



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DOS ALIMENTOS

Carlos Eduardo da Silva Soares

Aplicabilidade de Métodos Descontaminantes na Produção Avícola

Florianópolis

2021

Carlos Eduardo da Silva Soares

Aplicabilidade de Métodos Descontaminantes na Produção Avícola

Tese submetida ao Programa de Pós Graduação em Ciências dos Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de Doutor em Ciências dos Alimentos.

Orientador: Prof. Juliano De Dea Lindner, Dr.

Florianópolis

2021

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Soares, Carlos Eduardo da Silva
Aplicabilidade de Métodos Descontaminantes na Produção
Avícola / Carlos Eduardo da Silva Soares ; orientador,
Juliano De Dea Lindner, 2021.
138 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós
Graduação em Ciência dos Alimentos, Florianópolis, 2021.

Inclui referências.

1. Ciência dos Alimentos. 2. Avicultura. 3.
Descontaminantes. 4. Fungos. 5. Ozônio. I. Lindner, Juliano
De Dea. II. Universidade Federal de Santa Catarina.
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos. III.
Título.

Carlos Eduardo da Silva Soares

Aplicabilidade de Métodos Descontaminantes na Produção Avícola

O presente trabalho em nível de doutorado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof(a). Simone Gisele de Oliveira. Dra.
Universidade Federal do Paraná

Prof. Fabiano Dahlke. Dr.
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Giustino Tribuzi. Dr
Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de Doutor em Ciências dos Alimentos.

Prof. Ana Carolina Maisonnave Arisi Dr.(a)
Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Prof. Juliano De Dea Lindner, Dr.
Orientador

Florianópolis, 2021.

RESUMO

A avicultura de corte e de postura comercial no Brasil está entre as atividades que mais se desenvolveram dentro do setor agropecuário brasileiro, onde as aves possuem 90 anos de melhoramento genético. Novas tecnologias na produção de carne *in natura*, alimentos processados e ovos, faz do país o segundo maior produtor de carne de frango e ficar entre os cinco dos maiores produtores de ovos do mundo. Durante a criação das aves, a maravalha utilizada como cama de frango ou ninho, em a função de evitar o contato das aves com o solo e para o que os ovos não sofram danos durante o momento da postura. Deve estar livre de bactérias, fungos, insetos e matérias estranhas que interfiram no desenvolvimento das aves. A busca por estratégias para o controle de artrópodes e descontaminação microbiológica que utilizam métodos brandos sem deixar resíduos tóxicos, estão pouco associadas ao campo, o que nos incentiva à pesquisa, e também reflete a preocupação das entidades governamentais sobre a pesquisa, desenvolvimento e inovação, associadas à produção de alimentos. Como a indústria avícola depende constantemente do uso de agroquímicos, há necessidade de buscar novas tecnologias limpas e seguras frente a diversos contaminantes alimentares. Sanitizantes químicos utilizados na produção avícola têm em sua formulação, ácido peracético (APA) em várias concentrações, o que pode eliminar microrganismos patogênicos resistentes a outros tipos de desinfetantes. O gás ozônio (O₃) é usado como um agente oxidante e pode ser aplicado como um desinfetante para controlar microrganismos e degradar compostos tóxicos, como pesticidas e micotoxinas, nas indústrias de alimentos. Os trabalhos realizados nesta tese com o O₃ e APA são promissores quanto sua ação contra insetos como *Alphitobius diaperinus* e descontaminante fúngico em ovos. São capazes de degradar estruturas reprodutivas e reduzir o desenvolvimento de fungos filamentosos. No entanto, são necessárias mais pesquisas para estabelecer tratamentos ideais com APA e O₃ para a descontaminação fúngica e avaliar sua ação negativa em desencadear novas microfissuras e microfragmentos sobre a cutícula da casca dos ovos de galinha.

Palavras-chave: Ácido peracético. Cama de frango. Descontaminação. Fungos filamentosos. Ovos. Ozônio.

ABSTRACT

Broiler poultry farming and commercial laying in Brazil is among the activities that have developed the most within the Brazilian agricultural sector, where birds have had 90 years of genetic improvement. New technologies in the production of “*in natura*”, processed foods and eggs make the country the second largest producer of chicken meat and rank among the five largest egg producers in the world. During poultry rearing period, the wood shavings used as poultry litter or nest, has the function of avoiding the contact of the birds with the ground and so that the eggs do not suffer damage during the moment of laying. It must be free of bacteria, fungi, insects and foreign matter that interfere with the birds development. The search for strategies for the control of arthropods and microbiological decontamination that use mild methods without leaving toxic residues are little associated with the field, which encourages us to research, and also reflects the concern of government entities about research, development and innovation, associated with food production. As the poultry industry constantly depends on the use of agrochemicals, there is a need to seek new clean and safe technologies against various food contaminants. Chemical sanitizers used in poultry production have peracetic acid (PAA) in their formulation in various concentrations, which can eliminate pathogenic microorganisms resistant to other types of disinfectants. Ozone gas (O₃) is used as an oxidizing agent and can be applied as a disinfectant to control microorganisms and degrade toxic compounds such as pesticides and mycotoxins in food industries. The works carried out in this thesis with PAA and O₃ are promising regarding their action against insects such as *Alphitobius diaperinus* and fungal decontaminant in eggs, degrading reproductive structures and reducing the development of filamentous fungi. However, further research is needed to establish optimal treatments with PAA and O₃ for fungal decontamination and to evaluate their negative action in triggering new microfissures and microfragments on the cuticle of the hen's eggshell.

Keywords: Decontamination. Eggs. Filamentous fungi. Ozone. Peracetic acid. Poultry litter.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Consumo per capita de carne de frango (<i>Gallus gallus domesticus</i>) no Brasil por ano (kg/hab).....	21
Figura 2 - Destino das exportações e principais produtos de carne de frango exportados (inteiro, cortes, processados).....	22
Figura 3 - Aviários com estruturas adequadas para a criação de aves (a) climatizados (b) semiclimatizados.....	23
Figura 4 – Crescente produção de ovos na última década no Brasil.....	28
Figura 5 - Apresentação do (a) volume de produção de ovos para o mercado interno e externo e (b) consumo <i>per capita</i> de ovos durante a última década no Brasil.....	29
Figura 6- Material utilizado para acomodação das aves (a) maravalha e (b) casca de arroz.....	24
Figura 7 – Etapa de enleiramento da cama de frango para o processo de fermentação.....	24
Figura 8- Infestação de (a) besouros e (b) larvas da espécie <i>Alphitobius diaperinus</i> em comedouros infantis.....	25
Figura 9 - Presença de fungos toxigênicos como <i>Aspergillus</i> na região ventral e <i>Penicillium</i> na região dorsal.....	27
Figura 10 - Postura de ovos (a) na cama e (b) com sujidades (fezes) sobre a casca. .	30
Figura 11- Representação do exterior e interior do ovo de galinha a partir de uma seção longitudinal.....	31
Figura 12 - Micrografias por meio de MEV das camadas da casca do ovo (a) mamilar, paliçada e membranas da casca (b) Camada de cristal vertical e cutícula em aumento de 200 e 2000x, respectivamente.	34
Figura 13- Estrutura química da cipermetrina.....	36
Figura 14- Estrutura para aplicação do gás ozônio em silos de armazenagem de grãos.....	40
Figura 15- Colônias fúngicas em sítios anatômicos (sutura elítral) do <i>A. diaperinus</i> adulto isolados na cama de frango [300x].....	50
Figura 16- Conídios aderidos à cabeça da larva do <i>A.diaperinus</i> isoladas da cama de frango [300x].....	51

Figura 17 - Macro e microfauna isolada da cama de frango e sua relação na cadeia trófica.....	57
Figura 18- Micrografias de partes anatômicas de <i>Tribolium</i> sp. (a.1) VENTRAL - corpo inteiro, (b) cabeça com suas partes bucais e (c) prosterno com pelos e (d) detalhes das partes da boca [30 a x 1.400].....	58
Figura 19 - Micrografias eletrônicas de varredura de ácaros isolados de cama dorsal de aves - (a) sem fungos no idiossoma dorsal, apenas na região da cabeça e cobertos por micélios - (b) esporos presos ao aparelho bucal [150 a x 1.500].....	60
Figura 20- Esquema utilizado para o experimento com o O ₃ sobre a inativação de besouros adultos e larvas.	66
Figura 21- Micrografia do <i>Alphitobius diaperinus</i> (região ventral - perna) isolado de cama de frango e Fungos do gênero (<i>Aspergillus</i> sp) e suas estruturas reprodutivas [700X]..	70
Figura 22- Micrografia da superfície externa da casca do ovo: com diferentes gêneros, colônias e estruturas reprodutivas de fungos [300x].	76
Figura 23- Presença de fungos filamentosos e a formação de colônias na superfície na cutícula e poros de cascas de ovo [1000x].	77
Figura 24- Micrografia da presença de fungos filamentosos, sua invasão através do canal do poro e a formação de uma protusão na membrana externa do interior da casca [500x].	78
Figura 25 - Infográfico demonstrando a contaminação por fungos e aplicação de ácido peracético na casca do ovo	83
Figura 26- Micrografias em MEV da superfície externa saudáveis (a) sem danos estruturais (b) da casca do ovo sem microfissuras e poro desprotegido.....	85
Figura 27- Micrografia da superfície externa da casca do ovo: comportamento dos fungos na casca sem o uso de ácido peracético e a presença de fungos viáveis e estruturas reprodutivas com suas estruturas reprodutivas.	85
Figura 28- Micrografias de MEV das superfícies externas da casca do ovo com a cutícula despigmentada e com microfissuras, após a aplicação do APA (75 ppm) [600x].....	86
Figura 29- Micrografia da superfície externa da casca do ovo, com aplicação de APA (150 ppm) em fungos presentes na casca do ovo e estruturas reprodutivas desidratadas [600x].	87
Figura 30 - Micrografia da superfície externa da casca do ovo com aplicação de APA (300 ppm) apresenta a formação de microfragmentos da cutícula [600x].	88

Figura 31- Micrografia mostra a ação sanitizante do APA: micélios compactados e hifas e conídios com rupturas e desidratação, possivelmente inviáveis [600x].	89
Figura 32- Esquema de equipamentos utilizados no tratamento de ovos com ozônio.	95
Figura 33- Imagem de (MEV) da superfícies externas (cutículas) da casca do ovo (sem tratamento com ozônio - controle) com presença de microfissuras naturais [300x].	96
Figura 34- Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) das superfícies externas (cutícula) da casca do ovo após 120 min de exposição ao ozônio. (a) presença de microfissuras e ruptura de hifas (b) microfissuras e poro [700x]......	97
Figura 35- Micrografia da superfície externa (cutículas) da casca do ovo após 300 min de exposição ao ozônio. Presença de colônias de fungos rompidas e microfissuras em uma grande extensão da cutícula (com exposição do poro).	98

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Denominação de cada tipo de ovo comercializado, sua forma de armazenagem e tratamentos.....	33
Tabela 2- Porcentagem de mortalidade de insetos <i>Alphitobius diaperinus</i> (estágios larval e adultos) após a aplicação de gás ozônio em diferentes concentrações e tempos de exposição.	68

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	Ácido acético
AFLs	Aflatoxinas
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOAC	Associação Oficial de Químicos Analistas
DON	Deoxinivalenol
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
FAO	<i>Food and Agriculture Organization</i>
FBs	Fumonisin
FDA	Administração de Alimentos e Medicamentos, do inglês <i>Food and Drug Administration</i>
GRAS	Geralmente reconhecido como seguro do inglês <i>Generally recognized as safe</i>
LMR	Limite Máximo de Resíduo
MAPA	Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
OTA	Ocratoxina A
PDA	Agar Batata Dextrose, do inglês <i>Potato Agar Dextrose</i>
PVC	Policloreto de Vinila
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UV	Ultra violeta
USDA	Departamento de agricultura dos Estados Unidos, do inglês <i>United States Department of Agriculture</i>
APA	Ácido peracético
PAA	Ácido peracético, do inglês <i>Peracetic acid</i>
PH	Peróxido de hidrogênio
SM	microscopia estereoscópica do inglês <i>Stereoscopic microscopy</i>
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
SEM	Microscopia eletrônica de varredura, do inglês <i>Scanning electron microscopy</i>
ABPA	Associação Brasileira de Proteína Animal

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	OBJETIVOS	19
2.1	GERAL	19
2.2	ESPECÍFICOS.....	19
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
3.1	CARNE DE FRANGO	21
3.1.1	Consumo de Carne de Frango.....	21
3.1.2	Criação de Frango de Corte.....	22
3.2	Contaminação da cama de frango.....	23
3.2.1	Cama de Frango.....	23
3.2.2	Insetos na cama de frango.....	24
3.2.3	Fungos.....	26
3.3	Ovos.....	27
3.3.1	Produção e consumo de ovos	28
3.3.2	Sistema de criação para produção de ovos.....	29
3.4	Contaminação em ovos.....	29
3.4.1	Higienização de ovos frescos	30
3.4.2	Fontes de contaminação e higienização dos ovos	31
3.4.3	Regulamentação.....	32
3.4.4	Estrutura da casca do ovo	33
3.4.5	Contaminação no ambiente avícola, carne de frango e ovos	34
3.5	Agrotóxicos - Inseticidas do Grupo Piretróides.....	34
3.2.7	Cipermetrina.....	35
3.5.1	Exposições aos agrotóxicos.....	36
3.6	Estratégias de controle de ectoparasitas e descontaminação	37

3.6.1	Ozônio	37
3.6.2	Aplicações do Ozônio em diversas áreas	39
3.6.3	Ozônio x insetos	39
3.6.4	Susceptibilidade ao O ₃	40
3.6.5	Ozônio x Ovos	41
3.6.6	Ácido peracético.....	41
3.6.7	Ácido peracético x ovos	42
4	CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS DO BESOIRO (<i>Alphitobius diaperinus</i>) EM CRIAÇÃO DE AVES - UM VETOR DE FUNGOS TOXIGÊNICOS FILAMENTOSOS: POR MICROSCOPIA ESTEREOSCÓPICA E DE ELETRÔNICA DE VARREDURA.....	43
4.1	INTRODUÇÃO	47
4.2	. MATERIAL E MÉTODOS.....	48
4.2.1	Material	48
4.2.2	Métodos.....	48
4.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	49
4.3.1	Características microscópicas de <i>Alphitobius diaperinus</i>	49
4.3.2	<i>Alphitobius diaperinus</i> : Acúmulo de esporos de fungos e proliferação de colônias nos sítios anatômicos.....	49
4.3.3	Proliferação de <i>A. diaperinus</i> em instalações de criação de aves <i>versus</i> saúde das aves e produção segura da carne.....	51
4.4	CONCLUSÃO	52
5	MICRO E MACROFAUNA ISOLADAS DA CAMA DE FRANGO SEM TRATAMENTO COM PESTICIDAS: POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA	53
5.1	INTRODUÇÃO	56
5.2	MATERIAL E MÉTODOS.....	56
5.2.1	Material	56

5.2.2	Métodos.....	57
5.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	57
5.3.1	Besouros e ácaros e suas relações com fungos filamentosos	58
5.3.1.1	<i>Tribolium sp.</i>	58
5.3.1.2	<i>Trichouropoda sp.</i>	59
5.3.2	Bem-estar do frango, saúde e segurança dos produtos	60
5.4	CONCLUSÃO	61
6	USO DE GÁS OZÔNIO COMO ALTERNATIVA VERDE NO CONTROLE À INFESTAÇÃO POR BESOUROS <i>Alphitobius diaperinus</i> EM AVIÁRIOS UTILIZADOS NA INDÚSTRIA AVÍCOLA.....	62
6.1	INTRODUÇÃO	65
6.2	MATERIAL E MÉTODOS	66
6.2.1	Material	66
6.2.2	Métodos.....	67
6.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	67
6.3.1	Efeito do gás O₃ em tratamentos com <i>A. diaperinus</i> (adultos e larvas)	68
6.3.2	Comportamento dos insetos ao gás O₃ / dormência	69
6.4	CONCLUSÃO	70
7	ATIVIDADE DE FUNGOS FILAMENTOSOS PRESENTES CASCA OVOS DE GALINHA (<i>Gallus gallus domesticus</i>) E SUA AÇÃO SOBRE A CASCA DOS OVOS: POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA	71
7.1	INTRODUÇÃO	74
7.2	MATERIAL E MÉTODOS	74
7.2.1	Material	74
7.2.2	Métodos.....	75
7.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	75
7.3.1	Crescimento de fungos na casca de ovo - superfície externa e interna	75

8	ÁCIDO PERACÉTICO: EFEITO NA CUTÍCULA DA CASCA DO OVO DA GALINHA E AÇÃO DESCONTAMINANTE SOBRE OS FUNGOS FILAMENTOSOS	79
8.1	INTRODUÇÃO	82
8.2	MATERIAL E MÉTODOS	82
8.2.1	Material	82
8.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	84
8.3.1	Microfissuras e microfragmentos naturais	84
8.3.2	Ação da contaminação fúngica natural na casca do ovo	85
8.3.2.1	75 ppm	86
8.3.2.2	150 ppm	87
8.3.2.3	300 ppm	87
8.3.3	Comportamento de colônias fúngicas sobre de 300 ppm	88
8.4	CONCLUSÃO	89
9	ESTUDO PRELIMINAR UTILIZANDO O GÁS OZÔNIO COMO AÇÃO ANTIFÚNGICA EM OVOS DE GALINHA DE POSTURA	91
9.1	INTRODUÇÃO	94
9.2	MATERIAL E MÉTODOS	94
9.2.1	Amostras e equipamento	94
9.2.2	Ensaio utilizando ozônio	95
9.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	96
9.4	CONCLUSÃO	98
	REFERÊNCIAS	102

1 INTRODUÇÃO

A avicultura comercial no Brasil se destaca entre as atividades que mais se desenvolveram dentro do setor agropecuário brasileiro. Novas tecnologias na produção de carne *in natura*, alimentos processados e ovos, fazem do país, o segundo maior produtor de carne de frango e está entre um dos maiores produtores de ovos no mundo. A produção de carne de frango alcançou 13,8 milhões de toneladas de carne de frango e 53 bilhões de unidades ovos em 2021 (ABPA, 2021).

Todo este volume de produção, exige um substrato denominado cama de frango. A cama de frango ou de aviário, tem como função absorver a umidade, proteger as aves do contato direto com o solo e controlar a oscilação de temperatura no interior do galpão. Em ninhos, a maravalha é utilizada para que os ovos não sofram danos durante o momento da postura. Deve estar livre de bactérias, fungos, insetos e matérias estranhas.

Durante o período de criação das aves no aviário, a temperatura, umidade, penas, restos de ração e dejeções, tornam o ambiente ideal para o desenvolvimento de insetos e ácaros vetores de doenças, o que leva a necessidade da aplicação de pesticidas. Para manter a qualidade na produção, são necessárias estratégias de controle de ectoparasitas presentes nas instalações (insetos) e tegumento das aves (ácaros), os quais causam prejuízos econômicos e de saúde nas aves. Sua infestação, devido a seu rápido ciclo de vida e sua resistência a vários tipos de agrotóxicos, causam transtornos na produção avícola (SOARES et al., 2019; MARANGI et al., 2012).

O uso indiscriminado desses produtos na avicultura, incluindo os pesticidas, podem deixar resíduos tóxicos, tanto nas instalações quanto nas proximidades do solo, água, fauna e flora (FENOLL et al., 2011; HILDMANN et al., 2015; JABBAR et al., 1993; PALM, 2007; PARENTE et al., 2017). Regiões com grande concentração de granjas avícolas, geram um volume enorme de cama de aviário, e quando o destino é a lavoura (fertilizante) leva a um excesso de resíduos contaminantes no solo. A indústria avícola enfrenta sérios problemas com a qualidade de seus produtos, e o mercado consumidor cada vez mais exigente, busca alimentos seguros. Normas técnicas adotadas pelas empresas avícolas recomendam a aplicação de inseticidas do grupo dos piretróides para a higienização de seus galpões de criação com objetivo de controlar insetos indesejáveis (principalmente *Alphitobius diaperinus* L. - cascudinho) e ácaros

(*Dermanyssus gallinae*). Diversos sanitizantes deixam resíduo tóxicos, e eles são utilizados para o controle de microrganismos patogênicos como bactérias, vírus e fungos.

Fungos de armazenagem como dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e de campo como o *Fusarium* são relatados em diversos tipos de matrizes alimentícias e ambientes avícolas. O *Aspergillus fumigatus*, pode contaminar a cama de aviário, produzir micotoxinas e causar prejuízos com enfermidades conhecidas por aspergilose e aflatoxicose, principalmente em animais mais jovens. A presença de fungos, micotoxinas e resíduos de agrotóxicos em produtos de origem animal, tanto em carnes quanto em ovos, está relatado em diversos estudos.

A busca por estratégias para o controle e descontaminação estão pouco associadas ao campo, o que nos incentiva à pesquisa, e também reflete a preocupação das entidades governamentais sobre a pesquisa, desenvolvimento e inovação, associadas à produção de alimentos (MCTIC, 2016-2022). Como a indústria avícola depende constantemente do uso de agroquímicos, há necessidade de buscar novas tecnologias limpas e seguras frente a diversos contaminantes alimentares.

O gás ozônio, reconhecido como seguro por não deixar resíduos tóxicos, demonstra ter potencial para controle de fungos, insetos, degradação das micotoxinas e resíduos de agrotóxicos. Com relação aos insetos, principalmente presentes em unidades armazenadores de grãos, alguns trabalhos relataram a aplicação de O₃ para o controle destas pragas como estratégia eficaz que substitui outros compostos tóxicos que deixam resíduos (ROZADO et al., 2008). O ácido peracético é um forte desinfetante com um amplo espectro de atividade antimicrobiana devido sua ação bactericida e fungicida, demonstrado em diversos trabalhos de pesquisa na área (MENEGARO et al., 2016).

Cabe salientar que as condições de temperatura e umidade, dentro dos aviários e ninhos, podem favorecer o desenvolvimento fúngico. Portanto há necessidade de investigar a presença destes contaminantes, ou seja, insetos e ácaros, fungos (deteriorantes e toxigênicos) e pesticidas no ambiente, tanto na de criação de frango de corte quanto em ovos comerciais e buscar métodos seguros e limpos para de controle e/ou descontaminação.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Identificar possíveis contaminantes na produção avícola e reduzir sua incidência utilizando métodos seguros como o gás ozônio e ácido peracético para o controle de insetos e descontaminação de microrganismos presentes na cama de frango e ovos (*Gallus gallus domesticus*).

2.2 ESPECÍFICOS

- Verificar a segurança da cama de aviário por meio de ensaios para detecção de fungos (carga fúngica e gênero) durante o período de desenvolvimento das aves;
- Avaliar a presença de insetos e ácaros vetores de doenças no ambiente de criação de frango de corte (cama de aviário);
- Avaliar o efeito do gás ozônio no controle de besouros vetores de doenças e fungos durante a criação de frangos;
- Registrar a ação de contaminação de fungos filamentosos na casca de ovos comerciais por estereoscopia e microscopia eletrônica de varredura;
- Avaliar o efeito do gás ozônio no controle de fungos e seu efeito sobre a casca do ovo utilizando a microscopia eletrônica de varredura;
- Investigar a ação do ácido peracético na inibição do desenvolvimento de fungos filamentosos e seus efeitos sobre a casca de ovos comerciais;

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Partes deste capítulo foram resultados de artigos publicados em:

SOARES, Carlos Eduardo; WEBER, André; SCUSSEL, Vildes Maria. Stereo and scanning electron microscopy characteristics of poultry breeding beetle (*Alphitobius diaperinus*) –a filamentous toxigenic fungi carrier. **Emirates Journal of Food and Agriculture**, 2018.

SOARES, C. E. et al. Living Organisms and Biodegradation Changes Of Poultry Litter During Breeding And Their Relation To Chicken Health And Poultry Products Safety. **International Journal of Engineering and Technical Research**, 2019.

SOARES, Carlos Eduardo; SCUSSEL, Vildes; DAHLKE, Fabiano. Pyrethroid and Residues in Chickens and Poultry Litter. In: **Sustainable Agriculture Reviews 47**. Springer, Cham, 2021. p. 145-166.

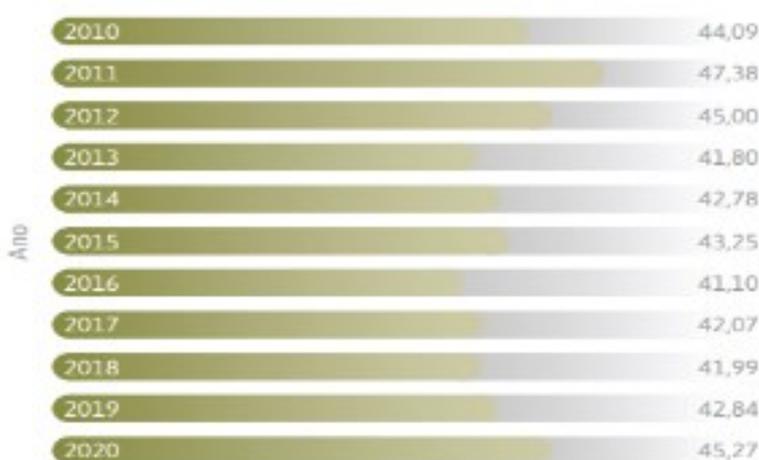
3.1 CARNE DE FRANGO

A carne de frango é obtida de aves híbridas oriundas de cruzamentos de 3 a 4 linhagens puras, que muitas vezes quadruplicam seu peso inicial em apenas 7 dias. A pressão de seleção alterou o sistema nervoso e digestivo dando origem a aves com um apetite voraz e grande aumento na estrutura muscular. São mais de 90 anos de melhoramento genético para alcançar os resultados obtidos atualmente, onde a criação de frangos e galinhas teve seu início no período de 1870 a 1930 (MENDES, 2004; STRINGHINI et al., 2006; SCHIMIDT et al., 2009; BIRGES, 2010).

3.1.1 Consumo de Carne de Frango

O consumo de carne de frango apresentou valores crescentes *per capita* neste ano, comparado ao ano anterior. No ano de 2011 o consumo *per capita* do brasileiro foi de 47,38 kg de carne de frango, caindo drasticamente nestes últimos anos. Para o ano de 2020 o consumo no mercado interno de carne de frango foi de 45,27 kg. A Figura 1 apresenta o consumo *per capita* por ano e mostra uma elevação no consumo neste ano de 2020 (ABPA, 2021).

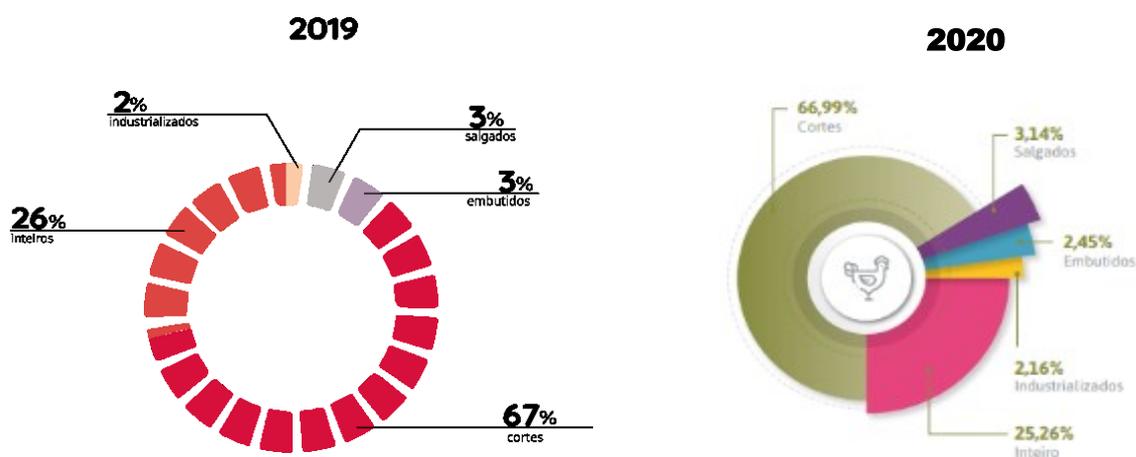
Figura 1 - Consumo per capita de carne de frango (*Gallus gallus domesticus*) no Brasil por ano (kg/hab).



Fonte: ABPA, 2021

A maior parte produção de carne de frango do país, de acordo com a associação brasileira de proteína animal (2020) está destinado ao mercado interno é de 69%. Para as exportações os principais produtos são os cortes (66,99%), frango inteiro (25,26%), industrializados (2,16%), embutidos (2,45%) e salgados (3,14%). Comparando com dados de (2019), houve um aumento nas exportações de produtos industrializados e salgados, e uma queda nos embutidos (Figura 2).

Figura 2 - Destino das exportações e principais produtos de carne de frango exportados (inteiro, cortes, processados).

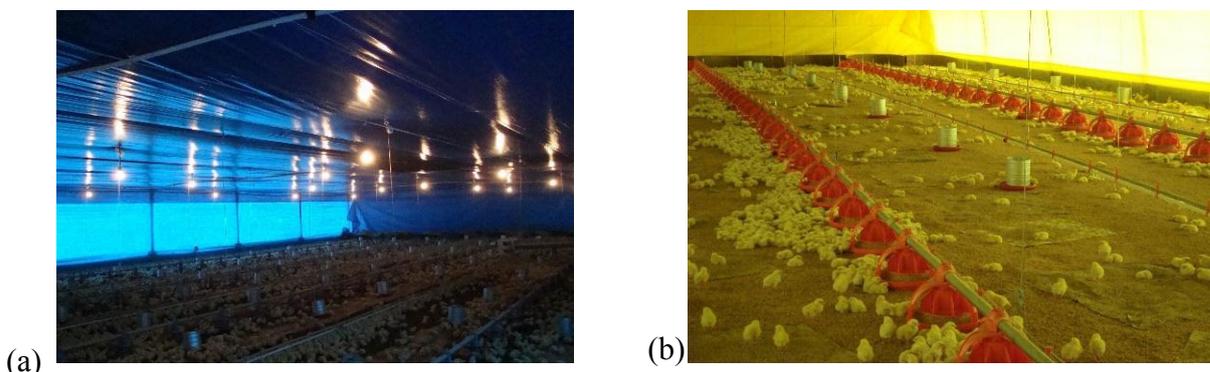


Fonte: ABPA, 2019, 2020

3.1.2 Criação de Frango de Corte

As aves são criadas em sua grande maioria, por produtores integrados às empresas do setor avícola. As instalações (aviários) com infraestrutura adequada, proporcionam um ambiente em que as aves possam expressar seus comportamentos naturais, além de conforto térmico (Figura 3). O frango de corte é criado no aviário por um período médio de 45 dias, dependendo da exigência do mercado consumidor. Período é dividido em 4 estádios de crescimento com pré-inicial (1 a 7), inicial (8 a 21 dias), crescimento (22 a 35 dias) e final (36 a 45 dias) (MENDES, 2004; STRINGHINI, 2006).

Figura 3 - Aviários com estruturas adequadas para a criação de aves (a) climatizados (b) sem climatizados.



Fonte: Autor

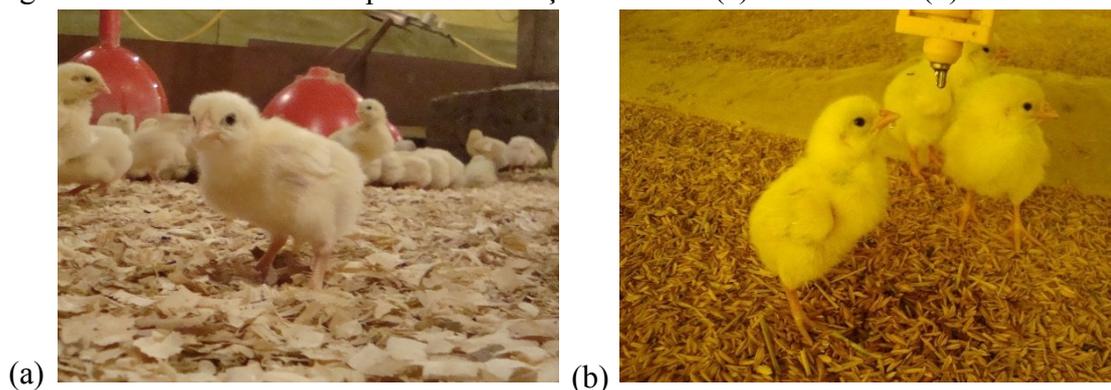
Novas tecnologias produzidas em outros países e transferidas para nossas condições climáticas e estruturais como (comedouros, bebedouros e cortinas automatizadas) principalmente para aviários climatizados, reduziram as limitações de produtividade das aves (SOUZA, 2003). Já a cadeia produtiva de ovos apresentou também, modificações tecnológicas em seus processos de produção, na seleção de linhagens híbridas mais produtivas e em seus sistemas de criação (BASHIR, et al., 2015; BUSSE et al., 2019).

3.2 CONTAMINAÇÃO DA CAMA DE FRANGO

3.2.1 Cama de Frango

A cama de frango no sul do país, consiste basicamente em, (a) maravalha (fragmentos de madeira) ou (b) casca de arroz. Que são materiais residuais de indústrias de beneficiamento de madeira e arroz (Figura 4). Tem a função de absorver a umidade do ambiente, promover conforto térmico para as aves, proteção direta com o solo do aviário e evitar oscilação de temperatura dentro do galpão (AVILA et al., 2007). No entanto, é esperado que a cama de frango contenha organismos vivos (insetos e ácaros), microrganismos patogênicos (bactérias, fungos e vírus), resíduos de medicamentos e pesticidas que podem prejudicar o desenvolvimento das aves (CUNNINGHAM; RITZ; MERKA, 2009; MUSA et al., 2011).

Figura 4 - Material utilizado para acomodação das aves (a) maravalha e (b) casca de arroz.

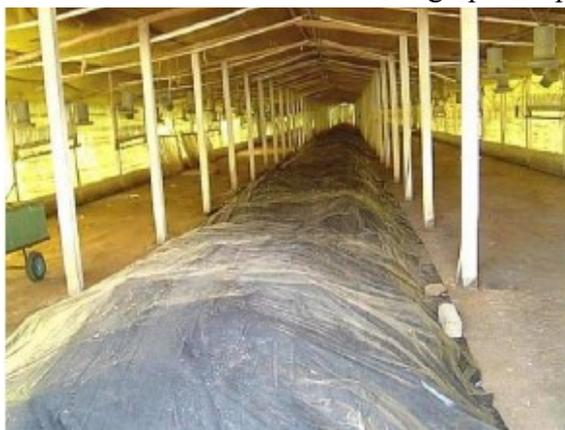


Fonte: Autor

Em todas as etapas de criação, os frangos de corte estão em contato com a cama, e sua qualidade possui um efeito primordial sobre a saúde e o desempenho das aves. Sua baixa qualidade propicia proliferação de insetos e ácaros que podem levar a problemas de saúde (cutâneos e respiratórios) para os animais e avicultores. Além disso, resíduos de alimentos acumulados na cama de frango junto com a alta umidade, tornam-se substrato ideal para o crescimento de fungos toxigênicos (SOARES et al., 2019b).

De acordo com a Instrução normativa nº 56/2007 publicada Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento estabelece que após a identificação de problemas sanitários, a cama após sua utilização, deverá sofrer processo de fermentação (Figura 5) por no mínimo 10 (dez) dias antes de sua retirada do galpão, após o enleiramento (formação em leira) (BRASIL, 2007).

Figura 5 – Etapa de enleiramento da cama de frango para o processo de fermentação.



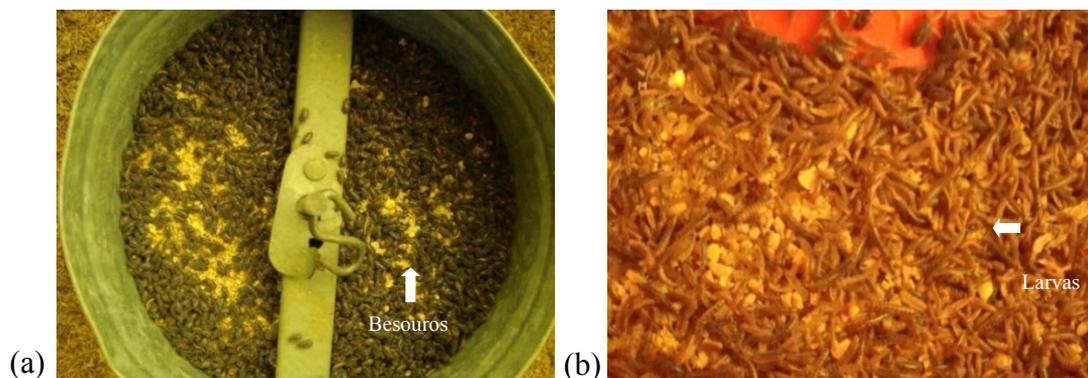
Fonte: SOARES et al. 2018

3.2.2 Insetos na cama de frango

Os insetos, principalmente os cascudinhos - *Alphitobius diaperinus* são agentes causadores de doenças em aves (Figura 6). Os besouros e as larvas (Figuras 8a,b)

provocam problemas sanitários nas granjas avícolas, prejudicam o desempenho zootécnico de frangos e causam sérios prejuízos financeiros (CHAUVE, 1998; DIAS; VARGAS; ALMEIDA, 2013).

Figura 6- Infestação de (a) besouros e (b) larvas da espécie *Alphitobius diaperinus* em comedouros infantis de frangos.



Fonte: SILVA et al. (2007).

Em sistemas intensivos de criação de aves, o besouro *A. diaperinus*, afeta a saúde das aves e dos avicultores, pois o coleóptero, transmite infecções virais (bouba aviária), fúngicas (*Aspergillus* sp) e bacterianas (*Salmonella* sp) (SESTI, 2005; DE LAS CASAS, 1972; HILBERT, 2012). No caso dos ovos, muitas vezes, os problemas são causados por ácaros que infestam as aves, o que implica no uso de pesticidas do grupo piretróide para controlar a infestação, o que causa o acúmulo de resíduos tanto no produto quanto no organismo das aves (REICH; TRIACCHINI, 2018).

Regiões com grande concentração de produtores, geram um grande volume de cama de aviário, e quando a destinação da cama de aviário é a agricultura, fertilizante, pode-se levar a um excesso de resíduos e contaminar o solo e rios (DASGUPTA et al., 2007; HOAI et al., 2011).

A infestação destes agentes contaminantes, devido a seu rápido ciclo de vida e sua resistência a vários tipos de agrotóxicos, causam transtornos econômicos na produção avícola (MARANGI et al., 2012b). O uso indiscriminado de pesticidas e fungicidas na avicultura, pode deixar resíduos nas instalações, ambiente (solo, água, fauna e flora) e possivelmente contaminar alimentos destinados a dieta humana (carne, ovos e vegetais) (COSTA et al., 2015a; FENOLL et al., 2011; HILDMANN et al., 2015; PARENTE et al., 2017b).

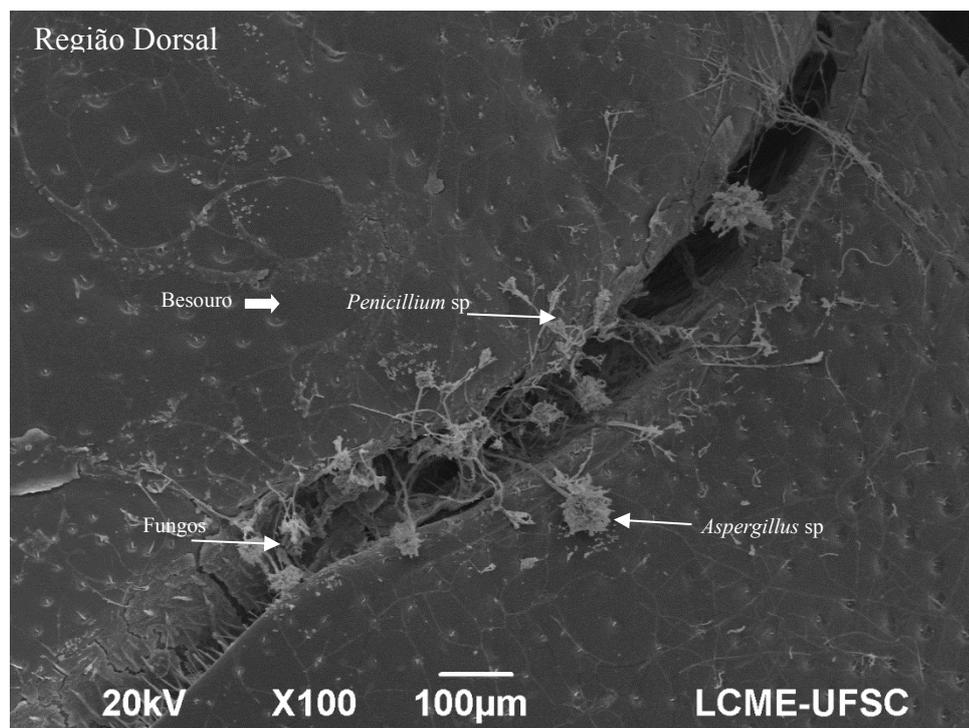
3.2.3 Fungos

Os Fungos toxigênicos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* foram detectados em besouros da espécie *A. diaperinus* mortos. Estes insetos, devem ser removidos do aviário para reduzir a contaminação. Eles representam substratos ricos para o desenvolvimento de fungos com possibilidade de formação de toxinas, além da exposição a doenças de galinhas devido aos hábitos alimentares dos insetos (SOARES et al. 2018).

Os esporos são responsáveis pela propagação dos fungos de armazenagem dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*, que em condições favoráveis, desenvolvem-se com rapidez durante o processo produção, colheita, transporte e armazenamento de grãos (SCUSSEL, 1998).

Durante o armazenamento, os fungos xerófilos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*, progridem e substituem os fungos de campo que são impedidos de se desenvolver, pois suportam métodos de secagem com atividades de água (0,75 e 0,85) (SCUSSEL, 2002). É importante mencionar que, condições favoráveis de temperatura (25-35°C), conteúdo de umidade (13-16%) e atividade de água (0,70 - 0,90), propiciam a produção de micotoxinas pelos fungos toxigênicos. E as essas características físicas, se assemelham as encontradas na cama de frango (SCUSSEL, 2002 ;SOARES et al., 2019b).

Oportunistas, os fungos toxigênicos se alojam em sítios anatômicos da região ventral (partes da boca, prosterno e cavidades dos membros) e dorsal (sutura elitral) de besouros mortos isolados em cama de aviário, possivelmente encontram umidade e substrato para seu desenvolvimento (SOARES; WEBER; SCUSSEL, 2018). A Figura 7, mostra através da microscopia eletrônica de varredura (MEV), as estruturas reprodutivas do *Aspergillus* e *Penicillium* aderidas aos sítios anatômicos do corpo do besouro adulto, tornando importante a remoção dos insetos mortos após a aplicação de pesticidas. O uso do (MEV) como ferramenta de identificação e investigação das estruturas reprodutivas de fungos filamentosos é expressiva em trabalhos de pesquisa (CHOI et al., 2010).



Fonte: Autor, 2019

Fungos toxigênicos são contaminantes microbianos relativamente pouco associados às cascas de ovos, por outro lado, é necessária uma investigação mais aprofundada, pois há poucas informações descritas sobre o desenvolvimento de fungos sobre a superfícies do ovo (GOODENOUGH; STALLWOOD, 2012; MANDEEL; NARDONI; MANCIANTI, 2011;BAHOBAIL; HASSAN; EL-DEEB, 2012).

3.3 OVOS

Os ovos constituem uma parte importante da dieta humana devido seu conteúdo proteico ser de alta qualidade. Também é rico em aminoácidos, gorduras, minerais e vitaminas (ANTON, 2007). Para a nutrição humana, o alto teor de colesterol presentes nos ovos fez com que milhares de consumidores restringissem seu consumo devido as consequências do alto consumo de colesterol. Estudos indicam que o colesterol presente nos ovos não afeta negativamente os níveis séricos de colesterol (HU; MANSON; WILLETT, 2001).

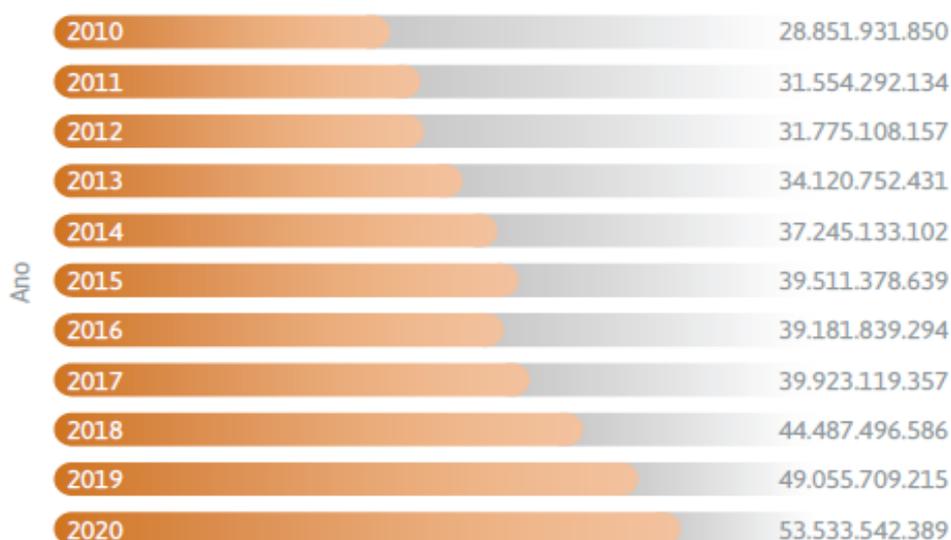
São um dos poucos alimentos que podem passar da propriedade rural para o consumidor com tratamento mínimo de higienização. A capacidade da galinha de produzir um alimento que pode ser armazenado por até três semanas sem efeitos adversos a sua qualidade é uma indicação que complexos sistemas antimicrobianos, juntamente com a casca, evoluíram para proteger o ovo (SPARKS, 2014).

3.3.1 Produção e consumo de ovos

O Brasil produziu aproximadamente quarenta bilhões de unidades no segundo semestre de 2017 (Figura 8), já no acumulado de nestes últimos 12 meses, os valores históricos alcançaram aproximadamente 54 bilhões de unidades (ABPA, 2021; IBGE, 2021). Neste mesmo período, o consumo de ovos também progrediu, elevando o consumo *per capita* para 251 ovos (ABPA, 2021).

De acordo com os dados do IBGE (2020) grande parte do destino da produção de ovos é o consumo, quanto que o restante para produção de pintainhos. Apenas 0,31% deste volume é destinado à exportação (APBA, 2021).

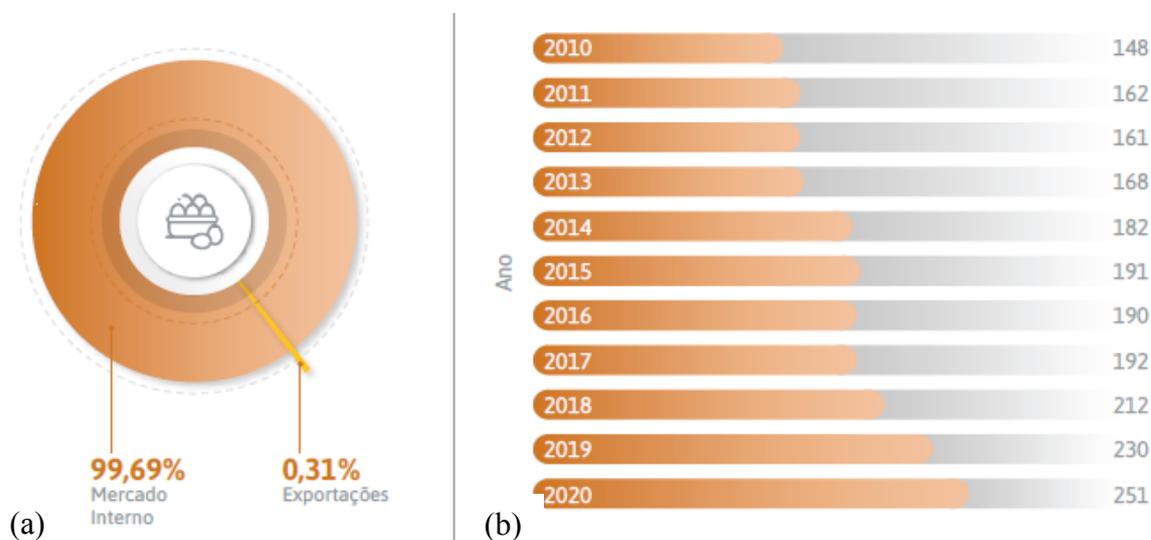
Figura 8 – Crescente produção de ovos na última década no



Fonte: ABPA, 2021

O consumo de ovos no Brasil é bastante dinâmico, devido seu perfil econômico, social e cultural. E estes diversos fatores, faz com que o país apresente um baixo consumo de ovos, quando comparado a outros países. No entanto, no ano de 2020, houve um aumento significativo no consumo de ovos durante este período de pandemia (ABPA, 2021). A Figura 9 apresenta (a) valores de exportações e o que foi consumido pelo mercado interno e (b) o consumo per capita de ovos durante os últimos 10 anos. Isto corrobora com a necessidade de novas pesquisas envolvendo contaminantes alimentares em ovos.

Figura 9 - Apresentação do (a) volume de produção de ovos para o mercado interno e externo e (b) consumo *per capita* de ovos durante a última década no Brasil.



Fonte: ABPA, 2021

3.3.2 Sistema de criação para produção de ovos

Em nosso país ainda prevalece o sistema intensivo de produção utilizando gaiolas convencionais. No entanto, sistemas alternativos de produção, como o “caipira” ou a produção avícola orgânica ganha espaço e atenção dos consumidores (AMARAL et al, 2015). Esta mudança conceitual fez com que as principais companhias de material genético passassem a desenvolver linhas genéticas específicas para a produção de aves de postura para o modelo *free-range* com ótimos níveis de produtividade e rusticidade às condições do ambiente.

Em sistemas de criação *free-range*, entretanto, as galinhas estão expostas a uma série de endo e ectoparasitas presentes no ambiente onde estão alojadas, não raramente, abrigam inúmeros tipos de fungos que podem provocar contaminação dos ovos ou até mesmo queda na produção com consequência na rentabilidade (LOZANE et al., 2017).

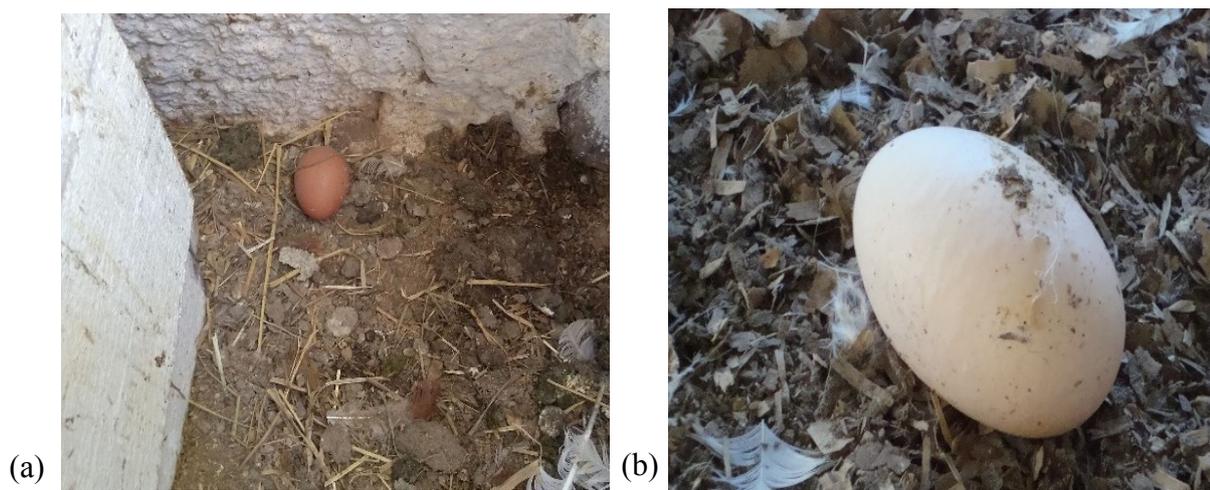
3.4 CONTAMINAÇÃO EM OVOS

Na produção de ovos, o material de nidificação (palha seca, casca de arroz entre outros) também precisa ser avaliado sempre, mesmo que esteja limpo, seco, sem a presença de bolores. Isso evita que ovos rachados e sujos, aumente ainda mais a possibilidade de contaminação (EFUNTOYE; FASHANU, 2002).

Ovos frescos são geralmente livres de organismos patogênicos, raramente tocam a parede cloacal contaminada durante a oviposição. O problema está na contaminação

cloacal, causar a contaminação vaginal da galinha. (MIYAMOTO-T; et al., 1997; OKAMURA et al., 2007). Contudo, após a postura (exposição ao ambiente), os ovos podem ser contaminados por diferentes tipos de fontes, incluindo solo, poeira e materiais de nidificação mal higienizados (GOODENOUGH e STALLWOOD, 2012). A Figura 10 apresenta ovos contaminados após a postura dos ovos (a) na cama e (b) com fezes sobre a casca.

Figura 10 - Postura de ovos (a) na cama e (b) com sujidades (fezes) sobre a casca.



Fonte: Autor, 2021

3.4.1 Higienização de ovos frescos

Na produção avícola, a higienização de equipamentos e instalações são realizadas utilizando compostos como, glutaraldeído, amônia quaternária e hipoclorito de sódio, porém são potencialmente prejudiciais ao meio ambiente e a saúde do avicultor (GRASTEAU; PATRICK DANIEL; VALÉRIE CHESNEAU, 2015). A contaminação por fungos em ovos, ocorre quando as hifas passam pelos poros e atingem a membrana interna da casca. Outra característica da contaminação fúngica é o aumento do diâmetro dos poros, o que facilita ainda mais a contaminação interna do ovo dependendo do período de exposição aos fungos (SOARES et al., 2020).

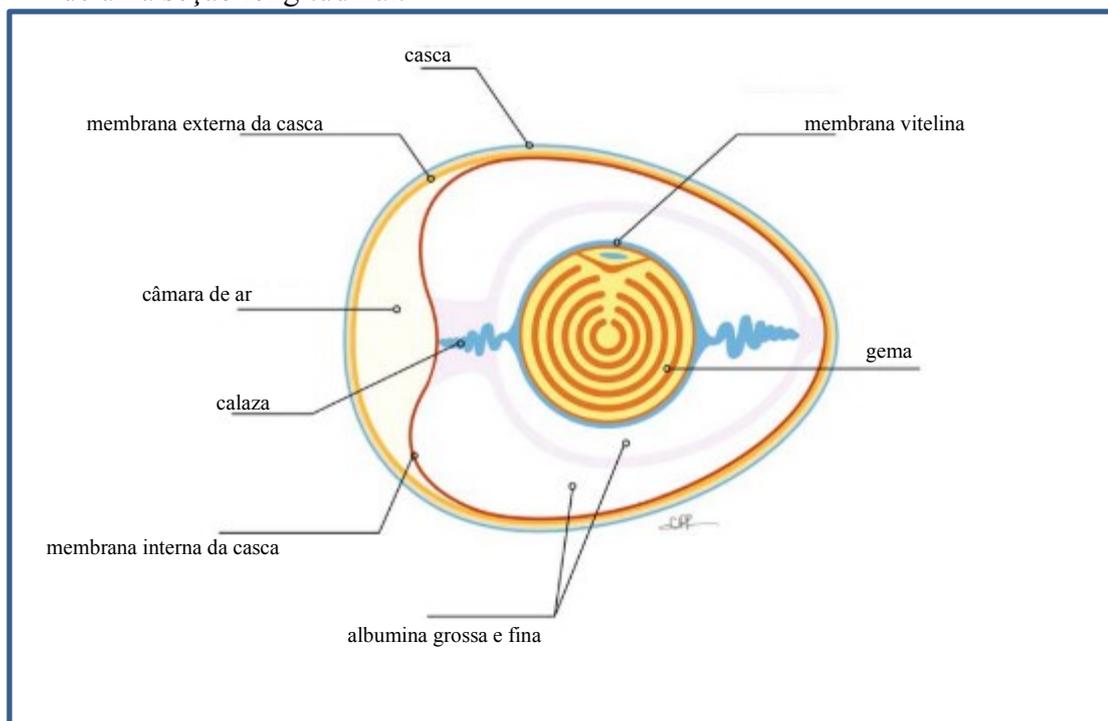
A serapilheira, camada depositada na superfície do solo (folhas/ramos) em plantios de *Pinus* ou *Eucalyptus*, que são as matérias primas para a produção de maravalha para os ninhos, contém quantidades significativas de nutrientes, portanto os fungos podem estar presentes nestes substratos (AUER; GHIZELINI; PIMENTEL, 2007).

As forragens utilizadas como ninhos, podem ser contaminadas em campo ou no momento do armazenamento por várias espécies de fungos micotoxigênicos, o que pode

umentar e diversificar o risco de exposição às micotoxinas. As micotoxinas mais estudadas são as aflatoxinas (AFLs), deoxinivalenol (DON), fumonisinas (FBs), ocratoxina A (OTA), e zearalenona (ZON) (GALLO, 2015).

O ovo é composto de uma gema em seu centro, envolta pelo albúmen (clara de ovo), membranas de casca de ovo, casca de ovo calcificada e cutícula (HINCKE et al., 2007). A propagação por hifas de *Fusarium* na casca do ovo é relevante, pois aumenta a preocupação com a possível formação de seus metabólitos no interior dos ovos, tanto na região externa quanto interna do ovo. Estudos sugerem que pode haver bioacumulação de micotoxinas de *Fusarium beauvericina* e *enniaticinas* na gema de ovo (JESTOI et al., 2009). A Figura 11 apresenta a seção longitudinal de conteúdo externo e interno do ovo de galinha.

Figura 11- Representação do exterior e interior do ovo de galinha a partir de uma seção longitudinal.



Fonte: Adaptado de HINCKE et al., 2012

3.4.2 Fontes de contaminação e higienização dos ovos

Pesquisas comprovaram que é imprescindível a conservação em um ambiente adequado para a qualidade do ovo, desde o início da produção até o consumo. Sem desconsiderar o processo de lavagem, tempo e temperatura de armazenamento, o que minimiza o nível de contaminação do ovo (AKTER et al., 2014; LUO et al., 2020).

A fonte de contaminação pode ser primária (transovariana) ou secundária (através da casca ou manejo inadequado), principalmente na manipulação e acondicionamento dos ovos. Galinhas alimentadas com dietas contaminadas com altos níveis (4 mg/kg) ou baixos (0,02 mg/kg) de aflatoxina B1, produziram pintainhos com lesões histopatológicas no fígado (necrose individual de hepatócitos, espaços sinusoidais obliterados e proliferação leve de ductos biliares) ocasionados por aflatoxina B1 (MARÍA DE LOURDES PÉREZ-ARÉVALO, JORGE SOTO-BRACHO; ARRIETA-MENDOZA, 2012).

A legislação brasileira recomenda a lavagem e secagem dos ovos (MAPA, 2017). Contudo, alguns trabalhos de pesquisa não recomendam esta etapa antes de serem armazenados, quando o destino é o consumo doméstico. Durante a higienização dos ovos, dependendo do tipo de detergente, pode ocorrer a remoção cutícula, o que facilita a contaminação interna e acelera o processo de decomposição, corroborando para a possível entrada de microrganismos patogênicos no interior do produto (MESSENS et al., 2011; SPARKS, 2014).

3.4.3 Regulamentação

De acordo com o MAPA (1990), os ovos são definidos pela sua condição (com ou sem casca) e conservação (por tratamentos térmicos) conforme (Tabela 1). Os ovos também são classificados de acordo com sua coloração (branco ou de cor) qualidade (ovoscopia) e peso (60-45g). Através RDC nº 35 a ANVISA (2009) estabelece a obrigatoriedade de apresentar nos rótulos das embalagens instruções para a conservação de ovos, no enfoque sobre casos de contaminação por bactérias do gênero *Salmonella*. Já o Decreto nº 9013/2017 estabelece as características qualitativas que os ovos devem apresentar, como por exemplo, integridade da casca e condições inócuas.

Tabela 1- Denominação de cada tipo de ovo comercializado, sua forma de armazenagem e tratamentos.

Ovo	Pela designação "ovo" entende-se o ovo de galinha em casca, sendo os demais acompanhados da indicação da espécie de que procedem (Art.709).
Ovo Fresco	Entende-se o ovo em casca que não foi conservado por qualquer processo e se enquadre na classificação estabelecida (Art. 707). Este ovo perderá sua denominação de fresco se for submetido intencionalmente a temperaturas inferiores a 8°C, visto que a temperatura recomendada para armazenamento do ovo fresco está entre 8°C e 15°C com uma umidade relativa do ar entre 70% - 90%.
Ovo Frigorificado	Entende-se o ovo em casca conservado pelo frio industrial nas especificações do Art. 725 da RIISPOA.
Conserva de Ovos	Produto resultante do tratamento do ovo sem casca ou partes do ovo que tenham sido congelados, salgados, pasteurizados, desidratados ou qualquer outro processo devidamente aprovado pela SIPA
Ovo Integral	Ovo em natureza desprovido de casca e que conserva as proporções naturais da gema e clara. Quando misturados, resultam em uma substância homogênea.

Fonte : MAPA, 2019

Ovos considerados impróprios para o consumo, são aqueles que apresentam diversas alterações como danos na casca, gema e clara com manchas escuras, presença de sangue também na clara, presença de embrião com mancha orbitária ou em adiantado estado de desenvolvimento e também a presença de fungos (interna ou externa) (Art. 733 RIISPOA).

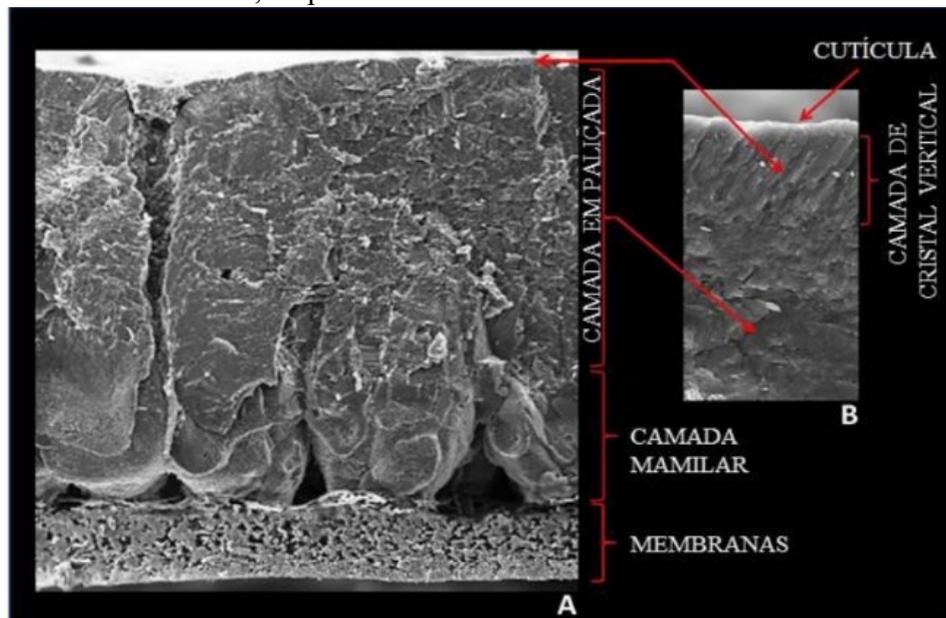
3.4.4 Estrutura da casca do ovo

A casca do ovo de galinha é uma biocerâmica complexa responsável por regular a troca de gases metabólicos e água, além de resistir ao peso da galinha, fornece proteção contra danos físicos. A permeabilidade da casca depende das características de seus poros - número, densidade e calibre (HINCKE et al., 2011).

Durante o desenvolvimento do ovo, uma fina película protetora de material transparente chamado cutícula é aplicada à superfície da casca. A cutícula é composta por quase 90% de proteína, com alguns carboidratos e uma pequena quantidade de lipídios (SOLOMON et al., 1994).

A casca de ovo tem uma estrutura bem definida, descrita a seguir, como do interior (lado do albumem do ovo) para o exterior (superfície externa): (I) camada mamilar (II) camada de paliçada compreendendo a camada mais espessa da casca e (III) a camada de cristal vertical de transição. A fina camada conhecida como cutícula (não calcificada) reveste a casca do ovo (Figura 12). (HAMILTON, 1986 ;CHIEN; HINCKE; MCKEE, 2008).

Figura 12 - Micrografias por meio de MEV das camadas da casca do ovo (a) mamilar, paliçada e membranas da casca (b) Camada de cristal vertical e cutícula em aumento de 200 e 2000x, respectivamente.



Fonte: BARBOSA et al., (2012)

3.4.5 Contaminação no ambiente avícola, carne de frango e ovos

A contaminação durante a criação das aves e ovos pode ocorrer tanto (a) no ambiente de criação quanto (b) pela exposição (ingestão / absorção) das próprias aves no próprio ambiente, podendo assim atingir o produto (carne/vísceras comestíveis/ovos). Essa contaminação pode ser ocasionada por organismos vivos (insetos e fungos) (SOARES et al., 2019).

A contaminação no ambiente de criação de frangos e produção de ovos, podem ocorrer pela produção de micotoxinas (cama de aviário e ração armazenada), e através aplicação de pesticidas para prevenção e controle de insetos e ácaros (GIRGIS; SMITH, 2010b; HILDMANN et al., 2015). Esta aplicação, acontece antes e durante o período de infestação dos artrópodes nocivos a produção avícola (SOARES; WEBER; SCUSSEL, 2019).

3.5 AGROTÓXICOS - INSETICIDAS DO GRUPO PIRETRÓIDES

Agrotóxicos (praguicidas / pesticidas) são substâncias utilizadas para controle de pragas, para prevenir, repelir, atacar, destruir, plantas ou animais inoportunos durante a

produção, transporte, armazenamento e processamento de alimentos (rações e cereais) (CODEX, 2002). A palavra pesticida é empregada de forma imprópria, devido sua pronuncia e grafia em inglês *pesticide*, já o termo praguicida (do latim *plaga*) que significa tudo que ataca, danifica e mata e (do latim *cida* que significa matar), refere-se à substancias químicas utilizadas para mitigar, repelir e até matar as pragas (SPINOSA, 2010).

Na legislação brasileira, inseticidas são mencionados como agrotóxicos, sendo conceituados como agentes de processos físicos, químicos e biológicos para uso no cultivo, armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas (BRASIL, 1989).

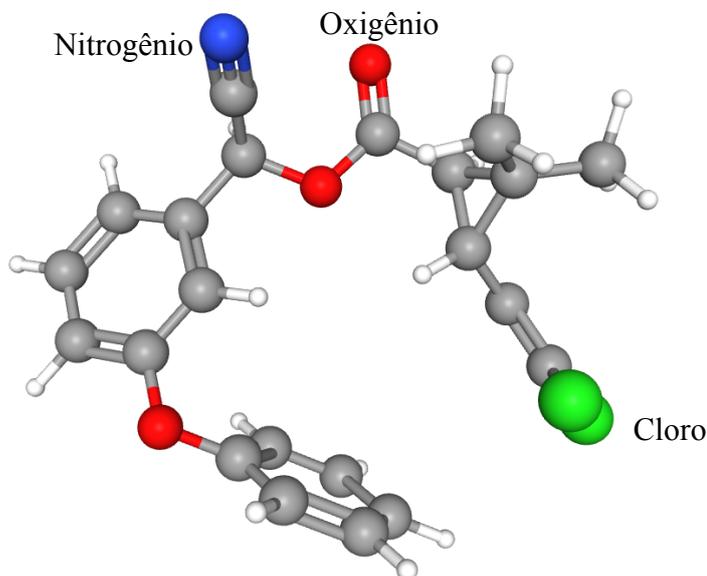
A classe toxicológica quanto ao potencial de periculosidade ambiental de um agrotóxico, terá que obedecer a seguinte graduação e cor Classe I – Produto Altamente Perigoso (vermelha), Classe II – Produto Muito Perigoso (amarela), Classe III (azul) – Produto Perigoso Classe IV (verde) – Produto Pouco Perigoso (IBAMA, 2016).

O grupo de inseticidas mais utilizados atualmente para o controle de vetores de doenças em climas tropicais são os piretróides (NEAL et al., 2010). São eles, acrinatrina (classe II), bifentrina (classe II), cipermetrina (classe II), aletrina (classe III), cialotrina (classe III), deltametrina (classe III), permetrina (classe III), de acordo com a Anvisa (2003).

3.2.7 Cipermetrina

A cipermetrina é um inseticida sintético do grupo químico Piretróide, utilizado na avicultura para o controle de ectoparasitas como moscas, besouros, pulgas e ácaros (SOARES et al. 2018a). Em grau técnico, é um cristal inodoro, altamente estável à luz, resistente a hidrólise ácida, baixa solubilidade em água, viscoso, de cor castanha amarelada, semi-sólido à temperatura ambiente e estrutura química derivada da piretrina (Figura 13). É um dos pesticidas piretróides recomendados pela Organização Mundial de Saúde (OMS, 1998), mesmo apresentando toxicidade aguda moderada para saúde pública. Utilizado em uso doméstico para o controle de insetos domésticos e na agricultura para o controle de pragas em frutas e hortaliças (HEBEISH, 2010).

Figura 13- Estrutura química da cipermetrina.



Fonte: PUBCHEM, 2021

3.5.1 Exposições aos agrotóxicos

A exposição aos piretróides acontece de forma direta e indireta. A maneira direta, ocorre durante a manipulação do produto (atomizador, pulverizador ou a lanço) em atividades ocupacionais e quando são utilizados de forma incorreta (sobredose). A forma indireta (dérmica, olhos, ingestão), é através da contaminação do meio ambiente e alimentos com resíduos dos compostos (SPINOSA, 2010). Alguns compostos do grupo dos piretróide têm sido encontrados na superfície de águas em escala mundial e até mesmo em águas pluviais (LAABS, 2002).

A ausência de equipamentos de proteção individual, diluições equivocadas e sobredosagem, tem como resultado, intoxicações de forma ocupacional e acidental em animais e seres humanos (ARAÚJO, 2007). O uso intensivo dos pesticidas piretróides sintéticos, conseqüentemente, expõem os trabalhadores rurais e ecossistema aos dos efeitos tóxicos do produto (POLAT et al., 2002; BASER et al., 2003; VIRAN et al., 2003; BORGES, 2005; PIMPÃO, 2006, EL-SAYED; SAAD, 2007; OSTI et al., 2007; VELISEK et al., 2007).

A cama de frango tem sido utilizada para acomodar as aves, proporcionando conforto. No entanto, fornece abrigo, esconderijo e alimentos para alguns insetos e ácaros, especialmente ectoparasitas, as principais pragas presentes no galinheiro, e a principal

razão para aplicações de pesticidas (SOARES et al.2019a). Os pesticidas e repelentes mais utilizados em todo o mundo para controlar a proliferação de artrópodes em camas e instalações de aves pertencem ao piretróide. Sua aplicação faz parte da rotina de vários avicultores desde o alojamento dos pintos até à fase final da produção avícola (SOARES, SCUSSEL, DAHLKE, 2021).

Atualmente, é necessário discutir a bioacumulação e a biotransformação de inseticidas em animais, uma vez que os resíduos são encontrados em vários tecidos e produtos de origem animal, incluindo ovos. Em níveis superiores ao recomendado, a cipermetrina apresentou concentrações 66 vezes mais elevadas do que os limites máximos de resíduos (LMR) em ovos frescos quando o pesticida comercial foi aplicado para controlar ectoparasitas. Resíduos de ingredientes ativos estavam presentes em um terço das amostras coletadas (PARENTE et al., 2017b).

Por outro lado, os baixos níveis de resíduos de pesticidas em ovos, declarados em alguns estudos, podem mascarar um risco para a saúde humana e animal, uma vez que os estudos mostram a bioacumulação de pesticidas piretróides lipofílicos em aves (ALONSO et al., 2012; DALLEGRAVE et al., 2018).

3.6 ESTRATÉGIAS DE CONTROLE DE ECTOPARASITAS E DESCONTAMINAÇÃO

Algumas estratégias químicas de descontaminação e higienização que podem deixar resíduos tóxicos, são aplicadas para controlar endo e ectoparasitas no ambiente avícola (CHRIST; SAVI; SCUSSEL, 2017; SAVI; PIACENTINI; SCUSSEL, 2014). Métodos químicos são envolvidos reações químicas ou processos químicos para a inativação ou eliminação de insetos e fungos, micotoxinas e agrotóxicos. Estes métodos são utilizados na indústria de alimentos por serem rápidos e com baixos custos. Sendo realizados por tratamento com atmosfera modificada (ozônio-O₃) ou por meio de produtos químicos (ácidos peracético) (CHRIST; SAVI; SCUSSEL, 2016; LEGGETT et al., 2016).

3.6.1 Ozônio

O ozônio (O₃) é formado quando as moléculas de oxigênio são divididas em átomos de oxigênio individuais, que se combinam com outros para formar o ozônio. O gás pode

ser produzido, principalmente, pelo processo de descarga elétrica (descarga corona), através do espaço do túnel entre 2 eletrodos exposto a uma alta diferença de potencial com cerca de 1000 v. O ozônio é gerado pela passagem do ar ou oxigênio puro entre ambos eletrodos. As moléculas de O₂, colidem-se, causando a dissociação do oxigênio, e em seguida formando moléculas triatômicas, dando origem ao ozônio (RUANGWONG et al., 2021; CHRIST; SAVI; SCUSSEL, 2017).

O gás tem sido empregado na medicina humana e veterinária para inativar bactérias, vírus, fungos, estimular o metabolismo do oxigênio e tratamento de lesões. Em saneamento básico remove agentes contaminantes encontrados em águas subterrâneas e superficiais (CHEN et al., 2012; DURIČIĆ; VALPOTIĆ; SAMARDŽIJA, 2015). Nas indústrias de beneficiamento de grãos é utilizado como ferramenta eficaz no controle de insetos como (*Tribolium confusum* e *Oryzaephilus surinamensis*), gêneros de fungos (*Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium*) suas toxinas e na degradação de resíduos de pesticidas (BEBER et al. 2015; HELENO et al. 2014; MASON et al. 1997; SAVI et al. 2014).

A degradação do O₃ se caracteriza por uma rápida redução da concentração inicial, continuada de uma segunda fase, em que a concentração de ozônio diminui como cinética de primeira ordem (ALMEIDA et al., 2004). O tempo de meia-vida pode variar de segundos a horas. Fatores como pH (O₃ aquoso) e temperatura (gasoso O₃), são responsáveis por sua estabilidade. A semi-vida do O₃ em condições atmosféricas são de aproximadamente 30 minutos. (MENNAD et al., 2010; KIM; YOUSEF, 2000).

O Holandês, Van Marum em 1783, observou que o ar, em torno de uma máquina eletrostática (durante aplicações de faíscas elétricas), adquiriu um odor forte e caracterizante (RIDEAL, 1920). Nos anos 80, os primeiros experimentos com a tecnologia do gás ozônio no Brasil, começaram em estações de tratamento de água no intuito de buscar formas alternativas para o tratamento, substituindo métodos convencionais. Manaus e São Paulo foram as primeiras cidades a realizarem testes de pré-ozonização em unidades de tratamento de água (DALSASSO et al., 1999).

Atualmente o ozônio é utilizado como agente oxidante e aplicados como descontaminante para eliminar organismos vivos (bactérias, fungos, leveduras, vírus, protozoários, insetos e ácaros) e /ou degradar compostos tóxicos (pesticidas, micotoxinas) em indústrias de alimentos (AFSAH-HEJRI; HAJEB; EHSANI, 2020; VARGA;

SZIGETI, 2016; XINYI; SUBRAMANYAM; LI, 2017; YÜCEER; ADAY; CANER, 2016).

3.6.2 Aplicações do Ozônio em diversas áreas

Neste contexto, o (O_3) que é considerado um gás *GRAS* (*generally recognized as safe - FDA*) e com semi-vida em condições atmosféricas de aproximadamente 30 min, pode certamente, ser utilizado no controle de insetos (FDA, 2001; SOARES et al., 2018c). Importante destacar a necessidade de estudos sobre a sua aplicação do O_3 em grandes instalações.

O gás ozônio tem sido empregado na medicina humana e veterinária para inativar bactérias, vírus, fungos, estimular o metabolismo do oxigênio e tratamento de lesões. Em saneamento básico remove agentes contaminantes encontrados em águas subterrâneas e superficiais (KHADRE; YOUSEF; KIM, 2001 ; CHEN et al. 2012).

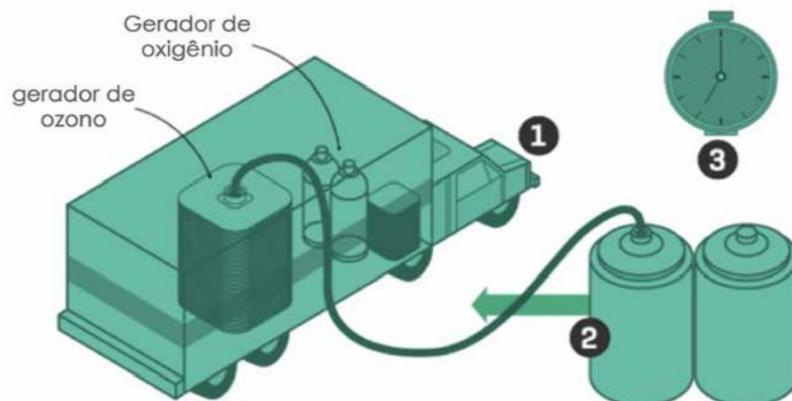
3.6.3 Ozônio x insetos

Pesquisadores como Mason, Woloshuk e Maier (1997), Kells, Mason, *et al.*, (2001) e McDonough, Campabadal, *et al.*, (2011) utilizaram altas concentrações de O_3 em curtos períodos para eliminar larvas e adultos de diversas espécies de besouros responsáveis por grandes prejuízos para a agricultura.

Outras espécies de *Alphitobius* como *A. laevigatus* (Fabricius), *A. stephens* e *A. piceus* (Oliver) também foram isoladas, no entanto, em grãos e farinhas armazenados (HAGSTRUM et al., 2013). Estes organismos vivos considerados pragas secundárias na armazenagem de grãos, são encontrados nas instalações da avícolas, onde encontram nutrientes (restos de ração e a cama de frango) para o seu desenvolvimento (SOARES et al., 2019b).

Diversos trabalhos de pesquisa relataram a aplicação O_3 para eliminar besouros *Tribolium castaneum*, *Sitophilus zeamais*, *Rhyzopertha dominica* e *Necrobia rufipes* e avaliar o comportamento destes insetos após o tratamento com o gás (HASAN et al., 2016; ROZADO et al., 2008). A Figura 14 mostra a aplicação do gás ozônio em silos de armazenagem de grãos. O procedimento inicia-se com o (1) caminhão com um gerador de ozônio acoplado, injetando do gás O_3 , (2) no interior dos silos (3) expostos ao gás por 24 horas (RAMIREZ, 2019).

Figura 14- Estrutura para aplicação do gás ozônio em silos de armazenagem de grãos.



Fonte: REVISTA GRÃOS BRASIL, 2019

Destacando que a avicultura brasileira está exposta a perdas quantitativas e qualitativas em sua produção, e , que a constante presença de besouros *A. diaperinus* e a contaminação por fungos é inerente. Investigar a eficiência e o mecanismo de ação de tratamentos utilizando o gás ozônio, incentiva a redução do uso de pesticidas aplicados muitas vezes de forma sistemática durante o desenvolvimento das aves nas granjas. E neste contexto, aumenta a qualidade e segurança, tanto dos alimentos para consumo quanto a saúde dos trabalhadores avícolas (SOARES et al., 2018).

3.6.4 Susceptibilidade ao O₃

A presença de besouros na cama de frango, significa problemas de saúde no frango, alterações de desempenho e sérias perdas financeiras (HUBERT et al., 2018; MULLENS; MURILLO, 2018). Seu controle depende principalmente das aplicações de pesticidas do grupo piretróide (MARANGI et al, 2012). Contudo, as larvas são mais susceptíveis ao uso do gás (SOARES et al. 2019b).

HOLMSTRUP et al. (2011) relataram testes de laboratório que expuseram adultos e larvas de *Tribolium castaneum* com 40 ppm por 6 h, o suficiente para eliminar 25%, dos insetos e a exposição foi necessária por 24 horas para atingir 100% de mortalidade.

O uso do O₃ para erradicar as pragas em armazéns de grãos sem deixar resíduos químicos, foi avaliada por Ramírez (2018), utilizando um sistema para produzir gás

ozônio “*in situ*”. Este sistema, gera o ozônio, e pode ser transportado e acoplado ao silo por um período de 11 horas, com um custo de 20% a menos que a utilização de agentes químicos tradicionais (RAMIREZ, 2019).

3.6.5 Ozônio x Ovos

A desinfecção da superfície da casca do ovo é uma ferramenta importante para prevenir a deterioração do ovo e doenças relacionadas ao consumo de ovos. Os microrganismos penetram no interior do ovo através do canal do poro e por microfissuras na casca, alterando a qualidade do ovo (FUHRMANN et al., 2010; SOARES et al., 2020). Um sistema de higienização eficaz, compromete tratar os ovos assim que são coletados no ninho e antes que os microrganismos possam penetrar na casca (CLÍMACO et al., 2018; FUHRMANN et al., 2010; MATTIOLI et al., 2020).

Métodos utilizando O₃, não influenciaram os parâmetros físico-químicos de qualidade interna dos ovos como: perda de peso dos ovos, índice de gema e unidade Haugh. No entanto, a temperatura de armazenamento dos ovos é um parâmetro determinante para a manutenção dessas variáveis (FILHO, 2019).

Um estudo preliminar para avaliar a ação do ozônio sobre a casca de ovo e fungos filamentosos, mostrou o efeito do O₃ sobre a cutícula da casca do ovo e a ação deletéria sobre estruturas dos fungos filamentosos. As micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura, mostraram que as cascas de ovos expostas ao O₃ por 120 min, danificou as hifas dos fungos que aderiram à cutícula, sem comprometer seriamente a estrutura externa da casca do ovo. Mais estudos são necessários para estabelecer um tratamento ideal com ozônio para a descontaminação fúngica e sua ação sobre a casca de ovos de galinha (SOARES et al. 2021).

3.6.6 Ácido peracético

O ácido peracético (APA) é o peróxido de ácido acético (AA) com um forte poder de oxidação. Seu potencial de oxidação e desinfetante é maior que o do cloro. O APA está disponível comercialmente em forma de soluções de equilíbrio quaternário contendo AA, peróxido de hidrogênio (PH), APA e água (GEHAN et al., 2009; WEAVER, 2002).

O APA é utilizado amplamente como desinfetante e esterilizante em indústrias de processamento de alimentos, bebidas, farmacêutica e médica. A poderosa ação antimicrobiana do APA em baixas concentrações, aumentou sua aplicação em processamento de alimentos, incluindo fábricas de processamento de carne (BLOCK, 1991; DYCHDALA, 1988).

A lavagem dos ovos pode ter deteriorar a cutícula da casca, resultando em menor proteção e maior suscetibilidade à contaminação (LIU et al., 2016). No entanto, a seleção genética de galinhas de postura com intuito de aumentar a deposição de cutícula na casca de ovos, pode reduzir a transmissão de microrganismos e previne comprimentos de onda potencialmente prejudiciais ao embrião quando submetidos à luz ultra violeta (BAIN et al., 2013; LILIANA D'ALBA; et al., 2017).

3.6.7 Ácido peracético x ovos

Como antifúngico, o ácido peracético é um sanitizante eficaz, podendo reduzir entre 2 e 4 logs de gêneros fúngicos como *Penicillium* e *Aspergillus* sp (BERNARDI et al., 2019a). O tempo recomendado para consumir os ovos é cerca de duas semanas ou refrigerado por 2 meses, após este período, os ovos reduzem seus parâmetros de qualidade (FEDDERN et al., 2017).

Ovos armazenados por 40 dias em condições ambientais e úmidas, apresentaram contaminação interna por fungos (coloração escura na membrana externa da casca), além da identificação de duas espécies de fungos *Cladosporium macrocarpum* e *Botrytis cinérea* (CUMERAS et al., 2016).

O APA pode interromper o desenvolvimento fúngico e impedir que as hifas se ramifiquem pela superfície da casca do ovo. De acordo com LIU et al., (2016) a temperatura de armazenamento influencia criticamente a qualidade do ovo, e , a lavagem dos ovos, reduzem cobertura da cutícula, comprometendo ainda mais sua qualidade.

A microscopia eletrônica nos permite avaliar com precisão, a ação sanitizante do APA na casca do ovo e em alguns gêneros de fungos testados. No entanto, há alguns entraves que devem ser levados em consideração, pois a idade avançada das galinhas resultada em muitos poros e microfissuras, o que corrobora para a busca de novas pesquisas sobre a ação do ácido peracético em diferentes estágios de postura (SOARES et al., 2021a).

4 CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS DO BESOURO (*Alphitobius diaperinus*) EM CRIAÇÃO DE AVES - UM VETOR DE FUNGOS TOXIGÊNICOS FILAMENTOSOS: POR MICROSCOPIA ESTEREOSCÓPICA E DE ELETRÔNICA DE VARREDURA

Informações contidas neste capítulo estão publicadas no artigo:

SOARES, Carlos Eduardo; WEBER, André; SCUSSEL, Vildes Maria. Stereo and Scanning Electron Microscopy characteristics of poultry breeding beetle (*Alphitobius diaperinus*)-a filamentous toxigenic fungi carrier. **Emirates Journal of Food & Agriculture (EJFA)**, v. 30, n. 2, 2018.

RESUMO

O isolamento de besouros *Alphitobius diaperinus* (vivos e mortos) capturados no interior do aviário (cama de frango) para investigar a distribuição de esporos de fungos e suas características de locais de acúmulo (dorsal e ventral) por diferentes microscopias (estéreo e eletrônica de varredura) corroborou para produzir diversos artigos sobre o assunto. Apesar de os besouros vivos serem descritos como os principais portadores de esporos de fungos, os mortos, tinham muito mais esporos aderidos ao exoesqueleto, tornando-o um foco de infecção. Isso deve-se aos sítios anatômicos, que favoreciam o efeito de captura de esporos, juntamente com o diferente teor de umidade dos besouros. As estruturas anatômicas microscópicas ventrais do besouro abrigavam a maior concentração de esporos de fungos e formação de colônias. Os fungos filamentosos mais detectados foram dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*. Concluindo que, os besouros mortos devem ser removidos do aviário para reduzir a contaminação. Eles servem como rico substratos para o desenvolvimento de fungos, com possibilidade de formação de toxinas, além da exposição a doenças nas galinhas.

Palavras-chave: *Aspergillus*, cama de frango, fungos, vetores, contaminação

ABSTRACT

The isolation of beetles *Alphitobius diaperinus* (live and dead) inside the aviary to investigate the distribution of fungal spores and their characteristics of sites of accumulation (dorsal and ventral) by different microscopes (stereo and scanning electronic) corroborated to produce several articles on the subject. Although living beetles were described as the main carriers of fungal spores, the dead, had many more spores attached to the exoskeleton, making it a focus of infection. This was due to the anatomical sites that favored the spore capture effect, along with the different moisture content of the beetles. The ventral microscopic anatomical structures of the beetle housed the highest concentration of fungal spores and colony formation. The filamentous fungi most detected were of the genera *Aspergillus* and *Penicillium*. In conclusion, dead beetles must be removed from the aviary to reduce contamination. They represent rich substrates for the development of fungi with the possibility of toxin formation, in addition to exposure to chicken diseases.

Keywords: *Aspergillus*, chicken bed, fungus, vectors, contamination

4.1 INTRODUÇÃO

Diferentes gêneros e espécies de artrópodes infestam o galpão avícola durante o desenvolvimento das aves e podem distribuir esporos de fungos toxigênicos em todas as instalações do aviário (SOARES et al., 2019). Transportam esporos de fungos mecanicamente em seus corpos, aumentando significativamente a taxa de infecções (POPOWSKA-NOWAK; TUMIALIS; PEZOWICZ, 2017). As condições de temperatura e umidade dos aviários produzem condições ideais para a infestação de insetos, contaminações fúngicas, incluindo outros organismos vivos (ácaros, bactérias e vírus), afetando a saúde das aves (SOARES et al., 2017; 2019c).

O *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera, Tenebrionidae), comumente chamado de cascudinho, é responsável por grandes perdas na avicultura (SKOV et al., 2004). Além dos fungos, bactérias como *Campylobacter jejuni* e *Salmonella* sp, também são responsáveis por contaminar aviários, aves adultas e pintinhos (HAZELEGER et al., 2018). Quando há escassez de alimentos durante a criação, os pintainhos / adultas começam a comer esses insetos (organismos vivos contaminados) podendo levar ao desenvolvimento de doenças. Isso também resulta em diminuição da conversão alimentar das aves, diarreia, estresse e redução do peso corporal (ZAHOOR-UL-HASSAN et al., 2010).

O constante movimento de insetos dentro de um ecossistema, contribui para dispersão de esporos dos gêneros *Fusarium* (fungos de campo) e *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor* e *Rhizopus* (fungos de armazenagem) (VIEGAS et al., 2012). Esses esporos podem ser transportados por adesão na superfície cerosa do exoesqueleto do inseto (NOH et al., 2016; LAWRENCE; BRITTON, 2019). Com relação ao efeito da presença de fungos no ambiente de criação de aves, eles podem levar ao desenvolvimento de doenças como em pintainhos (aspergilose) e embriões (suscetibilidade a efeitos fúngicos durante a contaminação no momento da posutra) incluindo inalação de esporos (micose pulmonar) (GIRGIS; SMITH, 2010a; M. YEGANI, T. K. SMITH, S. LEESON, 2008).

Considerando as atividades de criação extensiva de frango, problemas com infestação de insetos, o número consecutivo de ciclos de criação de frangos e o desenvolvimento de infecções fúngicas que reduzem as condições sanitárias do ambiente, conseqüentemente, haverá alteração na qualidade da carne.

Uma investigação por microscopias estereoscópicas (ME) e eletrônica de varredura (MEV) foi realizada no coleóptero *A. diaperinus* (estágios adulto e larval) para investigar os principais sítios anatômicos capazes de abrigar e disseminar esporos fúngicos. Este é o primeiro trabalho investigando características anatômicas detalhadas do *A. diaperinus* e locais de acúmulo de fungos relatados por ME e MEV.

4.2. MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Material

(a) Amostras: Insetos (*A. diaperinus*), extraídos da cama de aviário (no 45º dia de criação das frangos, sem aplicação de inseticida), vivos e mortos (estágios: adultos e larvas). (b) Equipamentos: pinças, Prolab (São Paulo, SP, Brasil); sistema de peneira, 9-16 mesh (2,00-1,00 mm / pm apert., 10-18 USM / ASTM) Baffer (Caieiras, SP, Brasil); aw meter, modelo Aqua-Lab4TE, Decagon (São José dos Campos, SP, Brasil); forno de secagem, Olidef-cz (Ribeirão Preto, SP, Brasil); estereomicroscópio (ME), modelo Opzt (x180), acoplado a uma câmera de captura de imagens coloridas, modelo OPT14 MP, Opticam (Doral, Flórida, EUA); microscópio eletrônico de varredura (MEV) (x5000), modelo JSM- 6390LV, Jeol (Peabody, Mass., EUA) e máquina de revestimento de ouro, modelo EM-Scd500, Leica (Leider, Ill., EUA). Outros materiais: stubs (pequenos blocos de metal, 9 de diâmetro e 10 mm de altura).

4.2.2 Métodos

(a) Cama de aviário e coleta de insetos: Antes do procedimento de isolamento do inseto, uma amostra de cama de aviário infestada (conteúdo de umidade: 40,6%, atividade de água: 0,98) foi coletada como segue (a.1) cama de aviário - uma porção (100 g) foi obtida do chão do galpão (10 cm de profundidade) após 45 dias do estágio de crescimento completo dos frangos, conforme relatado por Soares et al. (2018) e procedeu ao (a.2) isolamento de insetos - amostras de besouro separadas (ambos os estágios de crescimento: adulta e larval) foram coletadas (vivas e mortas) da cama de aviário como em (a.1), por meio de peneiramento (9 -16 mesh), escolhendo-os com uma pinça para a preparação da análise de microscopia. · Morto pela aplicação de uma solução de inseticida (cipermetrina) em acetoneitrila.

(b) Preparação de insetos para microscopia: Os insetos (ambos os estágios de crescimento) foram preparados para ME e MEV, como segue (b.1) ME – microscopia estereoscópica - (isolado vivo e morto) e as diferentes partes dos insetos (dorsal e ventral) foram separados em placas de petri (e assim as larvas e retiradas diretamente para observação de ME;

para (b.2) MEV - as amostras de (b.1) foram preparadas por montagem em *stubs* e suas superfícies revestidas de ouro, conforme relatado por Scussel et al. (2014a). Resumidamente, os insetos foram fixados nos *stubs* (contendo fita dupla-face de carbono) e, em seguida, revestimento de ouro, aplicado a vácuo e revestido com uma camada de ouro de 40 nm). (c) observação microscópica: amostras inteiras e de partes de insetos preparadas em (b) foram coletadas para observação microscópica, (c.1) ME - foram retiradas diretamente (de b.1) para identificação de características de cabeça, tórax, abdômen, pernas e, as partes anatômicas especiais que abrigam conídios de fungos e / ou colônias em crescimento; para (c.2) MEV - os *stubs* com as partes dos insetos, foram levados para a MEV para investigar a presença / distribuição / proliferação / identificação de gêneros (micélios, hifas, conídios) dos fungos nas partes dos insetos. Também foram investigados os principais locais onde os conídios estão aderidos ao corpo do inseto (25 a x 1.100).

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As características microscópicas do *A. diaperinus* por (ME & MEV) foram observadas e identificadas com relação às partes anatômicas que abrigam esporos de fungos em alta concentração (MARTINS; ALVES; MAMPRIM, 2016). A distribuição de esporos de fungos, seja em besouros capturados vivos ou encontrados mortos na cama de frango, foram registrados, incluindo suas diferenças. As Fig. 15 e 16 apresentam as características dos besouros (estágios adulto e larval) e as partes principais que mais acumulam conídios fúngicos (tanto na região dorsal quanto na ventral).

4.3.1 Características microscópicas de *Alphitobius diaperinus*.

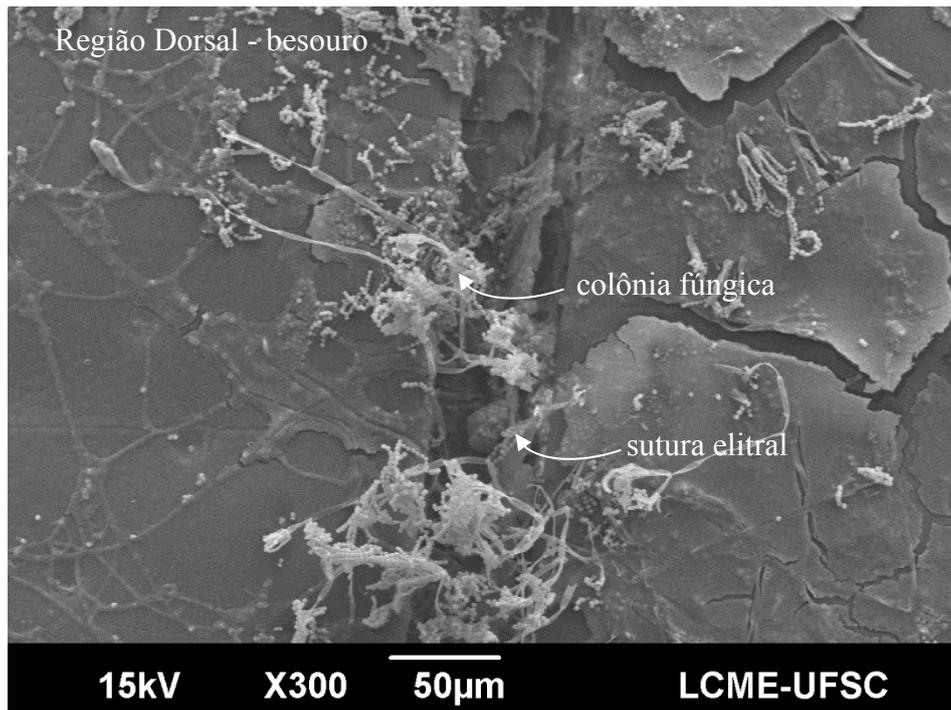
Para compreender o transporte de esporos de fungos pelo inseto *A. diaperinus* no ambiente de criação de aves e seus efeitos sobre a segurança das aves, foi necessário inicialmente, identificar suas características micro-morfológicas (estágios adulto e larval) (POVALUK, 2017). As principais características dos besouros observadas por ME e MEV (ambos os estágios) em diferentes partes do corpo (cabeça / tórax / abdômen) são mostradas no artigo completo.

4.3.2 *Alphitobius diaperinus*: Acúmulo de esporos de fungos e proliferação de colônias nos sítios anatômicos.

Com ambas as técnicas de microscopia utilizadas, foi possível identificar claramente os sítios anatômicos do besouro e os sítios especiais em que os fungos se alojavam, principalmente

por MEV. Alguns locais fornecem condições para permitir a ocorrência de infecção por fungos (alta umidade e rico substrato) (BUTT et al., 1992). Todos eles, tanto a larva quanto o besouro adulto, contribuem para a transferência de esporos em todo o ambiente avícola, mostrados nas Figura 15 e 16.

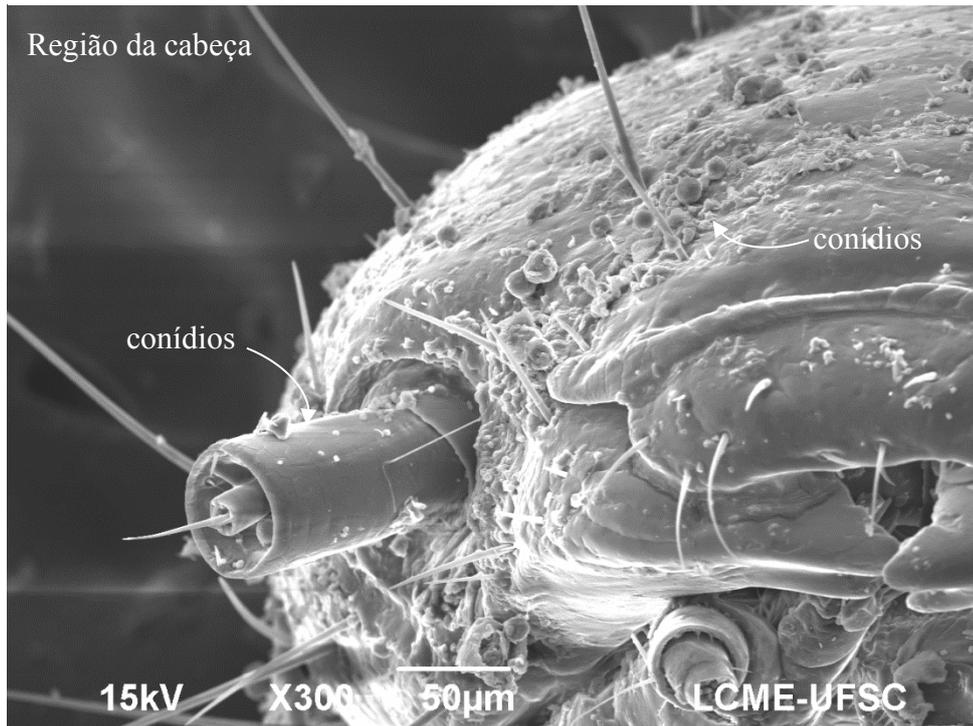
Figura 15- Colônias fúngicas em sítios anatômicos (sutura elitral) do *A. diaperinus* adulto isolados na cama de frango [300x].



Fonte: Autor, 2021

MEV: Os besouros foram investigados quanto ao acúmulo de fungos em seus sítios anatômicos e sua distribuição detalhada com precisão. É importante enfatizar, que no estágio larval (mortas) os sítios de acúmulo de fungos foram, nas estruturas da cabeça, partes bucais e antena (Figura 16).

Figura 16- Conídios aderidos à cabeça da larva do *A. diaperinus* isoladas da cama de frango [300x].



Fonte: Autor

4.3.3 Proliferação de *A. diaperinus* em instalações de criação de aves *versus* saúde das aves e produção segura da carne.

A presença de esporos e proliferação de fungos detectados no *A. diaperinus* no presente estudo e sua evidente dispersão pelos aviários, pode-se concluir que também disseminam doenças e afetam o bem-estar dos frangos durante o seu crescimento, interferindo na produção de carne e qualidade de carcaça (tamanho padrão) (JAPP; BICHO; SILVA, 2010).

Há registros que besouros *A. diaperinus* foram ingeridos por frangos e foram detectados em pró-ventrículos e moelas de aves post-mortem. Isso gera certa preocupação, visto que aquele besouro é portador de microrganismos vivos patogênicos, aumentando assim a sobrevivência dos fungos em seus corpos e ambiente, conseqüentemente transmissão e reprodução (DA SILVA et al., 2001; MOSER et al., 2010).

Com relação à segurança do frango, além de interferir no seu bem-estar (pela ingestão de insetos e/ou desconforto pelo contato), doenças como aspergilose em pintainhos, inalação de esporos (micose pulmonar) e alta suscetibilidade dos embriões a infecções, é necessário de

aplicar procedimentos de controle e prevenção seguros e que não deixem resíduos tóxicos (LAMBKIN et al., 2007).

4.4 CONCLUSÃO

Os principais sítios anatômicos de *A. diaperinus* que mais concentram conídios de fungos em besouros vivos foram: os ventritos abdominais e as pernas. Nos besouros mortos, os principais locais foram: a sutura elitral, aparelho bucal, pernas e prosterno. O que aumenta a disseminação da contaminação pelo desenvolvimento das colônias. Quanto às larvas, estas apresentavam conídios aderidos por todo o corpo, sendo a principal contaminação, a cabeça.

Os gêneros fúngicos mais isolados foram: *Aspergillus* e *Penicillium*. No que diz respeito ao bem-estar das aves, a presença de besouros na cama do aviário e a ingestão destes insetos, está associada a infecções fúngicas em pintainhos e animais adultos, essa ingestão pode ser mais intensa se o fornecimento de ração for reduzido ou interrompido.

5 MICRO E MACROFAUNA ISOLADAS DA CAMA DE FRANGO SEM TRATAMENTO COM PESTICIDAS: POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

Informações contidas neste capítulo estão publicadas no artigo:

SOARES, C. E. S. et al. Scanning electron microscopy of macrofauna isolated from poultry litter: No pesticide treated. **Scanning Electron Microscopy**, v. 9, n. 9, 2019.

SOARES, C. E. et al. Living Organisms and Biodegradation Changes of Poultry Litter During Breeding and Their Relation to Chicken Health and Poultry Products Safety. **International Journal of Engineering and Technical Research**, v. 9, n. 11, 2019.

RESUMO

As normas técnicas seguidas por empresas avícolas utilizam pesticidas do Grupo Piretróides para controlar insetos e ectoparasitas em ambiente aviário. O seguinte trabalho, apresenta uma investigação através de microscopia eletrônica de varredura na identificação macrofauna que se desenvolve no interior do aviário. Embora esses organismos vivos não sejam prejudiciais às aves, alguns atuam como vetores esporos de fungos e suas carcaças mortas como substrato para o crescimento de colônias de fungos. Quanto aos fungos, foram isolados na cama os seguintes gêneros, *Trichoderma* sp. *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium*. No entanto, o fungo do gênero *Trichoderma* sp estava presente em todas amostras coletadas e com maior número de carga total fúngica. Os Besouros isolados eram do gênero *Alphitobius* e *Carcinops*. Os gêneros *Liposcelis* eram numerosos e ácaros (*Trichouropoda* sp. e *Acarus* sp.) eram mais numerosos que o restante dos artrópodes isolados. Alguns desses insetos (parte da cadeia trófica atual), são considerados predadores de outras larvas de insetos. O uso de inseticidas antes e durante o ciclo de criação das aves reduz os insetos não prejudiciais e altera o equilíbrio da microflora, levando à resistência e à proliferação de organismos vivos.

Palavras-chave: Ácaros, Aves domésticas, Insetos, Microscopia, Piretróides

ABSTRACT

The technical standards followed by poultry companies, use pesticides from the Pyrethroid Group to control insects and ectoparasites in an avian environment. The following work presents an investigation through scanning electron microscopy in the macrofauna identification that develops inside the aviary. Although these living organisms are not harmful to birds, some act as fungal spore vectors and their dead carcasses as substrates for the growth of fungal colonies. As for fungi, the following genera, *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Fusarium*, and *Penicillium*, were isolated in poultry litter. However, the fungus of the genus *Trichoderma* sp was present in all samples collected and with greater total fungal load. The isolated beetles were of the genus *Alphitobius* and *Carcinops*. The psycoid genera of *Liposcelis* were numerous, along with the mites (*Trichouropoda* sp. and *Acarus* sp.). Some of these insects (part of the current trophic chain) are considered predators of other insect larvae. The use of insecticides before and during the poultry rearing reduces non-injurious insects and change the balance of microflora, leading to the resistance and proliferation of living organisms.

Keywords: Insects, Mites, Microscopy, Poultry, Pyrethroids

5.1 INTRODUÇÃO

Durante o ciclo de 45 dias, a cama de frango recebe resíduos de matéria orgânica como ração (que caem durante o momento de ingestão) e seus excrementos. Os principais organismos que compõem a macrofauna da cama de frango pertencem ao filo *Arthropoda*. Além disso, os fungos filamentosos podem crescer durante os 45 dias após as aves serem alojadas (SOARES et al., 2019b). Alguns artrópodes, como besouros e ácaros, infestam o ambiente avícola, causando perdas econômicas (HORN et al., 2018). A estratégia utilizada atualmente para o controle destas pragas é realizada principalmente pela aplicação de inseticidas do Grupo Piretróide, nas instalações e animais (REZENDE et al., 2013; KATSUDA, 2012).

A diversidade de artrópodes presentes na cama de frango é ampla, sendo principalmente ambiente ideal para besouros e ácaros. A infestação dessas espécies se desenvolve principalmente no local onde possui alimento e a temperatura, e os aviários fornecem condições favoráveis para que isso aconteça (CHERNAKI-LEFFER et al., 2002; MARANGI et al., 2012b).

A presença de ácaros pode causar alergias, tanto nas aves quanto no avicultor. Vários deles, apesar de seu estágio de crescimento (adultos, larvas, pupas e ovos) podem vir da fábrica de ração, especialmente quando não há controle de qualidade crítico sobre a matéria-prima que chega à produção de ração (FUKUTOMI et al., 2012; HUBERT et al., 2018).

Considerando que a atividade avícola está exposta à infestação de organismos vivos e inseticidas do Grupo Piretróide utilizados para controlar o problema de infestação - este trabalho relata uma investigação sobre a identificação de alguns gêneros de insetos e ácaros isolados da cama de frango (sem inseticidas tratados) por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV) incluindo seus principais sítios anatômicos que hospedam conídios fúngicos.

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

5.2.1 Material

(a) Amostra: cama de frango (2 kg) feita de fragmentos de madeira de *Pinus*, utilizada durante o final estágio de criação (no dia 45). Nenhum pesticida tratado. (b) Local de experimento: galpão de aves - capacidade para 15.000 aves (dimensões: área total de 1200 m² e forro de polipropileno).

(c) Equipamentos: sacos plásticos de polietileno, pinças, Prolab (São Paulo, SP, Brasil); sistema de peneira, 9-16 malha (2,00-1,00 mm / μ m apert., 10-18 USM / ASTM) Baffer (Caieiras, SP, Brasil); microscópio eletrônico de varredura (5000x), modelo JSM- 6390LV,

Jeol (Peabody, Mass., EUA) e máquina de revestimento de ouro, modelo EM-SCD 500, Leica (Leider, IL, EUA). Outros materiais: stubs (pequenos blocos de metal), 9 mm de diâmetro e 10 mm de altura.

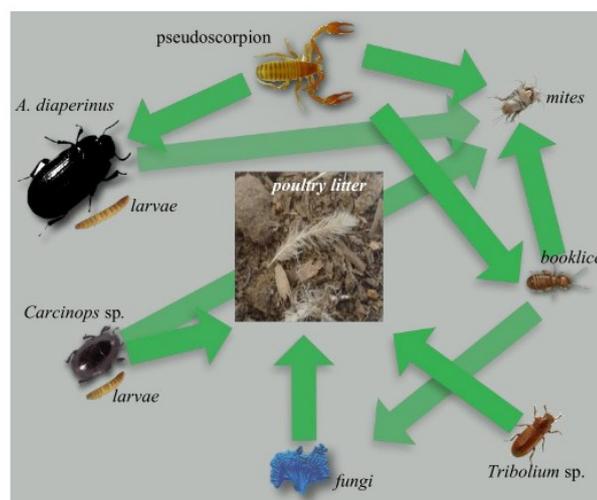
5.2.2 Métodos

(a) Isolamento da macrofauna - os organismos vivos (insetos e ácaros) foram separados (inteiros / vivos / mortos / fragmentos - incluindo larvas e pupas) por peneiramento (2-1 mm) e utilizando pinças de cada porção de 50 g de cama de frango por (Soares et al., 2018) e (b) Identificação por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e artigos por (BAJERLEIN E BŁOSZYK, 2004; BŁOSZYK; KLIMCZAK; LEŚNIEWSKA, 2006) - suas características foram identificadas por MEV com diferentes ampliações após a montagem dos stubs (SOARES; WEBER; SCUSSEL, 2018).

5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os organismos vivos isolados na cama de frango, entre insetos e ácaros, confirmaram a presença de predadores e presa, e que larvas e ovos também são frequentemente predados. A aplicação de pesticidas para controle de pragas, altera o equilíbrio da cadeia trófica dentro do ambiente da cama de frango. A Figura 17 apresenta a diversidade da macrofauna da cama de frango com diferentes insetos (besouros, traças e pseudoescorpiões) e características dos ácaros e suas principais partes anatômicas.

Figura 17 - Macro e microfauna isolada da cama de frango e sua relação na cadeia trófica.



Fonte: SOARES et al., 2019

5.3.1 Besouros e ácaros e suas relações com fungos filamentosos

Besouros podem carregar esporos e outras estruturas reprodutivas de fungos, que muitas vezes contaminam produtos mal armazenados. Algumas espécies de besouros se alimentam desses fungos, muitas vezes os besouros mortos tornam-se substrato para o desenvolvimento de estruturas fúngicas.

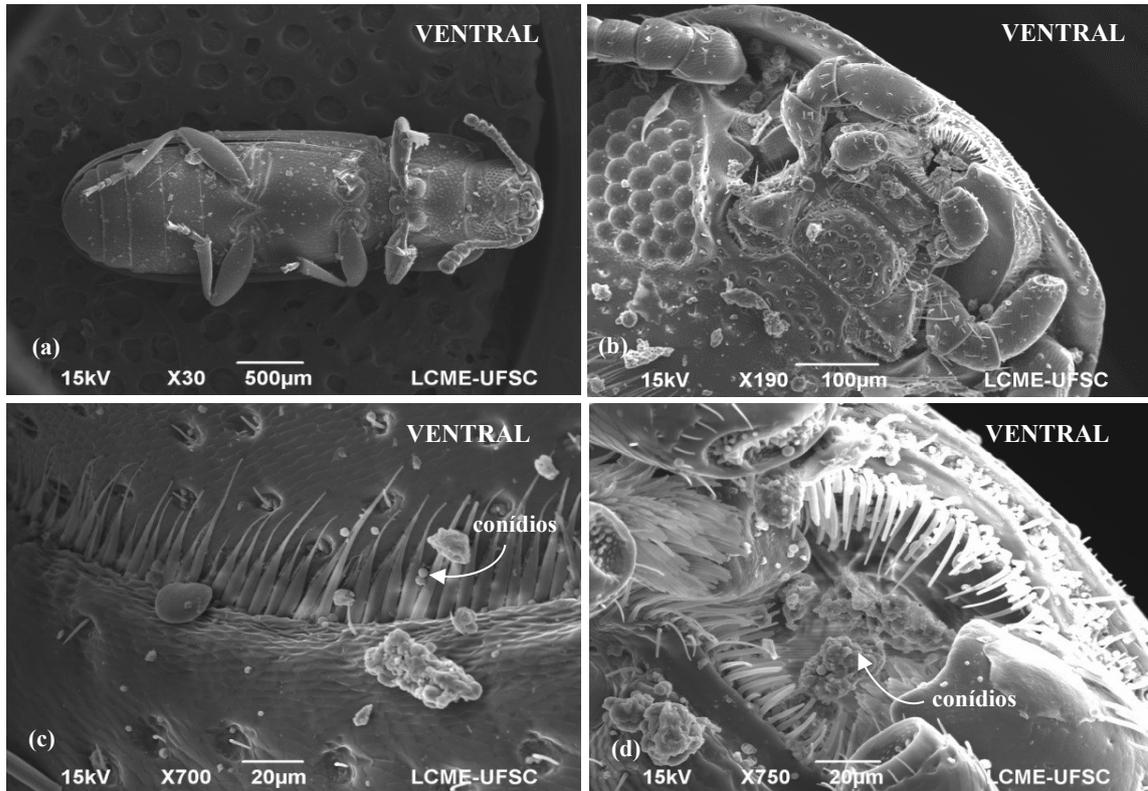
5.3.1.1 *Tribolium* sp

Algumas espécies de besouros apresentam pilosidade nas bordas do esterno e inúmeros espinhos na região da cabeça e do corpo. A Figura 18 ilustra as estruturas morfológicas de besouros do gênero *Tribolium* e também a presença de esporos de fungos aderidos ao seu exoesqueleto (SOARES; WEBER; SCUSSEL, 2018). A presença de fungos do gênero *Metarhizium* nos corpos de *A. diaperinus*, foi relatada por ALVES et al.,(2004) coletados do solo do aviário.

A presença desta espécie que infesta também grãos armazenados, pode transportar esporos e micélios de fungos aderidos ao seu corpo, especialmente os fungos produtores de aflatoxina *Aspergillus* (GIANIZELLA; ÂNGELO; PRADO, 1998). Eles são vetores de fungos, carregando esporos anexados aos seus exoesqueleto em vida. Quando mortos, podem servir de substrato para o desenvolvimento de estruturas fúngicas reprodutivas.

Para o controle de insetos indesejáveis em atividades avícolas como *A. diaperinus*, são utilizados pesticidas do Grupo Piretróide, principalmente, a cipermetrina. No entanto, estudos têm mostrado sua resistência crescente a esse grupo de compostos ativos (HICKMANN et al., 2018).

Figura 18- Micrografias de partes anatômicas de *Tribolium* sp. (a.1) VENTRAL - corpo inteiro, (b) cabeça com suas partes bucais e (c) prosterno com pelos e (d) detalhes das partes da boca [30 a x 1.400].



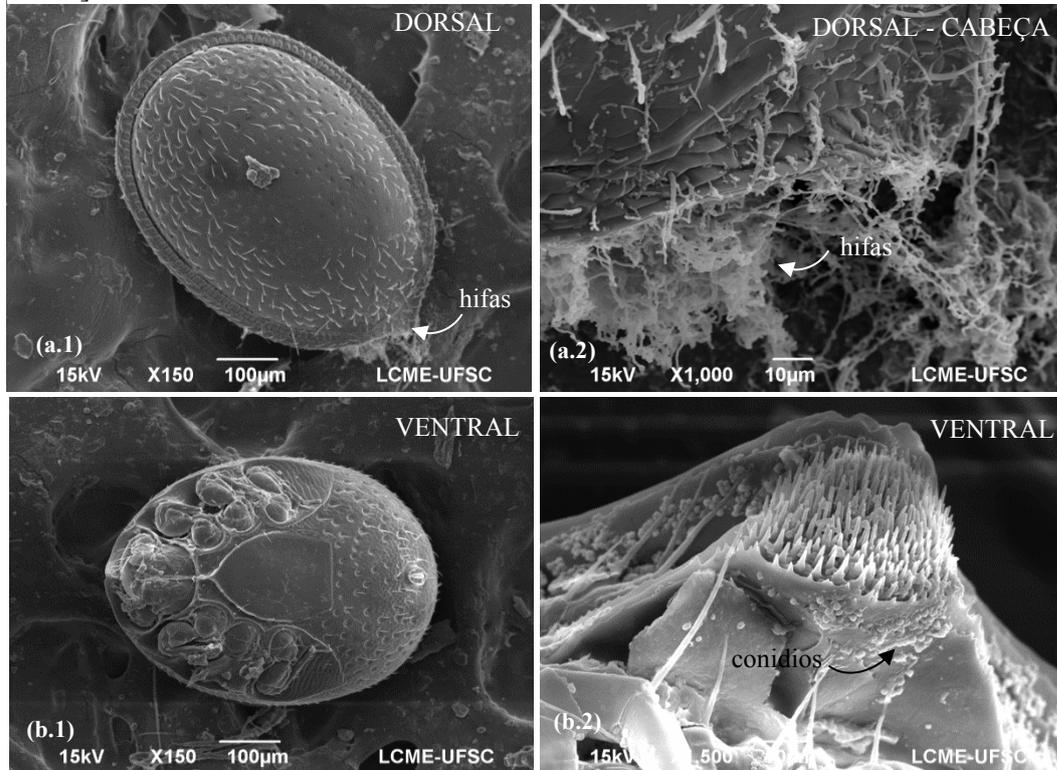
Fonte: SOARES et al. 2019

Alguns gêneros de ácaros estão relacionados principalmente à contaminação dos grãos armazenados, ninhos de aves, entretanto, sua interação com fungos é pouco conhecida (GREEN; BAKER, 1996; HUBERT; STEJSKAL; KUBÁTOVÁ, 2003). Esses artrópodes microscópios possuem muitos espinhos em vários locais anatômicos, tanto na região dorsal quanto na ventral. Alguns desses locais são ideais para adesão de esporos e desenvolvimento de fungos, especialmente quando estão mortos. A maioria das espécies de ácaros não são importantes para a saúde pública (HUBERT et al., 2018).

5.3.1.2 *Trichouropoda* sp.

Ácaros dos gêneros *Trichouropoda* sp. isolados da cama de frango, são responsáveis por alta infestação na cama de frango. Sua carapaça é dominada por micélios de fungos, principalmente no aparelho bucal (Figura 19). Alguns estudos relatam a presença desse gênero sendo transportado por besouros, sem qualquer tipo de parasitismo (FARAHANI et al., 2016). Esses ácaros são de cor vermelha e se desenvolvem intensamente na cama de frango.

Figura 19 - Micrografias eletrônicas de varredura de ácaros isolados de cama dorsal de aves - (a.1/b.2) sem fungos no idiossoma dorsal, (a.2) apenas na região da cabeça e cobertos por micélios - (b.2) esporos presos ao aparelho bucal [150 a x 1.500].



Fonte: SOARES et al., 2019

Quando não há aplicação de agrotóxicos, as infestações ocorrem na medida em que a temperatura e a umidade da cama de frango proporcionam ambiente ideal para a proliferação. Porém, algumas espécies estão associadas a ninhos de pássaros e podem ser encontradas em outros micro-habitats (BEHAN-PELLETIER;HOY, 2016; SKVARLA et al., 2019). São predadores e purificadores, entretanto, há relatos de que se alimentam de fungos (ČEJKA; HOLUŠA, 2013).

5.3.2 Bem-estar do frango, saúde e segurança dos produtos

Como insetos e ácaros são portadores de microrganismos (fungos, bactérias, vírus), sua presença e proliferação pode levar ao desenvolvimento de doenças, tais como alergias, lesões, micose, síndrome das toxinas (efeitos tóxicos) tanto nas aves quanto aos avicultores (DELABOUGLISE et al., 2020). Com relação à contaminação por fungos na cama de frango,

foram descritos alguns gêneros saprófitos e toxigênicos como, *Aspergillus*, *Alternaria* e *Penicillium* (VIEGAS et al., 2012).

5.4 CONCLUSÃO

As atividades avícolas que utilizam pesticidas, eliminam diversos gêneros e espécies de insetos e ácaros que fazem parte da cadeia trófica local. Alguns deles são vetores de doenças para aves e humanos. O uso incorreto de agrotóxicos leva à eliminação dos competidores mais suscetíveis, selecionando os mais resistente.

Com relação aos insetos identificados (*Carcinops*, *Tribolium*, *Liposcelis* e pseudoescorpiões) e ácaros (*Acarus*, *Trichouropoda*), existem poucos relatos sobre eles infestando ambientes avícolas. Isso provavelmente ocorreu devido ao tipo de material de celulose (madeira de *Pinus*) e / ou condições do ambiente de criação de aves.

A biodegradação da cama de frango promove ambiente ideal para o desenvolvimento de insetos, ácaros e de fungos filamentosos como: *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium* sp. Esses organismos vivos, incluindo fungos de deterioração, no ambiente das aves, sob alta umidade e temperatura, podem ser motivo de preocupação devido à possibilidade de produção de micotoxinas (afetando animais e possivelmente a carne).

**6 USO DE GÁS OZÔNIO COMO ALTERNATIVA VERDE NO CONTROLE À
INFESTAÇÃO POR BESOUROS *Alphitobius diaperinus* EM AVIÁRIOS
UTILIZADOS NA INDÚSTRIA AVÍCOLA**

Informações contidas neste capítulo estão publicadas no artigo:

SOARES, C. E. et al. Use of ozone gas as a green control alternative to beetles *Alphitobius diaperinus* (panzer) infestation in aviary bed utilized in the poultry industry. **Chemical Engineering Transactions**, v. 64, p. 589-594, 2018.

RESUMO

Na avicultura de frango de corte, o controle de besouros de *Alphitobius diaperinus* baseia-se exclusivamente na aplicação de inseticidas do Grupo Piretróide (cipermetrina). Alguns estudos relatam a resistência da população de besouros, reforçando a necessidade de métodos alternativos para o controle de besouros. O objetivo deste estudo foi determinar a eficácia do tratamento com gás O₃ para eliminar o desenvolvimento de besouros *A. diaperinus*, tanto em estágios adultos quanto em larvas. Os insetos foram tratados com três concentrações de O₃ (30/40/60ppm) e tempos de exposição (48, 36 e 24 h). Todos os tratamentos foram eficazes contra a fase larval. No entanto, o tratamento mais eficiente (100%) para a eliminação de besouros adultos foi de 40 ppm, durante 36 h de exposição.

Palavras-chave: *Alphitobius diaperinus*, avicultura, ozônio, Piretróides.

ABSTRACT

In broiler poultry, the control of *Alphitobius diaperinus* beetles is based exclusively on the application of insecticides of the Pyrethroid Group (cypermethrin). Some studies report the resistance of the beetle population, reinforcing the need for alternative methods for beetle control. The aim of this study was to determine the efficacy of O₃ gas treatment to eliminate the development of *A. diaperinus* beetles, both in adult and larval stages. The insects were treated with three concentrations of O₃ (30/40/60ppm) and exposure times (48, 36 and 24 h). All treatments were effective against the larval phase. However, the most efficient treatment (100%) for the elimination of adult beetles was 40 ppm, during 36 hours of exposure.

Keywords: *Alphitobius diaperinus*, ozone, poultry, Pesticide, Pyrethroid.

6.1 INTRODUÇÃO

A infestação de insetos na cama de frango, como o *Alphitobius diaperinus* que é considerado a principal praga aviária em todo o mundo, chamado popularmente de “cascudinho” é responsável por grandes perdas na avicultura. Eles se concentram principalmente perto dos bebedores/ alimentadores e dentro do galpão nas estruturas de madeira estruturas (SKOV et al., 2004).

Sua presença em fase larval é facilmente detectada em instalações e solo do aviário, e pode chegar a 80 cm de profundidade para se alojar, mesmo com o solo compactado (CHERNAKI; ALMEIDA, 2001). Além de insetos, fungos (*Aspergillus*, *Penicillium*) e bactérias (*Campylobacter*, *Salmonella*), entre outros organismos vivos, têm sido relatados como capazes de contaminar aviários e frangos/galinhas (HAZELEGER et al., 2018; SINGH et al., 2010). Quando há escassez de alimentos durante o crescimento do frango, eles podem ingerir estes insetos (outros organismos vivos contaminados - fungos, bactérias) levando ao desenvolvimento de doenças. Além desse hábito que altera a conversão da ração, as aves estão sujeitas a diarreia, estresse e redução do peso corporal (BANJO; LAWAL; ADEDUJI, 2005; SKOV et al., 2004).

A presença de besouros significa problemas de saúde do frango, alterações de desempenho e perdas financeiras graves (CHERNAKI-LEFFER et al., 2013; OVIEDO-RONDÓN, 2008). E seu controle depende principalmente das aplicações de pesticidas do Grupo Piretróides (MARANGI et al., 2012b).

A aplicação de Piretróides para o controle de besouros *A. diaperinus* em ambiente avícola expõe os trabalhadores. Ocorre diretamente (durante o manuseio - atomizador, spray ou lanço) em atividades ocupacionais por uso incorreto (sobredosagem) e indiretamente (por contato - dérmico, olhos, ingestão e/ou por inalação) ou contaminação de alimentos (resíduos) (SARTOR; SANTARÉM, 2017).

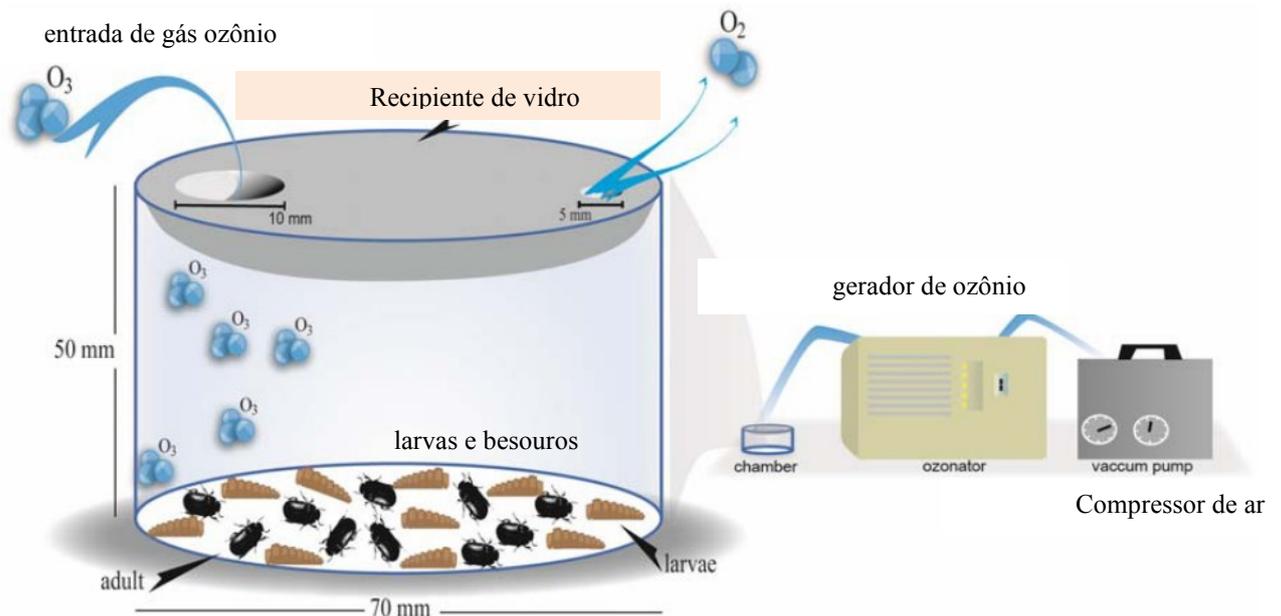
Como o controle de pragas na avicultura atualmente, depende da utilização de pesticidas tóxicos, há uma falta de informações sobre a aplicação de métodos limpos que não deixam resíduos na cama de frango. Portanto, o presente estudo objetivou investigar a eficácia dos tratamentos com gases O₃ para eliminar os besouros *A. diaperinus* tanto no estágio larval quanto adulto.

6.2 MATERIAL E MÉTODOS

6.2.1 Material

(a) Amostra: insetos (n=280) da espécie *A. diaperinus* (estágios adultos e larval: 0,7 e 10,0 mm de comprimento médio, respectivamente) extraídos do aviário no 46º dia de criação dos frangos (sem aplicação de inseticida). (b) Equipamentos: pinças, Prolab (São Paulo, SP, Brasil); sistema de peneira, 9-16 mesh (2,00- 1,00 mm/ μ m apert., 10-18 USM/ASTM), Baffer (Caieiras, SP, Brasil); bomba de vácuo, TE-58, Tecnal (São Paulo, SP, Brasil); gerador de gás O₃, OP-35-5L, Interzone (Jundiaí, SP, Brasil), termo-higrometro, J-SP, Brasil Prolab (São José dos Pinhais, PR, Brasil). As câmaras O₃ (50 e 70 mm para comprimento e diâmetro, respectivamente) foram feitas de vidro com duas aberturas: uma para a entrada de gás O₃ (tubo de 10 mm/tubo de 0,3 polegadas) e outra para a saída O₂ (uma pequena saída - 5 mm) (Figura 20).

Figura 20- Esquema utilizado para o experimento com o O₃ sobre a inativação de besouros adultos e larvas.



Fonte: SOARES et al., 2018

6.2.2 Métodos

(a) Coleta e preparação da amostra: (a.1) coleta - amostras de besouros (larvas e estádios adultos) foram colhidas da cama de frango, representativamente a partir do chão do aviário (camada de 10 cm de profundidade) após a transferência das aves (45 dias). Pontos de coleta: 4 pontos (n = 20 / cada ponto) da área total do galpão - o inseto foi mantido na cama de frango com resíduos de ração e enviado ao laboratório em temperatura ambiente (25°C); (a.2) preparação - grupos de insetos (n=10) foram carregados nas câmaras de vidro em condições constantes (23° C e 77% de umidade relativa -UR) e mantidos para a aplicação de gás O₃. (b) Aplicação de ozônio: após os besouros (ambos os estágios) serem carregados na câmara, o gás O₃ gerado foi bombeado (através da entrada) para os vasos por um compressor (equipado com um filtro para evitar a entrada de umidade), a uma taxa de fluxo contínuo (3 L min⁻¹). Foram preparados três grupos para os diferentes tratamentos de concentração de gás (30, 40 e 60 ppm: TI, TII, TIII), em duplicata. Um grupo de besouros (ambos os estágios) foi alojado em câmara idêntica para estimar sua mortalidade natural (Grupo Controle). Confirmação de mortalidade de insetos gasosos O₃ - confirmação de morte de insetos por concentração de gás O₃ e exposição foram registradas. Para confirmar a sua morte, os insetos foram transferidos para placas de Petri contendo cama de frango, durante 5 horas.

6.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Como estratégia de inativação limpa para o controle da proliferação de besouros do gênero *Alphitobius*, o efeito do gás O₃ apresentou variações. As condições de concentração e tempo de exposição aplicadas, definiram a eficácia para as fases de desenvolvimento do besouro. A Tabela 2 apresenta os dados obtidos pós tratamento dos besouros adultos e das larvas.

Tabela 2- Porcentagem de mortalidade de insetos *Alphitobius diaperinus* (estágios larval e adultos) após a aplicação de gás ozônio em diferentes concentrações e tempos de exposição.

Adultos e Larvas ^a	Tratamento com gás ozônio		Insetos mortos
	Concentração (ppm)	Tempo de exposição (h)	Número ^b (média ^c %)
Larvas	30	24	20 (100)
	40	36	20 (100)
	60	48	20 (100)
	30	48	20 (100)
	40	24	20 (100)
	60	36	20 (100)
Adultos	30	48	20 (100)
	40	36	20 (100)
	60	24	16 (80)
	30	36	4 (20)
	40	24	8 (40)
	60	48	20 (100)
	30	24	0 (0)
	40	48	20 (100)
	60	36	20 (100)

^a*A. diaperinus* ^btotal de insetos: 10 ^cn=2

6.3.1 Efeito do gás O₃ em tratamentos com *A. diaperinus* (adultos e larvas)

Larvas - as larvas foram mais suscetíveis ao gás, quando comparada aos besouros adultos, pois sua morte foi registrada a partir da menor concentração e tempo aplicado (30 ppm/24 h). Durante todo o tratamento, as larvas iniciaram a ecdise para a continuidade ao seu desenvolvimento. Assim, os tratamentos de O₃ aos quais as larvas foram submetidas, mostraram-se eficazes na sua eliminação (100%), nas condições de temperatura e UR aplicadas no presente estudo (23,2°C e 77,5%).

Altas concentrações em períodos curtos (1800 ppm / 30 min) foram capazes de eliminar uma média de 74,8% das larvas de espécies de *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae) (MCDONOUGH et al., 2011). Corroborando com o presente trabalho

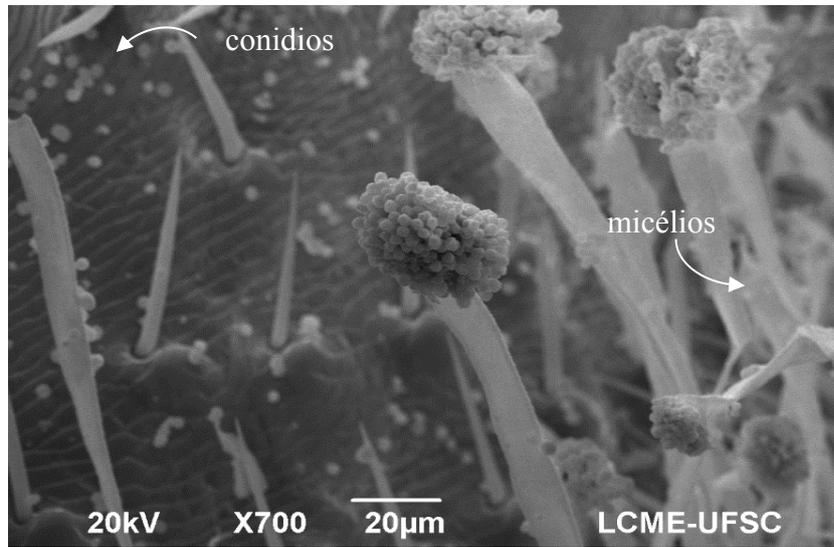
(mostrando as larvas altas sensibilidade quando exposto O₃), ao expor as larvas por mais tempo (60 e 90 min), os autores relataram resultados de 92 e 100%, respectivamente. Testes laboratoriais expondo adultos e larvas de *Tribolium castaneum* com 40 ppm para 6 h foi suficiente para eliminar 25%, e exposição foi necessária para 24 h para atingir 100% de mortalidade (HOLMSTRUP et al., 2011).

6.3.2 Comportamento dos insetos ao gás O₃ / dormência

Importante enfatizar que alguns insetos, incluindo besouros, aproveitam seus processos fisiológicos de dormência quando expostos a condições adversas (ou seja, falta de O₂, incluindo o O₃ nos experimento atual) e seu rápido reestabelecimento quando as adversidades são de curta duração (BEGON; TOWNSEND; HARPER, 2006). Segundo Sousa et. al. (2012), as menores taxas de respiração podem potencialmente levar a uma redução da absorção de O₃. Apesar disso, as larvas apresentaram atividade imóvel. Os insetos vivos e mortos (larvas e adultos) foram removidos das câmaras O₃ e contados 5 h após os bioensaios.

Sousa et al. (2008) observaram que o O₃ reduz a atividade de caminhada do *Sitophilus zeamais* ao reduzir as chances de insetos escaparem da exposição à fumigação nos estágios iniciais. O *A. diaperinus* atua como um vetor de fungos toxigênicos em granjas de aves, e esta redução na movimentação no interior da granja, seria favorável ao tratamento com o gás. Utilizando microscopia eletrônica de varredura é possível observar a presença de estruturas reprodutivas de fungos toxigênicos (*Aspergillus*) aderidos ao exoesqueleto de besouros (Figura 21). O uso de gás ozônio corrobora tanto o controle de besouros quanto o controle de hifas fúngicas (CHRIST; SAVI; SCUSSEL, 2016).

Figura 21- Micrografia do *Alphitobius diaperinus* (região ventral - perna) isolado de cama de frango e Fungos do gênero (*Aspergillus* sp) e suas estruturas reprodutivas [700X].



Fonte: SOARES et al., 2018

6.4 CONCLUSÃO

O efeito do gás O_3 sobre a proliferação de besouros *A. diaperinus* nos estágios estudados (adultos e larval) mostrou-se eficaz e deve ser mais estudado e aplicado como uma estratégia limpa de inativação e de forma antagônica a aplicação de pesticidas na cama de frango.

Nesse contexto, a aplicação de gás O_3 *in situ* sobre a cama de frango pode mostrar-se mais eficiente. Assim, haverá redução no uso de pesticidas para o controle do *A. diaperinus*, principalmente a cipermetrina. Esta estratégia de monitorização produz alimentos sem risco de resíduos e contribui para o bem estar das aves e dos avicultores.

7 ATIVIDADE DE FUNGOS FILAMENTOSOS PRESENTES CASCA OVOS DE GALINHA (*Gallus gallus domesticus*) E SUA AÇÃO SOBRE A CASCA DOS OVOS: POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

Informações contidas neste capítulo estão publicadas no artigo:

SOARES, C. E. MAIORKA, A. DAHLKE, F. SCUSSEL, V. Fungi Activity on Chicken (*Gallus gallus domesticus*) Eggshell and Their Pores Invasion by Scanning Electron Microscopy. **International Journal of Engineering Research and Applications**, v. 10, n. 6, p. 19–27, 2020

RESUMO

A presença de fungos em ninhos em galinhas criadas no sistema *free-range* é esperada, pois seu substrato, fonte de alimento, e condições de temperatura e umidade, tornam o ambiente ideal para o desenvolvimento fúngico. A idade das galinhas aumenta o número de poros na casca e as más condições de armazenamento dos ovos, podem influenciar na qualidade e segurança alimentar dos ovos. Este estudo relatou a contaminação natural por fungos dos gêneros *Fusarium* e *Curvularia* e o comportamento de crescimento e atividade através do canal do poro da casca do ovo investigado através da microscopia eletrônica de varredura (MEV). Sendo registradas ambas as superfícies (externa /interna) e ao longo dos poros (camadas cruzando - cutícula/ camada de cristal vertical / paliçada / mamilar / exterior / camada interna) comprimento (após 7 dias de incubação, a 23,5 ° C e 82% de umidade relativa ambiente). Como esperado, a contaminação natural e o armazenamento inadequado fornecem condições para que as hifas de fungos atravessem pelos poros da casca do ovo e alcancem a membrana externa da casca (dentro da casca). A MEV mostrou com detalhes a presença de fungos e suas estruturas reprodutivas no exterior e interior do ovo. Os gêneros de fungos identificados neste estudo encontraram locais ideais para desenvolver suas estruturas germinativas e contaminar a região interna, o que possivelmente afeta a qualidade dos ovos.

Palavras-chave: Casca do ovo, Contaminação, Ovo , Fungos, *Fusarium*

ABSTRACT

The presence of fungi in nests in free-range chickens is expected, as its substrate, food source, and temperature and humidity conditions make it the ideal environment for fungal development. The age of the hens increases the number of pores in the shell and the poor storage conditions, can influence the quality and food safety of the eggs. This study reported the natural contamination by fungi of the genera (*Fusarium/ Curvularia*) and the growth and activity behavior through the pore canal of the eggshell investigated through scanning electron microscopy (SEM). Being recorded both surfaces (external/internal) and along the pores (crossing layers - cuticle/vertical crystal layer / palisade / mammillary / outer / inner layer) length (after 7 days of incubation, at 23.5°C and 82% relative ambient humidity). As expected, natural contamination and inadequate storage provide conditions for fungal hyphae to pass through the pores of the eggshell and reach the outer membrane of the shell (inside the shell). The SEM showed the presence of fungi and their reproductive structures. The fungal genera identified in this study found ideal sites to develop their reproductive structures and contaminate the internal region, which affects egg quality.

Keywords: Contamination, Egg, Eggshell, Fungi, *Fusarium*

7.1 INTRODUÇÃO

O cenário avícola apresenta uma capacidade de produzir alimentos de alta qualidade e permite que a população acesse a proteína animal a um custo acessível, e, esta cadeia de produção, desempenha um papel econômico impostíssimo em diversos países (NYS; BAIN; VAN IMMERSEEL, 2011; SCANES, 2007) .

Com relação aos ovos, vários países produzem bilhões deles e milhares de galinhas poedeiras por ano. Junto a este grande volume de produção, há alguma preocupação com a segurança alimentar quando se trata de contaminação por fungos filamentosos (*Fusarium*, *Aspergillus*, *Penicillium* sp), devido à sua possível capacidade de produção de micotoxinas. Essas toxinas podem afetar diferentes órgãos e também, o sistema nervoso central, embrionário, causar problemas renais e hepáticos tanto nas aves como em seres humanos (ABPA, 2021; UEP, 2021; ZAHOOR-UL-HASSAN et al., 2010; ZAIN, 2011).

Como esperado, após a postura (exposição ao meio ambiente), os ovos podem ser contaminados por diferentes fontes, incluindo solo, poeira e materiais de nidificação mal higienizados (GOODENOUGH; STALLWOOD, 2012). Diversos compostos sanitizantes são testados para reduzir a contaminação microbiana, especialmente na água de lavagem. Por outro lado, muitas vezes esses higienizadores são ineficazes no controle de fungos de casca de ovo (KNAPE et al., 1999).

Esporos de fungos outros contaminantes podem aderir-se na superfície e atingir (através de poros) a parte comestível (clara de ovo e gema) e podem levar a riscos para a saúde humana e animal (SULEIMAN; SULEIMAN, 2018). Neste contexto, o trabalho teve como objetivo avaliar o comportamento de fungos filamentosos por contaminação natural de ovos de galinha (*Gallus Gallus domesticus*) e atividade de invasão de casca através dos poros utilizando técnicas de microscopia eletrônica de varredura (MEV) para observação

7.2 MATERIAL E MÉTODOS

7.2.1 Material

Amostras: ovos de galinha (*Gallus gallus*) - coletados dois dias após a postura, em ninhos de madeira forrados com palha, em um criatório onde as aves (Fazenda Experimental Ressacada-UFSC) com mais de dois anos de idade, são criadas livres, com água *ad libitum* e dieta controlada, formulada com milho e farelo de soja e pastagem.

Equipamentos: micropipeta de 1ml, Kasvi, (Curitiba, PR, Brasil) pinça e alça de inoculação de platina, Prolab, (São Paulo, SP, Brasil); incubadora bacteriológica, Sterilifer Sx1,3 Dtmc (São Paulo, SP, Brasil); Microscópio eletrônico (MEV) (5000x), modelo JSM- 6390LV, Jeol (Peabody, Mass., USA), máquina de revestimento de ouro modelo EM- SCD 500, Leica (Leider, IL, USA). Outros: stubs de aço com 9mm de diâmetro e 0 mm de altura.

7.2.2 Métodos

Incubação dos ovos: Resumidamente, 12 ovos foram incubados em estufa microbiológica por 7 dias a 23-24°C . As amostras foram observadas diariamente através da porta de vidro para monitorar o desenvolvimento natural dos fungos.

Preparação para microscopia (MEV): Resumidamente, diferentes fragmentos (5-10 mm) de cascas de ovo (onde cresceram a colônia de fungos). Em seguida, esses fragmentos foram imediatamente preparados para observação em MEV (superfícies e cortes transversais) após serem fixados em stubs (contendo fita dupla-face de carbono) foram revestidos com ouro (com uma camada de ouro a 40 nm sob vácuo).

7.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As colônias de fungos desenvolvem-se sobre a superfície casca do ovo, e, após o rompimento da casca, podemos observar a coloração escura na membrana interna da casca (região interna do ovo), possivelmente causada pelos fungos. Porém, quando analisado em MEV, não foi possível observar com qualidade visual hifas ou outras estruturas vegetativas dos fungos na membrana interna da casca.

A rede de fibras entrelaçadas na membrana do ovo assemelha-se a hifas fúngicas filamentosas, o que implica em mais estudos para avaliar o comportamento das hifas dentro do ovo. Provavelmente, trata-se de uma proteção contra ataques microbianos pelo sistema de defesa química presente nas membranas da casca e do albúmen (STADELMAN, WILLIAM J.; COTTERILL, 2013).

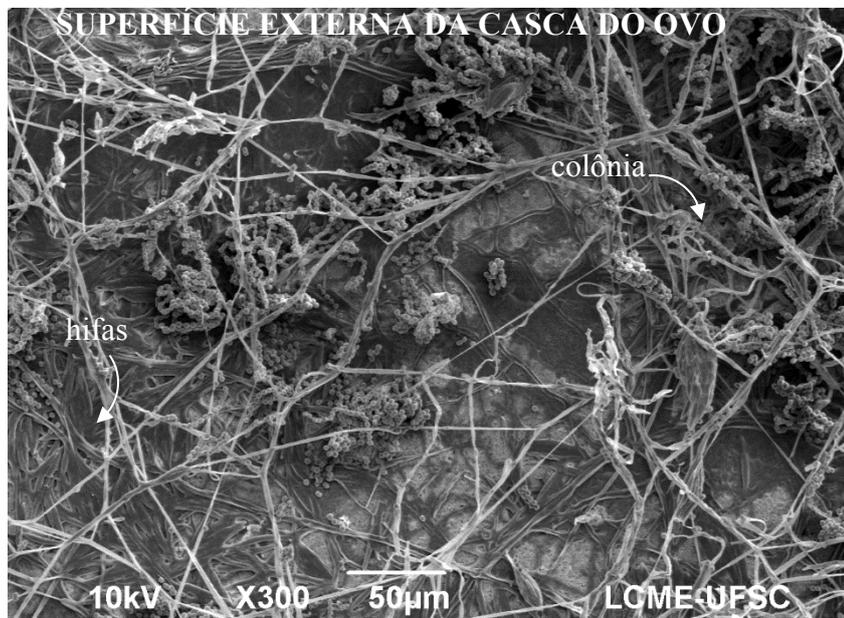
7.3.1 Crescimento de fungos na casca de ovo - superfície externa e interna

A partir das observações obtidos na casca do ovo da galinha, foi possível analisar o comportamento de crescimento dos fungos através da casca do ovo (tanto em superfícies quanto

nos poros) por meio da aplicação de técnicas de microscopia (MEV). As figuras apresentadas na pesquisa, mostram micrografias de superfícies de casca de ovo (interna e externa) e poros infectados por suas hifas / micélios e estruturas reprodutivas.

Diferentes gêneros de fungos foram capazes de crescer na casca do ovo (Figura 22). Alguns com intenso desenvolvimento e propagação devido as condições de temperatura e umidade e casca do ovo (DOS SANTOS et al., 2009). Na literatura, fungos dos gêneros: *Penicillium*, *Alternaria*, *Mucor*, *Rhizopus* sp. foram relatados por Szablewski e Tomczyk com casca de ovo fresco comercial. Os autores sugeriram que a contaminação veio das condições de armazenamento em que os ovos foram expostos (SZABLEWSKI; L. TOMCZYK, 2015).

Figura 22- Micrografia da superfície externa da casca do ovo: com diferentes gêneros, colônias e estruturas reprodutivas de fungos [300x].



Fonte: AUTOR, 2020

A contaminação fúngica ocorre frequentemente no ninho, devido ao substrato inserido para acomodar ovos e galinhas (CUMERAS et al., 2016). O tipo de ninho está frequentemente relacionado ao crescimento fúngico dos ovos, os ovos de nidificação em caixas, apresentam menos contaminação fúngica quando comparado com ovos de ninhos abertos (GODARD et al., 2007).

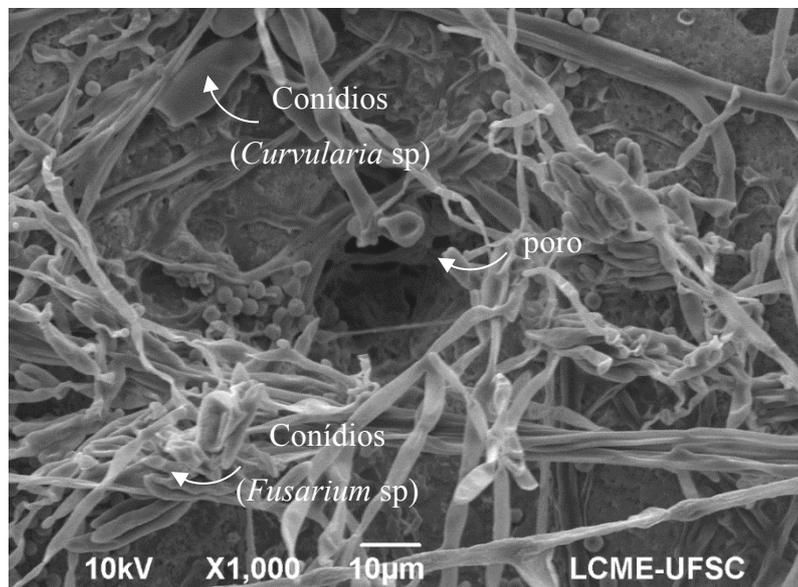
A presença do fungo filamentososo *Fusarium* sobre a superfície casca do ovo é relevante, pois aumenta a preocupação com a possível formação de seus metabólitos nos ovos, tanto na região externa quanto interna do ovo. Estudos sugerem que pode haver bioacumulação de micotoxinas de *Fusarium beauvericina* e *enniaticinas* na gema de ovo (JESTOI et al., 2009).

Os fungos atravessaram a casca e encontraram as condições ideais (conteúdo de umidade: 35-95% e temperatura: 8-25°C) para produzir toxinas. Essas condições podem promover o desenvolvimento de fungos na casca do ovo e comprometer a qualidade (TOMCZYK et al., 2018).

O armazenamento de ovos por 40 dias em condições ambientais e úmidas, apresentaram contaminação interna por fungos (coloração escura na membrana externa da casca), além da identificação de duas espécies de fungos *Cladosporium macrocarpum* e *Botrytis cinéreal* (CUMERAS et al., 2016).

A Figura 23 mostra o desenvolvimento da colônia, disseminação e movimentação de fungos filamentosos do gênero *Fusarium* e *Curvularia* sp., onde encontram os poros e alojam-se. A colônia fúngica inicia a invasão dos poros e o grande número de conídios que dificultam a identificação dos gêneros. E grande quantidade de hifas de dentro dos poros, indicando um local ideal para o desenvolvimento do fungo. Podemos observar também a presença de conídios, hifas, com o crescimento de suas extremidades (broto), o que provoca um aumento do diâmetro dos poros quando comparado ao poro adjacente.

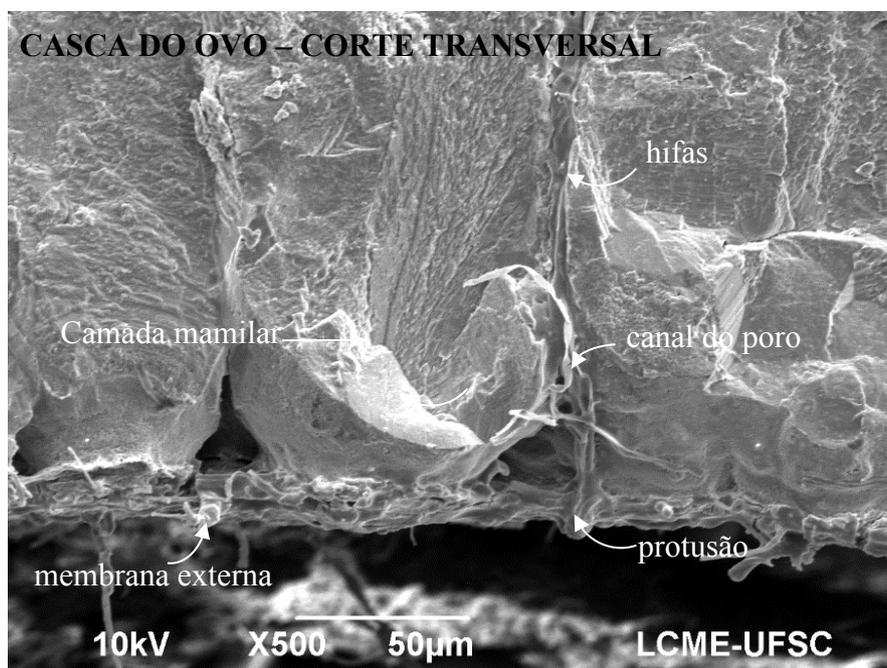
Figura 23- Presença de fungos filamentosos e a formação de colônias na superfície na cutícula e poros de cascas de ovo [1000x].



Estudos destacam a importância de fungos endofíticos como *Curvularia* sp como fonte de metabólitos secundários bioativos e sua ação antimicrobiana (AVINASH et al., 2015; KAANICHE et al., 2019). O *Fusarium* pode produzir micotoxinas e contaminar ovos de mesa e de incubação para a produção de pintinhos.

Geralmente, os alimentos que são altamente contaminados com micotoxinas (zearalenona, tricotecenos, fumonisinas e desoxinivalenol) expõem um sério risco à saúde humana e animal (ASAM; HABLER; RYCHLIK, 2017; MAGAN; OLSEN, 2004). Na Figura 3, é possível observar o camadas da casca do ovo onde os fungos atingem a membrana interna da casca, iniciando uma protrusão, que possivelmente desencadeou o mecanismo de defesa natural do ovo, presente na membrana interna da casca (MINE; OBERLE; KASSAIFY, 2003).

Figura 24- Micrografia da presença de fungos filamentosos, sua invasão através do canal do poro e a formação de uma protusão na membrana externa do interior da casca [500x].



Fonte: SOARES et al., 2020

CONCLUSÃO

Foi possível registrar e ilustrar a invasão fúngica com as hifas atravessando o canal do poro da casca do ovo e atingir a membrana interna da casca. Outra característica da invasão, é o aumento do diâmetro dos poros, o que facilita ainda mais a contaminação interna do ovo dependendo do período de exposição aos fungos.

Fungos dos gêneros *Fusarium* e *Curvularia* encontraram condições ambientais ideais para seu desenvolvimento. Circunstâncias de armazenamento impróprio de ovos que favorecem o crescimento de fungos toxigênicos de campo podem levar à contaminação do conteúdo interno dos ovos e comprometer sua qualidade e segurança.

8 ÁCIDO PERACÉTICO: EFEITO NA CUTÍCULA DA CASCA DO OVO DA GALINHA E AÇÃO DESCONTAMINANTE SOBRE OS FUNGOS FILAMENTOSOS

Informações contidas neste capítulo estão publicadas no artigo:

SOARES, C. E. et al. Peracetic acid : Effect on the Chicken Eggshell Cuticle and Decontaminating Action on Filamentous Fungi. **Jokull Journal**, v. 71, n. 4, p. 82–96, 2021.

RESUMO

A prática de descontaminação em ovos é extremamente importante, pois pode haver contaminação por uma ampla gama de microrganismos. Em sistemas de criação ao ar livre pode haver a contaminação os ovos. Além disso, as aves estão expostas aos microrganismos patogênicos, e a diferentes tipos de fungos, tanto de campo como de armazenagem. Os principais disseminadores de fungos são o substrato utilizado nos ninhos, especialmente quando é utilizado forragens ou resíduos de culturas (palha ou maravalha). Sanitizantes químicos utilizados na produção avícola têm em sua formulação, ácido peracético (APA) em várias concentrações, o que pode eliminar microrganismos patogênicos resistentes a outros tipos de desinfetantes. Portanto, este trabalho avaliou o uso de soluções de APA, com quatro concentrações diferentes, aplicadas nos ovos, na estrutura da casca de ovo e no controle da proliferação de fungos. O uso de solução de APA em 75, 150 ppm de concentração reduziu o desenvolvimento de esporos de fungos e hifas, com um ligeiro comprometimento da estrutura da cutícula externa. Por outro lado, a concentração de APA 300 ppm, pode induzir a microfragmentação em algumas regiões da membrana e comprometer a qualidade do ovo. Provavelmente a mistura de ácido acético produzido, pode interagir com os compostos de casca de ovo e causar as micro-fragmentações observadas nas micrografias.

Palavras-chave: Descontaminação, *Free-range*, Fungos, Ovo, Segurança alimentar.

ABSTRACT

The practice of decontamination in eggs is extremely important, as there may be contamination by a wide range of microorganisms. In outdoor farming systems there may be contamination of the eggs. In addition, birds are exposed to pathogenic microorganisms, and to different types of fungi, both field and storage. The main fungal disseminators are the substrate used in nests, especially when fodder or crop residues (straw or shavings) are used. Chemical sanitizers used in poultry production have in their formulation peracetic acid (PAA) in various concentrations, which can eliminate pathogenic microorganisms resistant to other types of disinfectants. Therefore, this work evaluated the use of APA solutions, with four different concentrations, applied in eggs, in eggshell structure and in the control of fungal proliferation. The use of PAA solution in 75, 150 ppm concentration reduced the development of fungal and hyphal spores, with a slight impairment of the outer cuticle structure. On the other hand, the concentration of APA 300 ppm, can induce microfragmentation in some regions of the membrane and compromise the quality of the egg. Probably the mixture of acetic acid produced, can interact with the shell compounds and cause the microfragmentations observed in micrographs.

Keywords: Decontamination, Egg, Food safety, Free-range, Fungi.

8.1 INTRODUÇÃO

O ácido peracético (APA) tem sido usado como um descontaminante em vários segmentos da produção animal para muitas espécies de microrganismos patogênicos. Um peróxido orgânico, um líquido incolor com odor característico semelhante ao ácido acético, sua estabilidade, dependendo da concentração, proporcionou desinfecção efetiva por pelo menos 4 dias sem capacidade de corrosão (GRASTEAU; PATRICK DANIEL; VALÉRIE CHESNEAU, 2015; COSTA et al., 2015b).

Um composto biodegradável, considerado um dos desinfetantes que melhor satisfaz os requisitos exigidos em ambientes susceptíveis de contaminação. No entanto, o uso de equipamentos de segurança individuais proporciona maior segurança no momento da aplicação (SVIDZINSKI; SVIDZINSKI, 2007).

Em estabelecimentos avícolas, compostos como glutaraldeído, amônia quaternária e hipoclorito de sódio são amplamente utilizados na higiene, no entanto, são potencialmente prejudiciais ao meio ambiente (GRASTEAU; PATRICK DANIEL; VALÉRIE CHESNEAU, 2015). A contaminação por fungos nos ovos ocorre quando hifas passam pelos poros e atingem a membrana interna da casca. Outra característica da contaminação fúngica é o aumento do diâmetro dos poros, o que facilita ainda mais a contaminação interna do ovo, dependendo do período de exposição a fungos (SOARES et al., 2020).

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) é usada em várias análises para entender a ação de diferentes tipos de compostos químicos em diferentes matrizes de alimentos (ABU-SAIED et al., 2020). Quatro concentrações de APA foram aplicadas na casca do ovo, em seguida foram avaliadas: sua ação sobre a casca do ovo e fungos, e demonstrar potenciais formas seguras de aplicação do ácido, sem interferir na integridade da casca do ovo.

8.2 MATERIAL E MÉTODOS

8.2.1 Material

Amostras: os ovos (n=16) foram coletados em ninhos de madeira, com palha como substrato, em um sistema livre. As galinhas poedeiras foram criadas com água e ração ad libitum (ração à base de milho, farelo de soja) e acesso livre ao pasto. Galinhas da linhagem Hy-line Brown com 88 semanas de idade criadas no Laboratório - Avicultura UFSC, na Fazenda Experimental.

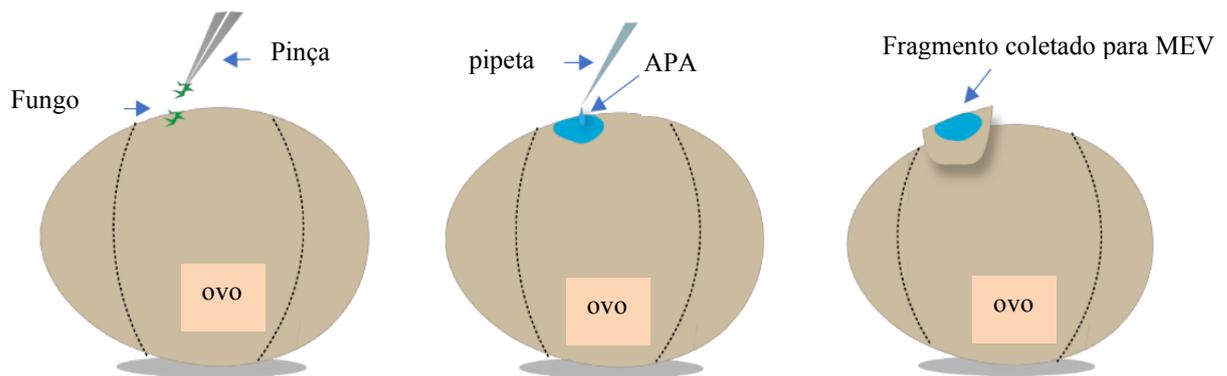
Equipamentos: pinças (Prolab, São Paulo, SP, Brasil); incubadora bacteriológica Sterilifer Sx1,3 (Dtmc, São Paulo, SP, Brasil); microscópio eletrônico de varredura (SEM) (5000x), modelo JSM-6390LV (Jeol, Peabody, Mass., EUA); revestimento em ouro SEM-Scd500 (Leica, Leider, Illinois, EUA); APA hortoxi-150 (15%) (Alloxy, São Paulo, SP, Brasil); medidor de concentração de APA Teste de Spect-AP3 (50-5000 ppm) (Specol, São Paulo, SP, Brasil); medidor de pH (Kasvi, Chiang Ang, China); potenciômetro (Tecnal, São Paulo, SP, Brasil). Outros materiais: stubs (pequenos blocos de metal, 9 de diâmetro e 10 mm de altura).

Método Incubação Fúngica: os ovos foram contaminados artificialmente e naturalmente com cepas de fungos (Figura 1), sendo então armazenados por 7 dias a 25° C no Laboratório de Micotoxicologia e Contaminantes Alimentares.

Preparação para microscopia: os ovos foram preparados para MEV da seguinte forma: diferentes partes externas das cascas de ovos, porém, na mesma região, foram obtidas e imediatamente aderidas a fita de carbono a para MEV.

Aplicação de ácido peracético: aplicação de APA com um volume de 100 µl sobre a casca do ovo (1cm²): ausência de APA no grupo I - (GC); aplicação de três concentrações de APA nos grupos II, III e IV (75, 150 e 300 ppm) e V com o produto comercial com uma concentração de 15% diluída em água destilada (v/v), respectivamente. A Figura 25 mostra como o APA foi aplicado à casca de ovo.

Figura 25 - Infográfico demonstrando a contaminação por fungos e aplicação de ácido peracético na casca do ovo



Fonte: SOARES et al., 2021

8.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

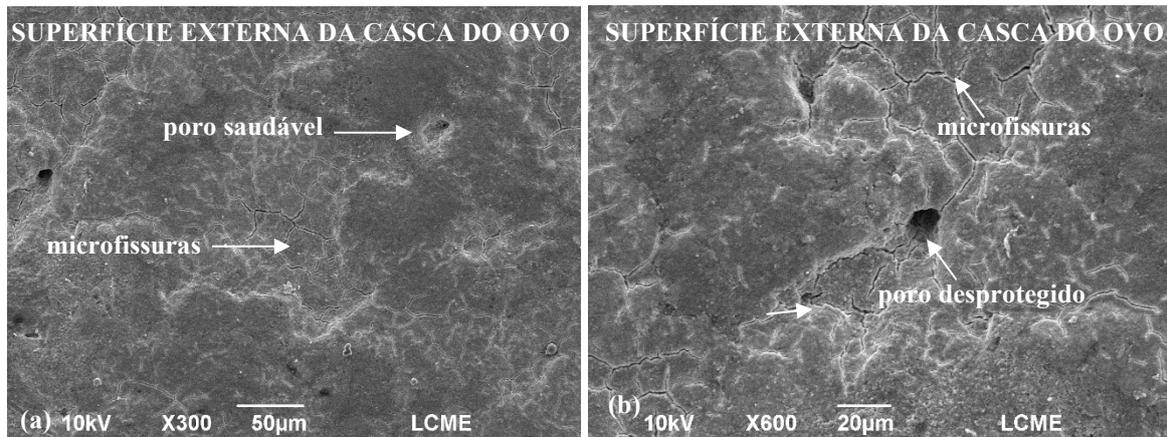
O APA é utilizado há muito tempo, porém, apresenta algumas limitações (concentração, meia-vida e presença de matéria orgânica) em seu uso. Vários microrganismos tornam-se resistentes aos desinfetantes utilizados na avicultura, intensificando ainda mais a quantidade e a concentração durante a aplicação. A aplicação de quatro concentrações de APA na casca do ovo e a avaliação da ação na casca e fungos, por MEV, foram utilizadas para demonstrar potenciais concentrações seguras sem interferir na integridade da casca do ovo.

A aplicabilidade de métodos de descontaminação limpos, seguros e eficazes como a luz ultravioleta, a luz pulsada e o ozônio são essenciais e promissores na produção de ovos e de alimentos hoje, onde existe uma grande preocupação com a segurança alimentar (CLÍMACO et al., 2018; LASAGABASTER; ARBOLEYA; DE MARAÑÓN, 2011). No entanto, algumas preocupações sobre a ação dos fungos sobre os ovos, com embalagens insatisfatórias (alta umidade e temperatura) são condições ideais para o desenvolvimento dos fungos e a alteração em sua estrutura protetora (cutícula) facilita a penetração dos fungos (SOARES et al., 2020). E a microscopia eletrônica de varredura pode ser como ferramenta para avaliar a ação de vários descontaminantes em muitas matrizes alimentares (FEROZE et al., 2020; RUANGWONG et al., 2021).

8.3.1 Microfissuras e microfragmentos naturais

Nas amostras do Grupo Controle -GC- observamos a forma integral da casca do ovo sem a ação de fungos e APA à temperatura ambiente (Figura 26). Na Figura 26, podemos observar a estrutura da superfície externa da casca (poros e cutículas). Nestas amostras coletadas, os poros estão intactos e outros estão completamente abertos, sem a proteção da cutícula. A cutícula, por outro lado, tinha microfissuras naturais. SPARKS; BOARD, 1985 mostram por MEV, que a cutícula tem microfissuras naturais em diferentes regiões da superfície da casca, em nossa pesquisa a quantidade de microfissuras está possivelmente relacionada com a idade das galinhas (88 semanas).

Figura 26- Micrografias em MEV da superfície externa saudáveis (a) sem danos estruturais (b) da casca do ovo sem microfissuras e poro desprotegido.

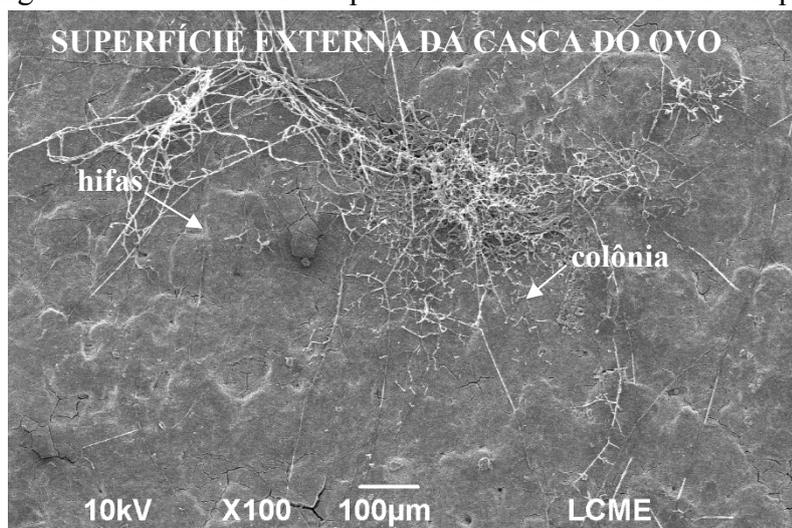


Fonte: SOARES et al., 2021

8.3.2 Ação da contaminação fúngica natural na casca do ovo

Alguns poros estão sem proteção da cutícula, expondo o interior do ovo a esses microrganismos. Na Figura 27 pode-se observar contaminação por fungos em deterioração na casca do ovo e seu comportamento de ramificação na superfície sem a aplicação de APA. A busca de novas alternativas para manter a qualidade dos ovos, como cobrir a casca por solução com um concentrado proteico de arroz em pó associado a óleos essenciais, pode influenciar a qualidade interna dos ovos comerciais, protegendo-os durante o período de armazenamento (PIRES et al., 2020).

Figura 27- Micrografia da superfície externa da casca do ovo: comportamento dos fungos na casca sem o uso de ácido peracético e a presença de fungos viáveis e estruturas reprodutivas com suas estruturas reprodutivas.



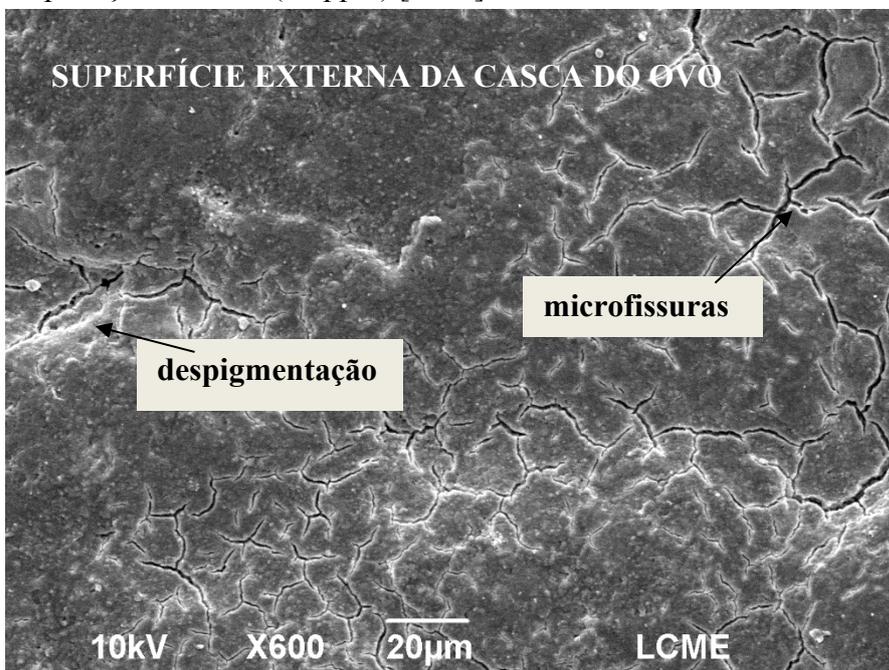
Fonte: SOARES et al., 2021

8.3.2.1 75 ppm

A lavagem dos ovos pode ter deteriorado a cobertura da cutícula, resultando em menor proteção e maior suscetibilidade à contaminação (LIU et al., 2016). No entanto, a seleção genética pode aumentar a deposição de cutícula em aves comerciais, reduzindo a transmissão de microrganismos e também evitando que comprimentos de onda ultravioleta potencialmente prejudiciais atinjam o embrião (BAIN et al., 2013; LILIANA D'ALBA; et al., 2017).

Diversas microfissuras podem ter sido criadas na superfície da casca do ovo pela presença da solução de APA (Grupo II- 75 ppm). Não existem estruturas reprodutivas fúngicas como hifas e conídios para avaliar a ação desta concentração de APA sobre os fungos Figura 28. Porém, podemos inferir que a presença da solução na superfície interfere na qualidade externa do ovo, gerando microfissuras na cutícula. Ampliando a magnitude das imagens, observa-se despigmentação da cutícula onde há deterioração da cutícula, aumentando ainda mais a exposição dos poros aos patógenos.

Figura 28- Micrografias de MEV das superfícies externas da casca do ovo com a cutícula despigmentada e com microfissuras, após a aplicação do APA (75 ppm) [600x]



Fonte: SOARES et al. 2021

8.3.2.2 150 ppm

As superfícies dos ovos (Grupo III-150 ppm) após 7 dias da aplicação de ácido peracético apresentaram pequenas microfissuras idênticas às de casca de ovos saudáveis. Observamos que na superfície da casca havia uma colônia de fungos desidratados com poucas estruturas reprodutivas viáveis (Figura 29).

A baixa eficiência do APA em fungos nesta concentração, permitiu que o desenvolvimento fosse menos acentuado. Nas figuras 5 as colônias de fungos são possui um crescimento menos acentuado. No entanto, eles encontraram um ambiente ideal para o seu desenvolvimento e para propagar hifas em toda a superfície da casca de ovo. Algumas cepas de fungos apresentaram baixa resistência às concentrações intermediárias e superiores de ácido peracético, o que mostra a variação da sensibilidade entre as espécies (BERNARDI et al., 2019b).

Figura 29- Micrografia da superfície externa da casca do ovo, com aplicação de APA (150 ppm) em fungos presentes na casca do ovo e estruturas reprodutivas desidratadas [600x].



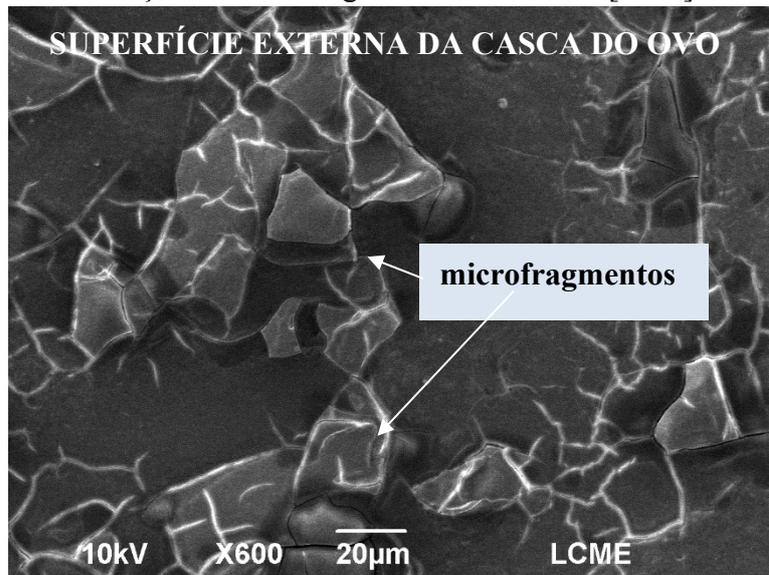
Fonte: SOARES et al., 2021

8.3.2.3 300 ppm

A aplicação de APA (Grupo IV - 300 ppm) aparentemente pode ter alterado a camada de cutícula em vários pontos da superfície da casca do ovo e também em outras soluções (75 e

150 ppm) aplicadas nos testes. Os microfragmentos em algumas regiões da cutícula são possivelmente resultado da ação do ácido peracético, visto que esses microfragmentos não foram observados em outros resultados do trabalho (Figura 30). Trinta segundos após a postura, a cutícula apresenta microfissuras e fragmentos, esses danos naturais foram observados em diferentes momentos após a postura dos ovos (BOARD; FULLER, 1994).

Figura 30 - Micrografia da superfície externa da casca do ovo com aplicação de APA (300 ppm) apresenta a formação de microfragmentos da cutícula [600x].



Fonte: Autor

8.3.3 Comportamento de colônias fúngicas sobre de 300 ppm

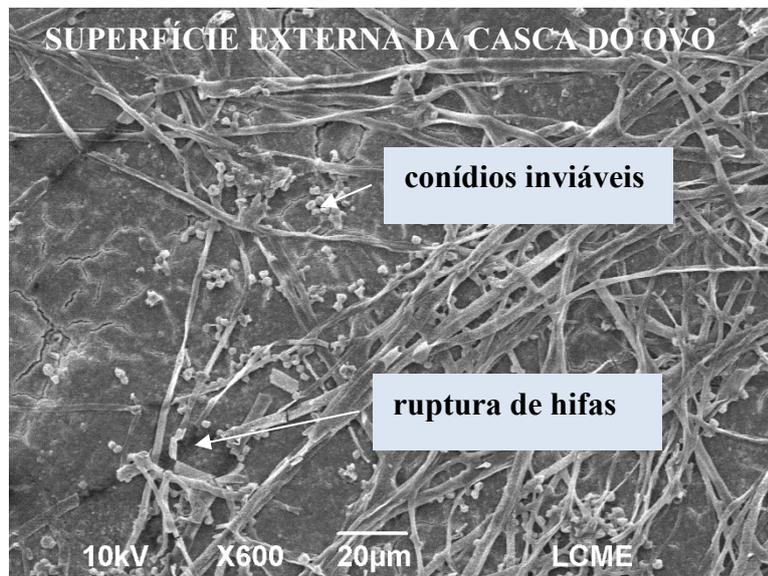
Atualmente, alguns produtos com o APA em diferentes concentrações, são utilizados como saneantes para eliminar bactérias patogênicas na superfície de objetos utilizados na produção de alimentos (WHITE et al., 2018). O mecanismo de ação do APA cessa a função quimiosmótica da membrana citoplasmática da lipoproteína e o transporte através do deslocamento ou ruptura das paredes celulares (BALDRY, 1988).

Algumas espécies de fungos do gênero *Chaetomium* responsáveis pela deterioração de alimentos e contaminação ambiental, são resistentes ao APA porque as paredes celulares são mais espessas (NAKAYAMA et al., 2013).

Os fungos encontraram um ambiente ideal para o desenvolvimento de suas estruturas reprodutivas na casca do ovo, porém, o APA, nas concentrações de 75 ppm e também de 300 ppm, restringe o crescimento das hifas, evitando que se ramifiquem pela casca. A aplicação da solução de ácido peracético a 2%, foi suficiente para esterilizá-la nos ovos e não comprometer a eclodibilidade (HARRISON, 2007).

A ação sanificante do ácido peracético demonstrada por MEV sobre micélios e conídios mostra que as estruturas reprodutivas dos fungos foram inativadas e colapsadas de forma compactada, desidratada e com rupturas em seus filamentos Figura 31. Apresentam hifas anômalas e conídios decompostos pelo uso de APA na cutícula da casca do ovo. Efeito semelhante com o uso de 150 ppm nas hifas que desidrataram (Figura 29).

Figura 31- Micrografia mostra a ação sanitizante do APA: micélios compactados e hifas e conídios com rupturas e desidratação, possivelmente inviáveis [600x].



Fonte: Autor

8.4 CONCLUSÃO

A MEV nos permitiu avaliar com precisão a ação descontaminante do APA na casca de ovo em alguns gêneros de fungos testados. Muitos poros expostos e microfissuras são resultado da idade avançada das aves de postura. No entanto, as microfissuras não parecem ser um local com condições ideais para o desenvolvimento de fungos.

Baixas concentrações da solução APA podem intensificar a formação de novas microfissuras, criar microfragmentos e comprometer a qualidade do ovo. O uso de APA para

desinfecção de patógenos em ovos é promissor. No entanto, é necessário avaliar a concentração ótima do produto que promova a descontaminação fúngica sem alterar ou danificar as características da cutícula e da casca dos ovos.

9 ESTUDO PRELIMINAR UTILIZANDO O GÁS OZÔNIO COMO AÇÃO ANTIFÚNGICA EM OVOS DE GALINHA DE POSTURA

Informações contidas neste capítulo estão publicadas no artigo:

SOARES, Carlos Eduardo da Silva; LEITE, Claudio Eduardo Cartabiano; DAHLKE, Fabiano; MAIORKA, Alex; MIOTTO, Marilia; VILDES, Scussel; JULIANO DEDEA, Lindner. Antifungal Action of Ozone on Chicken Eggshell Cuticles : A Preliminary Study. **Ozone: Science & Engineering**, [S. l.], v. 00, n. 00, p. 1–6, 2021.

RESUMO

Neste trabalho de pesquisa, a microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi utilizada para avaliar a estrutura da casca de ovo das galinhas após a exposição ao gás ozônio (O_3), principalmente para obter informações sobre a potencial ação antifúngica. O O_3 é usado como um agente oxidante e pode ser aplicado como um desinfetante para controlar microrganismos e degradar compostos tóxicos, como pesticidas e micotoxinas, nas indústrias de alimentos. A ação do O_3 na cutícula da casca de ovo e estruturas de fungos filamentosos ainda não está bem estudada. As micrografias de MEV obtidas mostraram que a aplicação de O_3 durante 120 minutos danificaram as hifas de fungos aderidos à cutícula da casca do ovo, sem comprometer gravemente a estrutura externa da casca.

Palavras-chave: Casca do ovo, Descontaminação, Fungos filamentosos, Ozônio.

ABSTRACT

In this research, scanning electron microscopy (SEM) was used to evaluate the eggshell structure of chickens after exposure to Ozone gas (O_3), mainly to obtain information about the potential antifungal action. The O_3 is used as an oxidizing agent and can be applied as a disinfectant to control microorganisms and degrade toxic compounds such as pesticides and mycotoxins in the food industries. The action of O_3 on the eggshell cuticle and filamentous fungal structures is not yet well studied. The micrographs of SEM obtained showed that the application of O_3 for 120 minutes damaged the hyphae of fungi adhered to the cuticle of the eggshell, without severely compromising the outer structure of the shell.

Keywords: Decontamination, Eggshell, Filamentous fungi, Ozone.

9.1 INTRODUÇÃO

O consumo de ovos está aumentando porque este alimento é reconhecido como uma boa fonte de proteína com alto valor nutricional. Cerca de 3 bilhões de galinhas são criadas em todo o mundo para produzir ovos não férteis para consumo humano. No entanto, estratégias de descontaminação precisam ser estudadas porque os ovos são um veículo alimentar para microrganismos patogênicos humanos (HENCHION et al., 2017; RÉHAULT-GODBERT; GUYOT; NYS, 2019).

A contaminação primária ocorre após a postura devido a contato com superfícies sujas de materiais de nidificação, cama de chão, matéria fecal aviária, manuseio inadequado, e equipamento de limpeza inadequado, configurando a chamada rota de infecção horizontal. O material utilizado nos ninhos para acomodar os ovos durante a oviposição deve proporcionar segurança à casca do ovo, pois pequenas microfissuras naturais ou desencadeadas por danos mecânicos aumentam ainda mais a possibilidade da contaminação (SOARES et al., 2020). Sanitizantes usados em aves podem diminuir a contaminação microbiana, no entanto, muitos deles deixam resíduos tóxicos na casca do ovo e podem mudar a qualidade da casca (CLÍMACO, 2017).

Utilizado como é um agente oxidante, o gás ozônio (O_3) e pode ser aplicado como um descontaminante para eliminar microrganismos e degradar compostos tóxicos, como pesticidas e micotoxinas, na indústria alimentar (CHRIST; SAVI; SCUSSEL, 2017).

Diferentes estudos foram conduzidos sobre a eficácia do O_3 , no entanto, poucos estudos avaliaram a ação do O_3 na cutícula da casca do ovo e estruturas de fungos filamentosos, que podem se desenvolver e contaminar ovos durante o armazenamento. Neste trabalho, a microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi utilizada para avaliar a estrutura da casca de ovo das galinhas após a exposição ao O_3 , principalmente para obter informações sobre a potencial ação antifúngica.

9.2 MATERIAL E MÉTODOS

9.2.1 Amostras e equipamento

Os ovos foram coletados de ninhos de madeira, com palha, em um sistema de criação ao ar livre. As galinhas poedeiras foram criadas no sistema *free-range*, com água e ração *ad libitum* (milho e soja à base de ração) e acesso livre ao pasto.

Foram utilizadas galinhas da linhagem Hy-Line Brown com 88 semanas de idade do Laboratório de Avicultura da Universidade Federal de Santa Catarina. O gerador de gás O_3 utilizado foi o modelo OP-35-5 L (Interozone, Jundiaí, SP, Brasil) acoplado a um compressor de ar modelo TE-58 (Tecnal, São Paulo, SP, Brasil) (Figura 1).

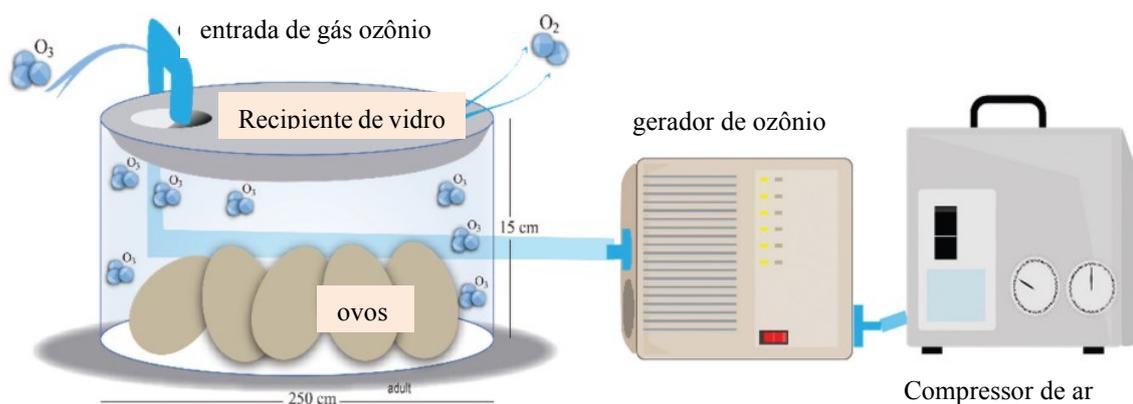
Para a microscopia (5000x), um microscópio eletrônico de varredura (SEM) modelo JSM- 6390LV (Jeol Ltd., Peabody, MA, EUA) e uma máquina para revestimento das amostras em ouro EM SCD500 (Leica, Leider, IL, EUA) foram usados.

9.2.2 Ensaio utilizando ozônio

Seis ovos foram coletados de cinco ninhos diferentes na primeira postura da manhã. Os ovos (cinco para cada lote de tratamento) foram tratados com O_3 (em duplicata). Os ovos foram depositados na câmara de vidro (Figura 1) e receberam 60 ppm de O_3 por 120 e 300 min (Controle não receberam tratamento de O_3).

Os ovos foram contaminados naturalmente por fungos e expostos ao ambiente do laboratório de micologia a 25°C e 78% de umidade relativa durante uma semana. Para o tratamento do ozônio, o gás ozônio foi gerado em o gerador de O_3 (Figura 32) e bombeado para a câmara de vidro por um compressor, equipado com um filtro para evitar a presença de umidade, a um caudal contínuo de 3 L.min⁻¹. Fragmentos de casca (5 a 10 mm) foram coletados da região equatorial dos ovos tratados.

Figura 32- Esquema de equipamentos utilizados no tratamento de ovos com ozônio.



Fonte: SOARES et al., 2021

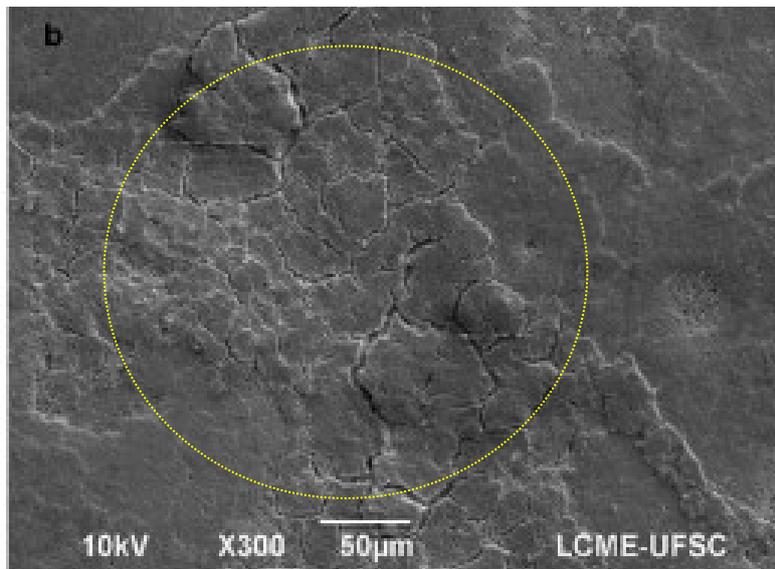
Após a aplicação do O_3 , os ovos foram mantidos na câmara por 60 min para esgotar o O_3 residual aplicado. Posteriormente, para o MEV, os fragmentos da casca foram fixados em

stubs (contendo fita de carbono de dupla face) e revestidos com uma camada dourada de 40 nm sob vácuo.

9.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nos ovos controle, observou-se na cutícula, microfissuras produzidas naturalmente ou por algum contato durante a coleta dos ovos (Figura 33). As características externas da casca de ovo em frangos com 60 semanas de idade, também foram investigadas por EL-MAATY; et al., (2021) utilizando MEV e mostraram presença de microfissuras semelhantes.

Figura 33- Imagem de (MEV) da superfícies externas (cutículas) da casca do ovo (sem tratamento com ozônio - controle) com presença de microfissuras naturais [300x].

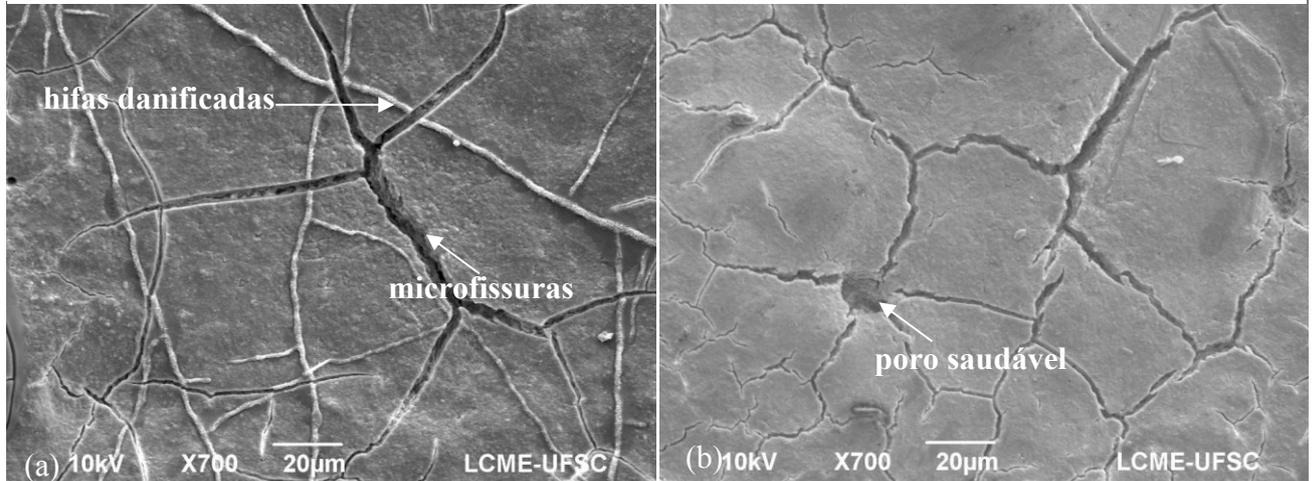


Fonte: SOARES et al., 2021

A degradação de resíduos de agrotóxicos presentes nas cascas dos ovos é outra alternativa para a utilização do ozônio, considerando essas aplicações, estudos que avaliem os possíveis danos que o O_3 pode causar nas cascas dos ovos devem ser abordados.

No presente estudo, a aplicação de ozônio por 120 min, degradaram as colônias de fungos aderidas à cutícula da casca do ovo (Figura 34 a,b), produziram microfissuras como as observadas nos ovos Controle (Figura 33) e não danificaram a cutícula excessivamente. O tratamento com O_3 pareceu ser responsável pela formação de novas microfissuras e desmembraram as hifas fúngicas (Figura 34a). A imagen obtida na Figura 34b mostra o poro da casca do ovo intacto e sem invasão das hifas fúngicas, mesmo próximos às microfissuras.

Figura 34- Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) das superfícies externas (cutícula) da casca do ovo após 120 min de exposição ao ozônio. (a) presença de microfissuras e ruptura de hifas (b) microfissuras e poro [700x].

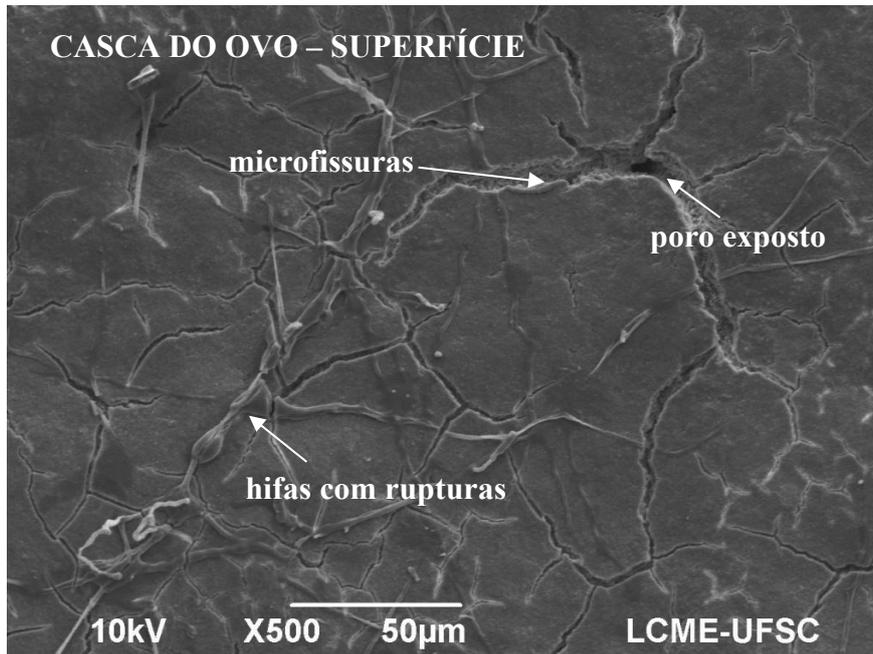


Fonte: Autor

A Figura 35 mostra estruturas danificadas de fungos e grande formação de microfissuras em comparação ao tratamento com O_3 de 120 min. A extensão das microfissuras presentes nas cascas de ovos tratadas com O_3 está relacionada ao grau de exposição. Na Figura 35, as microfissuras expuseram o poro da casca do ovo, e as hifas com diâmetros maiores foram destruídas após 300 minutos de aplicação de O_3 .

A ausência de microfragmentos após 300 minutos de exposição ao O_3 , o isenta de desencadear este tipo de dano à cutícula e inferir que sítios específicos de casca de ovo são propícios à formação deste tipo de dano. São necessários mais estudos, incluindo diferentes concentrações de O_3 e tempo de tratamento, para melhor compreender a manutenção da integridade da casca.

Figura 35- Micrografia da superfície externa (cutículas) da casca do ovo após 300 min de exposição ao ozônio. Presença de colônias de fungos rompidas e microfissuras em uma grande extensão da cutícula (com exposição do poro).



Fonte: Autor

A deterioração das estruturas da casca do ovo é frequentemente relacionada à saúde das galinhas, especialmente quando infectados por microrganismos patogênicos. De acordo com a idade das galinhas, a casca do ovo perde sua integridade e qualidade principalmente em más condições de armazenamento (FEBERWEE; DE WIT; LANDMAN, 2009; WANG et al., 2016).

A composição da cutícula, espessura e grau de cobertura são altamente dependentes da idade das galinhas e do frescor dos ovos. Os fungos podem invadir os ovos através do canal dos poros e se desenvolver nos microfragmentos desencadeados por algum processo de higiene (Soares et al. 2020). A cutícula desempenha um papel vital na prevenção de microrganismos de entrar na casca do ovo e mantendo os consumidores seguros (RODRÍGUEZ-NAVARRO et al., 2013; SAMIULLAH; ROBERTS, 2014).

9.4 CONCLUSÃO

Neste trabalho, o efeito do O_3 na casca do ovo não causou danos severos à cutícula que comprometessem sua ação protetora. A ação do O_3 nas hifas demonstrou ser eficaz em estruturas de fungos deteriorantes. As concentrações e o tempo utilizados nesta pesquisa

requerem mais investigação para determinar um tratamento ideal para a descontaminação fúngica de ovos de galinha.

As micrografias de SEM demonstraram ser uma ferramenta eficaz para observar a estrutura das cascas de ovos, preocupando-se com a contaminação fúngica e os danos. O potencial para O₃ para higienizar cascas de ovos é promissor.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho apresentou informações inéditas do comportamento fúngico sobre besouros e larvas mortas, isoladas da cama de frango. A partir da microscopia estereoscópica e eletrônica de varredura, podemos observar com todos os detalhes, a degradação da cama de frango de acordo com cada etapa de criação, a presença de fungos filamentosos na cama de frango, o exoesqueleto dos insetos e ácaros e os sítios anatômicos com carga fúngica elevada, a infestação fúngica nos corpos dos insetos, e a estrutura da casca dos ovos de galinha e a ação dos fungos sobre seu exterior e interior da casca.

Como esperado, a contaminação por fungos filamentosos estava presente em todas etapas de criação da aves. Espécies como *Aspergillus* sp, *Penicillium* sp foram isoladas na cama. Contudo, o do gênero *Trichoderma* esteve presente em todas as amostras coletadas desde o início do alojamento dos pintinhos. Atualmente, está espécie tem sido estudada para avaliar sua aplicabilidade no controle de pragas em lavouras.

Quanto aos insetos e ácaros, havia uma intensa infestação de ácaros do gênero *Trichouropoda* sp. em todas as amostras de cama de frango coletadas. Foram isolados o besouro *Alphitobius diaperinus* em todas as amostras, porém, com baixa infestação nos estágios adultos e larval. Os exoesqueletos de besouros mortos acumulados nas granjas, fornecem substrato ideal para o desenvolvimento fúngico e corrobora com a disseminação de conídios pelo aviário. Diante destas observações, foi mostrado o efeito nocivo do gás ozônio sobre estes insetos, principalmente em seu estágio larval.

Durante a armazenagem de ovos para o consumo, há uma preocupação com umidade acumulada na superfície da casca. Alguns gêneros fúngicos como o *Fusarium* e *Curvularia*, foram isolados na superfície de amostras de ovos coletados em ninhos forrados com maravalha. Podemos observar o comportamento de infestação do fungos atravessando o canal do poro da casca e alcançando o interior do ovo em apenas 7 dias. Neste contexto, foram testados a aplicabilidade dois métodos brandos de descontaminação (ácido peracético e gás ozônio), selecionados por não deixarem resíduos tóxicos. Ambos foram eficazes como tratamento antifúngico, interrompendo o desenvolvimento fúngico sobre a superfície da casca do ovo. No entanto, são necessárias novas pesquisas que investiguem uma concentração e tempo de exposição ideal para que não ocorra danos sobre a casca do ovo, principalmente a cutícula.

Estudos futuros serão necessários para avaliar a ação do gás ozônio e ácido peracético na cama de frango, frente aos contaminantes tóxicos aplicados sistematicamente nas granjas e também a contaminação natural de insetos e ácaros responsáveis por prejuízos econômicos para a indústria avícola.

O uso da transformação digital para prevenir e detectar a presença de microrganismos patogênicos e gases tóxicos com sensores é de extrema importância, pois a avicultura ocupa um lugar importante no agronegócio brasileiro e mundial. Além disso, criar ferramentas como plataformas robóticas para a aplicação de sanitizantes nas granjas, eximindo o produtor do contato direto com agroquímicos tóxicos.

REFERÊNCIAS

ABPA. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PROTEÍNA ANIMAL, **Relatório Anual 2021**. [s. l.], p. 176, 2018. Disponível em: <<http://abpa-br.com.br/>>.

ABREU, V.M.N; ABREU, P.G de. Os desafios da ambiência sobre os sistemas de aves no Brasil. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 40, n. 256, p. 1-14, 2011.

ABU-SAIED, M. A. et al. Potential decontamination of drinking water pathogens through k-carrageenan integrated green bottle fly bio-synthesized silver nanoparticles. **Molecules**, [s. l.], v. 25, n. 8, 2020.

AFFSAH-HEJRI, L.; HAJEB, P.; EHSANI, R. J. Application of ozone for degradation of mycotoxins in food: A review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, [s. l.], v. 19, n. 4, p. 1777–1808, 2020.

AKTER, Yeasmin et al. Effect of storage time and temperature on the quality characteristics of chicken eggs. **Journal of Food, Agriculture & Environment**, v. 12, n. 2, p. 87-92, 2014.

ALONSO, M. B. et al. Pyrethroids: A new threat to marine mammals? **Environment International**, [s. l.], v. 47, p. 99–106, 2012.

ALVES, L. F. A. et al. Ocorrência de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. em adultos de cascudinho (*Alphitobius diaperinus*) (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae) em aviários comerciais em cascavel, PR. **Neotropical Entomology**, [s. l.], v. 33, n. 6, p. 793–795, 2004.

AMARAL, G. et al. 2015 Avicultura de postura: estrutura da cadeia produtiva, panorama do setor no Brasil e no mundo. **BNDES Setorial, Rio de Janeiro**, v. 43, p. 167-207, 2015.

ANTON, M. Composition and Structure of Hen Egg Yolk. In: HUOPALAHTI, R. et al. (Eds.). **Bioactive Egg Compounds**. 1. ed. Nantes: Springer, 2007. p. 2.

AOAC. (2005). Association Official Method of Analysis of AOAC internacional. Thiex, NJW (E.d.). **Official Methods of Analysis**. 18. ed. Maryland: AOAC International.

APHA - American Public Health Association. **Compendium of Methods for the Microbio-logical Examination of Foods**. 5ª edição. Ed: SALFINGER, Y. e TORTORELLO, M. L. APHA press: 2015.

- ASAM, S.; HABLER, K.; RYCHLIK, M. *Fusarium* mycotoxins in food. In: **Chemical Contaminants and Residues in Food**. Woodhead Publishing, 2017. p. 295-336.
- AUER, C.; GHIZELINI, A.; PIMENTEL, I. Decomposição fúngica de acículas em plantios de Pinus. **Pesq. Flor. Bras**, [s. l.], n. 54, p. 127–138, 2007.
- AVILA, V. S. et al. Valor agrônômico da cama de frangos após reutilização por varios lotes consecutivos. Comunicado Técnico - **Centro Nacional de Pesquisa de Suínos e Aves**, [s. l.], v. 466, p. 1–4, 2007.
- AVINASH, K. S. et al. Antimicrobial Potential of Crude Extract of *Curvularia lunata*, an Endophytic Fungi Isolated from *Cymbopogon caesius*. **Journal of Mycology**, [s. l.], v. 2015, p. 1–4, 2015.
- BAHOBAI, A. A. S.; HASSAN, S. A.; EL-DEEB, B. A. Microbial quality and content aflatoxins of commercially available eggs in Taif, Saudi Arabia. **African Journal of Microbiology Research**, [s. l.], v. 6, n. 13, p. 3337–3342, 2012.
- BAIN, M. M. et al. Enhancing the egg's natural defence against bacterial penetration by increasing cuticle deposition. **Animal Genetics**, [s. l.], v. 44, n. 6, p. 661–668, 2013.
- BAJERLEIN, D.; BŁOSZYK, J. Phoresy of *Uropoda orbicularis* (Acari: Mesostigmata) by beetles (Coleoptera) associated with cattle dung in Poland. **European Journal of Entomology**, [s. l.], v. 101, n. 1, p. 185–188, 2004.
- BALDRY, M. G. C. **Disinfection with peroxygens**. Industrial biocides. Critical reports on applied chemistry, [s. l.], v. 23, p. 91–116, 1988.
- BANJO, A. D.; LAWAL, O. A.; ADEDUJI, O. O. Bacteria and fungi isolated from housefly (*Musca domestica* L.) larvae. **African Journal of Biotechnology**, [s. l.], v. 4, n. 8, p. 780–784, 2005.
- BARBOSA, V. M. et al. Avaliação da qualidade da casca dos ovos provenientes de matrizes pesadas com diferentes idades. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, [s. l.], v. 64, n. 4, p. 1036–1044, 2012.
- BASER, S.; ERKOÇ, F.; SELVI, M.; KOÇAK, O. Investigation of acute toxicity of permethrin on guppies *Poecilia reticulata*. **Chemosphere**, v. 51, p. 469-474, 2003.
- BASHIR, L., OSSAI, P. C., SHITTU, O. K., ABUBAKAR, A. N., & CALEB, T. Comparison of the nutritional value of egg yolk and egg albumin from domestic chicken, guinea fowl and hybrid chicken. **American journal of experimental agriculture**, [s. l.], v. 6, n. 5, p. 310–316, 2015.

BEBER, M.R.; SAVI, G.D., SCUSSEL, V.M. 2015. Ozone effect on fungi proliferation and genera susceptibility of treated stored dry paddy rice (*Oryza sativa* L.). J. **Food Safety**. 35 (1):59–65

BEGON, M.; TOWNSEND, C. R.; HARPER, J. L. ECOLOGY - From Individuals to Ecosystems. 4. ed. United Kingdom: Blackwell Publishing Inc., 2006. v. 148

BEHAN-PELLETIER. **A manual of acarology**. 3. ed. Texas: Texas Tech, 2009.

BERNARDI, A. O. et al. Antifungal activity of commercial sanitizers against strains of *Penicillium roqueforti*, *Penicillium paneum*, *Hyphopichia burtonii*, and *Aspergillus pseudoglaucus*: Bakery spoilage fungi. **Food Microbiology**, [s. l.], v. 83, n. October 2018, p. 59–63, 2019. a.

BŁOSZYK, J.; KLIMCZAK, J.; LEŚNIEWSKA, M. Phoretic relationships between Uropodina (Acari: Mesostigmata) and centipedes (Chilopoda) as an example of evolutionary adaptation of mites to temporary microhabitats. **European Journal of Entomology**, [s. l.], v. 103, n. 3, p. 699–707, 2006.

BOARD, R. G.; FULLER, R. **Microbiology of the Avian Egg**. 1. ed. UK: Springer, 1994.

BOONCHIANGMA, S.; NGEONTAE, W.; SRIJARANAI, S. Determination of six pyrethroid insecticides in fruit juice samples using dispersive liquid–liquid microextraction combined with high performance liquid chromatography. **Talanta**, v. 88, p. 209-215, 2012.

BORGES, A. C. da S. Os “ ribeirinhos ” do Pantanal Norte : temporalidades , práticas rurais e cotidiano (1870-1930). **Revista Mundos do Trabalho**, [s. l.], v. 2, n. 4, p. 305–335, 2010.

BORGES, A. **Valores hematológicos e bioquímicos séricos, efeitos de doses subletais da cipermetrina e características físico-químicas do sêmem do Jundiá (*Rhamdia quelen*)**. Porto Alegre, 2005. 175 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2005.

BRASIL. Lei nº 7.802/1989, de 11/07/1989. **Pesquisa, a experimentação, registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins, e dá outras providências**. Disponível em:<
https://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/17802.htm> Acesso em 14 jul. 2021.

BRASIL. Consulta Pública nº 50, de 09 de junho de 2003. **Relação de monografias dos ingredientes ativos de agrotóxicos e preservantes de madeira**. Órgão emissor:

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em: www.anvisa.gov.br =>. Acesso em: 14 de jul. de 2021.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Manual para coleta de amostras do PNCRC/MAPA**. Brasília, DF, 1996. 9p.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – Decreto n. 4.954, de 14 de janeiro de 2004. Aprova o Regulamento da Lei no 6.894, de 16 de dezembro de 1980, . **Inspeção e fiscalização da produção e do comércio de fertilizantes, corretivos, inoculantes ou biofertilizantes destinados à agricultura, e dá outras providências**. D.O.U, Seção 1, p.2, 15 jan. 2004

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Decreto nº 9.013, de 29 de março de 2017. **Regulamenta a inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal, que disciplina a fiscalização e a inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal**, Brasília, DF, 2017.

BRASIL. Ministério da Agricultura, pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº. 56, de 4 de setembro de 2007. **Procedimentos para registro, fiscalização e controle de estabelecimentos avícolas de reprodução e comerciais** D.O.U., 06/12/2007.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 29 de 14 de setembro de 2010. **Importação de produtos destinados à alimentação animal e a uso veterinário**. Disponível em:< <http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=visualizarAtoPortalMapa&chave=419570576>>. Acesso em: 28 de julho 2020.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 13 de 15 de julho de 2015. **Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes – PNCRC**. Disponível em:< http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/CRC/IN%2013-2015%20-%20Publica%C3%A7%C3%A3o%20do%20PNCRC%20Animal%202015.pdf>. Acesso em: 28 de julho 2021.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regulamento da **Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal – RIISPOA**. Brasília, 1952. 116 p. Disponível em: http://www.agais.com/normas/riispoa/riispoa_titulo9.pdf. Acesso em: 13 nov. 2019

BUSSE, M. et al. Ethical Concerns in Poultry Production : A German Consumer Survey About Dual Purpose Chickens. **Journal of Agricultural and Environmental Ethics**, [s. l.], n. 1 2019.

BUTT, T. M. et al. Pathogenicity of the Entomogenous, Hyphomycete Fungus, *Metarhizium anisopliae* against the Chrysomelid Beetles *Psylliodes chrysocephala* and *Phaedon cochleariae*. **Biocontrol Science and Technology**, [s. l.], v. 2, n. 4, p. 327–334, 1992.

CASTRO, J. Efeito do jejum alimentar na qualidade da carne de frangos de corte criados em sistema convencional. 2011. Dissertação (Mestrado)– Universidade e São Paulo, São Paulo.

ČEJKA, M.; HOLUŠA, J. Mites of the order mesostigmata associated with bark beetles (coleoptera: Curculionidae: Scolytinae)-review. **Zpravy Lesnickeho Vyzkumu**, [s. l.], v. 58, n. 4, p. 353–359, 2013.

CHAUVE, C. The poultry red mite *Dermanyssus gallinae* (De Geer, 1778): Current situation and future prospects for control. **Veterinary Parasitology**, [s. l.], v. 79, n. 3, p. 239–245, 1998.

CHEN, S. Y. CHEN, S.Y; ZHANG, Z.W.; HE, F.S.; YAO, P.P.; WU, Y.Q.; SUN, J.X.; LIU, L.H.; LI, Q.G.; An epidemiological study on occupational acute pyrethroid poisoning in cotton farmers. **British journal of industrial medicine**, v. 48, n. 2, p. 77-81, 1991.

CHEN, X. et al. Ozonation products of triclosan in advanced wastewater treatment. **Water Research**, [s. l.], v. 46, n. 7, p. 2247–2256, 2012.

CHEN, X.; RICHARD, J.; LIU, Y.; DOPP, E.; TUERK, J.; BESTER, K. 2012. Ozonation products of triclosan in advanced wastewater treatment. **Water Res.** 46 (7):2247-2256

CHERNAKI, A. M.; ALMEIDA, L. M. DE. Exigências Térmicas, Período de Desenvolvimento e Sobrevivência de Imaturos de *Alphitobius diaperinus* (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae). **Neotropical Entomology**, [s. l.], v. 30, n. 3, p. 365–368, 2001.

CHERNAKI-LEFFER, A. et al. Isolamento de enterobactérias em *Alphitobius diaperinus* e na cama de aviários no oeste do estado do Paraná, Brasil. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, [s. l.], v. 4, n. 3, p. 243–247, 2002.

CHERNAKI-LEFFER, A. M. **Dinâmica populacional, estimativa da resistência a inseticidas e suscetibilidade do cascudinho *Alphitobius diaperinus* (Panzer, 1797)**

(Coleoptera: Tenebrionidae) a inseticidas reguladores de crescimento e a fungos entomopatogênicos. 2004. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

CHERNAKI-LEFFER, A. M. et al. Effects of exposure of higher doses of cypermethrin in layers hens. **International Journal of Poultry Science**, [s. l.], v. 12, n. 6, p. 362–366, 2013.

CHIEN, Y. C.; HINCKE, M. T.; MCKEE, M. D. Avian eggshell structure and osteopontin. **Cells Tissues Organs**, [s. l.], v. 189, n. 1–4, p. 38–43, 2008.

CHIROLLO, C. et al. Persistence of α -cypermethrin residues in milk of lactating donkeys (*Equus asinus*) using UHPLC-MS/MS. **Food Additives & Contaminants: Part A**, v. 31, n. 7, p. 1205-1211, 2014.

CHOI, I.-Y. et al. Isolation and Identification of Mushroom Pathogens from *Agrocybe aegerita*. **Mycobiology**, [s. l.], v. 38, n. 4, p. 310, 2010.

CHRIST, D.; SAVI, G. D.; SCUSSEL, V. M. Effectiveness of Ozone Gas Application Methods against Combined Multi-Contaminants in Food. **Food and Public Health**, [s. l.], v. 7, n. 3, p. 51–58, 2017.

CHRIST, D.; SAVI, G.; SCUSSEL, S. Effectiveness of Ozone Gas in Raw and Processed Food for Fungi and Mycotoxin Decontamination - A Review. **Journal of Chemical, Biological and Physical Sciences**, [s. l.], v. 6, n. 2, p. 326–348, 2016.

CLÍMACO, W. L. dos S. **Desinfetantes alternativos ao uso de formaldeído para desinfecção de ovos férteis.** 2017. Universidade Federal de Minas Gerais, [s. l.], 2017.

CLÍMACO, W. L. dos S. et al. Eggshell microbiology and quality of hatching eggs subjected to different sanitizing procedures. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, [s. l.], v. 53, n. 10, p. 1177–1183, 2018.

CODEX ALIMENTARIUS FAO/WHO. **Pesticide Residues in Food and Feed.** Codex pesticides residues in food online database, 2005. Disponível em: <http://www.codexalimentarius.net/pestres/data/MRLs_Spices_e.pdf>. Acesso em : 14 jul. 2020

CORCELLAS, C.; FEO, M.L.; TORRES, J.P.; MALM, O.; OCAMPO-DUQUE, W.; LJARRAT, E.; BARCELÓ, D.. Pyrethroids in human breast milk: occurrence and nursing daily intake estimation. **Environment international**, v. 47, p. 17-22, 2012.

COSTA, E. M. da S. et al. Grão integral processado e coprodutos da soja em dietas para frangos de corte1. **Revista Ciencia Agronomica**, [s. l.], v. 46, n. 4, p. 846–854, 2015. a.

COSTA, S. A. I. da S. et al. Stability of antimicrobial activity of peracetic acid solutions used in the final disinfection process. **Brazilian oral research**, [s. l.], v. 29, n. 1, p. 1–6, 2015. b.

CUMERAS, R. et al. Identification of fungal metabolites from inside *Gallus gallus domesticus* eggshells by non-invasively detecting volatile organic compounds (VOCs).

Analytical and Bioanalytical Chemistry, [s. l.], v. 408, n. 24, p. 6649–6658, 2016.

CUNNINGHAM, D. L.; RITZ, C. W.; MERKA, W. C. **Best Management Practices For Storing and Applying Poultry Litter**. Georgia. 2011.

D'ARCHIVIO, A.A.; FANELLI, M.; MAZZEO, P.; RUGGIERI, F. Comparison of different sorbents for multiresidue solid-phase extraction of 16 pesticides from groundwater coupled with high performance liquid chromatography. **Talanta** 71, 25-30, 2007.

da SILVA, G. S. et al. (Panzer) (Coleoptera : Tenebrionidae) em cama de frangos de corte Evaluations of sampling methods for “Darkling beetles” (Alphitobius diaperinus Panzer) (Coleoptera : Tenebrionidae) in the litter of broiler houses. **Semina: Ci. Agrárias**, [s. l.], v. 22, n. 1, p. 73–76, 2001.

da SILVA, N. ; TANIWAKI, M.H. ; JUNQUEIRA, V.C.A. ; SILVEIRA, N.F.A. ; NASCIMENTO, M. S. Faz; GOMES, R.A.R. **Métodos microbiológicos de análise em alimentos e água: Manual de laboratório**. Instituto de Tecnologia de Alimentos - ITAL, Campinas, SP, Brasil. CRC Press / Balkema, Taylor & Francis Grupo, Londres: Reino Unido, 484p., 2013.

DALLEGRAVE, A. et al. Residue of insecticides in foodstuff and dietary exposure assessment of Brazilian citizens. **Food and Chemical Toxicology**, [s. l.], v. 115, n. March, p. 329–335, 2018.

D'AMATO, C; TORRES, J.P.M; MALM, O. DDT. (dichlorodiphenyltrichloroethane): toxicity and environmental contamination-a review. **Química Nova**, v. 25, n. 6A, p. 995-1002, 2002.

DASGUPTA, S. et al. Pesticide poisoning of farm workers-implications of blood test results from Vietnam. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, [s. l.], v. 210, n. 2, p. 121–132, 2007.

de ARAÚJO, A.J. et al., Multiple Exposure To Pesticides And Impacts On Health: A Cross-Section Study Of 102 Rural Workers, Nova Friburgo, Rio De Janeiro State, Brazil. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 12, n. 1, p. 115, 2007.

De AVILA, V.S; ABREU, V.M.N; DE FIGUEIREDO, É.A.P; De BRUM, P.A.R; De OLIVEIRA, U. (2007). Valor agrônômico da cama de frangos após reutilização por vários lotes consecutivos. Concórdia: **Embrapa Suínos e Aves**, 2007. 4.p (Comunicado técnico, 466).

De LAS CASAS, E; HAREIN, P.K.; POMEROY, B. S. Bacteria and fungi within the lesser mealworm collected from poultry brooder houses. **Environmental Entomology**, v. 1, n. 1, p. 27-30, 1972.

De OLIVEIRA, F. de FRANÇA, P.M.; PIEROZAN, M.K.; de OLIVERIRA, D.D.S.; RIBEIRO, T.; de ALMEIDA, M. A. . Principais micotoxinas que afetam a produção de alimentos. **Revista de Agronomia e Medicina Veterinária IDEAU**. v. 02, n. 3, p. 4-9, 2015

De SOUZA MENDONÇA, F.; FREITAS, S. H.; DÓRIA, R. G. S.; DE CAMARGO, L. M.; EVÊNCIO-NETO, J. Intoxicação por diclorvós e cipermetrina em bovinos em Mato Grosso–relato de caso. **Ciência Animal Brasileira**, v. 11, n. 3, p. 743-749, 2010.

DECAGON, Devices Inc. Medidor de Atividade de Água: manual do operador. 3. ed.:185 p, Pulman, WA.: **Decagon**, 2001.

DELABOUGLISE, A. et al. Poultry farmer response to disease outbreaks in smallholder farming systems in Southern Vietnam. **eLife**, [s. l.], v. 9, p. 1–44, 2020.

DIAS, D. A.; VARGAS, A. B.; ALMEIDA, F. S. Efeitos de dosagem mais concentrada de cipermetrina no controle de cascudinho (Coleoptera: Tenebrionidae) na avicultura. **Revista Acadêmica Ciências Agrárias e Ambientais**, [s. l.], v. 11, n. 551, p. 437, 2013.

DOS SANTOS, M. S. V. et al. Efeito da temperatura e estocagem em ovos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, [s. l.], v. 29, n. 3, p. 513–517, 2009.

DURICIC, D.; VALPOTIC, H.; SAMARDŽIJA, M. Prophylaxis and therapeutic potential of ozone in buiatrics: Current knowledge. **Animal reproduction science**, v. 159, p. 1-7, 2015

EFUNTOYE, M. O.; FASHANU, S. O. Occurrence of keratinophilic fungi and dermatophytes on domestic birds in Nigeria. **Mycopathologia**, [s. l.], v. 153, n. 2, p. 87–89, 2002.

EL-MAATY;, H. A. A. et al. Effects of ecofriendly synthesized calcium nanoparticles with biocompatible Sargassum latifolium algae extract supplementation on egg quality and scanning electron microscopy images of the eggshell of aged laying hens. **Poultry Science**, [s. l.], v. 100, p. 675–684, 2021.

EL-SAYED, Y. S.; SAAD, T. T.; EL-BAHR, S. M. Acute intoxication of deltamethrin in monosex Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus* with special reference to the clinical, biochemical and haematological effects. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, n. 24, p. 212-217, 2007.

FACCINI, J.L.H. Ácaros hematófagos: parasitos de aves de postura (*Gallus gallus*) no Brasil. Diversifi cação, biologia e controle. **Arquivo Fluminense de Medicina Veterinária**, v.2, n.1, p.29-31, 1987.

FAO/WHO. Food and Agricultural Organization of the United Nations/World Health Organization. Expert committee on food additives. meeting; world health organization. **Residues of some veterinary drugs in animals and foods**. Food & Agriculture Org., 2000

FAO/WHO. Food and Agricultural Organization of the United Nations/World Health Organization. **Test procedures for insecticide resistance monitoring in malaria**. Vectors, bio-efficacy and persistency of insecticides on treated surfaces. Geneva, 1998.

FAO/WHO. Food and Agricultural Organization of the United Nations/World Health Organization. **Residues of some veterinary drugs in animals and foods**. Chapter 16, Cypermethrin. Geneva: Rome, 2003. p. 10-24. Disponível em: http://ftp.fao.org/es/esn/jecfa/2004-10-15_fnp41-16final_4.pdf. Acesso em: 01 jun. 2020

FARAHANI, V. R. F. et al. Phoretic uropodine mites (Acari : Mesostigmata) associated with the red. **On Iyeron**. [s. l.], v. 48, p. 317–322, 2016.

FDA. Secondary direct food additives permitted in food for human consumption. . 2001, 123, p. 33829–33830.

FEBERWEE, A.; DE WIT, J. J.; LANDMAN, W. J. M. Induction of eggshell apex abnormalities by *Mycoplasma synoviae*: Field and experimental studies. **Avian Pathology**, [s. l.], v. 38, n. 1, p. 77–85, 2009.

FEDDERN, V. et al. Egg quality assessment at different storage conditions, seasons and laying hen strains. **Ciência e Agrotecnologia**, [s. l.], v. 41, n. 3, p. 322–333, 2017.

FENOLL, J. et al. Reduction of the movement and persistence of pesticides in soil through common agronomic practices. **Chemosphere**, [s. l.], v. 85, n. 8, p. 1375–1382, 2011.

FERNANDES, C.M.; PAZ, G. F.; LINS, J.C. **Avaliação das condições de frigorificação de carcaças de frangos de corte em diferentes pontos do processo produtivo, distribuição e comercialização**. Universidade Castelo Branco, 2008.

FEROZE, N. et al. Fungal mediated synthesis of silver nanoparticles and evaluation of antibacterial activity. **Microscopy Research and Technique**, [s. l.], v. 83, n. 1, p. 72–80, 2020.

FERREIRA, C.A. **Nutrição mineral de florestas plantadas: O estado atual e tendências da pesquisa prática**. In: CONGRESSO FLORESTAL BRASILEIRO, 7, 1993, Curitiba. Anais do 7º Congresso Florestal Brasileiro. Curitiba: Sociedade Brasileira de Silvicultura, Sociedade Brasileira de Engenheiros Florestais, 1993. v. 3, p. 157-162.

FILHO, J. D. E. M. **Ozone and ultraviolet radiation in commercial egg shell higienization**. 2019. Universidade Estadual Paulista, [s. l.], 2019.

FIOCRUZ. Fundação Oswaldo Cruz. **Sistema Nacional de Informações Tóxico - Farmacológicas**.http://sinitox.icict.fiocruz.br/sites/sinitox.icict.fiocruz.br/files//Tabela%201_2012.pdf>. Acesso em : 14 jul.2018

FUHRMANN, H. et al. The effect of gaseous ozone treatment on egg components. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, [s. l.], v. 90, n. 4, p. 593–598, 2010.

FUKAYAMA, E.H. **Características quantitativas e qualitativas da cama de frango sob diferentes reutilizações: efeitos na produção de biogás e biofertilizante**. 2008. xiv, 99 f. Tese (doutorado) – Univ.Estad. São Paulo, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, São Paulo.

FUKUTOMI, Y. et al. Allergenicity and cross-reactivity of booklice (liposcelis bostrichophila): A common household insect pest in Japan. **International Archives of Allergy and Immunology**, [s. l.], v. 157, n. 4, p. 339–348, 2012.

GAUMY, J. L.; BAILLY, J. D.; BURGAT, V.; GUERRE, P. Zearalenone: proprietes et toxicite experimentale. **Revue de médecine vétérinaire**, v. 152, n. 3, p. 217-234, 2001.

GEHAN, M. et al. In vitro Efficacy Comparisons of Disinfectants Used in the Commercial Poultry Farms. **International Journal of Poultry Science**, [s. l.], v. 8, n. 3, p. 237–241, 2009.

GIANIZELLA, S. L.; PRADO, A.P. Levantamento e sazonalidade de coleópteros (Histeridae) em criação de aves poedeiras. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 27, p. 551-557, 1998. GIORDANO, B.N.E.; NONES, J.; SCUSSEL, V.M. Susceptibility of the in shell Brazil nut mycoflora and aflatoxin contamination to ozone gas treatment during storage. **Journal of Agricultural Science**, v. 4, p. 1-10. 2012.

GIRIS, et al. Effects of feeding blends of grains naturally contaminated with Fusarium mycotoxins on performance, hematology, metabolism, and immunocompetence of Turkeys. **Poultry Science**, [s. l.], v. 87, n. 3, p. 421–432, 2008.

GIRGIS, G. N.; SMITH, T. K. Comparative aspects of Fusarium mycotoxicoses in poultry fed diets containing naturally contaminated grains. **World's Poultry Science Journal**, [s. l.], v. 66, n. 1, p. 65–86, 2010. a.

GODARD, R. D. et al. 38: 709–716, 2007 # 2007 The Authors. J. Compilation #. J. **Avian Biol**, [s. l.], n. February, p. 709–717, 2007.

GOODENOUGH, A. E.; STALLWOOD, B. Differences in Culturable Microbial Communities in Bird Nestboxes According to Orientation and Influences on Offspring Quality in Great Tits (*Parus major*). **Microbial Ecology**, [s. l.], v. 63, n. 4, p. 986–995, 2012.

GRASTEAU, A.; PATRICK DANIEL, T. G.; VALÉRIE CHESNEAU, S. C. Evaluation of Glutaraldehyde, Chloramine-T, Bronopol, Incimaxx Aquatic® and Hydrogen Peroxide as Biocides against *Flavobacterium psychrophilum* for Sanitization of Rainbow Trout Eyed Eggs. **Journal of Aquaculture Research & Development**, [s. l.], v. 6, n. 12, 2015.

GREEN, E. D.; BAKER, C. Observations on the micromorphology of the tropical rat mite *Ornithonyssus bacoti* (Hirst) as revealed by scanning electron microscopy. **Journal of the South African Veterinary Association**, [s. l.], v. 67, n. 3, p. 128–132, 1996.

GREEN, E. D.; BAKER, C. Observations on the micromorphology of the tropical rat mite *Ornithonyssus bacoti* (Hirst) as revealed by scanning electron microscopy. **Journal of the South African Veterinary Association**, [s. l.], v. 67, n. 3, p. 128–132, 1996

HAGSTRUM, D. W. et al. **Mouthparts of Insects and Mites**. In: HAGSTRUM, D. W. et al. (Eds.). AACC International. First Edit ed. Minnesota: AACC International, 2013. v. 1p. 589.

HAMILTON, R. M. G. The microstructure of the hen' s egg shell -A short review. **Food Structure**, [s. l.], v. 5, n. 1, p. 99–110, 1986.

HANKE, W.; ROMITTI, P.; FUORTES, L; SOBALA, W.; MIKULSKI, M. The use of pesticides in a Polish rural population and its effect on birth weight. **International archives of occupational and environmental health**, v. 76, n. 8, p. 614-620, 2003.

HARRISON, G. F. Production of germ-free chicks: a comparison of the hatchability of eggs sterilized externally by different methods. **Laboratory Animals**, [s. l.], v. 3, n. 1, p. 51–59, 2007.

HASAN, M. M. et al. Efficacy of controlled atmosphere treatments to manage arthropod pests of dry-cured hams. **Insects**, [s. l.], v. 7, n. 3, p. 1–15, 2016.

HAZELEGER, W. C. et al. Wild, insectivorous bats might be carriers of *Campylobacter* spp. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 13, n. 1, p. 1–10, 2018.

HEBEISH, A., HAMDY, I.A, EL-SAWY, S.M, E ABDEL-MOHDY, F.A. Preparation of durable insect repellent cotton fabric through treatment with a finishing formulation containing cypermethrin. **The Journal of The Textile Institute**, v. 101, n. 7, p. 627-634, 2010.

HELENO, F.F., DE QUEIROZ, M.E.L.R., NEVES, A.A., FREITAS, R.S., FARONI, L.R.A., DE OLIVEIRA, A.F. Effects of ozone fumigation treatment on the removal of residual difenoconazole from strawberries and on their quality. **J. Environ.Sci. Health Part B-Pest. Food Cont. Agric Wastes** 49 (2):94-101, 2014.

HENCHION, M. et al. Future protein supply and demand: Strategies and factors influencing a sustainable equilibrium. *Foods*, [s. l.], v. 6, n. 7, p. 1–21, 2017.

HEUDORF, U.; ANGERER, J. Metabolites of pyrethroid insecticides in urine specimens: current exposure in an urban population in Germany. *Environmental health perspectives*, v. 109, n. 3, p. 213, 2001.

HICKMANN, F. et al. Susceptibility of the Lesser Mealworm, *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae), from Broiler Farms of Southern Brazil to Insecticides. **Journal of Economic Entomology**, [s. l.], v. 111, n. 2, p. 980–985, 2018.

HILBERT, F.; SMULDERS, F.J.M.; CHOPRA-DEWASTHALY, R.; PAULSEN, P. Salmonella in the wildlife-human interface. **Food Research International**, v. 45, n. 2, p. 603-608, 2012.

HILDMANN, F. et al. Pesticide residues in chicken eggs - a sample preparation methodology for analysis by gas and liquid chromatography/tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, [s. l.], v. 1403, p. 1–20, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2015.05.024>>

HINCKE, M. et al. **The eggshell: Structure and protective function**. [s.l.] : Woodhead Publishing Limited, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/B978-1-84569-754-9.50008-5>>

HINCKE, M. et al. *The eggshell: Structure and protective function*. [s.l.] : Woodhead Publishing Limited, 2011.

HINCKE, M. T. et al. **Biosynthesis and Structural Assembly of Eggshell Components**. In: Egg Bioscience and Biotechnology. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2007. p. 97–128.

HOAI, P. M. et al. Pesticide pollution in agricultural areas of Northern Vietnam: Case study in Hoang Liet and Minh Dai communes. **Environmental Pollution**, [s. l.], v. 159, n. 12, p. 3344–3350, 2011.

HOLMSTRUP, M. et al. Effects of ozone on gene expression and lipid peroxidation in adults and larvae of the red flour beetle (*Tribolium castaneum*). **Journal of Stored Products Research**, [s. l.], v. 47, n. 4, p. 378–384, 2011.

HORN, T. B. et al. Mite fauna (Acari) associated with the poultry industry in different laying hen management systems in Southern Brazil: A species key. **Acarologia**, [s. l.], v. 58, n. 1, p. 140–158, 2018.

HOY, M. A. **Agricultural acarology**: Introduction to integrated mite management. [s.l: s.n.]. CRC press, 2016.

HU, F. B.; MANSON, J. A. E.; WILLETT, W. C. Types of Dietary Fat and Risk of Coronary Heart Disease: A Critical Review. **Journal of the American College of Nutrition**, [s. l.], v. 20, n. 1, p. 5–19, 2001.

HUBERT, J. A. N.; STEJSKAL, V.; KUBÁTOVÁ, A. Mites as selective fungal carriers in stored grain habitats. [s. l.], p. 69–87, 2003.

HUBERT, J. et al. Annual Review of Entomology Health Hazards Associated with Arthropod Infestation of Stored Products. **Annu. Rev. Entomol**, [s. l.], v. 63, p. 553–73, 2018.

HUSSEIN S.; BRASEL J.M. Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. **Toxicology**, v. 167, n.2, p.101-134, 2001.

IBAMA. Avaliação ambiental para registro de agrotóxicos, seus componentes e afins de uso agrícola. . 2016. Disponível. Em: <http://www.ibama.gov.br/avaliacao-e-destinacao/quimicos-e-biologicos/avaliacao-ambiental-para-registro-de-agrotoxicos-seus-componentes-e-afins-de-uso-agricola>.

JABBAR, A. et al. Pesticide residues in cropland soils and shallow groundwater in Punjab Pakistan. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, [s. l.], v. 51, n. 2, p. 268–273, 1993.

JABEEN, F. et al. Examining pyrethroids, carbamates and neonicotenoids in fish, water and sediments from the Indus River for potential health risks. **Environmental monitoring and assessment**, v. 187, n. 2, p. 1-11, 2015.

JANGHEL, E. K. et al. A new sensitive spectrophotometric determination of cypermethrin insecticide in environmental and biological samples. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 18, n. 3, p. 590-594, 2007.

JAPP, A. K.; BICHO, C. de L.; SILVA, A. V. F. Da. Importância e medidas de controle para **Alphitobius diaperinus** em aviários. **Ciência Rural**, [s. l.], v. 40, n. 7, p. 1668–1673, 2010.

JAPP, A.K; BICHO, C.L; SILVA, A.V.F da. Importance and measures of control for *Alphitobius diaperinus* in poultry houses. **Ciência Rural**, v. 40, n. 7, p. 1668-1673, 2010.

JESTOI, M. et al. Determination of Fusarium mycotoxins beauvericin and enniatins (A, A1, B, B1) in eggs of laying hens using liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). **Food Chemistry**, [s. l.], v. 115, n. 3, p. 1120–1127, 2009.

KAANICHE, F. et al. Bioactive secondary metabolites from new endophytic fungus *Curvularia*. sp isolated from *Rauwolfia macrophylla*. **Plos One**, [s. l.], v. 14, n. 6, p. e0217627, 2019.

KATSUDA, Y. **Progress and Future of Pyrethroids**. In: MATSUO, N.; MORI, T. (Eds.). *Pyrethroids From Chrysanthemum to Modern Industrial Insecticide*. 1. ed. New York: Springer Berlin Heidelberg London New York, 2012. p. 220.

KHADRE, M. A.; YOUSEF, A. E.; KIM, J. G. Microbiological aspects of ozone applications in food: A review. **Journal of Food Science**, [s. l.], v. 66, n. 9, p. 1242–1252, 2001.

KNAPE, K. D. et al. Comparison of chlorine with an iodine-based compound on eggshell surface microbial populations in a commercial egg washer. **Journal of Food Safety**, [s. l.], v. 19, n. 3, p. 185–194, 1999.

LAABS, V., AMELUNG, W., PINTO, A. A., WANTZEN, M., DA SILVA, C. J., & ZECH, W. (2002). Pesticides in surface water, sediment, and rainfall of the northeastern Pantanal basin, Brazil. **Journal of Environmental Quality**, 31(5), 1636-1648.

LAMBKIN, T. A. et al. Distributions of lesser mealworm (Coleoptera : Tenebrionidae) in litter of a compacted earth floor broiler house in subtropical Queensland, Australia. **Journal of Economic Entomology**, [s. l.], v. 100, n. 4, p. 1136–1146, 2007.

LASAGABASTER, A.; ARBOLEYA, J. C.; DE MARAÑÓN, I. M. Pulsed light technology for surface decontamination of eggs: Impact on Salmonella inactivation and egg quality. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, [s. l.], v. 12, n. 2, p. 124–128, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ifset.2011.01.007>>

LASKOWSKI, D. A. Physical and chemical properties of pyrethroids. **Environment Contaminants Toxicology**, v.174,p.49-170, 2002.

LAWRENCE, J.; BRITTON, E. **Australian Beetles**. [s.l: s.n.]. v. 1

LEE, I. et al. Developmental neurotoxic effects of two pesticides: Behavior and neuroprotein studies on endosulfan and cypermethrin. **Toxicology**, v. 335, n. 2015, p. 1–10, 2015.

LEGGETT, M. J. et al. Mechanism of sporicidal activity for the synergistic combination of peracetic acid and hydrogen peroxide. **Applied and Environmental Microbiology**, [s. l.], v. 82, n. 4, p. 1035–1039, 2016.

LILIANA D'ALBA; et al. Eggshell cuticles composed of nanospheres provide antimicrobial protection and decrease UV-reflectance in seven ground-nesting bird species. **Physiological and Biochemical Zoology**, [s. l.], v. 90, n. 5, p. 1–9, 2017.

LIU, Y. C. et al. Effects of egg washing and storage temperature on the quality of eggshell cuticle and eggs. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 211, p. 687–693, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.05.056>

LOZANO, João et al. Gastrointestinal parasites of free-range chickens—A worldwide issue. **Bulletin UASVM Veterinary Medicine**, v. 76, p. 2, 2019.

LUO, Wenxiang et al. Effects of temperature on quality of preserved eggs during storage. **Poultry Science**, v. 99, n. 6, p. 3144-3157, 2020.

MAGAN, Naresh; OLSEN, Monica (Ed.). **Mycotoxins in food: detection and control**. Woodhead Publishing, 2004.

MALEKINEJAD, H.; MAAS-BAKKER, R.; FINK-GREMMELS, J. Species differences in the hepatic biotransformation of zearalenone. **The Veterinary Journal**, v. 172, n. 1, p. 96-102, 2006.

MANDEEL, Q.; NARDONI, S.; MANCIANTI, F. Keratinophilic fungi on feathers of common clinically healthy birds in Bahrain. **Mycoses**, [s. l.], v. 54, n. 1, p. 71–77, 2011.

MARANGI, M. et al. Acaricide residues in laying hens naturally infested by red mite *Dermanyssus gallinae*. **PloS one**, v. 7, n. 2, p. e31795, 2012.

MARÍA DE LOURDES PÉREZ-ARÉVALO, JORGE SOTO-BRACHO, E. A.; ARRIETA-MENDOZA, D. Lesiones en pollitos recién nacidos causadas por aflatoxina b 1 transmitida vía transovárica injuries in chickens new born produced by aflatoxin b 1 transmitted ovarian route. *Revista Científica, FCV-LUZ*, [s. l.], v. 22, n. 3, p. 217–224, 2012.

MARTINS, C. C.; ALVES, L. F. A.; MAMPRIM, A. P. Ação de extratos vegetais e desinfetantes sobre parâmetros biológicos e patogenicidade do fungo *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. (Ascomycota: Cordycipitaceae). **Brazilian Journal of Biology**, [s. l.], v. 76, n. 2, p. 420–427, 2016.

MASON, L.J.; WOLOSHUK, C. P.; MAIER, D. E. **Efficacy of ozone to control insects, molds and mycotoxins**. In: Proceedings of the International Conference on Controlled Atmosphere and Fumigation in Stored Products, Nicosia, Cyprus Printer Ltd., Nicosia. 1997. p. 665-670.

MATÍN RAMIREZ. Uso de ozônio como pesticida em armazéns de grãos. **Grãos Brasil**, Paraná, p. 36, 2019.

MATTIOLI, S. et al. Impact of ozone and UV irradiation sanitation treatments on the survival of Salmonella and the physical–chemical characteristics of hen eggs. **Journal of Applied Poultry Research**, [s. l.], v. 29, n. 2, p. 409–419, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.japr.2020.01.004>>

MAZIERO, M. T.; BERSOT, L. dos S. Micotoxinas em alimentos produzidos no Brasil. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v.12, p.89-99, 2010.

MCALLISTER, J. C.; STEELMAN, C. D.; NEWBERRY, L. A.; SKEELES, J. K. Isolation of infectious bursal disease virus from the lesser mealworm, *Alphitobius diaperinus* (Panzer). **Poultry Science, Savoy**, v. 74, n. 1, p. 45-49, 1995.

MCDONOUGH, M. X. et al. Ozone application in a modified screw conveyor to treat grain for insect pests, fungal contaminants, and mycotoxins. **Journal of Stored Products Research**, [s. l.], v. 47, n. 3, p. 249–254, 2011.

MCKELVEY, B. **Evolution and Organizational Science**. In: BAUM, J. A. C.; SINGH, J. V. (Eds.). *Evolutionary Dynamics of Organizations*. 1. ed. New York: OXFORD UNIVERSITY PRESS, 1994.

MCTIC. **Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações**. Estratégia Nacional De Ciência, Tecnologia E Inovação 2016|2022, [s. l.], p. 136, 2016.

MEDEIROS, R.J et al. Casos de intoxicações exógenas em cães e gatos atendidos na Faculdade de Veterinária da Universidade Federal Fluminense durante o período de 2002 a 2008. **Ciência Rural**, v. 39, n. 7, 2009.

MENDES, A.A; DE ALENCAR NÄÄS, I; MACARI, M. **Produção de frangos de corte**. FACTA, 2004.

MENEGARO, A. et al. Sanitizantes: Concentrações e Aplicabilidade na Indústria de Alimentos. **Scientia Agraria Paranaensis**, [s. l.], v. 15, n. 2, p. 171–174, 2016.

MESSENS, W. et al. **Egg decontamination by washing**. Improving the Safety and Quality of Eggs and Egg Products [s.l.] : Woodhead Publishing Limited, UK, v. 2, 2011.

MINE, Y.; OBERLE, C.; KASSAIFY, Z. Eggshell matrix proteins as defense mechanism of avian eggs. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s. l.], v. 51, n. 1, p. 249–253, 2003.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (MAPA). **Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários (AGROFIT)**. 2010. Disponível em: <http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: 20 de Julho 2016.

MIYAMOTO-T; et al. Salmonella enteritidis contamination of eggs from hens inoculated by vaginal, cloacal, and intravenous routes. **Avian Diseases**, [s. l.], v. 41, n. 2, p. 296–303, 1997.

MOREIRA, J.C.et al. Groundwater and rainwater contamination by pesticides in an agricultural region of Mato Grosso state in central Brazil.**Ciência & Saúde Coletiva**, v. 17, n. 6, p. 1557-1568, 2012.

MOSER, J. C. et al. Do mites phoretic on elm bark beetles contribute to the transmission of Dutch elm disease? **Naturwissenschaften**, [s. l.], v. 97, n. 2, p. 219–227, 2010.

MULLENS, B. A.; MURILLO, A. C. **The future of poultry pest management**. [s.l.] : Elsevier Ltd, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-08-100915-4.00014-2>>

MUSA, I. W. et al. Common causes of traumatic ventriculitis in free range and intensively managed poultry in Zaria, Nigeria. **Veterinary World**, [s. l.], v. 4, n. 11, p. 511–514, 2011.

NAKAYAMA, M. et al. Method for rapid detection and identification of chaetomium and evaluation of resistance to peracetic acid. **Journal of Food Protection**, [s. l.], v. 76, n. 6, p. 999–1005, 2013.

NARAHASHI, Toshio. Neuronal ion channels as the target sites of insecticides. **Pharmacology & toxicology**, v. 79, n. 1, p. 1-14, 1996.

NASUTI, C. Different effects of Type I and Type II pyrethroids on erythrocyte plasma membrane properties and enzymatic activity in rats. **Toxicology**, v. 191, n. 2, p. 233-244, 2003.

NEAL, A.P. et al. Allethrin differentially modulates voltage-gated calcium channel. **Toxicological Sciences**, v.116, n.2, p.604-613.

NEELIMA, P. et al. Toxicological assessment of cypermethrin (25% EC) on activity levels of aspartate amino transferase (ASAT) and alanine amino transferase (ALAT) in the tissues of *Cirrhinus mrigala* (Ham.). **World J. Pharm. Pharmaceu. Sci.** 2015b, v. 4, n. 4, p. 825-832, 2015.

NOH, M. Y. et al. Cuticle formation and pigmentation in beetles. **Current Opinion in Insect Science**, [s. l.], v. 17, p. 1–9, 2016.

NYS, Y.; BAIN, M.; VAN IMMERSEEL, F. Improving the safety and quality of eggs and egg products: **Egg chemistry, production and consumption**. [s.l: s.n.].

O'CONNOR, J. P. *Alphitobius diaperinus* (Panzer) (Col.: Tenebrionidae) damaging polystyrene insulation in irish piggery. **Entomologist's Monthly Magazine**, v. 123, p. 1472-1475, 1987.

OKAMURA, M. et al. Comparative evaluation of a bivalent killed Salmonella vaccine to prevent egg contamination with Salmonella enterica serovars *Enteritidis*, *Typhimurium*, and *Gallinarum* biovar Pullorum, using 4 different challenge models. **Vaccine**, [s. l.], v. 25, n. 25, p. 4837–4844, 2007.

OVIEDO-RONDÓN, E. O. Technologies to mitigate the environmental impact of broiler production. **Revista Brasileira de Zootecnia**, [s. l.], v. 37, n. spe, p. 239–252, 2008.

PALM, B. Pesticide use in rice cultivation in Tarapoto , Peru. Usage patterns and pesticide residues in water sources. **Rapport / Sveriges lantbruksuniversitet, Miljöanalys**, [s. l.], v. 19, p. 130, 2007.

PARENTE, C. E. T. et al. Pyrethroids in chicken eggs from commercial farms and home production in Rio de Janeiro: Estimated daily intake and diastereomeric selectivity. **Chemosphere**, [s. l.], v. 184, p. 1261–1269, 2017. a.

PERDOMO, C.C. **Controle do ambiente e produtividade de frangos de corte: a produção animal na visão dos brasileiros**. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 28, Piracicaba. Anais.Piracicaba, 2001. p. 91- 110.

PIMPÃO, C. T.; ZAMPRONIO, A. R.; SILVA DE ASSIS, H. C. Effects os deltamethrin on hematological parameters and enzymatic activity in *Ancistrus multispinis* (Pisces, Teleostei). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 88, p. 122- 127, 2007.

PIRES, D.X; CALDAS, E.D; RECENA, M.C.P. Uso de agrotóxicos e suicídios no Estado do Mato Grosso do Sul, Brasil Pesticide use and suicide in the State of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Cad. Saúde Pública**, v. 21, n. 2, p. 598-605, 2005.

PIRES, P. G. S. et al. Effects of rice protein coating enriched with essential oils on internal quality and shelf life of eggs during room temperature storage. **Poultry Science**, [s. l.], v. 99, n. 1, p. 604–611, 2020.

PITT, J.I. **The genus *Penicillium* and its teleomorphics states *Eupenicillium* and *Talaromyces***. London: Academic Press, 634p., 1979.

PITTELLA, Carla Martins. **Determinação de resíduos de pesticidas em mel de abelhas (*Apis* sp) por cromatografia de fase gasosa acoplada a espectrometria de massas**. 2009. 119 f. 2009. Tese de Doutorado. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) –Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

POLAT, H.; ERKOÇ, F. U.; VIRAN, R.; KOÇAK, O. Investigation of acute toxicity of beta-cypermethrin on guppies *Poecilia reticulata*. **Chemosphere**, v. 49, p. 39-44, 2002.

POPOWSKA-NOWAK, E.; TUMIALIS, D.; PEZOWICZ, E. Susceptibility of lesser mealworm, *Alphitobius diaperinus* Panzer (Coleoptera: Tenebrionidae) to entomopathogenic fungi isolated from poultry houses litter and nearby soil. **Studia Ecologiae et Bioethicae**, [s. l.], v. 15, n. 4, p. 31–39, 2017.

POVALUK, M. Ciclo e controle do *Alphitobius diaperinus* (COLEOPTERA, TENEBRIONIDAE) no Município de Quitandinha, PR. Saúde e meio ambiente: **Revista interdisciplinar**, [s. l.], v. 6, n. 1, p. 107, 2017.

PRESTES, O.D. et al. QuEChERS–Um método moderno de preparo de amostra para determinação multirresíduo de pesticidas em alimentos por métodos cromatográficos acoplados à espectrometria de massas. **Química Nova**, v. 32, n. 6, p. 1620-1634, 2009.

QUEIROZ, S. C. N.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. Métodos de extração e/ou concentração de compostos encontrados em fluidos biológicos para posterior determinação cromatográfica. **Química Nova**, v.24, n.1, p.68-76, 2001.

RAMIREZ, M.. Uso do ozônio como pesticida em armazéns de grãos, **Revista Grãos Brasil** [s. l.], p. 13–15, 2018.

RAPER, K. B.; FENNELL, D.I. **The genus Aspergillus**. Baltimore: The Williams e Wilkings Company, 686p., 1965.

REBELO,F.M; CALDAS, E.D; HELIODORO, V.O; REBELO, R.M . Intoxicação por agrotóxicos no Distrito Federal, Brasil, de 2004 a 2007-análise da notificação ao Centro de Informação e Assistência Toxicológica. **Ciência saúde coletiva**, v. 16, n. 8, p. 3493-502, 2011.

RÉHAULT-GODBERT, S.; GUYOT, N.; NYS, Y. The golden egg: Nutritional value, bioactivities, and emerging benefits for human health. **Nutrients**, [s. l.], v. 11, n. 3, p. 1–26, 2019.

REICH, H.; TRIACCHINI, G. A. Occurrence of residues of fipronil and other acaricides in chicken eggs and poultry muscle/fat. **EFSA Journal**, [s. l.], v. 16, n. 5, 2018.

REZENDE, M. V. O. et al. Determinação de resíduo de cipermetrina em fígado bovino por meio de cromatografia líquida acoplada espectrometria de massas (LC-MS). **Revista em Agronegocio e Meio Ambiente**, [s. l.], v. 6, n. 2, p. 261–270, 2013.

REZENDE, M.V.O. et al. determinação de resíduo de cipermetrina em fígado bovino por meio de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (lc-ms)/determination of cypermethrin residue in bovine liver by liquid chromatography coupled to mass spectrometry (lc-ms). **Revista em Agronegócio e Meio Ambiente**, v. 6, n. 2, p. 261, 2013.

RIGHI, D. Abbud; PALERMO-NETO, J. Behavioral effects of type II pyrethroid cyhalothrin in rats. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 191, n. 2, p. 167-176, 2003.

RODRÍGUEZ-NAVARRO, A. B. et al. Change in the chicken eggshell cuticle with hen age and egg freshness. **Poultry Science**, [s. l.], v. 92, n. 11, p. 3026–3035, 2013.

ROMANINI, Camila Almeida; TEIXEIRA, Andrey Borges. Atendimento emergencial de intoxicação por piretróide em cão na clínica veterinária da FAI. **Revista OMNIA Saúde**, v. 5, n. 2, p. 15-23, 2011.

ROZADO, A. F. et al. Aplicação de ozônio contra *Sitophilus zeamais* e *Tribolium castaneum* em milho armazenado. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, [s. l.], v. 12, n. 3, p. 282–285, 2008.

RUANGWONG, K. et al. Atmospheric corona discharge plasma for rice (*Oryza sativa* L.) seed surface modification, fungi decontamination and shelf-life extension. **Plasma Medicine**, [s. l.], v. 10, n. 3, p. 191–201, 2021.

SAILLENFAIT, Anne-Marie; NDIAYE, Dieynaba; SABATÉ, Jean-Philippe. Pyrethroids: exposure and health effects—an update. **International journal of hygiene and environmental health**, v. 218, n. 3, p. 281-292, 2015.

SAMIULLAH, S.; ROBERTS, J. R. The eggshell cuticle of the laying hen. **World's Poultry Science Journal**, [s. l.], v. 70, n. 4, p. 693–708, 2014.

SANTOS, MAT dos; AREAS, Miguel Arcanjo; REYES, Felix Guillermo Reyes. Piretróides—uma visão geral. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, v. 18, n. 3, p. 339-349, 2008.

SARTOR, I. F.; SANTARÉM, V. Á. **Agentes Empregados no Controle de Ectoparasitos**. In: BERNARDI, H. de S. S. S. L. G. M. M. (Ed.). *Farmacologia aplicada em medicina veterinaria*. 6. ed. São Paulo: Guanabara, 2017. v. 6 edicion p. 1420.

SAVI, G. D.; PIACENTINI, K. C.; SCUSSEL, V. M. Reduction in residues of deltamethrin and fenitrothion on stored wheat grains by ozone gas. **Journal of Stored Products Research**, [s. l.], v. 61, p. 65–69, 2014.

SAVI, G.D.; SCUSSEL, V.M. Effects of ozone gas exposure on toxigenic fungi species from Fusarium, Aspergillus, and Penicillium genera **Ozone: Science & Engineering**, v. 36, n. 2, p. 144-152, 2014.

SCANES, C. G. The global importance of poultry. **Poultry Science**, [s. l.], v. 86, n. 6, p. 1057–1058, 2007.

SCHMIDT, C. J. et al. Comparison of a modern broiler line and a heritage line unselected since the 1950s. **Poultry Science**, [s. l.], v. 88, n. 12, p. 2610–2619, 2009.

SCUSSEL, V. M. (2002). **Fungos em grãos armazenados**. In I. LORINI, L. H. MIIKE, e V. M. SCUSSEL (Eds.), *Armazenagem de grãos* (pp. 675–691). Biogeneziz: Campinas

SCUSSEL, V. M.; SAVI, G. D.; KLUCZKOVSKI, A. M. **Fungos e micotoxinas associados a grãos armazenados**. In: LORINI, I., et al. *Armazenagem de Grãos*. Jundiaí: Instituto Bio Geneziz, 2018. p. 735-758.

SCUSSEL, V. M. **Micotoxinas em Alimentos**, 1. ed. Florianópolis: Insular, 1998.

SESTI, L.A.C. **Biosseguridade em granjas de reprodutores**. In: MACARI, M.; MENDES, A. A. *Manejo de matrizes de corte*. Campinas, SP: Facta, 2005. Cap.12, p. 243-317.

SILVA, G. S. et al. Effectiveness of the compound chlorpyrifos+ cypermethrin+ citronellal against *Alphitobius diaperinus*: laboratory analysis and residue determination in carcasses. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v. 9, n. 3, p. 157-160, 2007.

SILVA, V. S. et al. Efeito de tratamentos sobre a carga bacteriana de cama de aviário reutilizada em frangos de corte. **Comunicado Técnico Embrapa Suínos e Aves**, [s. l.], v. 467, p. 1–10, 2007.

SINGH, S. et al. Prevalence of *Salmonella* in chicken eggs collected from poultry farms and marketing channels and their antimicrobial resistance. **Food Research International**, [s. l.], v. 43, n. 8, p. 2027–2030, 2010.

SKOV, M. N. et al. The Role of Litter Beetles as Potential Reservoir for *Salmonella enterica* and Thermophilic *Campylobacter* spp. Between Broiler Flocks. **Avian Diseases**, [s. l.], v. 48, n. 1, p. 9–18, 2004.

SKVARLA, M. J. et al. Contemporary Acarology. [s.l: s.n.].

SOARES, C; WEBER, A.; SCUSSEL, V. M. Insecticide Contamination of Pyrethroids Group in the Poultry Farming Activities-A Review. **International Journal of Science Engineering Investigations**, [s. l.], v. 7, n. 72, p. 133–145, 2019.

SOARES, C. et al. Living Organisms And Biodegradation Changes Of Poultry Litter During Breeding And Their Relation To Chicken Health And **Poultry Products Safety**. [s. l.], v. 0869, n. 11, p. 4–11, 2019. b.

SOARES, C. et al. Scanning Electron Microscopy of Macrofauna Isolated From Poultry Litter: No Pesticide Treated. **Journal of Engineering (IOSRJEN)**, [s. l.], v. 09, n. 9, p. 82–91, 2019. a.

SOARES, C. E. . et al. Fungi Activity on Chicken (*Gallus gallus domesticus*) Eggshell and Their Pores Invasion by Scanning Electron Microscopy. **International Journal of Engineering Research and Applications**, [s. l.], v. 10, n. 6, p. 19–27, 2020. Disponível em: <http://www.ijera.com/papers/vol10no6/Series-2/D1006021927.pdf>

SOARES, C. E. da S. et al. Antifungal Action of Ozone on Chicken Eggshell Cuticles : A Preliminary Study. **Ozone: Science & Engineering**, [s. l.], v. 00, n. 00, p. 1–6, 2021. b. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/01919512.2021.1967722>>

SOARES, C. E. da S. et al. Fungos de armazenagem e micotoxinas em dieta para ovinos (*Ovis aries* L.): Estudo de caso. **Pubvet**, [s. l.], v. 11, n. 12, p. 1210–1219, 2017.

SOARES, C. E. et al. Peracetic acid : Effect on the Chicken Eggshell Cuticle and Decontaminating Action on Filamentous Fungi. **Jokull Journal**, [s. l.], v. 71, n. 4, p. 82–96, 2021. a. <https://www.jokulljournal.com/coredoux/index.php/pdf/stream/RL6X7/1614793679>.

SOARES, C. E. S. et al. Use of ozone gas as a green control alternative to beetles *Alphitobius diaperinus* (panzer) infestation in aviary bed utilized in the poultry industry.

Chemical Engineering Transactions, [s. l.], v. 64, p. 589–594, 2018.

SOARES, C. E.; WEBER, A.; SCUSSEL, V. M. Stereo and scanning electron microscopy characteristics of poultry breeding beetle (*Alphitobius diaperinus*) - a filamentous toxigenic fungi carrier. **Emirates Journal of Food and Agriculture**, [s. l.], v. 30, n. 2, p. 150–156, 2018.

SOARES, C.E; SCUSSEL, V.M; DAHLKE, F. **Pyrethroid and Residues in Chickens and Poultry Litter**. In: AHAMED, I. I.; LICHTFOUSE, E. (Eds.). Sustainable Agriculture Reviews. 47. ed. Cham: Springer India, 2021. v. 47p. 145–166.

SODERLUND, D. M. et al. Mechanisms of pyrethroid neurotoxicity: implications for cumulative risk assessment. **Toxicology**, v. 171, n. 1, p. 3–59, 2002.

SOLOMON, S. B. et al. **Hen ' s egg shell structure and function**. [s. l.], p. 1–24, 1994.

SOUZA, C. de F. **Instalações para frangos de corte e poedeiras**. [s. l.], p. 17, 2003.

SPARKS, N. H. C. EGGS: **Microbiology of Fresh Eggs**. Second Edi ed. [s.l.] : Elsevier, 2014. v. 1 Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00089-6>>

SPARKS, N. H. C.; BOARD, R. G. Bacterial penetration of the recently oviposited shell of hens' eggs. *Australian Veterinary Journal*, [s. l.], v. 62, n. 5, p. 169–170, 1985.

SPINOSA, H.S.; GÓRNIAK, S.L.; PALERMO-NETO, J. **Toxicologia Aplicada à Medicina Veterinária**, Barueri: Manole, 2008. 942p.

STADELMAN, WILLIAM J.; COTTERILL, O. J. Egg science and technology. Fourth ed. New York,: **The Howorth Press**, 2013.

STRINGHINI, J. H DI RESENDE, A.; CAFÉ, M.B.; MOGYCA, L.; NADJA, S.; ANDRADE, M.A.. Efeito do peso inicial dos pintos e do período da dieta pré-inicial sobre o desempenho de frangos de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 32, n. 2, p. 353-360, 2003.

STRINGHINI, J. H. et al. Desempenho, balanço e retenção de nutrientes e biometria dos órgãos digestivos de frangos de corte alimentados com diferentes níveis de proteína na ração pré-inicial. **Revista Brasileira de Zootecnia**, [s. l.], v. 35, n. 6, p. 2350–2358, 2006.

SULEIMAN, E.; SULEIMAN, N. Fungal Contamination of Table Eggs Sold in Khartoum State, **Sudan. Advances in Research**, [s. l.], v. 14, n. 4, p. 1–6, 2018.

SUMAN, G.; NARAVANENI, Rambabu; JAMIL, Kaiser. In vitro cytogenetic studies of cypermethrin on human lymphocyte. **Indian journal of experimental biology**, v. 44, n. 3, p. 233, 2006.

SVIDZINSKI, T. I. E.; SVIDZINSKI, A. Eficiência do ácido peracético no controle de staphylococcus aureus metilina resistente. **Ciência, Cuidado e Saúde**, [s. l.], v. 6, n. 3, p. 312–318, 2007.

SZABLEWSKI, T.; L. TOMCZYK, and R. C.-R. Characteristics of isolated fungal microflora from the content of consumption eggs. **Apar. Bad. Dydak.**, [s. l.], v. 1, p. 8–11, 2015.

TEIXEIRA, C.F.; DA SILVA AUGUSTO, L.G.; MORATA, T.C. Saúde auditiva de trabalhadores expostos a ruído e inseticidas. **Revista de Saúde Pública**, v. 37, n. 4, p. 417–423, 2003.

TOMBERLIN, J.K.; RICHMAN, D.; MYERS, H.M. Susceptibility of *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae) from broiler facilities in Texas to four insecticides. **Journal of Economic Entomology**, v.101, n.2, p.480-483, 2008.

TOMCZYK, Ł. et al. Characterisation of the mycobiota on the shell surface of table eggs acquired from different egg-laying hen breeding systems. **Toxins**, [s. l.], v. 10, n. 7, 2018.

VARGA, L.; SZIGETI, J. Use of ozone in the dairy industry: A review. **International Journal of Dairy Technology**, [s. l.], v. 69, n. 2, p. 157–168, 2016.

VELISEK, J.; JURCIKOVÁ, J.; DOBSIKOVÁ, R.; SVOBODOVÁ, Z.; PIACKOVÁ, V.; MÁCHOVÁ, J.; NOVOTNY, L. Effects of deltamethrin on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Sciencedirect. Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 23, p. 297-301, 2007.

VIEGAS, C. et al. Fungal contamination of poultry litter: a public health problem. **Journal of toxicology and environmental health. Part A**, [s. l.], v. 75, n. 22–23, p. 1341–50, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23095152>>

VIEIRA, P. C.; MAFEZOLI, J.; BIAVATTI, M. W. Inseticidas de origem vegetal. In: FERREIRA, J. T. B.; CORRÊA, A. G.; VIEIRA, P. C. Produtos naturais no

WANG, J. et al. Deterioration of eggshell quality in laying hens experimentally infected with H9N2 avian influenza virus. **Veterinary Research**, [s. l.], v. 47, n. 1, p. 1–10, 2016.

WEAVER, W. D. **Commercial Chicken Meat and Egg Production**. Fifth Edition. [s.l: s.n.].

WHITE, D. et al. Evaluation of layer cage cleaning and disinfection regimens. The **Journal of Applied Poultry Research**, [s. l.], v. 27, n. 2, p. 180–187, 2018.

WILKS, M.F.; WILKS, M. Pyrethroid-induced paresthesia—a central or local toxic effect. *Journal of Toxicology: Clinical Toxicology*, v. 38, n. 2, p. 103-105, 2000.

WORTHING, B. C. R. et al. **The pesticide manual: a world compendium**. British Crop Protection Council, Londres (RU)., 1987.

XINYI, E.; SUBRAMANYAM, B.; LI, B. Efficacy of ozone against phosphine susceptible and resistant strains of four stored-product insect species. **Insects**, [s. l.], v. 8, n. 2, 2017.

YUAN, Y. et al. Residue of chlorpyrifos and cypermethrin in vegetables and probabilistic exposure assessment for consumers in Zhejiang Province, China. **Food Control**, v. 36, n. 1, p. 63-68, 2014.

YÜCEER, M.; ADAY, M. S.; CANER, C. Ozone treatment of shell eggs to preserve functional quality and enhance shelf life during storage. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, [s. l.], v. 96, n. 8, p. 2755–2763, 2016.

ZAHOOR-UL-HASSAN et al. Pathological responses of white Leghorn breeder hens kept on ochratoxin a contaminated feed. **Pakistan Veterinary Journal**, [s. l.], v. 30, n. 2, p. 118–123, 2010.

ZAIN, M. E. Impact of mycotoxins on humans and animals. **Journal of Saudi Chemical Society**, [s. l.], v. 15, n. 2, p. 129–144, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jscs.2010.06.006>>

APÊNDICE A- Publicações realizadas durante o período da tese.

Artigo referente ao Capítulo 1.

Emirates Journal of Food and Agriculture. 2018. 30(2): 150-156
doi: 10.9755/ejfa.2018.v30.i2.1615
http://www.ejfa.me/

REGULAR ARTICLE

Stereo and scanning electron microscopy characteristics of poultry breeding beetle (*Alphitobius diaperinus*) – a filamentous toxigenic fungi carrier

Carlos Eduardo da Silva Soares^{1*}, André Weber², Vildes Maria Scussel¹

¹Laboratory of Mycotoxicology and Food Contaminants, Department of Food Science and Technology, Federal University of Santa Catarina, Brazil; ²Federal Institute Catarinense - Campus Araquari, SC, Brazil

ABSTRACT

This study isolated *Alphitobius diaperinus* (live and dead) insects from shed's aviary bed to investigate their fungi spores distribution (that affects chicken health and meat production) and their accumulation sites (*dorsal & ventral*) characteristics by different microscopies (stereo and scanning electron). Despite *live* beetles being the main fungi spore carriers, the *dead* ones had far more spores attached on their body exoskeleton thereby being a focus of infection. That was due to the anatomical sites favoring spores trapping effect, together with beetles' different moisture content. Regarding the spores distribution and so the hyphae presence & mycelia concentration on *dead A. w diaperinus*, they were mainly detected at the (a) elytra, elytral suture and pronotum (on the *dorsal* side). Despite that, the highest spores/mycelia concentration was at the mouthparts, prosternum and legs (femur & tarsus) (on the *ventral* side). Indeed the beetle's *ventral* anatomical microscopic structures (mouthparts & legs) sheltered the highest fungi spores concentration and colonies proliferation. Thus *dead* beetle colonies growth lead to spore multiplication, their dissemination throughout the aviary bed environment and so their contact to chicken feet and body, leading to discomfort and diseases development/mycotoxicosis. The filamentous fungi were most detected from the *Aspergillus* and *Penicillium* genera. Therefore *dead* beetles should be removed from aviary (at each 45 breeding cycle) to reduce contamination. They represent rich substrates for fungi development with possibility of toxin formation, apart from the chicken diseases exposure due to their insects eating habits.

Key-words: aviary bed, fungi, mycotoxins, poultry, vectors

Artigo referente ao Capítulo 6.



CHEMICAL ENGINEERING TRANSACTIONS

VOL. 64, 2018

Guest Editors: Enrico Bardone, Antonio Marzocchella, Tajalli Keshavarz
 Copyright © 2018, AIDIC Servizi S.r.l.
ISBN 978-88-95608-56-3; ISSN 2283-9216

589

A publication of



The Italian Association
 of Chemical Engineering
 Online at www.aidic.it/cet

DOI: 10.3303/CET1864099

Use of Ozone Gas as a Green Control Alternative to Beetles *Alphitobius diaperinus* (Panzer) Infestation in Aviary Bed Utilized in the Poultry Industry

Carlos E. da S. Soares^{*a}, André Weber^b, Elisa H.S. Moecke^c, Carolina K. de Souza^d, Mercedes G.R. Reiter^d, Vildes M. Scussel^a

^a Laboratory of Mycotoxicology and Food Contaminants - LABMICO. Food Science and Technology Department – CAL. Center of Agricultural Sciences. Federal University of Santa Catarina. Florianopolis. SC. Brazil;
^b Federal Institute of Santa Catarina - Campus Araquari. SC;
^c Laboratory of Microscopy. Food Science and Technology Department. Center of Agricultural Sciences. Federal University of Santa Catarina. Florianopolis. SC. Brazil.
^d Chemical Engineering Department - University of Blumenau / FURB. Blumenau. SC. Brazil.
c.ess@posgrad.ufsc.br

The control of poultry farming beetles (*Alphitobius diaperinus* Panzer – Coleoptera, Tenebrionidae) infestation around the world is based exclusively on Pyrethroid Group (cypermethrin) insecticide application (during the 45 days of poultry breeding). Some studies report beetles population's resistance, reinforcing the need of alternative methods for beetles control. Ozone (O₃) gas is considered a GRAS (generally recognized as safe) gas. The aim of this study was to determine the efficacy of O₃ gas treatment to eliminate beetles *A. diaperinus* development both, at adult and larvae stages. The insects were treated with three O₃ concentrations (30/40/60ppm) and exposure times (48, 36 and 24 h). All treatments were effective against its larvae stage. However, the most efficient (100%) treatment for adult beetles elimination was at 40 ppm, during 36 h of exposure. There is a need for future research on O₃ application in order to reduce the pesticides application/exposure, especially from the Pyrethroid Group, widely spread for pest control in the poultry environments (roofs, floor, screens and/or curtains).

Artigo referente ao Capítulo 5.

Ácaros (*Trichouropoda* sp.) como Vetores de Fungos e Sua Presença em Rações Armazenadas em Galpões Avícolas

135

Carlos Eduardo da S. Soares¹; Milena O. Dutra¹; Bárbara C. F. Ferrão¹; Bruna A. da Silva¹, Joyce P. Marques¹; Cristina L. Rüntzel; Vanessa Simão¹; Vildes M. Scussel¹.

RESUMO

Vários organismos vivos (roedores, insetos, ácaros, fungos, bactérias) exploram os grãos armazenados como fonte de alimentação e utilizam locais de armazenagem como esconderijo. Os ácaros podem ser encontrados nestes produtos e ambientes de armazenagem, além utilizarem/serem atraídos pela matéria orgânica em decomposição, na presença das aves e seus ninhos. Causam danos qualitativos e quantitativos em *commodities* e são considerados problemas quando há intensa infestação. O objetivo desse trabalho foi avaliar a presença de ácaros e sua conexão com fungos que infestam ambientes de armazenagem de ração em galpões avícolas. Após captura e isolamento foi possível através de análises por microscopia eletrônica de varredura a identificação da presença de *Trichouropoda* sp. como vetor de fungos, principalmente quando estão já mortos (substrato para esporos). Os fungos encontram em seus sítios anatômicos locais ideais para o desenvolvimento de suas estruturas reprodutivas viabilizando seu desenvolvimento e deterioração (e toxinas) nas rações.

Palavras-chave: Ácaros, Grãos, Fungos, Microscopia

Artigo referente ao Capítulo 5.

REVISTA ACADÊMICA: CIÊNCIA ANIMAL

OPEN ACCESS

SESSION I
IMPACT OF MYCOTOXINS IN ANIMAL PERFORMANCE

Contamination of poultry litter by toxigenic fungi and its relation with mycotic pododermatitis

Carlos Eduardo Soares*, Bárbara Cristina Ferrão Ferreir, Milena de Oliveira Dutra, Clarissa Maia Aquino, Vanessa Simão, Vildes Maria Scussel

Laboratory of Mycotoxicology and Food Contaminants, Food Science and Technology Department, Center of Agriculture Sciences, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, SC, Brazil

Contamination by living organisms in poultry litter may occur throughout the breeding stages of poultry. The presence of mycotoxins in poultry feed or poultry litter can affect poultry health and the safety of meat products. Pododermatitis is an injury to the plantar surface of the feet of poultry caused by nutritional factors and inadequate handling of poultry litter. The present work identified genera of filamentous fungi that produce mycotoxins, present in the poultry litter and its relation with tegument tissue of the chickens feet. As expected, the physical-chemical characteristics of the poultry litter as pH, moisture (mc) and water activity (a_w) ranged from 6.3 to 8.7, 9.7 to 40.6% and 0.74 to 0.98, respectively. These conditions are ideal for the proliferation of fungi toxigenic to produced mycotoxins. Through scanning electron microscopy, it was possible to identify fungi of the genus *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium* that were present in all stages of breeding. Most isolated fungi can produce mycotoxins (aflatoxins, fumonisins/deoxinivalenol/zearalenone and ochratoxin A, respectively). Tissue fungal infections (meat) can lead to possible contamination by fungal toxins, since the feet of the poultry are in direct contact with the aviary bed. This dermal contact with mycotoxins compromises the quality of the poultry foot that is currently a product of export to several countries and also the health of poultry.

Keywords: *Aspergillus*. Fungi. Mycotoxins. Poultry litter. *Trichoderma*.

Artigo referente ao Capítulo 5.

International Journal of Engineering and Technical Research (IJETR)
ISSN: 2321-0869 (O) 2454-4698 (P) Volume-9, Issue-11, November 2019

Living Organisms And Biodegradation Changes Of Poultry Litter During Breeding And Their Relation To Chicken Health And Poultry Products Safety

Soares CE, Dahlke F, Maiorka A, Moecke EHS, Dutra MO, Scussel VM

Abstract— Contamination and biodegradation changes of poultry litter that may occur during the breeding stages of poultry and may affect chicken health and meat product safety have been studied. The living organisms most isolated period were insects (mainly *Alphitobius* sp. and *Liposcelis* sp.), mites (*Acarus* sp. and *Dermanyssus* sp.) and fungi (*Trichoderma* sp., *Aspergillus* sp., *Fusarium* sp. and *Penicillium* sp.). The poultry litter biodegradation that occurred throughout the breeding period, lead to (a) an increase on its pH (6.3 to 8.7) and humidity (mc: 9.7 to 40.6%; - aw: 0.74 to 0.98); (b) change on the texture characteristics, color and reduction on particles size (regular to as small as <10 mm i.e., 34 to 88% of total). In scanning electron microscopy, were registered as cell wall disintegration and tissue fungi infections. Changes detected, can lead to reduction of animals speed and possible fungi toxins contamination.

Index Terms— chicken, fungi, insects, meat, pine shavings, poultry litter, residue

Chicken feed residues (ground corn) and animal wastes (faeces with urea) together with high humidity (especially near the drinkers & feeders) make Poultry litter an optimal environment for living organisms growth, which interferes to poultry development, health and well-being (Nadia et al., 2015). In addition, the internal environment conditions, when reaching also high relative humidity / rainy days and temperature, are optimal for fungi (both deteriorating and toxigenic). Apart from foreigner matters presence and environment favorable conditions, the Poultry litter matter itself (i.e., the cellulosic material utilized), becomes attractive to several deteriorating living organisms attack, that is responsible for its biodegradation (Cavalcante. 1982; Nadia et al 2015).

The insects that infest Poultry litters reported in the literature that are considered the main poultry farming pest

Artigo referente ao Capítulo 5.

IOSR Journal of Engineering (IOSRJEN)

www.iosrjen.org

ISSN (e): 2250-3021, ISSN (p): 2278-8719

Vol. 09, Issue 9, September, 2019, ||Series -I || PP 82-91

Scanning Electron Microscopy of Macrofauna Isolated From Poultry Litter: No Pesticide Treated

Soares, C.E.S¹ ; Maiorka, A³; Dahlke, F.²; Scussel, V.M¹.

¹Laboratory of Mycotoxicology and Food Contaminants, Food Science and Technology Department, Center of Agriculture Sciences, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis – SC, Brazil.

²Laboratory of Poultry Science, Department of Animal Science, Federal University of Santa Catarina, Center for Agricultural Sciences, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brazil.

³Laboratory of Animal Nutrition. Department of Animal Science, Federal University of Paraná, Curitiba, PR, Brazil.

Corresponding Author: Soares, C.E.S

Received 06 September 2019; Accepted 21 September 2019

Abstract: Poultry companies develop technical standards in which insecticides from the Pyrethroid Group are used to control insects and ectoparasites in aviary environment. This work presents an investigation through scanning electron microscopy on the macrofauna identification that develops in the poultry house. Although those living organisms are not harmful to the birds (are part of the local trophic chain) they act as fungi spores vectors and their dead carcasses as substrate for fungi colonies growth. The micrographs showed the insects isolated from the poultry litter with the birds still lodged (and their anatomical fungi spores hidden/trapped sites). Beetles isolated were from *Alphitobius* and *Carcinops* genus. The psychoid genus of *Liposcelis* were numerous, along with mites (*Trichouropoda* sp. and *Acarus* sp.). Regarding, to the pseudoscorpions from *Neobisium* genus only a few individuals were identified. Some of those insects (part of the present trophic chain), are considered predators of other insects larvae. The use of insecticides before and during the breeding cycle reduces non-harmful insects and alters microflora equilibrium leading to resistance and high living organisms proliferation.

Keywords: Insects, Microscopy, Mites, Pesticides, Poultry litter, Pyrethroids.

Artigo referente ao Capítulo 9.

International Journal of Computer Applications (0975 - 8887)
Volume 175 - No.16, September 2020

Use of IoT to Real-time Monitoring of Storage Silo and Ozone Gas Fungal Decontamination Strategy

Carlos Soares

Federal University of Santa Catarina
Department of Food Science
and Technology
Santa Catarina, Brazil

Eliza Gomes

Federal University of Santa Catarina
Department of Informatics and Statistics
Santa Catarina, Brazil

Fabiano Dahlke

Federal University of Santa Catarina
Department of Animal Science
Santa Catarina, Brazil

Carlos De Rolt

State University of Santa Catarina
Centre of Management
and Socioeconomic Science
Santa Catarina, Brazil

Patricia Plentz

Federal University of Santa Catarina
Department of Informatics and Statistics
Santa Catarina, Brazil

Mario Dantas

Federal University of Juiz de Fora
Department of Computer Science
Minas Gerais, Brazil

Vildes Scussel

Federal University of Santa Catarina
Department of Food Science and Technology
Santa Catarina, Brazil

Artigo referente ao Capítulo 9.

Soares, C.E et al. *International Journal of Engineering Research and Applications*
 www.ijera.com
 ISSN: 2248-9622, Vol. 10, Issue 6, (Series-II) June 2020, pp. 19-27

RESEARCH ARTICLE

OPEN ACCESS

Fungi Activity on Chicken (*Gallus gallus domesticus*) Eggshell and Their Pores Invasion by Scanning Electron Microscopy

Soares, C.E¹, Maiorka², A, Dahlke, F³ and Scussel, V.M¹

¹Laboratory of Mycotoxicology and Food Contaminants - LABMICO, Food Science and Technology Department, Center of Agricultural Sciences, Federal University of Santa Catarina, Av. Admar Gonzaga, 1346, Itacorubi, Florianópolis, SC, Brazil

²Laboratory of Animal Nutrition. Department of Animal Science, Federal University of Paraná, Curitiba, PR, Brazil.

³Laboratory of Poultry Science, Department of Animal Science, Center for Agricultural Sciences, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brazil.

Corresponding author: c.ess@posgrad.ufsc.br, Student, PhD

ABSTRACT

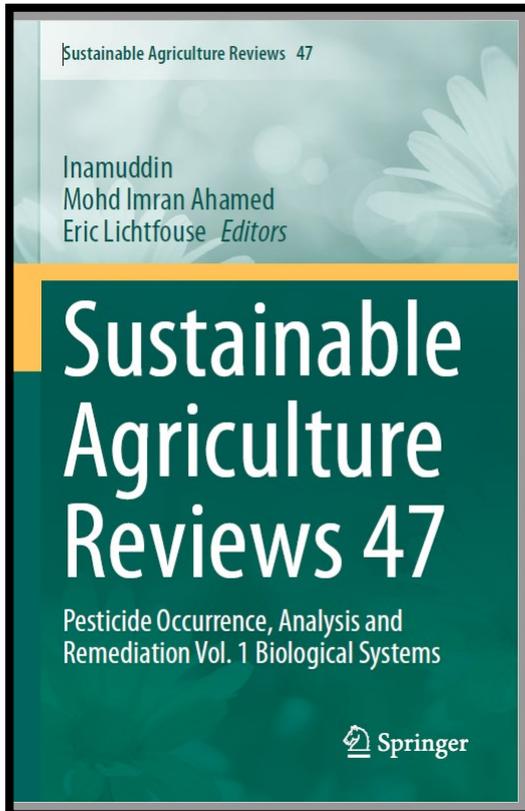
Eggshell exposure to both, field and storage toxigenic fungi, is of concern due to their possible metabolites transmission into the inner egg. The presence of fungi contamination in the nests environment, is expected due to its substrate, optimal temperature and humidity. In addition, the age of hens and eggshell increasing pore numbers together with egg storage conditions may influence their quality and safety. Diverse genera of fungi spores can get attached to the eggshell surface apart from the nest, also due to residual moisture coming from the natural moisture. This study reported the natural contamination by fungi of genera *Fusarium* and *Curvularia* (growth behavior) and activity through the eggshell pore canal investigated through scanning electron microscopy (SEM) being registered both surfaces (outer / inner) and along the pores (layers crossing –cuticle/ vertical crystal layer / palisade / mammillary / outer / inner layer) length (after 7 days incubation, at 23.5°C and 82% environment relative humidity). As expected, natural contamination and improper storage provide conditions for fungi hyphae to pass through the eggshell pores and reach the outer shell membrane (inside the shell). SEM showed the presence of fungi from a thick mycelia with the reproductive structures. The genera of fungi identified in this study found in the pores, ideal places to develop their reproductive structures and contaminate the internal region, which affects the quality of eggs.

Key words: Contamination, Chicken, *Curvularia*, Eggshell, Fungi, *Fusarium*, Microscopy, Pores.

Date of Submission: 18-05-2020

Date of Acceptance: 03-06-2020

Capítulo de referente aos Capítulos 5, 6 e 9.



Chapter 4 Pyrethroid and Residues in Chickens and Poultry Litter



Carlos Eduardo Carlos da Silva Soares , Vildes Maria Vildes Scussel, and
Fabiano Fabiano Dahlke

Abstract Poultry litter has been utilized to accommodate the birds, providing comfort, depriving the animals of direct contact with excretions and with the floor, also to avoid temperature variation inside the poultry house. However, it provides shelter, hiding place and food for some insects and mites, especially ectoparasites, the principal pests present in the poultry house, and the main reason for pesticide applications. The most widely used pesticides and repellents worldwide to control the proliferation of arthropods in litter and poultry facilities belong to the pyrethroid, cypermethrin, deltamethrin and phthalates such as dimethyl phthalate, respectively. Their application is part of the routine of several poultry farmers from chick housing to the final stage of the poultry production. Depending on the infestation, the application procedure may be carried out more than once during the poultry production cycle both in broiler and in commercial laying hens. Remediation strategies related to the environment, food and human exposure to these pesticides are developed in research. That also includes utilization of alternative/green decontamination methods for controlling pests with ozone gas/cold plasma/nanoparticles which can increase food safety, replacing pesticide use in poultry litter and avoid whole poultry environment exposure to those toxic compounds.

Keywords *Alphitobius diaperinus* · Arthropods · Cypermethrin · Dimethyl phthalate · Ozone · Pesticide · Poultry litter · Pyrethroids · Residue

Artigo referente ao Capítulo 8.

Peracetic acid: Effect on the Chicken Eggshell Cuticle and Decontaminating Action on Filamentous Fungi

Soares, C.E.S.^{1*}, Cartabiano-Leite, C.E.², Ferreira, W.X¹; Maiorka, A⁴; Dahlke, F.³, Scussel, V.M.¹, De Dea Lindner, J.¹.

¹Laboratory of Mycotoxicology and Food Contaminants - LABMICO, Food Science and Technology Department, Center of Agricultural Sciences, Federal University of Santa Catarina, Rod. Admar Gonzaga, Itacorubi, 1346, Florianópolis, SC, Brazil (c.ess@posgrad.ufsc.br)

²Laboratory of Cereals Technology - LABCERES, Food Science and Technology Department, Center of Agricultural Sciences, Federal University of Santa Catarina, Rod. Admar Gonzaga, Itacorubi, 1346, Florianópolis, SC, Brazil

³Laboratory of Poultry Science, Department of Animal Science, Center for Agricultural Sciences, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brazil.

⁴ Department of Zootechnics, Agricultural Sciences, Federal University of Paraná, Curitiba PR, Brazil

*Corresponding author:

Abstract

Decontamination methods of egg change according to the different countries. However, this practice is extremely important, because there may be contamination by a wide range of microorganisms. In free-range raising systems, in addition to being exposed to the pathogenic microorganisms, hens may be also exposed to a different kinds of fungi, both field and storage species, contaminating the eggs. The main fungi disseminators is the substrate used in nests, especially when forage or crop residues (straw or shavings) are used. Chemical sanitizers used in poultry production have in their formulation, peracetic acid (PAA) in several concentrations, which can eliminate pathogenic microorganisms resistant to other types of disinfectants. Therefore, this work evaluated the use of PAA solutions, with four different concentrations, applied on the eggs, on the eggshell structure and on the control of fungi proliferation. The use of PAA solution in 75, 150 ppm concentration reduced the development of fungi spores and hyphae, with a slight compromising of the external cuticle structure. On the other hand, PAA 300 ppm concentration can induce micro fragmentation in some regions of the membrane and compromise the egg quality. The mechanism of PAA sanitization occurs from oxidation reactions of the product resulting in acetic acid, hydrogen peroxide and water. Probably the amount of acetic acid produced may interact with the eggshell compounds and cause the microfragmentations observed in the micrographs. Thus, further studies are necessary to establish an ideal concentration of PAA as antifungal agent to egg, preventing contamination by mycotoxins and without any kind of damage in eggshell structure.

Key words: Decontamination, Egg, Food safety, Free-range, Fungi, Microorganism.

Artigo referente ao Capítulo 9.

OZONE: SCIENCE & ENGINEERING
<https://doi.org/10.1080/01919512.2021.1967722>



Antifungal Action of Ozone on Chicken Eggshell Cuticles: A Preliminary Study

Carlos Eduardo Da Silva Soares ^a, Cláudio Eduardo Cartabiano Leite ^b, Fabiano Dahlke ^c, Alex Maiorka ^d,
Marília Miotto ^a, Vildes Scussel ^a, and Juliano De Dea Lindner ^a

^aLaboratory Of Mycotoxicology And Food Contaminants, Food Science And Technology Department (CAL, Federal University of Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, SC, 88034-000, Brazil; ^bFood Science and Technology Department (CAL), Laboratory Of Cereals Technology, UFSC, Florianópolis, SC, 88034-000, Brazil; ^cDepartment Of Animal Science, Laboratory Of Poultry Science, UFSC, SC, 88034-000, Brazil; ^dDepartment of Veterinary Medicine and Zootechnics, Federal University Of Paraná, Curitiba, PR, 80060-000, Brazil

ABSTRACT

Ozone gas (O₃) is used as an oxidizing agent and can be applied as a sanitizer to control microorganisms and degrade toxic compounds, such as pesticides and mycotoxins, in food industries. Some studies investigated the use of O₃ as an agent to reduce pathogenic bacteria such as *Salmonella enteritidis*. The action of O₃ on the eggshell cuticle and structures of filamentous fungi is still not yet well studied. In this work, scanning electron microscopy (SEM) was used to assess the hens' eggshell structure after the exposition to O₃, mainly to obtain information about the potential antifungal action. The SEM micrographs obtained shown that the application of O₃ during 120 min damaged fungi hyphae adhered to the eggshell cuticle without severely compromising the external structure of the eggshell. Further studies are necessary to establish an ideal O₃ treatment for the fungal decontamination of chicken eggs.

ARTICLE HISTORY

Received 15 April 2021
Accepted 4 August 2021

KEYWORDS

Fungi; food safety;
disinfectant; hens; chicken
egg

Capítulo de livro referente ao Capítulo 4 e 5.

DECLARAÇÃO DE ACEITE

A Atena Editora, especializada na publicação de livros e coletâneas de artigos científicos em todas as áreas do conhecimento, com sede na cidade de Ponta Grossa-PR, declara que após avaliação cega pelos pares, membros do Conselho Editorial desta editora, o artigo intitulado "ÁCAROS E BESOUROS PRESENTES NA CAMA DE FRANGO ATUANDO COMO VETORES DE FUNGOS FILAMENTOSOS " de autoria de "CARLOS EDUARDO DA SILVA SOARES, FABIANO DAHLKE, ALEX MAIORKA, JULIANO DE DEA LINDNER", foi aprovado e encontra-se no prelo para publicação no livro eletrônico "Inovação e tecnologia nas ciências agrárias" a ser divulgado em dezembro de 2021.

Agradeço a escolha pela Atena Editora como meio de transmitir ao público científico e acadêmico o trabalho e parabênizo os autores pelo aceite de publicação.

Reitero protestos de mais elevada estima e consideração.

PONTA GROSSA, 19 de outubro de 2021.