

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
**Programa de Pós-Graduação em Zootecnia - Escola de Veterinária - UFMG**

**Desinfetantes alternativos ao uso de formaldeído para desinfecção de ovos  
férteis**

Winnie Luiza dos Santos Clímaco

**Belo Horizonte**

**2017**

WINNIE LUIZA DOS SANTOS CLÍMACO

**Desinfetantes alternativos ao uso de formaldeído para desinfecção de ovos  
férteis**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para Obtenção do grau de Doutora em Zootecnia

**Área de concentração:** Produção Animal

**Prof. Orientador:** Leonardo José  
Camargos Lara

Belo Horizonte

2017

C639d

Clímaco, Winnie Luiza dos Santos, 1986-

Desinfetantes alternativos ao uso de formaldeído para desinfecção de ovos férteis / Winnie Luiza dos Santos Clímaco. – 2017.

119 p. : il.

Orientador: Leonardo José Camargos Lara

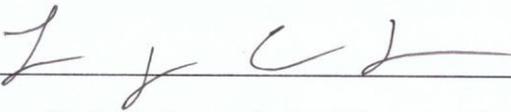
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária

Inclui bibliografia

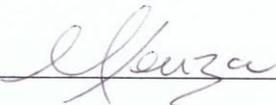
1. Ovos – Teses. 2. Fumigação – Teses. 3. Formaldeído – Teses. 4. Desinfecção e desinfetantes – Teses. 5. Bactérias aeróbicas – Teses. I. Lara, Leonardo José Camargos. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. III. Título.

CDD – 637.5

Tese defendida e aprovada em 21/02/2017 pela Comissão Examinadora composta pelos seguintes membros:



Prof. Dr. Leonardo José Camargos Lara  
(Orientador)



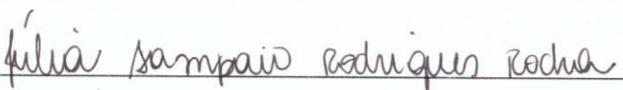
Prof. Dr. Marcelo Resende de Souza



Prof. Dr. Carlos Henrique de Figueiredo Vasconcellos



Prof. Dr. Nelson Rodrigo da Silva Martins



Dra. Júlia Sampaio Rodrigues Rocha

## **Agradecimentos**

Todo o desenvolvimento que obtive durante o período do doutorado somente foi possível devido ao apoio incondicional que tive do meu orientador, Leonardo Lara. Obrigada, Professor! Obrigada por sempre acreditar que eu era capaz.

Ao Professor Baião, meus sinceros agradecimentos por ter confiado a mim o aprofundamento científico inicial que gerou essa pesquisa.

Ao Professor Marcelo, pelas agradáveis conversas que tivemos ao longo do desenvolvimento desse trabalho. O aprendizado que tive com você certamente irá para além do campo microbiológico.

À empresa Cobb, pelo apoio financeiro para execução desse projeto. Especial agradecimento ao Rafael Carreon, por sonhar junto ao nosso grupo de pesquisa a busca de resultados para a melhoria na produção.

Ao Professor Juan Carlos Gonzalez, pela assistência técnica oferecida para medir a potência das lâmpadas UV.

À toda família PIFPAF Alimentos, em especial ao Leonardo Ruiz, Antônio, Clever, Saul, Renan, Samuel, Vanessa, Danielle, João, Emmerson e Júnior, pelo auxílio na execução do trabalho de campo.

Ao Nader, pela assistência da construção da câmara UV.

Ao Marcelo Sampaio, pela doação dos desinfetantes líquidos utilizados nessa pesquisa.

Aos amigos do Grupo de Estudos Avícolas da UFMG, em especial: Paulinha, Érica, Diego, Mari Maseo, Mari Pompeu, Maria Fernanda, Marcela, Renata, Lorena, Anna, Larissa, Mateus, Letícia, Flávia, Ed e Thiago. Foi um prazer trabalhar com uma equipe tão alegre!

Aos colegas da microbiologia, Maura, Letícia, Felipe, Renata, Gabriela e Samanta pelo apoio na realização das análises microbiológicas.

À Professora Ângela, à Doutora Júlia e aos alunos de pós-graduação (UFMG), Luiza e Diego, pelo auxílio no delineamento experimental e análises estatísticas realizadas.

Ao meu querido Flávio, pela paciência e carinho transbordados em todos os momentos necessários durante o desenvolvimento desse projeto. Companheirismo é tudo.

Aos meus amigos do coração, por tornarem essa fase mais leve e descontraída.

A minha família, por me ensinar a ter foco, força e fé!

Obrigada a todos!

## SUMÁRIO

<b>RESUMO.....</b>	<b>12</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>14</b>
<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>15</b>
<b>CAPÍTULO I – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>17</b>
<b>1. FORMAÇÃO E COMPOSIÇÃO DO OVO.....</b>	<b>17</b>
1.1. Formação e composição da casca do ovo.....	18
1.1.1. Ação antimicrobiana da matriz orgânica da casca do ovo.....	20
<b>2. PENETRAÇÃO E COLONIZAÇÃO DA CASCA POR MICRORGANISMOS .....</b>	<b>22</b>
2.1. Vias de infecção dos ovos .....	22
2.2. Tipos de microrganismos .....	23
2.3. Curso da infecção .....	27
<b>3. FATORES QUE AFETAM A PENETRAÇÃO MICROBIANA NA CASCA DOS OVOS.....</b>	<b>28</b>
3.1. Fatores intrínsecos.....	28
3.2. Fatores extrínsecos .....	31
<b>4. MÉTODOS PARA MENSURAR A PENETRAÇÃO BACTERIANA NO OVO.....</b>	<b>33</b>
<b>5. DESINFECÇÃO DE OVOS.....</b>	<b>35</b>
5.1. Importância da desinfecção de ovos.....	35
5.2. Momento ideal para desinfecção.....	37
<b>6. CARACTERÍSTICAS DOS DESINFETANTES .....</b>	<b>38</b>
<b>7. MÉTODOS DE DESINFECÇÃO DE OVOS INCUBÁVEIS.....</b>	<b>41</b>
7.1. Fumigação .....	43
7.1.1. Fumigação dos ovos com formaldeído.....	44
7.1.2. Requerimentos para fumigação com formaldeído.....	44
7.1.3. Vantagens e desvantagens do uso de formaldeído .....	45
7.2. Imersão .....	46
7.3. Pulverização ( <i>Spraying</i> ) .....	50
<b>8. DESINFETANTES ALTERNATIVOS PARA DESINFECÇÃO DE OVOS FÉRTEIS</b>	<b>53</b>
8.1. Raios ultravioleta (UV) .....	53
8.1.1. Características dos raios UV .....	53
8.1.2. Ação microbiana dos raios UV .....	55
8.1.3. Fontes de raios UV-C .....	55

8.1.4. Aplicações da luz UV para desinfecção .....	56
8.1.5. Aplicações da luz UV para desinfecção ambientes de incubação .....	56
8.1.6. Aplicações da luz UV para desinfecção de ovos férteis .....	57
8.2. Ozônio (O <sub>3</sub> ) .....	59
8.2.1. Propriedades físico-químicas do O <sub>3</sub> .....	60
8.2.2. Fatores físicos que podem afetar a efetividade do ozônio .....	61
8.2.3. Fontes de O <sub>3</sub> .....	62
8.2.4. Ação microbicida do O <sub>3</sub> .....	62
8.2.5. Vantagens da utilização de O <sub>3</sub> .....	63
8.2.6. Limitações do uso de O <sub>3</sub> .....	63
8.2.7. Utilização de gás O <sub>3</sub> como desinfetante de superfícies de ovos .....	64
8.3. Peróxido de Hidrogênio .....	66
8.3.1. Propriedades físico-químicas .....	67
8.3.2. Ação microbicida .....	67
8.3.3. Vantagens do uso de peróxido de hidrogênio .....	67
8.3.4. Limitações e cuidados ao uso .....	68
8.3.5. Utilização de peróxido de hidrogênio como desinfetante de casca de ovos .....	68
8.4. Ácido peracético .....	70
8.4.1. Características físico-químicas .....	70
8.4.2. Ação microbicida .....	71
8.4.3. Limitações ao uso .....	71
8.4.4. Aplicação do ácido peracético para desinfecção de ovos férteis .....	72
9. REFERÊNCIAS .....	73
<b>CAPÍTULO II – Desinfetantes alternativos ao uso de formaldeído para desinfecção de ovos férteis .....</b>	<b>90</b>
1. RESUMO .....	90
2. INTRODUÇÃO .....	91
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	92
3.1. Coleta de Ovos .....	92
3.2. Procedimentos de desinfecção .....	93
3.2.1. Ozônio .....	93
3.2.2. Paraformaldeído .....	93
3.2.3. Radiação UV .....	94
3.2.4. Peróxido de Hidrogênio .....	95

3.2.5. Ácido peracético .....	95
3.2.6. Sem desinfecção (controle úmido) .....	96
3.2.7. Sem desinfecção (controle seco) .....	96
3.3. Incubação .....	96
3.4. Nascimento dos pintos e rendimento de incubação .....	97
3.5. Avaliação microbiológica .....	97
3.5.1. Casca dos ovos .....	97
3.5.2. Saco vitelínico .....	98
3.6. Qualidade da casca .....	98
3.6.2. Espessura da casca.....	99
3.7. Delineamento experimental e análises estatísticas.....	99
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>100</b>
4.1. Contagem Microbiana da Casca.....	100
4.2. Qualidade da casca .....	103
4.3. Rendimento de incubação .....	104
4.4. Qualidade dos pintos nascidos e contagem microbiológica do saco vitelínico.....	110
<b>5. AGRADECIMENTOS .....</b>	<b>113</b>
<b>6. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>113</b>
<b>CAPÍTULO III - CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>119</b>

---

**LISTA DE TABELAS**


---

**CAPÍTULO I**

Tabela 1. Tipos de microrganismos presentes na casca de ovos de galinhas	<b>24</b>
Tabela 2. Tipos de bactérias encontradas em ovos apodrecidos	<b>25</b>
Tabela 3. Alterações ocorridas em ovos contaminados com culturas puras	<b>26</b>
Tabela 4. Maior grupo de desinfetantes e suas características	<b>39</b>
Tabela 5. Propriedades e usos de desinfetantes	<b>41</b>
Tabela 6. Propriedades físicas do ozônio	<b>61</b>

**CAPÍTULO II**

Tabela 1. Contagens de bactérias aeróbicas totais e Enterobacteriaceae, em log <sub>10</sub> UFC/mL pool de 4 ovos, antes e após a desinfecção, nos ovos dos tratamentos formaldeído, ozônio (O <sub>3</sub> ), luz ultravioleta (UV), peróxido de hidrogênio (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ), ácido peracético (PAA), controle úmido e controle seco, acompanhados dos respectivos desvios-padrão (DP)	<b>101</b>
Tabela 2. Médias da espessura da casca, em milímetros, e resistência, em Kg/mm <sup>2</sup> , dos ovos dos tratamentos formaldeído, ozônio (O <sub>3</sub> ), luz ultravioleta (UV), peróxido de hidrogênio (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ), ácido peracético (PAA), controle úmido e controle seco, acompanhados dos respectivos desvios-padrão (DP)	<b>104</b>
Tabela 3. Pesos médios dos ovos antes da incubação e durante a transferência, em gramas, e percentual de perda de peso de ovos dos tratamentos formaldeído, ozônio (O <sub>3</sub> ), luz ultravioleta (UV), peróxido de hidrogênio (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ), ácido peracético (PAA), controle úmido e controle seco, acompanhados dos respectivos desvios-padrão (DP)	<b>105</b>
Tabela 4. Percentual de fertilidade (Fert), eclodibilidade do número total de ovos incubados (Eclod), eclodibilidade do número total de ovos férteis incubados (Eclod fert), mortalidade embrionária de ovos dos tratamentos formaldeído, ozônio (O <sub>3</sub> ), luz ultravioleta (UV), peróxido de hidrogênio (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ), ácido peracético (PAA), controle úmido e controle seco, acompanhados dos respectivos desvios-padrão (DP)	<b>108</b>

Tabela 5. Peso médios dos pintos, em gramas, percentual de pintos vendáveis (machos e fêmeas) ao nascimento e contagem de bactérias aeróbicas totais e Enterobacteriaceae do saco vitelínico de pintos de um dia de idade oriundos dos tratamentos formaldeído, ozônio (O<sub>3</sub>), luz ultravioleta (UV), peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), ácido peracético (PAA), controle úmido e controle seco, acompanhados dos respectivos desvios-padrão (DP) **111**

---

**LISTA DE FIGURAS**

---

**CAPÍTULO II**

- Figura 1. Concentração de ozônio em ppm dentro da câmara de fumigação durante período de desinfecção dos ovos **93**
- Figura 2. Visão de corte de protótipo de câmara de desinfecção de ovos por meio de lâmpadas germicidas (UV-C). **95**

## RESUMO

Objetivou-se avaliar o efeito de diferentes procedimentos de desinfecção alternativos à fumigação com formaldeído sobre a redução da contagem microbiana da casca, qualidade de casca, rendimento de incubação, qualidade de pintos neonatos e contaminação microbiana do saco vitelínico de pintos de um dia. Um total de 10.080 ovos de galinhas de 42 semanas de idade, coletados dos ninhos, foi distribuído de maneira aleatória em delineamento em bloco ao acaso, entre os seguintes tratamentos: fumigação com paraformaldeído (13,33g/m<sup>3</sup>/20 min), fumigação com ozônio (5-10ppm/20 min), irradiação de luz UV-C (254nm; 6,36 mW/cm<sup>2</sup>; 60 s), pulverização com peróxido de hidrogênio (1,56%; 0,69ml/ovo), pulverização com ácido peracético (0,13%; 0,69ml/ovo), pulverização com água (0,69ml/ovo; controle úmido) e sem desinfecção (controle seco). Oito amostras com quatro ovos cada foram coletadas para contagem de Enterobacteriaceae e bactérias mesófilas aeróbicas totais presentes na casca dos ovos antes e após o momento de desinfecção em cada tratamento. Um total de 24 ovos por grupo foi coletado para avaliações da espessura e resistência da casca. Ao todo, 1.152 ovos de cada tratamento foram incubados, em 12 bandejas de 96 ovos cada, para avaliação dos percentuais de perda de dos ovos durante a incubação, eclodibilidade, eclodibilidade de ovos férteis, mortalidade embrionária (inicial, intermediária e final), peso dos pintos e percentual de pintos vendáveis ao nascimento. A avaliação das contagens de Enterobacteriaceae e bactérias mesófilas aeróbicas totais no saco vitelínico foram realizadas em 13 pintos de um dia de idade, oriundos de cada tratamento. Nenhuma diferença significativa entre os grupos foi encontrada para a contagem de Enterobacteriaceae e bactérias mesófilas aeróbicas totais na casca dos ovos antes da desinfecção ( $P > 0,05$ ). Após a aplicação dos tratamentos, a contagem de Enterobacteriaceae também não foi afetada pelos tratamentos ( $P > 0,05$ ). Somente os ovos dos grupos desinfetados com paraformaldeído e UV apresentaram significativa redução das contagens de bactérias aeróbicas totais quando comparados ao grupo controle e a esses mesmos grupos antes da desinfecção ( $P \leq 0,05$ ), contudo essa redução foi maior ( $P > 0,05$ ) nos ovos fumigados com formaldeído que nos ovos irradiados com luz UV. Foi observada maior perda de peso nos ovos ( $P \leq 0,05$ ) pulverizados com peróxido de hidrogênio, ácido peracético e água, e ausência de diferença significativa ( $P > 0,05$ ) para essa variável entre os ovos dos tratamentos formaldeído, ozônio, UV e controle seco. As demais variáveis avaliadas nesse experimento não foram afetadas pelos tratamentos ( $P > 0,05$ ). Por reduzir a contagem microbiana na casca dos ovos, não prejudicar a eclodibilidade, o

percentual de pintos vendáveis e os aspectos microbiológicos dos pintos de um dia, a luz UV pode ser considerada um potencial desinfetante substituto ao formaldeído para desinfecção de ovos incubáveis.

Palavras-chave: *Gallus gallus domesticus*, contagem de bactérias, casca dos ovos, ozônio, luz UV, peróxido de hidrogênio, ácido peracético

## ABSTRACT

The present study examined the effect of different disinfection procedures as an alternative to formaldehyde fumigation on eggshell microbial load, eggshell quality, hatching parameters, neonate chick quality and yolk sac contamination of day-old chicks. A total of 10,080 nest clean eggs were collected from a 42-wk-old Cobb commercial breeder flock and randomly distributed in a complete block design composed by the following treatments: paraformaldehyde fumigation (13.33 g/m<sup>3</sup>/20 min; FF); ozone fumigation (5-10 ppm/20 min; OZF); UV-C light irradiation (254nm ; 6.36 mW/cm<sup>2</sup>; 60 s; UVI); spraying with hydrogen peroxide (1.56%; 0,69 ml/egg; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), with peracetic acid (0.13%; 0,69 ml/egg; PAA), with water (0,69 ml/egg; wet control; H<sub>2</sub>OCONT) and no disinfection procedure (dry control; DCONT) Eight samples (pool of four eggs each one) from each treatment were collected to enumerate the presence of Enterobacteriaceae and total aerobic bacteria on the eggshell before and after the disinfection procedure. A total of 24 eggs per group were collected to evaluate the eggshell resistance and thickness. A total of 1,152 eggs per treatment were placed in twelve 96-egg trays to evaluate eggs weight loss during incubation, hatchability, hatchability of fertile eggs, embryo mortality (initial, medium and late), chick weight and percentage of saleable chicks at hatch. The counts of Enterobacteriaceae and total aerobic bacteria present in the yolk sac were performed in thirteen day-old chicks originated from each treatment. No significant reductions were observed in Enterobacteriaceae and total aerobic bacteria population on eggshell between groups before the disinfection ( $P>0.05$ ). After disinfection, Enterobacteriaceae count on eggshell was not affected by treatments ( $P>0.05$ ). Only eggs from UVI and FF groups showed significant reduction ( $P\leq 0.05$ ) on total aerobic bacteria count on eggshell when compared to DCONT after disinfection, and compared to the same groups before the treatments; however, FF group showed greater reduction ( $P\leq 0.05$ ) than UVI group. It was observed an increase in egg weight loss in eggs from H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, PAA and H<sub>2</sub>OCONT ( $P\leq 0.05$ ) and no statistical difference ( $P>0.05$ ) for this variable in eggs from FF, OZF, UVI and DCONT groups. The other variables evaluated in this study were not affected by treatments ( $P>0.05$ ). It can be concluded that UVI is a potential alternative to disinfect hatching eggs, since it decreased bacterial load on eggshell without affecting hatchability, the percentage of saleable chicks and bacterial load on yolk sac from day-old chick.

Key-words: *Gallus gallus domesticus*, bacteria count, eggshell, ozone, UV light, hydrogen peroxide, peracetic acid

## INTRODUÇÃO

A contaminação horizontal de ovos férteis pode levar à baixa qualidade do pinto neonato e a perdas de produção (Pardon, 1995). Em função do tipo de sistema de produção utilizado pela indústria avícola, caracterizada pelo grande volume de ovos produzidos e alto risco de contaminação oriunda do ambiente, torna-se imprescindível a desinfecção de ovos para produção de frangos de corte em quantidade e qualidade elevadas.

O gás formaldeído tem sido utilizado durante muitos anos pela indústria avícola para a desinfecção de ovos e equipamentos de incubatórios. Seu uso como agente fumigante foi provado ser efetivo em destruir microrganismos presentes na casca dos ovos (OIE, 2010). Contudo, os efeitos adversos associados a sua utilização, principalmente à saúde dos trabalhadores das granjas e incubatórios, direcionaram grande parte das pesquisas em busca de métodos de desinfecção alternativos (Berrang et al., 2000). Ademais, em revisão sistemática sobre a fumigação dos ovos com formaldeído, realizada por Cadirci (2009), efeitos adversos do uso dessa substância ao embrião também foram relatados. Por ter capacidade de difusão para dentro dos ovos através dos poros, esse gás pode alquilar componentes celulares, como as bases purinas e pirimidinas presentes no DNA e RNA do embrião, e levar à morte embrionária, principalmente na fase inicial de desenvolvimento (Cadirci, 2009).

Diversos métodos de desinfecção, além da fumigação com formaldeído, estão disponíveis para uso em ovos incubáveis, como o método de fumigação com gás ozônio (Whistler e Sheldon, 1989; Bailey et al., 1996; Rodriguez-Romo e Yousef, 2005; Braun et al., 2011), a imersão e pulverização dos ovos com soluções desinfetantes (Scott e Swetnam, 1993ab; Bailey et al., 1996; Sander e Wilson, 1999; Cox et al., 2007; Wells et al., 2011) e a irradiação de luz ultravioleta (UV-C) na casca dos ovos (Chavez et al., 2002; Coufal et al., 2003; Wells et al., 2011). A existência de diversos grupos de desinfetantes, com suas particularidades quanto ao método de aplicação utilizado, à concentração, ao tempo de exposição e à ação sobre microrganismos da casca dos ovos torna a comparação entre eles um processo complexo. No entanto, a avaliação dos efeitos de desinfetantes sobre a redução da contagem microbiana da casca, eclodibilidade e qualidade de pintos neonatos podem auxiliar na escolha do produto ou método alternativo ao formaldeído a ser utilizado.

Diante do exposto, objetivou-se avaliar o efeito da desinfecção de ovos com formaldeído e outros procedimentos alternativos (gás ozônio, radiação de luz UV, pulverização com peróxido de hidrogênio e ácido peracético) sobre a redução da contagem microbiana da casca, qualidade de casca, rendimento de incubação, qualidade de pintos neonatos e contaminação microbiana do saco vitelínico de pintos de um dia.

## CAPÍTULO I – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 1. FORMAÇÃO E COMPOSIÇÃO DO OVO

Após a síntese lipídica pelo fígado da galinha e o transporte desses lipídios ao ovário para incorporação no oócito maduro (Speake et al., 1998), a ovulação, decorrente também de específicas alterações hormonais pode ocorrer. Como resultado, tem-se a liberação do óvulo no oviduto, estrutura tubular tortuosa com 80 cm de comprimento nas galinhas em período de maturidade sexual, local esse que permite a formação do ovo e sua liberação pela cloaca. Variações estruturais distintas em diferentes níveis permitem a subdivisão do oviduto em cinco principais partes: infundíbulo, magno, istmo, útero e vagina (Aitken, 1971). Solomon (1991) também o subdividiu em cinco partes; porém, com algumas distinções: infundíbulo, magno, istmo branco, istmo vermelho ou glândula tubular da casca, e útero ou glândula da casca.

O infundíbulo, local de fertilização, é também o lugar de início da formação da membrana perivitelínica que circunda a gema. A região do magno, ou subdivisão secretora de albúmen, caracteriza-se por ser a parte mais longa e conspícua do oviduto que facilmente distingue-se do infundíbulo devido sua cor branca opaca, grande diâmetro e marcada espessura (Aitken, 1971). Os diferentes tipos de glândulas secretoras presentes no magno permitem a formação do albúmen, que será posteriormente caracterizado nessa secção. Separado da região anterior por uma linha translúcida, o istmo (istmo branco) caracteriza-se pela distinta formação morfológica, com presença de glândulas tubulares responsáveis pela formação das membranas (interna e externa) da casca do ovo. Os núcleos mamilares da casca, centro do início da mineralização, também parecem ter origem no istmo ou junção istmo-uterina (istmo vermelho) (Simkiss e Taylor, 1971). Logo adjacente ao istmo encontra-se o útero, ou glândula da casca, segmento que possui diâmetro semelhante à região anterior, mas, após um pequeno curso, expande-se para formar uma bolsa na qual o ovo é retido durante todo o período de formação da casca (aproximadamente 20 horas). É nessa região que as células epiteliais da glândula da casca promovem a pigmentação da casca, em virtude da deposição de protoporfirina (em ovos de aves domésticas) ou biliverdina (em ovos azuis de aves silvestres) (Solomon, 2002, Zhao et al., 2006).

Por fim, para realizar a postura, o ovo chega à vagina, região relativamente pequena em forma de ‘S’ e sem função na formação da casca; porém, com a singular capacidade de armazenamento de espermatozoides por meio das glândulas vaginais (Aitken, 1971).

Como pode ser observado, o ovo é então composto de três frações distintas: gema (óvulo ou ovo), clara (albúmen) e casca (cutícula, exterior calcificado e membranas) (Gilbert, 1971). A gema é circundada por uma membrana vitelina fibrosa, composta pelas camadas perivitelínicas interna e externa. Caracterizada como um corpo esférico constituído de multicamadas de gotas lipídicas e grânulos proteináceos e com coloração variando do branco ao amarelo, a gema consiste de 47,5% de água, 33% de lipídios e 17,4% de proteínas. Carboidratos livres são somente 0,2% da gema enquanto os componentes inorgânicos representam 1,11% e outros compostos 0,8% (Deeming, 2002). Devido a sua peculiar composição, a gema serve como maior fonte nutritiva ao embrião.

O albúmen, popularmente conhecido como “clara”, é secretado na região do magno e também é constituído de multicamadas estruturadas em diferentes zonas. O albúmen externo é composto de uma camada fina e fluida, adjacente à membrana que o limita, seguida de uma camada mais grossa, com consistência de gel, que forma o albúmen central, por sua vez, ligado à membrana limitante nos polos do ovo. O albúmen interno constitui-se de uma camada fluida e fina que envolve a gema e outra camada viscosa e espessa adjacente à membrana vitelina que circunda a gema (Deeming, 2002). Pode-se dizer que o albúmen de ovos de galinhas é constituído de 88,5% de água e 11,5% de sólidos, onde as proteínas ganham maior destaque e são representadas principalmente por ovoalbumina, ovotransferrina, ovomucóide, ovoglobulinas e lisozimas (Deeming, 2002). Além de ser importante fonte de nutrientes ao embrião, a fração proteica do albúmen é uma componente chave da defesa antimicrobiana da gema antes e durante a incubação. Várias dessas proteínas são inibidoras de enzimas, quelantes de íons essenciais ao desenvolvimento bacteriano e potente bactericida (Deeming, 2002).

### **1.1. Formação e composição da casca do ovo**

A casca do ovo é essencial para a propagação ou reprodução das aves; é uma estrutura sofisticada, cujas propriedades refletem perfeitamente suas funções na reprodução (Nys et al., 2004). Essas funções são basicamente: (a) proteger o conteúdo do ovo do ambiente físico e microbiano; (b) controlar a troca de água e gases por meio dos poros durante o

desenvolvimento extra-uterino no embrião; (c) prover cálcio para o desenvolvimento embrionário, caso o estoque da gema esteja esgotado (Nys et al., 2004).

Considerada como uma câmara de desenvolvimento do embrião ou simplesmente um invólucro para proteção do alimento, no caso dos ovos de consumo, a casca do ovo é um composto biocerâmico, formado pela interação equilibrada de fases orgânicas (3,5%) e inorgânicas (95%) (Fernandez et al., 1997, Nys and Gautron, 2007). Ultraestruturalmente, é possível identificar seis camadas distintas. Em contato direto com o albúmen encontra-se a **membrana interna da casca**, com aproximadamente 20 µm de espessura. Entre ela e a parte calcificada desse composto biocerâmico, encontra-se a **membrana externa da casca**, com 50 µm. Compostas por fibras orgânicas organizadas em paralelo ao redor do albúmen, as membranas são caracterizadas, por meio de imunohistoquímica, pela presença de colágeno tipos I, V e X (aproximadamente 10%) e outras proteínas e glicoproteínas contendo ligações cruzadas derivadas de lisina (70-75%) (Arias et al., 1991, Nys e Gautron, 2007, Hincke et al., 2012). A localização e normal conformação do colágeno presente nas membranas da casca parecem ser essenciais para a ocorrência de uma calcificação normal, visto que os componentes dessa matriz parecem guiar o padrão topográfico da deposição de cristais da casca (Arias et al., 1991, Fernandez et al., 1997). Devido a essa caracterização, as membranas atuam como importante barreira contra a penetração de microrganismos, além de reterem o albúmen e atuarem na formação das outras camadas da casca do ovo (Nakano et al., 2003, Nys e Gautron, 2007).

A **camada mamilar (corpo mamilar ou camada cônica)**, de 70 µm de espessura, é formada pelas partes basais de colunas calcificadas e cones que penetram na membrana externa da casca. Os núcleos orgânicos da camada mamilar, ou “*mammillary knobs*”, conectados às fibras dessa membrana e constituídos principalmente de proteoglicanos queratina-sulfato (Hincke et al., 2012), são considerados os sítios de implantação nos quais a deposição de cristais de carbonato de cálcio é iniciada (Nys e Gautron, 2007). Sabe-se que a distribuição desses núcleos sobre a membrana externa na casca está sob controle genético e que o espaçamento entre eles determina o tamanho dos cones mamilares, o formato da camada paliçada e a resistência da casca. Na camada mamilar encontram-se também núcleos chamados de “corpos de reserva de cálcio”, que contém microcristais de calcita com formato esférico que facilita a eventual dissolução do mineral e mobilização do cálcio pelo embrião (Fernandez et al., 2001, Hincke et al., 2012). A formação dos poros também ocorre ao nível da camada mamilar. À medida que o agrupamento de 4-5 núcleos mamilares vai crescendo, um espaço central é deixado, no qual sítios de troca funcionais persistem e se estendem

através de toda a casca (Solomon, 2010). Devido à mineralização dos cones da camada mamilar, esses se alongam e gradualmente se unem para formar a base da **camada paliçada**, completando o primeiro estágio de formação da casca (Hincke et al., 2012).

A camada paliçada, por sua vez, é constituída de cristais de calcita (carbonato de cálcio), nos quais uma matriz orgânica (2-3%) apresenta-se incorporada. Com 200  $\mu\text{m}$ , essa camada representa dois terços da espessura total da casca e sua formação faz parte do segundo estágio de formação desse invólucro (Nys e Gautron, 2007, Hincke et al., 2012). Estruturada por policristais de calcita com crescimento orientado perpendicularmente à superfície externa da casca a ser formada, a camada paliçada apresenta deposição de 0,33 g/h de carbonato de cálcio no útero (Hincke et al., 2012), onde a deposição da matriz orgânica também ocorre, exercendo papel primordial na formação da casca. A matriz orgânica possui tanto função de controle da cristalização, o que afeta a resistência da casca e formato dos cristais formados, quanto ação anti-microbiana (Lavelin et al., 2000, Nys et al., 2004, Hincke et al., 2012).

Seguindo a ordem de formação da casca, observa-se sua quinta subdivisão, **a camada de cristal vertical**. De comprimento estreito (3-8  $\mu\text{m}$ ), essa é uma banda de cristais verticais alinhados perpendicularmente à superfície externa da casca e de estrutura mais densa que a camada anterior (Nys e Gautron, 2007, Hincke et al., 2012). Por fim, no último estágio de desenvolvimento da casca, a **cutícula** é formada momentos antes da postura e apresenta-se com aproximadamente 10  $\mu\text{m}$  de espessura. Constituída principalmente por material orgânico associado a pequenas vesículas de hidroxiapatita, essa estrutura contém a maior parte dos pigmentos externos da casca (2/3) e atua como importante barreira antimicrobiana (Nys et al., 2004, Nys e Gautron, 2007). Após a postura, essa camada seca e fissuras podem ser observadas por eletromicroscopia. Essas alterações pós-postura garantem a troca de gases via poros (Solomon, 2010).

### ***1.1.1. Ação antimicrobiana da matriz orgânica da casca do ovo***

Para proteger o embrião contra o meio externo ou mesmo manter seu conteúdo interno livre de patógenos, o ovo apresenta propriedades contra microrganismos na gema (presença de IgY), albúmen (presença de IgA oriunda do magno), membranas e também na casca (Gautron e Nys, 2006). Como descrito anteriormente, a casca apresenta barreiras físicas com notáveis propriedades mecânicas capazes de exercer essa proteção, mas também um conjunto de moléculas com potencial ação antimicrobiana e que são constituintes da matriz orgânica.

Como descrito na sessão anterior, a matriz proteica participa do processo de cristalização da casca, contribuindo para sua eficiente biomecânica. De acordo com Nys et al. (2004), após inúmeros esforços e utilização de diferentes tecnologias, somente nas últimas duas décadas foi possível a identificação e caracterização dessas moléculas e assim o reconhecimento de suas funções estruturais e microbicidas.

A matriz orgânica extracelular, presente na camada paliçada em maior proporção que na camada mamilar, é composta por proteínas e proteoglicanos e pode ser subdividida em três grupos: (1) proteínas que ocorrem em outros tecidos do corpo da ave, (2) proteínas do útero únicas ao processo de formação da casca e (3) proteínas do albúmen (Nys et al., 2004).

Os primeiro e segundo grupos envolvem um conjunto de macromoléculas que estão relacionadas unicamente ao processo de mineralização, excetuando-se a Ovocalyxina-25 e Ovocalyxina-36, pertencentes ao segundo grupo. De acordo com Gautron e Nys (2006), essas proteínas são sintetizadas somente em regiões do oviduto, onde a mineralização ocorre, ou seja, no útero e istmo vermelho, e são específicas à casca do ovo. Ovocalyxina-36 (OXC-36) e Ovocalyxina-25 (OXC-25) correspondem a um componente de 36 kDa e 25 kDa, respectivamente, encontrado no fluido uterino, membranas da casca e casca e têm sua expressão aumentada durante a entrada do ovo no útero. Dessa maneira, são consideradas importantes para a formação desse invólucro. Além dessa característica, estudos demonstraram significantes similaridades da OXC-36 a proteínas ligantes a lipopolissacarídeos (LPB); proteínas bactericidas por aumento de permeabilidade (BPI-possuem propriedade bactericida pela produção de poros na membrana de micro-organismos Gram-negativo e neutralização da toxicidade da LPS); e proteínas da família PLUNC. As LPB/BPI e proteínas da família PLUNC são frequentemente descritas como “proteínas de defesa de primeira linha” e aparentemente estão envolvidas na resposta imune inata. Tais proteínas são capazes de se ligarem à porção A da parede celular LPS de bactérias Gram-negativo, o que ocasiona sua posterior destruição. Logo, a OXC-36 parece contribuir para a defesa natural do ovo, por meio de proteção química de seu conteúdo, particularmente no lúmen distal do oviduto, onde a casca é formada (Gautron e Nys, 2006). Quanto à OXC-25, análises de sequenciamento revelaram a presença de dois domínios encontrados em inibidores de protease (domínio tipo-WAP e *motif* inibidor de tripsina pancreática Kunitz), conhecidamente responsáveis por regular a atividade de proteases serina. Dessa maneira, sugere-se que presença de OXC-25 pode interferir na atividade de proteases bacterianas necessárias para adesão e infectividade do patógeno ao ovo em formação (Gautron e Nys, 2006).

Contudo, é no terceiro grupo que se destaca a presença de proteínas com o reconhecido papel de proteção química durante o desenvolvimento embrionário. Ovoalbumina, ovotransferrina e lisozima são as proteínas em maiores quantidades no albúmen e podem chegar via difusão por meio do lúmen do oviduto ao local de formação da casca, além de serem comprovadamente sintetizadas no útero (Nys et al., 2004). Ovotransferrina e lisozima são capazes de modificar a morfologia dos cristais de calcita *in vitro*, o que sugere a participação dessas proteínas no controle da formação do carbonato de cálcio; porém, suas funções antimicrobianas, juntamente com as da ovoalbumina, permanecem descritas como primordiais (Nys et al., 2004).

Ovoalbumina foi a primeira proteína do albúmen revelada na matriz orgânica da casca. Sua presença no fluido uterino é predominante no primeiro estágio de formação da casca e foi localizada na camada mamilar (Nys et al., 2004). De acordo Huntington e Stein (2001), a ovoalbumina não apresenta atividade inibidora de protease e sua função ainda é desconhecida. A lisozima e a ovotransferrina são encontradas principalmente nas membranas da casca e, em menor quantidade, nos núcleos orgânicos da camada mamilar. A lisozima é considerada fator chave para a defesa natural do ovo contra agressão bacteriana. Suas propriedades antibacterianas relacionam-se com sua capacidade de hidrolisar 1,4-betaligações entre ácido N-acetilmurâmico e resíduos de N-acetil-D-glucosaminas presentes nos peptídeoglicanos de bactérias Gram-positivo. Já a ovotransferrina está envolvida no transporte de ferro e atua como importante fator de proteção contra a deterioração do albúmen por bactérias gram-negativas. A sua interação com membranas de bactérias Gram-negativo e Gram-positivo também confere a essa proteína características anti-microbianas (Gautron e Nys, 2006).

## **2. PENETRAÇÃO E COLONIZAÇÃO DA CASCA POR MICRORGANISMOS**

### **2.1. Vias de infecção dos ovos**

Os ovos podem ser contaminados por microrganismos internamente e na superfície externa da casca. A contaminação interna pode ser resultado da penetração através da casca ou por contaminação direta do conteúdo do ovo antes da postura, devido infecção dos órgãos e trato reprodutivos (Gantois et al., 2009). Essa última foi definida por De Reu et al. (2006) como resultado da transmissão vertical ou transovariana de microrganismos. Timoney et al. (1989) demonstraram que a inoculação oral de  $10^6$  células de *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis em galinhas de postura produzia a infecção do trato reprodutivo e,

consequentemente, a infecção de 10% dos ovos produzidos, resposta característica da transmissão vertical. Assim como a contaminação sistêmica pode levar bactérias a colonizar o trato reprodutivo da galinha, a infecção ascendente, via cloca, também podem originar tal colonização e assim favorecer a transmissão vertical de microrganismos aos ovos (Gantois et al., 2009). Board e Tranter (1995) distinguem três rotas de infecção do ovo: (1) transovariana, quando a gema é infectada enquanto ainda está ligada ao ovário; ovidutal (2), quando a membrana vitelínica e/ou albúmen são contaminados ao passar pelo oviduto e (3) trans-casca, quando alguns fatores levam bactérias a translocar da camada externa para a interna da casca. A transmissão horizontal, ou tran-casca, é descrita então como a exposição do ovo ao ambiente contaminado, que também pode resultar na penetração de agentes microbianos pela casca. Apesar da importância dada à contaminação microbiana do trato reprodutivo de galinhas, que pode levar a alterações e contaminação do ovo e pinto de um dia, bem evidenciado no caso das origens de infecções alimentares<sup>1</sup> (Hiatt et al., 2002, De Reu et al., 2006, Gantois et al., 2009), a transmissão microbiana horizontal é tida como principal via de contaminação e deterioração dos ovos de galinhas reprodutoras e de postura.

## 2.2. Tipos de microrganismos

Os ovos provavelmente recebem sua primeira contaminação microbiana ao passar pela cloaca e, a partir de então, qualquer superfície em contato com os ovos pode levar à contaminação (Board e Tranter, 1995). A microbiota da casca de ovos de galinhas é dominada por bactérias Gram-positivo, oriundas, na sua maioria, da poeira, solo e fezes (Tabela 1) (Board, 1966, Board e Tranter, 1995). Apesar de na Tabela 1 ser observada maior quantidade de bactérias Gram-negativo descritas pelos os autores, esses justificam a ocorrência de maior frequência para bactérias Gram-positivo que para Gram-negativo na casca dos ovos. Além de bactérias citadas na Tabela 1, Al-khalaf et al. (2010) identificaram ainda, por meio de *swab* da casca, as bactérias *Klebsiella pneumoniae* e *Enterobacter cloacae*.

---

<sup>1</sup> Envolvida na maioria dos casos de salmoneloses de origem alimentar, *Salmonella* Enteritidis (SE) é uma das bactérias cuja transmissão ao ovo pode ocorrer devido à contaminação dos órgãos reprodutivos das galinhas, assim como pela contaminação da casca (De Reu et al., 2006, Gantois et al., 2009). Seguindo o mesmo padrão de contaminação, Hiatt et al. (2002) demonstraram a presença da bactéria *Campylobacter* no trato reprodutivo de galinhas reprodutoras de 61 semanas de idade e positivas para presença dessa bactéria nas fezes.

Tabela 1. Tipos de microrganismos presentes na casca de ovos de galinhas

Gênero	Frequência de ocorrência <sup>a</sup>	Coloração Gram
<i>Streptococcus</i>	±	Positivo
<i>Staphylococcus</i>	+	Positivo
<i>Micrococcus</i>	++	Positivo
<i>Sarcina</i>	±	Positivo
<i>Arthrobacter</i>	+	Positivo
<i>Bacillus</i>	+	Positivo
<i>Pseudomonas</i>	+	Negativo
<i>Acinetobacter</i>	+	Negativa
<i>Alcaligenes</i>	+	Negativo
<i>Flavobacterium</i>	+	Negativo
<i>Cytophaga</i>	+	Negativo
<i>Escherichia</i>	+	Negativo
<i>Aerobacter</i>	+	Negativo
<i>Aeromonas</i>	±	Negativo
<i>Proteus</i>	±	Negativo
<i>Serratia</i>	±	Negativo

<sup>a</sup> Presença: ±ocasionalmente, +na maioria dos ovos, mas em pouca quantidade, e ++ sempre presente e em grande quantidade. Adaptado de Board e Tranter (1995).

De acordo com Board e Tranter (1995), a predominância de bactérias Gram-positivo deve-se a sua capacidade de tolerar condições ambientais secas. Board (1966) relatou que apesar de essas bactérias serem predominantes, uma infecção mista com bactérias Gram-negativo parece ser típica em ovos visualmente podres e contaminados, além de frequentemente serem detectadas no conteúdo de ovos férteis (Tabela 2). De acordo com Cook et al. (2005), apesar da diversidade de microrganismos da microbiota da casca, somente certos grupos parecem ser importantes no processo de infecção. *Pseudomonas* spp. e fungos podem digerir a camada cuticular, destruir as propriedades da casca resistentes à água e aumentar o número de poros não cobertos disponíveis para a transmissão microbiana trans-casca (Cook et al., 2005). Os autores também destacam que a contaminação do albúmen e gema deve-se à variedade de micro organismos saprófitos como fungos, cocos Gram-positivo e bactérias Gram-negativo entéricas e fermentativas.

Tabela 2. Tipos de bactérias encontradas em ovos apodrecidos

Microrganismo	Frequência de ocorrência <sup>a</sup>	Coloração Gram
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	±	Negativo
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	++	Negativo
<i>Pseudomonas putida</i>	++	Negativo
<i>Xanthomonas maltophilia</i>	+	Negativo
<i>Flavobacterium</i>	±	Negativo
<i>Alcaligenes</i>	++	Negativo
<i>Acinetobacter</i>	±	Negativo
<i>Enterobacter cloacae</i>	±	Negativo
<i>Cytophaga</i>	±	Negativo
<i>Aeromonas</i>	+	Negativo
<i>Proteus</i>	++	Negativo
<i>Escherichia</i>	++	Negativo
<i>Hafnia</i>	+	Negativo
<i>Citrobacter</i>	+	Negativo
<i>Bacillus</i>	±	Positivo
<i>Micrococcus</i>	±	Positivo
<i>Serratia</i>	++	Negativo
<i>Streptococcus</i>	±	Positivo
<i>Arthrobacter</i>	±	Positivo

<sup>a</sup> Presença: ±somente em raras ocasiões, + infrequentemente, ++ comumente.

Adaptado de Board e Tranter (1995).

Board e Tranter (1995) afirmaram que grande parte dos organismos encontrados em ovos contaminados internamente: *Alcaligenes*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Enterobacter cloacae*, *Hafnia*, *Citrobacter*, *Proteus* e *Aeromonas*. Segundos esses autores, uma variedade desses organismos foi recuperada em ovos apodrecidos oriundos de todas as partes do mundo e durante um período em que a produção tornou-se mais tecnicada. Os autores consideram que mesmo com existência de algumas mudanças de nomenclatura e taxonomia, a variedade de microrganismos permaneceu similar durante os anos, o que implicaria em propriedades intrínsecas ao ovo serem determinantes para a seleção de bactérias produtoras de podridão. Fatores seletivos para esses tipos de bactérias favoreceriam o crescimento de organismos que tem uma reação negativa para a coloração de Gram, requisitos

nutricionais relativamente simples e, em algumas delas, habilidade de se desenvolver em baixas temperaturas (Board e Tranter, 1995). Algumas alterações no ovo devido a presença de determinadas bactérias no seu interior são descritas na Tabela 3.

Bolores parecem ser menos importantes que bactérias para causar podridão em ovos. Em condições de alta umidade, a casca pode ser envolvida em micélio e hifas podem penetrar pelos poros (Board e Tranter, 1995). O seu crescimento na membrana da casca é sempre associado com o gelatinização do albúmen e, às vezes, com o rompimento da membrana vitelínica (Board e Tranter, 1995).

Tabela 3. Alterações ocorridas em ovos contaminados com culturas puras

Organismos	Atributo metabólico						Alteração	Tipo de podridão
	1	2	3	4	5	6 <sup>a</sup>		
<i>Proteus</i> spp.	+	+	-	-	-	-	Gema marrom escura de aspecto granular; albúmen marrom escura	Negra tipo 2
<i>Aeromonas liquefaciens</i>	+	+	+	-	-	-	Gema enegrecida e escura; albúmen cinza liquefeito	Negra tipo 1
<i>Enterobacter</i> spp.	(+)	(+)	+	-	-	-	Gema incrustada com material cremoso e ocasionalmente salpicada com pigmento verde-oliva	Creme
<i>Serratia marcescens</i>	(+)	-	+	+	-	-	Albúmen manchado de vermelho; gema envolta em material cor creme	Vermelha
<i>Pseudomonas maltophilia</i>	+	+	-	(+)	-	-	Gema gelatinosa e de cor âmbar com listras verde-oliva; odor parecido com amêndoa	Verde
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	+	-	+	-	+	-	Albúmen verde fluorescente à rosa; gema envolta com material cor creme	Rosa
<i>Pseudomonas</i>	-	-	-	-	+	-	Albúmen com pigmentos	Verde

<i>putida</i>							verdes fluorescentes	fluorescente
<i>Pseudomonas</i>	-	-	-	-	+	-	Albúmen com pigmentos	Azul
<i>aeruginosa</i>							azuis fluorescentes	fluorescente
<i>Flavobacterium</i>	-	-	-	+	-	-	Pigmentação amarela	Amarelo
<i>Cytophaga</i>							formada na membrana no local de crescimento microbiano	
Outros	-	-	-	-	-	+	Apesar de largas populações se desenvolverem, não existem alterações microscópicas na gema e albúmen	Sem cor
<i>Enterobacter</i> e <i>Alcaligenes</i> spp.								

<sup>a</sup> 1, proteólise; 2, produção de H<sub>2</sub>S; 3, lecitinase; 4, pigmento solúvel; 5, pigmento insolúvel; e 6, negativo em todos esses testes. Parêntesis indicam que apesar de o organismo possuir esse atributo, não existe evidência que isso contribua para a podridão de um ovo.

Adaptado de Board e Tranter (1995).

### 2.3. Curso da infecção

Boad e Tranter (1995) afirmaram que o bem-estar do embrião não pode ser assegurado por nenhum dos componentes do ovo em separado, sendo plausível a discussão, em termos de ecologia, sobre harmonia entre tais componentes. Vários fatores parecem estar ligados à penetração de microrganismos, o que os autores e Messens et al. (2005) caracterizaram como fatores extrínsecos e intrínsecos ao ovo e detalhados na próxima seção.

Após a postura, a casca adquire infecção oriunda de todas as superfícies com as quais faz contato e a extensão da infecção está diretamente ligada com a limpeza dessas superfícies. De acordo com Board e Tranter (1995), a infiltração de microrganismos pela casca ocorre de maneira passiva e pode levar a sua deposição nas membranas da casca, ou próximas a elas. Uma aproximação de 15 a 20 µm dos microrganismos a essas membranas associada à presença de água, poderia favorecer o crescimento microbiano dentro do ovo (Board e Tranter, 1995). Os autores descreveram um estudo no qual a colonização das membranas da casca foi caracterizada pela seleção de microrganismos mais adequados ao ambiente, inicialmente bactérias Gram-positivo, mas seu número foi diminuindo gradualmente durante a incubação, com o aumento do número de Gram-negativo. Poucos microrganismos foram

recuperados do albúmen até o início do seu apodrecimento e entre diversas bactérias Gram-negativo somente uma foi capaz de contribuir para maior contaminação desse componente do ovo, mesmo com a formação do consórcio dessa bactéria e outras linhagens na membrana da casca. Os autores sugeriram que, com as evidências disponíveis na literatura, a seleção favoreceria microrganismos com requisitos nutricionais simples e que, dentro desse grupo de organismos com essa característica, a taxa de crescimento dentro do ovo seria o determinante final para a viabilidade de um organismo retido pelas membranas da casca (Board e Tranter, 1995). A presença de substâncias inibitórias, como a lisozima, a escassez de ferro disponível e o elevado pH torna o albúmen uma excelente defesa contra bactérias. Dessa maneira, o crescimento bacteriano é fraco ou quase nulo, sendo necessário aos microrganismos alcançarem a gema para a infecção prosperar (Grijnspeerdt et al., 2005).

Em condições comerciais de armazenamento em temperatura ambiente, existe um *lag* de dez a 20 dias após a penetração de microrganismos na casca para a ocorrência de grande número de organismos no albúmen (Board e Tranter, 1995). Nesse momento, alterações macroscópicas da gema e/ou albúmen são evidentes quando bactérias produtoras de podridão estão presentes. Anteriormente, pensava-se que a multiplicação bacteriana, levando a uma extensa contaminação do albúmen, era atribuída à chance de colisão entre contaminantes do albúmen e a superfície da gema ou a união da gema e membrana da casca, criando um nicho para o crescimento microbiano. Nos últimos anos, foi relatada a existência de uma resposta quimiostática que direcionaria o movimento de certas bactérias em direção à superfície da gema (Board e Tranter, 1995). Grijnspeerdt et al. (2005) descreveram que o sucesso do alcance de bactérias à gema também estaria relacionado às respostas quimiostáticas a nutrientes que difundem para fora da gema.

### **3. FATORES QUE AFETAM A PENETRAÇÃO MICROBIANA NA CASCA DOS OVOS**

#### **3.1. Fatores intrínsecos**

De acordo com Samiullah et al. (2013), ovos com boa qualidade de casca são menos propícios à penetração bacteriana. Características da casca, como sua espessura total e de suas camadas (mamilar, paliçada, cuticular), distribuição de poros e distribuição ultraestrutural da camada mamilar têm demonstrado influenciar a qualidade da casca e a facilidade de penetração microbiana (Samiullah et al., 2013).

Sauter e Petersen (1969) relataram a maior penetração de *Pseudomonas fluorescens* em ovos de baixa qualidade de casca. Ao utilizar a gravidade específica (GE) do ovo, variável que apresenta relação direta com o percentual de casca, os autores demonstraram que a penetração bacteriana foi significativamente maior em ovos com menores valores de GE. A incidência de deterioração para ovos com 1.085, 1.077 e 1.070 de GE correspondeu a 6,3, 19,4 e 29,1% durante um período de oito semanas de estocagem. Sauter e Petersen (1974) também demonstraram a maior incidência de penetração de *Salmonella* spp. pela casca em ovos com baixos valores de GE. Os autores relataram contaminação média de 47,5% de vários tipos de salmonela utilizando ovos de baixa qualidade de casca (GE= 1.070) e 21,4% e 10,0% para ovos com qualidade intermediária (GE=1.080) e alta (GE=1.090). Berrang et al. (1998) avaliaram a influência do peso do ovo, GE, condutância e idade de matrizes sobre a habilidade da penetração de *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium pela na casca e membranas. Esses autores relataram que as variáveis relacionadas à qualidade de casca não mudaram consideravelmente em relação à idade do lote, mas que os padrões de penetração da bactéria variaram, indicando que outros fatores, além dos parâmetros de qualidade da casca avaliados, estariam envolvidos na penetração bacteriana. O papel central das membranas da casca na exclusão de bactérias do interior do ovo pode ser uma possível explicação para os resultados encontrados nesse trabalho (Berrang et al., 1998).

Pequenos defeitos na casca podem prover meios para bactérias predominantes na superfície penetrarem e alcançarem o conteúdo dos ovos (De Reu et al., 2006). A translucência foi relatada como sendo um defeito da casca causado por núcleos orgânicos da camada mamilar irregulares, ocorridos, provavelmente, devido à fusão de diversos núcleos mamilares durante as fases iniciais de formação da casca (Bain et al., 2006). A ocorrência de translucência na casca também foi associada com maior penetração bacteriana (Chousalkar et al., 2010). Samiullah et al. (2013) avaliaram os efeitos da qualidade de casca sobre a capacidade de penetração de *Salmonella* Infantis em ovos de poedeiras comerciais e para isso avaliaram a translucência e a espessura da casca. A primeira apresentou associação positiva com a penetração microbiana, ou seja, quanto maior o escore de translucência, maior a incidência de penetração da bactéria. Já a espessura de casca não influenciou o padrão de penetração bacteriana na casca, o que também foi observado por De Reu et al. (2006). De acordo com De Reu et al. (2006), a comparação de resultados em diferentes estudos sobre a penetração bacteriana pode ser conflituosa pois a maioria das pesquisas são antigas e existem marcadas diferenças na alimentação, idade e criação da aves, metodologia nos trabalhos,

forma de mensuração das características da casca, viabilidade das bactérias inoculadas entre outros que podem afetar os resultados.

Como descrito anteriormente, os poros da casca são essenciais para a troca de gases entre o meio interno e externo do ovo, o que garante o desenvolvimento embrionário. Contudo, pesquisas indicam que por via poros, a transmissão microbiana horizontal pode levar à contaminação interna do embrião e com isso contaminar vários outros pintos, principalmente no momento da eclosão nos incubatórios comerciais (Berrang et al., 1999). Com dimensões superiores ao tamanho das bactérias, os poros da casca podem variar de 6 a 65  $\mu\text{m}$  de diâmetro e são alvo de estudo sobre a correlação entre a sua quantidade e penetração de microrganismos no ovo. Haigh e Betts (1991) demonstraram que a penetração bacteriana é maior no polo rombo do ovo, onde há maior número de poros, comparado à ponta fina. De Reu et al. (2006) avaliaram a infecção do ovo por sete bactérias (*Staphylococcus warneri*, *Acinetobacter baumannii*, *Alcaligenes* spp., *Serratia marcescens*, *Carnobacterium* sp., *Pseudomonas* sp. e *Salmonella* Enteritidis) via casca em ovos produzidos por galinhas de 34, 46, 60, 69 e 74 semanas de idade. Apesar de demonstrarem a ocorrência de porcentagem penetração bacteriana quase constante durante todo o período estudado (30, 39, 41, 33 e 37%, respectivamente), os autores não encontraram influência do número de poros, nem da espessura da casca, sobre a penetração desses microrganismos nos ovos testados. Os estudos de Hartung e Stadelman (1963) e Berrang et al. (1998) também corroboram a afirmativa que a penetração de bactérias não depende do número de poros da casca. Diferenças entre as conclusões quanto a existência de correlação positiva entre essas variáveis pode ser explicada pelo fato de nem todos os poros penetrarem a espessura da casca por completo (De Reu et al., 2006). Para Solomon (2010), o ingresso de bactérias na casca do ovo pode também estar relacionado a desigualdades naturais da camada cuticular e alterações no alinhamento da camada mamilar, resultando na formação de novas passagens para penetração bacteriana e corroborando a ideia de que a penetração bacteriana não é dependente do número de poros. Em vista desses resultados, Solomon (2010) apontou para a cutícula *per se* como fator contribuinte para a defesa física e, possivelmente, química da casca e ponderou sobre a utilização de seleção genética para essa espessura cuticular a fim de aprimorar a atividade protetora dessa camada.

### 3.2. Fatores extrínsecos

Em um trabalho que durante um período de seis meses estudou a relação entre determinadas condições ambientais e contaminação bacteriana na casca de ovos férteis, Graves e MacLaury (1962) demonstraram que o aumento da temperatura e umidade atmosférica favoreceu a invasão bacteriana na casca. Ao encontrarem correlação positiva e significativa entre o aumento de temperatura e umidade absoluta do ambiente e aumento da contaminação da casca por *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Streptococcus fecali*, bactérias selecionadas para o estudo, os autores concluíram que manter o ambiente de postura frio e seco é uma prática que deve ser seguida para controle da contaminação microbiana. Board (1966) afirmou que sob condições normais de armazenamento, a multiplicação bacteriana na casca dificilmente ocorre. O autor relatou que em ambientes limpos e não muito úmidos a sobrevivência de microrganismos é prejudicada. Resultados encontrados por Braun et al. (1999) evidenciam também o efeito de maior penetração de *Salmonella* Enteritidis no ovo com aumento da temperatura e umidade relativa. Em relação à multiplicação bacteriana dentro do ovo, Pinto et al. (2009) demonstraram que altas temperaturas (30°C) podem favorecer o crescimento de *S. Enteritidis* até mesmo no albúmen, meio com muitas propriedades antimicrobianas. Os autores, contudo, afirmaram que esse padrão de crescimento não é comum a todas as bactérias da família Enterobacteriaceae, já que, no mesmo estudo, *E. coli* apresentou baixa viabilidade em altas temperaturas nesse meio.

Cuidados para evitar a condensação da água ao redor dos ovos quando esses são retirados de ambiente refrigerados e colocados em temperatura ambiente são necessários a fim de diminuir o risco de contaminação (Berrang et al., 1999). A presença de água ou outros líquidos na casca, principalmente na existência de diferença de temperatura entre o ovo e o ambiente são outros importantes fatores que podem contribuir para a contaminação do ovo. Berrang et al. (1999) descreveram que no momento da postura, o ovo apresenta-se mais quente que o ambiente, já que a temperatura corporal da galinha é 42°C. Dessa maneira, o ovo tende a se resfriar e isso causa uma contração de seu conteúdo, que tende a formar uma pressão negativa dentro do ovo e arrastar bactérias presentes na superfície da casca ou no ambiente para seu interior, caracterizando dessa forma a contaminação trans-casca (Board, 1966, Berrang et al., 1999). Em um estudo sobre a porosidade inerente ao ovo, Haines e Moran (1940) descreveram que a imersão de ovos, logo após a postura, em solução de bactérias com temperatura inferior a esses ovos levava a uma maior incidência de contaminação, o que creditaram a forças de sucção devido a diferença de temperatura. Seguindo essa teoria, Berrang et al. (1998) demonstraram que a imersão de ovos previamente

aquecidos a 42°C e mergulhados em solução de *Salmonella* Typhimurium, com concentração de 10<sup>4</sup> células por mililitro a 25°C, levou a contaminação interna dos ovos testados. De acordo com Cook et al. (2003), a presença de água parece ser essencial para a transmissão trans-casca, pois ela provém condições necessárias para crescimento microbiano na casca e pode funcionar como meio transportador de microrganismos através dos poros. Quando água suficiente está presente, algumas espécies microbianas podem digerir a cutícula e com isso aumentar o número de poros sem proteção, o que facilita a penetração de patógenos no ovo (Cook et al., 2003).

A quantidade de microrganismos presentes no ovo também é outro fator a se considerar para gerar contaminação. Gast e Holt (2000) relataram que um crescimento de *S. Enteritidis* no albúmen foi maior e significativo em inóculo de 150 células quando comparado ao inóculo de 15 células, durante um período de incubação de dois dias a 25 °C. Messens et al. (2005) e De Reu et al. (2006) também relataram que o aumento do número de microrganismos na casca levou ao aumento do risco de penetração microbiana nessa estrutura e contaminação do conteúdo do ovo. Diferentemente, Samiullah et al.(2013) não encontraram relação entre dose de inoculação de bactéria e carga bacteriana na casca. Essa diferença de resultado pode ser devido a diferentes cepas de microrganismos utilizadas em cada trabalho.

Em relação ao tempo de armazenamento, a contagem microbiana ao longo do tempo parece estar fortemente associada às condições de armazenamento (temperatura e umidade relativa). Apesar de avaliarem a contaminação em ovos de consumo, Gentry e Quarles (1972), Jones et al. (2004), De Reu et al. (2005) demonstraram que diferentes temperaturas, umidade e tempo de armazenamento podem afetar a contagem de microrganismos na casca. Gentry e Quarles (1972) relataram que após um dia de armazenamento a 4°C nenhuma mudança significativa no número de bactérias foi observada em comparação com o número de organismos observados na casca no dia de produção. Contudo, após sete dias de armazenamento, o número de bactérias viáveis foi somente de 10%, demonstrando que baixas temperaturas podem dificultar a viabilidade bacteriana. Jones et al. (2004), por sua vez, demonstraram que ovos inoculados na casca com *Pseudomonas fluorescens* e/ou *Salmonella* Enteritidis em concentração de 10<sup>6</sup> ufc/ml e estocados em ambiente a 26°C e 90± 5% de UR por 30 dias apresentaram aumento dos níveis de contaminação da casca ao longo do tempo. Já De Reu et al. (2005) relataram que num período de armazenamento de 14 dias em condições ambientais normais (temperatura não informada, mas 50% de umidade relativa do ar) ou refrigeradas (85% UR a 5 °C), a contagem de bactérias aeróbicas totais permaneceu similar com o passar do tempo. Segundo esses autores, somente foi observado redução significativa

para a contagem total de bactérias Gram-negativo ao longo do tempo nos grupos de ovos armazenados em umidade relativa do ar baixa (UR de 50%, temperatura não informada), sendo creditado à UR baixa, a causa para essa redução do número de microrganismos.

#### **4. MÉTODOS PARA MENSURAR A PENETRAÇÃO BACTERIANA NO OVO**

Berrang et al. (1999) relataram uma série de métodos considerados relevantes para avaliar a penetração bacteriana no ovo. Para isso, os autores dividiram o tópico em métodos de avaliação com foco na casca e membranas da casca e somente nas membranas.

Dentre as metodologias utilizadas para mensurar a penetração bacteriana na casca, o trabalho de Williams e Whittemore (1967) é descrito como exemplo de teste para mensurar a invasão bacteriana em condições de contaminação fecal simulada. Esse método consiste em colar um pequeno pedaço de tubo de alumínio na área de interesse e preenche-lo com fezes esterilizadas da ave. As fezes, em seguida, podem ser inoculadas com microrganismos selecionados. A penetração é demonstrada por meio da cultura do microrganismo recuperado no interior do ovo. O ovo é esvaziado e a parte interna da casca (ou casca e membranas) é amostrada com *swab*. Berrang et al. (1999) afirmam que tal método é excelente para exame de áreas específicas da casca, mas se torna laborioso se o interesse for avaliar o ovo todo ou grande números de amostras.

O método de Board e Board (1967) é descrito como capaz de testar rapidamente a penetração bacteriana em toda a superfície do ovo. Ovos intactos são submetidos a desafio com diferencial de temperatura positiva por meio de imersão em suspensão de células bacteriana com temperatura mais fria. Após secagem, os ovos são esvaziados e preenchidos com meio de cultura para crescimento microbiológico com adição de cloreto de 2,3,4-trifenil tetrazólio. Em condições de redução dessa substância, realizado pelo crescimento bacteriano, ocorre a formação de formazan, que possui cor vermelha. Após o meio de cultura ficar endurecido, o ovo é selado com parafina e incubado para permitir crescimento bacteriano. Por meio de ovoscopia, pontos vermelhos podem aparecer através da casca. Adaptação desse método foi utilizado por De Reu et al. (2006) para mensurar a penetração bacteriana na casca. Após esvaziar o ovo, uma limpeza do seu interior foi realizada com água destilada a fim de remover o albúmen. O ovo foi preenchido com sódio fundido (50°C), 25 ppm de estreptomicina, 50 ppm de cicloheximida e 0,1% de cloreto de 2,3,4-trifenil tetrazólio. A adição de estreptomicina ao ágar garante que somente bactérias resistentes a esse composto sejam hábeis para crescer nesse meio, impedindo o crescimento de competidores presentes na

microbiota natural na casca. Já a adição de cicloheximida foi adicionada com intuito de prevenir o crescimento de leveduras e mofos (De Reu et al., 2006).

Outra metodologia descrita por Berrang et al. (1999) refere-se ao trabalho de Chen et al. (1996). O método consiste em testar ovos intactos utilizando cepa luminescente de *Salmonella* Enteritidis. Após inocular ovos por meio de imersão em cultura luminescente da bactéria, os ovos são selados em um saco de plástico com substrato de luciferase. A luminescência poderia ser detectada através da casca por meio de um sistema de imagem. Berrang et al. (1999) afirmaram que tal método poderia ser promissor pois os ovos não precisariam ser quebrados ou abertos durante o teste de penetração da bactéria.

Uma alternativa à utilização de culturas de bactérias, descrita por Berrang et al. (1999), seria a utilização de um método desenvolvido por Kim e Slavik (1996). Esses últimos desenvolveram um teste indicador no qual um corante azul é aplicado aos ovos. A penetração foi avaliada por meio da detecção de manchas azuis nas membranas abaixo da superfície da casca e esteve correlacionada positivamente com a penetração de *Salmonella sp.* no ovo.

Outra metodologia para avaliação da penetração no ovo inteiro é descrita e utilizada por Samiullah et al. (2013) e Gole et al. (2014). O método descrito consiste em, inicialmente, mergulhar os ovos a serem testados em solução de etanol 70%, por um tempo que varia de 30 a 60 segundos e em seguida deixá-los secar em cabine biossegura por 10-15 minutos. Os ovos são então imersos nas soluções da bactéria com concentrações conhecidas e a serem testadas por aproximadamente 60 a 90 segundos. Depois da inoculação, os ovos são incubados em temperaturas variando de 20 a 37°C por 21 dias para em seguida ser realizado o isolamento do microrganismo.

A avaliação de penetração somente das membranas foi estudada por Lifshitz et al. (1964). Ao esvaziar o conteúdo e removerem a casca da extremidade larga do ovo, esses autores conseguiram isolar as membranas intactas. O ovo foi colocado em uma suspensão bacteriana e o interior preenchido com caldo esterilizado. Culturas periódicas do caldo foram utilizadas para determinar a extensão da penetração bacteriana.

Berrang et al. (1999) também citaram o método desenvolvido por Wong et al. (1997), que examina a membrana da casca microscopicamente após imersão dos ovos em suspensão de *Salmonella spp.* Um microscópio confocal de varredura a *laser* foi utilizado para visualizar a bactéria dentro da malha da membrana externa da casca. Com um anticorpo específico à *Salmonella* conjugado com um químico produtor de cor, o método pode permitir a detecção de penetração bacteriana sem a necessidade de cultura do organismo.

## 5. DESINFECÇÃO DE OVOS

### 5.1. Importância da desinfecção de ovos

Maximizar a eclodibilidade dos ovos e qualidade dos pintinhos neonatos é um passo crucial para melhorar a produção de frangos de corte. Reduzir a carga microbiana da casca de ovos pode ajudar a diminuir a incidência de infecções bacterianas nos embriões e pintos neonatos (Fazenko et al., 2009).

Como o sistema de alojamento de matrizes de frangos de corte no Brasil é realizado principalmente em camas, a produção de ovos férteis é constantemente desafiada com o risco de contaminação microbiana da casca. Quarles et al. (1970) relataram que a contagem de bactérias aeróbicas na casca pode ser 20 a 30 vezes maior em sistema de produção em cama que em sistemas de gaiolas em suspensão, sendo a presença de bactérias coliformes nos embriões e pintos também relacionada com a sua concentração no ar dos galpões. Berrang et al. (1997) descreveram que ovos classificados como sujos caracterizam-se por apresentar adesão de fezes ou material de cama na casca e valores de bactérias aeróbias totais acima de  $5,9 \log_{10}$  UFC/ovo. Segundo esses autores, os produtores tendem a não incubarem tais tipos de ovos, o que gera perdas na receita associadas com o não nascimento dos prováveis pintos oriundos desses ovos. Esta atitude depende muito do mercado de ovos e pintos.

O problema ainda pode ser maior ao se considerar que em muitas ocasiões a postura pode ocorrer no chão e não nos ninhos. Barbour e Nabutt (1982) encontraram maior contaminação bacteriana em ovos coletados no chão, que ovos recolhidos dos ninhos. Em um estudo epidemiológico sobre fatores que afetavam significativamente a eclodibilidade de ovos de matrizes Ross, Heier e Jarp (2001) reconheceram que, dentre outros fatores, o uso de ovos coletados do chão esteve associado com piores resultados para essa variável.

O principal momento de contaminação dos ovos é logo após a postura, devido ao contato da casca com superfícies sujas e ambiente contaminado (Board, 1969, Quarles et al., 1970, Wall et al., 2008). Board (1969) descreveu que a microbiota da casca dos ovos é constituída principalmente de bactérias Gram-positivo, e que o ambiente seco nos galpões de postura, pode ter influência ao selecionar esses tipos de bactérias. Apesar de os ambientes dos galpões avícolas também apresentarem bactérias Gram-negativo, como por exemplo, do gênero *Pseudomonas*, essas são mais frequentemente isoladas dentro de ovos que apodrecem ou se contaminam, que na superfície da casca. A percepção do ovo como um ecossistema, onde diversos fatores afetariam a gênese e desenvolvimento de bactérias Gram-negativo, causadoras de podridão, dentro ovo, auxiliaria no entendimento do processo de contaminação

(Board, 1969). Scott e Swetnam (1993b) citaram um trabalho de 1957, realizado por Florian e Trussel, no qual esses autores isolaram 197 microrganismos diferentes de 81 ovos infectados oriundos de diferentes fontes, todos eles eram Gram-negativo, bactérias em forma de bastonete, principalmente de origem intestinal. As principais espécies causadoras de contaminação interna dos ovos encontradas nesse estudo foram *Pseudomonas fluorescens* e *Alcaligenes bookeri* linhagem A.

De maneira geral, a presença de poros na casca, que podem variar em número de  $7-17 \times 10^3$ , com nove a 35  $\mu\text{m}$  de diâmetro (Board, 1969), possibilita a passagem de bactérias e outros microrganismos para o interior do ovo. A penetração microbiana ainda é facilitada com a presença de água ou outros líquidos na casca, especialmente na presença de diferença de temperatura entre o ovo e o líquido. Após penetrarem as estruturas externas do ovo, os microrganismos podem levar à baixa eclodibilidade e/ou contaminação do pinto. Além disso, a possível contaminação dos pintos com enteropatógenos humanos, como as salmonelas, tem importante implicação na segurança alimentar (Berrang et al., 1999).

Outro importante momento de possível contaminação dos ovos ocorre durante sua permanência nos incubatórios. O ambiente nesses locais pode ser fonte de contaminação que envolve variedade de microrganismos que causam doenças nos lotes de frangos e perdas econômicas para a indústria avícola (Kim e Kim, 2010). Microrganismos encontrados sobre ou dentro de alguns ovos incubáveis podem ser facilmente espalhados na incubadora com o auxílio do movimento do ar durante a eclosão e, logo, contaminar todos os outros pintos (Kim e Kim, 2010).

É nesse contexto que a desinfecção ou sanitização de ovos férteis assume seu papel de linha de frente como ponto mais importante de intervenção para prevenir a disseminação bacteriana de lotes de matrizes para seus descendentes (Spickler et al., 2011). Mesmo ovos coletados nos ninhos e considerados limpos podem conter determinada quantidade de microrganismos que, submetidos a condições favoráveis ao seu crescimento, podem comprometer a eclodibilidade e saúde do pinto neonato. Berrang et al., (1997) relataram que, em ovos coletados em ninhos, a contagem de bactérias aeróbicas totais avaliada ao longo de 30 semanas de postura, variou entre 4,1 a 5,3  $\log_{10}$  UFC/ovo. Resultados similares foram descritos por Stephens et al. (2009), que encontraram valores de 4,4  $\log_{10}$  UFC/ovo em ovos considerados limpos. Zeweil et al. (2015) encontraram valores de 7,07  $\log_{10}$  UFC/ovo. A desinfecção de ovos incubáveis torna-se, então, benéfica, quando adequados procedimentos e parâmetros são aplicados (Berrang et al., 2000). Altos padrões de higiene que devem ser

praticados em granjas e incubatórios não excluem, portanto, a necessidade de desinfecção dos ovos, que ocorre para limitar número de microrganismos no ovo (Cadirci, 2009).

## **5.2. Momento ideal para desinfecção**

A desinfecção dos ovos nos núcleos de produção foi citada por Berrang et al. (1997, 2000) como importante ponto de controle para programas de limpeza e desinfecção de incubatórios. Manuais de linhagens também recomendam que os ovos devam ser desinfetados imediatamente após a coleta (tempo não especificado), enquanto ainda estão quentes (Heir e Jarp, 2001). Como mencionado anteriormente, com o resfriamento do ovo após a postura, o seu conteúdo tende a se contrair e bactérias presentes na casca podem ser sugadas para seu interior através dos poros (Heir e Jarp, 2001).

O Código Sanitário para os Animais Terrestres (OIE, 2010), da Organização Mundial de Saúde Animal (OIE), que estabelece as normas para melhorar a sanidade e o bem-estar dos animais terrestres e sanidade pública veterinária, aborda sobre as recomendações aplicáveis a ovos incubáveis. Dentre várias ações sugeridas para eliminar o risco de contaminação estão: a manutenção da cama do aviário seca e em boas condições; ninhos e seus materiais limpos; frequência de coleta de ovos de no mínimo quatro vezes por dia e sua desinfecção imediatamente após a coleta. A desinfecção momentos após a postura também foi destacada por Turblin (2011) que evidenciou a importância da desinfecção em tempo hábil para evitar o ingresso de microrganismos dentro do ovo. Segundo esse autor, a demora no processo de desinfecção dá a oportunidade de microrganismos atingirem as membranas da casca e não serem expostos à ação do desinfetante.

De acordo com a OIE (2010), a sanitização de ovos incubáveis significa: (a) fumigação com formaldeído, ou; (b) pulverização ou imersão da casca do ovo em desinfetante de acordo com as instruções do fabricante, ou; (c) utilização de outro método aprovado pelas Autoridades Veterinárias. Turblin (2008) descreveu algumas particularidades envolvidas na escolha do desinfetante para ovos incubáveis. O produto usado, por si só, deve preencher diferentes exigências, a saber: (a) ter um espectro de ação abrangente (ser eficaz na destruição de microrganismos Gram-negativo, Gram-positivo e fungos); (b) ser ativo em baixas concentrações, seguro para os ovos e pessoas envolvidas na sua aplicação; (c) ser quimicamente estável; (d) não ter ação corrosiva em metais; e (f) estar em conformidade com as regulações locais. Além disso, o autor citou a necessidade de levar em consideração que diferentes fatores podem influenciar a atividade do desinfetante, assim como o tipo de

superfície a ser aplicado e seu *status*, as propriedades físico-químicas e bacteriológicas da água de diluição (caso seja um desinfetante a ser aplicado junto à água) e a concentração e a temperatura.

## **6. CARACTERÍSTICAS DOS DESINFETANTES**

Os principais grupos de desinfetantes são descritos como pertencentes à família dos halógenos (cloro, iodo), aldeídos, compostos de amônia quaternária, fenol e derivados e peróxidos. Cada família tem suas características e o seu espectro de atividade é relativamente específico (Tabela 1 e 2) (Turblin, 2008; OIE, 2010). Segundo Zeweil et al. (2015), diversos produtos antimicrobicidas estão disponíveis no mercado e são caracterizados por apresentarem uma única substância ou mistura delas. Muitos compostos originais têm demonstrado maior efetividade, estabilidade e menor irritação com a adição de outros grupos químicos (Zeweil et al., 2105). Os autores citaram que não é apropriado generalizar a atividade de um composto original, como o iodo ou fenol, diante dos seus derivados comercialmente disponíveis, sendo a escolha sobre o desinfetante a usar, ser baseada nos ingredientes ativos e habilidade de eliminar diferentes microrganismos. Com relação à mistura de produtos, Berrang et al. (2000) destacaram a importância de se considerar a química do detergente ou sanitizante a ser utilizado, a fim de evitar a incompatibilidade entre reagentes que possa causar neutralização dos desinfetantes ou a produção de produtos perigosos.

Tabela 4. Principal grupo de desinfetantes e suas características

Grupo e suas características			Vantagens	Inconvenientes
<b>Halógenos</b>	Produtos a base de cloro	-Hipoclorito de sódio -Cloroamina -Isocianureto de sódio	-Largo espectro -Custo Moderado -Baixa toxicidade	-Pouca estabilidade -Alta sensibilidade a materiais orgânicos -Atividade fortemente ligada ao pH (ruim acima de 7,3)
	Produtos a base de iodo	-Muito comum nas indústrias agroalimentares	-Muito boa atividade - Baratos -Ação em temperaturas baixas -Baixa toxicidade	-Coloração em matérias -Corrosivo -Dificuldade de conservação
<b>Aldeídos</b>	Formol	Riscos à saúde oriundos do uso de formol levaram à atual utilização do glutaraldeído	-Largo espectro -Baratos -Não são muito afetados pelo pH (uso em larga escala de pH)	-Ação não muito rápida -Baixa penetração
	Glutaraldeído			-Ação lenta -Tóxico -Odor irritante
<b>Amônia quaternária</b>		Ampla ação em Gram-positivo e bolores. Sempre associada com aldeídos para aumentar sua ação	-Não corrosivo -Boa degradabilidade - Boa atividade	-Incompatibilidade com produtos aniônicos -Susceptibilidade a materiais orgânicos -Sempre balanceado

	contra bactérias Gram-negativo e melhorar ação virucida		por associação com aldeído
<b>Fenol e derivados</b>	<p>O uso do fenol, por si só é muito limitado devido a sua grande toxicidade.</p> <p>Os derivados de fenol são sempre usados como desinfetantes, principalmente:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>-Cloro-4-metil-3-fenol</li> <li>-Benzil-4-clorofenol</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Bom bactericida</li> <li>-Baixa susceptibilidade a materiais orgânicos</li> </ul>	<p>Muitos inconvenientes:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>-Pode induzir lesões de pele (percutâneas)</li> <li>-Baixa atividade virucida</li> <li>-Susceptibilidade à água</li> <li>-Não compatível com produtos catiônicos</li> <li>-Preocupações ecológicas (biodegradabilidade)</li> <li>-Banido em várias indústrias agroalimentares</li> <li>- Odor irritante</li> </ul>
<b>Peróxidos</b>	<p>Dois compostos muito comuns:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>-Peróxido de hidrogênio</li> <li>-Ácido peracético</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Boa eficácia</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Muito instável (temperatura, materiais orgânicos, etc)</li> <li>-Perigoso ao manipular</li> </ul>

Adaptado de Turblin (2008)

Tabela 5. Propriedades e usos de desinfetantes

Propriedades	Clorados	Iodados	Fenóis	Quats <sup>1</sup>	Formaldeído
Bactericida	+	+	+	+	+
Bacteriostático	-	-	+	+	+
Fungicida	-	+	+	±	+
Virucida	±	+	+	±	+
Toxicidade	+	-	+	-	+
Atividade em matéria orgânica*	++++	++	+	+++	+
Área de uso					
Equipamento de incubatório	+	+	+	+	±
Equipamento de água	+	+	-	+	-
Pessoal	+	+	-	+	-
Lavagem do ovo	+	-	-	+	+
Chão	-	-	+	+	+
Lavagem dos calçados	-	-	+	+	-
Salas	±	+	±	+	+

<sup>1</sup>Quats = compostos de amônia quaternária

\* = Número de + indica grau de afinidade pela matéria orgânica e a correspondente perda de ação de desinfecção

+ = Propriedades positivas

- = Propriedades negativas

± = Ação limitada para a propriedade específica

Adaptado de OIE, 2010.

## 7. MÉTODOS DE DESINFECÇÃO DE OVOS INCUBÁVEIS

Vários métodos estão disponíveis para a sanitização/desinfecção de ovos incubáveis. A melhor escolha para uma granja, em particular, dependerá de fatores como o tamanho da operação, o potencial uso dos pintos nascidos, o histórico de doenças no local e também o custo de equipamento alternativo para desinfecção e químicos (Ernst, 2004). De acordo com

Ernst (2004), pequenas criações de aves podem escolher como melhor alternativa, o estoque de ovos em locais limpos e a incubação o mais rápido possível sem desinfecção. Aviários de grande porte devem consultar um veterinário responsável para aconselhamento da melhor maneira de manusear os ovos e programas de desinfecção que melhor atendam suas necessidades (Ernst, 2004).

Os métodos de desinfecção de ovos comumente utilizados na indústria avícola são a fumigação (volatilização de um desinfetante), a pulverização e a imersão (Cony et al., 2008; OIE, 2010). O uso de radiação UV também tem sido citado como meio potencial para desinfecção de ovos incubáveis (Berrang et al., 2000, Chavez et al., 2002, Coufal et al., 2003, Rodriguez-Romo e Yousef, 2005, Wells et al., 2010).

No que concerne a molhar os ovos como procedimento de desinfecção com alguma substância, seja por pulverização ou imersão, algumas observações foram feitas por Berrang et al. (1997). Segundo esses autores, apesar de molhar ou lavar ovos incubáveis tenha sido considerado, no passado, uma ação que reduzia a porcentagem de eclosão, pesquisas ao longo dos anos demonstraram que se realizada de maneira adequada, não afeta negativamente a eclodibilidade e, quando aplicado em ovos considerados sujos, pode levar a um apreciável aumento no ganho econômico do galpão.

Lorenz e Starr publicaram em dois artigos, em 1952, os resultados de um estudo sobre lavagem de ovos por diferentes métodos em laboratório e em campo (Lorenz e Starr, 1952ab). Nesses trabalhos, por se tratarem de ovos de consumo, todos os ovos foram estocados por seis meses, independentemente dos tratamentos realizados, o que de certa forma influenciou os resultados obtidos. Ainda assim, os diferentes métodos de molhagem de ovos sobre a ocorrência de podridão podem ser úteis para o entendimento do processo. Nos trabalhos citados, foi demonstrado que a lavagem, seja de ovos limpos ou sujos, aumentou o número de podridão, mas algumas particularidades foram destacadas pelos autores. Os autores concluíram que a lavagem com água quente (50-60° C) e não fria, produzia menos podridão dos ovos (Lorenz e Starr, 1952a) e que a pulverização de água fresca (não reutilizada) e não estática também foi menos prejudicial.

No que concerne a ovos incubáveis, Funk e Forward (1949) avaliaram a lavagem de ovos considerados sujos, com solução desinfetante a base de amônia quaternária 10%, num período de oito meses (Janeiro à Agosto de 1948). Apesar de não avaliarem no seu estudo a eclodibilidade de ovos sujos não lavados, os pesquisadores, ao encontrarem resultados similares de eclodibilidade para ovos considerados sujos e lavados e ovos limpos não lavados, concluíram que esse procedimento de limpeza foi benéfico para aumentar a porcentagem de

eclodibilidade de ovos sujos, já que esses tendem a não eclodir de maneira satisfatória. Huston et al. (1957) também afirmaram que ovos incubáveis não foram prejudicados ao serem submetidos à lavagem. Esses pesquisadores avaliaram 14 eclosões ao longo de um ano com um total de mais de 17.000 ovos, sendo que diferentes experimentos envolvendo ovos considerados limpos e sujos foram submetidos ou não à lavagem com detergente (não especificado). A eclodibilidade de ovos limpos foi significativamente maior que dos considerados sujos e nenhuma diferença significativa foi observada entre ovos limpos (lavados ou não lavados) e ovos sujos (lavados ou não lavados). Os autores afirmaram que não houve nenhuma evidência de que lavar ovos considerados sujos melhorasse a eclodibilidade; porém, afirmaram que dados desse trabalho indicaram que ovos lavados corretamente não apresentaram pior eclosão em relação aos ovos não lavados.

Como procedimentos a serem seguidos para correta lavagem dos ovos incubáveis, Proudfoot e Hulan (1976) destacaram alguns itens:

- 1) a lavagem momentos após a coleta é fortemente indicada;
- 2) a água utilizada deve apresentar temperatura entre 38,0-40,5°C;
- 3) a máquina de lavagem deve ser do tipo não-recicladora de água, o que evita recontaminação;
- 4) após a lavagem, os ovos devem ser pulverizados com uma solução fresca em temperatura de 40,5-43,5°C, contendo 200 ppm de cloro livre;
- 5) ao longo da lavagem, a temperatura do ovo deve se elevar, pois isso assegura que, até o momento da casca se secar, o conteúdo do ovo tenha se expandido e exercido uma pressão para fora do ovo, de modo que a solução de lavagem não consiga entrar pelos poros. De acordo com Pino (1950), a lavagem dos ovos deve ser seguida por uma secagem apropriada a fim de manter a qualidade interna do ovo e evitar a contaminação; porém, faltam dados na literatura sobre o processo de secagem de ovos incubáveis após a lavagem.

### **7.1. Fumigação**

A fumigação dos ovos é o ato de propiciar a volatilização de um desinfetante (Cony, 2007). O formaldeído é o produto químico mais comumente utilizado para desinfecção de ovos incubáveis, podendo-se também utilizar ozônio (Whistler e Sheldon, 1989abc; Bailey et al., 1996; Rodriguez-Romo e Yousef, 2005; Braun et al., 2011). Samberg e Meroz (1995) citaram o uso de gás ozônio como possível desinfetante alternativo ao uso de formaldeído.

### **7.1.1. Fumigação dos ovos com formaldeído**

O gás formaldeído tem sido utilizado por muitos anos pela indústria avícola para a desinfecção de ovos e equipamentos de incubatórios. Seu uso como fumigante foi provado ser um meio efetivo para destruir microrganismos nos ovos e suas embalagens, caixa de pintos, máquinas de eclosão e outros equipamentos de incubatório, após esses itens serem submetidos à limpeza prévia (OIE, 2010). Dois métodos são descritos pela OIE (2010) para desinfecção com essa substância. O primeiro é caracterizado pela mistura de formalina e permanganato de potássio ( $\text{KMnO}_4$ ). Quando a mistura apresenta-se adequada, um pó seco de cor marrom irá permanecer após a reação ser completada (OIE, 2010). Um método alternativo à mistura de formalina e  $\text{KMnO}_4$  é o uso de gás formaldeído produzido pela evaporação de paraformaldeído (um polímero dessa substância). Preparações patenteadas de paraformaldeído estão disponíveis no mercado e essa operação é realizada colocando a quantidade necessária desse pó sobre uma placa pré-aquecida (OIE, 2010).

Em estudos prévios, Neely (1963) observou que o formaldeído tem atividade bacteriostática, quando utilizado em doses subletais (20 to 50  $\mu\text{g/ml}$ ), devida a sua habilidade em interromper o crescimento bacteriano e interferir na biosíntese de metionina pela bactéria. Em altas concentrações, é tido como excelente agente bactericida. A eficácia bactericida do formaldeído é devida a sua habilidade em agir nas proteínas e bases dos ácidos nucleicos dos microrganismos (Maris, 1995). Nas proteínas, o formaldeído age por meio da desnaturação e nos ácidos nucleicos por alquilação, sendo sua ação irreversível (Maris, 1995). Sua ação em determinados nucleotídeos ocorre rapidamente e o equilíbrio se desloca para a hidroximetilação. Sua ação é pH-dependente, trabalhando melhor em pH alcalino (Maris, 1995).

### **7.1.2. Requerimentos para fumigação com formaldeído**

A camada do ovo mais exposta ao agente fumigante é a cutícula, uma importante barreira à invasão microbiana. Qualquer lesão a essa camada pode acarretar sérias consequências ao embrião durante a incubação. Logo, o uso de fumigação com formaldeído objetiva reduzir a carga microbiana e minimizar os efeitos adversos da contaminação, causando o mínimo efeito adverso nos embriões (Cadirci, 2009).

Recomendações para fumigação de ovos com formaldeído são citadas por Samberg e Meroz (1995) e na revisão sobre o assunto realizada por Cadirci (2009). Esses autores descreveram que para atingir a máxima atividade germicida com esse produto a temperatura, umidade, tempo e concentração utilizados no processo de desinfecção devem ser controlados.

Temperatura entre 24-38°C foi citada como ideal para a desinfecção (Samberg e Meroz, 1995), o que Cadirci (2009) explicou ser devido às altas temperaturas serem capazes de manter o vapor gerado em altas concentrações e retardar o tempo de saturação. Cuidados com superaquecimento foram relatados por Cadirci (2009) para não expor os embriões a temperaturas acima do zero fisiológico antes da incubação. A umidade, medida no termômetro de bulbo-úmido, com valor de 20°C ou superior, foi indicada como adequada para o processo de desinfecção de ovos (Samberg e Meroz, 1995). Cadirci (2009) explicou que quando o formaldeído é usado como desinfetante na fase de vapor, sua atividade fica influenciada pela umidade relativa (UR) do ar, já que as partículas do gás são carregadas pelas gotas d'água. A sua aplicação em umidade ambiente já seria eficiente para desinfecção de ovos férteis, com cuidado para evitar acúmulo de água nas superfícies expostas, visto que o produto perde eficácia quando dissolvido em água. O tempo de exposição para eliminar microrganismos depende dos fatores citados e concentração do produto (Samberg e Meroz, 1995). A aplicação de 53 ml de formalina e 35 g de KMnO<sub>4</sub> por m<sup>3</sup>, durante 20 minutos, em temperatura e umidade adequadas, foi recomendada por esses autores. O cálculo de quantidade do produto necessário deve levar em consideração as dimensões internas da cabine de fumigação. Para desinfecção de ovos considerados limpos – coletados em ninhos – seria, então, necessária fumigação em temperatura ambiente de 25°C, 50-70% de UR, por 20 minutos com um mínimo de concentração de 600mg de gás formaldeído por m<sup>3</sup> (exemplo: 10 g paraformaldeído ou 45 ml de 40% de formalina e 30 g de KMnO<sub>4</sub>) (Cadirci, 2009).

### ***7.1.3. Vantagens e desvantagens do uso de formaldeído***

Dentre as vantagens do uso de formaldeído destaca-se o baixo preço, o fato de não ser corrosivo e a capacidade de eliminar a maioria das bactérias e fungos – incluindo seus esporos (Cadirci, 2009). Segundo Scott e Swetnam (1993a), o poder germicida do formaldeído não se alterou após anos de uso, além da resistência de linhagens de microrganismos contra o produto não ter se desenvolvido.

Apesar de excelente agente antimicrobiano, o formaldeído não tem poder residual prolongado e, portanto, não previne a recontaminação (Ledoux, 2004). Somado a isso, pode causar sérios danos ao embrião, se a fumigação for realizada de maneira incorreta (Cadirci, 2009). Hayretdag e Kolankaya (2008) avaliaram o efeito da fumigação com formaldeído sobre o epitélio de embriões de galinhas e pintos neonatos. Amostras de epitélio traqueal foram coletadas no 18º dia de incubação e no 1º dia de vida e apresentaram alterações

independentes da concentração utilizada (3x 42 ml de formalina +21 g de  $\text{KMnO}_4$  por  $\text{m}^3$  e 4x 56 ml de formalina + 28 g de  $\text{KMnO}_4$  por  $\text{m}^3$  , com dois tempos de exposição, 20 e 40 minutos para ambas as concentrações). Os cílios presentes no epitélio traqueal apresentaram-se em menor número e encurtados, quando não deteriorados e com presença de vacuolização.

Além dessa desvantagem, o uso do formaldeído não é recomendado principalmente devido ao risco à saúde das pessoas envolvidas na sua aplicação. O uso desse composto orgânico está ligado à ocorrência de câncer, irritação e efeitos sensibilizantes nas pessoas com risco de exposição ocupacional. Mesmo a regulação da exposição dos trabalhadores ao produto determinar valores abaixo de 0,75 ppm (indicação do Departamento do Trabalho americano), esse valor muitas vezes é excedido na maioria dos aviários e incubatórios (Scott e Swetnam, 1993a). Quando absorvido pelo organismo por inalação e, principalmente, pela exposição prolongada, o formaldeído apresenta como risco o aparecimento de câncer na boca, nas narinas, no pulmão, no sangue e na cabeça. De acordo com a Resolução RDC nº 91/ 2008 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA (Brasil, 2008), está proibido o uso isolado de produtos que contenham paraformaldeído ou formaldeído, para desinfecção e esterilização, devido a sua reconhecida carcinogenicidade e atual classificação toxicológica pela IARC (*International Agency for Research on Cancer*), salvo em casos onde todas as medidas de proteção ao trabalhador são garantidas. Efeitos negativos ao meio ambiente também são citados por alguns autores. De acordo com Roca et al. (2008), o formaldeído também é considerado um potencial poluente já que sua alta volatilidade no meio facilita a sua dispersão pelo ar para o solo e água. Diante desse cenário, a busca por um substituto efetivo a ser usado para desinfecção de ovos incubáveis tornou-se essencial e direcionou diversas pesquisas nessa área para tal propósito (Berrang et al., 2000).

## **7.2. Imersão**

Mauldin (2008) descreveu que, em décadas posteriores, nos Estados Unidos, a imersão de ovos em tanque contendo desinfetante aquecido era utilizada para desinfecção de ovos incubáveis e mostrava-se efetiva. Contudo, a aplicação em grande número de ovos não se mostrou eficiente, principalmente porque os produtores não mudavam a solução desinfetante com frequência, o que causava maior contaminação dos ovos, além de não respeitarem o tempo máximo e mínimo de permanência desses no tanque. A falta de controle de temperatura também foi outro fator inconveniente apontado por Mauldin (2008). Ainda assim, o autor afirmou que se o processo for bem monitorado, torna-se novamente efetivo. A imersão de

ovos incubáveis com alto valor agregado, como ovos de perus e ovos de linhagem pura de frangos de corte, é utilizada por algumas indústrias. Nelas, o cuidado extra com esses tipos de ovos garantiria que o método de imersão fosse mais eficiente.

Alguns trabalhos envolvendo o uso do método de imersão de ovos em substâncias desinfetantes são encontrados na literatura. Ao testar o dióxido de cloro ( $\text{ClO}_2$ ) como desinfetante alternativo ao uso de fumigação com formaldeído em ovos incubáveis, Patterson et al. (1990) notaram que a imersão dos ovos por cinco minutos nessa solução (e com concentração acima de 100ppm de Cl), não foi benéfica para a eclodibilidade dos ovos (2,3 a 20% contra 83,7% do grupo sem tratamento de desinfecção). Contudo o método de pulverização com o mesmo produto, assim como o método de fumigação com formaldeído, não prejudicaram essa variável, quando comparado com o grupo controle. A causa para o efeito negativo da imersão sobre os ovos foi descrita como devido ao uso de solução desinfetante muito fria ( $5^\circ\text{C}$ ), o que teria ocasionado a entrada do desinfetante pelos poros e levado à morte embrionária. Scott e Swetnam (1993b), por sua vez, observaram que o uso de  $\text{ClO}_2$  como desinfetante para casca de ovos não foi efetivo, pois esse composto foi rapidamente neutralizado por componentes da casca.

Comparação entre métodos de desinfecção, realizada por Cox e Bailey (1991), demonstrou que o método de imersão dos ovos em peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), poli-hexametileno-biguanida (PHMB) e formulações comerciais de glutaraldeído, amônia quaternária, fenol e composto virucida foi mais efetivo que os métodos de pulverização e nebulização com os mesmos desinfetantes. Todos os métodos foram aplicados após um minuto, cinco minutos e 24 horas após a inoculação de *Salmonella* Typhimurium. Glutaraldeído, amônia quaternária e composto virucida resultaram em baixo efeito sobre a redução da bactéria na casca dos ovos, independentemente do método e tempo decorrido para sua aplicação. PHMB (0,05%),  $\text{H}_2\text{O}_2$  (1%) e fenol (0,2%) foram mais efetivos, com 95%, 94% e 80% de redução no número de salmonela, se tratados após um minuto de inoculação, e 95%, 44%, 69% de redução, se tratados após cinco minutos. Não foi analisado o efeito desses desinfetantes sobre a eclodibilidade.

Em um estudo mesclando o método de imersão e fumigação, um total de 23 desinfetantes (entre eles formalina, glutaraldeído, compostos a base de amônia quaternária, compostos a base de fenol, compostos a base de peróxido de hidrogênio, produtos com presença de EDTA na sua formulação e ozônio), previamente avaliados quanto ao uso e compatibilidade ambiental (Scott e Swetnam, 1993a), foram testados por Scott e Swetnam (1993b) como possíveis produtos capazes de reduzir a carga microbiana da casca de ovos de

consumo (não incubáveis). Os autores concluíram nesse último trabalho que todos os desinfetantes testados foram capazes de reduzir o número de colônias de bactérias inoculadas viáveis na casca dos ovos a números insignificantes. Num terceiro estudo, Scott et al. (1993) avaliaram o efeito da concentração e tempo de exposição de desinfecção, por meio dos métodos de fumigação (formaldeído e ozônio) e imersão (demais desinfetantes) dos 23 diferentes produtos testados, sobre a perda de umidade dos ovos durante a incubação e a eclodibilidade. Para isso o grupo controle foi considerado o grupo de ovos tratados com 1% de formalina com tempo de exposição de 1, 5 ou 10 minutos que obteve resultados similares para todos os tempos de exposição testados à exposição dos ovos ao formaldeído para todas as variáveis analisadas. Não foi relatada a temperatura da solução desinfetante na qual os ovos foram imersos. Dentre os resultados obtidos, foi destacado que compostos a base de amônia quaternária apresentaram valores de perda de umidade significativamente inferiores aos do tratamento controle, mas não apresentaram diferença para a variável eclodibilidade. Os autores enfatizaram, então, a importância do uso de elevado número de amostras para encontrar pequenas diferenças entre os tratamentos, o que não foi possível nesse experimento (n=360 ovos por tratamento). Os resultados encontrados para a desinfecção com as três concentrações de ozônio testadas (3,2; 1,6 e 0,8  $\mu\text{L}$ , por 3 horas a 10°C) também não apresentaram diferença significativa, porém seus valores numéricos para eclodibilidade foram inferiores ao grupo controle. O tratamento dos ovos com  $\text{H}_2\text{O}_2$  (0,70, 1,40 e 2,90 vol/vol) apresentou alterações na textura da casca, contudo não foi observado efeito sobre as variáveis estudadas. Com a utilização do método de imersão em diferentes desinfetantes e comparação com método de fumigação com formaldeído nesse trabalho, os autores concluíram que existem diversos produtos disponíveis no mercado que podem atuar tão bem ou até melhor que o formaldeído. Novas pesquisas foram sugeridas com o intuito de avaliar em grande escala o efeito de diferentes compostos de desinfecção e também a desinfecção com a luz UV sobre a eclodibilidade.

Cox et al. (1999) avaliaram o uso do método de imersão dos ovos em solução contendo  $\text{H}_2\text{O}_2$  (1,4%) e PHMB (0,035%) em ovos previamente contaminados com *Salmonella* spp. Os produtos foram aplicados por meio de imersão (10 minutos) ou imersão seguida de vácuo (10 minutos no total) – esse último a fim de forçar a entrada dos químicos pelos poros e assim atingir as possíveis bactérias, que após a contaminação, estariam presentes na membrana da casca. Os resultados dessa pesquisa mostraram que a imersão nos desinfetantes foi eficiente em diminuir o número de ovos positivos para *Salmonella* spp., tanto com o uso de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , quanto com PHMB. Porcentagem de 97% dos ovos sem tratamento

foram positivos para *S. Typhimurium*, enquanto que ovos imersos em solução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sem vácuo apresentaram taxa de positividade de 43% e com vácuo somente 10%. Porcentagem de ovos positivos após imersão com PHMB foi de apenas 13% e imersão+vácuo na mesma solução, somente 3%. Nenhum dos métodos de desinfecção afetou o parâmetro de eclodibilidade, contudo os autores concluíram que mesmo com os bons resultados observados para o uso de imersão+ vácuo, sua aplicabilidade em galpões industriais permanecia limitada.

O uso de desinfecção de ovos incubáveis com desinfetantes considerados naturais, por meio do método de imersão, foi estudado por Gulsen Copur et al. (2011) e Zeweil et al. (2015). Gulsen Copur et al. (2011) realizaram um estudo a fim de avaliar a aplicabilidade do extrato de alicina (composto bioativo presente no alho) em controlar a atividade microbiana presente na casca de ovos, além de determinar os efeitos sobre os parâmetros de eclodibilidade e desenvolvimento dos pintos após eclosão. Foram avaliados quatro tratamentos: sem desinfecção, desinfecção com formaldeído, desinfecção por meio de imersão dos ovos em alicina 3600 mg/L e imersão em alicina 7200mg/L. O tempo de imersão dos ovos e a temperatura das soluções desinfetantes não foram relatadas pelos autores. Apesar de não encontrarem diferença significativa entre os tratamentos, os valores numéricos para contagem bacteriana com o uso de alicina foram inferiores ao tratamento sem desinfecção. Para a variável eclodibilidade também não foi encontrada diferença significativa entre os grupos, mas os autores sugeriram o uso dessa substância, pois valores numéricos apresentaram superiores ao grupo controle e grupo tratado com formaldeído. O baixo número de amostras em cada tratamento (n=300) também pode ser considerado um fator que limitou a observação de resultados positivos significativos para o uso de alicina. Zeweil et al. (2015), por sua vez, avaliaram o efeito de produtos químicos e produtos naturais para desinfecção de ovos sobre a contagem bacteriana e desenvolvimento embrionário. Os produtos químicos testados foram: peróxido de hidrogênio 5%, cloreto de sódio 10%, iodopovidona (2%), e peróximonossulfato de potássio 0,4%+cloreto de sódio 1,5%. Os produtos naturais testados foram: produto à base de orégano (0,2 e 0,4%), outro à base de cominho (0,2 e 0,4%) e outro com a mistura dos dois (0,1+0,1% e 0,2+0,2%). Novamente, tempo de imersão e temperatura da solução desinfetante não foram informados pelos autores. Todos os compostos testados, químicos ou naturais, foram capazes de reduzir a contagem bacteriana de maneira significativa. O efeito residual bactericida foi observado em todos eles, exceto nos ovos tratados com formaldeído.

### 7.3. Pulverização (*Spraying*)

Segundo Cony (2007), esta prática de desinfecção consiste em pulverizar os ovos com solução desinfetante com a utilização de um pulverizador simples, sendo amplamente praticada. Buhr et al. (1994a) citaram que os problemas envolvidos na lavagem de ovos incubáveis, levando à rejeição pela indústria, passaram desde a falta de diligência em monitorar e manter uma apropriada temperatura de solução de sanitização, até problemas no tempo de imersão (não maior que cinco minutos) e também falha na frequência em mudar essa solução sanitizante para minimizar o acúmulo de bactérias, que ocasionaria a contaminação cruzada dos ovos. Segundo esses autores, um novo interesse na lavagem de ovos incubáveis surgiu com a ocorrência de melhorias tecnológicas das máquinas pulverizadoras de sanitizantes, adaptadas com controle automático de temperatura, principalmente após os bons resultados obtidos com sua utilização em ovos de matrizes de perus.

Assim como vários procedimentos de desinfecção, o método de pulverização tem que seguir alguns requerimentos no intuito de desinfetar os ovos adequadamente (Turblin, 2011). A seleção e diluição do desinfetante é um desses requerimentos que, de acordo com Turblin (2011), além de seguir critérios relacionados à atividade do desinfetante, não deve utilizar composto que prejudique a troca de gases pela casca do ovo. A correta aplicação é outro ponto abordado pelo autor, que afirmou que para eliminar o maior número de organismo, a solução desinfetante tem que ser aplicada de maneira que atinja toda a superfície do ovo. O aquecimento da água, antes de preparar a solução desinfetante e aplicá-la nos ovos, é outra recomendação a ser seguida, a fim de evitar o choque térmico, principalmente em locais de climas frios.

Como ponto limitante desse método, pode-se citar o custo das máquinas pulverizadoras, que para atingir melhor resultado de desinfecção, deveriam ser instaladas em cada galpão de reprodutores (Mauldin, 2008). Uma alternativa à instalação de máquinas em cada galpão seria a instalação somente nos incubatórios, mas a efetividade pode se reduzir de maneira drástica devido ao tempo que os ovos demorariam para ser desinfetados até chegar nesses locais. A aplicação incorreta, de maneira que nem toda a superfície do ovo seja atingida pela pulverização, também é citada como outro fator limitante do método de desinfecção por pulverização (Turblin, 2011).

Estudos sobre a pulverização de desinfetantes em ovos incubáveis foram apresentados ao longo dos anos. A comparação entre o método de fumigação com formaldeído e pulverização com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi relatada por Sheldon e Brake (1991). Os autores demonstraram

que ovos pulverizados com 5% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> antes da incubação tiveram significativa redução da contagem microbiana (5 log<sub>10</sub> UFC/ovo). Nesse estudo, ao comparar a desinfecção dos ovos com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e ovos não tratados com desinfetante, os autores relataram um aumento de 2% na eclodibilidade. Quando comparado ao formaldeído, nenhuma diferença significativa foi encontrada para essa variável em ovos de matrizes de 30 e 56 semanas de idade. Esses resultados levaram os autores afirmar que o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> é uma possível alternativa ao uso de formaldeído para desinfecção de ovos férteis.

Comparação entre o métodos de imersão e pulverização com outros desinfetantes em ovos de matrizes de frangos de corte foi realizado por Buhr et al. (1994a). Nesse estudo, os autores observaram que em ovos limpos, tanto o uso de imersão por dois minutos em solução desinfetante a base de compostos de peroxigênio e pulverização dos ovos com solução com amônia quaternária por 16 ou 68 segundos, houve mudança na temperatura externa e interna no ovo no momento da desinfecção quando comparado ao tratamento controle (sem desinfecção). No método de imersão, os ovos se aqueceram mais internamente e levaram também mais tempo para sua temperatura interna retornar à temperatura pré-desinfecção, o que, segundo os autores, poderia afetar a eclodibilidade dos ovos. Ainda nesse trabalho, mesmo apresentando maiores valores para a condutância da casca, foi demonstrado que os métodos de desinfecção testados não afetaram de maneira significativa essa variável. Contudo, dados de eletromicroscopia da camada cuticular da casca demonstraram que o método de pulverização de solução a base de amônia quaternária levou à maior perda da cutícula quando comparada com os outros tratamentos realizados, o que pode ser entendido como fator limitante ao uso de amônia quaternária para desinfecção da casca de ovos. Em série de experimentos realizados Buhr et al. (1994b), complementações ao trabalho anterior puderam ser obtidas. Ao submeterem ovos limpos a diferentes tratamentos de desinfecção, seja por imersão em água, pulverização de água, pulverização de solução a base de cloro ou pulverização a base de cloro seguida de tratamento com solução a base de amônia quaternária, resultados demonstraram que a eclodibilidade de ovos férteis foi similar aos ovos não desinfetados (91,00 a 93,26%). Em outro experimento com ovos limpos, mas com uso de diferentes concentrações de desinfetantes no momento da pulverização e a exclusão do tratamento com imersão em água, também não houve diferença estatística para essa variável, com ressalvas realizadas ao uso de desinfetantes em alta concentração, que levou à ocorrência de menores valores de eclosão (86,6%), quando comparado aos resultados dos grupos tratados com desinfetantes (89,3 a 90,5%) e não desinfetados (90,5%). Em outra parte do experimento, ao avaliar a eclodibilidade de ovos sujos e limpos, os autores relataram que a eclodibilidade

foi significativamente menor para ovos considerados sujos, sejam eles desinfetados ou não, quando comparado com ovos limpos, desinfetados ou não. As causas apontadas para a esse resultado foram descritas como sendo devido à alta mortalidade embrionária tardia observada nesses grupos.

Outro trabalho avaliando o efeito da pulverização de diversos desinfetantes e imersão dos ovos nessas soluções sobre a contaminação microbiana da casca foi realizado por Cony et al. (2008). No primeiro experimento, os tratamentos foram constituídos de, além dos grupos controle sem desinfecção e controle com desinfecção por meio de formaldeído, pulverização de compostos de fenol sintético, digluconato de clorexidina, amônia quaternária, amônia associada à ureia e amônia associada à glutaraldeído. Os desinfetantes testados, exceto amônia associada à glutaraldeído, demonstraram valores significativamente similares para contagem de mesófilos aeróbicos totais ao tratamento controle sem desinfecção e ao tratamento com fumigação a base de formaldeído. A associação entre amônia e glutaraldeído apresentou maior contaminação para mesófilos totais em relação aos demais tratamentos, o que foi justificado pela possível maior quantidade microbiana existente na amostra. Não foram encontradas diferenças entre os tratamentos para bolores e leveduras, coliformes totais, *Pseudomonas* sp. e *Aspergillus* sp. Dados do experimento com imersão demonstraram que todos os tratamentos com os desinfetantes apresentaram contagem de mesófilos aeróbicos totais e coliformes menores e estatisticamente diferentes ao grupo sem desinfecção. As demais variáveis também não apresentaram diferença significativa. A eclodibilidade sobre o número de ovos férteis também foi avaliada nesses trabalhos, mas não apresentou diferença estatística entre os grupos.

Novos produtos para pulverização em ovos continuam a ser estudados. Fazenko et al. (2009) avaliaram a pulverização de água oxidante eletrolisada ácida (EO ácida) como método alternativo ao uso de fumigação com formaldeído em ovos incubáveis. A EO ácida, um composto não tóxico produzido por meio da eletrólise de solução de água fracamente salinizada, é um composto rico em ânions hidroxila, cloro, ácido hipocloroso e peróxido de hidrogênio e foi estudada por esses autores como possível agente desinfetante. Por possuir elevado potencial oxidação-redução (1,140 mV) e baixo pH (entre 2,5 e 4,5), a EO ácida atua como eficiente microbicida e demonstrou capacidade de eliminar *E. coli* e *Salmonella* Enteritidis em casca de ovos (Bialka et al., 2004). Ao testar a ação de EO ácida sobre a contagem microbiana da casca, os autores relataram redução significativa na carga microbiana da casca (2,5 log ufc/cm<sup>2</sup> versus 3,5 log ufc/cm<sup>2</sup> do tratamento sem desinfecção) e nenhuma alteração na cutícula (medida por meio da perda de peso do ovo durante incubação) foi

observada. O desenvolvimento do embrião e eclodibilidade também não foram prejudicados. Resultados do desempenho de frangos oriundos de ovos tratados com EO ácida e não tratados, demonstraram que a desinfecção por esse método diminuiu a mortalidade nas primeiras semanas, o que levou os autores a sugerirem que o número de bactérias presentes nos pintinhos foi menor no grupo EO ácida. Futuras pesquisas a fim de analisar se essa hipótese esteve correta são sugeridas pelos autores.

## **8. DESINFETANTES ALTERNATIVOS PARA DESINFECÇÃO DE OVOS FÉRTEIS**

### **8.1. Raios ultravioleta (UV)**

A radiação UV destaca-se por ser um dos poucos meios de desinfecção que não gera resíduo ao meio ambiente e parece ser eficaz em reduzir a contagem microbiana de produtos quando aplicada corretamente. Segundo Bintsis et al. (2000), a aplicação dos efeitos germicidas da radiação ultravioleta abrangem três categorias: (a) inibição de microrganismos na superfície; (b) destruição de microrganismos no ar e (c) esterilização de líquidos. Tendo como base esses efeitos, o uso de luz UV é amplamente utilizado para processos de sanitização de água e alimentos (Bintsis et al., 2000). Características de alta praticidade e baixo custo, aliadas à vantagem de não produzir resíduos químicos, co-produtos ou radiação ao final do processo (Gottselig, 2011), conferem à luz UV-C uma excelente alternativa para desinfecção de ambientes e produtos.

#### **8.1.1. Características dos raios UV**

A radiação ultravioleta, assim como os raios gama, os raios-X, a luz visível, os raios infravermelhos e as ondas de TV e rádio, faz parte do espectro eletromagnético. A luz ultravioleta, como também é chamada, foi descoberta em 1801 por J. W. Ritter e sua denominação deve-se à proximidade da frequência dessas ondas à frequência da luz violeta que, por sua vez, faz parte da luz visível. Sabe-se que a principal fonte de raios UV é a radiação solar e que o conhecimento dos diferentes comprimentos de onda UV é importante para determinar seu efeito sobre os organismos vivos. Os primeiros cientistas a relatarem que a luz solar tinha a capacidade de destruir bactérias prejudiciais aos seres humanos foram Downes e Blunt em 1877 (Okuno e Vilela, 2005). Eles não sabiam se esse efeito era causado pelo calor da radiação solar ou por alguma outra característica. Só mais tarde, Duclaux, em

1885, e Ward, em 1892, demonstraram que a radiação ultravioleta era responsável pela ação bactericida (Okuno e Vilela, 2005). Devido a essa capacidade de destruição sobre microrganismos, o estudo do efeito germicida da radiação UV foi ampliado ao longo dos anos. Em 1903, o médico dinamarquês Niels Ryberg Finsen (1860-1904) ganhou o prêmio Nobel de medicina pela sua contribuição no tratamento de doenças em humanos com a utilização de radiação UV (Okuno e Vilela, 2005).

Os raios UV têm distribuição no espectro eletromagnético situada entre os raios-X (200nm) e a luz visível (400nm) (Bintsis et al., 2000) e sua mensuração é dada em nanômetros (nm). No espectro eletromagnético a radiação UV pode ainda ser subdividida em UV-A, UV-B, UV-C, UV-*Vaccum*, de acordo com o comprimento de onda, sendo os raios UV-A, de maior comprimento e os raios UV-*vaccum*, de menor comprimento. As ondas mais curtas de UV são tipicamente referidas como ‘UV *vaccum*’, pois são intensamente absorvidas pelo ar (Shama, 2007). A intensidade de radiação UV é expressa como irradiância ou intensidade de flux ( $\text{Wm}^{-2}$ ), enquanto a dose, que é uma função da intensidade e do tempo de exposição, é expressa como exposição radiante ( $\text{Jm}^{-2}$ ) (Bintsis et al., 2000).

Dentre os tipos de radiação UV, a radiação UV-A (320-400 nm) emitida pelo sol caracteriza-se por chegar normalmente à superfície terrestre, não sendo absorvida de maneira eficiente por nenhum dos constituintes atmosféricos, entre eles o ozônio ( $\text{O}_3$ ) estratosférico. A radiação UV-A é importante para sintetizar a vitamina D (colecalfiferol) no organismo, envolvida no metabolismo ósseo e no funcionamento do sistema imunológico (Balogh et al., 2011); porém, o excesso de exposição pode causar queimaduras e, em longo prazo, causar o envelhecimento precoce. Os raios UV-B solar (280-320nm) são em grande parte (90%) absorvidos pela camada de ozônio, diferentemente dos raios UV-A (Kirchhoff et al., 2000; Balogh et al., 2011). De acordo com Balogh et al. (2011), raios UV-B causam danos ao DNA, geram inflamação e estão mais associados à carcinogênese. O uso de radiação ultravioleta como agente de desinfecção é atribuído principalmente aos raios UV-C (200-280nm). Essa faixa de radiação de menor comprimento de onda que os raios UV-A e UV-B, quando emitida pelo sol, é completamente absorvida pela camada de ozônio e moléculas de oxigênio na atmosfera (Bintsin et al., 2000). A radiação UV na faixa de  $250\pm 260\text{nm}$  é letal para a maioria dos microrganismos, incluindo bactérias, vírus, protozoários, fungos e algas. No comprimento de onda germicida, a radiação UV-C é suficiente para causar deslocamento físico de elétrons e quebra de ligações no ácido desoxirribonucleico (DNA) dos microrganismos (Guedes et al., 2009).

### **8.1.2. Ação microbicida dos raios UV**

De acordo com Aguiar et al. (2002), a radiação UV é absorvida pelas estruturas do DNA, quebrando as ligações de hidrogênio entre as bases nucleotídicas da célula e fazendo com que se formem novas ligações entre nucleotídeos adjacentes. Posteriormente, moléculas duplas, ou dímeros das bases pirimídicas, são originadas. Os dímeros de pirimidina ciclobutano (CPD) formados são compostos orgânicos que podem acarretar alterações genéticas nas células e são os maiores responsáveis por bloquear a duplicação do DNA, impossibilitando assim a reprodução do microrganismo, além de comprometer a síntese proteica. O efeito da radiação UV sobre o RNA é reduzido visto que o RNA encontra-se presente em várias cópias que podem ser substituídas, desde que as informações para sua síntese, contidas no DNA, não tenham sido perdidas (Aguiar et al., 2002).

Em relação à capacidade de penetração da luz UV-C, sabe-se que bactérias suspensas no ar são mais sensíveis à radiação que as suspensas em líquidos (Guedes et al., 2009). A capacidade de penetração dos raios é atenuada quando esse atravessa o meio, em maior ou menor grau, de acordo com o coeficiente de absorção do meio físico (Guedes et al., 2009). Isso explica a redução da ação germicida da luz UV-C em superfícies onde há acúmulo de matéria orgânica.

### **8.1.3. Fontes de raios UV-C**

Como mencionado, a luz solar pode ser fonte de raios UV, contudo sabe-se que a faixa de radiação UV-C solar, com maior potencial germicida, é bloqueada pelo ozônio estratosférico. Fontes artificiais dessa radiação são obtidas por meio de lâmpadas de mercúrio de baixa e média pressão, que produzem energia na região germicida (254nm) e que são eletricamente idênticas às lâmpadas fluorescentes, exceto pela ausência de cobertura de fósforo (Bintsis et al., 2000). Essas lâmpadas consistem de um tubo hermético de sílica ou quartzo (ambos transmissores de UV), com as extremidades dotadas de eletrodos de tungstênio com uma mistura de terra alcalina que facilita a formação do arco dentro da lâmpada (Aguiar, 2000). No interior do tubo é introduzida uma pequena quantidade de mercúrio e de um gás inerte – geralmente o argônio. A voltagem através dos eletrodos produz uma excitação do mercúrio e ao retornarem a um nível de menor energia, as moléculas excitadas emitem a luz UV (Aguiar, 2000). As lâmpadas de UV de baixa pressão – ou monocromáticas – emitem de 85% a 90% de radiações no comprimento de onda de 254 nm, de maior efeito germicida. Dessa forma, é considerada nos estudos cinéticos da desinfecção UV a intensidade média da radiação germicida a 254 nm. Para as lâmpadas de média pressão

– ou policromáticas –, as contribuições de cada radiação de diferente comprimento de onda devem ser consideradas na determinação da dose (Aguiar et al., 2002).

#### **8.1.4. Aplicações da luz UV para desinfecção**

O alcance da radiação UV-C às células dos microrganismos é condicional à dose de radiação que esses podem absorver. De acordo com Gottselig (2011), a dose necessária para destruição da célula bacteriana é relativamente baixa e dependente da intensidade e tempo de exposição. O impacto de vários obstáculos pode afetar a dose ótima de luz UV, pois que a luz emitida pela lâmpada germicida pode não ser absorvida pela maioria dos microrganismos.

De acordo com Guedes et al. (2009), esporos de microrganismos apresentam elevada resistência ao raio UV e a dose subletal pode favorecer seu crescimento em vez de inibi-lo, sendo importante seu uso em ambientes e produtos com ausência de matéria orgânica e obstáculos. De fato, segundo Shama (2007), microrganismos presentes em superfície lisa e regular são mais susceptíveis aos efeitos da luz UV que aqueles presentes em superfícies irregulares.

#### **8.1.5. Aplicações da luz UV para desinfecção ambientes de incubação**

A utilização de radiação UV para desinfecção do ar é realizada por diversos métodos: irradiação na parte superior do ambiente, irradiação em todo o ambiente (quando esse não está ocupado) e irradiação no ar que passa através de entradas de ar (Reed, 2010). Bailey et al. (1996) avaliaram a capacidade de desinfecção da luz ultravioleta nos últimos três dias de incubação. Ao posicionar lâmpadas germicidas no teto e no chão da incubadora, os autores encontraram redução na contagem do número total de bactérias aeróbicas e *Enterobacteriaceae* no ar quando comparado ao tratamento controle (sem método de desinfecção no período final de incubação). Contudo, essa redução não foi significativa, fato esse explicado pela dificuldade que a luz UV teve em penetrar as áreas onde as bactérias se localizavam (Bailey et al., 1996). A avaliação da presença de *Salmonella* sp. no ar também foi objetivada nesse trabalho. A redução significativa de *Salmonella* sp. observada no dia do nascimento demonstrou eficácia da luz UV em controlar esse patógeno, entretanto esse efeito não perdurou dias após o nascimento, tendo o número de animais positivos para *S. Typhimurium* se igualado ao tratamento controle.

### 8.1.6. Aplicações da luz UV para desinfecção de ovos férteis

Os efeitos adversos associados ao uso de formaldeído para desinfecção de ovos contribuiu para a crescente procura a outros tipos de produtos desinfetantes (Berrang et al., 2000). Dessa maneira, a radiação UV tem sido estudada como um meio potencial para desinfecção de ovos embrionados, devido todas as vantagens de sua utilização já mencionadas, além de, segundo Coufal et al. (2003), não remover a cutícula.

Chavez et al. (2002) avaliaram o uso de luz UV em ovos férteis antes da incubação com intuito de diminuir a contagem microbiana aeróbica da casca dos ovos. Os autores consideraram a importância da irradiação em toda a superfície dos ovos e para isso desenvolveram dois sistemas de desinfecção. No primeiro, por meio de operação manual, os ovos giravam em número de rotações e intervalos diferentes em torno da luz UV (7,35 mW/cm<sup>2</sup> de radiação UV por 0, 15, 30 ou 60 segundos). No segundo, os autores construíram um protótipo de máquina de desinfecção de ovos no qual lâmpadas germicidas longas (91,5cm - 7,35 mW/cm<sup>2</sup>) e curtas (30,5 cm - 6,55mW/cm<sup>2</sup>) foram acopladas à máquina. Nela, os ovos passavam por desinfecção pelos diferentes tipos de lâmpadas ou pela combinação delas em diferentes tempos de exposição, constituindo quatro tratamentos (ovos expostos a nenhuma luz, à luz curta, à luz longa e a ambas as luzes). O resultado do trabalho comprovou eficácia do tratamento UV em todos os sistemas para a diminuição da contagem microbiana aeróbica da casca dos ovos, com maior redução no sistema de operação manual. Tal resultado foi justificado pelo fato de nesse sistema o número de rotações serem menores numa intensidade alta, o que levou a uma redução de 2 a 3 log<sub>10</sub> ufc/ovo em ovos expostos a 60 segundos quando comparado ao tratamento controle (sem exposição à luz UV).

Da mesma maneira, Coufal et al. (2003) desenvolveram um protótipo de máquina de desinfecção UV para ovos férteis, a ser utilizado logo após a coleta dos ovos. Nesse trabalho, os autores investigaram a viabilidade de tal máquina para uso comercial na granja e ainda avaliaram a efetividade do procedimento contra *Salmonella sp.* e *E. coli* na casca dos ovos. Ao utilizar intensidade maior de radiação UV na cabine construída (4-14 mW/cm<sup>2</sup> de radiação UV), durante quatro minutos, foram encontrados resultados de redução significativos de 1 a 2 log<sub>10</sub> ufc/ovo, 3 a 4 log<sub>10</sub> ufc/ovo e 4 a 5 log<sub>10</sub> ufc/ovo para contagem de bactérias mesófilas aeróbicas, *S. Typhimurium* e *E. coli*, respectivamente. Mesmo utilizando de maior intensidade de exposição, os resultados para contagem de bactérias mesófilas aeróbicas não foram proporcionalmente maiores quando comparados aos do trabalho de Chavez et al. (2002). A explicação para tal resultado foi devida à possível incapacidade dos raios UV em atingirem toda a superfície dos ovos, devido ao sombreamento realizado pela esteira da máquina

desenvolvida. Ainda assim, por esse procedimento reduzir significativamente todas as contagens microbianas e também não afetar a eclodibilidade dos ovos e integridade da cutícula, tem-se com a radiação UV uma alternativa eficiente para desinfecção de ovos na granja. Coufal et al. (2003) sugeriram ainda a avaliação posterior sobre o efeito da luz UV sobre os aspectos microbiológicos no pinto de um dia.

A combinação de luz UV e outros agentes de desinfecção, como o ozônio ( $O_3$ ) e o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), também pode contribuir para redução da população microbiana na casca do ovo (Rodriguez-Romo e Yousef, 2005, Wells et al., 2010). Esses trabalhos foram realizados em ovos não férteis, destinados à indústria alimentícia, contudo podem servir de base para o estudo da ação sinérgica de outros desinfetantes com a luz UV.

O ozônio pode ser produzido na indústria por meio da combinação de luz ultravioleta de comprimento de onda de 185nm e oxigênio. Sua ação sobre os microrganismos é complexa, mas de acordo com Rodriguez-Romo (2004), estudos indicam que o  $O_3$  age contra lipídeos insaturados do envelope da célula microbiana, lipopolissacarídeos de bactérias Gram-negativo, enzimas intracelulares e material genético dos microrganismos. Rodriguez-Romo e Yousef (2005) avaliaram a combinação de gás ozônio e radiação UV sobre casca de ovos e seu efeito sobre a redução de *Salmonella* Enteritidis. Os autores combinaram UV (1500-2500  $\mu W/cm^2$ ) por um minuto e, em seguida, trataram os ovos com  $O_3$  (5 psig) por mais um minuto. Após avaliar o efeito do uso de cada agente desinfetante separadamente e em conjunto, concluiu-se que houve efeito sinérgico do UV e  $O_3$ , com inativação  $\geq 4,6 \log_{10}$  ufc do microrganismo, quando comparado com o tratamento controle.

De acordo com Samberg e Meroz (1995), o  $H_2O_2$ , por sua vez, é efetivo em baixas concentrações e tem efeito bactericida similar ao ozônio. Quando utilizado, é rapidamente evaporado e degradado depois do uso, sendo prontamente decomposto em água e oxigênio (Samberg e Meroz, 1995). Wells et al. (2010) avaliaram o tempo ótimo de exposição ao UV para a máxima redução bacteriana e também avaliaram se redução maior poderia ocorrer ao se utilizar a combinação de UV e  $H_2O_2$  comparado a cada tratamento separado. Ao utilizarem uma lâmpada germicida de intensidade em torno de 11  $mW/cm^2$ , foi determinado que a exposição dos ovos durante oito minutos foi capaz de reduzir em 2,07  $\log_{10}$  ufc/ovo, sem exceder a temperatura interna do ovo acima de 29°C. Uma desinfecção eficaz por meio do uso de luz UV não deve elevar essa temperatura, pois o aquecimento dos ovos pode levar a um desenvolvimento precoce do embrião antes da incubação. Nesse experimento, foi determinado que a exposição dos ovos à luz UV durante 8 minutos concomitante ao uso de  $H_2O_2$  na concentração de 1,5% foi significativamente eficaz para reduzir a contagem bacteriana de 4

$\log_{10}$  ufc/ovo para 1  $\log_{10}$  ufc/ovo. Os autores enfatizaram a necessidade da avaliação desse tipo de método de desinfecção em ovos férteis e seu efeito sobre a eclodibilidade.

Posteriormente, Wells et al. (2011) avaliaram a o efeito do uso de luz UV (11  $\text{mW}/\text{cm}^2$ ) e  $\text{H}_2\text{O}_2$  (3%) e concluíram que tratamento com repetição por seis vezes de UV +  $\text{H}_2\text{O}_2$  (3%), com duração de dois minutos cada repetição, proporcionou significativa redução da contagem de microrganismos mesófilos aeróbicos. Os autores, contudo, não encontraram diferença significativa para a eclodibilidade dos ovos e para a qualidade dos pintos quando comparado com o tratamento controle. Tal resultado foi justificado pelo número de bactérias presentes no tratamento controle ser provavelmente insuficiente para causar alterações no desenvolvimento embrionário e, assim, afetar a eclosão. Ainda assim, o método utilizado foi sugerido por estes autores para uso em granjas comerciais a fim de se evitar a contaminação de ovos durante a incubação.

A luz UV é uma alternativa segura para desinfecção de ar, água e superfícies. A aplicação de radiação UV, por meio do uso de lâmpadas germicidas (UV-C), é eficaz em reduzir a contagem microbiana total da superfície de ovos e de ambientes de incubação. Contudo, cuidado quanto à correta exposição da superfície do ovo deve ser observada, devida a dificuldade que a luz UV tem em ultrapassar obstáculos. O sinergismo obtido com o uso de luz UV-C e  $\text{H}_2\text{O}_2$  pode ser considerado para potencializar o efeito desinfetante da lâmpada germicida.

## 8.2. Ozônio ( $\text{O}_3$ )

Em 2001, a *Food and Drug Administration* (FDA) aprovou a utilização do ozônio, tanto na forma de gás quanto na forma líquida, como agente desinfetante a ser aplicado em processamento de alimentos e estoque de produtos (Khadre et al., 2001). Desde então, atenção especial é dada ao uso de ozônio como um potente desinfetante a ser utilizado em diversos ambientes, como hospitais, fábricas de doces, salas de maturação de queijo e também em incubatórios avícolas (Poppendieck et al., 2007). Além da sua atuação como desinfetante de ambientes, o ozônio, na forma gasosa, tem a mesma propriedade para desinfetar ovos, frutas frescas e vegetais e, na forma líquida, pode ser utilizado para lavar carcaças de aves e peixes, a fim de reduzir ou até mesmo eliminar a carga microbiana.

Em estudo sobre a ação microbiana do gás ozônio em ambientes hospitalares, Sharma e Hudson (2008) afirmaram que tal desinfetante oferece vantagens de desinfecção sobre a utilização de outros agentes microbicidas, como o cloro e o formaldeído. Como benefícios da

sua utilização podem-se citar: a forma prática como o gás é gerado e também seu controle por meio de aparelhos, que mensuram sua concentração no ambiente, evitando dessa maneira sua toxicidade se inalado por operadores. Outra característica favorável a sua eleição é o fato de se decompor em oxigênio após o uso, sendo, portanto, considerado um desinfetante não liberador de resíduos.

Estudos realizados para desinfecção de ovos por meio do ozônio demonstraram a sua eficácia em reduzir a contagem microbiana. Contudo ainda é necessária a determinação da dose a ser recomendada e a avaliação dos efeitos desse desinfetante sobre o rendimento de incubatório e qualidade dos pintos de um dia.

### **8.2.1. Propriedades físico-químicas do $O_3$**

A palavra ozônio é derivada do termo grego “*Ozein*”, que significa “cheirar” (Mahapatra et al., 2005). Essa denominação está ligada ao pungente odor do gás que, em concentrações tão baixas quanto 0,02 mg/l, é prontamente detectável pelo olfato humano (Yousef et al., 2011).

A molécula de ozônio ( $O_3$ ) é resultado do rearranjo de átomos quando moléculas de oxigênio ( $O_2$ ) são sujeitas à descarga elétrica de alta voltagem (Khadre et al., 2001). Na natureza, o ozônio pode ser produzido de maneira espontânea pela reação de oxigênio com agentes químicos específicos, descarga elétrica em iluminação ou por radiação ultravioleta curta solar (Yousef et al., 2011).

A forma estrutural do  $O_3$  consiste de três átomos de oxigênio arranjados na forma de um triângulo isósceles com um ângulo de 116,8 graus entre as duas ligações O-O, sendo a distância entre as ligações dos átomos igual a 1,27 angstroms (Mahapatra et al., 2005). Uma das características marcantes de suas propriedades físicas é que essa molécula apresenta elevado potencial eletroquímico, +2,075 V, o que lhe confere alta capacidade de oxidação (Mahapatra et al., 2005). Devido à instabilidade da molécula não é possível realizar o estoque, tanto na forma líquida, quanto na forma gasosa, sendo, portanto, necessária a geração *in-loco* por meio de aparelhos específicos (Yousef et al., 2011). Demais propriedades físicas do ozônio estão apresentadas na Tabela 6.

Tabela 6. Propriedades físicas do ozônio

<b>Propriedades físicas</b>	<b>Valores</b>
Ponto de ebulição (°C)	-111,9
Densidade <sup>a</sup> (fase gasosa) (kg/m <sup>3</sup> )	2,14
Calor de formação (kJ/mol)	144,7
Ponto de fusão (°C)	-192,7
Peso molecular (g/mol)	47,9982
Resistência à oxidação (V)	2,075
Solubilidade em água ppm (a 20°C)	3
Peso específico	1,658

<sup>a</sup> Determinado a 0°C e 1 atmosfera (101,3 kPa), Yousef et al., (2011).

Adaptado de Mahapatra et al., 2005.

A estabilidade da molécula na sua forma gasosa é maior que na forma líquida. Misturas puras de ozônio em oxigênio são estáveis em temperatura ambiente na ausência de catalase e luz (Yousef et al., 2011). Contudo, na produção de ozônio em escala industrial, a molécula é menos estável devido à presença de impurezas do ambiente (Yousef et al., 2011).

### **8.2.2. Fatores físicos que podem afetar a efetividade do ozônio**

A meia vida do ozônio na forma gasosa, sob condições de pressão atmosférica e temperaturas normais e ambiente seco, é de aproximadamente 12 horas (Yousef et al., 2011). Fatores ambientais, como temperatura, umidade, quantidade de matéria orgânica, reação com superfícies (por exemplo, o metal), concentração e pressão do ozônio afetam a sua dissociação em oxigênio (Yousef et al., 2011) e a sensibilidade microbiana a essa molécula.

De acordo com Khadre et al. (2001), a taxa de destruição de microrganismos por um desinfetante geralmente se eleva com o aumento da temperatura. No caso do ozônio, no entanto, o aumento da temperatura resulta em menor taxa de solubilidade e maior instabilidade da molécula, apesar de a taxa de reação com o substrato aumentar (Khadre et al., 2001). A umidade, por sua vez, desempenha papel de significância nesse tipo de processo de desinfecção. Apesar de Whistler e Sheldon (1989c) não encontrarem relação da alta umidade (90% x 55% UR) com a redução de microrganismos da casca de ovos desinfetados com gás ozônio, Braun et al. (2011) afirmaram que a umidade relativa do ar acima de 70% é importante para a efetividade desse tipo de desinfecção. A formação de radicais livres em alta umidade parece intensificar o efeito oxidante do ozônio (Braun et al., 2011). A diferença entre

os resultados dos trabalhos de Whistler e Sheldon (1989c) e Braun et al. (2011) pode estar relacionada às características e suscetibilidade dos microrganismos ao ozônio avaliados por cada grupo de autores.

Em relação à presença de matéria orgânica, a eficácia da maioria dos desinfetantes está, de maneira geral, inversamente relacionada à quantidade de matéria orgânica presente no sistema (Whistler e Sheldon, 1989a). Isso deve ser levado em consideração ao se utilizar a desinfecção com o ozônio, visto que sua eficácia pode ser potencializada em ambientes e produtos sem muitos contaminantes. Ainda assim, por ser eficaz em destruir bactérias em meio de cultura, em concentrações maiores que as encontradas em ambientes de incubação, o uso de gás ozônio para desinfecção desses locais foi proposto por Whistler e Sheldon (1989a).

### **8.2.3. Fontes de $O_3$**

Ozônio deve ser produzido no local de desinfecção para uso imediato, pois, devido a sua alta instabilidade, decompõe-se rapidamente em oxigênio. O ozônio é gerado pela exposição do ar ou outro gás contendo oxigênio normal a uma fonte de alta energia. As formas de produção são pelo método de descarga elétrica (*Corona Discharge Method*) ou métodos eletroquímicos e radiação ultravioleta, todos eles inspirados na sua formação natural na atmosfera (Mahapatra et al., 2005). O método de descarga elétrica é o mais utilizado comercialmente, mesmo tendo baixa eficiência (2-10%) e alto consumo de eletricidade (Mahapatra et al., 2005). Os outros métodos têm menor custo efetivo (Mahapatra et al., 2005), mas a produção de ozônio pelo método UV é menor que pelo método de descarga elétrica, pois só produz ozônio em uma concentração de 0,1% por peso.

### **8.2.4. Ação microbiana do $O_3$**

Devido a seu alto potencial de redução/oxidação, o ozônio atua como um oxidante de elementos da parede das células de microrganismos. Ao lesionar a parede da célula, o ozônio penetra dentro do microrganismo e oxida outros elementos importantes, como lipídeos insaturados, enzimas, proteínas, ácidos nucleicos e outros (Mahapatra et al., 2005). Dessa maneira, o dano causado a bactérias, fungos e vírus resulta em destruição gradual ou imediata da célula, sendo que esporos apresentam certa resistência ao ozônio (Yousef et al., 2011).

A sensibilidade dos microrganismos ao ozônio varia entre estudos (Khadre et al., 2001). Características de linhagens de microrganismos, idade da cultura, métodos de aplicação da molécula (bolhas de gás ou solução aquosa de ozônio uniforme), acurácia de

procedimentos de mensuração e métodos de mensuração da eficácia antimicrobiana são alguns dos fatores que torna a comparação entre diferentes estudos inviável (Khadre et al., 2001). Da mesma maneira, Mahapatra et al. (2005) afirmaram que a sensibilidade dos microrganismos ao ozônio depende do meio, do método de aplicação e da espécie.

### **8.2.5. Vantagens da utilização de $O_3$**

Além do efeito microbicida, características de menor toxicidade e fácil manuseio conferem ao ozônio vantagens do uso frente ao formaldeído. Somado a esses fatores, sua decomposição em oxigênio não tóxico e pronta degradação da molécula caracterizam o ozônio como um desinfetante não produtor de resíduos (Braun et al., 2011). Whistler e Sheldon (1989c) apontavam que a exposição dos trabalhadores ao formaldeído e sua formulação para desinfecção de ovos, era uma prática de risco. De maneira contrária, a formulação de gás ozônio podia ser mais bem controlada, devido à existência comercial de detectores de ozônio (Whistler e Sheldon, 1989c). A capacidade de detecção de ozônio pelo cheiro, em concentrações de 0,01 e 0,05 ppm/volume, muito abaixo de níveis tóxicos, também é relatada como uma vantagem dessa molécula sobre o formaldeído (Whistler e Sheldon, 1989c).

A existência de diversos métodos de mensuração de ozônio no ambiente, também é uma das vantagens de sua utilização como desinfetante. Métodos físicos, físico-químicos e químicos estão disponíveis no mercado (Khadre et al., 2001). Métodos físicos mensuram a absorção direta na região do espectro eletromagnético UV, luz visível e infravermelho, enquanto métodos físico-químicos são dependentes de efeitos como calor ou quimi-iluiminescência causados por reação (Khadre et al., 2001). Métodos químicos se referem à quantificação de produtos quando ozônio reage com reagentes químicos, como o iodeto de potássio, sendo o método *Indigo* o mais recomentado nesse caso (Khadre et al., 2001).

### **8.2.6. Limitações do uso de $O_3$**

Em comparação ao formaldeído, o custo de desinfecção por meio de ozônio é maior e deve ser levado em conta pelas empresas para sua utilização como desinfetante. De acordo com Whistler e Sheldon, (1989c), o custo associado à produção de  $O_3$  deve ser dividido em várias fases, a saber: 1) preço do gás alimentador (oxigênio); 2) processo de secagem do ar ou reciclagem do ozônio, dependendo do tipo de gás utilizado; 3) produção de ozônio e equipamento de monitoração e; 4) processo opcional de eliminação e recuperação de excesso

de ozônio. Os autores também relataram que, dependendo do tipo de material utilizado nas instalações, custos adicionais com reparos devem ser considerados, devido à capacidade corrosiva do gás em longo prazo.

Mahapatra et al. (2005) alertaram a existência de restrições quanto a exposição humana ao gás, sendo esse, portanto, um ponto de crítico de controle pela empresa. Um analisador ultravioleta equipado com sistema de mensuração que abranja a taxa de 0,01 a 100 ppm por volume (0,02 a 200 mg/m<sup>3</sup> NTP) deve ser instalado nos ambientes de desinfecção por ozônio, salas adjacentes e local onde a molécula será destruída (Khadre et al., 2001). Sinais de alarme devem ser emitidos quando a concentração de ozônio no ambiente exceder a 0,1 ppm (0,2 mg/m<sup>3</sup> NTP) (Khadre et al., 2001).

#### ***8.2.7. Utilização de gás O<sub>3</sub> como desinfetante de superfícies de ovos***

O ozônio vem sendo estudado como alternativa potencial de desinfetante frente ao uso de formaldeído para desinfecção de ambientes de incubatório e ovos férteis (Whistler e Sheldon, 1989abc; Bailey et al., 1996; Rodriguez-Romo e Yousef, 2005; Fuhrmann et al., 2010, Braun et al., 2011). Whistler e Sheldon (1989a) avaliaram a efetividade biocida do O<sub>3</sub> comparado com formaldeído sobre microrganismos cultivado em placas encontrados em incubatórios e outros patógenos da indústria avícola que afetam a produção avícola. Nesse primeiro trabalho, os autores afirmaram que a utilização de O<sub>3</sub> como desinfetante alternativo ao formaldeído, em concentração entre 1,52% e 1,65%, durante oito minutos, foi eficaz em reduzir a contagem microbiana, de maneira significativa, quando comparado ao grupo sem tratamento de desinfecção. Apesar da redução da contagem bacteriana e fúngica, para o uso de gás O<sub>3</sub>, ser de 4 a 7 log<sub>10</sub> e >4 log<sub>10</sub>, respectivamente, a redução da contagem dos mesmos microrganismos, por meio da desinfecção com formaldeído, apresentou-se maior (>7log<sub>10</sub> e >5log<sub>10</sub>). Por ter sido um experimento realizado com o alvo sobre os microrganismos, os autores sugeriram, então, a continuação dos estudos do efeito desinfetante do O<sub>3</sub> em ovos férteis e ambientes de incubação.

Com o objetivo de comparar o efeito bactericida do O<sub>3</sub> e formaldeído sobre microrganismos da casca do ovo e também o efeito da aplicação desses desinfetantes sobre a condutância e eclodibilidade dos ovos, Whistler e Sheldon (1989b) conduziram outro experimento que indicou, novamente, a eficiente ação desinfetante do O<sub>3</sub>. Como um bom resultado esperado para um desinfetante, o O<sub>3</sub> não afetou a cutícula dos ovos, pois, segundo os autores, os valores de condutância entre os tratamentos foram os mesmos. Contudo, apesar

dessa característica favorável e também de ter reduzido a contagem microbiana em  $>2,5 \log_{10}$ , valor estatisticamente semelhante à fumigação com formaldeído, a fumigação com  $O_3$  (concentração de 3,03% por peso, por duas horas) afetou a eclodibilidade de forma negativa. Os autores creditaram a alta mortalidade embrionária, de 26,5 a 37,5%, à toxicidade do gás aos embriões, quando aplicado durante o período testado.

Bailey et al. (1996) avaliaram a capacidade de desinfecção do gás  $O_3$  liberado dentro o nascedouro durante os últimos três dias de incubação. Nesse trabalho, ao comparar os tratamentos sem desinfecção (controle), desinfecção com gás  $O_3$  (0,2 a 0,4ppm), com peróxido de hidrogênio (2,5% de  $H_2O_2$  em água) e com luz ultravioleta (254 nm, 146  $\mu W/s$ ), os autores notaram que todos os desinfetantes testados reduziram de 75 a 99% do total de bactérias mesófilas aeróbicas totais, Enterobacteriaceae e *Salmonella* sp. Apesar do bom resultado, o peróxido de hidrogênio foi mais eficiente que os demais, sendo a reduzida capacidade do  $O_3$ , quando comparado ao  $H_2O_2$ , atribuída à baixa concentração testada.

A importância da desinfecção da casca de ovos de consumo, com objetivo de reduzir a presença de *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis, também levou pesquisadores a utilizarem o ozônio como desinfetante. Rodriguez-Romo e Yousef (2005) avaliaram a desinfecção de ovos contaminados externamente com *Salmonella* ( $8,0 \times 10^5$  to  $4,0 \times 10^6$  CFU/g por casca de ovo) por meio de ozônio (0 to 15 lb/in<sup>2</sup> gauge por 0 a 20 min) e UV (1500-2500  $\mu W/cm^2$ ). O estudo comprovou eficácia dos desinfetantes, testados separadamente ou em combinação, em reduzir a contagem bacteriana dos ovos, sendo um importante indicador do uso de associação de  $O_3$  a outros desinfetantes. Resultados indicaram que tratando os ovos com  $O_3$  (12-14% peso/peso durante 10 min a 4-8°C), ou com UV (1500-2500  $\mu W/cm^2$  durante 5 min a 22-25°C), reduziu-se significativamente ( $p < 0,05$ ) a contagem de *Salmonella* sp. na superfície da casca dos ovos em  $\geq 5,9$  e 4,3  $\log_{10}$ , respectivamente.

Em um estudo sobre o efeito da desinfecção com ozônio sobre os componentes do ovo e desenvolvimento embrionário, Fuhrmann et al. (2010) demonstraram, de maneira contrária a Whistler e Sheldon (1989b), que a cutícula foi totalmente destruída, mesmo com a desinfecção na menor dose (10 mL/L de  $O_3$ , em 20 ou 120 minutos de exposição). Tal análise foi possível por meio do uso da técnica de eletroforese, na qual a banda de proteínas 32, 43 e 80 kDa estavam ausentes no grupo de ovos tratado com ozônio, mas presentes no grupo controle. Ao compararem o efeito da menor dose, da dose média (25 mL/L de  $O_3$ , por 40 min) e da dose alta (50 mL/L de  $O_3$ , por 60 min) de exposição sobre o desenvolvimento embrionário, os autores concluíram que somente a menor dose pareceu não afetar o

desenvolvimento do embrião, mensurada pelo reduzido escore de dano ao DNA. Processos de oxidação por meio da formação de radicais oxidativos parecem estar relacionados ao dano celular, pois a ação direta do O<sub>3</sub> sobre o embrião é dificultada devido à proteção física que o saco vitelino exerce sobre as células (Fuhrmann et al., 2010). Mesmo afetando a cutícula de maneira negativa, os autores não descartaram o uso de baixas doses de O<sub>3</sub> para desinfecção de ovos férteis. Ao afirmarem que a meia vida da cutícula é de somente 48 horas, Fuhrmann et al. (2010) questionaram se sua ausência poderia representar perigos ao desenvolvimento do embrião. Efeitos desse tipo de desinfecção sobre a eclodibilidade não foram demonstrados nesse trabalho.

Por fim, com o objetivo de avaliar a eficácia do gás O<sub>3</sub> para desinfecção de ovos embrionados, Braun et al. (2011) elaboraram um protocolo para determinação de exposição-dose ótima para eliminar *Salmonella* Enteritidis da casca dos ovos. Ao expor ovos previamente contaminados ( $10^2$ – $10^4$  ou  $10^5$ – $10^6$  ufc/casca de ovo) a concentrações de O<sub>3</sub> entre 0,5% a 5% (peso/peso), em combinação com duas umidades relativas (< 30%, > 70%) à temperatura ambiente, os autores demonstraram que o método de desinfecção por meio do O<sub>3</sub> pode ser recomendado para aplicação em incubatórios. A utilização de 1% (peso/peso) de O<sub>3</sub> por 120 min, associado à alta umidade, resultou em completa inativação de *Salmonella* ( $10^2$ – $10^4$  ufc/casca), o que levou os autores a recomendar a verificação dessa metodologia em cabines de desinfecção maiores. Os autores enfatizaram a utilização de alta umidade (>70%) para esse tipo de desinfecção, já que a formação de radicais livres, em alta umidade relativa do ar, sustenta o efeito oxidativo do ozônio. Resultados desse tipo de desinfecção sobre parâmetros de eclodibilidade e qualidade dos pintos de um dia não foram estudados nesse trabalho, sendo, portanto, necessária sua avaliação.

A partir de novas pesquisas, com o uso de geradores de O<sub>3</sub> de alta potência, pode ser possível determinar a real aplicabilidade de desinfecção de ovos embrionados por meio de ozônio em incubatórios e seu efeito sobre o rendimento de incubação. Avaliações de custo desse tipo de desinfecção frente a outros desinfetantes também são recomendadas.

### **8.3. Peróxido de Hidrogênio**

O peróxido de hidrogênio é um dos oxidantes mais versáteis que existe, sendo superior ao cloro, dióxido de cloro e permanganato de potássio (Mattos et al., 2003). Por meio de catálise, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pode ser convertido em radical hidroxila (•OH) com reatividade inferior apenas

ao flúor (Mattos et al., 2003). Devido à alta capacidade oxidante, essa substância tem sido utilizada como agente antimicrobiano desde 1800. Na indústria alimentícia, o  $H_2O_2$  é utilizado como desinfetante de embalagens e agente esterilizante de superfícies (Schurman, 2001).

### **8.3.1. Propriedades físico-químicas**

O  $H_2O_2$  é uma substância transparente, com aparência da água e odor característico. Além disso, não é inflamável, é miscível com água em todas as proporções e é, geralmente, vendido como solução aquosa com concentrações entre 20 e 60% (m/v) (Mattos et al., 2003). Sob temperatura ambiente, o peróxido de hidrogênio é estável, se devidamente armazenado, sendo que pequenas perdas, de até 1% (m/v) ao ano, podem ocorrer no armazenamento em grandes tanques (Mattos et al., 2003).

Como agente oxidante de destaque, o  $H_2O_2$  possui potencial padrão de oxidação igual a 1,77 V. Listando-se os oxidantes mais poderosos e associando-os aos seus respectivos potenciais padrão (em V) tem-se: flúor (3,0), radical hidroxila (2,8), ozônio (2,1), permanganato de potássio (1,7), dióxido de cloro (1,5) e cloro (1,4) (Mattos et al., 2003).

### **8.3.2. Ação microbiana**

Agentes oxidantes, como o  $H_2O_2$ , são geralmente de baixo peso molecular e passam através de paredes e membranas celulares, ocasionando a destruição de componentes intracelulares (Finnegan et al., 2010). O efeito microbiana do peróxido de hidrogênio em sistemas biológicos tem sido relatado, demonstrando inibição de crescimento e/ou inativação de microrganismos patogênicos, como bactérias vegetativas, fungos, vírus, micobactérias e esporos quando usado na concentração e aplicação adequadas (Labas et al., 2008).

Essa solução desinfetante é um biocida fortemente oxidante que, por meio da formação de radicais livres, ataca membranas lipídicas, DNA e outros componentes celulares essenciais (Oliveira, sd). Ao remover elétrons de grupos químicos susceptíveis e dessa maneira os oxidando, o  $H_2O_2$  se torna, então, reduzido no processo (Finnegan et al., 2010).

### **8.3.3. Vantagens do uso de peróxido de hidrogênio**

O peróxido de hidrogênio, diferentemente do formaldeído, é facilmente evaporado ou degradado após o uso, pois se decompõe em água e oxigênio (Sheldon e Brake, 1991). Além dessas propriedades, não apresenta odor de duração prolongada e representa risco mínimo de segurança para os trabalhadores, se manuseado corretamente (Sheldon e Brake, 1991).

Quando comparado ao ozônio, o  $\text{H}_2\text{O}_2$  é menos oneroso, pois não necessita de equipamento específico para geração *in loco*, é efetivo em baixas concentrações e tem atividade microbiana similar ao  $\text{O}_3$  (Sheldon e Brake, 1991).

De acordo com Gottselig (2011), o peróxido de hidrogênio é relativamente barato e fácil de incorporar em equipamentos que produzem *spray*. Alta concentração de  $\text{H}_2\text{O}_2$  pode ser adquirida e diluída para o uso e, com isso, economizar na compra de grandes quantidades da solução em baixa concentração, não sendo necessário o estoque de grandes volumes (Gottselig, 2011).

#### **8.3.4. Limitações e cuidados ao uso**

Como um potente oxidante, deve ser manuseado com atenção, pois pode irritar a pele, os olhos e as mucosas, além de descolorir roupas e pelos (Sheldon e Brake, 1991). De acordo com Mattos et al. (2003), óculos, máscaras e roupas apropriadas devem ser sempre empregados quando do uso de soluções de peróxido de hidrogênio, pois a inalação de vapores causa irritação e inflamação das vias respiratórias.  $1,4 \text{ mg m}^{-3}$  de vapor de  $\text{H}_2\text{O}_2$  é considerado o limite para um período diário de 8 h (Mattos et al., 2003). Efeito carcinogênico é citado por Gottselig (2011) quando a solução possui alta concentração, contudo 3% é a concentração mais utilizada devido a sua baixa toxicidade.

#### **8.3.5. Utilização de peróxido de hidrogênio como desinfetante de casca de ovos**

O uso de peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) para esterilização de canos, filtros e etc, na indústria alimentícia data de várias décadas (Toledo et al., 1973). A sua recomendação como desinfetante para ovos férteis foi estabelecida por Sheldon e Brake (1991), que demonstraram que ovos tratados com 5% de  $\text{H}_2\text{O}_2$  antes da incubação tiveram significativa redução da contagem microbiana ( $5 \log_{10}$ ). Nesse estudo, ao comparar a desinfecção dos ovos com  $\text{H}_2\text{O}_2$  e ovos não tratados com desinfetante, os autores relataram um aumento de 2% na eclodibilidade. Quando comparado ao formaldeído, nenhuma diferença significativa foi encontrada para essa variável em ovos de matrizes de 30 e 56 semanas de idade. Esses resultados levaram os autores afirmar que o  $\text{H}_2\text{O}_2$  é uma alternativa possível ao uso de formaldeído para desinfecção de ovos férteis.

Em outro estudo, Padron (1995) avaliou o efeito desinfetante de uma solução de 6% de  $\text{H}_2\text{O}_2$  sobre a redução da contagem de *Salmonella* Typhimurium da membrana da casca de ovos férteis e sobre a eclodibilidade. Ao utilizar o método de imersão dos ovos na solução

desinfetante, o que, segundo o autor, permite que essa atinja a membrana do ovo, foi observada redução em 95% do número de colônias da bactéria e apenas 55% dos ovos foram considerados positivos para o patógeno. A eclodibilidade não foi afetada pelo tipo de desinfecção realizado, mas o autor sugeriu que novos trabalhos fossem conduzidos com número de ovos maior que o testado (360). Mesmo sendo considerado um método eficaz, Padron (1995) afirmou que a desinfecção com solução de 6% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pelo método de imersão não seria um método prático para uso na indústria avícola.

Como mencionado anteriormente, Bailey et al. (1996) testaram três alternativas viáveis de desinfecção de ovos férteis. Nesse trabalho, ao comparar os tratamentos sem desinfecção (controle), desinfecção com gás O<sub>3</sub> (0,2 a 0,4 ppm), com peróxido de hidrogênio (nebulização de 2,5% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em água, a cada 5 min, durante os últimos três dias de incubação) e com luz ultravioleta (254 nm, 146 μW/s), os autores notaram que todos os desinfetantes testados reduziram de 75 a 99% do total de bactéria mesófilas aeróbicas totais, Enterobacteriaceae e *Salmonella* sp. Apesar do bom resultado, o peróxido de hidrogênio foi mais eficiente que os demais. Os autores creditaram essa eficiência no fato de que o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> obteve maior dispersão na incubadora e, com isso, maior contato com bactérias patogênicas, resultando na diminuição do número de unidades formadoras de colônias.

A avaliação do uso de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como desinfetante para ovos embrionados também foi abordada por Sander e Wilson (1999). Nessa pesquisa, os autores avaliaram o efeito da pulverização de uma solução de 3% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, do 1º ao 18º dia de incubação, sobre a redução de contagem bacteriana, perda de umidade do ovo, eclodibilidade e qualidade do pinto de um dia. Uma significativa redução da contagem bacteriana foi encontrada no tratamento com o desinfetante, quando comparado ao grupo controle (nebulização com água). Em relação à perda de umidade do ovo, o tratamento com o desinfetante apresentou maior valor quando comparado ao grupo controle (pulverização com água), o que pode demonstrar efeito do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sobre a permeabilidade do ovo. Ainda assim, a alta perda de umidade (11,3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> x 8,6% H<sub>2</sub>O+água) não afetou a eclodibilidade e qualidade do pinto de um dia, o que levou os autores a recomendarem o uso do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em substituição ao formaldeído.

A combinação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e luz UV foi considerada por Bayliss e Waites (1982) como um método eficaz em eliminar bactérias. Em conjunto, a luz UV e o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produziram radicais hidroxila que resultaram na destruição mais acelerada de *Bacillus subtilis* em placa (redução de 99,999% na contagem bacteriana). Pensando nisso, Wells et al. (2010) avaliaram a duração ideal de exposição de ovos à luz UV e a concentração ótima de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, quando usados em combinação, para máxima redução do número de bactérias na casca do ovo. Foi determinado

que a exposição dos ovos à luz UV durante 8 minutos, concomitante ao uso de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (aplicação manual do produto) na concentração de 1,5%, foi significativamente eficaz para reduzir a contagem bacteriana de 4 log<sub>10</sub> ufc/ovo para 1 log<sub>10</sub> ufc/ovo. Os autores enfatizaram a necessidade da avaliação desse tipo de método de desinfecção em ovos férteis e seu efeito sobre a eclodibilidade. Posteriormente, Wells et al. (2011) sugeriram o uso da combinação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e luz UV em granjas comerciais a fim de se evitar a contaminação de ovos durante a incubação. Nesse trabalho, ao utilizarem luz UV (11 mW/cm<sup>2</sup>) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (3%) em conjunto, os autores concluíram que o tratamento com repetição por seis vezes de UV + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, com duração de dois minutos cada repetição, proporcionou significativa redução da contagem de microrganismos mesófilos aeróbicos. Não foi encontrada diferença significativa para eclodibilidade dos ovos e qualidade dos pintos quando comparado com o tratamento controle.

#### **8.4. Ácido peracético**

O ácido peracético (C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O<sub>3</sub>) consiste em peróxido de hidrogênio, ácido acético, água e ácido peracético (Steiner, 1995). É considerado um forte oxidante devido a uma série de reações que ocorrem durante a sua decomposição (Stampi et al., 2001). A solução de C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O<sub>3</sub> tem sido utilizada como desinfetante na indústria alimentícia (Del Río et al., 2007, Bauermeister et al., 2008) e farmacêutica e, mais recentemente, em ambientes de saúde, sendo sua utilização em tratamentos de água e efluentes destacada em diversas pesquisas (Stampi et al., 2001).

Em 2004, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde (ANVISA, 2004), por meio da RDC n. 2 de 2004, aprovou a utilização deste composto na lavagem de ovos, carcaças, peixes e hortifrutícolas em quantidade suficiente para obter o efeito desejado, sem deixar resíduos no produto final. A dissociação em água, ácido acético e oxigênio, caracteriza esse composto como não liberador de resíduos tóxicos e, portanto, “amigável” ao meio ambiente, sendo, portanto indicado o estudo do seu uso como desinfetante alternativo ao uso de formaldeído para desinfecção de ovos férteis.

##### **8.4.1. Características físico-químicas**

O ácido peracético ou ácido peroxiacético (PAA) é o peróxido do ácido acético (AA) e possui potencial oxidante (1,81 V) maior que o do cloro ou dióxido de cloro (Kitis, 2004). O

PAA está disponível comercialmente na forma de uma mistura quaternária que contém AA, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, PAA e água:



H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> = peróxido de hidrogênio

CH<sub>3</sub>COOH = ácido acético

H<sub>2</sub>O = água

CH<sub>3</sub>COOOH = ácido peracético

O ácido peracético é um líquido límpido e incolor, sem capacidade de formação de espuma, que possui forte odor pungente do ácido acético (componente principal do vinagre), além de um pH ácido menor que 2 (Kitis, 2004). É uma solução menos estável que o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e deve ser armazenada em locais resfriados e recipientes originais (Kitis, 2004).

Temperatura ambiente e pH do meio podem interferir na ação do PAA (Baldry, 1983, Marquis et al., 1995). Assim como outros desinfetantes, o PAA perde eficiência quando a temperatura ambiente diminui e o meio apresenta-se pouco ácido (Baldry, 1983).

#### **8.4.2. Ação microbida**

O ácido peracético é um excelente bactericida, fungicida e esporicida (Alasri et al., 1992, Alasri et al., 1993, Marquis et al., 1995). Sua atividade como desinfetante parece estar relacionada com a liberação de oxigênio ativo, mas o detalhamento do modo de ação contra microrganismos ainda é limitado (Kitis, 2004, Finnegan et al., 2010). É provável que, assim como outros agentes oxidantes, o PAA aja na oxidação de componentes celulares (ligações sulfidríla e sulfúricas de proteína, enzimas e outros metabólitos), ocasionando a destruição da célula microbiana.

De maneira geral, a dose necessária para eliminar ou reduzir o número de bactérias é menor quando comparada a dose esporicida. De acordo com Baldry (1983), em pH 5,0, a dose esporicida é de 13 mmol/l por 60 min, enquanto que a dose bactericida é de apenas 0,13mmol/l por 30 min. Segundo Marquis et al. (1995), a ação do PAA em esporos pode estar relacionada à atuação redutora dos radicais orgânicos (OH e O<sub>2</sub><sup>-</sup>) formados pelo PAA nesses microrganismos, que encontram-se em estado altamente oxidados.

#### **8.4.3. Limitações ao uso**

Problemas de corrosão de materiais são apontados como um dos fatores limitantes ao uso de PAA. O alumínio puro, aço inoxidável e ferro estanhado são resistentes ao PAA; mas

aço liso, ferro galvanizado, cobre, latão e bronze são suscetíveis à reação e à corrosão (Kitis, 2004). Contudo, isso pode ser solucionado com o uso de formulações comerciais contendo baixa concentração de PAA e ausência de ácido sulfúrico (Baldry, 1983).

Em relação à toxicidade, os perigos à saúde associados ao uso de 12% de PAA são semelhantes aos perigos do peróxido de hidrogênio a 50% (Kitis, 2004), sendo recomendado, portanto, o manuseio do produto com proteção adequada. Outra limitação apontada por Samberg e Meroz (1995) é o elevado custo do PAA quando utilizado em larga escala.

#### **8.4.4. Aplicação do ácido peracético para desinfecção de ovos férteis**

Trabalhos com o uso de PAA para desinfecção de ovos férteis ainda são escassos frente a outros desinfetantes mais comuns. Hartman e Carlin (1957) sugeriram o tratamento de desinfecção com solução de ácido peracético em ovos de consumo a fim de reduzir a contagem bacteriana, especialmente de bactérias Gram-negativo. Apesar de essa recomendação ser direcionada ao tratamento de ovos não férteis, a utilização de PAA na indústria avícola foi abrangida, ao longo dos anos, para lavagem de carcaças de frangos (Bauermeister et al., 2008), desinfecção de granjas e abatedouros (Kaskova et al., 2007), incubatórios (Rodgers et al., 2001, Moustafa-Gehan, 2009) e ovos embrionados (Harrison, 1969, Cox et al., 2007).

Para produção de aves livres de patógenos, o PAA foi testado por Harrison (1969), na concentração de 2%, como possível esterilizante de ovos embrionados. O autor observou que a desinfecção dos ovos com hipoclorito de sódio, momentos antes da incubação, seguida de esterilização com cloreto de mercúrio (2% m/v, por 8 min), no 19º dia de incubação, era capaz de esterilizar os ovos, mas reduzia a eclodibilidade de maneira acentuada. Ao comparar o PAA com o cloreto de mercúrio, Harrison (1969) comprovou a eficácia do PAA em eliminar patógenos dos ovos, medida na proporção de aves comprovadamente livres de patógenos nascidas após a esterilização, sem que a eclodibilidade fosse afetada (91% para o PAA x 41% do cloreto de mercúrio). Apesar de nesse trabalho a utilização do PAA ser direcionada para esterilização, seu uso para desinfecção é mais usual.

Geralmente, a solução de PAA é encontrada associada a outro agente oxidante, o  $H_2O_2$ , e dessa maneira, analisada sua eficiência como microbicida em ovos férteis. Cox et al. (2007) testaram o efeito de sete produtos químicos comerciais sobre a redução da contagem de *Salmonella* Typhimurium em ovos férteis, no qual a solução de PAA avaliada (35.000 ppm) estava associada ao  $H_2O_2$ . Os tratamentos consistiram de: T1- peróxido de hidrogênio, T2- gotículas de emulsão de óleo em água estabilizada por detergente, T3- ácido peroxiacético

(35.000 ppm), T4- quatro compostos de amônia quaternária ligados a um polímero, T5- dois compostos de amônia, um composto de biguanida e bronopol ligados a um polímero, T6- cloreto alquil dimetil benzil amônio e ureia estabilizada, e T7- cloridato de polihexametileno biguanida (PHMB). Após inocular os ovos com o patógeno e realizar a aplicação dos produtos por meio de *spray* (recipiente de 750 mL, calibrado para administrar 10 mL de cada químico por ovo), foi realizada a análise microbiológica. Os autores observaram eficiência do PAA em reduzir a contagem bacteriana em 93,5%, resultado significativamente melhor que a solução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> testada (14.000 ppm), a qual obteve somente 10% de redução da bactéria. Nesse trabalho, não foi avaliado efeito dos desinfetantes sobre eclodibilidade e qualidade dos pintinhos, mas os autores recomendaram análises dessas variáveis em trabalhos futuros.

## 9. REFERÊNCIAS

- Aguiar, A. M. S. Avaliação do emprego da radiação ultravioleta na desinfecção de águas com cor e turbidez moderadas. 114p. Dissertação (Mestre em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos). Belo Horizonte. Universidade Federal de Minas Gerais. 2000.
- Aguiar, A. M. S.; Neto, M. L. F.; Brito, L. L. A. et al. Avaliação do emprego da radiação ultravioleta na desinfecção de águas com turbidez e cor moderadas. Artigo técnico-Engenharia Sanitária e Ambiental, v. 7, n. 1, 2002.
- Aitken, R.N.C. The oviduct. In. Physiology and Biochemistry of the Domestic Fowl, vol. III, ed. D. J. Bell; B.M. Freeman New York: Academic Press, p. 1237-1289. 1971.
- Alasri, A.; Roques, C.; Michel, G. et al. Bactericidal properties of peracetic acid and hydrogen peroxide, alone and in combination, and chlorine and formaldehyde against bacterial water strains. *Can. J. Microbiol.*, v. 38, p. 635-642, 1992.
- Alasri, A.; Valverde, M.; Roques, C. Sporocidal properties of peracetic acid and hydrogen peroxide, alone and in combination, in comparison with chlorine and formaldehyde for ultrafiltration membrane disinfection. *Can. J. Microbiol.*, v. 39, p. 52-60, 1993.

Al-khalaf, A.N., Akeila, M.A., Al-Dubaib, M.A et al. Bacterial contamination of hatcheries. *J. of Agri. and Vet. Sci.*, v., 2, n. 2, p. 67-76, 2010.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILANCIA SANITÁRIA - ANVISA. Resolução RDC nº 02, de 08 de janeiro de 2004. Aprova o uso do ácido peracético como coadjuvante de tecnologia na função de agente de controle de microrganismos na lavagem de ovos, carcaças e ou partes de animais de açougue, peixes e crustáceos e hortifrútícolas em quantidade suficiente para obter o efeito desejado, sem deixar resíduos no produto final. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 09 de janeiro de 2004.

Arias, J.L., Fernandez, M.S., Dennis, J.E. et al. Collagens of the Chicken Eggshell Membranes, *Connec. Tis. Res.*, v. 26, n. 1-2 ,p. 37-45, 1991.

Bailey, J. S.; Buhr, R. J.; Cox, N. A.; Berrang, M. E. Effect of Hatching Cabinet Sanitation Treatments on *Salmonella* Cross-Contamination and Hatchability of Broiler Eggs. *Poult. Sci.*, v. 75, p. 191-196, 1996.

Bain, M.M., MacLeod, N., Thomson, R., Hancock, J.W. Microcracks in eggs. *Poult. Sci.*, v. 85, p. 2001–2008, 2006.

Baldry, M .G .C. The bactericidal, fungicidal and sporicidal properties of hydrogen peroxide and peracetic acid. *Journal of Applied Bacteriology*, v.54, p.417-423, 1983.

Balogh, T.S.; Velasco, M.V.R.; Pedriali, C.A. et al. Proteção à radiação ultravioleta: recursos disponíveis na atualidade em fotoproteção. *An Bras Dermatol.*, v. 86, n. 4, p. 732-742, 2011.

Barbour, E.K. Nabbut, N.H. Isolation of salmonella and some other potential pathogens from two chicken breeding farms in Saudi Arabia. *Avian Dis.*; v. 26, n. 2, p.:234-44, 1982.

Bauermeister, L.J.; Bowers, J.W.; Townsend J.C.; Mckee, S.R. Validating the efficacy of peracetic acid mixture as an antimicrobial in poultry chillers. *J. Food Prot.*, 71: 119-22, 2008.

Bayliss, C.; Waites, W.M. Effect of simultaneous high intensity ultraviolet irradiation and hydrogen peroxide on bacterial spores. *J. Food Technol.*, v.17, p 467-470, 1982.

Berrang, M.E., Frank, J.F., Buhr, R.J. et al. Microbiology of sanitized broiler hatching eggs through the egg production period. *J. Appl. Poult. Res.*, v. 6, p. 298-305, 1997.

Berrang, M.E., Frank, J.F., Buhr, R.J. et al. Eggshell characteristics and penetration by *Salmonella* through the productive life of a broiler breeder flock. *Poult. Sci.*, v. 77, p. 1446–1450, 1998.

Berrang, M.E., Cox, N.A., Frank, J.F et al. Bacterial penetration of the eggshell and shell membranes of the chicken hatching egg: a review. *J. Appl. Poult. Sci.*, v.8, p. 499- 504, 1999.

Berrang, M. E.; Cox, N. A.; Frank, J. E.; Buhr, R J. et al. Hatching egg sanitization for prevention of human Enteropathog: A Review. *J. Appl. Poult. Res.*, v. 9, p. 279-284, 2000.

Bialka, K. L., A. Demirci, A. , Knabel, S. J., et al. Efficacy of electrolyzed oxidizing water for the microbial safety and quality of eggs. *Poult. Sci.*, v. 83, p. 2071–2078, 2004.

Bierer, B. W., Valentine, H. D., Barnett, B. D., Rhodes, W. H. Germicidal efficiency of eggwashing on eggs artificially contaminated with *Salmonella* Typhimurium. *Poult. Sci.*, v. 40, p. 148-152, 1961.

Bintsis, T., E. Litopoulou-Tzanetaki, and R.K. Robinson. Existing and potential applications of ultraviolet light in the food industry – a critical review. *J. Sci. Food Agric.*, v. 80, p. 637-645, 2000.

Board, R.G. Review article: the course of microbial infection of the hen's egg. *J. Appl. Bact.*, v. 29, n. 2, p. 319-341, 1966.

Board, P A and Board, R.G. A method of studying bacterial penetration of the shell of the hen's egg. *Lab. Prac.* v. 16, p.472-473,482, 1967.

Board, R. G., The microbiology of the hen's eggs. *Adv. Appl. Microbiol.*, v.11, p.245-281, 1969.

Board, F.G. e Tranter, H.S. The microbiology of eggs. In. *Egg Science and Technology*, 4rd edition, ed.: W.J. Stadelman and O.J. Cotterill .AVI, Westport, CT, p. 81-104, 1995.

BRASIL. Resolução RDC nº 91, de 28 de novembro de 2008. Proíbe o uso isolado de produtos que contenham paraformaldeído ou formaldeído, para desinfecção e esterilização, regulamenta o uso de produtos que contenham tais substâncias em equipamentos de esterilização e dá outras providências. Agência Nacional da Vigilância Sanitária. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 01 de dezembro de 2008.

Braun, P., Fehlhaber, K. e Wicke, A. *Salmonella* Enteritidis invades the egg through the shell. *World Poult. Spe.*, v. 11, p. 23-24, 1999.

Braun P.G.; Fernandez, N.; Fuhrmann, H. Investigations on the effect of ozone as a disinfectant of egg surfaces. *Ozone: Science & Engineering: The Journal of the International Ozone Association*, v. 33, n.5, p. 374-378, 2011.

Buhr, R.J., Mauldin, J.M., Bailey, J.S. et al. Automated spray sanitizing of broiler hatching eggs 1. Physical Characteristics of the egg. *J. Appl. Poult. Res.*, v. 3, p. 219-225, 1994a.

Buhr, R.J., Mauldin, J.M., Bailey, J.S. et al. Automated spray sanitizing of broiler hatching eggs 2. Hatchability of nest clean and dirty eggs. *J. Appl. Poult. Res.*, v. 3, p. 226-233, 1994b.

Buhr, R.J., Mauldin, J.M., Berrang, M.E , et al. Value of sanitized dirty broiler hatching eggs. *Poult. Sci. (Suppl)* v.75, p. 107, 1996.

Cadirci, S. Disinfection of hatching eggs by formaldehyde fumigation – a review. *Arch.Geflügelk.*, v. 73, n. 2, p. 116–123, 2009.

Chavez, C., Knape, K. D. ; Coufal, C. D; e Carey, J. B. Reduction of eggshell aerobic plate counts by ultraviolet irradiation. *Poult. Sci.*, v. 81, p.1132–1135, 2002.

Chen, J., Clarke, R.C. e Grimths, M.W. Use of luminescent strains of *Salmonella enteritidis* to monitor contamination and survival in eggs. *J. Food Prot.* v.59, p.915-921. 1996.

Chousalkar, K.K., Flynn, P., Sutherland, M., Roberts, J.R., Cheetham, B.F., 2010. Recovery of *Salmonella* and *Escherichia coli* from commercial eggshells and effect of translucency on bacterial penetration in eggs. *Int. J. of Food. Micro.*, v. 142, p.2017-213, 2010.

Cony, H.C. Métodos de desinfecção e princípios ativos desinfetantes e a contaminação, mortalidade embrionária e eclodibilidade de ovos e embriões de aves. 101p. (Tese de Mestrado), Porto Alegre, Brasil, 2007.

Cony, H.C.; Vieira, S. L.; Berres, J. et al. Técnicas de pulverização e imersão com distintos desinfetantes sobre ovos incubáveis. *Ciê. Rur.*, v.38, n.5, 2008.

Cook, M.I., Beissinger, S.R., Toranzos, G.A. et al. Trans-shell infection by pathogenic microorganisms reduces the shelf life of non-incubated bird's eggs: a constraint on the onset of incubation? *Proc. R. Soc. Lond. B.* v. 270, p. 2233–2240, 2003.

Cook, M.I., Beissinger, S.R., Toranzos, G.A., et al. Incubation reduces microbial growth on eggshells and the opportunity for trans-shell infection. *Eco. Let.*, v.8, p. 532–537, 2005.

Cortés, C.R., Isáías, G.T., Cuello, C.L. et al. Bacterial isolation rate from fertile eggs, hatching eggs, and neonatal broilers with yolk sac infection. *Rev. Latinoam. Microbiol.*, v. 46, n.1-2, p. 12-16, 2004.

Coufal, C., C. Chavez, K. Knape, and J. Carey. Evaluation of a method of ultraviolet light sanitation of broiler hatching eggs. *Poult. Sci.*, v. 82, p.754–759, 2003.

Cox, N.A. e Bailey, J.S. Effect of chemical treatments to eliminate *Salmonella* on hatching eggs. *Poult. Sci.*, v. 70 (Supp. 1), p. 154, 1991.

Cox, N.A., Bailey, J.S e Berrang, M.E. Bactericidal treatment of hatching eggs I. Chemical immersion treatments and *Salmonella*. *J Appl Poult Res.*, v. 7, p. 347-350, 1998.

Cox, N.A., Berrang, M.E., Buhr, R.J. e Bailey, J.S. Bactericidal treatment of hatching eggs II. Use of Chemical Disinfectants with Vacuum to Reduce *Salmonella*. *J Appl Poult Res.*, v. 8 (3), p. 321-326, 1999.

Cox, N. A.; Richardson, L. J. ; Buhr, R. J. et al. Bactericidal effect of several chemicals on hatching eggs inoculated with *Salmonella* serovar Typhimurium. *J. Appl. Poult. Res.*, v. 16, p.623–627, 2007.

Deeming, D. C. Embryonic development and utilisation of egg components, In. *Avian incubation*, ed D. C. Deeming. Oxford University Press, Toronto, p. 43–53, 2002.

Del Río, E.; Panizo-Morán, M.; Priet, M. et al. Effect of various chemical decontamination treatments on natural microflora and sensory characteristics of poultry. *International Journal of Food Microbiology*, v. 115, p. 268–280, 2007.

De Reu, K., Grijspeerdt, K., Heyndrickx, M. et al. Bacterial eggshell contamination in conventional cages, furnished cages and aviary housing systems for laying hens. *Brit. Poult. Sci.*, v.46, n.2, p.149-155, 2005.

De Reu, K., Grijspeerdt, K., Messens, W. et al. Eggshell factors influencing eggshell penetration and whole egg contamination by different bacteria, including *Salmonella Enteritidis*. *Int. J. of Food Microb.*, v. 112, p. 253–260, 2006.

Ernst, R.A. Hatching Egg Sanitation: The Key Step in Successful Storage and Production. University of California, California USA., Publication: 8120. 2004.

Fasenko, G.M.; O’Dea Christopher, E. E. e McMullen, L. M. Spraying hatching eggs with electrolyzed oxidizing water reduces eggshell microbial load without compromising broiler production parameters. *Poult. Sci.*, v. 88, p.1121–1127, 2009.

Fernandez, M.S., Araya, M., Arias, J.L. Eggshells are shaped by a precise spatio-temporal arrangement of sequentially deposited macromolecules. *Mat. Bio.*, v. 16, p. 13-20, 1997.

Fernandez, M.S., Moya, A., Lopes, L. et al. Secretion pattern, ultrastructural localization and function of extracellular matrix molecules involved in eggshell formation. *Mat. Bio.*, v. 19, p. 793-803, 2001.

Finnegan, M.; Linley, E.; Denyer, S. P. et al. Mode of action of hydrogen peroxide and other oxidizing agents: differences between liquid and gas forms. *J Antimicrob Chemother.*, v. 65, p. 2108–2115, 2010.

Fuhrmann, H.; Rupp, N.; Buchner, A.; Braun, P. The effect of gaseous ozone treatment on egg components. *J. Sci. Food Agric.*, v. 90, p. 593–598, 2010.

Funk, E. M. e Forward, J. F. Effect of washing soiled eggs on hatchability. *Poult. Sci.*, v. 28, n.1, p. 155-157, 1949.

Gast, R.K., Holt, P.S. Influence of the level and location of contamination on the multiplication of *Salmonella* Enteritidis at different storage temperatures in experimentally inoculated eggs. *Poult. Sci.*, v. 79, p. 559–563, 2000.

Gantois, I, Ducatelle, R., Pasmans, F. et al. Mechanisms of egg contamination by *Salmonella* Enteritidis. *FEMS Microbiol. Ver.*, v. 33, p. 718–738, 2009.

Gautron, J. e Nys, Y. Eggshell matrix proteins and natural defenses of the egg. Symposium COA/INRA Scientific Cooperation in Agriculture, Tainan (Taiwan, R.O.C.), p. 159-164, 2006.

Gentry, R.F. e Quarles, C.L. The measurement of bacterial contamination on egg shells. *Poult. Sci.*, v. 51, p. 930-933, 1972.

Gilbert, A.B. Egg albumen and its formation. In: *Physiology and Biochemistry of the Domestic Fowl*, Vol. III, ed Bell, D.J. & Freeman, B.M., Academic Press, London, p. 1291-1329, 1971.

Gole, V.C., Chousalkar, K.K., Roberts, J.R. et al. Effect of egg washing and correlation between eggshell characteristics and egg penetration by various *Salmonella Typhimurium* strains. *PloS One*, v. 9, n. 3, 2014.

Gottselig, S. M. Microbial reduction on eggshell surfaces by the use of hydrogen peroxide and ultraviolet light. 91p. Thesis (Master of Science). Texas A&M University. 2011.

Graves, R.C. e MacLaury, D.D.W. The effects of temperature, vapor pressure and absolute humidity on bacterial contamination of shell eggs. *Poult. Sci.*, v. 41, p. 1219-1225, 1962.

Grijpspeerd, K., Kreft, J.-U., Messens, W. Individual-based modelling of growth and migration of *Salmonella enteritidis* in hens' eggs. *Int. J. of Food Microb.*, v. 100, p. 323– 333, 2005.

Guedes, A. M. M.; Novello, D.; Mendes, G. M. P.; Cristianini, M. Tecnologia de ultravioleta para preservação de alimentos. *B.CEPPA*, v. 27, n. 1, p. 59-70, 2009.

Gulsen Copur; Arslan, M.; Baylan, M. et al. Use of allicin as an alternative hatching egg disinfectant versus formaldehyde fumigation in broiler hatching eggs. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 25:3, 2494-2498, 2011.

Haigh, T. e Betts, W.B. Microbial barrier properties of hen egg shells. (1991): Microbial barrier properties of hen egg shells. *Microbios*, v. 68, p. 137–146, 1991.

Haines, R.B. e Moran, T. Porosity of, and bacterial invasion through, the shell of the hen's egg. *J. Hyg.*, v. 40, p. 453-461, 1940.

Harrison, G.F. Production of germ-free chicks: a comparison of the hatchability of eggs sterilized externally by different methods. *Lab. Anim.*, v.3, p.51-59, 1969.

Hartman, P. A. e Carlin, F. Peracetic acid treatment of eggs. *Poult. Sci.*, v. 36, p. 673-675, 1957.

Hartung, T. E. e Stadelman, W. J. *Pseudomonas fluorescens* penetration of egg shell membranes as influenced by shell porosity, age of egg and degree of bacterial challenge. *Poult. Sci.*, v. 42, p. 147-150, 1963.

Hayretdag, S. e Kolankaya, D. Investigation of the Effects of Pre-Incubation Formaldehyde Fumigation on the Tracheal Epithelium of Chicken Embryos and Chicks. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.*, v. 32, n.4, p. 263-267, 2008.

Heier, B.T. e Jarp, J. An epidemiological study of the hatchability in broiler breeder flocks. *Poult. Sci.*, v. 80, p. 1132–1138, 2001.

Hielt, K.L., Cox, N. A., Buhr, R.J. et al. Genotype analyses of campylobacter isolated from distinct segments of the reproductive tracts of broiler breeder hens. *Current Micro.*, v. 45, p. 400–404, 2002.

Hincke, M.T., Nys, Y., Gautron, J. et al. The eggshell: structure, composition and mineralization. *Front. in Bio.*, v. 17, p. 1266-1280, 2012.

Huntington, J.A. e Stein, P.E. Structure and properties of ovalbumin. *J. Chromatogr. B.*, v. 756 p. 189–198, 2001.

Huston, T. M., J. R. Palmer, and J. L. Carmon, The effects of washing on the hatchability of hens' eggs. *Poult Sci.*, v. 36, p.557-562, 1957.

Jones, D. R., Curtis, P. A., Anderson, K.E. et al. Microbial Contamination in Inoculated Shell Eggs: II. Effects of Layer Strain and Egg Storage. *Poult. Sci.*, v. 83, p. 95–100, 2004.

Kaskova, A.; Ondrasovicova, O.; Vargova, M. Application of peracetic acid and quarternary ammonium disinfectants as a part of sanitary treatment in a poultry house and poultry processing plant. *Zoonoses Public Health*, v.54, p. 125-130, 2007.

Khadre, M.A.; Yousef, A.E.; Kim, J-G. Microbiological aspects of ozone applications in food: a review. *Journal of Food Science*, v. 66, n. 9, p. 1242-1252, 2001.

- Kim, J.W. e Slavik, M.F. Use of blue lake as an indicator of bacterial penetration into eggs. *J. Rapid Methods Automat. Microbiol.*, v.4, p. 183-190, 1996.
- Kim, J.H. e Kim, K.S. Hatchery hygiene evaluation by microbiological examination of hatchery samples. *Poult. Sci.*, v. 89, p.1389–1398, 2010.
- Kirchhoff, V.W.J.H.; Echer, E.; Leme, N.P.; Silva, A.A. A variação sazonal da radiação ultravioleta solar biologicamente ativa. *Rev. Bras. Geof.*, v. 18, n. 1, 2000.
- Kitis, M. Disinfection of wastewater with peracetic acid: a review. *Environment Int.*, v. 30, p.47– 55, 2004.
- Labas, M. D.; Zalazar, C. S.; Brandi, R. J. et al. Reaction kinetics of bacteria disinfection employing hydrogen peroxide. *Bioch. Eng. J.*, v. 38, p. 78–87, 2008.
- Lavelin, I, Meiri N. e Pines, M. New insight in eggshell formation. *Poult. Sci.*, v. 79, p. 1014–1017, 2000.
- Ledoux, L., The importance of hygiene and disinfection. *Int. Hatchery Practice*, v. 19: p.11-15, 2004.
- Lifshitz A, Baker, R.C. e Naylor, H.B. The relative importance of chicken e exteriorstructures in resisting bacterial penetration. *J.Food Sci.* v. 29, p.94-99, 1964.
- Lorenz, F.W., Starr, P.B. Spoilage of washed eggs 1. Effect of sprayed versus static water under different washing temperatures. *Poult. Sci.*, v. 31, p. 204-214, 1952a.
- Lorenz, F.W., Starr, P.B. Spoilage of washed eggs 2. Laboratory versus ranch washing. *Poult. Sci.*, v. 31, p. 215-220, 1952b.
- Mahapatra, A. K.; Muthukumarappan, K.; Julson, J. L. Applications of ozone, bacteriocins and irradiation in food processing: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v.45, n.6, p. 447-461, 2005.

Marin, C.; Hernandiz, A.; Lainez, M. Biofilm development capacity of *Salmonella* strains isolated in poultry risk factors and their resistance against disinfectants. *Poult. Sci.*, v. 88, p. 424–431, 2009.

Maris, P. Modes of action of disinfectants. *Rev. Sci. Tech. Off. int. Epiz.*, v.14, n.1, p. 47-55, 1995.

Marquis, R.E.; Rutherford, G.C.; Faraci, M.M.; Shin, S.Y. Sporicidal action of peracetic acid and protective effects of transition metal ions. *J. Ind. Microbiol.*, v. 15, p. 486-492, 1995.

Mattos, I. L.; Shiraishi, K. A.; Braz, A. D. et al. Peróxido de hidrogênio: importância e determinação. *Quím. Nova*, v.26, n.3, p. 373-380, 2003.

Mauldin, J.M. Reducing contamination of hatching eggs. Technical article, In: *Poult. Industry*. 2008. Disponível em: <https://en.engormix.com/MA-poultry-industry/articles/reducing-contamination-hatching-eggs-t1014/p0.htm>

Messens, W., Grijspeerdt, K. e Herman. L. Eggshell characteristics and penetration by *Salmonella enterica* serovar Enteritidis through the production period of a layer flock. *Brit. Poult. Sci.*, 46, 694–700, 2005.

Moustafa-Gehan, Z. A new approach to evaluate the hygienic condition of commercial hatcheries. *Int. J. Poult. Sci.*, v. 8, n. 11, p. 1047-1051, 2009.

Nakano, T., Ikawa, N.I., Ozimek, L. Chemical composition of chicken eggshell and shell membranes. *Poult, Sci.*, v. 82, p. 510–514, 2003.

Neely, W. B. Action of formaldehyde on microorganisms- I. Correlation of activity with formaldehyde metabolism. *J. Bacteriol.*, v. 85, p.. 1028-1031, 1963.

Nys, Y., Gautron, J., Garcia-Ruiz, J.M. et al. Avian eggshell mineralization: biochemical and functional characterization of matrix proteins. *C. R. Palevol.* , v. 3, p. 549–562, 2004.

Nys, Y. e Gautron, J. Structure and Formation of the Egg shell. In: *Bioactive Egg Compounds*. Reiner Huopalahti, Rosina López-Fandino, Marc Anton, Rüdiger Schade. Springer – Verlag Berlin Heidelberg, p. 99–102, 2007.

OIE. In: *Terrestrial Animal Health Code*, Chapter 6.4. - Hygiene and disease security procedures in poultry breeding flocks and hatcheries, OIE. 2010.

Okuno, E., Vilela M.A.C. Radiação Ultravioleta: características e efeitos. São Paulo: Editora Livraria da Física-Sociedade Brasileira de Física, 2005.

Oliveira, N. C. P. Desinfecção e anti-sepsia na indústria farmacêutica: uma abordagem prática. Artigo técnico. Disponível em:  
[http://www.sbcc.com.br/revistas\\_pdfs/ed%2018/18ArtigoTecnicoDesinfetantes.pdf](http://www.sbcc.com.br/revistas_pdfs/ed%2018/18ArtigoTecnicoDesinfetantes.pdf)

Padron, M. Eggs dipping in Hydrogen Peroxide to eliminate *Salmonella* Typhimurium from eggshell membranes. *Avian Dis.* 39:627–630, 1995.

Patterson, PH. H., Ricke, S.C., Sunde, M.L. e Schaefer, D.M. Hatching eggs sanitized with chlorine dioxide foam: egg hatchability and bactericidal properties. *Avi. Diseases*, v.34, p. 1-6, 1990.

Pino, J. A., 1950. Effect of washing with a hot detergent solution on keeping quality and hatchability of eggs. *Poult. Sci.*, v. 29, p. 888-894, 1950.

Pinto, A.T., Mendonça, A.D. e Silva, E.N. Isolated or associated experimental contamination of albumen and egg yolk for *Salmonella* Enteritidis and *Escherichia coli* – influence of temperature and storage time. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.61, n.1, p.128-134, 2009.

Poppendieck, D.; Hubbard, H.; Warda, M. et al. Ozone reactions with indoor materials during building disinfection. *Atmospheric Environment*, v. 41, p. 3166–3176, 2007.

Proudfoot, F. G., e H. W. Hulan, Care of hatching eggs before incubation. In: Agriculture Canada Publication 1573/E, Research Station, Kentville, NS, Canada. p. 1–17. 1976.

- Quarles, C. L.; Gentry, R. F. e Bressler, G. O. Bacterial contamination in poultry houses and its relationship to egg hatchability. *Poult. Sci.*, v. 49, p. 60-66, 1970.
- Roca, A., Rodriguez-Herva, J.J., Duque, E. e Ramos, J.L. Physiological responses of *Pseudomonas putida* to formaldehyde during detoxification. *Mol Biotechnol.*, vol 1, p. 159-169, 2008.
- Reed, N.G. The history of ultraviolet germicidal irradiation for air disinfection. *Public Health Reports*, v.125, p. 15-27, 2010.
- Rodriguez-Romo, L.A. Control of salmonella enterica serovar Enteritidis in shell eggs by ozone, ultraviolet radiation, and heat. 185p. Dissertation (Doctor of Philosophy). The Ohio State University. 2004.
- Rodriguez-Romo, L.A. e Yousef, A.E. Inactivation of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis on shell eggs by ozone and UV radiation. *J Food Prot.*, v.68, p. 711–717, 2005.
- Rodgers, J.D.; McCullagh, J.J.; McNamee, P.T. et al. An investigation into the efficacy of hatchery disinfectants against strains of *Staphylococcus aureus* associated with the poultry industry. *Vet. Microbiol.*, v. 82, p.131-140, 2001.
- Samberg, Y. e Meroz, M. Application of disinfectants in poultry hatcheries *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, v.14, n. 2, p. 365-380, 1995.
- Samiullah, Chousalkar, K.K., Roberts, J.R., Sexton, M., May, D., Kiermeier, A. Effects of egg shell quality and washing on *Salmonella* Infantis penetration. *Int. J. Food Microbiol.*, v. 165 , p. 77–83, 2013.
- Sander, J. E. e Wilson, J. L. Effect of hydrogen peroxide disinfection during incubation of chicken eggs on microbial levels and productivity. *Avian Dis.*, v. 43, p. 227–233, 1999.
- Sauter, E.A. e Petersen, C.F. The Effect of Egg Shell Quality on Penetration by *Pseudomonas fluorescens*. *Poult. Sci.*, v.48, p. 1525-1528, 1969.

Sauter, E.A. e Petersen, C.F. The effect of egg shell quality on penetration by various salmonellae. *Poult. Sci.*, v.53, p.2159-2162, 1974.

Schurman, J. J. Antibacterial activity of hydrogen peroxide against *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* spp. in fruit juices, both alone and in combination with organic acids. 62p. Thesis (Master of Science in Food Science and Technology). Faculty of the Virginia Polytechnic Institute and State University. Blacksburg, Virginia, 2001.

Scott, T.A. e Swetnam, C. Screening sanitizing agents and methods of application for hatching eggs, 1. Environmental and user friendliness. *J. Appl. Poult. Res.* v. 2, p. 1–6, 1993a.

Scott, T.A. e Swetnam, C. Screening sanitizing agents and methods of application for hatching eggs, 2. Effectiveness against microorganisms on the egg shell. *J. Appl. Poult. Res.* v. 2, p. 7–11, 1993b.

Scott, T.A., Swetnam, C. e Kinsman, R. Screening sanitizing agents and methods of application for hatching eggs, 3. Effect of concentration and exposure time on embryo viability, *J. Appl. Poult. Res.* v. 2, p. 12-18, 1993.

Scott, T.A. The effect of UV light and air filtering system on embryo viability and microorganism load on the egg shell. *J. Appl. Poult. Res.* v. 2, p.19-23, 1993.

Shama, G. Process challenges in applying low doses of ultraviolet light to fresh produce for eliciting beneficial hormetic responses. *Postharvest biology and technology*, v. 44, n.1, p. 1-8, 2007.

Sharma, M. e Hudson, J.B. Ozone gas is an effective and practical antibacterial agent. *Am. J. Infect. Control*, v. 36, n. 8, p. 559– 563, 2008.

Sheldon, B.W. e Brake. J. Hydrogen peroxide as an alternative hatching egg disinfectant. *Poult. Sci.*, v. 70, p. 1092-1098, 1991.

Speake, B.K., Murray, A.M.B., Noble, R.C. Transport and transformations of yolk lipids during development of the avian embryo. *Prog. Lipid Res.*, v. 37, n.1, p. 1-32, 1998.

Simkiss, K. e Taylor, T.G. Shell formation. In *Physiology and Biochemistry of the Domestic Fowl*, vol III, ed. D. J. Bell, B.M. Freeman, p. 1331- 1341. New York. Academic Press, 1971.

Solomon, S.E. Egg and Eggshell Quality. Wolfe Publishing. Aylesbury, England, 1991.

Solomon, S.E. The oviduct in chaos. *World's Poul. Sci. J.*, v. 58, p. 41-48, 2002.

Solomon, S.E. The eggshell: strength, structure and function, *Brit Poul. Sci.*, v. 51, n.1, p. 52-59, 2010.

Spickler, J.L., Buhr, R.J., Cox, N.A. et al. Comparison between rinse and crush-and-rub sampling for aerobic bacteria recovery from broiler hatching eggs after sanitization. *Poult. Sci.*, v. 90, p.1609–1615, 2011.

Stampi, S.; De Luca, G.; Zanetti, F. Evaluation of the efficiency of peracetic acid in the disinfection of sewage effluents. *J. Applied Microbiol.*, v. 91, p. 833-838, 2001.

Steiner, N. Evaluation of peracetic acid as an environmentally safe alternative for hypochlorite. *Text. Chem. Colorist*, v. 27, n. 8, p. 29-32, 1995.

Stephens C. B., Cox, N. A., Richardson L. J., et al. Eggshell surface and deep bacteria recovered from non-sanitized broiler hatching eggs. *Poult. Sci.*, v. 88 (Suppl. 1):143. (Abstr.), 2009.

Stuart, L.S. e McNally, E.H. Bacteriological studies on the eggshell. *U. S. Egg Poult. Mag.*, v. 49, p.28-31, 1943.

Timoney, J. F., Shivaprasad, H. L., Baker, R. C. et al. Egg transmission after infection of hens with *Salmonella* Enteritidis phage type 4. *Vet. Rec. (Veterinary Record)*, v. 125, p. 600–601, 1989.

Toledo, R. T.; Escher, F. E.; Ayres, J. C. Sporicidal properties of hydrogen peroxide against food spoilage organisms. *Applied Microbiology*, v. 26, n. 4, p. 592-597, 1973.

Turblin, V. Disinfection of hatching eggs importance and practical aspects. *Ceva Animal. N.* 21, 2008. Disponível em:

[http://www.thepoultrysite.com/focus/contents/ceva/OnlineBulletins/ob\\_2008/Article-No21-Nov08.pdf](http://www.thepoultrysite.com/focus/contents/ceva/OnlineBulletins/ob_2008/Article-No21-Nov08.pdf)

Turblin, V. Good quality chicks from disinfected eggs. *World Poult.*, v. 27, p.1-3, 2011.

Wall, H., R. Tauson, and S. Sorgjerd. Bacterial contamination of eggshells in furnished and conventional cages. *J. Appl. Poult. Res.*, v. 17, p. 11–16, 2008.

Wells, J. B.; Coufal, C. D.; Parker, H. M.; McDaniel, C. D. Disinfection of eggshells using ultraviolet light and hydrogen peroxide independently and in combination. *Poult. Sci.*, v. 89, p. 2499–2505, 2010.

Wells, J. B.; Coufal, C. D.; Parker, H.M. et al. Hatchability of Broiler Breeder Eggs Following Eggshell Sanitization by Repeated Treatment with a Combination of Ultraviolet Light and Hydrogen Peroxide. *Int. J. Poult. Sci.*, v. 10, n. 6, p. 421-425, 2011.

Whistler, P.E. e Sheldon, B.W. Bactericidal activity, eggshell conductance and hatchability effects of ozone versus formaldehyde disinfection. *Poult. Sci.*, v. 68, p. 1074-1077, 1989a.

Whistler, P.E. e Sheldon, B.W. Biocidal activity of ozone versus formaldehyde against poultry pathogens inoculated in a prototype setter. *Poult. Sci.*, v 68, p. 1068-1073, 1989b.

Whistler, P.E. e Sheldon, B.W. Comparison of ozone and formaldehyde as poultry hatchery disinfectants. *Poult. Sci.*, v. 68, p. 1345-1350, 1989c.

Williams, J.E. e AD. Whittemore. A method for studying microbial penetration through the outer structures of the avian egg. *Avian Dis.*, v. 11, n. 3, p. 467-490, 1967.

Wong, J.W., Frank, J.F. e Bailey, S. Visualization of eggshell membranes and their interaction with-ententldls using confocal scanning laser microscopy. *J. Food Prot.*, v. 60, p. 1022-1028, 1997.

Yousef, A.E.; Vurma, M.; Rodriguez-Romo, L. Chapter 21. Basics of Ozone Sanitization and Food Applications. In: Nonthermal processing Technologies for food. 2011. Blackwell Publishing Ltd. And Institute of Food Technologists. 1a edition. 2011.

Zeweil, H.S., Rizk, R.E., Bekhet, G.M et al. Comparing the effectiveness of egg disinfectants against bacteria and mitotic indices of developing chick embryos. *The J. of Basic & Appl.Zoo.*, v. 70, p. 1–15, 2015.

Zhao, R., Xu, G.-Y., Liu, Z.-Z. et al. A study on eggshell pigmentation: biliverdin in blue-shelled chickens. *Poult. Sci.*, v. 85, p.546–549, 2006.

## **CAPÍTULO II – Desinfetantes alternativos ao uso de formaldeído para desinfecção de ovos férteis**

### **1. RESUMO**

Objetivou-se avaliar o efeito de diferentes procedimentos de desinfecção alternativos à fumigação com formaldeído sobre a redução da contagem microbiana da casca, qualidade de casca, rendimento de incubação, qualidade de pintos neonatos e contaminação microbiana do saco vitelínico de pintos de um dia. Um total de 10.080 ovos de galinhas de 42 semanas de idade, coletados dos ninhos, foi distribuído de maneira aleatória, em delineamento em bloco ao acaso, entre os seguintes tratamentos: fumigação com paraformaldeído (13,33g/m<sup>3</sup>/20 min), fumigação com ozônio (5-10ppm/20 min), irradiação de luz UV-C (6,36 mW/cm<sup>2</sup>; 60 s), pulverização com peróxido de hidrogênio (1,56%; 0,69 mL/ovo), pulverização com ácido peracético (0,13%; 0,69 mL/ovo), pulverização com água (0,69 mL/ovo; controle úmido) e sem desinfecção (controle seco). Oito amostras com quatro ovos cada foram coletadas, por tratamento, para enumeração de Enterobacteriaceae e bactérias mesófilas aeróbicas totais presentes na casca dos ovos antes e após o momento de desinfecção. Um total de 24 ovos por tratamento foi coletado para avaliações da espessura e resistência da casca. Ao todo, 1.152 ovos de cada tratamento foram incubados, em 12 bandejas de 96 ovos cada, para avaliação dos percentuais de perda de peso dos ovos durante a incubação, eclodibilidade, eclodibilidade de ovos férteis, mortalidade embrionária (inicial, intermediária e final), peso dos pintos e percentual de pintos vendáveis ao nascimento. A contagem dos mesmos microrganismos avaliados na casca foi realizada no saco vitelínico de 13 pintos de um dia de idade de cada tratamento. Somente os ovos dos grupos desinfetados com formaldeído e UV apresentaram significativa redução das contagens de bactérias mesófilas aeróbicas totais quando comparados ao grupo controle seco e a esses mesmos grupos antes da desinfecção ( $P \leq 0,05$ ), contudo essa redução foi maior ( $P > 0,05$ ) nos ovos fumigados com formaldeído que nos irradiados com luz UV. Foi observada maior perda de peso ( $P \leq 0,05$ ) em todos os ovos pulverizados, independentemente da substância utilizada, quando comparados com os ovos do grupo controle. As demais variáveis avaliadas nesse experimento não foram afetadas pelos tratamentos ( $P > 0,05$ ). Por reduzir a contagem microbiana na casca dos ovos, não prejudicar a

eclodibilidade, o percentual de pintos vendáveis e os aspectos microbiológicos dos pintos de um dia, a luz UV pode ser considerada um potencial desinfetante substituto ao formaldeído para desinfecção de ovos incubáveis.

Palavras-chave: contagem de bactérias, casca dos ovos, ozônio, luz UV, peróxido de hidrogênio, ácido peracético

## 2. INTRODUÇÃO

A desinfecção de ovos férteis tem fundamental importância para prevenir a disseminação bacteriana de lotes de matrizes para seus descendentes (Spickler et al., 2011). Mesmo ovos coletados nos ninhos e considerados limpos possuem determinada quantidade de microrganismos que, submetidos a condições favoráveis ao seu crescimento, podem comprometer a eclodibilidade e saúde do pinto neonato. Nesses tipos de ovos, a contagem de bactérias mesófilas aeróbicas totais pode alcançar valores que variam de 3,75 a 7,07 log<sub>10</sub> UFC/ovo (Kuo et al., 1996; Berrang et al., 1997; Coufal et al., 2003; Zeweil et al., 2015). Diante desse cenário, a redução da carga microbiana da casca de ovos visa, então, diminuir a incidência de infecções bacterianas nos embriões e pintos neonatos (Fasenko et al., 2009).

Durante muitos anos, a desinfecção de ovos incubáveis foi considerada um problema para a indústria avícola, devido à ausência de uma alternativa econômica, efetiva e segura para substituir a fumigação com formaldeído (Coufal et al., 2003). Pode se dizer que mais de dez anos passados após tal afirmação, o problema ainda persiste. Os efeitos adversos associados ao uso de formaldeído à saúde dos trabalhadores das granjas e incubatórios direcionaram grande parte das pesquisas para a busca de métodos alternativos de desinfecção (Berrang et al., 2000). Além disso, em revisão sistemática sobre a fumigação dos ovos com formaldeído, realizada por Cadirci (2009), efeitos adversos do uso dessa substância ao embrião também foram relatados. Por ter capacidade de difusão para dentro dos ovos através dos poros, esse gás pode alquilar componentes celulares, como as bases purinas e pirimidinas presentes no DNA e RNA do embrião, e levar à morte embrionária, principalmente na fase inicial de desenvolvimento (Cadirci, 2009).

O uso de procedimentos alternativos de desinfecção da casca de ovos, como a pulverização com desinfetantes a base de peróxidos (Bailey et al., 1996; Sander e Wilson, 1999; Cox et al., 2007; Wells et al., 2011), fumigação com gás ozônio (Whistler e Sheldon, 1989; Bailey et al., 1996; Rodriguez-Romo e Yousef, 2005; Braun et al., 2011) e o uso de

irradiação de luz UV-C (Chavez et al., 2002; Coufal et al., 2003; Wells et al., 2011) tem demonstrado efetividade em reduzir a contagem bacteriana presente na casca. Por serem procedimentos de desinfecção não liberadores de resíduos tóxicos após o uso (Sheldon e Brake, 1991; Braun et al., 2011), esses métodos também podem ser caracterizados como ecologicamente corretos ao meio ambiente.

Mesmo com resultados positivos para seu uso como agente microbicida na casca dos ovos, é necessário um conhecimento mais aprofundado dos efeitos desses procedimentos sobre o rendimento de incubação, qualidade e status microbiológico de pintos neonatos. Nesse contexto, objetivou-se avaliar o efeito da desinfecção de ovos com formaldeído e outros procedimentos alternativos (gás ozônio, radiação de luz UV, pulverização com peróxido de hidrogênio e ácido peracético) sobre a redução da contagem microbiana da casca, qualidade de casca, rendimento de incubação, qualidade de pintos neonatos e contaminação microbiana do saco vitelínico de pintos de um dia.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1. Coleta de Ovos**

Os ovos foram obtidos de um lote de matrizes pesadas da linhagem Cobb<sup>®</sup> de 42 semanas de idade provenientes de um matrizeiro comercial. Ovos de terceira e quarta coletas foram utilizados para a realização dos diferentes procedimentos de desinfecção, avaliação da contagem microbiana da casca, qualidade de casca e rendimento de incubação. Todos os ovos foram coletados dos ninhos com luvas de procedimento para evitar contaminação entre ovo e coletador e acondicionados em pentes de plástico previamente desinfetados. Ovos de cama ou muito sujos não foram utilizados. Um total de 10.080 ovos foram selecionados e distribuídos entre os tratamentos de desinfecção de maneira aleatória, totalizando 1440 ovos para cada tratamento. Todos os tratamentos receberam a mesma quantidade de ovos de cada coleta, a fim de garantir a homogeneidade das amostras. Os tratamentos foram constituídos de cinco diferentes procedimentos de desinfecção (fumigação com ozônio, fumigação com paraformaldeído, irradiação com luz ultravioleta tipo C, pulverização com peróxido de hidrogênio e pulverização com ácido peracético) e dois tratamentos controle (pulverização dos ovos com água e sem desinfecção), totalizando sete tratamentos. Imediatamente após a separação dos ovos, uma amostra de 16 ovos foi coletada de cada tratamento para avaliação microbiológica da casca. Em seguida, os ovos foram submetidos aos sete tratamentos propostos.

## 3.2. Procedimentos de desinfecção

### 3.2.1. Ozônio

Os ovos foram desinfetados com gás ozônio na concentração de 5-10 ppm por 20 minutos, de acordo com as recomendações do fornecedor do gerador (Alvap Engenharia LTDA, Lajeado, Rio Grande do Sul, Brasil). O gás foi gerado por meio da passagem de oxigênio comprimido por um gerador de ozônio (ALVAP<sup>®</sup>, Lajeado, Rio Grande do Sul, Brasil) e para sua mensuração dentro da câmara foi utilizado um mensurador de ozônio (OZONE ANALYZER UV-100, Santa Fe, Novo México, Estados Unidos). Imediatamente após a separação dos pentes de ovos coletados entre os tratamentos, os ovos desse grupo foram alocados dentro de caixa de ovos de plástico e colocados dentro da câmara de fumigação, de 3 m<sup>3</sup>, localizada no próprio núcleo, para a desinfecção. A umidade relativa do ar foi ajustada para manter-se a 70% dentro da câmara e mensurada por meio de uma sonda acoplada a um termohigrômetro. Os dados de concentração de ozônio dentro da câmara registrados durante as desinfecções estão apresentados na Figura 1. Após a fumigação, foi realizada a exaustão do produto dentro da câmara por um tempo total de 12 minutos.

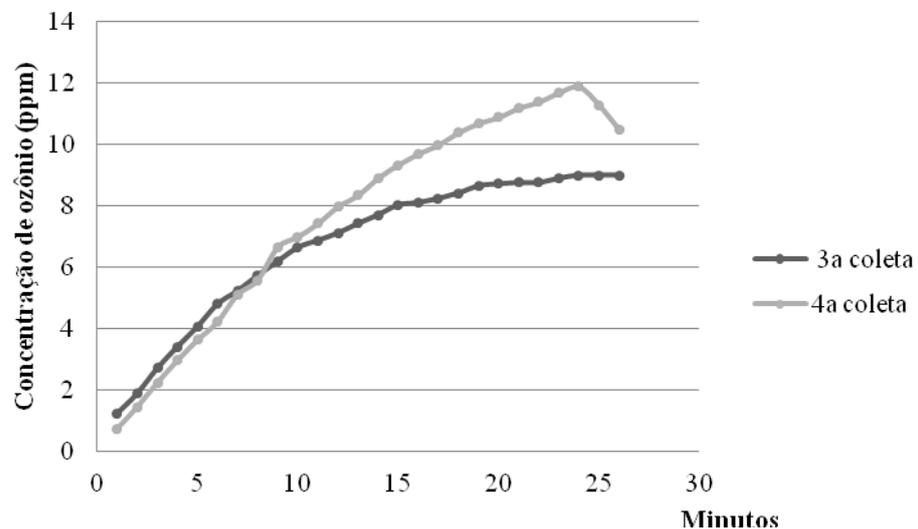


Figura 1. Concentração de ozônio em ppm dentro da câmara de fumigação durante período de desinfecção dos ovos

### 3.2.2. Paraformaldeído

A concentração de 13,33g/m<sup>3</sup> de paraformaldeído foi utilizada para a desinfecção. Os tempos de queima do produto, fumigação e exaustão totalizaram 20,

10 e 10 minutos, respectivamente. Da mesma maneira que no grupo desinfetado com ozônio, os pentes de ovos desse grupo foram alocados em caixas plásticas específicas e colocados dentro da câmara de fumigação, localizada no próprio núcleo. A mesma câmara utilizada para desinfecção dos ovos com ozônio foi utilizada para a fumigação com paraformaldeído. Por isso, após cada coleta, os ovos desse tratamento foram desinfetados com atraso de uma hora em relação aos outros tratamentos, tempo que envolve o tempo de fumigação mais uma espera para total retirada dos resíduos do produto utilizado anteriormente. A umidade relativa do ar dentro da câmara foi ajustada para manter-se a 70% e mensurada da mesma maneira que na desinfecção com ozônio.

### **3.2.3. Radiação UV**

Por meio do uso de luvas de procedimento, os ovos foram colocados um a um em uma bandeja específica e, em seguida, introduzidos em uma câmara fechada, onde 16 lâmpadas UV-C instaladas (30W; 90cm; 254nm; HALOTECH) proporcionaram intensidade média de  $6,36 \text{ mW/cm}^2$ . O tempo de desinfecção para cada bandeja de ovos foi de 60 segundos. A intensidade de UV foi mensurada por meio de medidor de potência (THORLABS PM100D, Dachau, Alemanha) e sonda (S401C- THORLABS, Dachau, Alemanha). Com dimensão de 1,20x0,45x0,55m, a câmara, adaptada de Gottselig et al. (2016), foi desenvolvida com material MDF e capaz de comportar uma bandeja de 95 ovos por vez (Figura 2). A bandeja, feita com material de alumínio, foi desenhada de modo a evitar que os ovos encostassem uns nos outros e, assim, permitir maior exposição de todas as partes do ovo à luz UV-C. A temperatura dentro da câmara foi mensurada por meio de uma sonda acoplada a um termômetro digital e variou de 29,3 a 33,6°C durante todo o período de desinfecção. O período total gasto para desinfetar todos os ovos foi de no máximo 35 minutos após cada coleta.

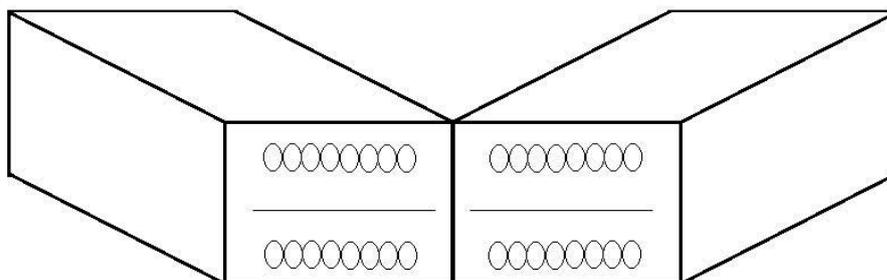


Figura 2. Visão de corte de protótipo de câmara de desinfecção de ovos por meio de lâmpadas germicidas (UV-C).

#### **3.2.4. Peróxido de Hidrogênio**

Uma solução de 1,56% de peróxido de hidrogênio (OXIVIR FIVE 16 CONCENTRATE<sup>®</sup>, São Paulo, Brasil) foi utilizada para desinfecção dos ovos. Após cada coleta e separação dos ovos por tratamento, a pulverização foi realizada por meio do uso de pulverizador manual, em que 500 mL da solução do desinfetante foram pulverizados em 720 ovos por vez. Mensurada por meio do uso de termômetro (INCOTERM<sup>®</sup> 5004, São Paulo, Brasil), a temperatura da solução registrada variou de 25 a 28°C. Para que toda a superfície dos ovos fosse atingida pela solução, os pentes de ovos foram colocados em uma superfície plana e a pulverização ocorreu em duas etapas: 250 mL foram administrados em um lado dos ovos e, após a viragem desses, por meio do uso de novos pentes previamente desinfetados, mais uma pulverização de 250 mL foi administrada na outra superfície. No total, foi pulverizado, em média, 0,69 mL de peróxido de hidrogênio em cada ovo e o tempo gasto nesse procedimento variou de 8 a 10 minutos após cada coleta.

#### **3.2.5. Ácido peracético**

Uma solução de 0,13% de ácido peracético (DIVOSAN FORTE<sup>®</sup>, São Paulo, Brasil) foi utilizada para a pulverização dos ovos. O modo de pulverização e a quantidade do produto pulverizado foram similares às pulverizações com peróxido de hidrogênio. Mensurada da mesma maneira que no grupo anterior, a temperatura da solução registrada variou de 23 a 26°C. O tempo total gasto para pulverização dos ovos desse grupo variou de 7 a 12 minutos após cada coleta.

### **3.2.6. Sem desinfecção (controle úmido)**

Ao final de cada coleta, os ovos foram submetidos à pulverização contendo somente água para levar em conta os efeitos da molhagem dos ovos sobre as variáveis analisadas. O modo de pulverização e a quantidade de água pulverizada foram similares às pulverizações com os outros produtos. A temperatura da água registrada foi de 27°C em todas as desinfecções e foi mensurada da mesma forma que nos demais grupos de pulverização. O tempo total gasto para pulverização dos ovos desse grupo variou de 10 a 13 minutos após cada coleta.

### **3.2.7. Sem desinfecção (controle seco)**

Os pentes com os ovos desse tratamento foram mantidos na mesma sala na qual os outros tratamentos foram realizados, porém os ovos não foram submetidos a nenhum procedimento de desinfecção ou pulverizados com água após as coletas. A temperatura e umidade ambiental foram registradas e variaram entre 27,9 a 31,3°C e 48 a 54%, respectivamente.

## **3.3. Incubação**

Após a realização dos processos de desinfecção, os ovos foram transportados a um incubatório comercial. Com um dia de armazenamento foi realizada a seleção dos ovos, eliminando aqueles considerados não incubáveis (sujos, trincados, quebrados, pequenos, com duas gemas e deformados). Em seguida, mantendo-se as identificações dos tratamentos, os ovos foram colocados em bandejas próprias para incubação, com capacidade para 96 ovos cada. Foram utilizadas 12 bandejas de incubação, totalizando 1.152 ovos para cada tratamento. Nessas condições, os ovos permaneceram por mais um dia na sala de armazenamento.

Antes da entrada dos ovos na incubadora, todas as bandejas com ovos foram pesadas individualmente. Em seguida, as bandejas foram dispostas ao acaso na máquina de incubação de estágio múltiplo (CASP CMG 125E, Amparo, São Paulo, Brasil) que foi regulada para manter-se com a temperatura do bulbo seco em 37,4°C (99,3°F) e a temperatura de bulbo úmido em 28,9°C (84°F), correspondendo a 62% de umidade relativa (UR). A viragem dos ovos foi programada para acontecer a cada hora. No 11º dia de incubação foi realizada a ovoscopia para identificar os ovos inférteis e com embriões mortos. Esses dados foram registrados para serem incluídos na análise final de mortalidade embrionária e fertilidade.

No 19º dia de incubação os ovos foram transferidos para um nascedouro (CASP 21E, Amparo, São Paulo, Brasil) e, nessa ocasião, todas as bandejas foram novamente pesadas

individualmente, para posterior cálculo de perda de peso dos ovos. Após a pesagem, os ovos foram transferidos para as bandejas de eclosão, devidamente identificadas de acordo com os tratamentos e essas distribuídas aleatoriamente dentro do nascedouro. A máquina foi regulada para manter-se a temperatura de bulbo seco em 36,6°C (98°F) e a temperatura de bulbo úmido em 28,9°C (84°F), correspondendo a 65% de UR.

### **3.4. Nascimento dos pintos e rendimento de incubação**

A retirada dos pintos do nascedouro ocorreu com 504 horas (21 dias) de incubação. Foi realizada a contagem e pesagem dos pintos nascidos. A qualidade dos pintos nascidos foi visualmente registrada e, assim, determinada a porcentagem de pintos vendáveis de acordo com os padrões comerciais exigidos pelo incubatório (pintos com umbigo aberto, problemas de pernas ou outras anormalidades não foram contabilizados). O número de ovos não eclodidos de cada bandeja foi registrado e cada ovo examinado para determinação do percentual de ovos inférteis, ovos bicados (pintos totalmente desenvolvidos e que não conseguirão eclodir) vivos e mortos e a fase em que ocorreu a mortalidade embrionária (0-7, 8-14 e 15-21 dias de incubação), incluindo a observação sobre ovos contaminados, desidratados e anormalidades morfológicas. A eclodibilidade foi calculada com base no percentual de pintos nascidos sobre o total de ovos incubados e sobre o total de ovos férteis.

### **3.5. Avaliação microbiológica**

#### **3.5.1. Casca dos ovos**

Um método adaptado de Fassenko et al. (2009) para avaliação de bactérias mesófilas aeróbicas totais e Enterobacteriaceae foi realizado para contagem microbiana das casca dos ovos. Após cada coleta, imediatamente antes e uma hora depois da desinfecção, foram selecionados 16 ovos de cada tratamento para a realização das avaliações de contagem microbiana da casca. Os ovos, coletados com luvas de procedimento, foram colocados em sacos autoclavados em agrupamentos de quatro ovos por saco, os quais foram devidamente identificados de acordo com cada tratamento e, então, refrigerados a 4°C. As amostras foram transportadas ao laboratório, onde 24 horas após sua refrigeração foram realizadas as análises microbiológicas. Cada saco contendo um *pool* de quatro ovos foi aberto e os ovos foram repassados para outro saco autoclavado, onde 250 mL de solução tampão fosfato-salina (PBS) foram adicionados. Nesse novo ambiente, os ovos foram massageados por cinco minutos a fim de remover as células bacterianas de suas superfícies. Em seguida, uma amostra de 1,0 mL de PBS foi retirada de cada saco e uma série de três diluições decimais em PBS foram

realizadas para cada amostra. O plaqueamento de 1,0 mL de PBS de cada diluição foi realizado sobre ágar PCA (OXOID LTD., Basingstoke, Hampshire, Inglaterra) e MacConkey (BD DIFCO™, Sparks, Maryland, Estados Unidos) para a obtenção da contagem de microrganismos mesófilos aeróbicos e enterobactérias, respectivamente. As placas foram incubadas a 37°C, de 24 a 48 horas, sob condições de aerobiose, e as colônias bacterianas contadas e registradas. Contagens microbianas foram expressas em  $\log_{10}$  UFC/1 mL de *pool* de ovos.

### **3.5.2. Saco vitelínico**

A avaliação microbiológica do saco vitelínico foi adaptada de Sander e Wilson (1999). Os pintos considerados vendáveis foram selecionados para posterior análise microbiológica do saco vitelínico. Após a pesagem, foi realizada a coleta, ao acaso, de 13 pintos por tratamento e esses encaminhados, separadamente, ao laboratório para análise microbiológica. Após 24 horas do nascimento, os pintos foram eutanasiados por deslocamento cervical para a coleta do órgão. A coleta do saco vitelínico de cada pintinho foi realizada de maneira asséptica de forma a evitar sua contaminação com o ambiente. Foi amostrado 1,0 g de saco vitelínico mais fluido de cada amostra para a realização de cinco diluições decimais em PBS. O plaqueamento de 100  $\mu$ L de cada diluição foi realizado para avaliação da contagem de bactérias mesófilas aeróbicas e enterobactérias, em ágar PCA (OXOID LTD., Basingstoke, Hampshire, Inglaterra) e MacConkey (BD DIFCO™, Sparks, Maryland, Estados Unidos), respectivamente. As placas foram incubadas sob aerobiose a 37°C, de 24 a 48 horas, e colônias bacterianas contadas e registradas. Contagens microbianas foram expressas em  $\log_{10}$  UFC/1 mL de saco vitelínico.

## **3.6. Qualidade da casca**

### **3.6.1. Resistência da casca**

Foram amostrados 24 ovos de cada tratamento para avaliações de resistência da casca. A força necessária para quebrar essa estrutura, em gramas, foi determinada por meio do aparelho TA.XT2 Texture Analyser (Stable Micro Systems, Surrey, England). Foi utilizada uma sonda (P4 DIA Cylinder) de aço inoxidável de 4 mm de diâmetro, com distância de 6 mm e velocidade pré, durante e pós teste de 3,0; 0,5; e 5,0; mm/s respectivamente. A força de gatilho da sonda foi de 3,0g. O teste seguiu o método de fratura por compressão de acordo

com Stefanello et al. (2014), no qual o ovo inteiro é colocado longitudinalmente dentro de um cadinho de porcelana. A casca foi pressionada até que ocorresse a fratura e a força necessária usada foi indicadora da resistência da casca.

### **3.6.2. Espessura da casca**

Após os procedimentos de desinfecção, outros 24 ovos foram coletados de cada tratamento para a medida de espessura da casca por método similar ao utilizado por Stefanello et al. (2014). As cascas foram separadas com o auxílio de uma tesoura em três partes correspondentes às regiões apical (extremidade afilada), equatorial e basal (extremidade alargada que contém a câmara de ar). A medida da espessura da casca foi realizada com um micrômetro digital com resolução de 0,001mm (MITUTOYO SUL AMERICANA LTDA, Suzano, São Paulo, Brasil). Foi medida a espessura de cada uma das três regiões e então, a espessura média da casca do ovo foi calculada.

### **3.7. Delineamento experimental e análises estatísticas**

O delineamento experimental utilizado para as avaliações microbiológicas da casca e rendimento de incubação foi em blocos ao acaso, sendo as coletas consideradas como blocos, e constituído de sete tratamentos. Um total de oito repetições formadas por um *pool* de quatro ovos cada foi utilizada para a avaliação microbiológica da casca, enquanto 12 repetições, constituídas das bandejas de incubação compostas de 96 ovos cada, foram utilizadas para avaliação do rendimento de incubação. Para as avaliações de qualidade de casca, o delineamento foi inteiramente ao acaso, constituído de sete tratamentos de 24 repetições cada, sendo o ovo considerado a repetição. Para a avaliação da contagem microbiana presente no saco vitelínico de pintos de um dia, o delineamento foi similar à avaliação de qualidade de casca, constituído de sete tratamentos, mas com 13 repetições cada, sendo o pinto considerado a repetição. Todos os dados foram submetidos à análise de variância pelo procedimento GLM do SAS. Médias entre tratamentos foram comparadas pelo teste Tukey a 5% de significância. Os dados que não apresentaram distribuição normal (percentual de mortalidade inicial, intermediária e final e pintos vendáveis) foram transformados para raiz da variável e, então, novamente submetidos à ANOVA pelo mesmo procedimento.

## **4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **4.1. Contagem Microbiana da Casca**

Os ovos dos grupos desinfetados com formaldeído e UV apresentaram redução significativa das contagens de bactérias mesófilas aeróbicas totais quando comparados aos demais grupos e a esses mesmos grupos antes da desinfecção ( $P \leq 0,05$ ; Tabela 1). Os ovos desinfetados com formaldeído apresentaram menores contagens de bactérias mesófilas aeróbicas totais que os ovos tratados com UV ( $P \leq 0,05$ ; Tabela 1). Nenhuma diferença significativa entre os grupos foi encontrada para a contagem de bactérias aeróbicas totais e Enterobacteriaceae na casca dos ovos antes da desinfecção ( $P > 0,05$ ; Tabela 1). Após a aplicação dos tratamentos, a contagem de Enterobacteriaceae também não foi afetada pelos tratamentos ( $P > 0,05$ ; Tabela 1).

Tabela 1. Contagens médias de bactérias mesófilas aeróbicas totais e Enterobacteriaceae, em  $\log_{10}$  UFC/mL pool de 4 ovos, antes e após a desinfecção, nos ovos dos tratamentos formaldeído, ozônio ( $O_3$ ), luz ultravioleta (UV), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), ácido peracético (PAA), controle úmido e controle seco, acompanhados dos respectivos desvios-padrão (DP)

Tratamento	Bactérias mesófilas aeróbicas totais			Enterobacteriaceae		
	(log <sub>10</sub> UFC/mL pool de 4 ovos ± DP)					
	Antes do tratamento	Depois do tratamento	CV (%)	Antes do tratamento	Depois do tratamento	CV (%)
Formaldeído	3,42 ±0,29 <sup>Aa</sup>	1,10 ±0,16 <sup>Bc</sup>	10,41	1,27 ±0,64	1,04 ±0,00	39,44
O <sub>3</sub>	3,31 ±0,42 <sup>Aa</sup>	2,95 ±0,41 <sup>Aa</sup>	13,33	1,08 ±0,10	1,37 ±0,69	40,31
UV	3,57 ±0,24 <sup>Aa</sup>	2,20±0,56 <sup>Bb</sup>	14,97	1,11 ±0,13	1,04 ±0,00	8,54
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	3,28±0,39 <sup>Aa</sup>	3,05 ±0,16 <sup>Aa</sup>	9,39	1,24 ±0,38	1,04 ±0,00	23,73
PAA	3,24±0,35 <sup>Aa</sup>	2,91 ±0,67 <sup>Aa</sup>	17,76	1,37 ±0,84	1,39 ±0,72	56,43
Controle úmido	3,17 ±0,22 <sup>Aa</sup>	3,16 ±0,44 <sup>Aa</sup>	15,24	1,13 ±0,26	1,43 ±0,61	36,36
Controle seco	3,36±0,36 <sup>Aa</sup>	3,14 ±0,42 <sup>Aa</sup>	12,06	1,16 ±0,22	1,08 ±0,10	15,12
<sup>1</sup> CV (%)	10,06	16,22		36,95	36,88	

a,b,c Médias seguidas de letras distintas minúsculas dentro das colunas são diferentes pelo teste Tukey ( $P \leq 0,05$ ).

A,B Médias seguidas de letras distintas maiúsculas dentro das linhas são diferentes pelo teste F ( $P \leq 0,05$ ).

<sup>1</sup>CV = Coeficiente de variação.

A inclusão da contagem de bactérias da família Enterobacteriaceae, para monitoração da contaminação dos ovos nas granjas, fornece uma boa visão do grau de higiene dos ovos a serem incubados (Musgrove et al., 2014). A presença de algumas bactérias pertencentes a essa família, como *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis e *Escherichia coli* patogênica, pode ser prejudicial à saúde das aves e à produtividade, além de ameaça à segurança de produtos a base de carne de frango (Berrang et al., 2000; Fassenko et al., 2009). Os resultados encontrados para contagem de Enterobacteriaceae na casca, em todos os grupos, diferem-se dos encontrados por Fassenko et al. (2009), que não observaram a presença dessa família de bactérias na casca de ovos, sejam eles desinfetados ou não. No entanto, os resultados obtidos no presente estudo, assim como observado no trabalho de Musgrove et al. (2014), demonstraram contagens de

Enterobacteriaceae muito baixas em todos os grupos, mesmo antes da desinfecção. Com isso, as médias das contagens, tanto em ovos do grupo controle ou em ovos desinfetados, apresentaram-se abaixo da precisão para contagem de microrganismos por placa (Corry et al., 2007).

Os valores encontrados para a contaminação da casca de ovos por bactérias mesófilas aeróbicas totais, antes de qualquer procedimento de desinfecção, variaram entre 3,17 e 3,57  $\log_{10}$  UFC/mL entre os grupos e estão em consonância com dados observados na literatura para ovos coletados em ninhos (Kuo et al., 1996; Coufal et al., 2003). No entanto, valores entre 4 e 7  $\log_{10}$  UFC/ovo, em ovos considerados limpos, também foram descritos por alguns autores (Berrang et al., 1997; Stephens et al., 2009; Wells et al., 2011; Zeweil et al., 2015). Diante desse fato, sugere-se que os ovos desse experimento foram expostos a reduzido desafio bacteriano após a postura.

Independentemente do desafio microbiano a que os ovos foram submetidos, foi possível observar que as desinfecções com formaldeído e UV, em comparação ao grupo controle, foram eficazes em reduzir a contaminação da casca por bactérias mesófilas aeróbicas totais em 2 e 1  $\log_{10}$  UFC/ml, respectivamente. Chavez et al. (1999) e Coufal et al. (2003) também demonstraram redução significativa da população de microrganismos mesófilos aeróbicos na casca, dentro da faixa citada, em ovos expostos durante 60 segundos à irradiação de luz UV de 7,5  $\text{mW}/\text{cm}^2$  e 4-14  $\text{mW}/\text{cm}^2$ , respectivamente, valores próximos ao utilizado nesse trabalho. Em relação à comparação com o formaldeído, os dados dessa pesquisa indicam que não foi possível atingir o mesmo padrão de redução microbiana da casca por meio do uso de luz UV. Como também foi sugerido por Coufal et al. (2003), esse resultado pode ser explicado pela dificuldade da luz UV atingir toda a superfície do ovo, impossibilitando a exposição das bactérias à irradiação e, então, obter maior redução na contagem microbiana da casca. Outra possível causa desse resultado apoia-se no valor da intensidade de luz utilizada nesse experimento, que teria sido insuficiente para equiparar ou superar os valores de redução dessa contagem aos resultados do formaldeído.

Apesar de menor valor numérico de contagem de bactérias aeróbicas totais observado nos grupos de ovos desinfetados com ozônio, peróxido de hidrogênio e ácido peracético, esses resultados foram estatisticamente similares ao grupo controle. Diferentemente do obtido nesse trabalho, Whistler e Sheldon (1989) observaram redução significativa de 2,5  $\log_{10}$  na contagem desses microrganismos na casca de ovos desinfetado com ozônio (3,03% por peso durante duas horas). Como abordado por Braun et al. (2011), o efeito do ozônio estaria relacionado a uma curva de inativação bacteriana de caráter bifásico, a qual apresenta um

padrão inicial rápido, seguido de lenta redução de microrganismos mais resistentes. Os autores ainda destacaram a importância da concentração do ozônio combinado a elevados tempos de exposição para a ocorrência de uma linear inativação de bactérias na casca de ovos. Diante disso, sugere-se que a ausência de diferença significativa encontrada para a contagem de bactérias mesófilas aeróbicas totais entre os ovos desinfetados com o ozônio e grupo controle, pode ter sido causada pela baixa dose de exposição a que os ovos foram submetidos nesse experimento.

Em relação ao peróxido de hidrogênio, os dados apresentados na Tabela 1 também contrastam com os dados da literatura, nos quais reduções significativas de bactérias mesófilas aeróbicas totais de até 5 log<sub>10</sub> foram observadas em ovos desinfetados com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Sheldon e Brake, 1991; Wells et al. 2011) quando comparados com o grupo controle. Samberg e Meroz (1995) citaram a alta efetividade do ácido peracético contra bactérias, fungos e vírus. O efeito bactericida do ácido peracético também foi comprovado por Cox et al. (2007), apesar desses autores terem estudado esse efeito em ovos previamente contaminados por *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium. Todos os desinfetantes a base de peróxidos testados nessa pesquisa foram aplicados em menores concentrações, de acordo com as recomendações dos fabricantes, e menores quantidades, a fim de evitar a molhagem excessiva do ovo, quando comparado aos trabalhos citados, o que pode ser a causa para a diferença encontrada para redução bacteriana na casca.

#### **4.2. Qualidade da casca**

Os dados da Tabela 2 demonstram semelhança ( $P>0,05$ ) entre os tratamentos para a espessura e resistência da casca.

Tabela 2. Médias da espessura da casca, em milímetros, e resistência, em Kg/mm<sup>2</sup>, dos ovos dos tratamentos formaldeído, ozônio (O<sub>3</sub>), luz ultravioleta (UV), peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), ácido peracético (PAA), controle úmido e controle seco, acompanhados dos respectivos desvios-padrão (DP)

Tratamento	Espessura (mm±DP)	Resistência (Kg/mm <sup>2</sup> ±DP)
Formaldeído	0,35±0,020	4,40±0,651
O <sub>3</sub>	0,36±0,018	4,51±0,623
UV	0,35±0,018	4,48±0,680
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0,34±0,024	4,51±0,621
PAA	0,35±0,018	4,12±0,612
Controle úmido	0,35±0,020	4,41±0,612
Controle seco	0,36±0,024	4,47±0,502
<sup>1</sup> CV(%)	5,78	13,97

Médias não seguidas de letras dentro das colunas são semelhantes (P>0,05)

<sup>1</sup>CV = Coeficiente de variação.

A relação entre qualidade da casca e penetração bacteriana nessa estrutura foi proposta por alguns autores (Sauter E Petersen, 1974; Nascimento e Solomon, 1991, Messens et al., 2005). Alguns compostos químicos usados na desinfecção de ovos podem afetar a estrutura da casca (Kim e Slavik, 1996) e isso pode alterar a qualidade dessa estrutura (Messens et al., 2005). A ausência de diferença significativa para os valores de espessura da casca indica que nenhum dos procedimentos testados afetou essa variável de maneira negativa. Como a espessura é um dos fatores diretamente relacionados à resistência da casca (Robert, 2004), a ausência de diferença estatística observada entre os grupos para resistência também era esperada. Contudo, uma análise da ultraestrutura da casca é fortemente indicada para uma avaliação mais precisa do efeito dos referidos procedimentos de desinfecção sobre as diversas camadas da casca, em especial, a cutícula.

### 4.3. Rendimento de incubação

Os pesos dos ovos no momento da incubação não foram afetados pelos tratamentos (P>0,05; Tabela 3). Os percentuais de perda de peso dos ovos variaram significativamente de 12,52 a 13,30% entre os grupos. A perda de peso dos ovos foi menor no grupo controle

quando comparados com as perdas observadas nos ovos dos grupos controle úmido, ácido peracético e peróxido de hidrogênio ( $P \leq 0,05$ ; Tabela 3), não diferindo dos grupos paraformaldeído, ozônio e UV ( $P > 0,05$ ; Tabela 3).

Tabela 3. Pesos médios dos ovos antes da incubação e durante a transferência, em gramas, e percentual de perda de peso de ovos dos tratamentos formaldeído, ozônio ( $O_3$ ), luz ultravioleta (UV), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), ácido peracético (PAA), controle úmido e controle seco, acompanhados dos respectivos desvios-padrão (DP)

Tratamento	Peso antes		
	da incubação (g±DP)	Peso na transferência (g±DP)	Perda de peso <sup>1</sup> (%±DP)
Formaldeído	64,57±0,34	56,28±0,60	12,84 ±0,73 <sup>ab</sup>
Ozônio	64,83±0,58	56,52±0,50	12,82 ±0,39 <sup>ab</sup>
UV	64,82±0,66	56,51±0,70	12,82 ±0,40 <sup>ab</sup>
$H_2O_2$	64,68±0,49	56,20±0,55	13,12±0,40 <sup>b</sup>
PAA	64,77±0,65	56,24±0,60	13,18±0,52 <sup>b</sup>
Controle úmido	64,69±0,73	56,09±0,66	13,30±0,37 <sup>b</sup>
Controle seco	64,54±0,43	56,47±0,48	12,52±0,38 <sup>a</sup>
<sup>2</sup> CV (%)	0,79	0,92	3,61

<sup>a,b</sup> Médias seguidas de letras distintas dentro das colunas são diferentes pelo teste Tukey ( $P \leq 0,05$ ).

<sup>1</sup>Perda de peso= [(peso inicial dos ovos – peso dos na transferência)/peso inicial dos ovos] x100.

<sup>2</sup>CV = Coeficiente de variância.

A ausência de diferença significativa para peso dos ovos entre os tratamentos garantiu a uniformidade das amostras de ovos entre os grupos e a certeza que qualquer alteração do peso ou perda de peso, durante a incubação, deveu-se exclusivamente aos efeitos dos tratamentos aplicados nos ovos. A perda de peso dos ovos durante a incubação deve-se principalmente à difusão de água do interior do ovo através da casca (Tullet, 1990; Tona et al., 2001), o que pode afetar a eclodibilidade e qualidade dos pintos neonatos (Peebles et al., 1987; Tona et al., 2001). De acordo com Peebles et al. (1998), o aumento da perda de água dos ovos pelos poros está relacionado, além da baixa umidade de incubação, à remoção ou dano à cutícula. A cutícula é capaz de atuar como barreira à difusão do vapor de água, o que pode afetar a permeabilidade da casca (Peebles e Brake, 1986) e o desenvolvimento embrionário (Peebles et al., 1987). Nesse experimento, devido à incubação de todos os ovos em condições similares

de temperatura e umidade, credita-se qualquer alteração na perda de peso dos ovos à alteração na camada cuticular da casca.

Poucos trabalhos na literatura descreveram os efeitos da desinfecção da casca com os desinfetantes testados, exceto formaldeído, sobre a perda de peso dos ovos durante a incubação. Para a comparação entre os tratamentos de desinfecção dos ovos com formaldeído, ozônio e sem desinfecção, os dados encontrados nesse estudo estão em consonância com os apresentados por Whistler e Sheldon (1989). Esses autores também não observaram diferença significativa para perda de umidade dos ovos entre grupos de ovos não desinfetados (controle seco) e fumigados com ozônio (3, 06% peso/peso por 30 minutos) ou formaldeído (3 x = 119,8 mL formalina: 59,9 g permanganato de potássio/2,83 m<sup>3</sup>). Em relação à comparação entre desinfecção dos ovos com UV e formaldeído, a ausência de diferença significativa para a perda de peso dos ovos encontrados entre esses tratamentos neste trabalho diverge dos resultados encontrados por Scott (1993a). Esse autor observou maior perda de peso em ovos desinfetados com 1% de formalina – substância de mesmo princípio ativo que o formaldeído – que em ovos tratados com luz UV em alta intensidade. Tal divergência entre resultados pode ser explicada com base no efeito do método de desinfecção sobre a camada cuticular utilizado pelo autor, que avaliou a imersão dos ovos em formalina e não a fumigação com esse produto. Dessa maneira, a possível ação da formalina, em estado líquido, sobre a cutícula dos ovos pode ter levado ao aumento da permeabilidade da casca e conseqüente aumento da perda de peso dos ovos, o que não foi observado na comparação entre os grupos de ovos fumigados com formaldeído e desinfetados com luz UV nesse trabalho. Ao comparar a desinfecção dos ovos com UV e grupo de ovos sem desinfecção, os dados desse trabalho estão de acordo com os encontrados por Coufal et al. (2003). Esses autores também não encontraram diferença significativa para a perda de umidade dos ovos entre grupos, sugerindo que o tratamento de ovos férteis com a luz UV não é capaz de afetar cutícula a ponto de aumentar a perda de peso dos ovos durante a incubação.

Em relação ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, PAA e controle úmido, os maiores valores de perda de peso dos ovos encontrados nesses grupos sugerem que o método de pulverização utilizado, independentemente da substância aplicada nos ovos, parece ter afetado a integridade da cutícula. Esses resultados diferem dos encontrados por Sheldon e Brake (1991), que não observaram diferença significativa para perda de umidade durante a incubação entre ovos pulverizados com 5% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e sem desinfecção. Ainda que a aplicação do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nessa pesquisa tenha sido em concentração menor que no trabalho citado, a diferença entre resultados talvez se deva à quantidade do desinfetante pulverizado nos ovos, que foi maior no

presente estudo (0,69 mL/ ovo) que no trabalho de Sheldon e Brake (1991) (0,25-0,33 mL/ovo). Devido ao alto poder de oxidação do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, esses autores não descartaram a provável alteração que essa substância poderia ocasionar à cutícula, levando a maior perda de água e peso dos ovos, fato corroborado por Sander e Wilson (1999). Ao pulverizar ovos de matrizes de 35 semanas de idade com solução de 3% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante a incubação (do 1º ao 18º dia), esses autores observaram maior perda de peso dos ovos no grupo pulverizado com o desinfetante que no grupo pulverizado com água. No presente estudo, a alta perda de peso dos ovos pulverizados com água pode ser explicada por dois fatores: possível presença de cloro residual (não mensurado) na água em quantidade capaz de alterar a camada cuticular; e/ou o efeito da água *per se* sobre a remoção dessa estrutura.

Independentemente do maior ou menor percentual de perda de peso do ovo observado entre os tratamentos, todos os valores encontraram-se dentro do esperado para essa variável. Dados da literatura apontam para a perda de 12 a 15% do peso inicial do ovo durante a incubação para obtenção de boa eclodibilidade (Peebles e Brake, 1986; Peebles et al., 1987; Molenaar et al., 2010).

Os tratamentos de desinfecção não afetaram a fertilidade, eclodibilidade do número total de ovos incubados e eclodibilidade do número total de ovos férteis ( $P > 0,05$ ; Tabela 4). A mortalidade embrionária também não foi afetada pelos tratamentos nos períodos analisados (inicial, intermediária e final) ( $P > 0,05$ ; Tabela 4).

Tabela 4. Percentual médio de fertilidade (Fert), eclodibilidade do número total de ovos incubados (Eclod), eclodibilidade do número total de ovos férteis incubados (Eclod fert), mortalidade embrionária de ovos dos tratamentos formaldeído, ozônio (O<sub>3</sub>), luz ultravioleta (UV), peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), ácido peracético (PAA), controle úmido e controle seco, acompanhados dos respectivos desvios-padrão (DP)

Tratamento	Fert <sup>1</sup> (%±DP)	Eclod <sup>2</sup> (%±DP)	Eclod fert <sup>3</sup> (%±DP)	Mort inicial <sup>4</sup> (%±DP)	Mort inter- mediária <sup>5</sup> (%±DP)	Mort final + bicados (vivos e mortos) <sup>6</sup> (%±DP)
Formaldeído	98,26±1,36	91,22±3,13	92,84±2,99	5,04±1,81	0,09±0,30	1,51±1,68
O <sub>3</sub>	98,35±1,86	92,43±3,48	93,98±2,93	3,98±2,36	0,09±0,31	1,50±1,57
UV	98,35±1,50	93,29±1,74	94,87±1,88	2,84±1,54	0,35±0,68	1,76±1,22
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	98,61±1,28	93,21±3,30	94,52±2,84	4,15±3,03	0,18±0,41	0,80±0,66
PAA	98,87±1,44	92,70±2,00	93,76±1,45	4,13±1,52	0,44±0,54	1,15±0,96
Controle úmido	98,77±1,48	93,71±2,99	94,86±2,18	2,84±2,04	0,27±0,48	1,15±1,05
Controle seco	98,25±1,43	93,00±2,98	94,66±2,90	3,48±2,33	0,09±0,31	1,24±0,88
CV <sup>7</sup> (%)	1,51	3,06	2,59	26,97	26,81	33,00

Médias não seguidas de letras dentro das colunas são semelhantes (P>0,05).

<sup>1</sup>Fertilidade = (número de ovos férteis/número de ovos incubados) x 100.

<sup>2</sup>Eclodibilidade = (número de ovos eclodidos/ número total de ovos incubados) x 100.

<sup>3</sup>Eclodibilidade de ovos férteis = ( número de ovos eclodidos/número de ovos férteis incubados) x 100.

<sup>4</sup>Mortalidade inicial = (número de embriões mortos entre 0 a 7 dias de incubação/número total de ovos férteis incubados) x 100.

<sup>5</sup>Mortalidade intermediária = (número de embriões mortos entre 8 a 14 dias de incubação/número total de ovos férteis incubados) x 100.

<sup>6</sup>Mortalidade final mais bicados vivos e mortos = [(número de embriões mortos entre 15 a 21 dias de incubação + número de ovos bicados com embriões vivos e ovos bicados com embriões mortos)/número total de ovos férteis incubados] x 100.

<sup>7</sup>CV = Coeficiente de variação.

O resultado observado para fertilidade dos ovos era esperado e demonstra, mais uma vez, que a homogeneidade das amostras de ovos coletados para todos os grupos, antes dos

tratamentos, foi garantida. A ausência de diferença significativa observada entre os tratamentos para as variáveis de eclodibilidade indica que a desinfecção dos ovos, com qualquer um dos procedimentos testados, não afetou esses parâmetros de maneira negativa, tampouco melhorou seus valores em comparação ao grupo controle.

Nenhuma alteração significativa nas taxas de mortalidade embrionária em quaisquer períodos durante a incubação foi observada entre tratamentos (Tabela 2). O padrão de mortalidade embrionária seguiu a normalidade apontada por Tona et al. (2001), com altas taxas sendo observadas nos períodos inicial e final de incubação.

De maneira diferente ao observado por Whistler e Sheldon (1989), a desinfecção com ozônio não prejudicou a eclodibilidade dos ovos ou aumentou as taxas de mortalidade embrionária nesse estudo. Essa diferença entre resultados provavelmente deve-se à elevada dose de exposição ao ozônio (concentração de 3,03% por peso, por duas horas) a que os ovos foram expostos no trabalho desses autores. De acordo com Furhmann et al. (2010), o ozônio possui efeito deletério sobre o desenvolvimento celular quando aplicado em altas doses. Como nesse estudo não foi observada alteração na eclodibilidade ou mortalidade embrionária, sugere-se que a desinfecção com o ozônio, nos moldes propostos, não foi prejudicial às células embrionárias.

Em relação ao tratamento com UV, a ausência de melhora significativa na eclodibilidade dos ovos tratados por esse método também foi observada por outros pesquisadores (Scott, 1993; Berrang et al., 1995; Coufal et al., 2003). Isso evidencia, mais uma vez, que a desinfecção por meio de luz UV não prejudica o desenvolvimento das células embrionárias e tem efeito somente na casca.

Para os ovos do grupo testado com  $H_2O_2$ , os dados observados nessa pesquisa diferem dos encontrados por Sheldon e Brake (1991), que relataram maior eclodibilidade de ovos férteis e menor mortalidade embrionária inicial para ovos pulverizados com  $H_2O_2$  que para ovos não desinfetados. A contaminação da casca dos ovos na pesquisa desses autores apresentou-se maior que no presente estudo, o que pode ter influenciado a alta mortalidade embrionária e conseqüente diferença significativa para eclodibilidade de ovos férteis em grupos não desinfetados. Outra possível justificativa para as diferenças encontradas pode ser apoiada no fato de que no trabalho de Sheldon e Brake (1991), a desinfecção dos ovos com  $H_2O_2$  ocorreu em concentrações maiores desse desinfetante, o que levou à maior redução da contaminação da casca e, logo, menor desafio microbiano aos embriões na fase inicial de incubação. Em contraste com os dados apresentados por esses autores, assim como observado

nesse estudo, Scott et al. (1993) e Sander e Wilson (1999) também não observaram efeito deletério da desinfecção de ovos com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sobre a eclodibilidade.

Nesse trabalho, assim como ocorreu com o tratamento H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, a pulverização dos ovos com PAA também não foi prejudicial ao embrião. Pouco é conhecido sobre o efeito da desinfecção de ovos incubáveis com ácido peracético sobre o rendimento de incubação e qualidade de pintos. Em concordância aos resultados apresentados nesse trabalho, Harisson (1969) também não encontrou efeito prejudicial do PAA, utilizado como produto esterilizante em ovos incubáveis para a produção de pintos SPF (*Specific-Pathogen-Free*), sobre a eclodibilidade.

Ao supor que a menor contagem bacteriana da casca dos ovos diminui a mortalidade embrionária e melhora os parâmetros de eclodibilidade, esperava-se que os grupos formaldeído e UV apresentassem, ao menos, eclodibilidade superior ao grupo controle. No entanto, isso não foi observado, o que sugere que a contaminação inicial dos ovos foi insuficiente para causar efeito negativo a essa variável.

#### **4.4. Qualidade dos pintos nascidos e contagem microbiológica do saco vitelínico**

O peso dos pintos e o percentual de pintos vendáveis ao nascimento não diferiram entre os tratamentos ( $P > 0,05$ ; Tabela 5). Da mesma maneira, as contagens de bactérias mesófilas aeróbicas e enterobactérias em pintos de um dia de idade apresentaram valores semelhantes entre os tratamentos ( $P > 0,05$ ; Tabela 5). As contagens de bactérias mesófilas aeróbicas e Enterobacteriaceae variaram de 2,12 a 2,85 e 2,04 a 2,89 log<sub>10</sub>UFC/mL entre os grupos, respectivamente.

Tabela 5. Peso médios dos pintos, em gramas, percentual de pintos vendáveis (machos e fêmeas) ao nascimento e contagens de bactérias mesófilas aeróbicas totais e Enterobacteriaceae do saco vitelínico de pintos de um dia de idade oriundos dos tratamentos formaldeído, ozônio (O<sub>3</sub>), luz ultravioleta (UV), peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), ácido peracético (PAA), controle úmido e controle seco, acompanhados dos respectivos desvios-padrão (DP)

Tratamento	Peso dos pintos (g±DP)	Vendáveis (%±DP)	Contagem microbiológica do saco vitelínico (log <sub>10</sub> UFC/mL±DP)	
			Bactérias mesófilas	
			aeróbicas totais	Enterobacteriaceae
Formaldeído	42,75±1,07	98,45±1,34	2,85±1,26	2,89±1,29
O <sub>3</sub>	43,48±1,02	98,95±0,92	2,12±0,44	2,04±0,13
UV	43,27±0,53	99,24±0,89	2,43±0,76	2,36±0,88
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	43,32±1,02	99,25±0,75	2,20±0,28	2,48±1,01
PAA	43,21±0,85	98,96±1,13	2,53±1,12	2,44±1,02
Controle úmido	43,46±1,14	99,05±1,28	2,21±0,52	2,35±0,78
Controle seco	43,36±1,34	98,40±1,01	2,50±0,87	2,09±0,31
CV <sup>1</sup> (%)	2,22	1,08	34,24	36,19

Médias não seguidas de letras dentro das colunas são semelhantes (P>0,05)

<sup>1</sup>CV = Coeficiente de variação.

O peso dos pintos ao nascimento foi similar entre os grupos e, da mesma maneira, o percentual de pintos vendáveis não foi afetado pelos tratamentos de desinfecção dos ovos. O peso ao nascimento é um indicador da qualidade dos pintos (Tona et al., 2004) e varia em função do peso do ovo, idade e nutrição da matriz, além da perda de peso dos ovos, entre outros (Tona et al., 2001). Apesar de os grupos de ovos pulverizados com desinfetantes a base de peróxidos e água apresentarem maior perda de peso durante a incubação em comparação com os demais grupos, essa diferença não foi suficiente para causar alteração no peso e percentual de pintos vendáveis. Como mencionado anteriormente, a perda de peso dos ovos variou dentro dos limites relatados na literatura, o que também pode estar relacionado às similaridades observadas entre os diferentes procedimentos de desinfecção tanto para a eclodibilidade, quanto para a qualidade dos pintos.

Cortés et al. (2004) apontaram a contaminação da casca dos ovos nos ninhos e/ou ambiente de incubação como provável causa para a infecção do saco vitelínico. A contaminação bacteriana do saco vitelínico pode resultar em infecções sistêmicas e subsequente diminuição de qualidade de pintos e desempenho produtivo das aves (Harry, 1957). Todos os tratamentos apresentaram pintos com baixas contagens microbianas do saco vitelínico e ausência de diferença estatística entre si para essa contagem. Sander e Wilson (1999) também observaram que, no primeiro dia de vida, a contaminação desse órgão, medida em percentual de incidência de positividade para a presença de bactérias, foi bastante reduzida e estatisticamente similar entre pintos oriundos de ovos desinfetados ou não.

A redução significativa da contagem de microrganismos da casca, observada nos tratamentos dos ovos com formaldeído e UV, não foi acompanhada por menor contagem dos mesmos microrganismos no saco vitelínico dos pintos. Uma explicação possível para essa ocorrência pode apoiar-se no fato de que o desafio microbiano imposto pelo ambiente de incubação tenha aumentado a contagem de bactérias da casca dos ovos de maneira a equiparar esses valores em todos os tratamentos. Dados de Magwood (1964) corroboram essa teoria, ao demonstrarem aumento expressivo da contagem bacteriana da casca durante a incubação. De acordo com Fuller e Jayne-Williams (1968), a ocorrência de doença oriunda da infecção do saco vitelínico da ave estaria ligada não somente à presença de bactérias nesse órgão, mas também ao tipo de microrganismos envolvidos na infecção, o grau de hidratação da gema e o nível de resistência do pinto.

Em conclusão, resultados desse experimento indicam que somente a radiação de luz UV e a fumigação com formaldeído foram eficazes em reduzir a contagem de bactérias aeróbicas na casca de ovos incubáveis em comparação ao grupo controle. Por apresentar efeito bactericida significativo na casca e não afetar os parâmetros de qualidade de casca, perda de peso dos ovos, rendimento de incubação e qualidade dos pintos neonatos e aspectos microbiológicos do saco vitelínico, a luz UV é indicada como procedimento alternativo eficaz para desinfecção de ovos incubáveis em larga escala. Avaliações da ultraestrutura da casca são necessárias para determinar se realmente a luz UV não afeta a cutícula. A desinfecção dos ovos com gás ozônio, em doses maiores que as testadas nesse experimento, é indicada para nova avaliação quanto ao uso como desinfetante alternativo ao formaldeído em matrizeiros. A pulverização de peróxido de hidrogênio ou ácido peracético nas concentrações testadas afeta a perda de peso dos ovos, o que sugere provável efeito indireto dessas substâncias sobre a cutícula e, portanto, restrição do seu uso em ovos que apresentem menor deposição dessa camada. Apesar de os ovos não desinfetados não terem apresentados piores resultados de

eclodibilidade e gerado pintos de similar qualidade aos pintos oriundos de ovos desinfetados, a desinfecção logo após a postura é fortemente indicada, a fim de evitar aumento do desafio microbiano dos ovos no ambiente de incubação. Estudos futuros são necessários para determinar se os desinfetantes alternativos testados possuem efeito diferenciado quando aplicados em ovos de matrizes mais velhas e ovos coletados em camas.

## 5. AGRADECIMENTOS

Ao suporte financeiro dado pela COBB e ao apoio técnico oferecido por Rafael Carreon. Ao apoio da Empresa PIFPAF Alimentos e de seus profissionais, Leonardo Ruiz, Antônio e Clever, na condução do experimento na fase de campo. Ao apoio técnico oferecido por Alcides (ALVAP). Aos conselhos dados pelo Professor Marcelo Resende (Universidade Federal de Minas Gerais/UFMG, Brasil) e à assistência técnica dada por Maura (UFMG, Brasil) e pelos alunos de pós-graduação (UFMG, Brasil), Letícia, Felipe, Gabriela e Renata, na condução das análises microbiológicas. Aos alunos de graduação, Letícia e Matheus, e pós-graduação (UFMG, Brasil), Érica, Mariana, Diego, Paula, Maria Fernanda, Renata, Lorena e Larissa, do Grupo de Estudos Avícolas (GEAv), pela ajuda na condução desse experimento. À Professora Ângela, à Doutora Júlia e à aluna de pós-graduação (UFMG, Brasil), Luiza, pelo auxílio no delineamento experimental e análises estatísticas realizadas. Aos Professores Leonardo José Camargos Lara e Nelson Carneiro Baião (UFMG, Brasil) pela confiança em mim depositada para a realização desse projeto.

## 6. REFERÊNCIAS

Bailey, J. S.; Buhr, R. J.; Cox, N. A.; Berrang, M. E. Effect of Hatching Cabinet Sanitation Treatments on Salmonella Cross-Contamination and Hatchability of Broiler Eggs. *Poult. Sci.*, v. 75, p. 191-196, 1996.

Berrang, M. E.; Cox, N. A.; Bailey, J. S. e Buhr, R. J. Efficacy of ultraviolet light for elimination of Salmonella on broiler hatching eggs. *J. Appl. Poult. Res.*, v. 4, p. 422-429, 1995.

Berrang, M.E., Frank, J.F., Buhr, R.J. et al. Microbiology of sanitized broiler hatching eggs through the egg production period. *J. Appl. Poult. Res.*, v. 6, p. 298-305, 1997.

Berrang, M. E.; Cox, N. A.; Frank, J. E.; Buhr, R J. et al. Hatching egg sanitization for prevention of reduction of human Enteropathog: A Review. *J. Appl. Poult. Res.*, v. 9, p. 279-284, 2000.

Braun P.G.; Fernandez, N.; Fuhrmann, H. Investigations on the effect of ozone as a disinfectant of egg surfaces. *Ozone: Science & Engineering: The Journal of the International Ozone Association*, v. 33, n.5, p. 374-378, 2011.

Cadirci, S. Disinfection of hatching eggs by formaldehyde fumigation – a review. *Arch.Geflügelk.*, v. 73, n. 2, p.116–123, 2009.

Chavez, C.; Knape, K. D. e Carey, J. B. Reduction of egg shell aerobic plate counts by ultraviolet light irradiation. *Poult. Sci.*, v. 78 (Suppl. 1), p. 67, 1999.

Chavez, C., Knape, K. D. ; Coufal, C. D; e Carey, J. B. Reduction of eggshell aerobic plate counts by ultraviolet irradiation. *Poult. Sci.*, v. 81, p.1132–1135, 2002.

Corry, J. E. L.; Jarvis, B.; Passmore, S.e Hedges, A. A critical review of measurement uncertainty in the enumeration of food microorganisms. *Food Microbiol.* v. 24, p. 230–253, 2007.

Cortés, C.R., Isaías, G.T., Cuello, C.L.et al. Bacterial isolation rate from fertile eggs, hatching eggs, and neonatal broilers with yolk sac infection. *Rev. Latinoam. Microbiol.*, v. 46, n.1-2, p. 12-16, 2004.

Coufal, C., C. Chavez, K. Knape, and J. Carey. Evaluation of a method of ultraviolet light sanitation of broiler hatching eggs. *Poult. Sci.*, v. 82, p.754–759, 2003.

Cox, N. A.; Richardson, L. J. ; Buhr, R. J. et al. Bactericidal effect of several chemicals on hatching eggs inoculated with *Salmonella* serovar Typhimurium. *J. Appl. Poult. Res.*, v. 16, p.623–627, 2007.

Fasenko, G.M.; O'Dea Christopher, E. E. e McMullen, L. M. Spraying hatching eggs with electrolyzed oxidizing water reduces eggshell microbial load without compromising broiler production parameters. *Poult. Sci.*, v. 88, p.1121–1127, 2009.

Fuhrmann, H.; Rupp, N.; Buchner, A.; Braun, P. The effect of gaseous ozone treatment on egg components. *J. Sci. Food Agric.*, v. 90, p. 593–598, 2010.

Fuller, R. e Jayne-Wiliams, D.J., The origin of bacteria recovered from the peritoneum and yolk sac of healthy chickens. *Br. Poult. Sci.*, v. 9, p. 159-163, 1968.

Gottselig, S.M.; Dunn-Horrocks, S.L.; Woodring, K.S. et al. Advanced oxidation process sanitization of eggshell surfaces. *Poult. Sci.*, v. 95, p.1356-1362, 2016.

Harrison, G.F. Production of germ-free chicks: a comparison of the hatchability of eggs sterilized externally by different methods. *Lab. Anim.*, v.3, p.51-59, 1969.

Harry, E. G. The effect on embryonic and chick mortality of yolk contaminated with bacteria from the hen. *Vet. Rec.*, v. 69, p. 1433-1439, 1957.

Kim, J.W. e Slavik, M.F. Use of blue lake as an indicator of bacterial penetration into eggs. *J. Rapid Methods Automat. Microbiol.*, v.4, p. 183-190, 1996.

Kuo, F.-L., Carey; J. B.; Ricke, S. C. e. Ha, S. D. Peroxidase catalyzed chemical dip, egg shell surface contamination, and hatching. *J. Appl. Poult. Res.*, v.5, p. 6-13, 1996.

Magwood, S. E. Studies in hatchery sanitation I. Fluctuations in microbial counts of air in poultry hatcheries. *Poult. Sci.*, v. 43, p. 441-449, 1964.

Messens, W.; Grijspeerdt, K. e Herman. L. Eggshell characteristics and penetration by *Salmonella enterica* serovar Enteritidis through the production period of a layer flock. *Brit. Poult. Sci.*, 46, 694–700, 2005.

Molenaar, R.; Reijrink, I.A.M.; Meijerhof. et al. Meeting embryonic requirements of broilers throughout incubation: a review. *Rev. Bras. Cienc. Avic.*, v.12, n.3, p. 137-148, 2010.

Musgrove, M. T.; Stephens, C. B.; Bourassa, D. V. et al. Enterobacteriaceae and Salmonella recovered from non sanitized and sanitized broiler hatching eggs. *J. Appl. Poult. Res.*, v. 23, p. 516-522, 2014.

Nascimento, V.P. e Solomon, S.E. The transfer of bacteria (*Salmonella* Enteritidis) across the eggshell wall of eggs classified as poor quality. *Anim. Tech.*, v. 42, p. 157-165, 1991.

Peebles, E. D. e Brake, J. The role of the cuticle in water vapor conductance by the eggshell of broiler breeders. *Poult. Sci.*, v. 65, p.1034-1039, 1986.

Peebles, E. D.; Brake, J. e Gildersleeve. R. P. Effects of eggshell cuticle removal and incubation humidity on embryonic development and hatchability of broilers. *Poult.Sci.*, v. 66, p.834-840, 1987.

Peebles, E.D.; Pansky,T.; Doyle, S. M. et al. Effects of dietary fat and eggshell cuticle removal on egg water loss and embryo growth in broiler hatching eggs. *Poult. Sci.*, v. 77, p.1522–1530, 1998.

Rodriguez-Romo, L.A. e Yousef, A.E. Inactivation of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis on shell eggs by ozone and UV radiation. *J Food Prot.*, v.68, p. 711–717, 2005.

Robert, J.R. Factors affecting egg internal quality and egg shell quality in laying hens. *J. Poult. Sci.*, v. 41, p. 161-177, 2004.

Samberg, Y. e Meroz, M. Application of disinfectants in poultry hatcheries *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, v.14, n. 2, p. 365-380, 1995.

Sander, J. E. e Wilson, J. L. Effect of hydrogen peroxide disinfection during incubation of chicken eggs on microbial levels and productivity. *Avian Dis.*, v. 43, p. 227–233, 1999.

Sauter, E.A. e Petersen, C.F. The effect of egg shell quality on penetration by various salmonellae. *Poult. Sci.*, v.53, p.2159-2162, 1974.

Scott, T.A. The effect of UV light and air filtering system on ebryo viability and microorganism load on the egg shell. *J. Appl. Poult. Res.*, v. 2, p.19-23, 1993.

Scott, T.A., Swetnam, C. e Kinsman, R. Screening sanitizing agents and methods of application for hatching eggs, 3. Effect of concentration and exposure time on embryo viability, *J. Appl. Poult. Res.*, v. 2, p. 12-18, 1993.

Sheldon, B.W e Brake. J. Hydrogen peroxide as an alternative hatching egg disinfectant. *Poult. Sci.*, v. 70, p. 1092-1098, 1991.

Spickler, J.L., Buhr, R.J., Cox, N.A. et al. Comparison between rinse and crush-and-rub sampling for aerobic bacteria recovery from broiler hatching eggs after sanitization. *Poult. Sci.*, v. 90, p.1609–1615, 2011.

Stefanello, C., Santos, T.C., Muramaki, A.E et al. Productive performance, eggshell quality, and eggshell ultrastructure of laying hens fed diets supplemented with organic trace minerals. *Poult. Sci.*, v. 93, p. 104-113, 2014.

Stephens C. B., Cox, N. A., Richardson L. J., et al. Eggshell surface and deep bacteria recovered from non-sanitized broiler hatching eggs. *Poult. Sci.*, v. 88 (Suppl. 1):143. (Abstr.), 2009.

Tona, K., Bamelis, F., Coucke, W. Relationship between broiler breeder's age and egg weight loss and embryonic mortality during incubation in large-scale conditions. *J. Appl. Poult. Res.*, v. 10, p. 221–227, 2001.

Tona, K.; Onafbesan, O. M.; Jago, Y. et al. Comparison of embryo physiological parameters during incubation, chick quality and growth performance of three lines of broiler breeders differing in genetic composition and growth rate. *Poult. Sci.*, v. 83, p. 507–513, 2004.

Tullett, S.G. Science and the art of incubation. *Poult. Sci.*, v. 69, p.1-15, 1990.

Wells , J. B. ;Coufal, C. D.; Parker, H.M. et al. Hatchability of Broiler Breeder Eggs Following Eggshell Sanitization by Repeated Treatment with a Combination of Ultraviolet Light and Hydrogen Peroxide. *Int. J. Poult. Sci.*, v. 10, n. 6, p. 421-425, 2011.

Whistler, P.E. e Sheldon, B.W. Bactericidal activity, eggshell conductance and hatchability effects of ozone versus formaldehyde disinfection. *Poult. Sci.*, v. 68, p. 1074-1077, 1989.

Zeweil, H.S., Rizk, R.E., Bekhet, G.M et al. Comparing the effectiveness of egg disinfectants against bacteria and mitotic indices of developing chick embryos. *The J. of Basic & Appl.Zoo.*, v. 70, p . 1–15, 2015.

### **CAPÍTULO III - CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Em virtude dos problemas descritos na literatura associados ao uso de formaldeído, os resultados desse trabalho realçam a possibilidade do uso da luz UV-C como procedimento alternativo capaz de reduzir a contagem microbiana da casca de ovos incubáveis considerados limpos. Por meio das respostas obtidas nesse experimento, foi possível observar que esse procedimento de desinfecção não prejudicou a produção de pintos em quantidade e qualidade elevados.

Importante ressaltar que a capacidade germicida da radiação UV-C está condicionada à exposição da superfície do ovo à radiação e, portanto, qualquer obstáculo entre a luz e o ovo pode diminuir sua efetividade. Por isso, a indicação de seu uso está relacionada aos ovos considerados limpos e sem acúmulo de matéria orgânica.

A utilização da radiação UV-C para desinfecção de ovos em escala industrial deve também se ater ao tempo entre postura e desinfecção, que deve ser o mínimo possível. Dessa maneira, a indicação do uso desse procedimento está ligada ao uso de máquinas que garantam a desinfecção de grande número de ovos em tempo hábil.

O uso de gás ozônio para a desinfecção de ovos, apesar de não ter sido efetivo em reduzir a contaminação microbiana da casca nesse experimento, deve ainda ser objeto de estudos futuros devido à praticidade de uso. Avaliação da dose de exposição dos ovos ao ozônio pode fornecer dados mais consistentes para uma possível indicação do ozônio como método de desinfecção alternativo ao formaldeído. Já as respostas obtidas com os desinfetantes pulverizados indicaram possível ação negativa desses produtos sobre a cutícula, o que pode limitar sua indicação para uso em ovos com menor espessura dessa camada.

Estudos futuros são necessários para determinar se o formaldeído e os desinfetantes alternativos testados possuem efeito diferenciado quando aplicados em ovos de matrizes mais velhas e ovos coletados em camas.