

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
CAMPUS DOIS VIZINHOS
CURSO DE BACHARELADO EM ZOOTECNIA

MARIANA DE ANDRADE

**AVALIAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE CITROLENA
(*CYMBOPOGON WINTERIANUS*) COMO AGENTE
ALTERNATIVO NA DESINFECÇÃO DE OVOS INCUBÁVEIS**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

DOIS VIZINHOS - PR
2018

MARIANA DE ANDRADE

AVALIAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE CITRONELA (*CYMBOPOGON WINTERIANUS*) COMO AGENTE ALTERNATIVO NA DESINFECÇÃO DE OVOS INCUBÁVEIS

Trabalho de Conclusão de Curso, apresentado ao Curso de Zootecnia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Dois Vizinhos, como requisito parcial à obtenção do título de Zootecnista.

Orientadora: Prof. Dra. Sabrina Endo Takahashi

DOIS VIZINHOS - PR

2018



Ministério da Educação
Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Campus Dois Vizinhos
Gerência de Ensino e Pesquisa
Curso de Zootecnia



**TERMO DE APROVAÇÃO
TCC**

**AVALIAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE CITRONELA (*CYMBOPOGON
WINTERIANUS*) COMO AGENTE ALTERNATIVO NA DESINFECÇÃO
DE OVOS INCUBÁVEIS**

Autora: Mariana de Andrade
Orientadora: Profa. Dra. Sabrina Endo Takahashi

TITULAÇÃO: Zootecnista

APROVADA em 28 de junho de 2018.

Banca examinadora:

Anselmo Bodenmuller Filho

Prof. Dra. Marcela Tostes Frata

Prof. Dra. Sabrina Endo Takahashi
(Orientadora)

“A Folha de Aprovação assinada encontra-se na Coordenação do Curso”.

DEDICATÓRIA

Ao meu noivo Mauricio Debiasi.

À minha Orientadora Professora Dra. Sabrina Endo Takahashi.

“Sem sonhos, a vida não tem brilho. Sem metas, os sonhos não têm alicerces. Sem prioridades, os sonhos não se tornam reais. Sonhe, trace metas, estabeleça prioridades e corra riscos para executar seus sonhos. Melhor é errar por tentar do que errar por se omitir”.

Augusto Cury

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter-me dado a vida e a oportunidade de estudar.

À Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Dois Vizinhos, em especial ao Departamento de Zootecnia, pela oportunidade de realização do curso, e pelo ensino de qualidade.

Ao meu noivo Mauricio Debiasi, por ter-se mantido ao meu lado, me ajudando e incentivando em todos os momentos.

Em especial agradecimento à professora Sabrina Endo Takahashi por ter sido mais que orientadora, estando sempre ao meu lado, me ajudando em todas as dificuldades, pelas críticas, conselhos, paciência e tempo dedicado para ensinamentos, sugestões e por toda contribuição para minha formação pessoal e profissional e, acima de tudo, pela confiança depositada. Admiro seu respeito e sua sabedoria.

À minha co-orientadora professora Marcela Tostes Frata pelo auxílio e sugestões dadas, pela presteza que me atendeu quando precisei.

Ao Professor Cleverson Busso e Pós Doutorado Cleverson de Souza pela presteza que me atenderam nos momentos que solicitei, e pelas contribuições no esclarecimento de minhas dúvidas.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização desse trabalho.

ANDRADE, Mariana de. **Avaliação do óleo essencial de citronela (*Cymbopogon winterianus*) como agente alternativo na desinfecção de ovos incubáveis.** 2018. 45p (Trabalho de Conclusão de Curso) - Programa de Graduação em Bacharelado em Zootecnia, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Dois Vizinhos 2018.

RESUMO

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a eficiência do princípio ativo do óleo essencial de citronela (*Cymbopogon winterianus*) na desinfecção de ovos férteis, sujos de cama (sem nenhuma pré desinfecção) pelo método de desinfecção por pulverização. Foram selecionados ovos da linhagem COBB®. O delineamento experimental foi de blocos ao acaso, com 4 blocos, separados por 4 faixas de peso dos ovos (ovos superleves, leves, médios e grandes). No total foram cinco tratamentos com 48 ovos por tratamento. Os tratamentos consistiram em grupo controle, sem pulverização de óleo essencial (*Cymbopogon winterianus*), grupo controle positivo, com a pulverização de antifúngico à base de Clotrimazol 10mg/mL, 400 µL de óleo de citronela, 600 µL de óleo de citronela, e 800 µL de óleo de citronela. A pulverização foi realizada em toda a superfície do ovo. Após pulverização, esperou-se um tempo de exposição de 10 a 20 minutos, e coletou-se suabes dos ovos; sendo uma amostragem de 5 ovos, em duplicata, por tratamento. Com a coleta do suabes foram realizados os testes microbiológicos, envolvendo a capacidade de redução microbiana com contagem total de bactérias mesófilas e fungos. Assim, verificou-se em quais concentrações o óleo essencial obteriam maior eficácia e potencial de desinfecção, quanto à sua capacidade de redução de microrganismos, quando comparados ao grupo controle. Em seguida, os ovos foram incubados por 21 dias. Ao 7º e 18º dias de incubação realizou-se ovoscopia para descartar os ovos inférteis e verificar o crescimento e desenvolvimento do embrião. Aos 21 dias, ou seja, ao nascimento, as variáveis analisadas foram taxa de eclosão, peso ao nascimento, avaliação da qualidade dos pintainhos, e classificação de mortalidade embrionária através do embriodiagnóstico. Os dados de colônias de bactérias foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, utilizando o programa SAS. Os resultados da qualidade dos pintainhos (score, taxa de eclosão e peso) indicam que não houve diferença estatística significativa. Os dados das colônias dos fungos foram submetidos à teste não paramétrico para testar se havia diferença ou não dos tratamentos. Médias das colônias dos fungos foram comparadas pelo método Dwass, Steel, Critchlow-Fligner. Não houve diferença estatística, ($P>0,05$), para a contagem de colônias de bactérias. Para a contagem de colônias de fungos, os tratamentos com 400 µL e

800 µL diferiram estatisticamente, ($P < 0,05$), sendo que ocorreu uma redução no crescimento das colônias no tratamento com 800 µL em relação ao 400 µL. Entre os tratamentos com Clotrimazol, 10mg/mL, controle, 400 µL e 600 µL, não se observou diferença estatística, o mesmo ocorreu para os tratamentos com Clotrimazol, 10mg/mL, controle, 600 µL e 800 µL. Portanto, o óleo essencial de citronela (*Cymbopogon winterianus*) demonstrou efeito inibitório do crescimento micelial nos vários gêneros de fungos e bactérias presentes na casca do ovo, sendo mais eficiente nas dosagens de 400 µL e 800 µL, confirmando a sua eficiência fungicida e bactericida.

Palavras chave: Desinfetante, ovos férteis, incubação.

ABSTRACT

ANDRADE, Mariana de. Evaluation of citronella essential oil (*Cymbopogon winterianus*) as an alternative agent in the disinfection of hatching eggs. 2018. 45 p (Completion of course work) Undergraduate Program Bachelor of Animal Science, Federal Technological University of Paraná, Dois Vizinhos, 2018.

The objective of the present work was to evaluate the efficiency of the active principle of citronella essential oil (*Cymbopogon winterianus*) in the disinfection of fertile, bedwetted eggs (without pre-disinfection) by the spray disinfection method. COBB® eggs were selected. The experimental design was a randomized complete block design with 4 blocks, separated by 4 egg weight ranges (superleve, light, medium and large eggs). In total, there were five treatments with 48 eggs per treatment. The treatments consisted of a control group, without spraying of essential oil (*Cymbopogon winterianus*), positive control group, with the spray of antifungal based on Clotrimazole 10 mg / mL, 400 µL of citronella oil, 600 µL of citronella oil, and 800 µL of citronella oil. Spraying was performed across the surface of the egg. After spraying, an exposure time of 10 to 20 minutes was expected, and swabs were collected from the eggs; being a sample of 5 eggs, in duplicate, by treatment. With the collection of the swabs the microbiological tests were carried out, involving the capacity of microbial reduction with total count of mesophilic bacteria and fungi. Thus, it was verified in which concentrations the essential oil would obtain greater efficiency and potential of disinfection, as to its capacity of reduction of microorganisms, when compared to the control group. The eggs were then incubated for 21 days. On the 7th and 18th days of incubation, egg-laying was performed to discard the infertile eggs and to verify the growth and development of the embryo. At 21 days, that is, at birth, variables analyzed were hatch rate, birth weight, chicks quality evaluation, and classification of embryonic mortality through embryodiagnosis. Data from bacterial colonies were submitted to analysis of variance and the means were compared by the Tukey test at 5% probability, using the SAS program. The chicks quality results (score, hatch rate and weight) indicate that there was no significant statistical difference. Data from the fungi colonies were submitted to a non-parametric test to test whether or not there were differences in treatments. Mean values of the fungi colonies were compared by the Dwass, Steel, Critchlow-Fligner method. There was no statistical difference, ($P > 0.05$), for counting bacterial colonies. For the fungal colonies count, the treatments with 400 µL and 800 µL differed statistically, ($P < 0.05$), and a reduction in the growth of the colonies occurred in the

treatment with 800 μL in relation to 400 μL . There were no statistically significant differences between the treatments with Clotrimazole, 10 mg / mL, control, 400 μL and 600 μL . Therefore, the essential oil of citronella (*Cymbopogon winterianus*) demonstrated an inhibitory effect of mycelial growth in the various genera of fungi and bacteria present in the egg shell, being more efficient in the dosages of 400 μL and 800 μL , confirming its fungicidal and bactericidal efficiency.

Key words: Disinfectant, fertile eggs, incubation.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. OBJETIVO	14
2.1 Objetivo Geral	14
2.2 Objetivo Específico	14
3. REVISÃO BIBLIOGRAFICA	15
3.1 Manejo de ovos incubáveis	15
3.1.2 Manejo de ovos sujos de cama	17
3.2 Contaminação de ovos incubáveis	18
3.3 Desinfecção de ovos férteis	18
3.4 Óleo essencial de citronela	19
4. MATERIAL E MÉTODOS	20
4.1 Etapa 1 – Pré-Teste: Confirmação e identificação de fungos nos ovos	20
4.1.1 Etapa 2 – Teste escolha de dosagens e efeito do óleo essencial de citronela (<i>Cymbopogon winterianus</i>) para inibição do crescimento micelial dos fungos	23
4.2 Avaliação do poder antimicrobiano IN VIVO	27
4.3 Ovoscopia e pesagem	30
4.4 Avaliação: Qualidade dos pintainhos	31
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
5.1 Efeito sobre a contagem de bactérias mesófilas e fungos	34
5.2 Resultado da Avaliação da qualidade dos pintainhos	38
6. CONCLUSÃO	40
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41

1 INTRODUÇÃO

A cadeia produtiva avícola, têm se destacado cada vez mais, pela capacidade produtiva de alimentos de alta qualidade. É um ramo do agronegócio de suma importância no Brasil, sendo responsável por empregar milhares de pessoas. Além disso, o Brasil possui destaque internacional na produção de frangos, sendo o maior exportador e o segundo maior produtor mundial dessa carne (ABPA, 2017).

Todo esse sucesso se deve aos altos padrões adquiridos em todos os pontos da cadeia produtiva desde avançadas tecnologias em melhoramento genético, nutrição, manejo, e sanidade. Hoje é possível obter um produto para atender as exigências do mercado. Entre as características do frango, destacam-se o maior ganho de peso, ótima conversão alimentar e baixa mortalidade. Tudo isso sem comprometer a produtividade da matriz, e a excelente habilidade para produção de ovos.

Existem diversas práticas relacionadas, que visam a melhoria do manejo das aves produtoras de ovos férteis para incubação. Uma das práticas relacionada à sanidade é a desinfecção dos ovos incubáveis, poucos minutos após a postura.

Na fase de incubatório, quando os ovos férteis das matrizes são incubados, pelo período de 21 dias, ocorrerá a eclosão e o nascimento dos pintainhos. Contudo, uma grande preocupação nesse momento é em relação ao *status* sanitário desses ovos, principalmente por contaminantes de origem fúngica e bacteriana. Quando esses patógenos estão presentes, podem prejudicar posteriormente o desempenho produtivo dos frangos. Estes causam enfermidades e podem causar mortalidade para esses animais ainda em desenvolvimento embrionário (ANDREATTI FILHO, 2000).

Um fungo de grande importância econômica nessa fase é o *Aspergillus fumigatus*. Segundo Braem (1988), esse agente micótico pode causar mortalidade embrionária ou causar pneumomicose nos pintos de 1 dia. Entretanto, outros fungos comumente presentes que podem causar danos sanitários, como fungos do gênero *Penicillium* e outras espécies do gênero *Aspergillus* (DI FABIO, 1997).

Os fungos ou certas bactérias podem estar presentes nos incubatórios devido ao clima favorecer seu desenvolvimento, sendo um local quente e úmido. Os esporos dos fungos são transportados principalmente pelo ar nos incubatórios, assim, torna as incubadoras grandes fontes de contaminação aos embriões (ANDREATTI FILHO, 2000). Devido a isso, esses patógenos são capazes de se disseminar rapidamente nesse local, principalmente se o sistema de desinfecção não for eficaz (CARDOSO et al., 2009).

Após a postura, os ovos esfriam e as bactérias conseguem passar através dos poros para o conteúdo interno do ovo, levando à contaminação interna (SILVA, 1996).

A desinfecção do incubatório e dos ovos serve justamente para a eliminação desses agentes causadores de doenças, como vírus, bactérias, fungos, entre outros. É uma atividade complementar considerada muito importante para a biossegurança, uma vez que garante reduzir riscos com a saúde pública e perdas econômicas (RISTOW, 2008).

Por isso, uma forma de realizar o controle de fungos e bactérias é a desinfecção dos ovos antes de incubá-los e também a rígida limpeza dos incubatórios. Os métodos de desinfecção atuais dos ovos contêm agentes que podem ser nocivos, tanto para os operadores como para o meio ambiente. Podem ser citados a fumigação com formalina ou a imersão dos ovos em solução de água e ácido peracético. Desta maneira, outras alternativas eficazes para a desinfecção dos ovos podem ser utilizadas sem a ocorrência de tantos riscos.

A alternativa de baixo risco que pode ser utilizada para realizar a desinfecção é o uso de óleos essenciais. Segundo Bakkali et al. (2008), esses óleos são denominados como compostos complexos, naturais, voláteis, conhecidos pelo forte odor característico. Eles podem ser produzidos pelos órgãos das plantas (galhos, raízes, sementes, frutas, flores, folhas, caules e cascas).

Esses óleos vegetais, como o óleo essencial de citronela (*Cymbopogon winterianus*), possuem diversas funções na planta, sendo elas antifúngicas, antivirais e também inseticidas. Conforme Castro et al. (2010), os óleos essenciais podem ser originados por cem ou até mais compostos orgânicos. Os compostos orgânicos encontrados com uma maior frequência nos óleos essenciais são os monoterpenos e sesquiterpenos. Devido as suas propriedades antissépticas, os óleos essenciais são utilizados como analgésicos, sedativos, anti-inflamatório, anestésicos e principalmente antimicrobianos, devido aos estudos de seus mecanismos de ação (COSTA et al., 2005; LIMA et al., 2006).

As características citotóxicas dos óleos essenciais têm-se estudado para combater diferentes tipos de bactérias. A citotoxicidade dos óleos essenciais tem capacidade para provocar danos à parede celular, pois, como são compostos lipofílicos típicos, conseguem passar pela membrana citoplasmática, afetando a estrutura das diferentes camadas de polissacarídeos, ácidos graxos e fosfolipídios, permeabilizando as bactérias com a perda de íons e com a redução do potencial da membrana, tendo colapso da bomba de prótons e esgotamento de ATP, assim, os danos causados à parede celular e à membrana celular ocasionam perda de macromoléculas, evoluindo para a lise celular (DI PASQUA et al., 2006).

A amplitude dos efeitos dos óleos essenciais é dependente de sua concentração, que podem ser testados sozinhos ou em conjunto com outros óleos essenciais (CAL, 2006).

Lertsatitthanakorn et al. (2010) estudaram a atividade antimicrobiana do óleo essencial de citronela (*Cymbopogon winterianus*) contra *Propionibacterium acnes*, uma das principais bactérias causadoras da acne na pele. Foi avaliada a capacidade de indução da lesão da membrana com várias concentrações do óleo essencial. Nos resultados puderam perceber perda e rompimento da estrutura rígida da parede celular, danos na membrana citoplasmática e lise celular.

O objetivo dessa pesquisa, foi avaliar a eficácia do uso de óleo essencial de citronela (*Cymbopogon winterianus*), em diferentes concentrações, como agente desinfetante de ovos incubáveis. Nesse sentido, obter uma substância alternativa para realizar a desinfecção dos ovos, sem causar riscos ambientais, aos embriões e também aos operadores.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Objetivou-se por meio do presente trabalho avaliar a eficácia de desinfecção do óleo essencial de citronela (*Cymbopogon winterianus*), em diferentes concentrações quanto à sua capacidade de redução de microrganismos presentes na casca do ovo, na desinfecção de ovos férteis de galinha.

2.2 Objetivos específicos

- Verificou-se a eficácia de cada concentração do óleo de citronela quanto à sua capacidade de redução de microrganismos presentes na casca do ovo;
- Comparar a taxa de eclodibilidade de cada tratamento através da diminuição da taxa de mortalidade por contaminantes fúngicos e/ou bacterianos;
- Melhorou-se a qualidade do pintinho ao nascimento através da redução de patógenos presentes no ovo.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Manejo de ovos incubáveis

Em função do tamanho da cadeia produtiva de frangos de corte, a incubação de ovos de matrizes pesadas têm sua importância e atenção especial, pois a qualidade do ovo incubado é fundamental para o posterior resultado da qualidade do pintainho.

Segundo a Associação Brasileira de Proteína Animal – ABPA, no ano de 2016 a produção brasileira de ovos (unidade) chegou a 39.181.839.294, e o alojamento de matriz de postura (unidades) no ano de 2015 chegou a 981.788. Com isso, possuímos reconhecimento internacional e a responsabilidade de produção eficiente e com qualidade, para mais de 150 mercados importadores da carne de frango brasileira.

O manejo empregado desde a postura dos ovos até o momento do nascimento no incubatório, são fatores que podem interferir na qualidade de incubação, eclodibilidade e, conseqüentemente, no pintainho. Para que possa garantir um produto de qualidade, deve-se ter rigoroso controle de biosseguridade nas granjas, cuidados no manejo na coleta dos ovos, e na desinfecção, garantindo assim, a saúde animal e excelente produção (CALIL, 2007). Portanto, um alimento seguro resulta na admissão de cuidados higiênico sanitários em todas as etapas da cadeia alimentar.

O objetivo da incubação é produzir pintainhos com qualidade e que possam atender a demanda exigente do mercado consumidor, sendo que o ambiente onde o ovo é produzido, é o principal aspecto para interferir na qualidade do mesmo. Portanto, são necessárias condições adequadas de biosseguridade e sanidade no manejo de lote, mantendo os ovos sempre secos e limpos, para evitar possíveis contaminações (BERMUDEZ & BROWN, 2003).

A avaliação da qualidade do ovo pode ser influenciada por fatores como a genética, dietas estabelecidas, condições de ambiente, frequência e manejo da coleta dos ovos nos ninhos, desinfetante utilizado para higienizá-lo, onde podem afetar a viabilidade do embrião (BRAKE & SHELDON, 1990). Outros fatores considerados por Heier & Jarp (2001) são o número de matrizes no lote e o tempo de estocagem dos ovos, sendo este eleito como o mais importante.

Embora o ovo apresente barreiras naturais (casca, cutícula e membrana), as bactérias passam para o conteúdo interno do ovo. Após a postura o ovo esfria, e com esse resfriamento causa o encolhimento da parte interna, havendo uma sucção de bactérias e fungos, ou seja, microrganismos patogênicos possuem a capacidade de penetrar na casca do ovo, através dos

poros, podendo prejudicar o desenvolvimento embrionário e posteriormente o desempenho produtivo dos frangos (GUSTIN, 2003).

Os ovos sempre terão presença da flora bacteriana e microrganismos, pois os mesmos são aderidos à casca quando o ovo passa pela cloaca, por onde também passam as fezes, podendo assim, matar ou retardar o desenvolvimento embrionário, afetando a viabilidade do embrião, ou levar à morte de aves recém nascidas, comprometendo toda a produção (WILLIAMS, 1970).

Ao passar pela cloaca o ovo já sofre contaminação por microrganismos e possíveis doenças. Muitas bactérias conseguem passar para o interior da casca, no caso, para o embrião. Com isso, se recomenda a desinfecção logo após a postura e coleta dos ovos, pois o número de bactérias de um ovo sujo pode chegar a 1165000 UFC e pode ocorrer a penetração em apenas trinta minutos (BRITO, 2006).

A deformidade da casca afeta a viabilidade do embrião, pois não terá condições requeridas para a incubação, se comparada ao ovo normal, trazendo alteração na porosidade, interferindo na perda de água devido à desidratação do embrião, causada pela perda evaporativa das lesões da casca durante o andamento do processo (SCHMIDT et al., 2002).

A porosidade e espessura da casca também afetarão a qualidade e o desenvolvimento do embrião, sendo que os ovos com maior espessura de casca, são os que apresentam maiores índices de eclosão na incubação (NARUSHIN & ROMANOV, 2002). Esse fator está relacionado com o aumento da idade da matriz, que possui uma taxa de retenção de cálcio de apenas 40% absorvido, comparado com uma ave jovem que retém cerca de 60% de cálcio. Por este motivo recomenda-se 3,75 g/ave/dia de cálcio na dieta das aves, para obter uma casca com qualidade (BAIÃO; CANÇADO, 1997). Segundo Schmidt et al. (2003), uma boa espessura de casca encontra-se em torno de 0,33 a 0,35mm, já espessura inferior a 0,27mm pode causar mortalidade para o embrião.

É considerado um ovo ideal para incubação aquele com formato ovalado, com relação largura x altura de 74. Já ovos com 72 são considerados formato compridos, tem-se também os ovos curtos e redondos; esses dois últimos possibilitam a quebra com maior facilidade durante o processo de viragem dentro da incubadora (ALBINO, 2005).

É viável incubar ovos com peso entre 56 a 70 gramas. Segundo Schmidt et al. (2003), o peso é afetado pela idade da ave, sendo matrizes mais velhas normalmente produtoras de ovos maiores, podendo assim, apresentar redução na densidade da casca do ovo, ocorrendo maior perda de peso no processo de incubação, e conseqüentemente, aumento da mortalidade embrionária.

O embrião necessita de temperatura, umidade relativa do ar e fluxo de ar adequado no momento da incubação, além de viragem periódica dos ovos, para evitar a aderência do embrião à parede interna do ovo. Se o ambiente estiver muito úmido e não for feita a correta higienização, certamente a presença de microrganismos será perdurada (SAYEED & SANKARAN, 1990). A viragem dos ovos é realizada até o décimo oitavo dia, com ângulo de 45° a cada hora (BRITO, 2006).

Segundo Decuypere et al. (2003), um dos fatores de maior importância é a temperatura, que deve estar a 37,8°C, ideal para o desenvolvimento do embrião, e uma boa eclodibilidade dos pintainhos, pois temperaturas elevadas causam mortalidade embrionária, e temperaturas baixas atrasam o desenvolvimento e nascimento dos mesmos. Já a umidade do ar da incubadora deverá estar entre 60% a 65%, para que se tenha melhores resultados. Quando a umidade estiver alta, poderá levar a eclosão precoce, podendo ter como resultado o desenvolvimento incompleto do pintainho, e quando a umidade estiver baixa, levará a perda de água mais rapidamente, acarretando atraso na eclosão (NEVES, 2005).

3.1.2 Manejo de ovos sujos de cama

Atualmente buscam-se práticas para intensificar a postura em ninhos, mantendo a sanidade dos ovos, e evitar a postura na cama, pois levará ao aumento de ovos sujos. Por isso se preconiza o manejo adequado dos ninhos e uma maior coleta dos ovos diariamente para evitar ao máximo a contaminação por microrganismos (AVILA et al., 2001).

Os ovos selecionados para incubação devem permanecer limpos, coletados diretamente dos ninhos, secos e desprendidos de sujeira e material fecal, para evitar maiores contaminações e prejuízos para o embrião (ELGUERA, 1999). Esses ovos limpos, normalmente são recolhidos após a postura e imediatamente desinfetados separadamente dos ovos sujos. Já os ovos sujos são anteriormente lavados para após serem desinfetados. Os níveis de contaminação do ovo segundo os critérios de North (1984), se estabelece em ovo limpo aquele com 3.000 a 4.000 microrganismos; ovos sujos aquele com 5.000 a 28.000 microrganismos; e ovos muito sujo com 390.000 a 430.000 microrganismos presentes na casca.

Portanto, o manejo de ovos e a qualidade da cama sobre a qual ficam as aves, requer cuidados especiais, pois isso levará a maiores riscos de contaminação, patógenos e doenças. Manter sempre boa ventilação e cama seca, pois quanto mais úmido, maiores são as chances

da sujeira contaminar o pé da galinha e levar essa contaminação para dentro dos ninhos, além da umidade favorecer a penetração bacteriana. Deve-se reduzir ao máximo o tempo de permanência dos ovos em ambiente contaminado.

3.2 CONTAMINAÇÃO DOS OVOS INCUBÁVEIS

A contaminação bacteriana é um fator que contribui na perda da qualidade do ovo, redução na eclosão, na disseminação de doenças e conseqüentemente, perdas de produção (BRUCE & DRYSDALE, 1991).

Os principais microrganismos patogênicos encontrados nos ovos são *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella Pullorum*, *Staphylococcus*, *Campylobacter jejuni*, *Listeria monocytogenes* e *Yersinia enterocolítica* (STRINGHINI, 2008).

Entre os gêneros bacterianos que podem causar maiores deterioração desse alimento estão *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Proteus*, *Aeromonas*, *Alcaligenes*, *Escherichia*, *Micrococcus*, *Serratia*, *Enterobacter* e *Flavobacterium* (ARAGON-ALEGRO et al., 2005).

A contaminação mais frequente resultante de fungos são espécies dos gêneros *Penicillium*, *Sporotrichum*, *Mucor*, *Cladosporium* e *Alternaria* (CARDOSO et al., 2001)

Adesiyun et al. (2006), ao verificarem as coletas das análises microbiológicas obtidas em ovos coletados em granjas, supermercados e pequenos comércios, observaram a presença de diferentes espécies de bactérias como *Enterobacter spp.* (3,3%), *Klebsiella spp.* (1,6%), *Citrobacter spp.* (0,5%), *Serratia spp.* (1,6%), *Proteus spp.* (2,2%), *Pseudomonas spp.* (1,1%), *Acinetobacter spp.* (0,5%), *Alcaligenes spp.* (0,5%) e outras enterobactérias (6,0%).

A boa qualidade dos ovos de incubação está relacionada a efetivação, execução das regras de higiene e biosseguridade, onde deve-se englobar práticas de manejo na granja, como higienização das instalações, equipamentos, utensílios; supervisão do controle da qualidade da água de abastecimento e dos possíveis transmissores e causadores de doenças; além da preocupação em capacitar todos os profissionais na área envolvidos (BRASIL, 2004).

3.3 DESINFECÇÃO DE OVOS FÉRTEIS

A desinfecção dos ovos instantes após a postura permite a redução de microrganismos contaminantes na superfície da casca e minimiza seus efeitos deletérios (SILVA, 1996).

Essa prática deve ser feita de forma correta e com desinfetantes apropriados, pois sua ineficiência resultará em perdas significativas em todo o processo, na mortalidade embrionária, eclodibilidade, mortalidade dos pintainhos no campo, aves com desempenho indesejáveis, e incremento nos custos de produção (ARAÚJO; ALBINO, 2012).

Existem vários métodos de desinfecção que podem ser realizados nas granjas e incubatórios. A fumigação consiste na volatilização de um desinfetante, podendo se tornar tóxica, causando danos à saúde das pessoas expostas ao produto e ao método, sendo que a pulverização pode ser manual ou mecânica, e a imersão consiste em mergulhar os ovos em tanques com a solução desinfetante (ELGUEIRA, 1999).

Os desinfetantes podem ser químicos ou não, como o óleo essencial de citronela. No entanto, a eficácia de cada produto está relacionada a diversos fatores como concentração, pH da solução, meio dispersante, entre outros. A desinfecção eficiente pode melhorar a eclodibilidade e a qualidade dos pintainhos (CAMPOS, 2000). Para sua eficácia deve-se realizar pesquisas, além de estudos para considerar a relação risco-benefício e custo.

3.4 ÓLEO ESSENCIAL DE CITRONELA

O emprego de produtos vegetais para vários fins como medicinais, farmacêuticos, culinária entre outros, se perde na história. Esse conhecimento sempre acompanhou a evolução do homem através dos tempos. Há registros de que há milhares de anos, já existia uma medicina egípcia organizada com medicamentos à base de plantas. Surgiu a medida que o homem tentava suprir suas necessidades básicas. Sua descoberta foi através da busca pela cura em observações nos animais, no combate às doenças, assim, revelaram, embora empiricamente, o seu potencial curativo. (FERRO, 2006).

Os conhecimentos da medicina antiga vem sendo atribuídos e enriquecidos pela medicina atual, e o uso dos óleos essenciais tem sido difundido e aplicado em larga escala no mundo todo. Pode-se definir Aromaterapia como “a ciência que estuda óleos essenciais, tendo sua aplicação terapêutica” (TESKE; TRENTINI, 1997).

Segundo a OMS (1978), planta medicinal é toda e qualquer planta que contenha substâncias que possam ser usadas para prevenir, aliviar, curar ou modificar um processo fisiológico ou patológico, e que possa servir como matéria-prima para fitofármacos para síntese químico-farmacêutico.

A utilização de plantas que apresentam atividades fungicidas vem sendo pesquisada objetivando um controle alternativo na disseminação de certas doenças. Buscando hoje

produtos que atinjam o mínimo possível o ambiente, que tragam segurança para o ser humano, e apresentem baixo risco de resistência/seleção de microrganismos patogênicos (MOURA, 2007).

A citronela é uma planta do gênero *Cymbopogon*, que compreende muitas espécies aromáticas de regiões tropicais e temperadas. Planta perene, pertencente à família Poaceae, originária da Índia. Apresenta folhas inteiras, estreitas e longas, que podem atingir até um metro. As folhas apresentam bordas ásperas e cortantes. Possui funções aromáticas, bactericidas, fungicidas e inseticidas. Existem duas espécies de citronela: *Cymbopogon nardus* var. *lenabatu* (L.) Rendle e *Cymbopogon winterianus* Jowitt. Ambas possuem óleos essenciais parecidos no aroma, porém sua diferença está no teor de citronelal do óleo, sendo a *Cymbopogon winterianus* a mais cultivada devido a sua maior concentração de óleo (WIJESEKERA et al., 1973).

O óleo essencial é um produto volátil do metabolismo secundário da planta, sendo uma mistura de compostos orgânicos eficientes no controle de microrganismos. Muitos óleos essenciais são utilizados na farmacologia por seus efeitos antimicrobiano, anti-inflamatório, analgésico e inseticida (SILVA et al., 1995). O potencial desse óleo se dá pelo fato de conseguir inibir o crescimento micelial e a germinação de esporos, impedindo a ação de agentes patogênicos.

Datta (1982) coloca a importância desse óleo com as seguintes composições: citronelal (32,0 a 45,0%), geraniol (12,0 a 18,0%), citonelol (11,0 a 15,0%), e geranyl acetato (3,0 a 8,0%). Onde é feito melhoramento genético na planta para aumento do óleo essencial.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Etapa 1 - Pré Teste: confirmação e identificação de fungos nos ovos.

Essa pesquisa foi elaborada em duas etapas distintas. A primeira delas (Etapa 1) foi para verificar se havia a presença de fungos nos ovos, e quais seriam o gênero dos mesmos. Na etapa 2, após confirmação da presença de fungos, foram utilizadas diferentes dosagens do óleo essencial de citronela (*Cymbopogon winterianus*) para verificação do seu efeito com presença ou ausência (inibição) do halo micelial, conforme os tratamentos.

Primeiramente, uma amostragem pequena de ovos foi higienizada com álcool 70% e a casca perfurada com auxílio de uma pinça esterilizada para verificar se já havia presença de

fungos na membrana interna do ovo. Nesse caso, os ovos já estavam contaminados com presença de fungos (Figura 1).



Fonte: Andrade, 2018.

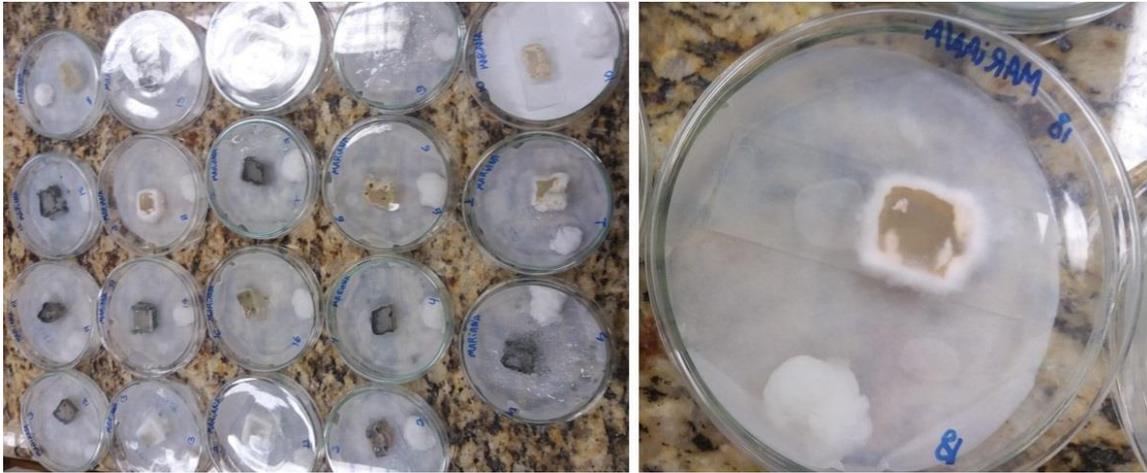
Figura 1. Ovos contaminados, apresentando diferentes gêneros de fungos na membrana.

Foram coletados os diferentes fungos com a alça de platina (flambada no fogo), e cada amostra de fungo foi inoculada em meio de cultura BDA (*Batata Dextrose Agar*) pela técnica por estrias múltiplas (movimento zig-zag na superfície da placa), as placas foram colocadas na incubadora a $25 \pm 1^\circ\text{C}$, por 7 dias.

Após crescimento dos fungos nas placas, realizou-se o procedimento de microcultivo, para conseguir isolar cada fungo, conseguindo assim, a identificação das estruturas fúngicas, pois no método de estrias crescem vários gêneros de fungos juntos.

O método de microcultivo se faz diretamente com o preparo da lâmina, lamínula e placa de Petri. Colocou-se sobre uma lâmina esterilizada, contida na placa de Petri estéril um cubo de ágar BDA. A lâmina deve estar sobre um suporte de papel de filtro estéril recortado em formato redondo, que caiba dentro da placa. Semeou-se o fungo, a partir da placa feita por estrias, nos quatro lados do cubo de ágar, e recobriu-se com uma lamínula também esterilizada previamente. Acrescentou-se água destilada (umedecemos um “chumaço” de algodão e no papel de filtro estéreis) para evitar a dessecação do meio de cultura, durante o crescimento do fungo. Tampou-se as placas as quais foram incubadas na incubadora a $25 \pm 1^\circ\text{C}$, por 7 dias, até que se observe o desenvolvimento de hifas. Assim, retirou-se a lamínula

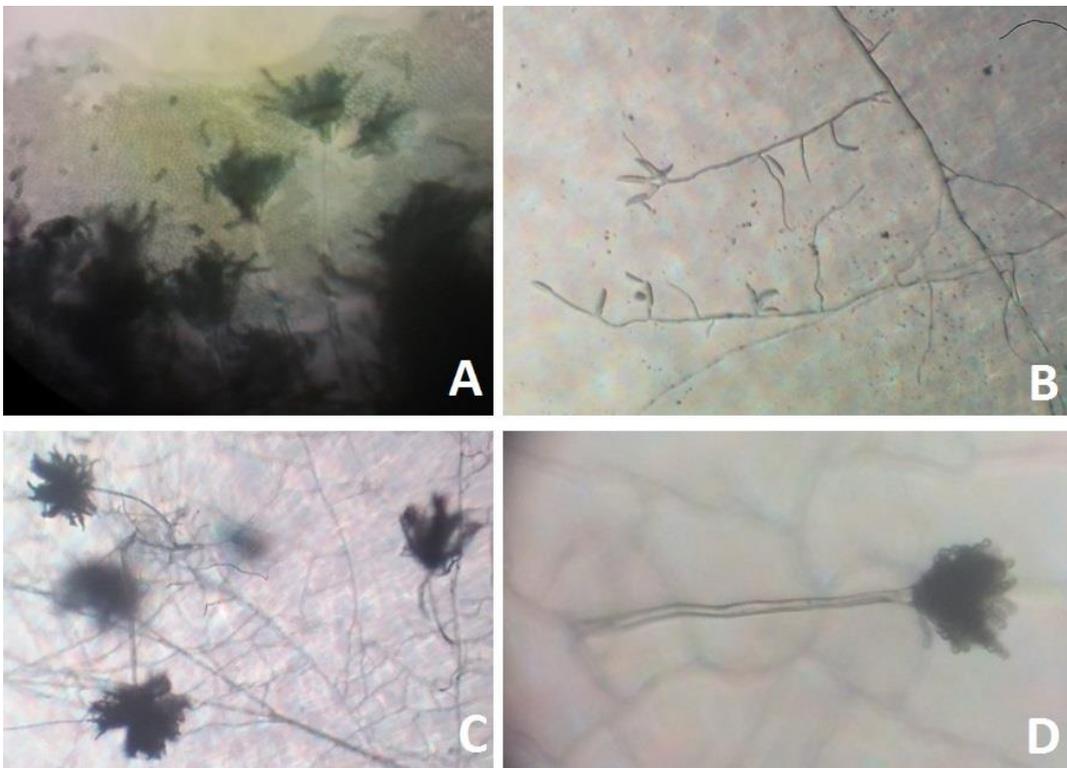
cuidadosamente com auxílio de uma pinça, onde as hifas e esporos do fungo devem estar aderidas na mesma. Pingou-se uma gota de corante azul (lactofenol) e colocou-se sobre uma lâmina para observação no microscópio onde conseguiu-se observar a estrutura do fungo para sua identificação (Figura 2).



Fonte: Andrade, 2018.

Figura 2 - Microcultivo de Fungos

Com a técnica de microcultivo foram isolados e identificados três gêneros de fungos, o *Fusarium* spp., *Penicillium* spp. e o *Aspergillus* spp. (Figura 3).



Fonte: Andrade, 2018.

Figura 3 - Identificação do Gênero do fungo *Penicillium* spp. (A), Gênero do fungo *Fusarium* spp. (B), Gênero do fungo *Aspergillus* spp. (C e D)

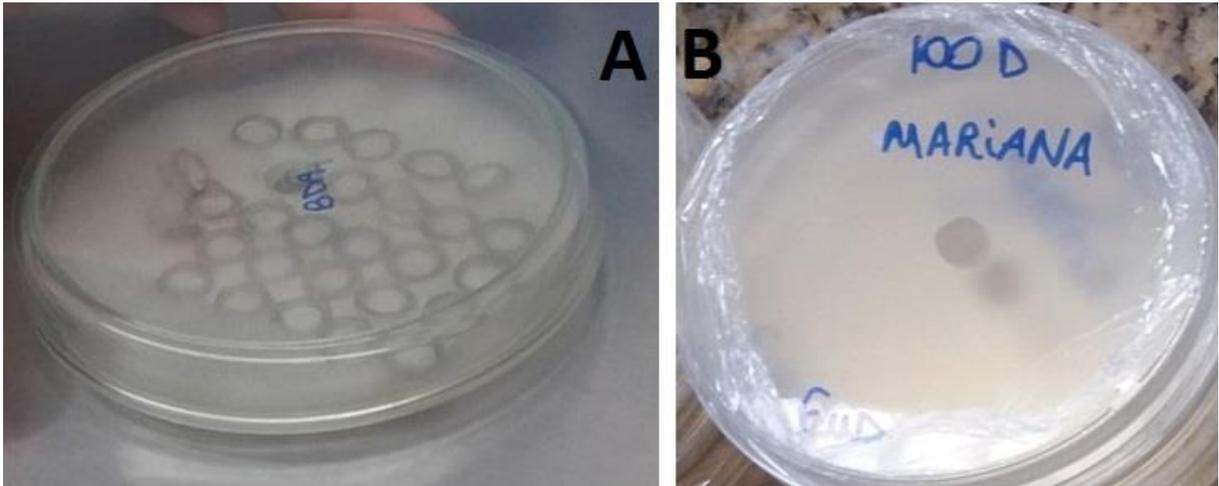
4.1.1 Etapa 2 - Teste Escolha de Dosagens e Efeito do óleo essencial de citronela (*Cymbopogon winterianus*) para inibição do crescimento micelial dos fungos.

Através do isolamento realizado com o microcultivo, e por ter maior incidência dos fungos *Fusarium* spp., e *Penicilium* spp. semeou-se em uma nova placa em estria para cada um, para o crescimento completo no meio BDA. Com isso, realizou-se a etapa 2 para verificar quais concentrações do óleo essencial de citronela (*Cymbopogon winterianus*) fariam efeito para a inibição do crescimento micelial dos fungos, e assim, decidiríamos quais concentrações seriam usadas para o experimento definitivo.

Os tratamentos do pré teste foram compostos por T1: grupo controle negativo, sem pulverização de óleo essencial de citronela (*Cymbopogon winterianus*), T2: grupo controle positivo, com a pulverização de antifúngico a base de Clotrimazol 10mg/mL, diluídos em 200 mL de meio BDA (*Batata Dextrose Agar*); T3: 8 µL *Tween* 80® diluídos em 200 mL de meio BDA; T4: 50 µL de óleo essencial de citrolena + 0,5 µL de *Tween* 80® diluídos em 200 mL de meio BDA; T5: 100 µL de óleo essencial de citronela + 1 µL de *Tween* 80® diluídos em 200 mL de meio BDA; T6: 400 µL de óleo essencial de citronela + 4 µL de *Tween* 80® diluídos em 200 mL de meio BDA; e T7: 800 µL de óleo essencial de citronela + 8 µL de *Tween* 80® diluídos em 200 mL de meio BDA. O *Tween* 80® é um tensoativo usado como um agente dispersante para misturar solubilizar o óleo essencial na água.

A técnica consistiu em preparo prévio do meio de cultura BDA esterilizado, onde preparou-se 200 mL do meio para cada erlenmeyer. Após a retirada da autoclave, esperou-se o meio ficar em temperatura ambiente e adicionou-se dentro de cada erlenmeyer as devidas dosagens pré estabelecidas conforme cada tratamento. Homogeneizou-se cada componente adicionado no erlenmeyer e distribuiu-se o meio nas placas de Petri para solidificação. Foram feitas quatro placas (A, B, C e D) para cada tratamento e para os dois fungos identificados. No total tinham-se 56 placas, 28 placas para *Fusarium* spp. e 28 placas para *Penicillium* spp.

Com as placas que semeamos os fungos *Fusarium* spp. e *Penicillium* spp. anteriormente pela técnica de estrias, fizemos vários recortes em formato de disco com o auxílio da ponteira de micropipeta (ponta mais larga). Cada disco media 8,4 mm de diâmetro (Figura 4).

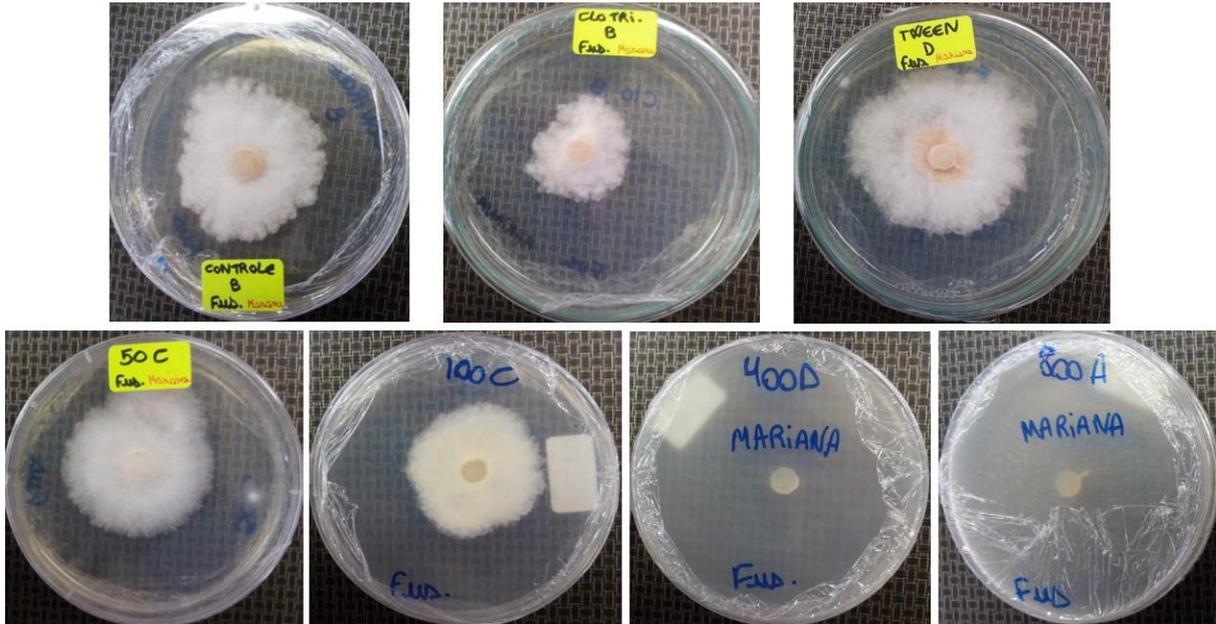


Fonte: Andrade, 2018.

Figura 4 - Recortes do fungo em formato de disco (A). Disco do fungo *Fusarium* spp. sobre o centro da placa do Tratamento T5: 100 μ L de óleo essencial de citronela + 1 μ L de *Tween* 80® diluídos em 200 mL de meio BDA

Após a solidificação do meio de cultura BDA + tratamentos, coletou-se com o auxílio da alça de platina (flambada no fogo) os recorte dos discos com o fungo, e colocou-se cada disco no centro de uma placa, seguindo os respectivos tratamentos, para verificar se haveria ausência (inibição) ou crescimento micelial, a partir deste disco de 8,4 mm no centro da placa. Vedou-se as placas com plástico filme para evitar possíveis contaminações, e incubou-se as placas a temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$.

Essa análise foi realizada por sete dias, verificando diariamente se houve crescimento no diâmetro das colônias com paquímetro digital (Figura 5). Foi determinada através desta observação, qual seria a dose mínima do óleo essencial de citronela (*Cymbopogon winterianus*) que causaria efeito e inibição micelial, e escolha das dosagens definitivas.



Fonte: Andrade, 2018.

Figura 5 - Placas demonstrando todos os tratamentos. Fungo *Fusarium* spp. Medição realizada com 5 dias, verificando crescimento do halo micelial em alguns tratamentos e ausência (inibição) nos tratamentos T6: 400 μL de óleo essencial de citronela + 4 μL de Tween 80® e T7: 800 μL de óleo essencial de citronela + 8 μL de Tween 80®

Através das medições realizadas diariamente por 7 dias, sendo que a primeira medição foi realizada com 24 horas de incubação, o diâmetro das colônias (Dc) foi obtido com a média de duas medidas diametralmente opostas com o uso do paquímetro digital. A porcentagem de redução do crescimento micelial dos fungos em relação as concentrações dos tratamentos testados, foi calculada considerando a fórmula descrita por Fonseca et al., (2015):

$$\% \text{ RCM} = \frac{\text{Dc tratamento controle} - \text{Dm tratamento com óleo}}{\text{Dc tratamento controle}} \times 100$$

Onde:

% RCM = % Redução do crescimento micelial

Dc tratamento controle = diâmetro médio (quadriplicata) do tratamento controle (BDA sem aditivos)

Dc tratamento com óleo = diâmetro médio (quadriplicata) do tratamento com óleo essencial.

Tabela 1 - Percentual de inibição do óleo essencial de citronela (*Cymbopogon winterianus*) frente a *Fusarium* sp. Dois Vizinhos, UTFPR, 2018

Horas	24(h)	48(h)	72(h)	96(h)	120(h)	144(h)	168(h)
% Inibição	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
Controle							
Positivo							
Clotrimazol	8,6	36,4	29,9	23,9	15,1	21,3	22,1
10 mg/mL							
<i>Tween 80</i> ®	5,2	21,5	2,8	-0,8	-12,0	-10	-10,9
50 µL/mL	23,4	51,8	32,5	13,3	-1,1	1,6	1,7
100 µL/mL	24,1	64,7	55,8	26,3	12,0	9,2	10,5
400 µL/mL	24,3	66,1	73,3	75,1	76,5	80,1	81,9
800 µL/mL	24,3	66,1	73,3	75,1	76,5	80,1	81,9

Legenda: Valores com símbolo negativo (-) indicam que nesta concentração obteve maior crescimento em relação ao tratamento controle com meio BDA sem aditivos.

Fonte: Andrade, 2018.

Tabela 2 - Percentual de inibição do óleo essencial de citronela (*Cymbopogon winterianus*) frente a *Penicillium* sp. Dois Vizinhos, UTFPR, 2018.

Horas	24 (h)	48 (h)	72 (h)	96 (h)	120 (h)	144 (h)	168 (h)
% Inibição	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
Controle							
Positivo							
Clotrimazol	0	48,6	63,2	68,1	61,8	40,0	38,5
10 mg/mL							
<i>Tween 80</i> ®	0	-42,3	-12,7	3,2	4,5	-0,2	-0,2
50 µL/mL	0	48,6	27,3	15,9	15,8	-5,5	-7,1
100 µL/mL	0	48,9	65,4	56,0	50,0	26,4	24,4
400 µL/mL	0	49,5	68,2	74,1	77,3	77,4	77,4
800 µL/mL	0	49,5	68,2	74,1	77,3	77,4	77,4

Legenda: Valores com símbolo negativo (-) indicam que nesta concentração obteve maior crescimento em relação ao tratamento controle com meio BDA sem aditivos. Valores igual a 0 indicam que o tratamento com óleo essencial nesta concentração obteve o mesmo desenvolvimento do controle testemunha realizado com meio BDA sem aditivos, ou seja, em 24 horas o diâmetro do halo micelial continuou em 8,4 mm.

Com esses resultados, verificou-se que a partir da dosagem de 100 µL de óleo essencial de citronela, já houveram redução do crescimento micelial, destacam-se os efeitos nas dosagens de 400 µL e 800 µL do óleo de citronela, ambos com 81,9% de redução do crescimento micelial frente a *Fusarium* spp. e 77,4% de redução do crescimento micelial frente a *Penicillium* spp. em relação ao grupo controle.

4.2 AVALIAÇÃO DO PODER ANTIMICROBIANO IN VIVO

O experimento foi realizado na Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), no Campus de Dois Vizinhos. A incubação dos ovos foi realizada no laboratório de Controle Biológico. As análises microbiológicas o experimento foi conduzido no laboratório de Microbiologia.

Os ovos são provenientes do comércio local, coletados da cama. Matrizes da linhagem Cobb® com 55 semanas de idade, com peso médio de 60g para a incubação. Incubadora automática, marca *Brood* Chocadeira, modelo GOLD MASTER 1, com capacidade para 240 ovos, com controle da temperatura (37,5°C) e da umidade (65%) e viragem automática dos ovos a cada hora.

O delineamento experimental foi em blocos ao acaso, com 4 blocos, separados por 4 faixas de peso dos ovos (ovos superleves, leves, médios e grandes). No total foram 5 tratamentos com 48 ovos por tratamento.

O processo de obtenção das referidas concentrações se deu através de testes iniciais (pré-testes), concedendo assim, a verificação de presença ou ausência do halo de inibição micelial conforme dosagens e tratamentos escolhidos para o pré-teste, e com isso, tomou-se a decisão de quais dosagens iríamos usar no experimento definitivo.

O óleo essencial para esse experimento foi proveniente de uma marca comercial - FERQUIMA®. A espécie da citronela utilizada tem seu nome científico de *Cymbopogon winterianus*. O método de extração do óleo se deu através da destilação a vapor das folhas, com densidade a 20°C de 0,875 a 0,895, índice de refração a 20°C de 1,463 a 1,473, rotação ótica [-8°; +2°], e seus principais componentes são o citronelal (38%), citronelol (12%) e geraniol (22%). Não apresentando impurezas conforme rótulo do fabricante.

Os tratamentos definitivos foram compostos pelo T1: grupo controle, sem pulverização de óleo essencial de citronela (*Cymbopogon winterianus*). T2: grupo controle positivo, com a pulverização de antifúngico a base de Clotrimazol 10 mg/mL; T3: 400 µL de óleo de citronela + 40 µL de *Tween* 80® diluídos em 400 mL de água destilada; T4: 600 µL

de óleo de citronela + 60 μL de *Tween 80*® diluídos em 400 mL de água destilada e T5: 800 μL de óleo de citronela + 80 μL de *Tween 80*® diluídos em 400 mL de água destilada. O *Tween 80*® como citado anteriormente, é um tensoativo usado como um agente dispersante para misturar solubilizar o óleo essencial na água.

Antes da incubação, foi realizada a desinfecção dos ovos com pulverização manual da solução, de acordo com os tratamentos citados anteriormente. Os tratamentos foram colocados em um borrifador (um borrifador para cada tratamento), onde pulverizou-se toda a superfície do ovo. Esperou-se um tempo de 20 minutos para ocorrer a absorção, para a coleta de suabes.

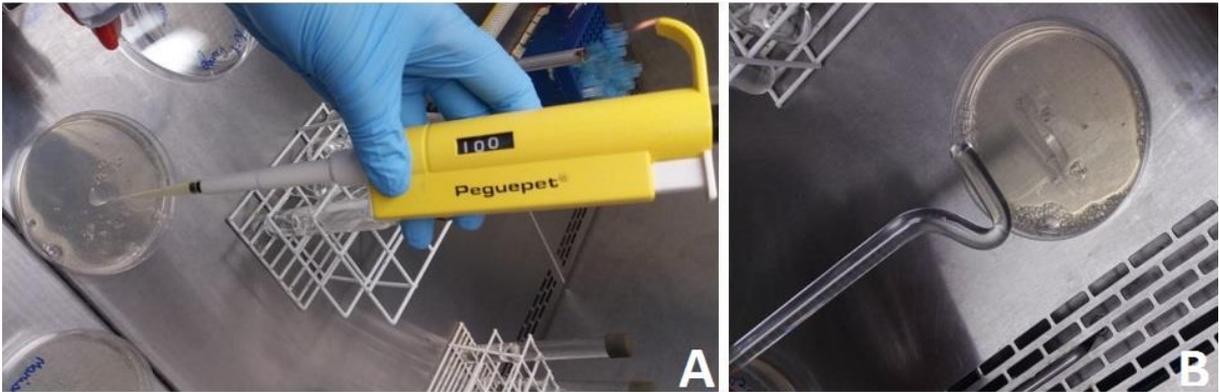
As amostras para análise microbiológica foram coletadas antes da desinfecção (Tratamento 1 – grupo controle) e após desinfecção, coletando suabes de contato (umedecendo o algodão no diluente, comprimindo-o contra as paredes do tubo para remover o excesso de líquido) em toda a superfície dos ovos, e homogeneizados em tubos com 10 mL de água peptonada 0,1%, sendo recomendados pelo *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods* (MIDURA & BRYANT, 2001).

Com o material coletado foram feitas as análises microbiológicas de contagem de bolores e leveduras e de bactérias totais.

Para a determinação da contagem tanto de bactérias aeróbias mesófilas, como na contagem de fungos, após a coleta dos suabes com solução peptonada 0,1%, homogeneizados por 60 segundos no tubo de ensaio, gerou uma diluição 10^{-1} , a partir desta diluição, foram efetuadas as demais diluições desejadas em solução peptonada 0,1% (10^{-2} e 10^{-3}).

Os meios utilizados foram o PCA (*Plate Count Agar*) para o plaqueamento em profundidade (para determinação total de bactérias), e o BDA (*Agar Batata Dextrose*) para o plaqueamento em superfície (para determinação de bolores e leveduras). Os mesmos após preparo, foram esterilizados em autoclave a 121°C por 15 minutos (ISO 11133-1).

Em seguida, foram inoculados 0,1 mL (100 μL) de cada diluição (10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3}) nas placas já identificadas, sobre o centro do meio sólido ágar batata acidificado, previamente preparado, e com a alça de Drigalski foi espalhado o inóculo por toda a superfície do meio, até que o excesso de líquido fosse absorvido. A alça com base de vidro, foi mergulhada em álcool 70% e flambada no bico de Bunsen entre uma placa e outra (Figura 6).

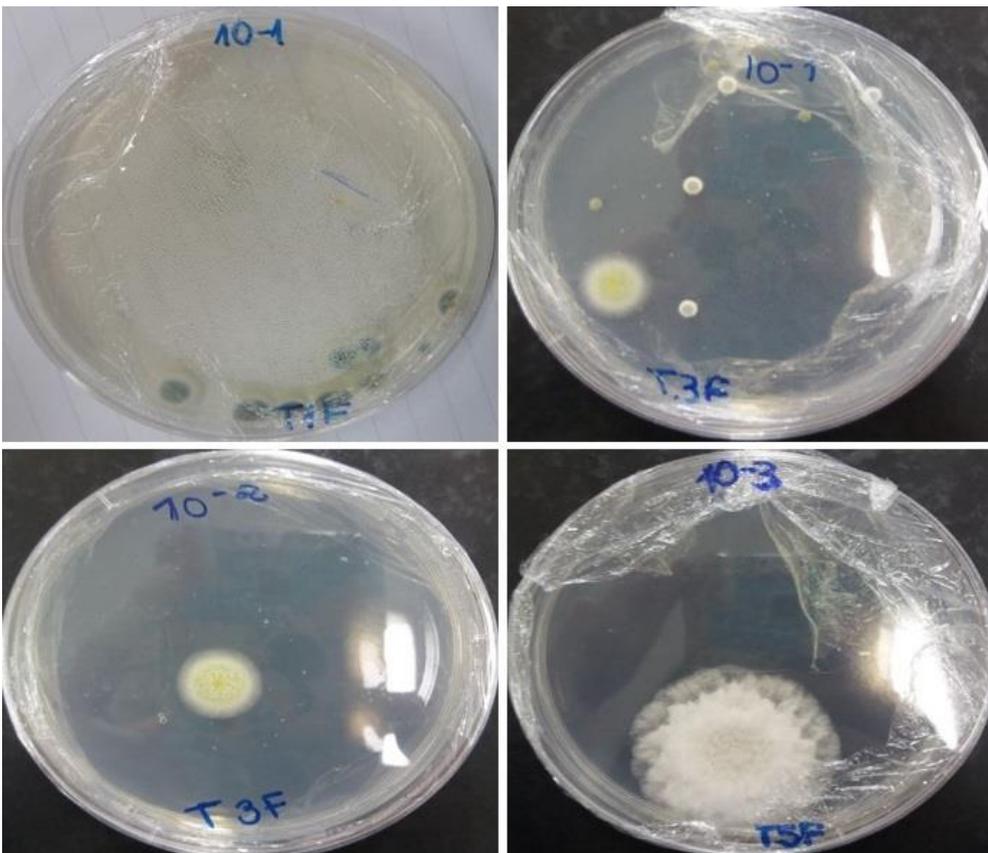


Fonte: Andrade, 2018.

Figura 6 - Inoculação da diluição (A). Plaqueamento em superfície. Alça de Drigalski espalhando o inóculo (B)

A incubação foi feita com as placas invertidas onde foram colocadas na incubadora a $25 \pm 1^\circ\text{C}$, por 5 a 7 dias (BRASIL, 2003).

Para contagem de colônias de fungos, utilizou-se lupa um contador de colônias, onde selecionava-se as placas com 15 a 150 colônias de bolores e leveduras (Figura 7).



Fonte: Andrade, 2018.

Figura 7 - Contagem de colônias de bolores e leveduras nas diluições 10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3}

No plaqueamento em profundidade, com o auxílio da pipeta, 1 mL (1000 μ L) de cada diluição foram inoculados em placas de Petri estéreis. Após adicionou-se 20 mL de meio PCA fundido e mantido em banho-maria a 46-48°C, onde misturamos o meio com o inóculo com movimentos suaves, na forma de oito, numa superfície plana para solidificar (Figura 8).



Fonte: Andrade, 2018.

Figura 8 - Inoculação da diluição (A). Plaqueamento em profundidade, meio com o inóculo (B)

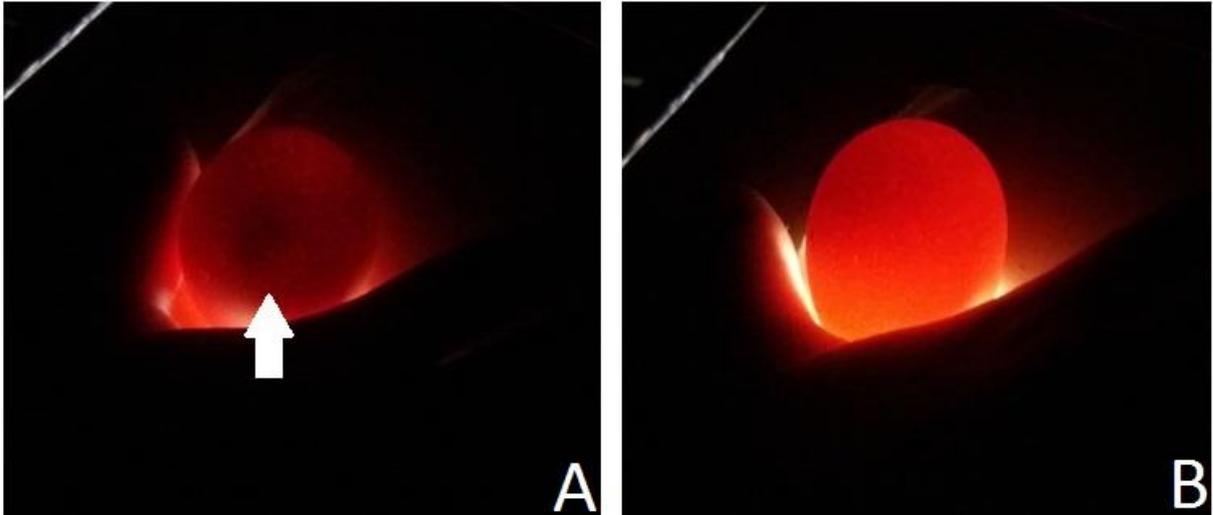
Foram incubadas as placas invertidas a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por 48 horas. Realizou-se a contagem das colônias de bactérias com o auxílio da lupa em um contador de colônias, com número por placa entre 25 a 250 colônias (BRASIL, 2003).

4.3 Ovoscopia e pesagem

Os ovos foram posicionados em bandejas, com a câmara de ar voltada para cima, para o correto desenvolvimento do embrião (BRITO, 2006), e incubados por 21 dias. Realizou-se a pesagem antes da incubação e no 18° dia.

No 7° dia de incubação foi realizada ovoscopia (Figura 9) para descartar os ovos inférteis, os quais, são identificados pela ausência da formação do blastoderme (ALMEIDA, 2008).

No 18° dia de incubação, os ovos foram colocados conforme tratamento em sacos plásticos de “filó”, para que ao nascer os animais não se misturassem, para posterior avaliação da qualidade dos pintainhos e, após isso, foram recolocados no nascedouro da mesma incubadora (Figura 10).



Fonte: Andrade, 2018.

Figura 9 - Ovoscopia, seta branca indicando presença de embrião (A). Ovo infértil, sem presença de embrião (B)

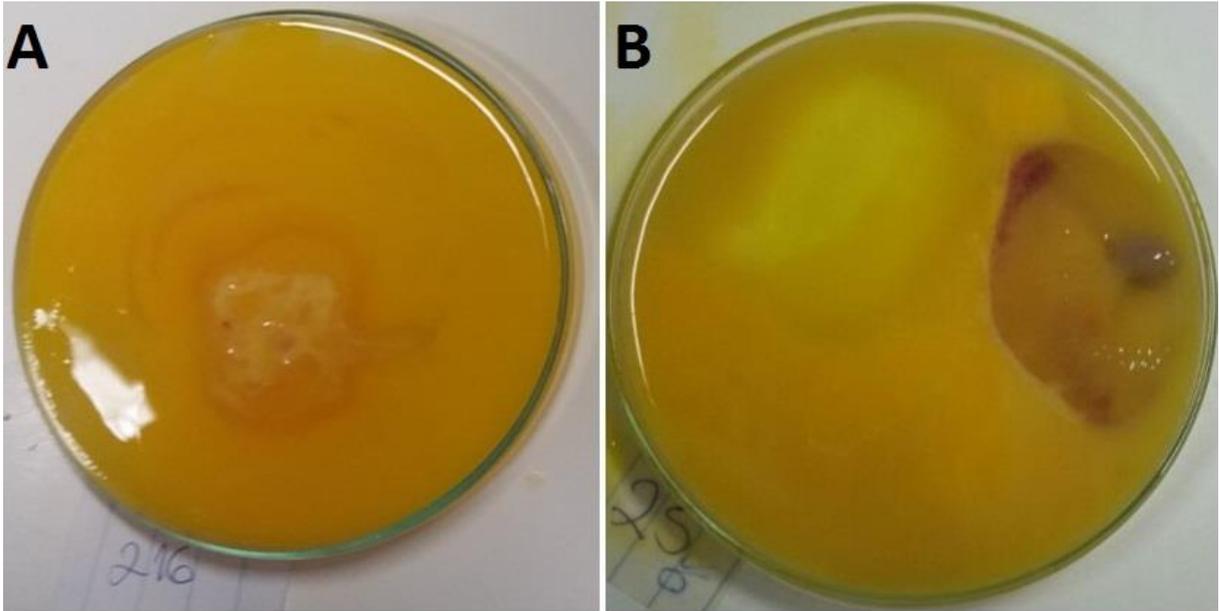


Fonte: Andrade, 2018

Figura 10 - Pintinhos que nasceram em sacos plásticos de “filó”

4.4 Avaliação da qualidade dos pintainhos

Após o nascimento dos animais, com 21 dias, foi avaliada a taxa de eclosão. Para obtenção desse valor, foi considerado o número de ovos eclodidos em relação ao número de ovos incubados. Nos ovos que não eclodiram foi realizado o embriodiagnóstico para verificar a idade da mortalidade do embrião. O embriodiagnóstico foi realizado de acordo com o guia de manejo de incubação da Aviagen e da Cobb-Vantress. Com isso, foi classificada a mortalidade embrionária inicial (1 a 7 dias), mortalidade intermediária (8 a 14 dias), mortalidade em fase final (15 a 19 dias), bicagem da casca (ovos bicados e não nascidos, 20 dias), e ovos inférteis (Figura 11).



Fonte: Andrade, 2018.

Figura 11 - Embriodiagnóstico. Mortalidade precoce - 1 a 7 dias (A). Mortalidade intermediária - 8 a 14 dias (B)

Também foi avaliada a qualidade dos pintos pós-eclosão. Para essa avaliação, os animais foram apanhados e observados visualmente, para classificá-los em boa, média ou má qualidade, segundo os critérios de Tona et al. (2003). As características e estimativas da qualidade do pintainho incluem avaliar as condições físicas, tais como, atividade com vivacidade, penugem bem seca, olhos brilhantes e vivos, aparência e cicatrização do umbigo, ausência de hérnias, conformação das pernas, entre outras características que foram pontuadas de acordo com uma escala segundo a importância de sobrevivência do animal e grau que se encontra a anomalia.

A soma das pontuações para todas as características citadas forneceu o resultado da qualidade das aves (Tabela 3). Pintinhos que somaram o escore de 100 pontos foram considerados ótimos, os que somaram entre 80 a 99 pontos foram considerados bons, aqueles com escore entre 50 a 79 pontos foram considerados de médias qualidade e os que somaram 49 pontos, ou menos, foram classificados como fracos. Ao término da avaliação, os pintinhos foram pesados individualmente.

Tabela 3 - Variáveis e suas definições e escores para avaliar a qualidade de pintos neonatos

Variável	Definição	Características	Escore
Atividade	Verificada quando se coloca o pintinho de costas. Um rápido retorno a posição em pé é definido como boa. Quando permanecer deitado, é definido como fraco.	Bom	16
		Médio	8
		Fraco	0
Penugem	A aparência deve ser limpa e seca. Quando estiver úmida e suja, ou ambos são cotados como ruins.	Limpa e seca	12
		Limpa e úmida	6
		Suja e úmida	0
Olhos	Coloca-se o pintinho em pé e observam-se seus olhos, o brilho e a extensão que ocupa a pálpebra sobre o olho.	Abertos e brilhantes	10
		Abertos e sem brilho	5
		Fechados	0
Umbigo	Examina-se a área do umbigo e ao redor dele, verificando-se o seu fechamento e sua cor. Quando a cor for diferente da corda pele, registra-se como de má qualidade.	Fechado e limpo	12
		Não completamente fechado, coloração normal	6
		Não fechado e coloração normal	0
Membrana remanescente	Na área do umbigo, avalia-se o tamanho de uma possível membrana remanescente. O tamanho será classificado como: muito grande, grande ou pequeno.	Sem membrana	12
		Pequena	6
		Grande	0
Abdome	Examina-se o abdome do pintinho visualmente. Quando estiver grande (balifo) é classificado como ruim.	Normal	12
		Médio	6
		Distendido	0
Pernas	O pintinho é colocado em pé para determinar se permanece firme nessa posição. A conformação dos dedos e articulação do joelho são examinadas.	Pernas/dedos e articulações normais	10
		Uma perna/dedos e articulações afetadas	5
		Duas pernas/dedos e articulações afetadas	0
Canelas	Observa-se o brilho e a cor da canela. A normal deve ser avermelhada e brilhante.	Brilhante, avermelhada	16
		Brilhante, pálida	8
		Opaca, pálida	0

Fonte: Adaptado de Tona et al. (2003).

Os dados foram submetidos à análise de variância, ANOVA, e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Para análise dos dados de contagem de colônias de fungos, foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis, com posterior comparação das médias pelo método Dwass, Steel, Critchlow-Fligner através dos procedimentos PROC GLM e PROC NPAR1WAY do programa estatístico SAS UNIVERSITY EDITION (2018).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Efeito sobre a contagem de bactérias mesófilas e fungos

Não houve diferença estatística, ($P > 0,05$), para a contagem de colônias de bactérias. Para a contagem de colônias de fungos, os tratamentos com 400 μL e 800 μL diferiram estatisticamente, ($P < 0,05$), sendo que ocorreu uma redução no crescimento das colônias no tratamento com 800 μL em relação ao 400 μL . Entre os tratamentos com Clotrimazol, 10mg/mL, controle, 400 μL e 600 μL , não se observou diferença estatística, o mesmo ocorreu para os tratamentos com Clotrimazol, 10mg/mL, controle, 600 μL e 800 μL (Tabela 4).

Tabela 4 - Análise de Médias para Colônias de Bactérias e Colônias Fungos

	Nível	Colônias Bactérias	Colônias Fungos
Tratamento	Clotrimazol 10mg/mL	1,609	0,286AB
	Controle	1,675	0,600AB
	400	1,791	0,759A
	600	1,330	0,233AB
	800	1,320	0,167B
Média		1,545	0,408
CV		51,31	189,7
EPM		0,064	0,064
		ANOVA ¹	Kruskal-Wallis Test ²
P		0,072	0,015

¹Médias foram comparadas pelo teste de Tukey (0,05). ²Médias foram comparadas pelo método Dwass, Steel, Critchlow-Fligner.

Vários estudos mostram a eficácia dos óleos essenciais na inibição do crescimento microbiano, que interferem na permeabilidade da membrana citoplasmática, causando perdas dos constituintes celulares, inativando ou destruindo o material genético das bactérias e causando lise da parede celular (BURT, 2004; TAJKARIMI et al., 2010)

Dentre os microrganismos de interesse na área alimentícia e de produção animal, destacam-se *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella Enteritidis*, que causam perda de produção, enfermidades aos animais, além de trazer riscos para a saúde pública, como surtos de toxinfecções alimentares. Diante disso, Pereira et al. (2014) determinaram a atividade antimicrobiana e a curva de morte termoquímica das bactérias, empregando óleos essenciais de *Thymus vulgaris* (tomilho), *Elettaria cardamomum* (cardamomo), *Eugenia*

caryophyllus (cravo da Índia), e *Foeniculum vulgare* dulce (funcho doce) sobre *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* Enteritidis e *Staphylococcus aureus*. As concentrações testadas foram de (%): 0,00; 0,25; 0,5; 1,0; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5; 4,0; 4,5; e 5,0. *Escherichia coli* foi a única bactéria sensível a todos os óleos em concentrações abaixo de 5%. O cravo da Índia não inibiu o crescimento de *S. aureus* nas concentrações testadas. Somente o óleo essencial de tomilho 0,25% inibiu o crescimento de *Salmonella Enteritidis*. Contudo, Moreira et al. (2005), estudando vários óleos essenciais contra *E. coli*, observaram maior efetividade do óleo de cravo da Índia, MIC de 0,25%, igual ao valor encontrado no trabalho de Pereira et al., 2014.

No trabalho realizado por Mata et al. (2009), também determinaram o controle dos fungos *Aspergillus* sp. (0,5%), *Penicillium* sp. (0,5%), *Cladosporium* sp. (13,5%), *Curvularia* sp. (3%), *Nigrospora* sp. (1%) e *Rhizopus* sp. (1,5%), realizando desinfecção prévia de sementes de mandacaru, submetidas a diferentes concentrações de óleo de erva-doce (*Pimpinella anisum*) e de citronela (*Cymbopogon winterianus*), compondo os seguintes tratamentos: 1% (T1), 1,5% (T2), 2,0% (T3) e 2,5% (T4). Os resultados do experimento mostraram que o crescimento de *Cladosporium* sp., *Curvularia* sp. e *Nigrospora* sp. foram controlados com óleo de *P. anisum* em todas as concentrações utilizadas, porém o óleo essencial de *C. winterianus* controlou apenas *Cladosporium* sp. e *Nigrospora* sp. constatando maior eficiência do óleo essencial de *P. anisum*.

Schneider et al. (2012) usaram o óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (capim limão) sobre o fungo *Mycosphaerella fragariae* que causa mancha nas folhas em morangueiro. Foram utilizadas as concentrações de 0,1 (100mL); 0,25 (250mL); 0,5 (500mL); 0,75 (750mL) e 1% (1000mL) de óleo para 100 mL de meio de cultivo ágar-batata-dextrose (BDA). Semelhante ao nosso estudo, também foi depositado um disco contendo uma colônia do fungo no centro da placa, e realizado as medições do crescimento da colônia. Verificou-se que todas as concentrações do óleo de *C. citratus* inibiram em 100% o crescimento micelial do fungo.

Outro trabalho realizado por Cruz et al. (2015) utilizando o óleo essencial de citronela (*Cymbopogon winterianus*) para testar sua eficácia contra o fungo *Fusarium solani*, que ataca a cultura de goiabeira. Para avaliar o efeito dos óleos essenciais no crescimento micelial, esporulação e germinação de esporos do fungo, foram utilizadas alíquotas de 5, 10, 15, 20, 25 e 30 µL do óleo essencial que foram distribuídas na superfície do meio de cultura BDA contido em placas de Petri antes da repicagem do fungo. Os resultados apresentaram que até mesmo na menor concentração do óleo em 5 µL já inibiu em mais de 90% a

germinação de esporos, e reduziu a produção de esporos em mais de 95%, indicando que esse óleo possui ação na atividade fungitóxica.

Seixas et al. (2011) avaliaram efeito fungitóxico do óleo essencial de capim-citronela (*Cymbopogon nardus* L.) sobre a inibição micelial do fitopatógeno *Fusarium subglutinans*, agente causal da fusariose da cultura do abacaxi (*Ananas comosus*). Foram utilizadas seis alíquotas (0, 5, 10, 15, 20 e 25 μ L) do óleo e do citronelal que foram distribuídas na superfície do meio BDA (batata-dextrose-ágar) antes da repicagem do fungo. O crescimento micelial foi medido após 48 h de instalação do experimento e em cinco épocas de avaliação (2, 4, 6, 8 e 10 dias após repicagem). Os resultados indicaram que o óleo essencial do capim-citronela demonstrou maior efeito inibitório do crescimento micelial do fungo *F. subglutinans*. Em todos os tratamentos utilizados o óleo essencial proporcionou menor taxa de crescimento micelial.

Nascimento et al., (2014) usaram óleo essencial de eucalipto, citronela, gengibre e tea tree contra fungo *Fusarium solani*, causador da fusariose na soja. Discos miceliais oriundos das colônias foram transferidos para meio de cultura BDA (batata-dextrose-ágar) acrescidos das referidas substâncias em diferentes concentrações: 0, 25, 50, 75, 100 μ L. Todos os óleos testados mostraram-se promissores no controle do patógeno, destacando-se o óleo essencial de tea tree, que obteve 87,44% de controle em relação a testemunha, na concentração de 75 μ L. Os demais óleos de eucalipto, gengibre e citronela, obtiveram cerca de 48, 59 e 64% de controle, respectivamente.

Na área animal Perini, Silvia (2013) avaliou a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de *Salvia sclarea*, *Eugenia caryophyllata* (cravo-da-índia), *Thymus vulgaris* (tomilho), *Cymbopogon winterianus* (citronela), *Elettaria cardamomum* (cardomono) *Cymbopogon flexuosos* (capim-limão), *Rosmarinus officinalis* (alecrim) e *Cinnamomum cassia* (canela-cássia) frente aos fungos isolados de *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae* associados a casos clínicos e subclínicos de mastite bovina. Onde para isolados de *S.aureus*, observou-se que o óleo de *C. cassia* foi o de maior eficiência, apresentando 0,03906% de concentração inibitória mínima (CMI), seguido dos óleos de *T.vulgaris* e *C. flexuosos* (0,15625%) e *E. caryophyllata* e *C. winterianus* (0,3125%). Para isolados de *S. agalactiae*, o óleo mais eficiente também foi o *C. cassia* com CIM de 0,01953%, seguido dos óleos de *E. caryophyllata* (0,078125%), *C. flexuosos* e *T. vulgaris* (0,15625%), e *C. winterianus* e *E. cardamomum* com 0,625%. Observou-se sinergismo em todas as combinações de óleos ensaiadas, e os resultados obtidos apresentaram uma perspectiva de utilização dos mesmos no controle das infecções intramamárias em bovinos.

Olivo. J. C. et al (2008), avaliaram o efeito in vivo e in vitro do óleo de citronela (*Cymbopogon nardus* (L.) Rendle) no carrapato de bovinos (*Boophilus microplus*), colhidas de animais da raça Holandesa, naturalmente infestados. Para as experimentações in vitro foram usadas sete (0; 0,5; 1,0; 10,0; 25,0; 50,0; 100,0%) e nove (0,1; 0,25; 0,5; 1,0; 2,0; 10,0; 25,0; 50,0; 100%) concentrações de óleo de citronela, sendo testadas em fêmeas ingurgitadas.

Submetidas ao teste do biocarrapaticidograma em três imersões, com intervalos de 24 horas, A eficácia observada foi de 0; 44,2; 92,1; 85,6; 87,8; 87,0; 88,9 e de 0,7; 2,8; 51,6; 79,3; 81,0; 87,1; 86,7; 89,5%, respectivamente. A ação acaricida deste produto também foi comprovada por CHUNGSAMARNYART & JIWAJINDA (1992) que, utilizando o óleo de citronela a 12,5; 8,3 e 7,1%, diluído em etanol, verificaram ação larvicida de 95,7; 92,7 e 58,1%, respectivamente.

A eficácia da erva-de-santa-maria (*Chenopodium ambrosioides*) no controle de endoparasitos de galinha caipira (*Gallus gallus*) foi testada por VITA et al. (2014), com ensaios in vitro e in vivo nas formas homeopáticas e fitoterápicas, apresentando valores significativos no controle contra nematoides, em galinhas caipiras, com índices variando entre 90,00% a 100,00%.

No estudo de BRITO & FERNANDES (2013), foi avaliada a ação anti-helmíntica de noni (*Morinda citrifolia*) sobre o nematoide *Heterakis gallinarum*. Nos testes in vitro, com concentrações elevadas dos extratos aquoso e etanólico, apresentaram mortalidade dos nematoides superior a 90%, comprovando-se a eficácia dos extratos.

Óleos essenciais também são utilizados para fins alimentícios ou como aditivos. SILVA et al. (2011) avaliaram os efeitos da inclusão de óleo essencial da aroeira-vermelha (*Schinus terebinthifolius Raddi*) como promotor de crescimento incorporado nas rações de frangos de corte. No estudo foi observado que a adição de 0,4% de óleo de aroeira promoveram a melhoria na superfície absorptiva intestinal e uma diminuição no peso relativo dos intestinos delgado e grosso das aves se comparado com aves alimentadas sem promotor de crescimento. Ao observar o desempenho animal houve o mesmo ganho de peso com a adição de 0,4% de óleo com o peso que a dieta com promotores de crescimento.

5.2 Resultado da Avaliação da qualidade dos pintainhos

Na análise de variância para qualidade/escore, taxa de eclosão e peso dos pintainhos não houve diferença estatística significativa entre os tratamentos. (Tabela 5).

De acordo com as variáveis para determinar a qualidade dos pintos pós eclosão, nenhum tratamento obteve a pontuação máxima (100), mas também não tiveram pontuações consideradas ruins/fracos (abaixo de 50), apenas o tratamento de 800 µL de óleo essencial obteve pontuação considerada média com 75,71 pontos (escore entre 50 a 79 pontos). A taxa de eclosão é um importante parâmetro utilizado nas empresas do setor avícola para mensurar a qualidade da incubação. Ela representa a quantidade de pintos viáveis nascidos em relação aos ovos incubados. Tona et al. (2003) relataram que a qualidade dos pintos de um dia tem relação com a qualidade da incubação.

O tratamento com 800 µL de óleo essencial, foi o que apresentou a menor pontuação média (75,71) em relação ao grupo controle (86,53), Clotrimazol 10mg/mL (86,68), 400 µL - Óleo de Citronela (85,20) e 600 µL – Óleo de Citronela (89,63) que apresentaram as médias numéricas superiores.

Para as avaliações dos parâmetros de mortalidade embrionária não houveram diferenças entre os tratamentos (Figura 12).

Tabela 5 - Avaliação Qualidade dos Pintainhos

Tratamento	Qualidade/Escore	Taxa de Eclosão	Peso dos Pintainhos
Controle	86,53	0,61	38,70
Clotrimazol 10mg/mL	86,68	0,48	41,07
400 µL - Óleo de Citronela	85,20	0,36	40,85
600 µL – Óleo de Citronela	89,63	0,54	40,40
800 µL – Óleo de Citronela	75,71	0,50	41,99
\bar{X}	84,75	0,50	40,6
CV	14,88	37,52	9,65

Legenda: Não houve diferença estatística.

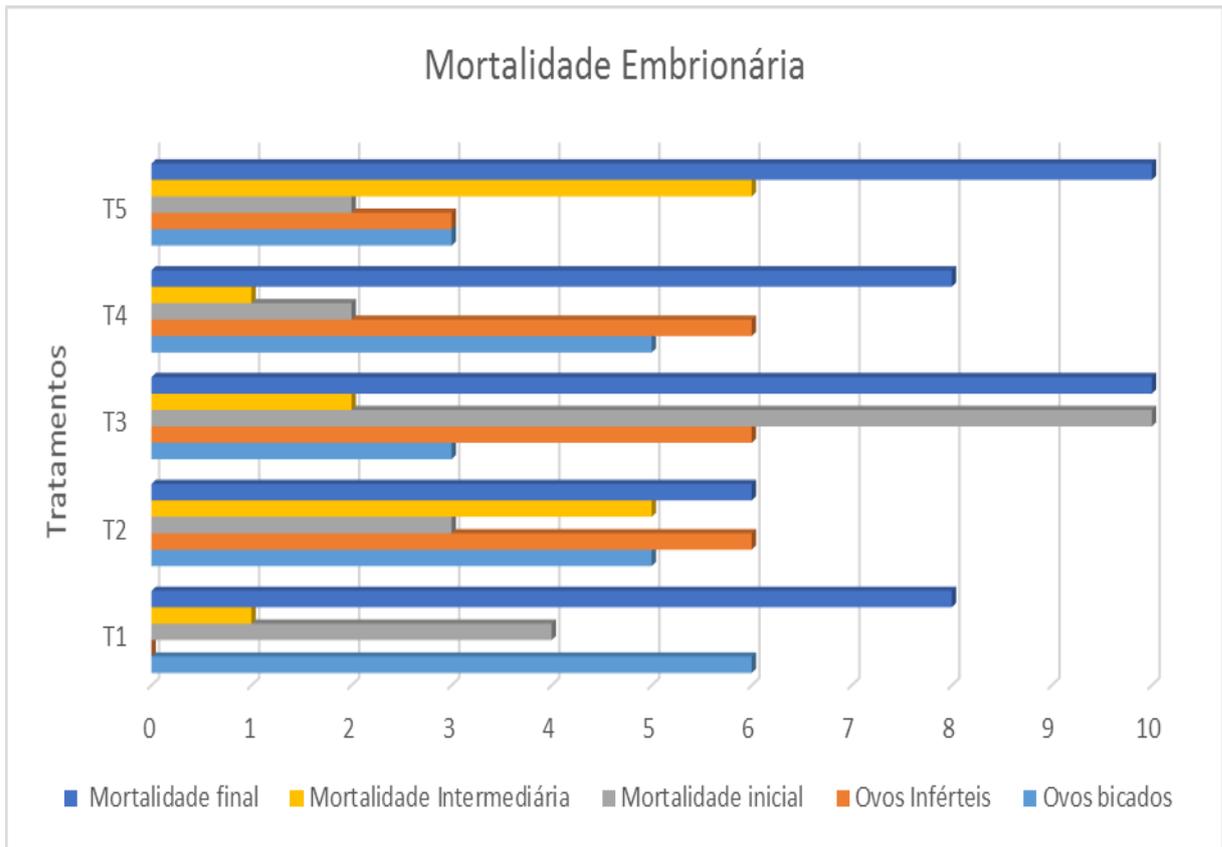


Figura 12 - Classificação da mortalidade embrionária de frangos de corte submetidos a desinfecção prévia na casca do ovo em diferentes concentrações do óleo essencial de citronela *T1: grupo controle. T2: grupo controle positivo, com a pulverização de antifúngico a base de Clotrimazol 10 mg/mL. T3: 400 μ L de óleo de citronela + 40 μ L de *Tween* 80®. T4: 600 μ L de óleo de citronela + 60 μ L de *Tween* 80® e T5: 800 μ L de óleo de citronela + 80 μ L de *Tween* 80®.

6. CONCLUSÃO

Pode-se concluir através deste trabalho que o óleo essencial de citronela (*Cymbopogon winterianus*) demonstrou efeito inibitório do crescimento micelial nos vários gêneros de fungos e bactérias presentes na casca do ovo, sendo mais eficiente nas dosagens de 400 µL e 800 µL, confirmando a sua eficiência fungicida e bactericida. Na análise de variância para qualidade/escore, taxa de eclosão, peso dos pintainhos e avaliações dos parâmetros de mortalidade embrionária não houveram diferenças estatística entre os tratamentos, demonstrando que o óleo essencial de citronela atuou de forma natural, não sendo tóxico para o desenvolvimento dos embriões e para o nascimento dos pintainhos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADESIYUN, A.; OFFIAH, N.; SEEPERSADSINGH, N.; RODRIGO, S.; LASHLEY, V.; MUSAI, L. **Frequency and antimicrobial resistance of enteric bacteria with spoilage potential isolated from table eggs**. Food Research International, v. 39, p. 212–219, 2006.
- ALBINO, L. F. T. **Criação de Frango e Galinha Caipira: Avicultura Alternativa**. 2. ed. Viçosa M.G., 2005.p. 94-109.
- ALMEIDA, I. **Reprodução Geral Ovoscopia**. Disponível em:<
<http://calospitasonline.oteuforum.com/reproduco-geralvt4.html?start=0&postdays=0&postorder=asc&highlight=&sid=518135ee4b4e2a8983ef9465fffd1f62A>>. Acesso em: 03 de maio de 2018.
- ANDREATTI FILHO, R.L. **Enfermidades micóticas**. In: BERCHIERI JÚNIOR, A. & MACARI, M. (Eds.) Doenças das aves. Campinas: FACTA, 2000. p.369-378.
- APBA (Associação Brasileira de Proteína Animal). **Estatística da produção de frangos de corte**. Boletim Estatístico, 2015. Disponível em: <[http:// http://abpa-br.com.br/setores/avicultura/mercado-mundial](http://abpa-br.com.br/setores/avicultura/mercado-mundial)> Acesso em: 11 de fevereiro de 2018.
- ARAGON-ALEGRO, L. C; SOUZA, K. L. O; SOBRINHO, P. S. C; LANDGRAF, M; DESTRO, M. T. **Avaliação da qualidade microbiológica de ovo integral pasteurizado produzido com e sem a etapa de lavagem no processamento**. Ciência e Tecnologia de Alimentos. v. 25, n.3, p. 618-622, 2005.
- ARAÚJO, W. A. G.; ALBINO, L. F. T. **Desinfecção de ovos incubáveis**. 2012. Disponível em: <http://www.trnres.com/ebook/uploads/araujo/T_13210042509%20Araujo.pdf>. Acesso em: 10 de maio de 2018.
- AVIAGEN. **Manejo de incubação**. Disponível em:
 <http://pt.aviagen.com/assets/Tech_Center/BB_Foreign_Language_Docs/Portuguese/Como...-Incubao-Portugus.pdf>. Acesso em: 20 de julho de 2018.
- AVILA, V. S. et al. **Influência do horário de arracoamento na produção de ovos de acordo com o horário de coleta em reprodutoras de frango de corte**. Embrapa suínos e aves, 2001, P 1-3

BAIÃO, N. C.; CANÇADO S. V. **Fatores que afetam a qualidade da casca do ovo.** Cad. téc. Esco. Vet. UFMG, N°21, P.01-82 1997.

BAKKALI, F. *et al.* **Biological effects of essential oils.** Food and Chemical Toxicology, v. 46, n. 02, p. 446-475, 2008.

BERMUDEZ, A.J.; BROWN, B.S. **Principles of disease prevention: Diagnosis and control.** In: SAIF, Y.M. Diseases of Poultry. 11.ed. Iowa: Iowa State Press, 2003. p.17-53.

BRAKE, J.; SHELDON, W. **Effect of a quaternary ammonium sanitizer for hatching eggs on their contamination, permeability, water loss and hatchability.** Poultry Science, v.69, n.4, p.517-525, 1990.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n° 62, de 26 de agosto de 2003. Estabelece o regulamento técnico para os métodos analíticos oficiais para as análises microbiológicas para controle de produtos de origem animal e água. **Diário Oficial da União**, Brasília, 18 set. 2003. Seção 1, p.14.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC n. 216 de 15/09/2004. Publicada em 16/09/2004. **Regulamento técnico de boas práticas para serviços de alimentação.** Brasília. DF: MS, 2004. Disponível em <http://e-legis.anvisa.gov.br>. Acesso em: 12 de maio de 2018.

BRITO, A. B. **Problemas Microbiológicos na Incubação Artificial.** Disponível em: <http://www.polinutri.com.br/conteudo_artigos_anteriores_agosto_06.htm>. Acesso em: 20 de fevereiro de 2018.

BRITO, D. R. B.; FERNANDES, R. M.; **Ação anti-helmíntica da *Morinda citrifolia* (noni) sobre *Heterakis gallinarum*.** Semina: Ciências Agrárias, Londrina, v. 34, n. 4, p. 1775-1782, 2013.

BURT, S. **Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review.** International Journal of Food Microbiology, v.94, n.3, p.223-253, 2004. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022>>. Acesso em: 14 maio de 2018. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022.

BRUCE, J.; DRYSDALE, E.M. **Egg hygiene: Routes of infection.** In: TULLET, S.G. Avian Incubation. London: Butterworth-Heinemann, 1991. p. 257-267. Trabalho apresentado no 22. Poultry Science Symposium.

CAL, K. **Skin penetration of terpenes from oils and tropical vehicles.** Planta Médica, Stuttgart, v. 72, n. 4, p. 311-316, Mar. 2006.

CALIL, T.A.C. **Princípios básicos de incubação.** In: CONFERÊNCIA APINCO 2007, SIMPÓSIO SOBRE INCUBAÇÃO, 2007. Santos. Anais... Campinas: Fundação APINCO de Ciência e Tecnologia Avícola, 2007. 1 CD-ROM.

CARDOSO, A.L.S.P. **Avaliação da qualidade sanitária de incubatório por meio de placas de sedimentação.** Arq. Inst. Biol., São Paulo, v.76, n.2, p.279-283, abr./jun., 2009.

CARDOSO, A. L. S. P; TESSARI, E. N. C; CASTRO, A. G. M; KANASHIRO, M. I; GAMA, N. M. S. Q. **Pesquisa de coliformes totais e coliformes fecais analisados em ovos comerciais no laboratório de patologia avícola de descalvado.** Arquivos do Instituto Biológico. v. 68, n.1, p. 19-22, 2001.

CAMPOS, J. E. **Avicultura razões, fatos e divergências,** Incubação Industrial. FEPMVZ Belo Horizonte M. G.: 2000, Capítulo 7, p. 203-303.

COSTA, J. G. M. et al. **Estudo químico-biológico dos óleos essenciais de *Hyptis martiussi*, *Lippia sidoides* e *Syzygium aromaticum* frente às larvas do *Aedes aegypti*.** Revista Brasileira de Farmacognosia, São Paulo, v. 15, n. 4, p. 304-309, out./dez. 2005.

CASTRO, H. G. et al. **Avaliação do teor e composição do óleo essencial de *Cymbopogon nardus* (L.) em diferentes épocas de colheita.** Revista Ciência Agronômica, v. 41, n. 2, p. 308-314, 2010.

CHUNGSAMARNYART, N.; JIWAJINDA, S. **Acaricidal activity of volatile oil from lemon and citronella grasses on tropical cattle ticks.** Kasetsart Journal, v.26, p.46-51, 1992.

CRUZ T. P. et al., 2015. **Atividade fungicida do óleo essencial de *cymbopogon winterianus* jowit (citronela) contra *fusarium solani*.** Biosci. J., Uberlandia, v. 31, n. 1, p. 1-8, Jan./Feb. 2015.

DATTA, S. C. **Cultivation of *Cymbopogon winterianus* Jowitt for production of citronella (Java) oil.** In: ATAL, C. K., KAPUR, B. M. **Cultivation and utilization of aromatic plants.** New Delhi: G. C. Printers, p. 325-30. 1982.

DECUYPERE, E., MALHEIROS, R.D., MORAES, V.M.B., et al., **Fisiologia do Embrião.** In: MACARI, M., GONZALES, E. **Manejo da Incubação.** 2.ed. Editora FACTA. Jaboticabal-SP, p.65-94. 2003

DI FABIO, J. **Higiene e controle sanitário do incubatório.** In: Simpósio Internacional sobre Manejo de Matrizes e Incubação. Anais. Campinas. FACTA, 1997. p.91-106.

DI PASQUA, R. et al. **Changes in membrane fatty acids composition of microbial cells induced.** Journal Agricultural Food Chemistry, London, v. 54, n. 7, p. 2745-2749, Apr. 2006.

ELGUERA, M. A., **Relação entre o manejo de reprodutoras de carne e qualidade dos ovos incubáveis.** 2o Simpósio Técnico sobre Matrizes de Frango de Corte. Chapecó, SC, Brasil. 1999.

FERRO, D. **Fitoterapia: conceitos clínicos.** São Paulo: Atheneu, 2006.

FONSECA et al., (2015). **Potencial de óleos essenciais de plantas medicinais no controle de fitopatógenos.** Rev. Bras. Pl. Med., Campinas, v.17, n.1, p.45-50, 2015.

GUSTIN, P. C. **Biossegurança no incubatório.** In: MACARI, M.; GONZALES, E. **Manejo da incubação.** Campinas, SP: Ed. FACTA, 2003. Cap. 3, p. 297 - 349.

HEIER, B.T.; JARP, J. **An epidemiological study of the hatchability in broiler breeder flocks.** Poultry Science, v.80, n.8, p.1132-1138, 2001.

ISSO 6887-1. **Microbiology of food and animal feeding stuffs – Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination – Part1: General rules for the preparation of the initial suspension and decimal, 1st ed.** The International Organization for Standardization, 1999.

ISO/TS 11133-1. **Microbiology of food and animal feeding stuffs – Guidelines on preparation and production of culture media – Part 1: General Guidelines on quality assurance for the preparation of culture media in the laboratory, 1st ed.** The International Organization for Standardization, 2000.

LERTSATITTHANAKORN, P. et al. **Effect of citronella oil on time kill profile, leakage and morphological changes of propionibacterium acnes**. Journal of Essential Oil Research, Carol Stream, v. 22, n. 3, p. 270-274, May/June 2010.

MATA, F. M. et al. **Incidência e controle alternativo de patógenos em sementes de mandacaru (*Cereus jamacaru* DC, Cactaceae)**. Disponível: <<http://www.ufrgs.br/seerbio/ojs/index.php/rbb/article/view/1115>> Acesso: 20 de fevereiro de 2018.

MIDURA, T.F. & BRYANT, R.G. **Sampling plans, sample collection, shipment, and preparation for analysis**. In: DOWNES, F.P. & ITO, K. (eds.), *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*, 4th ed. Washinton: American Public Health Association (APHA), 2001. Chapter 2, p. 13-23.

MOURA, R. D. **Produtos biológicos e alternativos no controle de doenças pós-colheita em melão cantaloupe**. Dissertação de Mestrado – Agronomia. Mossoró, RN: Universidade Federal Rural do Semi-árido, 2007. Disponível em: <www.dominiopublico.gov.br/pesquisa/DetalheObraForm.do?> Acesso em 13 maio de 2018.

MOREIRA, M.R. et al. **Inhibitory parameters of essential oils to reduce a foodborne pathogen**. LWT - Food Science and Technology, v.38, p.538-570, 2005. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2004.07.012>>. Acesso em: 20 dez. 2013.
doi:10.1016/j.lwt.2004.07.012

NASCIMENTO, D. M. et al. **Controle in Vitro do Fusarium sp. Causador da Fusariose na Soja**. Agroecol, Dourados, MS, 2014. Disponível em: <<file:///C:/Users/User/Downloads/16304-1-67476-1-10-20150109.pdf>>. Acesso em: 20 de maio de 2018.

NARUSHIN, V.G.; ROMANOV, M.N. **Egg physical characteristics and hatchability**. World's Poultry Science Journal, v.58, n.3, p.297-303, 2002.

NEVES, A. C. R. S. **Maximização do Fluxo Operacional em Incubatório Comerciais**. VII Simpósio Goiano de Avicultura e II Simpósio Goiano de Suinocultura - Avesui Centro-Oeste Seminário Técnico de Avicultura. 2005. Goiânia - GO. Disponível em: <www.cnpsa.embrapa.br/down.php?tipo=publicacoes&cod_publicacao=497>. Acesso em: 07 de março de 2017.

CONCEA. Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal. **Normativas do CONCEA**. Disponível em: < <http://www.invitare.com.br/arq/ceua/Arquivo-3-normativas-concea-2016.pdf>> Acesso em: 10 de maio de 2018.

NORTH, M. O. **Maintaining hatching egg quality. Commercial chicken production manual**. 3ed. p, 71-84, 1984. (Patrício, I.S. 2003).

OLIVO, J. C. et al. **Óleo de citronela no controle do carrapato de bovinos. Ciência Rural**. Santa Maria, v.38, n.2, p.406-410, mar-abr, 2008. Disponível em: < <http://www.scielo.br/pdf/cr/v38n2/a18v38n2.pdf>> Acesso em: 03 de março de 2018.

OMS (Organizacion Mundial de la salud). Alma-Ata 1978: **Atención Primária de Salud**. Genebra. OMS, série saúde para todos, n.1, 1978. 3-4p.

ORTH, M.O. **Commercial Chicken Production Manual**. Westport: The Avi Publishing, 1972. p. 21-30.

PEREIRA, A. A. et al. **Inativação termoquímica de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella enterica Enteritidis* por óleos essenciais**. *Ciência Rural*, Santa Maria, v.44, n.11, p.2022-2028, nov, 2014.

PERINI, SILVIA. **Atividade antimicrobiana de óleos essenciais frente a *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae* isolados de mastite bovina**. Lavras: UFLA, 2013. 70 P. :il. Disponível em: < http://repositorio.ufla.br/bitstream/1/1703/1/DISSERTA%C3%87%C3%83O_Atividade%20antimicrobiana%20de%20%C3%B3leos%20essenciais%20frente%20a%20Staphylococcus%20aureus%20e%20Streptococcus%20agalactiae%20isolados%20de%20mastite%20bovina.PDF> Acesso em: 15 de maio de 2018.

RISTOW, L. E. Desinfetantes e desinfecção em avicultura. *Revista Ave world* [online], edição 29, 2008. Disponível em:

<http://www.agrolink.com.br/saudeanimal/NoticiaDetalhe.aspx?codNoticia=73085>

SAYEED, S. A., SANKARAN, R. - **A study on the behaviour of air microflora in food industries**. *Journal of Food Science and Technology*, Mysore. v. 27 n. 5 p. 340-344, 1990.

SCHNEIDER, C. F.; NOZAKI, M. H.; PIATTI, A. **Efeito fungitóxico do óleo essencial de capim limão sobre *Mycosphaerella fragariae***. Revista Varia Scientia Agrária, v.2, n.2, p. 91-98, 2012.

SCHMIDT, G.S. et al. **Fatores que afetam a qualidade do pinto de corte**. Artigos Embrapa suínos e aves, 2002. Capturado em 25 mar. 2017. Online. Disponível na Internet: <<http://www.cnpsa.embrapa.br/?/artigos/2002/artigo-2002-n018.html;ano=2002>> Acesso em: 20 de fevereiro de 2018.

SEIXAS, P. T. L. et al., **Controle fitopatológico do *Fusarium subglutinans* pelo óleo essencial do capimcitronela (*Cymbopogon nardus* L.) e do composto citronelal**. Rev. Bras. Pl. Med., Botucatu, v.13, especial, p.523-526, 2011.

SCHMIDT, G.S. et al. **Incubação: características dos ovos incubados**. Artigos Embrapa suínos e aves, 2003. Capturado em 25 mar. 2017. Online. Disponível na Internet: <http://www.cnpsa.embrapa.br/sgc/sgc_artigos/artigos_k0u9z5v.html>. Acesso em: 9 de janeiro de 2018.

SILVA, E. N. **Biossegurança básica em incubação**. In: International Poultry Consultants IPC Inc. Clínica de incubação. Brasília – DF: Asa Alimentos Ltda., 1996, p.1-5.

SILVA, I. et al. **Noções sobre o organismo humano e utilização de plantas medicinais**. Cascavel: Assoeste, 1995.

SILVA, M. A.; PESSOTTI, B. M. S.; ZANINI, S. F.; COLNAGO, G. L.; NUNES, L. C.; RODRIGUES, M. R. A.; FERREIRA, L. **Óleo essencial de aroeira-vermelha como aditivo na ração de frangos de corte**. Ciência Rural, v. 41, n. 4, p. 676-681, 2011.

STANGARLIN, J. R.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; CRUZ, M. E. S.; NOZAKI, M. H. **Plantas Medicinais e controle alternativo de fitopatógenos**. Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento, n.11, p.16-21, 1999. Disponível em: <www.biotecnologia.com.br/revista/bio11/plantas.pdf> Acesso em: 10 maio de 2018.

STRINGHINI, M. L. F. **Perfil socioeconômico e microbiológico de manipuladores e qualidade de ovos de granjas de produção comercial. Influência da contaminação experimental por *Pseudomonas aeruginosa* sobre a qualidade de ovos não-lavados e lavados**. 2008. 142 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal). Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Goiás, Goiânia.

SWANSON, K.M.J, PETRAN, R.L. & HANLIN, J.H. **Culture methods for enumeration of microorganisms**. In: DOWNES, F.P & ITO, K. (eds), *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, 4th ed.* Washinton: American Public Health Association (APHA), 2001. Chapter 6, p.53-67.

UFJF- Universidade Federal de Juiz de Fora. Disponível em:

<http://www.ufjf.br/microbiologia/files/2018/04/ROTEIRO-PARA-AULAS-PR%C3%81TICAS-bacteriologia-2018-parte-02-Tecnicas-de-semadura-1.pdf>

TAJKARIMI, M.M. et al. **Antimicrobial herb and spice compounds in food**. *Food Control*, v.21, n.9, p.1199-1218, 2010. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2010.02.003>>. Acesso em: 22 maio 2018. doi: 10.1016/j.foodcont.2010.02.003.

TESKE, M.; TRENTINI, A. M. M. **Herbarium compêndio de fitoterapia**. 3.ed. Curitiba: Herbarium Laboratório Botânico, 1997.

TESSARI, E.N.C. **Prevalência de aspergilose pulmonar em pintos de um dia de idade**. *Arq. Inst. Biol.*, São Paulo, v.71, n.1, p.75-77, jan. /mar. 2004.

TONA, K.; BAMELIS, F.; KETELAERE, de B., et al. Effects of EPP StoraPe Time on Spread of Hatch, Chick Quality, and Chick Juvenile Prowth. **Poultry Science**, ChampaiPn, v.82, p.736–741, jan., 2003.

VITA, G. F.; FERREIRA, I.; PEREIRA, M. A. V. C.; AZEVEDO, J. R.; SANAVRIA, A.; BARBOSA, C. G.; GALLO, S. S. M.; VASCONCELLOS, H. V. G. **Eficácia de *Chenopodium ambrosioides* (erva-de-santa-maria) no controle de endoparasitos de *Gallus gallus* (galinha caipira)**. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 34, n. 1, p. 39-45, 2014.

WIJESEKERA, R.O.B., JAYEWARDENR, A. L., FONSEKA, B.D. **Varietal differences in the constituents of citronela oil**. *Phytochemistry*, v.12, n.11, p.2697-04, 1973.

WILLIAMS, J.E. **Effect of high-level formaldehyde fumigation on bacterial populations on the surface of chicken hatching eggs**. *Avian Diseases*, Kennett Square, Pa., v.14, n.2, p.386-391, 1970.

