

AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTIMICROBIANO DE ÁCIDOS ORGÂNICOS EM UM MODELO DE ALIMENTO SEMIÚMIDO PARA CÃES

LUCAS B. F. HENRÍQUEZ¹, ARIELLE R. SCHAFFER¹, PATRICK S. LOURENÇO¹, SHIRLEY SOUZA¹, JÉSSYKA L. G. COSTA¹, VANDERLY JANEIRO², MAGALI S. S. POZZA¹, RICARDO S. VASCONCELLOS¹

¹Departamento de Zootecnia, Universidade Estadual de Maringá (UEM), Maringá-PR, Brasil ²Departamento de Estatística, Universidade Estadual de Maringá (UEM), Maringá-PR, Brasil

Contato: lucasbfhenriquez@gmail.com / Apresentador: PATRICK S. LOURENÇO

Resumo: Objetivou-se avaliar a eficácia de um *blend* de ácidos orgânicos, contendo principalmente o propiônico, no controle de fungos e bactérias em alimento semiúmido para cães. Foram fabricados em condições industriais cinco tratamentos: controle negativo (sem antimicrobianos), controle positivo (0,50% de sorbato de potássio (SP)) e três com *blend* de ácidos orgânicos (0,33%, 0,66% e 0,99%), em três teores de umidade (18%, 21% e 25%). Foram determinadas ainda as isotermas de sorção (adsorção e dessorção) e microscopia eletrônica de varredura (MEV). As amostras foram inoculadas com *A. brasiliensis* ou *S. Typhimurium*, sendo analisadas contagem microbiana, pH, aw e umidade no dia da inoculação e após 15, 30, 45 e 60 dias. A análise estatística foi realizada no RStudio ($p < 0,05$). Nos alimentos analisados, as curvas de dessorção apresentaram melhor capacidade preditiva ($R^2 > 0,99$). As imagens da MEV mostraram crescimento fúngico predominante na superfície do alimento. Não houve diferença entre tratamentos para pH, aw e umidade. O SP foi mais eficaz contra *A. brasiliensis* que o *blend*, mas nenhum antimicrobiano foi eficaz contra *S. Typhimurium*. Portanto, apenas o SP teve efeito fungicida, e nenhum antimicrobiano apresentou efeito bacteriostático ou bactericida.

PalavrasChaves: Ácido propiônico; *Aspergillus*; isotermas de sorção; *Salmonella*; sorbato de potássio

EVALUATION OF THE ANTIMICROBIAL EFFECT OF ORGANIC ACIDS IN A SEMIMOIST DOG FOOD MODEL

Abstract: The objective was to evaluate the effectiveness of an organic acid blend, primarily containing propionic acid, in controlling fungi and bacteria in semi-moist dog food. Five treatments were manufactured under industrial conditions: negative control (without antimicrobials), positive control (0.50% potassium sorbate (PS)), and three with the organic acid blend (0.33%, 0.66%, and 0.99%) at three moisture levels (18%, 21%, and 25%). Sorption isotherms (adsorption and desorption) and scanning electron microscopy (SEM) analyses were also conducted. Samples were inoculated with *A. brasiliensis* or *S. Typhimurium* and analyzed for microbial counts, pH, water activity (aw), and moisture on the day of inoculation and after 15, 30, 45, and 60 days. Statistical analysis was performed using RStudio ($p < 0.05$). In the analyzed foods, desorption curves showed better predictive capacity ($R^2 > 0.99$). SEM images revealed predominant fungal growth on the surface of the food. No differences were observed between treatments for pH, aw, and moisture. PS was more effective against *A. brasiliensis* than the blend, but neither antimicrobial was effective against *S. Typhimurium*. Therefore, only PS had a fungicidal effect, and no antimicrobial showed bacteriostatic or bactericidal effects.

Keywords: Propionic acid; *Aspergillus*; sorption isotherms; *Salmonella*; potassium sorbate

Introdução: A contaminação de *pet food* por microrganismos pode ocorrer tanto durante a fabricação, como na fase de uso na casa dos tutores (Morelli et al., 2021). A deterioração por bactérias patogênicas e fungos reduz o *shelf-life* e representa risco para animais e tutores (Viegas et al., 2020). A inclusão de antimicrobianos e aditivos, como antiumectantes e acidificantes, é essencial para reduzir o crescimento microbiano em alimentos com maior teor de umidade, como os semiúmidos para cães e gatos. Os principais antimicrobianos usados são sais sintéticos, como o sorbato de potássio (SP). Contudo, a demanda por aditivos naturais tem crescido (Deliephan et al., 2023). Diante disso, com este trabalho objetivou-se avaliar a eficácia de um *blend* de ácidos orgânicos, principalmente propiônico, no controle de *Aspergillus brasiliensis* e *Salmonella Typhimurium* em alimento semiúmido para cães.

Material e Métodos: Foram preparados 5 tratamentos: controle negativo (sem antimicrobiano); controle positivo (0,50% de SP); e três tratamentos com diferentes inclusões de um *blend* de ácidos orgânicos: 0,33, 0,66 e 0,99%, em 3 teores de umidade diferentes: 18, 21 e 25%. O *blend* de ácidos orgânicos foi obtido por meio da fermentação da lactose presente soro de leite por bactérias do gênero *Propionibacterium* spp. O propiônico foi o principal ácido orgânico identificado. O pH do produto era de 6,51. Antes do experimento, foram realizadas análises de isotermas de sorção e microscopia eletrônica de varredura (MEV) para caracterização das amostras em diferentes umidades. Com o intuito de avaliar a capacidade antimicrobiana do *blend* de ácidos orgânicos, após a confecção dos produtos, as amostras foram submetidas a desafios com contaminação ou do fungo *Aspergillus brasiliensis* (Kwik Stik 16404) ou da bactéria *Salmonella Typhimurium* (ATCC 14028). Após a inoculação dos microrganismos, as amostras foram acondicionadas em embalagens de polipropileno e mantidas em estufa tipo BOD com temperatura controlada a 25°C. Cada embalagem continha 50 g de alimento. Foram coletadas amostras para contagem microbiana nos dias 0, 15, 30, 45 e 60 pós inoculação. Estas amostras também foram utilizadas para determinar o teor de umidade, aw e pH dos alimentos nos diferentes tempos. Em cada período foram analisadas 4 amostras por tratamento/umidade. A análise estatística foi conduzida no RStudio, considerando o tempo 0 como covariável para os tempos subsequentes. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

Resultado e Discussão: Na análise de isotermas, as curvas de dessorção se ajustaram melhor amostras de alimento semiúmido. As imagens da MEV mostraram crescimento fúngico predominante na superfície do alimento (Figura 1). Não

foram observadas mudanças no pH, aw e umidade ao longo do estudo, nem diferenças entre tratamentos para essas variáveis (Tabela 1). Nas amostras com umidade de 18% e 21%, houve redução na contagem de UFC para todos os tratamentos, enquanto na de 25% apenas para o CP. O SP apresentou maior capacidade antifúngica que o *blend* de ácidos orgânicos (Figura 2). Nenhum antimicrobiano foi eficaz contra *S. Typhimurium* (Figura 3).O crescimento microbiano é influenciado pelas condições do meio. Antes de incluir um antimicrobiano na formulação, é essencial conhecer sua forma de ação e o pH ideal para melhor desempenho (Kiprotich et al., 2023). Tanto os ácidos orgânicos quanto seus sais, como o SP, atuam de maneira semelhante, acidificando o meio e causando a morte celular dos microrganismos, sendo o segundo mecanismo mais eficaz. Apenas a forma não dissociada dos ácidos é capaz de atravessar a parede celular (Coban, 2020). O pKa do ácido sórbico é 4,7 (Dehghan et al., 2018), apesar disso, o SP já demonstrou atividade antimicrobiana em pH 6,0, embora com eficácia reduzida (Flores et al., 2007). Já o pKa do ácido propiônico é 4,88, com faixa ideal de ação entre pH 4 e 5 (Costa et al., 2024). Como o pH das amostras com o *blend*, assim como do CN, permaneceram acima de 6, as doses utilizadas não foram suficientes para acidificar o meio, reduzindo a eficácia fungicida do ácido

Figura 1. Crescimento do *Aspergillus brasiliensis* ao longo de 20 dias em alimentos semiúmidos para pets com 25% de umidade. A, B e C: superfície do alimento no dia da aspersão da solução e 10 e 20 dias depois; D: Fungo aparente após 20 dias do desafio com a solução fúngica.

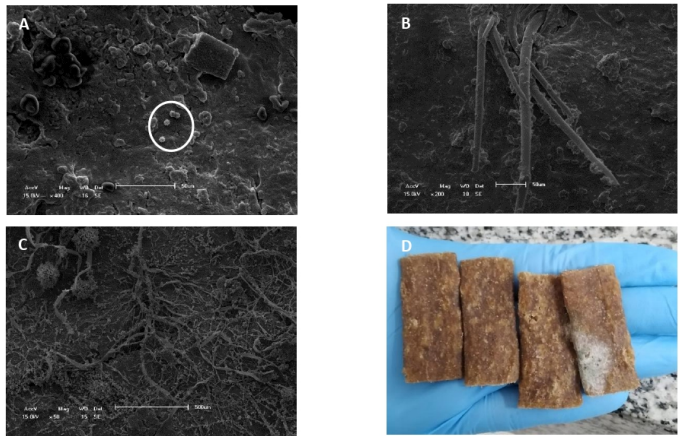


Tabela 1. Teor de umidade, atividade de água (aw) e pH médios dos alimentos semiúmidos para cães antes e após a aspersão das soluções fúngicas e bacterianas.

Variável	Antes da aspersão			<i>Aspergillus brasiliensis</i>			<i>Salmonella Typhimurium</i>		
	18%	21%	25%	18%	21%	25%	18%	21%	25%
Umidade	18,36	20,65	25,11	19,85	21,80	26,46	19,82	21,82	26,23
aw	0,677	0,703	0,745	0,680	0,712	0,762	0,682	0,715	0,763
pH	6,16	6,16	6,15	6,19	6,18	6,17	6,16	6,12	6,14

Figura 2. Contagem (log UFC/g) de *Aspergillus brasiliensis* em alimentos semiúmidos para cães fabricados com 18% (A), 21% (B) e 25% (C) de umidade ao longo de 60 dias.

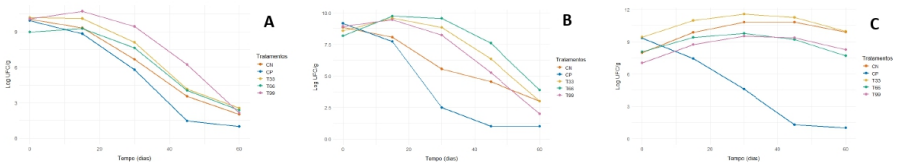
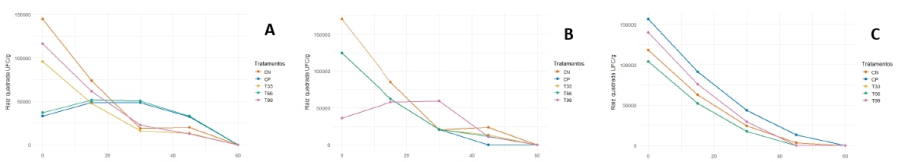


Figura 3. Contagem (raiz quadrada UFC/g) de *Salmonella Typhimurium* em alimentos semiúmidos para cães fabricados com 18% (A), 21% (B) e 25% (C) de umidade ao longo de 60 dias.



Conclusão: O SP foi o único antimicrobiano com efeito fungicida entre os tratamentos testados, enquanto nenhum dos antimicrobianos avaliados apresentou atividade bactericida ou bacteriostática. A análise de isotermas de sorção mostrou-se uma ferramenta útil para prever o comportamento microbiano em diferentes condições de umidade, embora ajustes adicionais sejam necessários para melhorar sua precisão.

Agradecimentos: À CAPES pela bolsa concedida ao autor Lucas B. F. Henríquez. Aos estagiários e funcionários do Centro Mesorregional de Excelência em Tecnologia do Leite da Universidade Estadual de Maringá pelo auxílio com as análises microbiológicas.

Referências Bibliográficas: COBAN, H. B. Organic acids as antimicrobial food agents: applications and microbial productions. Bioprocess Biosyst. Eng. 43, 569–591, 2020.COSTA, F. K. C. et al. Modeling the influence of propionic acid concentration and pH on the kinetics of Salmonella Typhimurium. Int. J. Food Microbiol. 416, 2024.DEHGHAN, P. et al.

Pharmacokinetic and toxicological aspects of potassium sorbate food additive and its constituents. *Trends Food Sci. Technol.* 80, 123–130, 2018. DELIEPHAN, A. et al. Effects of liquid smoke preparations on shelf life and growth of wild type mold and *Aspergillus flavus* in a model semi moist pet food. *Front. Microbiol.* 14, 2023. FLORES, S. et al. Antimicrobial performance of potassium sorbate supported in tapioca starch edible films. *Eur. Food Res. Tec.* 225, 375–384, 2007. KIPROTICH, S. et al. Assessment of the antifungal efficacy of whey fermentate alone or in combination with citrus extract to control *Aspergillus flavus* mold in semi-moist pet food for dogs. *Front. Microbiol.* 14, 2023. MORELLI, G. et al. A survey among dog and cat owners on pet food storage and preservation in the households. *Animals* 11, 1–19, 2021. VIEGAS, F. M. et al. Fecal shedding of *Salmonella* spp., *Clostridium perfringens*, and *Clostridioides difficile* in dogs fed raw meat-based diets in Brazil and their owners' motivation. *PLoS One* 15, 2020.