

## EFEITO ANTIMICROBIANO DE ÁCIDOS ORGÂNICOS DERIVADOS DA FERMENTAÇÃO BACTERIANA (*PROPIONIBACTERIUM SPP.*) EM ALIMENTO SECO EXTRUSADO

LUCAS B. F. HENRÍQUEZ<sup>1</sup>, ARIELLE R. SCHAFFER<sup>1</sup>, PATRICK S. LOURENÇO<sup>1</sup>, SHIRLEY SOUZA<sup>1</sup>, JÉSSYKA L. G. COSTA<sup>1</sup>, VANDERLY JANEIRO<sup>2</sup>, MAGALI S. S. POZZA<sup>1</sup>, RICARDO S. VASCONCELLOS<sup>1</sup>

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

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

**Resumo:** Objetivou-se avaliar o efeito antimicrobiano de dois *blends* de ácidos orgânicos, contendo principalmente ácido propiônico, obtidos pela fermentação do *Propionibacterium spp.* em alimento seco extrusado para *pets*. Foram fabricados 8 tratamentos: controle negativo (sem antimicrobiano), controle positivo (0,15% de propionato de cálcio (PC)), três com o *blend* A (0,33, 0,66 e 0,99%) e três com o *blend* B (0,33, 0,66 e 0,99%), em três teores de umidade: 6, 12 e 18%. Antes do estudo, foram realizadas análises de isotermas de adsorção e microscopia eletrônica de varredura (MEV). As amostras foram inoculadas com ou com *A. brasiliensis* ou com *S. Typhimurium* e analisadas quanto à 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 ( $p < 0,05$ ). As curvas de isotermas de demonstram bom ajuste das curvas nas amostras analisadas ( $R^2 > 0,99$ ). A MEV mostrou conídios na superfície e interior dos kibbles. Não foram observadas diferenças entre tratamentos para pH, aw e umidade ao longo do tempo. Embora os microrganismos não tenham se desenvolvido em aw até 0,65, os antimicrobianos não reduziram as UFC para fungos ou bactérias. Portanto, o PC e os *blends*, não demonstraram efeito microbicida ou microbiostático.

**PalavrasChaves:** Ácido propiônico; *Aspergillus*; isotermas de sorção; *Salmonella*; propionato de cálcio.

## ANTIMICROBIAL EFFECT OF ORGANIC ACIDS DERIVED FROM BACTERIAL FERMENTATION (*PROPIONIBACTERIUM SPP.*) IN EXTRUDED DRY PET FOOD

**Abstract:** This study aimed to evaluate the antimicrobial effect of two blends of organic acids, mainly propionic acid, obtained through *Propionibacterium spp.* fermentation in extruded dry pet food. Eight treatments were prepared: a negative control (without antimicrobials), a positive control (0.15% calcium propionate (CP)), three treatments with blend A (0.33%, 0.66%, and 0.99%), and three with blend B (0.33%, 0.66%, and 0.99%), at three moisture levels: 6%, 12%, and 18%. Before the trial, adsorption isotherm analysis and scanning electron microscopy (SEM) were performed. Samples were inoculated with *A. brasiliensis* or *S. Typhimurium* and analyzed for microbial count, pH, aw, and moisture on the day of inoculation and after 15, 30, 45, and 60 days. Statistical analysis was performed using RStudio ( $p < 0.05$ ). The isotherm curves showed a good fit to the analyzed samples ( $R^2 > 0.99$ ). SEM revealed conidia on the surface and inside the kibbles. No differences were observed between treatments for pH, aw, and moisture over time. Although microbial growth did not occur at aw up to 0.65, the antimicrobials did not reduce colony-forming units for fungi or bacteria. Therefore, CP and the blends showed no microbicidal or microbiostatic effects.

**Keywords:** Propionic acid; *Aspergillus*; sorption isotherms; *Salmonella*; calcium propionate.

**Introdução:** O crescimento microbiano em alimentos pode reduzir o *shelf life* e representar riscos à saúde de animais e humanos (Kepinska-Pacelik and Biel, 2021). Esse risco é maior em alimentos com alta atividade de água (aw) e umidade, que favorecem o crescimento de microrganismos (Bintsis, 2017). No entanto, alimentos secos também podem apresentar riscos devido à troca de água com o ambiente (Conceição et al., 2022; FDA, 2024; RASFF, 2024). O propionato de cálcio (PC) é um antimicrobiano comum em alimentos com baixa aw devido à sua ação microbicida (Alam et al., 2014). Entretanto, a crescente demanda por aditivos naturais tem incentivado a busca por alternativas aos sintéticos atualmente empregados. Diante disso, com este estudo objetivou-se avaliar a capacidade microbicida ou microbiostática de dois *blends* de ácidos orgânicos, contendo principalmente ácido propiônico, obtidos pela fermentação de diferentes substratos por *Propionibacterium spp.* em um modelo de alimento seco extrusado para *pets*.

**Material e Métodos:** Foram preparados 8 tratamentos: controle negativo (sem antimicrobiano), controle positivo (0,15% de PC) e três com o *blend* A (0,33, 0,66 e 0,99%) e três com o *blend* B (0,33, 0,66 e 0,99%), em três teores de umidade: 6, 12 e 18%. O *blend* A foi obtido por fermentação da lactose do soro de leite, enquanto o *blend* B foi obtido por fermentação de glicose, frutose e maltose, ambos por *Propionibacterium spp.* O ácido propiônico foi o principal componente identificado em ambos, sendo observado em maior concentração no produto B. O pH do *blend* A foi de 6,51 e o do *blend* B foi de 6,25. Antes do experimento, foram realizadas análises de isotermas de adsorção e microscopia eletrônica de varredura para caracterização das amostras em diferentes umidades. Para avaliar a capacidade antimicrobiana, as amostras foram inoculadas com *Aspergillus brasiliensis* (Kwik Stik 16404) ou *Salmonella Typhimurium* (ATCC 14028). Após a inoculação, foram armazenadas em embalagens de polipropileno a 25°C em estufa tipo BOD. Cada embalagem continha 50 g de alimento. Foram realizadas contagens microbianas e análises de umidade, atividade de água (aw) e pH nos dias 0, 15, 30, 45 e 60 pós-inoculação, com quatro amostras analisadas por tratamento e umidade em cada período. A análise estatística foi conduzida no *software* RStudio, considerando o tempo 0 como covariável para os tempos subsequentes. Foi considerado nível de significância de 5%.

**Resultado e Discussão:** As curvas de isotermas mostraram bom ajuste ( $R^2 > 0,99$ ). As imagens da MEV revelaram conídios na superfície e interior dos kibbles, com crescimento visível de fungo apenas na amostra com 18% de umidade (Figura 1). Não

houve alterações no pH, aw e umidade entre tratamentos ao longo do estudo (Tabela 1). Os antimicrobianos testados não reduziram as contagens de UFC para os microrganismos avaliados (Figuras 2 e 3). Alimentos comerciais apresentam até 12% de umidade, os resultados deste estudo demonstram que medidas extras de prevenção, como pH ácido e antimicrobianos, são necessárias mesmo em alimentos secos. Antimicrobianos à base de ácidos requerem pH ideal para ação eficaz. Nesta faixa, há maior concentração de moléculas não dissociadas, que atravessam a membrana celular, causando morte por aumento do gasto energético e elevação do pH intracelular (Sequeira et al., 2017). Nenhum tratamento ou teor de umidade reduziu as contagens microbianas após 60 dias, tornando os alimentos impróprios para consumo, mesmo sem crescimento visível de fungo. A ABINPET (2024) recomenda contagem zero para *Salmonella* em 25 g e até 10<sup>3</sup> UFC/g para fungos sem crescimento visível. Microrganismos podem permanecer dormentes até que condições ambientais favoreçam seu crescimento. As isoterms indicaram que os alimentos absorveram água suficiente para estimular o crescimento microbiano. O tempo de estabilização em maior aw foi de 35 dias, relativamente curto considerando que alimentos para pets devem manter estabilidade microbiológica entre 12 e 24 meses (Lambertini et al., 2016).

Figura 1. Crescimento do *Aspergillus brasiliensis* ao longo de 20 dias em alimentos secos extrusados para pets com 18% de umidade. A, B e C: superfície do kibble no dia da aspersão da solução e 10 e 20 dias depois; D: Corte transversal do kibble no dia 20 pós inoculação; E: Fungo aparente após 20 dias do desafio com a solução fúngica.

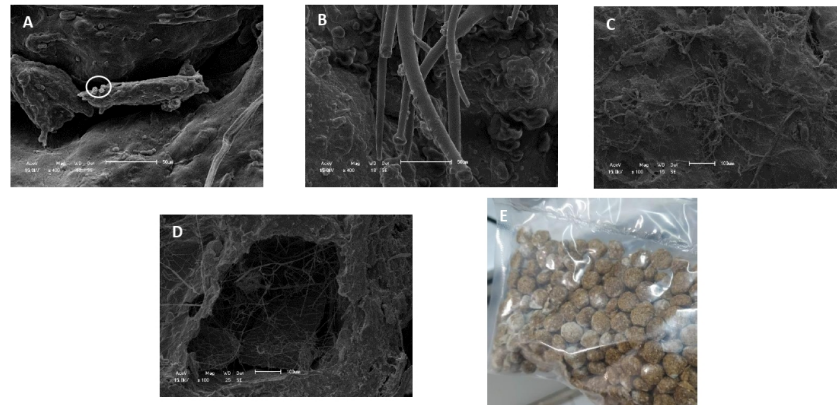


Tabela 1. Teor de umidade, atividade de água (aw) e pH médios dos alimentos secos extrusados para pets antes e após a aspersão das soluções fúngicas e bacterianas.

Variável	Antes da aspersão			<i>Aspergillus brasiliensis</i>			<i>Salmonella Typhimurium</i>		
	6%	12%	18%	6%	12%	18%	6%	12%	18%
Umidade	5,50	11,01	17,95	5,92	13,17	20,07	5,86	12,97	19,56
aw	0,310	0,630	0,718	0,340	0,658	0,743	0,333	0,655	0,742
pH	6,26	6,32	6,38	6,29	6,33	6,40	6,32	6,35	6,41

Figura 2. Contagem (log UFC/ml) de *Aspergillus brasiliensis* em alimentos secos extrusados para pets fabricados com 6% (A), 12% (B) e 18% (C) de umidade durante 60 dias a 25°C.

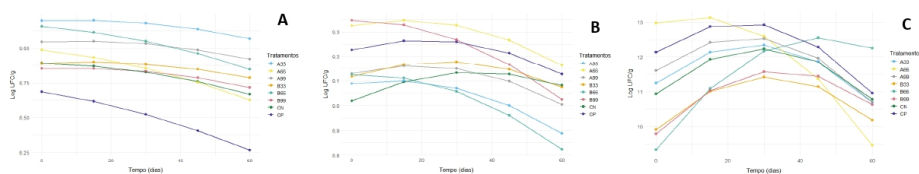
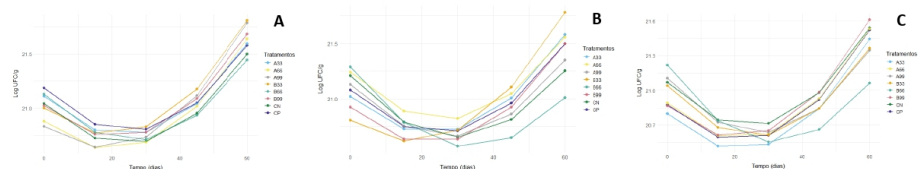


Figura 3. Contagem (log UFC/ml) de *Salmonella Typhimurium* em alimentos secos extrusados para pets fabricados com 6% (A), 12% (B) e 18% (C) de umidade durante 60 dias à 25°C.



**Conclusão:** Este estudo demonstrou a prevalência de fungos e bactérias em alimentos secos extrusados para pets até 60 dias de armazenamento, numa simulação de contaminação pós-processamento. Até 0,65 de aw, o desenvolvimento fúngico foi limitado, mas os aditivos testados não tiveram efeito microbicida, com fungos e bactérias permanecendo viáveis, porém em estado de latência.

**Agradecimentos:** À CAPES pela bolsa concedida ao autor Lucas B. F. Henriques. 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:** ABINPET. Manual Pet Food Brasil, 2024. ALAM, S. et al. Influence of calcium propionate, water activity and storage time on mold incidence and aflatoxins production in broiler starter feed. Anim. Feed Sci. Technol. 188, 137–144, 2014. BINTSIS, T. Foodborne pathogens. AIMS Microbiol. 3, 529–563, 2017. CONCEIÇÃO, A. B. S. et al.

Presença de fungos em rações de gatos comercializadas em Seropédica, Rio de Janeiro, Brasil. *Pubvet* 16, 1–6, 2022. Food and Drug Administration (FDA) (2024). Recalls & Withdrawals. Disponível em: <https://www.fda.gov/animal-veterinary/safety-health/recalls-withdrawals> KEPINSKA-PACELIK, J.; BIEL, W. Mycotoxins—prevention, detection, impact on animal health. *Processes* 9(11), 2035, 2021. LAMBERTINI, E. et al. Transmission of Bacterial Zoonotic Pathogens between Pets and Humans: The Role of Pet Food. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 56, 364–418, 2016. Rapid Alert System for Food and Feed (RASFF) (2024). RASFF Window. Disponível em: <https://webgate.ec.europa.eu/rasff-window/screen/search> Sequeira, S. O. et al. Antifungal treatment of paper with calcium propionate and parabens: Short-term and long-term effects. *Int. Biodeterior Biodegradation* 120, 203–215, 2017.