium, g/kg	7.9	7.9	7.9	7.9	7.9	7.9	7.1	7.1	7.1	7.1	7.1	7.1
Sodium, g/kg	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	1.9	1.9	1.9	1.9	1.9	1.9
Chlorine, g/kg	3.4	3.4	3.4	3.4	3.4	3.4	3.4	3.4	3.4	3.4	3.4	3.4
Lysine (digestible), g/kg	12.2	12.2	12.2	12.2	12.2	12.2	11.0	11.0	11.0	11.0	11.0	11.0
Methionine (digestible), g/kg	5.7	5.7	5.7	5.7	5.7	5.7	5.1	5.1	5.1	5.1	5.1	5.1
Methionine+Cystine (digestible), g/kg	9.0	9.0	9.0	9.0	9.0	9.0	8.1	8.1	8.1	8.1	8.1	8.1
Threonine (digestible), g/kg	8.4	8.4	8.4	8.4	8.4	8.4	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6

¹ Provided per kg of diet: Vitamin A (mín) 10000 U.I.; Vitamin D3 (mín) 2500 U.I.; Vitamin E (mín) 17.5 U.I.; Vitamin K3 (mín) 2 mg; Thiamin (mín) 1.5 mg; Riboflavin (mín) 7.5 mg; Niacina (mín) 25 mg; Pantothenic acid (mín) 15 mg; Pyridoxine, (mín) 2 mg; Folic acid (mín) 0,5 mg; Biotin (mín) 60 mcg; B12 (mín) 15 mcg. ² Provided per kg of diet: Iron (mín) 30 mg; Copper (mín) 6 mg; Manganese (mín) 70 mg; Zinc (mín) 50 mg; Iodine (mín) 1 mg. Selenium (mín) 0,35 mg; Cobalt (mín) 0,2 mg. ³ Salinomycin (66 ppm). ⁴ Avilamycin (10ppm).

Table 3- Effect of dietary pequi oil (PO) levels on growth performance of broiler chickens

Item ^a	Experimental diets (g/kg diet) ^b						SEM	P-value of Contrasts ^c		
	AGP	CON	1.5PO	3.0PO	4.5PO	6.0PO		AGP vs all	linear	quadratic
BW, g										
21d	1045.60	1031.40	1037.80	998.48*	1029.31	1003.45*	8.56	0.011	0.025	0.863
42d	3239.00	3239.00	3267.70	3253.40	3271.34	3317.20	14.15	0.432	0.159	0.614
1 to 21 d										
ADG, g/day/bird	47.69	47.06	47.33	45.47*	46.93	45.70*	0.40	0.011	0.022	0.834
ADFI, g/day/bird	63.75	62.12	63.62	62.82	63.29	61.43*	0.59	0.037	0.370	0.168
FCR	1.34	1.32	1.35	1.38*	1.35	1.35	0.01	0.006	0.060	0.001
Livability, %	100.00	99.58	99.58	100.00	99.17	99.58	0.85	0.309	0.723	0.765
1 to 42d										
ADG, g/day/bird	76.07	76.09	76.76	76.42	76.84	77.94	0.34	0.426	0.161	0.608
ADFI, g/day/bird	115.12	115.99	113.84	113.37	114.08	112.10	0.50	0.351	0.053	0.732
FCR	1.52	1.54	1.50	1.50	1.50	1.47	0.08	0.300	0.036	0.795
Livability,%	96.24	95.83	95.00	95.82	95.00	93.75	0.38	0.268	0.168	0.268
EPI										
42 d,	481.50	474.30	487.53	490.13	486.09	497.91	2.98	0.463	0.046	0.721

^aBW: Final body weight; ADG: Average daily gain; ADFI: Average daily feed intake; FCA: Feed conversion ratio; EPI = [(% livability x average gained/day (kg)) x 100]/ FCR

^bAGP (basal diet with Avilamycin and no PO); CON (basal diet without AGP and PO); 1.5PO (basal diet containing 1.5 g PO/kg diet); 3.0PO (basal diet containing 3.0 g PO/kg diet); 4.5PO (basal diet containing 4.5 g PO/kg diet); 6.0PO (basal diet containing 6.0 g PO/kg diet).

SEM: Standard error of the means. n= 8 replicate pens per treatment (30 birds/pen). ^cOrthogonal polynomials were used to evaluate linear and quadratic responses to the levels of PO treatment. Means followed by * differ significantly from the AGP treatment according to Dunnett's test ($P \leq 0.05$).

Table 4- Effects of dietary pequi oil (PO) levels on serum biochemical indices and serum oxidation in broiler chickens

Item ^a	Experimental diets (g/kg diet) ^b						SEM	<i>P</i> -value of Contrasts ^c		
	AGP	CON	1.5PO	3.0PO	4.5PO	6.0PO		AGP vs all	linear	quadratic
Day 21										
CHO, mg/dL	137.0	123.5	131.8	129.0	133.0	136.0	2.87	0.424	0.256	0.890
TG, mg/dL	111.00	85.88	90.50	101.80	80.69	105.70	4.86	0.173	0.435	0.847
HDL, mg/dL	79.00	84.00	86.68	100.80	79.60	70.49	4.74	0.673	0.359	0.189
AST, U/L	239.2	220.0	222.6	206.3	239.7	256.4	6.82	0.064	0.078	0.094
ALT, U/L	4.99	5.02	5.24	3.49	5.24	4.49	0.31	0.739	0.668	0.591
Day 42										
CHO, mg/dL	118.9	113.8	115.9	110.4	106.4	123.8	2.14	0.110	0.052	0.089
TG, mg/dL	118.30	105.86	85.38	79.14	91.90	104.50	5.09	0.064	0.896	0.074
HDL, mg/dL	71.00	68.40	55.90	95.30	66.50	54.17	5.45	0.840	0.680	0.185
AST, U/L	364.9	358.4	353.6	349.2	457.7	397.4	14.15	0.392	0.158	0.944
ALT, U/L	3.06	2.62	4.15	3.27	3.71	4.37	0.22	0.336	0.076	0.830
MDA, nmol/L	9.96	10.18	3.53*	5.42*	4.85*	3.20*	1.63	<0.001	0.147	0.485

^aCHO: Cholesterol; TG: Triglycerides; HDL: high density lipoprotein; AST: aspartate aminotransferase; ALT: alanine aminotransferase; MDA: malondialdehyde concentrations.

^bAGP (basal diet with Avilamycin and no PO); CON (basal diet without AGP and PO); 1.5PO (basal diet containing 1.5 g PO/kg diet); 3.0PO (basal diet containing 3.0 g PO/kg diet); 4.5PO (basal diet containing 4.5 g PO/kg diet); 6.0PO (basal diet containing 6.0 g PO/kg diet).

SEM: Standard error of the means. n= 8 replicate pens per treatment (one birds/pen).

^cOrthogonal polynomials were used to evaluate linear and quadratic responses to the levels of PO treatment. Means followed by * differ significantly from the AGP treatment according to Dunnett's test ($P \leq 0.05$).

Table 5- Effect of dietary pequi oil (PO) levels blood leukocyte profile of broiler chickens

Item ^a	Experimental diets (g/kg diet) ^b						SEM	<i>P</i> -value of Contrasts ^c		
	AGP	CON	1.5PO	3.0PO	4.5PO	6.0PO		AGP vs all	linear	quadratic
Day 21										
Heterophil,%	37.710	39.500	32.880	37.880	39.880	37.380	0.99	0.934	0.717	0.559
Lymphocyte,%	53.430	50.880	58.130	54.500	49.630	55.710	1.07	0.999	0.783	0.469
Eosinophils,%	3.000	5.800	2.710	2.500	5.200	3.750	0.36	0.055	0.097	0.850
Basophils,%	2.857	4.710	3.750	4.500	3.500	2.750	0.43	0.216	0.322	0.266
Monocytes,%	2.167	2.857	3.286	2.500	1.600	2.833	0.30	0.357	0.969	0.909
H/L	0.726	0.817	0.589	0.715	0.835	0.655	0.03	0.943	0.919	0.517
Day 42										
Heterophil,%	40.250	32.630	40.000	35.130	37.000	38.750	1.32	0.327	0.376	0.715
Lymphocyte,%	41.880	56.000	45.000	54.000	49.380	49.880	1.58	0.142	0.508	0.301
Eosinophils,%	8.750	5.750	7.143	5.860	5.380	7.500	0.65	0.296	0.905	0.587
Basophils,%	3.500	3.429	2.750	2.500	3.800	2.500	0.31	0.734	0.922	0.734
Monocytes,%	5.140	3.625	3.375	3.500	4.630	3.250	0.43	0.228	0.880	0.750
H/L	0.945	0.525	0.809	0.639	0.697	0.774	0.06	0.247	0.559	0.827

^aH/L: heterophil to lymphocyte ratio;

^bAGP (basal diet with Avilamycin and no PO); CON (basal diet without AGP and PO); 1.5PO (basal diet containing 1.5 g PO/kg diet); 3.0PO (basal diet containing 3.0 g PO/kg diet); 4.5PO (basal diet containing 4.5 g PO/kg diet); 6.0PO (basal diet containing 6.0 g PO/kg diet).

SEM: Standard error of the means. n= 8 replicate pens per treatment (one birds/pen).

^cOrthogonal polynomials were used to evaluate linear and quadratic responses to the levels of PO treatment. Means followed by * differ significantly from the AGP treatment according to Dunnett's test ($P \leq 0.05$).

Table 6- Effects of dietary pequi oil (PO) levels on the relative organ weights of broilers chickens

Item	Experimental diets (g/kg diet) ^a						SEM	<i>P</i> -value of Contrasts ^b		
	AGP	CON	1.5PO	3.0PO	4.5PO	6.0PO		AGP vs all	linear	quadratic
Day 21										
Spleen, %	0.076	0.086	0.084	0.086	0.091	0.097	0.01	0.360	0.860	0.281
Bursa, %	0.229	0.256	0.254	0.237	0.249	0.197	0.02	0.356	0.254	0.068
Thymus, %	0.406	0.531	0.482	0.490	0.516	0.494	0.04	0.551	0.217	0.087
Pancreas, %	0.272	0.269	0.293	0.288	0.306	0.297	0.01	0.202	0.280	0.836
Liver, %	2.413	2.461	2.376	2.512	2.478	2.545	0.09	0.798	0.434	0.511
Day 42										
Spleen, %	0.079	0.086	0.077	0.086	0.070	0.077	0.01	0.691	0.245	0.885
Bursa, %	0.049	0.048	0.034	0.050	0.041	0.047	0.00	0.213	0.156	0.528
Thymus, %	0.295	0.303	0.228	0.338	0.228	0.246	0.00	0.169	0.291	0.922
Pancreas, %	0.152	0.155	0.142	0.151	0.148	0.146	0.01	0.776	0.428	0.467
Liver, %	1.578	1.498	1.463	1.515	1.542	1.546	0.06	0.835	0.414	0.619

^aAGP (basal diet with Avilamycin and no PO); CON (basal diet without AGP and PO); 1.5PO (basal diet containing 1.5 g PO/kg diet); 3.0PO (basal diet containing 3.0 g PO/kg diet); 4.5PO (basal diet containing 4.5 g PO/kg diet); 6.0PO (basal diet containing 6.0 g PO/kg diet).

SEM: standard error of the means. n= 8 replicate pens per treatment (one birds/pen).

^bOrthogonal polynomials were used to evaluate linear and quadratic responses to the levels of PO treatment. Means followed by * differ significantly from the AGP treatment according to Dunnett's test ($P \leq 0.05$).

Table 7 - Effects of dietary pequi oil (PO) levels on carcass characteristics of broiler chickens at 42-days

Item	Experimental diets (g/kg diet) ^a						SEM	<i>P</i> -value of Contrasts ^b		
	AGP	CON	1.5PO	3.0PO	4.5PO	6.0PO		AGP vs all	linear	quadratic
Carcass yield,%	76.228	76.144	75.895	76.072	76.234	76.663	0.31	0.398	0.584	0.849
Breast,%	41.27	41.00	40.82	41.09	41.33	41.19	0.46	0.814	0.858	0.569
Wing,%	11.819	11.851	11.892	11.868	11.708	11.691	0.16	0.928	0.331	0.685
Thigh,%	13.876	14.034	14.144	14.180	13.676	14.096	0.19	0.482	0.573	0.914
Drumstick,%	14.264	14.395	14.751	14.410	14.186	14.575	0.20	0.324	0.596	0.970
Back,%	18.151	18.160	18.020	18.179	18.303	17.882	0.26	0.992	0.594	0.447
Abdominal fat,%	1.074	1.083	0.950	1.098	1.062	1.007	0.11	0.824	0.514	0.734

^aAGP (basal diet with Avilamycin and no PO); CON (basal diet without AGP and PO); 1.5PO (basal diet containing 1.5 g PO/kg diet); 3.0PO (basal diet containing 3.0 g PO/kg diet); 4.5PO (basal diet containing 4.5 g PO/kg diet); 6.0PO (basal diet containing 6.0 g PO/kg diet).

SEM: Standard error of the means. n= 16 birds per treatment (2 bird/pen).

^bOrthogonal polynomials were used to evaluate linear and quadratic responses to the levels of PO treatment. Means followed by * differ significantly from the AGP treatment according to Dunnett's test ($P \leq 0.05$).

Table 8- Effect of dietary pequi oil (PO) levels on breast meat quality of broiler chickens at 42-days

Item ^a	Experimental diets (g/kg diet) ^b						SEM	P-value of Contrasts ^c		
	AGP	CON	1.5PO	3.0PO	4.5PO	6.0PO		AGP vs all	linear	quadratic
pH _{24h}	6.189	6.184	6.202	6.227	6.153	6.271	0.01	0.899	0.095	0.923
L* (lightness)	57.618	58.245	56.094	57.073	57.586	56.827	0.57	0.148	0.299	0.163
a* (redness)	2.254	2.077	2.601	2.296	1.775	1.748	0.25	0.161	0.360	0.038
b* (yellowness)	7.630	8.513	9.030	8.324	8.215	7.517	0.47	0.225	0.108	0.160
Cooking loss,%	20.070	20.550	22.230	21.399	20.380	18.220	0.52	0.590	0.103	0.031
Drip Loss,%	1.163	1.361	1.800	2.671	1.720	1.374	0.22	0.062	0.706	0.360
Shear force, N	10.705	11.335	11.449	11.590	12.477*	10.455	0.36	0.031	0.592	0.001

^apH 24h postmortem; Shear force (N): Newtons

^bAGP (basal diet with Avilamycin and no PO); CON (basal diet without AGP and PO); 1.5PO (basal diet containing 1.5 g PO/kg diet); 3.0PO (basal diet containing 3.0 g PO/kg diet); 4.5PO (basal diet containing 4.5 g PO/kg diet); 6.0PO (basal diet containing 6.0 g PO/kg diet).

SEM: Standard error of the means. n= 16 birds per treatment (2 bird/pen).

^cOrthogonal polynomials were used to evaluate linear and quadratic responses to the levels of PO treatment. Means followed by * differ significantly from the AGP treatment according to Dunnett's test ($P \leq 0.05$).

Table 9 - Effect of dietary pequi oil (PO) levels on lipid oxidation of breast meat of broilers chickens after storage

Item ^a	TBARS, mg MDA/kg							<i>P</i> -value of Contrasts ^c		
	Experimental diets ^b						SEM	AGP vs all	linear	quadratic
	AGP	CON	1.5PO	3.0PO	4.5PO	6.0PO				
Day 30	0.322	0.328	0.207	0.199*	0.252	0.234	0.014	0.027	0.167	0.056
Day 60	0.287	0.279	0.254	0.218	0.260	0.236	0.010	0.172	0.405	0.326
Day 90	0.325	0.360	0.322	0.279	0.270	0.272	0.015	0.540	0.049	0.405

^a Refrigerated storage days (-20°C)

^bAGP (basal diet with Avilamycin and no PO); CON (basal diet without AGP and PO); 1.5PO (basal diet containing 1.5 g PO/kg diet); 3.0PO (basal diet containing 3.0 g PO/kg diet); 4.5PO (basal diet containing 4.5 g PO/kg diet); 6.0PO (basal diet containing 6.0 g PO/kg diet).

SEM: Standard error of the means. n= 8 replicate pens per treatment (one birds/pen).

^cOrthogonal polynomials were used to evaluate linear and quadratic responses to the levels of PO treatment. Means followed by * differ significantly from the AGP treatment according to Dunnett's test ($P \leq 0.05$).

Capítulo 4

IMPLICAÇÕES

Na avicultura moderna, há grande interesse no uso de ingredientes naturais para melhorar o desempenho, saúde das aves, bem como, melhorar a estabilidade e qualidade dos produtos de origem animal. Isto porque, a produção avícola cresce acentuadamente, as aves são altamente especializadas na produção carne ou ovos e os desafios na criação exigem cada vez mais do metabolismo animal. Em conjunto com estas perspectivas, os consumidores atuais levam em consideração na hora da compra de produtos oriundos da produção animal, ideais de bem-estar, sustentabilidade e ausência de resíduos potencialmente danosos a saúde. Portanto, a exploração de produtos naturais é bem vinda na produção avícola e tem demonstrado resultados positivos.

O pequi é um fruto tipicamente brasileiro distribuído na biodiversidade do cerrado, fazendo parte da culinária local e da medicina popular, e fonte de renda das comunidades extrativistas por meio de manejo sustentável (extração racional e artesanal; IBAMA portaria nº113). O óleo do pequi é extraído particularmente, por técnica manual com a fervura e maceração dos mesmos, entretanto, devido seu valor e utilidade em diversas áreas, equipamentos específicos de extração de óleo da polpa para otimizar o processo tem sido desenvolvido, o que também trará retorno para os extrativistas que vivem da coleta e venda deste fruto e seus derivados. Além disso, as propriedades do óleo de pequi despertaram o interesse de diversas pesquisas envolvidas na terapia anticâncer, antitumoral e como alimento protetivo contra o estresse oxidativo na saúde humana.

Partindo destas características, este estudo pioneiro com óleo de pequi em frangos de corte teve intuito de investigar sua ação no organismo animal, suplementado em pequenas doses na dieta das aves sob condições de conforto ou desafiadas a altas temperaturas, situação está comum na criação avícola em todo o mundo. E foi possível observar que os carotenoides

presentes no óleo de pequi (β -caroteno, luteína e licopeno) contribuem na redução dos danos oxidativos nas aves, o que os tornam fisiologicamente mais preparados as situações adversas. Adicionalmente, o fato de as dietas com óleo de pequi não afetarem as características de desempenho, rendimento de cortes nobres e a qualidade de carne, sendo estes semelhantes as dietas com antibiótico, permite que o óleo de pequi seja um potencial ingrediente alternativo ao uso de promotores de crescimento, o que atende as preocupações atuais, gera ganhos econômicos e agrega valor ao produto final.

O Brasil desempenha um papel internacional crucial como fornecedor de alimentos nos setores agrícola e animal, o que, aliado à sua enorme biodiversidade, o torna ator-chave para o trabalho em questões de microrganismos resistentes a antibióticos (*RAMs*), particularmente na pecuária. É também importante destacar que as relações comerciais com a União Europeia e a questão da *RAMs* são seriamente levadas em consideração e fazer avançar este assunto significa também avançar nas relações comerciais. *E de que forma nós (profissionais) podemos trabalhar em relação a estas temáticas?* Sem dúvida, por meio da constante inovação na pesquisa, não é uma tarefa simples, pois envolve diversas estratégias e, neste caso, o uso de produtos naturais e alternativos poderão auxiliar nos avanços produtivos e comerciais na cadeia avícola brasileira. Finalmente, novas pesquisas com óleo de pequi devem ser realizadas para investigar com detalhes a ação benéfica na saúde avícola, fazendo-se o uso de técnicas a nível celular como nutrigenômica, e investigando a atividade e modulação microbiana intestinal e imunológica das aves. Adicionalmente, as novas pesquisas podem suscitar a valorização deste produto nas comunidades extrativistas, bem como, gerar novas tecnologias de extração do produto, fechando o ciclo de retorno econômico produtivo, social e sustentável.