UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
***CAMPUS* MARECHAL CÂNDIDO RONDON**
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MESTRADO EM ZOOTECNIA

TALITA VITÓRIA GIRON

MICROBIOLOGIA E HISTOPATOLOGIA DE PODODERMATITE EM FRANGOS DE CORTE APÓS ESCARIFICAÇÃO EPIDÉRMICA

Marechal Cândido Rondon
2014

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
***CAMPUS* MARECHAL CÂNDIDO RONDON**
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MESTRADO EM ZOOTECNIA

TALITA VITÓRIA GIRON

MICROBIOLOGIA E HISTOPATOLOGIA DE PODODERMATITE EM FRANGOS DE CORTE APÓS ESCARIFICAÇÃO EPIDÉRMICA

Dissertação apresentada à Universidade Estadual do Oeste do Paraná como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação *strictu sensu* em Zootecnia, Área de Concentração "Produção e Nutrição Animal" para obtenção do título de "Mestre em Zootecnia".

Orientador: Ricardo Vianna Nunes, DSc.
Coorientadora: Magali Soares dos Santos Pozza, DSc.

Marechal Cândido Rondon
2014

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
***CAMPUS* MARECHAL CÂNDIDO RONDON**
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MESTRADO EM ZOOTECNIA

TALITA VITÓRIA GIRON

MICROBIOLOGIA E HISTOPATOLOGIA DE PODODERMATITE EM FRANGOS DE CORTE APÓS ESCARIFICAÇÃO EPIDÉRMICA

Dissertação apresentada à Universidade Estadual do Oeste do Paraná como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, área de concentração em Nutrição e Produção Animal, para obtenção do título de "Mestre".

Marechal Cândido Rondon, _____/_____/_____.

BANCA EXAMINADORA

Ricardo Vianna Nunes, DSc. - Orientador

Aline De Marco Viott, DSc. – Membro externo

Paulo Levi de Oliveira Carvalho, DSc. – Membro.

DEDICATÓRIA

À minha família, especialmente ao meu namorado, que são essenciais na minha vida e que me dão forças para seguir em frente, e que amo acima de tudo!

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Luiz Roberto (*In memoriam*) e Gilvanda, e aos meus irmãos, Jonathan e Luiza, pelo carinho, amor e incentivo que sempre me proporcionaram.

Ao meu namorado, Irineo, pelo companheirismo, amor, carinho, apoio e incentivo, não deixando fraquejar nos momentos mais difíceis.

Ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, pela oportunidade de realização do mestrado.

À Cooperativa Agroindustrial Copagril, pelo financiamento do projeto, fomentando a pesquisa animal.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), fundação do Ministério da Educação (MEC), pela concessão da bolsa de mestrado.

Ao meu professor e orientador, Prof. Dr. Ricardo Vianna Nunes, pelos conhecimentos técnicos e científicos passados, pela amizade e confiança em mim depositada, por cada oportunidade, pela paciência e apoio durante o curso, que sempre serão lembrados com carinho e admiração.

Às professoras Dr^{a}. Aline De Marco Viott e Dr^{a}. Magali Soares dos Santos Pozza, pelo auxílio, colaboração, sugestões e conhecimento transmitido durante todo o mestrado.

Aos professores Dr. Edmar Soares de Vasconcelos e Dr. Carlos Antônio Lopes de Oliveira, pela assistência nas análises estatísticas.

Aos integrantes do Grupo de Estudos de Aves – GEMADA, especialmente à Carina Scherer e Douglas Fernando Bayerle, pela colaboração durante todo o mestrado, que tornou este momento possível.

Aos residentes do laboratório de patologia da Universidade Federal do Paraná – *Campus* Palotina, Alcides Branco da Silva Júnior e Tatiane Caleffo, e ao funcionário da instituição, Fernando França Giraldes, pela simpatia incomparável e auxílio nas análises realizadas neste trabalho.

À minha colega de mestrado e amiga, Kelly Libardi, que esteve comigo durante essa fase da vida, pelos momentos inesquecíveis, por toda ajuda durante o experimento e pelo apoio prestado nesses anos de convivência.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para realização deste trabalho, muito obrigada.

RESUMO

GIRON, TALITA VITÓRIA. Mestrado em Zootecnia. Universidade Estadual do Oeste do Paraná, setembro de 2014. **Microbiologia e histopatologia de pododermatite em frangos de corte após escarificação epidérmica.** Orientador: Dr. Ricardo Vianna Nunes.

O objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito da utilização da máquina removedora de calos microbiologicamente e histopatologicamente em diferentes graus de pododermatite de frangos de corte. No presente estudo, foram coletados pés com e sem lesão em um frigorífico comercial após os procedimentos de escaldagem e remoção de cutícula, e separados por graus de lesão de pododermatite. Os graus foram definidos de acordo com a proporção de comprometimento existente na superfície plantar visível macroscopicamente: 0 - sem lesão, 1 - lesão menor que 25%, 2 – lesão entre 25 e 50% e 3 – mais de 50%. Após seleção de 60 pés de cada tipo, 30 amostras passaram pelo processo de remoção de calos através da utilização da máquina removedora de calos. Todas as amostras coletadas foram avaliadas histopatologicamente e microbiologicamente totalizando 240 unidades experimentais. Na avaliação microbiológica, foram coletados swabs dos coxins plantares das amostras e a partir destes foram realizadas sete diluições sucessivas que foram semeadas em Placas para contagem de aeróbios mesófilos e coliformes totais com diferenciação para *Escherichia coli* e incubadas em estufa B.O.D. à 35ºC por 48 horas. Para a análise histopatológica, as amostras coletadas foram fixadas em formol 10% tamponado durante aproximadamente 24 horas e submetidas a três secções de cada coxim plantar. Os fragmentos resultantes foram processados para derivar as lâminas avaliadas de acordo com a presença e quantificação do infiltrado inflamatório. Os dados foram submetidos ao teste F de análise de variância e submetidas ao teste de médias Tukey (P=0,05). As amostras que passaram pelo procedimento de lixa apresentaram melhores resultados quando comparadas com as amostras que não passaram pelo procedimento e até mesmo superiores às amostras que não apresentavam indícios de pododermatite macroscopicamente, demonstrando a eficácia do equipamento para remoção de lesões. Não foi detectada nos produtos analisados e nas condições estudadas a presença de contaminação microbiológica superior aos níveis aceitáveis de acordo com os padrões estabelecidos pela legislação sanitária brasileira, indicando boas condições de higiene e segurança dos produtos.

Palavras-chave: aeróbios mesófilos, *Escherichia coli*, frango de corte, pododermatite.

ABSTRACT

GIRON, TALITA VITÓRIA. Master Course in Animal Science. Paraná West State University, 2014, September. **Microbiological and histopathological analysis of foot pad dermatitis in broilers after epidermal scarification.** Adviser: Dr. Ricardo Vianna Nunes.

The objective of this study was to evaluate microbiological and histopathological effects of using foot ulcers remover machine in varying degrees of foot pad dermatitis in broilers. The injured and uninjured legs were collected in a poultry slaughterhouse and separated by degrees of foot ulcers. Grades were defined according to the compromised ratio existing in the plantar surface macroscopically visible: 0 - no lesion, 1 - less than 25% damage, 2 - injury between 25 and 50% and 3 - more than 50%. Following selection of 60 feet each type, 30 samples went through the process of the foot ulcer removal using the machine. All samples were evaluated histopathologically and microbiologically totaling 240 experimental units. Inside the microbiological evaluation, swabs from the footpads of the samples were collected and from these seven successive dilutions were performed, sown on plates for counting of mesophilic aerobic and total coliforms with differentiation for *Escherichia coli* and incubated in chamber (B.O.D. type) emissions at 35 °C for 48 hours to count. For histopathological analysis, the samples were fixed in 10% buffered formalin for approximately 24 hours and submitted to three sections of each footpad: top (next to the digits), central and bottom. The resulting fragments were processed to derive the blades evaluated in accordance with the presence and quantification of inflammatory infiltrate. Data were analyzed using the F test and submitted to Tukey test to compare averages. The samples which underwent the removal procedure showed better results when compared with samples that have not undergone the procedure and even better than samples with no macroscopically evidence of foot pad dermatitis, demonstrating the effectiveness of the equipment in the lesions removal. Microbiological analyzes showed no correlation with pododermatite scores evaluated.Presence of microbiological contamination exceeding the acceptable levels in accordance with the standards established by Brazilian law were not detected in the analyzed products under the conditions studied, indicating good hygiene and product safety

Keywords: mesophilic aerobic, *Escherichia coli*, broiler, foot ulcers.

SUMÁRIO

CAPÍTULO I 9
1. INTRODUÇÃO 10
2. OBJETIVO GERAL 13
3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS 13
4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 14
4.1. Produto: pé de frango de corte 14
4.2. Utilidade do produto na indústria 14
4.3. Pele 15
4.4. Pododermatite 16
4.5. Anatomopatologia 18
4.6. Microbiologia 19
5. MATERIAL E MÉTODOS 21
5.1. Local e período 21
5.2. Máquina removedora de calos de patas 21
5.3. Amostragem 24
5.4. Análise microbiológica 26
5.5. Análise histopatológica 28
5.6. Análise estatística 30
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO 31
7. CONCLUSÃO 38
8. REFERÊNCIAS 39

CAPÍTULO I

MICROBIOLOGIA E HISTOPATOLOGIA DE PODODERMATITE EM FRANGOS DE CORTE APÓS ESCARIFICAÇÃO EPIDÉRMICA

1. INTRODUÇÃO

Os problemas locomotores têm grande importância e impacto na produção avícola mundial. A presença de aves com claudicação pode ser responsável por grandes perdas financeiras. Pesquisas apontam que cerca de 10 a 40% do lucro bruto por lote é perdido devido a problemas locomotores nas aves que tem sua carcaça condenada parcial ou totalmente, assim que chegam aos abatedouros (COOK, 2000).

O frango de corte é um animal doméstico geneticamente melhorado, objetivando em rápido crescimento e deposição de tecido muscular, o que torna ainda mais frágeis seus membros de sustentação.

Uma das principais enfermidades que acometem os membros de sustentação das aves é a pododermatite, também conhecida como "calo de pé", definida como uma lesão acastanhada, semelhante a uma queimadura, que se localiza na superfície plantar dos pés, podendo afetar também os coxins digitais. Possui amplitude e profundidade variadas e se enquadra como um tipo de dermatite de contato, sendo comum em frangos de corte criados sobre camas úmidas e compactadas, com incidência altamente variável (SANTOS et al., 2002).

Dependendo da gravidade das lesões, causa claudicação e dificuldade de locomoção, restringindo o acesso das aves à ração e água. Além disso, a presença de lesões é um dos indicativos de bem estar das aves (JÚNIOR, 2009).

Alguns fatores relacionados ao manejo e à nutrição são descritos na literatura como predisponentes da pododermatite, como alta umidade de cama, alta densidade dos plantéis, tipo de criação e deficiência de biotina e zinco (JÚNIOR, 2009; VIEIRA, 2009).

O contato prolongado com compostos amoniacais, provenientes da degradação do ácido úrico excretado pelas aves, tem sido relacionado com essa enfermidade. Essas substâncias irritantes são formadas a partir do processo de deterioração da cama. As condições inadequadas da cama de aves, especialmente o excesso de umidade, tem papel decisivo no aumento da atividade microbiológica (MEDEIROS, 2008).

O controle rigoroso da amônia no ar dos galpões é necessário, principalmente em densidades de alojamento elevadas e no período final de criação, tendo em vista a maior formação deste gás nestas situações. Assim, a reutilização de cama pode potencializar ainda mais os efeitos indesejáveis da amônia (GONZÁLES et al., 2001).

Segundo Sorensen et al.(2000), aves criadas em menores densidades (16 aves/m²) apresentaram menores escores para as lesões de pododermatite do que aquelas alojadas em densidades mais altas (22 aves/m²).

Conforme a Portaria N º 210 (BRASIL, 1998) que aprova o Regulamento Técnico da Inspeção Tecnológica e Higiênico-Sanitária de Carne de Aves do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), as pododermatites são consideradas lesões condenatórias pela Inspeção Sanitária e devem ser enquadradas dentro dos critérios e destinos de aves com dermatites, ou seja, processos inflamatórios (Artrite, Celulite, Dermatite, Salpingite e Colibacilose). "Qualquer órgão ou parte da carcaça que estiver afetado por um processo inflamatório deverá ser condenado e, se existir evidência de caráter sistêmico do problema, a carcaça e as vísceras na sua totalidade deverão ser condenadas."

Os pés comercializados dentro de carcaças destinadas ao mercado interno não devem apresentar pododermatite ou ao menos devem passar por toalete, pois os pés com lesões não são aceitos para comercialização.

Como a produção de pés é voltada principalmente para o mercado externo, e no Brasil ainda não há uma legislação específica que determine o padrão de qualidade dos pés, as indústrias estão verificando e classificando esse produto de acordo com as exigências do mercado consumidor.

Para esses mercados, a seleção dos pés se enquadra em três especificações: aqueles que não apresentam nenhuma lesão macroscópica (tipo A); os que apresentam lesões moderadas a leves (tipo B); e os com lesões severas que são destinados à graxaria (tipo C).

A pododermatite é o principal fator limitante da qualidade dos pés de frango para a exportação. Dependendo do grau da lesão tem-se a depreciação do produto através do corte para retirada da lesão, ou mesmo o descarte dos pés que ocorre nos casos mais severos .

A partir de 2005, o padrão das patas de frango entre Hong-Kong e a China Continental foi unificado, declarando os pés de frango como "produto comestível". Com a nova legislação sanitária, passou a ser necessária a inspeção *ante-mortem* e *post-mortem* das aves. Pelo aumento no rigor do padrão sanitário de Hong Kong, muitas indústrias tiveram seu volume de exportação reduzido (BEAN et al., 2007).

O MAPA permite a exportação de patas tipo B para Hong Kong após a retirada da lesão de pododermatite com lâmina, porém não permite o uso de raladores (BRASIL,2010).

Economicamente, este comércio é muito importante para as indústrias brasileiras. Os cortes de frangos de corte corresponderam a 53,14% das exportações brasileiras por produto, em 2013. As exportações brasileiras de cortes de frango para a Ásia (que incluem os pés),

neste mesmo ano ultrapassaram a marca de um milhão de toneladas, repetindo o ocorrido em 2012 (UBABEF, 2014).

Dentre os países asiáticos, destaca-se a China que é o sexto maior país importador de carne de frango brasileira. Em 2013, foi responsável por 5% de todos os embarques, totalizando 190,3 mil toneladas e faturamento de US$ 440,7 milhões. Apenas Hong Kong importou cerca de 305 mil toneladas de cortes de frango em 2012 e mais de 333 mil toneladas em 2013. O Japão importou aproximadamente 375 mil toneladas em 2012 e mais de 382 mil toneladas em 2013 (UBABEF, 2014).

O Brasil conta com 29 abatedouros habilitados pelo governo chinês para atender o seu crescente mercado de carne de aves, em especial de pés e patas de frango (UBABEF, 2014).

Com o alto valor de mercado deste produto e as novas normas sanitárias, há uma grande preocupação em relação às doenças que possam condenar ou depreciar este corte. Neste contexto, torna-se necessária a busca de novas alternativas que propiciem o máximo e seguro aproveitamento desse corte.

Portanto, o estudo desta lesão e da resposta obtida através do uso de novas tecnologias fornece dados valiosos que podem ser utilizados para elevar o aproveitamento deste corte.

2. OBJETIVO GERAL

- Avaliar histológica e microbiologicamente diferentes escores de pododermatite em frangos de corte, com e sem o uso de máquina removedora de calos.

3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito da utilização da máquina removedora de calos sob parâmetros histopatológicos nos pés afetados em diferentes graus pela lesão inflamatória (pododermatite).
- Avaliar o efeito da utilização da máquina removedora de calos sob parâmetros microbiológicos nos pés afetados em diferentes graus pela lesão inflamatória (pododermatite).

4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1. Produto: pé de frango de corte

A indústria avícola brasileira vem mantendo índices elevados de produção, exportação e consumo interno, sendo o Brasil, hoje, o maior exportador e terceiro produtor mundial de carne de frango (UBABEF, 2014). Para assegurar estes mercados, a indústria deve ser cada vez mais competitiva e diversificada em seus produtos, procurando atender os mercados consumidores com qualidade e preço.

O pé de frango de corte possui baixo valor comercial em nosso país, sendo considerado principalmente como subproduto e destinado à fabricação de rações animais. Desta forma, a produção de pés é voltada principalmente para o mercado externo.

Na Resolução n°1, de 09 de janeiro de 2003, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, que aprova a uniformização da nomenclatura de produtos cárneos não formulados, há descrição de vários produtos obtidos de aves e seus cortes, incluindo os pés como um tipo de corte (BRASIL, 2003a).

A Comissão Econômica das Nações Unidas para a Europa desenvolveu um documento em colaboração com vários países, incluindo o Brasil, que serve como parâmetro para tipos de apresentação comercial de carcaças e cortes de frango. De acordo com este documento, no processamento os pés são removidos da carcaça com o corte da perna na articulação entre o metatarso e a tíbia; as unhas e a cutícula que cobre os pés são removidas. Os pés processados consistem no metatarso e nos quatro dedos (falanges) com a carne e pele associados. Para produzir a pata, a diferença consiste no local do corte no momento da separação da carcaça, que é próximo do metatarso, mais especificamente na altura do esporão, resultando em um produto com menores extensões (UNECE, 2006).

4.2. Utilidade do produto na indústria

Em função do grande volume de produção e da expansão da venda de carne de frango em cortes, sobram como subprodutos grandes quantidades de partes menos nobres como dorsos, peles, pés, pescoços, ossos da coxa, caixa torácica e produtos lesionados, cujos valores alimentar e comercial nacionalmente são menores. Estes resíduos são geralmente

transformados em produtos de baixo valor comercial como farinha para fabricação de rações, produtos empanados, molhos, pastas, patês, etc. (MARTINS et al., 2009).

Os pés de frango são exportados como cortes para vários países, sendo os mercados orientais os que se destacam atualmente em relação à comercialização destes produtos. Estes cortes possuem grande importância comercial e são consideradas verdadeiras iguarias da culinária asiática (RODRIGUES, 2008).

Na constituição dos pés do frango é encontrada elevada quantidade de proteínas e lipídeos, sendo altos também os teores de colágeno dentre as proteínas (WALRAND et al., 2008).

Dentre as proteínas que podem ser obtidas através desse produto destaca-se a gelatina, que é produzida em larga escala a preços relativamente baixos, justificando assim o grande interesse e exploração de suas propriedades funcionais (DAVANÇO, 2007).

O emprego das gelatinas tem se difundido ao longo dos anos nas indústrias farmacêuticas, de alimentos, de cosméticos e fotográficas. É utilizada para aumentar a elasticidade, consistência e estabilidade de produtos alimentícios (MONTERO e GÓMEZ-GUILLÉN, 2000).

Dentre as propriedades terapêuticas estudadas para o colágeno hidrolisado extraído de pés de frango, destaca-se a rápida e fácil absorção diretamente para a corrente sanguínea (WALRAND et al., 2008) e aumento da matriz orgânica dos ossos, sugerindo possíveis efeitos benéficos sobre a osteoporose (WATANABE-KAMIYAMA et al., 2010).

4.3. Pele

A pele é o maior órgão do corpo e desempenha funções de proteção física aos órgãos internos, isolamento térmico e barreira entre o corpo e o ambiente externo e também como órgão sensorial através de suas terminações nervosas (JÚNIOR et al., 2009).

Histologicamente, a pele das aves é similar a dos mamíferos e constituída por uma camada mais externa, a epiderme, que é formada por epitélio pavimentoso estratificado com queratina, e uma parte mais interna, composta pela derme e hipoderme, formada por tecido conjuntivo (JÚNIOR et al., 2009).

A epiderme é continuamente renovada, as células mais superficiais sem vitalidade são eliminadas e esta perda é compensada pela divisão celular na camada mais profunda. À

medida que as células epidérmicas se acumulam na superfície, sofrem uma série de modificações internas que gradualmente causam sua morte (DYCE, 2004).

A epiderme é subdividida em camadas ou estratos: basal ou germinativo, onde ocorre a multiplicação celular e se encontram os melanócitos; espinhosa ou granulosa, onde ocorre a produção de queratina; lúcida, presente na pele das extremidades do corpo; e córnea, localizada mais externamente e composta por várias camadas de células anucleares ricas em queratina, dando à pele das aves o característico aspecto seco e escamoso. A epiderme é avascular e recebe nutrientes da derme, através de difusão pelos vasos sanguíneos (JÚNIOR et al., 2009).

Logo abaixo do estrato germinativo encontra-se a derme, cuja espessura varia de acordo com a região do corpo. É constituída principalmente por tecido conjuntivo fibroso, vasos sanguíneos e linfáticos, tecido adiposo, nervos, músculo liso e terminações nervosas (ZACHARY et al., 2013).

A hipoderme é a camada mais profunda da pele, apesar de ter limites muito pouco definidos com a derme e de ser composta por elementos comuns. A espessura da hipoderme varia de indivíduo para indivíduo e também conforme as várias regiões do corpo. Os principais componentes da hipoderme são os adipócitos, células especializadas na síntese e reserva de gorduras (ZACHARY et al., 2013).

4.4. Pododermatite

A pododermatite é uma dermatite de contato corriqueira em frangos de corte. As lesões ocorrem nas áreas de contato da pele com a cama. A patogenia da enfermidade não está bem esclarecida, porém há forte associação com a umidade da cama (JÚNIOR et al., 2009).

A incidência da pododermatite pode variar de 0 a 100% nos plantéis de frango produtores de carne (EKSTRAND, 1998). De acordo com Nagaraj et al. (2007), a incidência de pododermatite é maior em machos (61%) do que em fêmeas (55%).

Segundo Vieira (2009), a pododermatite tem sido relacionada a vários fatores, entre eles: deficiência de vitaminas e minerais, como a biotina e o zinco; uso excessivo de farelo de soja, que por ter baixa digestibilidade e conter altos teores de potássio afeta a consistência das excretas; combinação de umidade e fatores cáusticos, como o ácido úrico presente na cama; degradação das excretas aderidas à pele; alta densidade de alojamento; alto consumo de água, que afeta a viscosidade das fezes, aumentando sua capacidade de aderência à pele das patas;

baixa ventilação, que acresce a umidade ambiental; e tamanho e textura das partículas do material utilizado na cama, que pode causar lesões físicas à pele das patas.

Mayne (2005) ainda relata outros fatores como estrutura da pele; peso e sexo das aves; temperatura do ar; estação do ano.

De acordo com Borges (2006), o reaproveitamento da cama por até quatro vezes consecutivas é realizado por grande parte dos produtores de frangos de corte. Isso favorece a formação de umidade e a compactação da cama, contribuindo para maior ocorrência de lesões, mesmo que utilizem baixa densidade de criação em seus galpões.

Outro fato de grande destaque quanto à ocorrência de pododermatite está na presença de lesões na carcaça, que é indicadora de bem-estar das aves e está particularmente relacionada às condições de alojamento e manejo. (MUNIZ, 2006).

Evidências experimentais sugerem que a deficiência de biotina- também conhecida como vitamina H, vitamina B7 ou vitamina B8- causa pododermatite, e que as rações comerciais não contém quantidade suficiente para prevenir essas lesões. (MAYNE, 2005).

Além disso, as vitaminas do complexo B são necessárias como coenzimas em diversas funções celulares envolvidas no metabolismo energético e na síntese tecidual. A biotina, em especial, é necessária nas reações de carboxilação, participando da síntese de ácidos graxos, aminoácidos e purinas pelo tecido epitelial (BALNAVE, 1977).

Na mesma linha de estudo, Shepherd & Faichild (2010) comprovaram que alguns nutrientes como a biotina, riboflavina, ácido pantatênico e aminoácidos sulfurados têm efeito sobre os componentes estruturais da pele. As deficiências de vitaminas e aminoácidos como a biotina, riboflavina, metionina e cistina nas dietas têm sido correlacionadas com a pododermatite.

Hess et al. (2001) suplementaram dietas de frango com complexo zinco aminoácido e não observaram diferenças nos graus de pododermatite em machos, porém detectaram uma diminuição das lesões em fêmeas.

As lesões são prejudiciais do ponto de vista clínico por serem dolorosas e por comprometerem a movimentação das aves, e do ponto de vista econômico porque as aves acometidas diminuem ou param de se alimentar e ingerir água, resultando em piores índices de conversão alimentar e diminuição do crescimento (BESTMAN et al., 2011).

As lesões de coxim plantar geralmente ocorrem nos primeiros 14 dias de vida, quando a pele ainda é fina, porém com o tempo as calosidades se tornam mais visíveis. O acido úrico e a amônia, presentes em aviários úmidos, afetam a pele causando rachaduras e inflamação. Se os pés permanecerem secos e limpos nas primeiras semanas, as aves se tornam menos

propensas a inflamações nas outras fases de criação, mesmo em condições desfavoráveis de cama (BESTMAN et al., 2011).

4.5. Anatomopatologia

A presença de um processo inflamatório intenso e crônico nos pés das aves é um fator prejudicial para a comercialização do produto, pois macroscopicamente torna-o desinteressante aos clientes. No âmbito de segurança alimentar, o excesso de células inflamatórias torna o produto impróprio para consumo (ZACHARY et al., 2013).

A inflamação na sua forma aguda inicia com hiperemia, edema e migração de leucócitos como resultado da liberação de mediadores, resultando em uma de quatro consequências: primeira, pode haver resolução completa, que ocorre quando o estímulo inicial tem curta duração e há pouca agressão tecidual, que é totalmente reparada; segunda, pode-se formar um abcesso, que ocorre em infecções bacterianas piogênicas; terceira, ocorre cicatrização pela substituição da área danificada por tecido conjuntivo fibroso, que ocorre quando há destruição significativa do tecido sem possibilidade de regeneração; quarta, ocorre evolução da dermatite aguda para a dermatite crônica (ZACHARY et al., 2013).

Macroscopicamente, em um estágio inicial de lesão de pododermatite, observam-se mudanças na coloração da pele evoluindo para presença de hiperqueratose e necrose da epiderme, que podem ser vistas histologicamente (GREENE et al., 1985).

Na dermatite crônica, a inflamação perdura por semanas a meses e geralmente é causada por infecções persistentes. As características histológicas da dermatite crônica incluem o acúmulo de células inflamatórias, destruição tecidual, e resposta reparadora do organismo com fibrose e angiogênese. Geralmente, nos casos de pododermatite as respostas inflamatórias frequentemente têm características histológicas sobrepostas, ou seja, características de dermatite aguda e crônica (ZACHARY et al., 2013).

Em casos severos, as lesões evoluem para ulceração com reação inflamatória do tecido subcutâneo. As feridas frequentemente são cobertas por crostas formadas por exsudato, cama e material fecal (MARTLAND, 1984; GREENE et al., 1985).

Microscopicamente, é possível visualizar restos celulares na camada de queratina e infiltração difusa e focal de heterófilos na derme. Com o progresso das lesões notam-se, na epiderme, vacúolos preenchidos por heterófilos; as células epidérmicas degeneram e ocorre a formação de úlceras repletas de restos inflamatórios, podendo ou não apresentar hiperplasia da epiderme, sendo que o principal tipo de fagócitos polimorfonucleares em galinhas são os

heterófilos, que são os equivalentes dos neutrófilos de mamíferos. Os heterófilos exercem um papel significativo na fagocitose e morte de microrganismos patogênicos (JÚNIOR et al., 2009).

4.6. Microbiologia

Muitos fatores podem influenciar a qualidade microbiológica dos alimentos desde sua produção até o consumo. Para diminuir os riscos de contaminação, é imprescindível o controle sobre todas as etapas pelas quais os alimentos passam, e para maior garantia desta qualidade foi elaborada uma série de leis e padrões internacionais.

Foi regulamentado no Brasil um limite máximo de tolerância de coliformes termotolerantes em carnes de aves, sendo estes organismos indicadores de qualidade e higiene durante a produção. Esta regulamentação tem o objetivo de redução na prevalência de carcaças contaminadas, através do monitoramento ativo pelo Serviço de Inspeção Federal (SIF) (BRASIL, 2001).

Na maioria das pesquisas sobre a pododermatite, foi considerado que os agentes infecciosos não são a causa primária da injúria. Após a instalação da lesão, é possível constatar, em alguns casos, a presença de infecções secundárias causadas por uma variedade de bactérias e fungos. Nestas pesquisas, permaneceu a impossibilidade da identificação da etiologia relacionada às infecções secundárias (GREENE et al., 1985; SANTOS et al., 2002).

Não há legislação específica que regulamente as análises microbiológicas para pés de frango no Brasil. Sendo assim, são utilizados os padrões recomendados para a carne de frango *in natura* (SANTOS et al., 2011).

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), por meio da RDC nº. 12/2001, aprovou o Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos, em que estabelece que para a comercialização deve ser obedecido o limite para Coliformes termotolerantes a 45°C, considerando o produto inaceitável ao consumo quando o resultado ultrapassar 10^4 UFC.g^{-1} (BRASIL, 2001).

Na RDC n.º 39/2002, foi aprovado o Regulamento Técnico para Instruções de Uso, Preparo e Conservação na Rotulagem de Carnes de Aves e seus Miúdos Crus, Resfriados ou Congelados, com instruções mínimas obrigatórias para que auxiliem o consumidor no controle do risco associado ao consumo destes alimentos (BRASIL, 2002).

A produção de carcaças e cortes de frango destinados à China, principal importador mundial, deve apresentar conformidade com a legislação sanitária do país em questão para produtos avícolas *in natura* congelados, que estabelece a enumeração de bactérias aeróbias mesófilas ($\leq 5{,}0x10^{5} UFC.g^{-1}$) e coliformes totais ($\leq 5{,}0x10^{3} UFC.g^{-1}$) (USDA/FAS, 2006).

Baixas contagens destes microrganismos em produtos tratados termicamente demonstram que o processamento foi eficaz na inativação de bactérias presentes no alimento (KORNACKI et al., 2001).

Os microrganismos aeróbios mesófilos são aqueles que têm a temperatura ótima de multiplicação entre 25°C e 40°C, mínima entre 5°C e 25°C, e máxima entre 40°C e 50°C. Estes microrganismos correspondem à maioria daqueles de importância em alimentos, inclusive a maior parte dos patógenos de interesse.

Estudos consideram fora das condições higiênico-sanitárias ideais os frangos que ultrapassam a contagem de mesófilos 10^{6} $UFC.g^{-1}$ (RITTER et al., 2003).

A contagem de aeróbios mesófilos em um produto alimentício reflete a qualidade da matéria-prima, bem como as condições de processamento, manuseio e estocagem, permitindo estimar o tempo de prateleira do alimento em questão.

Outro grupo de microrganismos de interesse são os coliformes, bastonetes gram-negativos, não esporulados, que fermentam a lactose, sendo representados principalmente pela *E. coli,* que por sua vez é de origem exclusivamente fecal, estando presente em densidades elevadas nas fezes de humanos, mamíferos e pássaros (JAY, 2005).

As bactérias denominadas *E.coli* crescem em temperaturas que podem variar de 18 a 44°C, sendo ideal a temperatura de 37°C (JÚNIOR et al., 2009).

Segundo Tallon et al. (2005), o grupo coliforme tem sido utilizado há vários anos na avaliação da qualidade microbiológica de amostras ambientais e atende vários dos requisitos de um bom indicador de contaminação fecal.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Local e Período

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Microbiologia e Bioquímica da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE), *Campus* Marechal Cândido Rondon, e no Laboratório de Patologia Veterinária da Universidade Federal do Paraná (UFPR), *Campus* Palotina – PR.

As coletas das amostras avaliadas foram realizadas na Unidade industrial de aves da Cooperativa Agroindustrial Copagril, sob Serviço de Inspeção Federal 797, localizada na cidade de Marechal Cândido Rondon -PR.

O projeto foi conduzido de outubro/2013 a março/2014, com o objetivo de avaliar as amostras de pés de frangos com diferentes graus de lesões de pododermatite, sob aspectos histopatológicos e microbiológicos.

5.2. Máquina removedora de calos de patas

A máquina removedora de calos utilizada neste trabalho foi desenvolvida pela cooperativa agroindustrial Copagril, através de sua equipe de manutenção. Trata-se de uma tecnologia que considera todos os aspectos sanitários necessários para o processo e o produto, visando diminuir as perdas dos pés e possibilita a produção de um produto que atenda os aspectos de segurança alimentar, de acordo com os requisitos do mercado e características solicitadas pelos clientes.

O equipamento fabricado pela cooperativa (Figuras: 1A, 1B e 1C) possui quatro postos operacionais e tem capacidade suficiente para atender uma linha de produção com velocidade de abate de 10.000 aves/ hora. A máquina removedora de calos é confeccionada em aço inoxidável, com dimensões de 2100 mm de comprimento x 810 mm de altura x 580 mm de profundidade, motor de indução trifásico da marca WEG de 820 rpm (rotações por minuto) e higienização direcionada e contínua, com pressão suficiente para manter limpo o disco de remoção de calos.

Figura 1. Máquina removedora de calos de pés de frango. A) Visão lateral da máquina removedora de calos fixada próxima à esteira de pés do abatedouro B) Visão frontal da máquina removedora de calos. C) Disco de aço inoxidável utilizado para remoção de calos de pés, com a tampa abaixada.

Fonte: Arquivo pessoal

Os pés com lesões de pododermatite são direcionados para os orifícios circulares do equipamento (Figuras: 2A, 2B, 2C e 2D) onde sob a superfície metálica consta um cilindro estriado para a retirada das lesões.

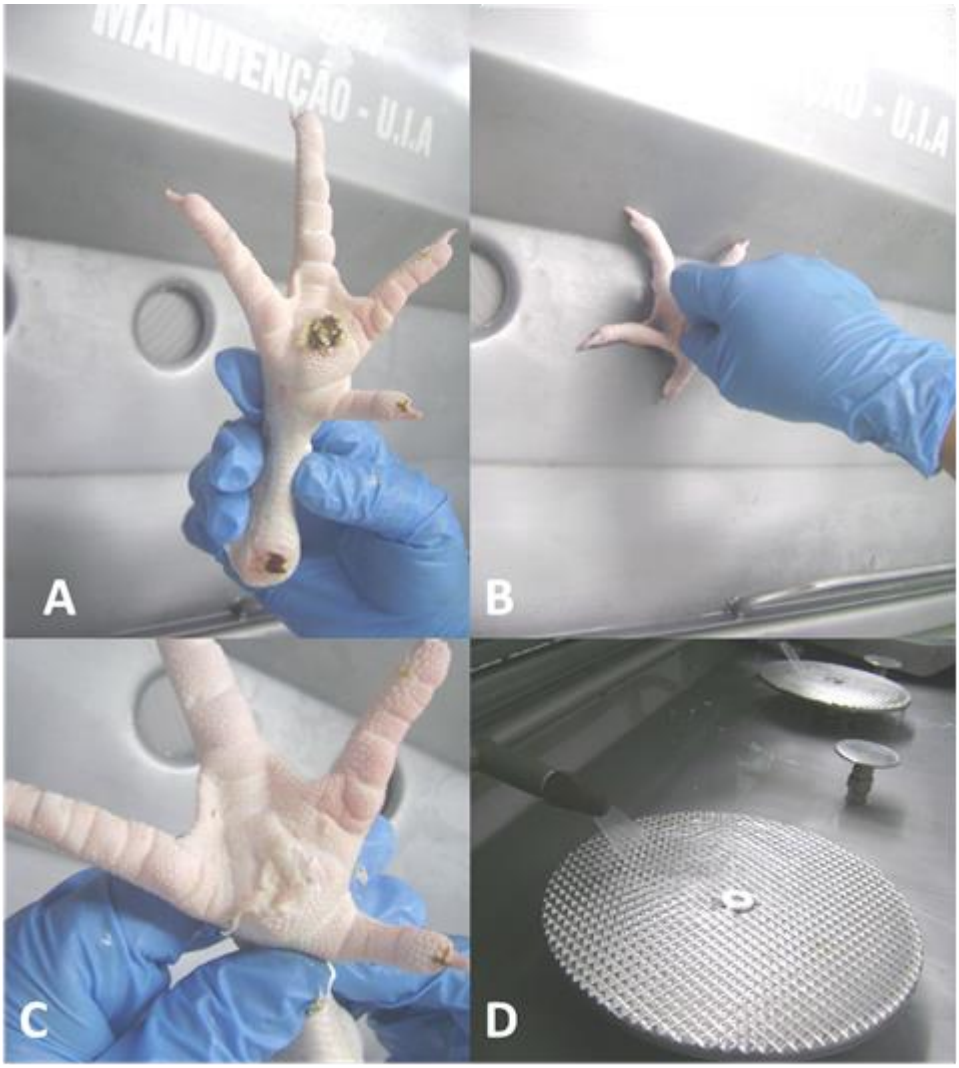

Figura 2. Demonstração do funcionamento da máquina removedora de calos de patas. A) Pé com lesão de pododermatite é selecionado B) O pé com lesão é direcionado para o orifício circular do equipamento. C) pé após o procedimento de remoção de calos. D) Disco de aço inoxidável utilizado para remoção de calos de patas com a tampa levantada. Observa-se jato de água sob pressão direcionada aos discos com função de higienização constante.

Fonte: Arquivo pessoal

O referido cilindro apresenta-se em plano horizontal com rotação sobre o eixo central, ficando cada disco exposto em sua superfície superior a dois orifícios da superfície metálica.

Acompanhando o curso do disco (considerando o sentido de giro anti-horário), observa-se que após o contato dos pés lesionados com as estrias do disco no orifício, o tecido da lesão é removido e a própria superfície do disco que foi contaminada passará continuamente por jato de água sob pressão. Este exerce uma função mecânica de remoção

dos resíduos das lesões retiradas, com fim higiênico-sanitário.

5.3. Amostragem

Foram utilizados pés de aves provenientes da Unidade industrial de aves da Cooperativa Agroindustrial Copagril, com idade média de abate de 42 dias, linhagem Cobb, lotes mistos. Após a remoção da cutícula, os pés de frango de corte foram classificados em 4 tipos, sendo tipo 1 - grau 0 (sem lesão), tipo 2 – grau 1 (lesão leve), tipo 3 – grau 2 (lesão moderada) e tipo 4 – grau 3 (lesão grave). Este critério de avaliação de graus de lesão de pododermatite visível macroscopicamente está de acordo com a metodologia proposta por Martrenchar et al. (2002), que baseia-se na proporção de comprometimento existente na superfície plantar, onde zero indica coxim plantar íntegro (Figura 3A), escore 1 menos de 25% do coxim acometido (Figura 3B); escore 2, lesão cobrindo de 25 a 50% do coxim plantar (Figura 3C); e escore 3, lesão cobrindo mais de 50% da superfície (Figura 3D).

Figura 3. Graus de lesão de pododermatite em pés de frango de corte. A) Escore 0 - superfície íntegra. B) Escore 1 – hiperemia e hiperplasia tecidual, lesão comprometendo até 25 % do coxim plantar. C) Escore 2 - lesão com abrangência entre 25% e 50% da área plantar. D) Escore 3 - injúria severa comprometendo mais de 50% da superfície.

Fonte: Arquivo pessoal

Após seleção de 60 pés de cada grau selecionado, 30 amostras passaram pelo processo de remoção de calos através da utilização da máquina removedora de calos (Figura 1) para que fosse realizada a comparação com os outros 30 pés que não passaram pelo procedimento. As 60 amostras coletadas de cada escore foram avaliadas histopatológica e microbiologicamente totalizando 240 unidades experimentais.

5.4. Análise microbiológica

Os pés com e sem lesão foram coletados em um frigorífico após os procedimentos de escaldagem e remoção de cutícula, e separados por graus de lesão de pododermatite. A coleta do material para análise microbiológica foi realizada através de swabs estéreis devidamente identificados para todos os pontos de eleição. As amostras coletadas foram separadas por graus de acometimento de pododermatite e por procedimento (uso ou não da máquina removedora de calos). Os swabs foram identificados com correspondência numérica e mantidos em caixa de poliestireno devidamente preenchida com quantidade adequada de gelo reciclável até o término da coleta. Depois de armazenados, estes foram encaminhados ao Laboratório de Microbiologia e Bioquímica da Unioeste (*campus* Marechal Cândido Rondon) para posterior análise microbiológica (coliformes com diferenciação para *E. coli* e contagem total de aeróbios mesófilos) e avaliação dos resultados.

Os pontos de eleição para a coleta escolhidos foram: pés antes da remoção de calos (escores 0, 1, 2 e 3) e pés após a remoção dos calos (escores 0, 1, 2 e 3), sendo 30 amostras de cada escore, totalizando 240 swabs.

O esfregaço foi realizado com um swab estéril, em sentido zigue-zague, abrangendo toda a região do coxim plantar dos pés das aves (Figura 4).

Figura 4. Realização do swab estéril em sentido zigue-zague, abrangendo toda a região do coxim plantar dos pés das aves.

Fonte: Arquivo pessoal.

No momento da coleta, os swabs foram imersos em 10 ml de caldo de água peptonada tamponada estéril (3M™ Swab-Sampler)[1]. No Laboratório, os swabs foram transferidos para água peptonada, cada amostra em 9,0 ml. Após diluições sucessivas até 10^7, as amostras foram semeadas em Placa 3M™ Petrifilm™ para Contagem de *E. coli*/coliformes (EC)[2] e Placa 3M™ Petrifilm™ para Contagem de Aeróbios mesófilos (AC)[3], sendo inoculadas com alíquotas de 1,0 ml das diferentes diluições. Após incubação das placas em estufa tipo B.O.D (demanda bioquímica de oxigênio) à 35ºC por 48 h, as mesmas foram contadas.

As análises microbiológicas foram realizadas conforme recomendação do fabricante 3M™ e de acordo com as recomendações da Instrução Normativa nº 62 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA, 2003).

[1] 3M™ - Swab-sampler com caldo de água peptonada tamponada, código RS96010BPW, distribuidor Labtec, Londrina/PR.

[2] Placa 3M™ Petrifilm™ para Contagem de E. coli/coliformes, código 6414, distribuidor Labtec, Londrina/PR.

[3] Placa 3M™ Petrifilm™ para Contagem de Aeróbios , código 6406, distribuidor Labtec, Londrina/PR.

Nas placas EC, as colônias azuis associadas a bolhas de gás foram contadas como *Escherichia coli* e as colônias de coloração vermelha associadas a bolhas de gás foram contadas como coliformes totais. O total de coliformes totais foi calculado pela soma das colônias vermelhas e azuis associadas a bolhas de gás.

Nas placas AC, as colônias de coloração vermelha foram contadas como aeróbios mesófilos. O resultado final foi expresso em unidades formadoras de colônia por grama de amostra ($UFC.g^{-1}$).

Todas as contagens obtidas foram convertidas em médias em logaritmo decimal (Log10) e expressas em Log $UFC.g^{-1}$. Para padronização do método, todas as contagens foram realizadas pelo mesmo avaliador.

5.5. Análise histopatológica

Após a realização do swab para a análise microbiológica, as amostras foram cortadas na região tarso-metatársica para melhor acomodação nos potes plásticos de coleta, e fixados em formol 10% tamponado durante aproximadamente 24 horas, para que suas estruturas morfológicas fossem preservadas. Após o período de fixação da amostra, foram retirados 3 fragmentos de aproximadamente 10 mm^2 de cada coxim plantar. O corte dos fragmentos foi padronizado em 3 áreas (Figura 5): parte cranial (próxima aos dígitos); parte medial e parte caudal para avaliar a presença de infiltrado inflamatório na periferia da lesão. Posteriormente, os fragmentos foram levados ao laboratório de patologia da UFPR – Universidade Federal do Paraná – *Campus* Palotina, para processamento.

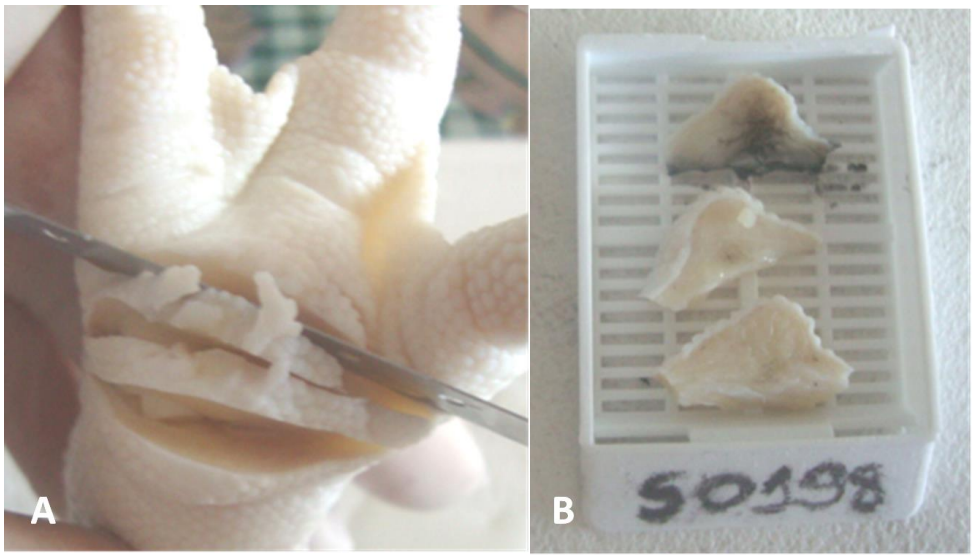

Figura 5. Clivagem tecidual para análise histológica de pés de frango de corte. A) Clivagem em três fragmentos. B) Fragmentos dispostos em um cassete para processamento histológico.

Fonte :Arquivo pessoal.

O processamento obedeceu às seguintes etapas: os fragmentos foram desidratados, diafanizados, impregnados e emblocados com parafina (parafinados) a fim de que os tecidos suportem o processo de corte. Os Blocos foram cortados em micrótomo semi-automático a 5µm de espessura e corados em HE (Hematoxilina-Eosina) de acordo com Luna (1968). As lâminas foram analisadas em microscópio LEICA (DM1000), segundo procedimentos de rotina do Laboratório de Patologia da UFPR – *campus* Palotina.

A análise das lâminas foi realizada de acordo com o grau de evolução do processo inflamatório, sua distribuição e intensidade. Foi observada também a presença ou ausência de células inflamatórias, necrose, ulceração e hiperqueratose, sendo o processo considerado discreto quando observado até 5% de comprometimento tecidual, leve de 5 a 30%, moderado de 30 a 70%, acentuado de 70 a 95% e severo com mais de 95% de comprometimento. Visto a impossibilidade de obter números exatos, por se tratar de análises qualitativas, foram consideradas grau 0 de lesão lâminas que apresentaram comprometimento discreto a leve, grau 1 comprometimento leve a moderado, grau 2 comprometimento moderado a acentuado e grau 3 comprometimento acentuado a severo. Para padronização do método, as lâminas foram analisadas pelo mesmo avaliador.

5.6. Análise Estatística

O experimento teve um delineamento experimental inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2 (lixado e não lixado) x 4 (graus de lesão 0, 1, 2 e 3), totalizando 8 tratamentos com 30 repetições cada.

Todas as contagens obtidas nas análises microbiológicas foram convertidas em médias em logaritmo decimal e expressas em Log_{10} UFC.g^{-1}.

Os resultados obtidos foram submetidos à ANOVA. Para comparação entre as médias analisadas nas avaliações microbiológicas e histopatológicas foi utilizado o teste Tukey ao nível de 5% de significância.

Verificou-se a correlação entre os resultados das amostras que passaram e que não passaram pela máquina removedora de calos e entre os graus de lesão estudados.

Todos os procedimentos estatísticos foram avaliados a 5% de probabilidade, pelo pacote estatístico GENES (CRUZ, 1997).

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com os resultados (Tabela 1) foi possível observar que os pés lixados não apresentaram diferença (P≥0,05) entre os graus avaliados, se igualando aos resultados obtidos no grau 0, ou seja, sem lesões de pododermatite visíveis macroscopicamente. Os pés que passaram pelo procedimento de lixa nos graus de lesão de pododermatite 1, 2 e 3 foram semelhantes aos pés lixados grau 0 (Figura 6A).

Tabela 1: Médias e erro padrão das avaliações histopatológicas dos diferentes graus de lesão de pododermatite em pés de frangos de corte submetidos ao procedimento de lixa e não submetidos

Procedimento	Grau 0	Grau 1	Grau 2	Grau 3	CV(%)
Lixado	$0,533\pm0,010^{Ab}$	$0,600\pm0,010^{Ab}$	$0,533\pm0,010^{Ab}$	$0,533\pm0,014^{Ab}$	
Não lixado	$1,567\pm0,011^{Ca}$	$1,867\pm0,013^{BCa}$	$2,100\pm0,010^{Ba}$	$2,667\pm0,008^{Aa}$	79,67

Médias seguidas pelas mesmas letras, maiúsculas na linha e minúsculas na coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro

Este resultado provavelmente foi alcançado devido à capacidade da máquina removedora de calos em extrair o fragmento lesionado de forma eficiente e profunda para sobrarem poucas células inflamatórias da lesão inicial do tecido, independente de sua abrangência (Figura 6B).

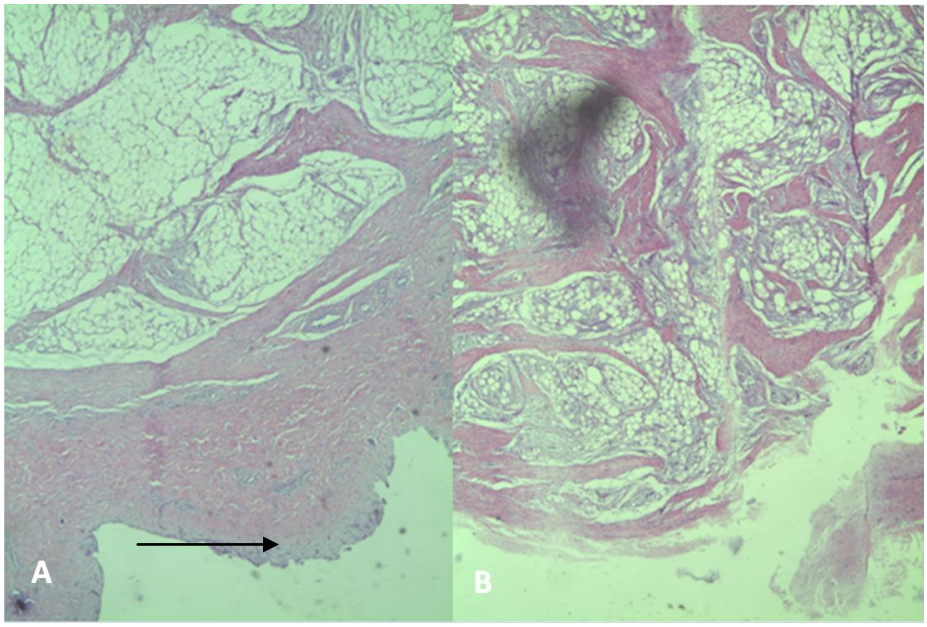

Figura 6. Frango, coxim plantar, pododermatite grau zero. H&E 4X. A) corte histológico sem a utilização da máquina removedora de calos. Presença de infiltrado inflamatório polimorfononuclear leve com distribuição multifocal localizada ao longo da junção dermo-epidérmica (seta). B) Observa-se a hipoderme com rara presença de células inflamatórias.

Fonte: Arquivo pessoal

A remoção da lesão pela máquina, logo após a escaldagem e a remoção da cutícula, se faz até a camada média da derme, onde as lesões de pododermatite encontradas nas amostras não eram pronunciadas, eliminando portanto a maioria das células inflamatórias existentes no tecido (Figura 7B).

Greene et al. (1985) observaram completa destruição da camada de queratina (epiderme) no centro da lesão, por razão do processamento de escaldagem e de remoção da cutícula, estando de acordo com os resultados encontrados neste estudo.

Martland (1985) observou extensiva ulceração da epiderme e coxins plantares de aves que foram criadas em cama úmida, sendo que as úlceras se encontravam preenchidas por uma crosta celular espessa. Histologicamente, esta área era delimitada pela inflamação e a derme apresentava infiltrações maciças de heterófilos. Não há indicação neste estudo de infiltrações maciças de heterófilos e a presença de infiltrado inflamatório se manteve em níveis moderados nos graus mais elevados avaliados, contudo a delimitação da lesão encontrada pelo autor corresponde ao observado neste trabalho.

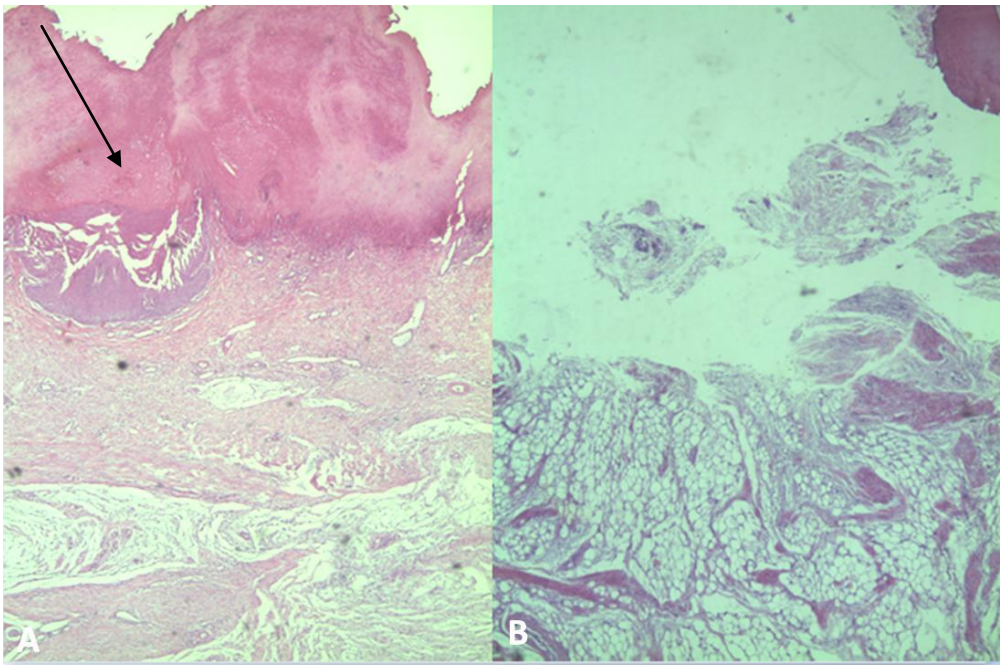

Figura 7. Frango de corte, coxim plantar, pododermatite grau três. H&E 4X. A) Tecido sem a utilização da máquina removedora de calos, presença de infiltrado inflamatório polimorfonuclear acentuado a severo com distribuição multifocal localizada ao longo da junção dermo-epidérmica. Presença de material necrótico (seta). B) Tecido com a utilização da máquina removedora de calos, observa-se a ausência das camadas de epiderme e derme com raras células inflamatórias.

Fonte: Arquivo pessoal

Houve diferença (P≤0,05) entre os resultados dos diferentes graus de pés não lixados, de acordo com a avaliação estatística da análise histopatológica. O grau 3 de lesão de pododermatite foi o mais acometido (2,667), apresentando presença de infiltrado inflamatório polimorfonuclear moderado a acentuado com distribuição multifocal localizada ao longo da derme superficial e média (Figura 7A), seguido do grau 2 (2,100) e grau 1 (1,867).

As amostras com menor acometimento histopatológico foram as que apresentaram grau 0 (1,567), verificando-se presença de infiltrado inflamatório polimorfononuclear leve com distribuição multifocal localizada ao longo da derme superficial e média.

Comparando os valores encontrados para as amostras com graus 0, 1, 2 e 3 de lesão de pododermatite lixadas e não lixadas, verificou-se que houve diferença (P≤0,05). As amostras que passaram pelo procedimento de lixa obtiveram médias inferiores aos valores encontrados para as amostras não lixadas.

Os achados microscópicos das análises histopatológicas corresponderam à classificação macroscópica dos pés de frangos utilizada, reforçando os critérios da indústria

de classificação no processamento tecnológico. A presença de infiltrado inflamatório foi característica em todas as amostras de pés de frangos classificados macroscopicamente, independente do grau, mesmo nos que não apresentavam lesões macroscópicas (grau 0), respeitando-se a intensidade de acometimento.

A presença de inflamação nas análises microscópicas e sua gravidade corresponderam aos achados macroscópicos de acordo com os graus avaliados.

Em confirmação ao estudo de Miljković et al. (2012), que observou mudanças na estrutura de queratina (hiperqueratose) e infiltração difusa da derme por células inflamatórias em função de resposta ao trauma externo, neste estudo o aspecto de delimitação linear das lesões microscópicas de pododermatite sugeriu a superficialidade da lesão nas amostras avaliadas, não observando-se hiperqueratose acentuada macroscopicamente. Porém, a presença de infiltrado inflamatório esteve presente mesmo que de forma leve em todas as amostras avaliadas.

Quanto à utilização da máquina removedora de calos, as amostras que passaram pelo procedimento de lixa apresentaram resultados melhores do que as amostras que não passaram pelo procedimento e até mesmo melhores do que a amostras que não apresentavam indícios de pododermatite macroscopicamente, demonstrando a eficácia do equipamento para remoção de lesões.

Amostras que não apresentavam lesão macroscópica, consideradas grau 0, apresentaram presença de algumas células inflamatórias. Este fato é explicado devido ao organismo animal utilizar seu sistema de defesa a todo o momento, principalmente na pele, por se tratar do primeiro órgão de defesa do organismo. Dessa forma, a ausência total de células inflamatórias na pele seria improvável, sobretudo na região dos coxins plantares, que tem função de apoio do corpo e se mantém em contato com sujidades durante toda a vida do animal (JÚNIOR et al., 2009).

Em estudo semelhante realizado por Teixeira (2008), as aves classificadas com lesão apresentaram achados microscópicos que se assemelharam aos de pés de aves onde não havia lesões ou estas eram discretas, aos 13 dias de idade. Mesmo nos casos mais graves, também foi encontrada infiltração superficial difusa de heterófilos, sendo a resposta inflamatória da lesão limitada à junção derme/epiderme. Desta forma, foi possível relacionar os escores microscópicos atribuídos aos pés de frango com os aspectos macroscópicos e vice versa. Todas as classificações macroscópicas, quando avaliadas pela microscopia, apresentaram um aspecto de delimitação linear das lesões, sugerindo que não havia profundidade na evolução da doença, nem presença de contaminação microbiológica evidente nos cortes analisados.

Os parâmetros microbiológicos para contagem de aeróbios mesófilos avaliados (Tabela 2) não apresentaram diferença (P≥0,05) entre as médias logarítmicas dos graus avaliados e entre os procedimentos, descartando-se a hipótese de correlação entre os graus de lesões de pododermatite e níveis de contaminação bacteriana da lesão após o procedimento de escaldagem e retirada da cutícula.

Tabela 2: Médias e erro padrão das análises microbiológicas em pés de frangos de corte com acometimento de diferentes graus de lesões de pododermatite submetidos e não submetidos ao procedimento de lixa.

Procedimento	Grau 0	Grau 1	Grau 2	Grau 3	CV (%)
		Aeróbios mesófilos (log_{10} UFC.g^{-1})			
Lixado	3,917 ± 0,026	4,038 ± 0,033	3,997 ± 0,032	3,675 ± 0,021	41,71
Não lixado	3,770 ± 0,026	3,876 ± 0,028	4,020 ± 0,030	3,699 ± 0,017	
		Coliformes totais (log_{10} UFC.g^{-1})			
Lixado	0,475 ± 0,014	0,314 ± 0,014	0,248 ± 0,010 ^{b}	0,377 ± 0,010	160,17
Não lixado	0,326 ± 0,009 ^{B}	0,556 ± 0,013 ^{AB}	0,817 ± 0,015 ^{Aa}	0,705 ± 0,014^{AB}	
		Escherichia Coli (log_{10} UFC.g^{-1})			
Lixado	0,110 ± 0,006	0,067 ± 0,004	0,077 ± 0,004 ^{b}	0,203 ± 0,008	249,01
Não lixado	0,143 ± 0,006	0,226 ± 0,008	0,326 ± 0,011 ^{a}	0,392 ± 0,012	

Médias seguidas pelas mesmas letras, maiúsculas na linha e minúsculas na coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

A contaminação observada encontra-se dentro dos valores aceitáveis de acordo com os critérios estabelecidos pelo Ministério de Agricultura Pecuária e Abastecimento. Este resultado pode ser explicado pelo procedimento de escaldagem ao qual o produto é submetido durante o abate e que, neste trabalho, foi realizado antes da coleta das amostras, conforme o fluxo contínuo do abatedouro.

Os aeróbios totais são bons indicadores de deterioração de carne de aves (DOMINGUEZ et al., 2007). Como indicador para o fim de vida útil, adota-se a contagem de aeróbios mesófilos de 10^{7} UFC.g^{-1} (ICMSF,1986). Neste estudo, as contagens se mantiveram dentro dos limites estabelecidos.

O procedimento de lixa poderia resultar em uma contaminação elevada devido ao contato direto com a área lesionada, contudo esta situação não foi observada, demonstrando a eficiência do método em análise.

Em frangos resfriados, a contagem de microrganismos aeróbios mesófilos indica as condições de higiene no processamento, pois estes microrganismos são aqueles que vêm aderidos às penas, pele, pés e cloaca.

Níveis de contaminação por aeróbios mesófilos em carnes podem indicar condições higiênicas adequadas no abate e contagens acima de 10^5 podem significar condições inadequadas (GILL, 1998).

Durante o abate, quando o processo tecnológico não é realizado adequadamente é possível ainda haver contaminação por microrganismos presentes no sistema digestivo das aves (RITTER et al., 2003).

Com relação aos parâmetros microbiológicos para contagem total de coliformes fecais (Tabela 2), observou-se que não houve diferença ($P \geq 0,05$) entre as médias, em log de 10, dos graus avaliados para as amostras que foram submetidas ao procedimento de lixa.

Os valores para as médias da contagem total de coliformes fecais encontrados para as amostras não lixadas não se diferenciaram ($P \geq 0,05$) entre os graus 1, 2 e 3 e foram semelhantes ($P \geq 0,05$) entre os graus 0 e 1.

A média em log para contagem total de coliformes fecais das amostras de grau 2 que não passaram pelo procedimento de lixa se apresentou superior (0,817) à média obtida para as amostras de mesmo grau que passaram pelo procedimento (0,248), provavelmente devido à retirada do material necrótico.

O limite para coliformes totais, de acordo com a regulamentação da legislação chinesa, é de $\leq 5,0x10^3 UFC.g^{-1}$. Contagens mais elevadas foram encontradas por Leite et al. (2006), os quais analisaram a presença de coliformes totais e *E.coli* em diversos cortes congelados de frango, com resultados médios de $2,0x10^7$ $UFC.g^{-1}$ e $9,8x10^5$ $UFC.g^{-1}$, respectivamente. Os autores atribuíram as altas contagens a condições sanitárias inadequadas durante o processamento dos produtos analisados.

Para Coliformes totais termotolerantes, a legislação estabelece um limite máximo de $10^4 UFC.g^{-1}$ em carnes resfriadas ou congeladas de aves (BRASIL, 2001).

Ao observar os resultados, pode-se constatar que todas as amostras analisadas estavam em conformidade com o padrão nacional para carne de frango, apresentando variações abaixo do limite máximo estabelecido pela legislação brasileira.

Baixas contagens destes microrganismos em produtos tratados termicamente demonstram que o processamento foi suficiente para inativar as bactérias presentes no alimento (KORNACKI et al., 2001).

Juneja et al. (2003) observaram que a manutenção de parâmetros adequados durante a escadalgem, como temperatura da água acima de 71°C, é suficiente para reduzir a carga bacteriana em pés de frango, considerando o tempo de processamento de 28 segundos. Santos et al. (2011) encontraram uma redução de 99,98% na ocorrência de bactérias aeróbias

mesófilas e de 99,99% coliformes termotolerantes, após o processamento térmico (65-70°C durante 28 segundos) e congelamento (temperatura -30°C) de amostras de pés de frango.

De acordo com os parâmetros microbiológicos para contagem de *Escherichia coli* encontrados neste trabalho (Tabela 2), observou-se que não houve diferença (P≥0,05) entre as médias em log dos graus avaliados para as amostras submetidas e não submetidas ao procedimento de lixa nos graus 0, 1, 2 e 3.

Comparando-se os procedimentos dos quais as amostras foram submetidas (lixado e não lixado), entre os graus 0, 1 e 3, não houve diferença (P≥0,05) entre as médias em Log da contagem de *E.coli*. A média em log das amostras de grau 2 não lixadas se apresentou superior (0,326) à média obtida para as amostras de mesmo grau que passaram pelo procedimento (0,077), provavelmente devido a uma maior contaminação durante alguma etapa do processo.

Silva et al. (2002), analisaram cortes de carne de aves e verificaram que o microrganismo de maior prevalência foi a *E. coli*. Sua ocorrência não patogênica indica contaminação fecal direta ou indireta e a possibilidade de contaminação por outros microrganismos patogênicos. Os pés das aves estão em contato direto com suas excretas, dessa forma, a contaminação por esta bactéria poderia ser elevada. Entretanto, os procedimentos costumeiros do abatedouro frigorífico juntamente com o procedimento estudado foram suficientes em reduzir a contaminação por este microrganismo.

Na pesquisa de enterobactérias foi observado por Gualhardo et al. (2006) que a *E. coli* foi o coliforme predominante, com incidência de 72% das carcaças de frango após a passagem pelo *chiller*.

Os resultados obtidos através das análises microbiológicas apontam para a utilização eficaz das boas práticas de fabricação durante os processos realizados no abatedouro frigorífico em questão, para obtenção dos pés de frango e também para a eficácia da máquina removedora de calos, que não afetou ou contaminou as amostras estudadas.

7. CONCLUSÃO

As análises microbiológicas não apresentaram correlação com os graus de pododermatite avaliados. Não foi detectada nos produtos analisados a presença de contaminação microbiológica superior aos níveis aceitáveis, de acordo com os padrões estabelecidos pela legislação sanitária brasileira, indicando eficiência da máquina removedora de calos e boas condições de higiene e segurança dos produtos dentro do abatedouro.

A utilização da máquina removedora de calos reduziu a quantidade de células inflamatórias nas lesões de pododermatite e até mesmo retirou completamente a lesão.

Dessa forma, este estudo demonstrou que a utilização da máquina removedora de calos foi uma alternativa eficaz para a remoção da área afetada pela inflamação, nos casos de pododermatite.

8. REFERÊNCIAS

BALNAVE, D. Clinical symptoms of biotin deficiency in animals. American Journal of Clinical Nutrition, v.30, p.1408-1413, 1977. Disponível em: <http://www.ajcn.org/cgi/reprint/30/9/1408>. Acesso em: 15 agosto. 2014.

BEAN, C.; JACOBSON, J.; RYAN, S**. USDA – Foreing Agricultural Service. GAIN Report:** China, Peoples Republic of Poultry and Products Chicken Paw, Wing and Wing tip Exports to China 2007. Global Agriculture Information Network. Beijing, China, GAIN Report Number: CH7006, Publicado em 02 de julho de 2007.

BESTMAN M.; RUIS M.; HEIJMANS J.; MIDDELKOOP K.V. **Poultry Signals – a practical guide for bird focused poultry farming** – Zutphen: Roodbont Publishers B.V., 2011.

BORGES V.P. **Principais lesões macro e microscópicas em frangos de corte condenados por caquexia em abatedouro: contribuição ao diagnóstico**. 2006. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista. Jaboticabal, 125p.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Portaria n° 210**, de 10 de novembro de 1998. Aprova Regulamento técnico de inspeção tecnológica e higiênico-sanitária de carnes de aves. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 26 dez. 1998. Seção 1, p. 226-272, 1998.

BRASIL(a). Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Resolução n° 1**, de 09 de janeiro de 2003. Aprova a uniformização da nomenclatura de produtos cárneos não formulados em uso para aves e coelhos, suideos, caprinos, ovinos, bubalinos, equídeos, ovos e outras espécies animais. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 10 jan. 2003. Seção 1, p. 2, 2003.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, **circular nº 599/2010/CGPE/DIPOA**, de 29 de julho de 2010, Brasília. Hong Kong - Exportação de Cortes Congelados - Pés.

BRASIL(b). Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº 62**, de 26 de agosto de 2003. Aprova os Métodos analíticos oficiais para análises microbiológicas para o controle de produtos de origem animal e água. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 18 set. 2003. Seção 1, p. 21-32; 40-43; 51-67, 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC nº 12,** de 2 de janeiro de 2001. Regulamento técnico sobre os padrões microbiológicos para alimentos. Brasília: Ministério da Saúde, 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC nº 39,** de 8 de fevereiro de 2002. Regulamento técnico para instruções de uso, preparo e conservação na rotulagem de carne de aves e seus miúdos crus, resfriados ou congelados. Brasília: Ministério da Saúde, 2002.

COOK, M. E. Skeletal Deformities and Their Causes: Introduction. **Poultry Science**, v.79, p.982-984, 2000.

CRUZ, C.D. (1997). **Programa GENES** - Aplicativo Computacional em Genética e Estatística. Editora UFV, Viçosa, MG, p. 442.

DAVANÇO, T., TANADA-PALMU, P., & GROSSO, C. Filmes compostos de gelatina, triacetina, ácido esteárico ou capróico: efeito do pH e da adição de surfactantes sobre a funcionalidade dos filmes. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v27, n2, p.408-416, 2007.

DOMINGUEZ, S. A.; SCHAFFNER, D. W. Development and validation of a mathematical model to describe the growth of Pseudomonas spp. in raw poultry stored under aerobic conditions. **International Journal of Food Microbiology**, v.120, p.287-295, 2007.

DYCE, K, M; SACK, M, O ;WENSING, C, J, G. **Tratado De Anatomia Veterinária**. Rio de (Tradução 3rd ed.) Janeiro: Elsevier, 2004. ISBN 85-352-1392-9.

EKSTRAND, C., T. E. CARPENTER, I. ANDERSON, AND B. ALGERS, 1998. Prevalence and prevention of footpad dermatitis in broilers in Sweden. **British Poultry Science**, v.39, n.3, p.318-324, 1998.

GILL, C. O. Microbiological contamination of meat during slaughter and butchering of cattle, sheep and pigs. In: DAVIES, A.; BOARD, R. **The Microbiology of Meat and Poultry**. London: Blackie Academic and Professional, 1998. p.118-157.

GONZÁLES, E.; SALDANHA, E.S.P.B. Os primeiros dias de vida do frango e a produtividade futura. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ZOOTECNIA, 11., 2001, Goiânia. **Anais...** Goiânia: AZEG/ABZ, 2001. P.312-313.

GREENE, J.A.; McCRACKEN, R.M.; EVANS, R.T. Contact dermatitis of broilers – clinical and pathological findings. **Avian Pathology**, v.14, p.23-38, 1985.

GUALHARDO, J. A. et al. Eficácia dos tanques de pré-resfriamento na redução de contaminação bacteriana em carcaças de frango . **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 27, n. 4, p. 647-656, out./dez. 2006.

HESS, J. B., S. F. BILGILI, A. M. PARSON; K. M. DOWNS. 2001. Influence of complexed zinc products on live performance and carcass grade of broilers. **Journal of Applied Animal Research**. Vol.19, n^{o} 1, pages 49-60, 2001.

INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS - ICMSF. **Microorganisms in Foods**. Sampling for Microbiological Analysis: Principles and Scientific Applications. Toronto: University of Toronto, 1986. v. 2, p. 181-186.

JAY, J.M. **Microbiologia de alimentos**, 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. p.415-431.

JUNEJA, V. K.; MARKS, H. M.; MOHR, T. Predictive thermal inactivation model for effects of temperature, sodium lactate, NaCl, and sodium pyrophosphate on Salmonella serotypes in ground beef. **Applied and Environmental Microbiology.** v. 69, n. 9, p. 5138-5156, 2003

JÚNIOR, A.B.; SILVA, E,N; FÁBIO, J; et al. **Doenças das aves**. 2ª ed. Campinas: fundação APINCO de ciências e tecnologia avícolas, 2009. p.190-214, 459.

KORNACKI, J. L.; JOHSON, J. L. Enterobacteriaceae, Coliforms and Escherichia coli as quality and safety indicators. In: ITO, K. F. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods.** Ann Arbor: Sheridan Books, 2001. cap. 8, p. 69-82.

LEITE, A. M. O.; FRANCO, R. M. Coliformes totais e Escherichia coli em coxas de frango comercializados no Rio de Janeiro. **Revista Brasileira de Ciências Veterinárias**. v.13, n.2, p.80-83, 2006.

LUNA, L.G. **Manual of the histologic staining methods of the armed forces institute of pathology.** 3.ed. New York : McGraw Hill, 1968. 258p.

MARTINS, Cleverson A. F.; MIGUEL, Marilis D.; ZANIN, Sandra M. W. Utilização de material colagenoso e gorduroso extraído de peles de frango na indústria alimentícia, cosmética e de sabão. **Visão Acadêmica**. v.10, n.2, 2009.

MARTLAND, M. F. Wet litter as a cause of plantar pododermatitis leading to foot ulceration and lameness in fattening turkeys. **Avian Pathology**, v.13, p.241-252, 1984.

MARTRENCHAR, A.; BOILLETOT, E.; HUONNIC, D.; POL F. Risk factors for foot pad dermatitis in chicken and turkey broilers in France. **Preventive Veterinary Medicine**. v.52, p.213-226, 2002.

MAYNE, R.K. A review of the aetiology and possible causative factors of foot pad dermatitis in growing turkeys and broilers. **World's Poultry Science Journal,** v.61, p.256-267, 2005.

MEDEIROS, R.; SANTOS, B.J.M; FREITAS, M; SILVA, O.A. A adição de diferentes produtos químicos e o efeito da umidade na volatilização de amônia em cama de frango. **Ciência Rural**, v.38, n.8, p.2321-2326, 2008.

MILJKOVIĆ, B., ŠKRBIĆ, Z., PAVLOVSKI, Z., LUKIĆ, M., IVETIĆ, V., KURELJUŠIĆ, B., & PETRIČEVIĆ, V. Foot-pad dermatitis in commercial broilers. **Biotechnology in Animal Husbandry**, v.28, n.4, p.835-843, 2012.

MONTERO, P., & GÓMEZ-GUILLÉN, M. C. (2000). Extracting conditions for megrim (Lepidorhombus boscii) skin collagen affect functional properties of the resulting gelatin. **Journal of Food Science**, v.65, n.3, p.434-438.

MUNIZ E.C. 2006. **Influência da densidade populacional sobre o peso médio, percentual de calo de patas e histomorfometria da bolsa cloacal em aves** (Gallus gallus). Dissertação (Mestrado em Ciência Animal), Universidade Federal do Mato Grosso do Sul. Campo Grande, 34p.

NAGARAJ, M., WILSON, C. A. P., HESS, J. B. et al. Effect of high-protein and all-vegetable diets on the incidence and severity of pododermatitis in broiler chickens. **Journal Applied Poultry Research**, v.16, p.304–312, 2007.

RITTER, R.; BERGMANN, G. P. Eficácia do sistema de pré-resfriamento de frangos em tanques, sobre a redução da contaminação bacteriana de carcaças. **Higiene alimentar**. v.17, n.108, p.97-104, 2003.

RODRIGUES, F. S. **Estratégias mercadológicas da cadeia agroexportadora de frango de corte no Brasil**. 2008. Dissertação (Mestrado em Agronegócios) - Departamento de Economia e Administração. Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Campo Grande.

SANTOS R.L, NUNES V.A, BAIÃO N.C. Pododermatite de contato em frangos de corte. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. V.54, n.6, p.655-658, 2002.

SANTOS, F. F.; AQUINO, M. H. C.; NASCIMENTO, E. R.; ABREU, D. L. C.; GOUVEA, R.; RODRIGUES, D. P.; REIS, E. M. F.; ARAUJO, M. S.; PEREIRA, V. L. A. Chicken feet bacteriological quality at 4 steps of technological processing. **Poultry Science**. v.90, n.12, p.2864-2868, 2011.

SHEPHERD E. M.; FAIRCHILD B. D. Footpad dermatitis in Poultry. **Poultry Science,** V.89, n.10, p.2043-2051, 2010.

SILVA, J. A.; AZERÊDO, G. A.; BARROS, C. M. R.; COSTA, E. L.; FALCÃO, M. M. S. Incidência de bactérias patogênicas em carne de frango refrigerada. **Revista Higiene Alimentar**, v.16, n.100, p.97-101, 2002.

SORENSEN P, SU G, KESTIN SC. Effects of age and stocking density on leg weakness in broiler chickens. **Poultry Science**, v.79, n.6, p.864-870, 2000.

TALLON P., MAGAJNA B., LOFRANCO C., LEUNG K. T. Microbial indicators of faecal contamination in water: a current perspective. **Water, Air and Soil Pollution**, v.166, n.1-4, p.139-166, 2005.

TEIXEIRA,V.Q. **Anatomopatologia e bacteriologia da pododermatite em frangos de corte sob inspeção sanitária**. Universidade Federal Fluminense. Niterói, RJ, 2008.

UNIÃO BRASILEIRA DE AVICULTURA - UBABEF. Relatório anual 2014. São Paulo, 2014. Disponível em: <http://www.ubabef.com.br/publicacoes?m=75&date=2014-03> Acesso em: 22/08/2014.

UNITED NATIONS ECONOMIC COMMISSION FOR EUROPE - UNECE. **Standard for chicken meat carcasses and parts**. Genova: United Nations Publications, p.58, 2006.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE / FOREIGN AGRICULTURAL SERVICE - USDA/FAS. 2006. **Fresh and frozen poultry product standard**. GAIN Report: CH6001. Disponível em: <http://apps.fas. usda.gov/gainfiles/200601/146176574.pdf> Acesso em: 20/06/2014.

VIEIRA, S.L. Defeitos Visuais – Dermatites de Contato. In: **Qualidade visual de carcaça de frangos de corte: uma abordagem a partir do ambiente de produção**. 2.ed. Cascavel: Gráfica Positiva, p.55-59, 2009.

WALRAND, S.; CHIOTELLI, E.; NOIRT, F.; MWEWA, S.; LASSEL, T. Consumption of a functional fermented milk containing collagen hydrolysate improves the concentration of collagen-specific amino acids in plasma. **Journal of agricultural and food chemistry,** v.56, n.17, p.7790-7795, 2008.

WATANABE-KAMIYAMA, M.; MUNESHIGE, S.; SHIN, K. et al. Absorption and effectiveness of orally administered low molecular weight collagen hydrolysate in rats. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.58, n.2, p.835–841, 2010.

ZACHARY, J.F.; McGAVIN, I.; DONALD, M. **Bases da patologia em veterinária**. [tradução de Renata Scavone...et al. – 2ª .ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2013.