

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ  
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

BIANCA REBONATTO

**ÁCIDOS ORGÂNICOS VISANDO MELHORIA DA ESTABILIDADE DE  
RAÇÕES PELETIZADAS COM MELAÇO EXTERNO**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

LONDRINA

2017

BIANCA REBONATTO

**ÁCIDOS ORGÂNICOS VISANDO MELHORIA DA ESTABILIDADE DE  
RAÇÕES PELETIZADAS COM MELAÇO EXTERNO**

Dissertação de mestrado, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, Câmpus Londrina, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Tecnologia de Alimentos.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Elisabete Hiromi Hashimoto

Co-orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Alessandra Machado Lunkes

LONDRINA

2017

## TERMO DE LICENCIAMENTO

Esta Dissertação está licenciada sob uma Licença Creative Commons *atribuição uso não-comercial/compartilhamento sob a mesma licença 4.0 Brasil*. Para ver uma cópia desta licença, visite o endereço <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/> ou envie uma carta para Creative Commons, 171 Second Street, Suite 300, San Francisco, Califórnia 94105, USA.



Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Biblioteca UTFPR - Câmpus Londrina

R292a Rebonatto, Bianca

Ácidos orgânicos visando melhoria da estabilidade de rações peletizadas com melação externo / Bianca Rebonatto. - Londrina : [s.n.], 2017.  
106 f. : il. ; 30 cm.

Orientadora: Profª Drª Elisabete Hiromi Hashimoto

Coorientadora: Profª Drª Alessandra Machado-Lunkes

Dissertação (Mestrado) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná.

Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos. Londrina, 2017.

Bibliografia: f. 55-71.

1. Ácidos orgânicos. 2. Antimicóticos. 3. Aflatoxina - Controle. 4. Ração.  
I. Hashimoto, Elisabete Hiromi, orient. II. Machado-Lunkes, Alessandra, coorient.  
III. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. IV. Programa de Pós-Graduação  
em Tecnologia de Alimentos. V. Título.

CDD: 664

**FOLHA DE APROVAÇÃO**  
Título da Dissertação N° \_\_\_\_

**ÁCIDOS ORGÂNICOS VISANDO MELHORIA DA  
ESTABILIDADE DE RAÇÕES PELETIZADAS COM MELAÇO  
EXTERNO**

por

**BIANCA REBONATTO**

Esta dissertação foi apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de MESTRE EM TECNOLOGIA DE ALIMENTOS – Área de Concentração: Tecnologia de Alimentos, pelo Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos – PPGTAL – da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR – Câmpus Londrina, às 13:30h do dia 21 de Agosto de 2017. O trabalho foi aprovado pela Banca Examinadora, composta por:

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Elisabete Hiromi Hashimoto  
Prof.<sup>a</sup> Orientadora  
UTFPR Câmpus Francisco Beltrão

---

Prof Dr. Eder da Costa Santos  
Membro Titular

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Naimara Vieira do Prado  
Membro Titular

Visto da coordenação:

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Lúcia Felicidade Dias  
(Coordenadora do PPGTAL)

A Folha de Aprovação assinada encontra-se na Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos.

Dedico este trabalho a minha família, pais,  
irmã e avó (*in memoriam*) pelo apoio e  
amor incondicional.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus por sempre me guiar na realização dos meus sonhos, me mostrando o caminho mesmo quando parecia não dar certo.

À minha família. Meus pais, irmã e cunhado. Vocês foram essenciais em mais essa etapa. Se não fosse o amor, paciência e ajuda de vocês eu não teria chegado até aqui.

À minha orientadora Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Elisabete Hiromi Hashimoto, pelo apoio, atenção e incentivo com que me guiou nesta trajetória. A minha co-orientadora Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Alessandra Machado Lunkes, pelas considerações e acompanhamento no laboratório. Agradeço também a Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Naimara Vieira do Prado, pelo auxílio em todos os momentos da pesquisa.

Agradeço imensamente à Cooperativa pelo apoio e por ter acreditado na proposta do trabalho, em especial a toda equipe da Nutrição Animal, pela oportunidade, auxílio e atenção prestados ao longo desses anos.

Aos técnicos de laboratório da UTFPR-FB Ronaldo, Sinara, Camila e Sintia, e aos alunos de iniciação científica, em especial a Janice que esteve presente em todos os momentos.

Aos amigos e colegas de trabalho e mestrado, pela ajuda e principalmente paciência e companheirismo nos momentos difíceis.

Enfim, a todos os que por algum motivo contribuíram para a realização deste projeto.

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas graças a Deus, não sou o que era antes”.  
(Marthin Luther King)”.

## RESUMO

REBONATTO, Bianca. **Ácidos orgânicos visando melhoria da estabilidade de rações peletizadas com melaço externo.** 2017.106f. Dissertação (Mestrado Profissional em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Londrina, 2017.

O desenvolvimento de fungos em alimentos e a possibilidade de produção de micotoxinas por estes fungos constituem um problema de saúde pública. Restringir a contaminação fúngica dos alimentos e matérias-primas é uma das etapas de maior importância para garantir a segurança alimentar. Uma alternativa para prevenir o desenvolvimento fúngico é a utilização de ácidos orgânicos. Estes compostos possuem ação antimicrobiana, reduzem o pH dos alimentos e o pH intracelular do microrganismo. O objetivo deste trabalho foi determinar a concentração inibitória mínima (CIM) de ácidos orgânicos e suas combinações contra *Aspergillus flavus* aflatoxigênico e posteriormente, avaliar o efeito da adição da combinação de ácidos orgânicos na estabilidade de rações peletizadas com melaço externo. Os ácidos orgânicos e sal isolados (ácido acético (AA), láctico (AL), propiônico (AP) e sorbato de potássio (SP) e combinados (AA+AP, AA+SP, AL+SP, AA+AL, AL+AP e AP+SP) foram testadas *in vitro* para a inibição de  $10^4$  esporos. mL<sup>-1</sup> de *A. flavus* NRRL 3251. Um total de 7 tratamentos, sendo: (T1: Controle sem ácido, T2: AP comercial, T3: AP1 0,025%, T4: AP2 0,1%, T5: AP+AC 0,025+0,25%, T6: AP+SP 0,025+0,25% e T7: AP+AL 0,1+0,4%) foram aplicados em ração peletizada com melaço externo e a estabilidade da ração avaliada por um período de 60 dias de armazenamento. A determinação de contagem de bolores e leveduras, umidade, pH, atividade de água e acidez foram realizadas após 1, 7, 14, 30, 45 e 60 dias. Entre os compostos avaliados individualmente, o ácido propiônico (AP) foi o mais eficiente em inibir *A. flavus* (CIM = 26,99 mM), seguido do ácido acético (AA) (83,26 mM) e sorbato de potássio (SP) (133,13 mM). Entre as combinações, os melhores resultados de CIM foram de AA (41,63 mM) + AP (3,37 mM), AA (4,16 mM) + SP (6,65 mM) e AP (3,37 mM) + SP (16,64 mM), demonstrando o melhor desempenho dos compostos para inibir *A. flavus* quando combinados. Não foi possível determinar a estabilidade das rações peletizadas com melaço externo, em decorrência da baixa atividade de água da amostra e das condições de armazenamento, estando em níveis inferiores aos necessários para o desenvolvimento de fungos deteriorantes ( $A_w > 0,80$ ). Os fatores intrínsecos relacionados ao produto e os extrínsecos relacionados ao ambiente deverão ser levados em consideração para que se possa avaliar a possível efetividade dos ácidos orgânicos como antifúngicos em rações armazenadas, garantindo a segurança e qualidade do produto até o momento do consumo.

**Palavras-chave:** Ácido fraco. Antifúngicos. Ração. Combinação de ácidos orgânicos.



## ABSTRACT

REBONATTO, Bianca. **Evaluation of efficacy of organic acids in stability of animal feed pelleting with external molasses.** 2017. 106f. Dissertation (Master in Food Technology) - Federal Technology University - Paraná. Londrina, 2017.

The development of molds in food and the possibility of mycotoxins production by these fungi has become a public health problem. Restricting fungal contamination of food and feedstock is one of the most important steps to ensure food safety. A way to prevent the fungal growth is the use of organic acids. These compounds have antimicrobial activity, they reduce the food pH and the intracellular pH of the microorganism. The aim of this paper was to determine the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of the organic acids and its combinations against the aflatoxigenic *Aspergillus flavus* and therefore, evaluate the effect of the addition of organic acids combination on the stability of animal feed pelleting with external molasses. Organic acids and salt isolated: acetic acid (AA), lactic acid (LA), propionic acid (PA) and potassium sorbate (PS) and the combined ones (AA+PA, AA+PS, LA+PS, AA+LA, LA+PA and PA+PS) were tested in vitro for the inhibition of  $10^4$  spores. mL<sup>-1</sup> of *A. flavus* NRRL 3251. Seven treatments, (T1: Acid Control, T2: Comercial PA, T3: PA1 0,025%, T4: PA2 0,1%, T5: PA+CA 0,025+0,25%, T6: PA+PS 0,025+0,25% and T7: PA+LA 0,1+0,4%) were applied in animal feed pelleting with external molasses and the stability of the animal feed was evaluated for a period of 60 days of storage. The analyses of yeasts and molds count, moisture, pH, water activity and acidity were performed after 1, 7, 14, 30, 45 and 60 days. Among the compounds evaluated individually, propionic acid (PA) was the most efficient in inhibiting *A. flavus* (MIC = 26,99 mM), followed by acetic acid (AA) (83,26 mM) and potassium sorbate (PS) (133,13 mM). Among the combinations, the best MIC results were AA (41,63 mM) + PA (3,37 mM), AA (4,16 mM) + PS (6,65 mM) and PA (3,37 mM) + PS (16,64 mM), showing the best performance of the compounds to inhibit *A. flavus* when they are combined. It was not possible to determine the stability of animal feed pelleting with external molasses, due to the low water activity of the sample and the storage conditions, being in lower levels than those that are required for the fungal growth deteriorating ( $A_w > 0,80$ ). Intrinsic factors related to the product and the extrinsic factors related to the environment should be considered in order to evaluate the potential effectiveness of the organic acids as antifungals in stored animal feed, ensuring the safety and quality of the product until the moment of consumption.

**Keywords:** Weak acid. Antifungal. Animal feed. Organic acids combination.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Processo de fabricação de ração peletizada .....	21
Figura 2 - Efeito de cinco obstáculos ao crescimento microbiano .....	39
Figura 3 - Fluxograma experimental do trabalho.....	44
Figura 4 - Tacho para homogeneização da ração .....	50
Figura 5 - Homogeneização das rações com melaço externo.....	51
Figura 6 - Fluxograma do processo de produção de ração peletizada com melaço externo .....	88
Figura 7 - Umidade relativa e temperatura ao longo do armazenamento .....	93

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Ácidos orgânicos e concentrações testadas .....	48
Tabela 2 - Concentrações dos ácidos orgânicos combinados .....	49
Tabela 3 - Tratamentos e concentrações de ácidos orgânicos para o teste de estabilidade .....	51
Tabela 4 - Concentrações dos ácidos orgânicos combinados .....	75
Tabela 5 - Contagem total de bolores e leveduras em amostras de milho e ração peletizada .....	76
Tabela 6 - Concentração inibitória mínima (CIM) dos compostos antimicrobianos testados contra <i>Aspergillus flavus</i> NRRL 3251 ( $10^4$ esporos.mL <sup>-1</sup> ) e pH .....	76
Tabela 7 - Concentração inibitória mínima (CIM) e índice da concentração fracionária inibitória (ICFI) para controle de <i>Aspergillus flavus</i> NRRL 3251 ( $10^4$ esporos.mL <sup>-1</sup> ) e pH.....	79
Tabela 8 – Custo relativo da combinação de ácidos orgânicos de sorbato de potássio em relação ao ácido propiônico comercial. ....	81
Tabela 9 - Tratamentos e concentrações de ácidos orgânicos para o teste de estabilidade .....	87
Tabela 10 - Contagem total de bolores e leveduras ração ao longo do armazenamento .....	90
Tabela 11 - Atividade de água ração ao longo do armazenamento .....	91
Tabela 12 - pH ração ao longo do armazenamento .....	96
Tabela 13 - Umidade ração ao longo do armazenamento .....	98
Tabela 14 - Acidez na ração ao longo do armazenamento .....	99

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIações

Aa	Atividade de água
AA	Ácido acético
AL	Ácido láctico
AAM	Aditivos anti-micotoxinas
AF	Aflatoxina
AFB <sub>1</sub>	Aflatoxina B <sub>1</sub>
AFM <sub>1</sub>	Aflatoxina M <sub>1</sub>
AFs	Aflatoxinas
AOs	Ácidos orgânicos
AP	Ácido propiônico
IAL	Instituto Adolfo Lutz
pH	Potencial hidrogeniônico
pKa	Constante de dissociação
SP	Sorbato de potássio
UFC	Unidade formadora de colônia
UR	Umidade relativa

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>14</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>16</b>
2.1	OBJETIVO GERAL .....	16
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	16
<b>3</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	<b>17</b>
3.1	RAÇÃO .....	17
3.2	MATÉRIA-PRIMA .....	17
3.2.1	Milho .....	18
3.2.2	Farelo de soja e de trigo .....	19
3.2.3	Aditivos .....	20
3.3	PROCESSAMENTO DE RAÇÃO .....	20
3.4	CONTAMINAÇÃO FÚNGICA .....	22
3.4.1	<i>Aspergillus flavus</i> .....	24
3.4.2	Aflatoxinas .....	25
3.4.3	Efeitos do processamento para aflatoxinas .....	27
3.5	CONTROLE DE AFLATOXINAS .....	28
3.5.1	Controle físico .....	29
3.5.2	Controle biológico .....	30
3.5.3	Controle químico .....	32
3.6	ÁCIDOS ORGÂNICOS E SEU USO COMO ANTIFÚNGICO .....	33
3.6.1	Ácido propiônico .....	34
3.6.2	Ácido acético .....	35
3.6.3	Ácido sórbico .....	36
3.6.4	Ácido láctico .....	37
3.6.5	Combinações de ácidos .....	37
3.7	ESTABILIDADE AO LONGO DO ARMAZENAMENTO .....	38
3.7.1	Estabilidade de rações .....	40
3.7.2	Estudo de estabilidade para controle fúngico .....	42
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>44</b>
4.1	AMOSTRAGEM .....	45
4.1.1	Milho e ração para caracterização sanitária .....	45
4.1.2	Ração peletizada para teste de estabilidade .....	45
4.2	CONTAGEM TOTAL DE BOLORES E LEVEDURAS .....	45
4.3	DETERMINAÇÃO DE AFLATOXINA .....	46
4.4	DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) DOS COMPOSTOS ANTIFÚNGICOS .....	46
4.4.1	Preparo do inóculo .....	46
4.4.2	Preparo das concentrações dos compostos antifúngicos .....	47
4.4.3	Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) da combinação de ácidos orgânicos .....	49
4.5	APLICAÇÃO DOS ÁCIDOS ORGÂNICOS NAS RAÇÕES PELETIZADAS COM MELAÇO EXTERNO .....	49
4.6	DETERMINAÇÃO DA ESTABILIDADE DE RAÇÕES PELETIZADAS COM MELAÇO EXTERNO .....	52
4.6.1	Contagem de bolores e leveduras .....	52
4.6.2	Determinação do pH .....	53
4.6.3	Determinação da acidez .....	53
4.6.4	Determinação de umidade .....	53
4.6.5	Determinação da atividade de água .....	54

4.7	TRATAMENTO DOS DADOS .....	54
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>55</b>
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>72</b>
	ARTIGO 1 – SINERGISMO DE ÁCIDOS ORGÂNICOS E SORBATO DE POTÁSSIO PARA CONTROLE DE <i>Aspergillus flavus</i> TOXIGÊNICO. ....	73
	ARTIGO 2 – ESTABILIDADE DE RAÇÕES PELETIZADAS COM MELAÇO EXTERNO UTILIZANDO COMBINAÇÕES DE ÁCIDOS ORGÂNICOS E SAL.....	85
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>106</b>
<b>7</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>106</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O aumento das exigências nutricionais aliada as necessidades de melhoria da eficiência alimentar, faz com que as indústrias de rações busquem incessantemente ter um maior controle nutricional, fornecendo rações balanceadas à base de grãos e cereais (SALMAN; OSMARI; SANTOS, 2011). No processamento de rações, a peletização permite a redução da carga microbiana, possibilita o consumo mais uniforme e melhor conversão alimentar (AGUIAR, 2014; ANDRADE et al., 2016). Alternativamente, para melhorar a palatabilidade e enriquecer nutricionalmente, é adicionado melaço externo aos *pellets* de ração. No entanto, por ser higroscópico, o melaço pode elevar a umidade quando em contato com os *pellets* que estão envoltos, favorecendo o desenvolvimento de bolores (GONÇALVES; BORGES; FERREIRA, 2009).

As indústrias processadoras de rações buscam constantemente novas tecnologias para obter produtos que tenham maior tempo de prateleira, assegurando sua qualidade, principalmente no que se refere à contaminação fúngica, visto que, os fungos comprometem a qualidade do produto, causando deterioração, perdas nutricionais, alterações das características sensoriais, rejeição do alimento e queda da produtividade do animal (BRITO et al., 2013). Além disso, algumas espécies fúngicas podem produzir micotoxinas, com riscos à saúde humana e animal (DENLI, 2015; FREIRE, et al., 2007; ZAIN, 2011;).

Entre as micotoxinas destacam-se as aflatoxinas produzidas pelo metabolismo secundário, principalmente das espécies de *Aspergillus flavus* e *A. parasiticus*. As condições climáticas do Brasil favorecem o desenvolvimento fúngico e a produção de micotoxinas. A aflatoxina B<sub>1</sub> é a micotoxina de maior prevalência e também a de maior toxicidade sendo condições ideais para sua produção umidade relativa em torno de 85 % e temperatura acima de 27 °C (MALLMANN et al., 2013).

As ações empregadas para prevenir a contaminação fúngica ou retardar a deterioração de alimentos compreendem a combinação de fatores como redução do pH, tratamento térmico e o uso de antimicrobianos (RYDLO; MILTZ; MOR, 2006). Existem no mercado inúmeras substâncias químicas com ação antifúngica. Produtos à base de ácidos orgânicos são cada vez mais utilizados pelas indústrias para garantir a qualidade e aumentar a vida de prateleira dos alimentos, pois são considerados simples, rápidos, baratos e eficientes (BELLAVIER; SCHEUERMANN, 2005).

Entretanto, as pesquisas são limitadas no que se refere a estudos de estabilidade de rações peletizadas, e mais especificamente, com melaço externo com aplicação da combinação de ácidos orgânicos para controle do desenvolvimento fúngico. Portanto, no presente trabalho, objetivou-se avaliar o efeito da combinação de ácidos orgânicos para o controle do desenvolvimento fúngico e estudar a estabilidade de rações peletizadas com melaço externo.



## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito da combinação de ácidos orgânicos no controle fúngico para a melhoria da estabilidade de rações peletizadas com melaço externo.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o nível de contaminação fúngica e de aflatoxina B<sub>1</sub> em milho e ração peletizada de uma indústria processadora de ração;
- Determinar *in vitro* a concentração inibitória mínima (CIM) dos ácidos propiônico, acético, láctico e de sal sorbato de potássio no controle do desenvolvimento de *Aspergillus flavus* aflatoxigênico;
- Determinar *in vitro* a concentração inibitória mínima (CIM) da combinação dos ácidos acético, láctico, propiônico e de sal sorbato de potássio para controlar o desenvolvimento de *A. flavus* aflatoxigênico.
- Aplicar as melhores combinações de ácidos orgânicos em rações peletizadas com melaço externo para avaliar a estabilidade destas rações.

### 3 REFERENCIAL TEÓRICO

#### 3.1 RAÇÃO

A Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação (FAO) estima que até 2050 a produção de proteínas animais crescerá em média 1,7 % ao ano. Sendo que, a produção de carne e leite atingirá um aumento em torno de 70 e 55 %, respectivamente (INTERNATIONAL FEED INDUSTRY FEDERATION - IFIF, 2015).

A produção mundial de rações em 2015 ficou próxima de 1 bilhão de toneladas, sendo a China o maior produtor, seguido dos Estados Unidos e Brasil. A produção nacional de rações foi de 66,8 milhões de toneladas em 2016. Desta produção, 29 milhões de toneladas de ração foram destinadas ao setor de aves de corte e 6 milhões de toneladas ao setor de gado leiteiro (IFIF, 2015; SINDIRAÇÕES, 2016).

O fornecimento de ração com ingredientes equilibrados deve garantir a produtividade, qualidade dos produtos e o bem-estar dos animais (FAO, 2017). Independente do setor, carne, leite ou ovos, a ração representa cerca de 70 % do custo total da produção. Sendo assim, um rigoroso controle de qualidade faz-se necessário na produção de rações, pois variações no desempenho dos animais, devido ao consumo de rações de má qualidade pode ser um dos principais fatores responsáveis por prejuízos na produção animal (BUTOLO, 2010).

#### 3.2 MATÉRIA-PRIMA

Devido ao alto valor energético, os grãos de cereais constituem as principais matérias-primas utilizadas para produção de ração. No Brasil, o setor consome aproximadamente 65 e 45 % da produção nacional de milho e farelo de soja (BUTOLO, 2010). Além desses grãos, são utilizados para alimentação animal, subprodutos provenientes da panificação, grãos de destilados secos (da produção de bebidas e etanol industrial), farinhas e cascas de soja e algodão (do processamento de óleo vegetal), melaço (da produção de açúcar) e peles de amendoim (TURLINGTON, 2014).

### 3.2.1 Milho

O milho (*Zea mays*) é classificado como um dos alimentos mais energéticos para o consumo humano e animal, constituindo um dos principais macro componentes da ração animal. Sua composição em base seca é de cerca de 72,0 % de amido, 9,5 % de proteína, 9,0 % de fibra e 4,0 % de lipídeos, sendo carente de aminoácidos essenciais como a lisina e triptofano (LANA, 2007; PAES, 2006).

Os grãos de milho normalmente são colhidos com umidade excessiva, entre 25 e 30 %, tendo que ser submetido ao processo de secagem após a limpeza, visando reduzir o teor de umidade a níveis de armazenamento seguros, ou seja, menor que 14 % (PIMENTEL; FONSECA, 2011). A Instrução Normativa nº 60 do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento estabelece como padrão de qualidade para comercialização de milho grão, percentual de umidade inferior a 14 % (BRASIL, 2011).

O excesso de umidade nos grãos reflete a perda de qualidade devido à combinação de outros fatores, como temperatura, umidade relativa do ar, que favorecem o desenvolvimento de fungos e insetos e a perda da qualidade nutricional (LORINI; MIIKE; SCUSSEL, 2002; GONÇALVES; BORGES; FERREIRA, 2009). O controle do desenvolvimento fúngico preconiza temperatura de armazenamento entre 17 a 22 °C e umidade relativa inferior a 30 % (SILVA; FILHO; DEVILLA, 2000).

O processamento industrial do milho envolve moagem seca ou úmida. No processo de moagem úmida, o milho é separado em classes de amido, proteína, gérmen, óleo e fibra, necessitando de processamento complementar antes do consumo (GWIRTZ; CASAL, 2014). A partir da moagem úmida, dois principais subprodutos são utilizados para alimentação animal: o farelo de glúten de milho, que possui alto valor digestivo e proteico, e o farelo proteico de milho, composto principalmente pelas fibras digestíveis do grão de milho e parte do glúten (MENEGHETTI; DOMINGUES, 2008).

A moagem seca possui como principal diferencial, a não utilização de água nos processos de redução e separação da granulometria. Constitui processos como quebra, moagem, tostagem e peletização (HALE, 1973), nas quais são obtidos diversos componentes granulométricos do milho, como canjica, *grits*, fubá, farinha e creme de milho e fibras (WEIGEL; LOY; KILMER, 2005).

Em fábrica de rações, os processos mais utilizados são a moagem a seco em moinhos de martelo, onde o atrito reduz o tamanho das partículas até que ele passe

através de uma peneira, e proporciona alterações importantes na digestibilidade do amido e da proteína (ENSMINGER; OLDFIELD; HEINEMANN, 1990), e a peletização que consiste em submeter o produto farelado em uma estrutura firme, chamada de *pellet* através de temperatura (70 a 90 °C) e pressão, melhorando a digestibilidade do alimento (LARA et al., 2008; THOMAS; ZUILICHEM; POEL, 1997).

### 3.2.2 Farelo de soja e de trigo

As matérias-primas utilizadas na formulação de rações para ruminantes são abrangentes, mas exclusivamente de origem vegetal, tendo como principais fontes grãos, cereais e seus respectivos subprodutos como farelos de soja e de trigo (GONÇALVES; BORGES; FERREIRA, 2009).

A soja (*Glycine max*) pode ser utilizada na alimentação animal em sua forma integral processada, para inibir os fatores antinutricionais, e também através do farelo de soja (BUTOLO, 2010; GU et al., 2010).

O farelo de soja é o subproduto resultante da industrialização da soja, para a obtenção de óleo, é um alimento de alta aceitabilidade pelos animais e pode ser utilizado como fonte única de proteína em rações (THIAGO; SILVA, 2003). A casca de soja também é utilizada para alimentação animal, por ser composta de fibra de alta digestibilidade (IPHARREGUERRE; CLARK, 2003).

Os produtos obtidos a partir da moagem do trigo requerem atenção desde a colheita, até o armazenamento, para que obtenham a qualidade esperada (VIEIRA, 2006). Dentre os subprodutos do trigo, o farelo de trigo é obtido no processamento industrial do grão. É constituído de pericarpo, aleurona, fragmentos de gérmen e uma fração pequena de grãos. É o principal e mais importante subproduto da moagem de grãos, rico em fibra e proteína, de baixa densidade e energia (COMPÊNDIO, 2013).

As matérias-primas utilizadas na formulação de rações estão sujeitas a danos e alterações durante o seu armazenamento, seja em decorrência do armazenamento no fornecedor, ou na fábrica. Essas perdas são resultantes do ataque de insetos e pragas, microrganismos, além de processos físicos e químicos que comprometem a qualidade e segurança do produto (FAO, 2017).

### 3.2.3 Aditivos

Ingredientes aditivos são adicionados na ração visando garantir que os nutrientes sejam mais bem aproveitados pelos animais. A adição desses compostos em quantidades e concentrações ideais objetivam um melhor balanceamento e melhoria nas características do alimento, ou do desempenho zootécnico, de forma que não sejam prejudiciais aos animais e não contaminem o meio ambiente (SOUZA; SILVA, 2008; BUTOLO, 2010).

Nesse contexto, a Instrução Normativa 13/2004 do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, regulamenta e classifica os aditivos em tecnológicos, sensoriais, nutricionais, zootécnicos, anti-coccidianos e agonistas. Os aditivos tecnológicos e sensoriais são utilizados pelo setor industrial, para melhorar ou alterar as propriedades organolépticas e características visuais do produto, e os aditivos nutricionais são utilizados para manter as propriedades nutricionais (MOURÃO et al., 2012; BRASIL, 2004).

O melaço é um elemento de elevada palatabilidade, saborizante muito utilizado em fábricas de rações comerciais. É um líquido viscoso, de cor marrom-escura, denso, que contém em torno de 75 % de matéria seca e 50 % de açúcares e sacarose, possui boa digestibilidade, rico em fontes de hidratos de carbono e sais minerais (KIRCHOF, 2005). Além de ser um componente altamente energético, este subproduto da indústria de açúcar é empregado como aditivo sensorial, fazendo parte das formulações principalmente destinadas a bovinos e equinos, que têm preferência a alimentos doces. Pode ser adicionado diretamente ao misturador das fábricas de rações por possuir propriedades aglutinantes que auxiliam na etapa de peletização (COMPÊNDIO, 2013; PAYNE; RATTINK; WINOWISKI, 2001; GOES; SILVA; SOUZA, 2013).

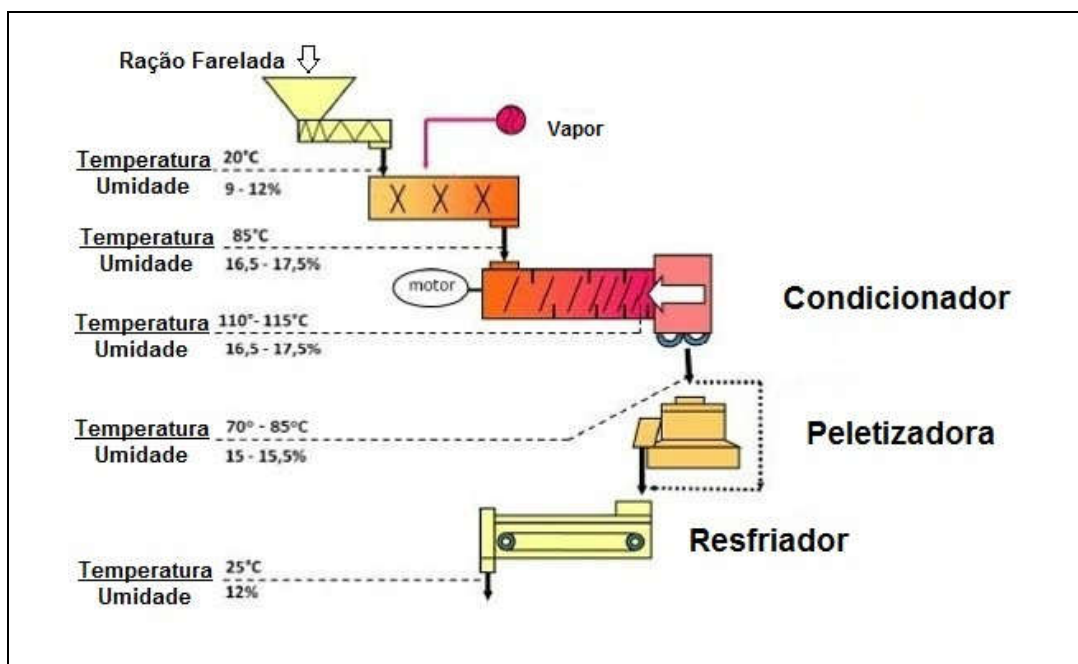
No entanto, devido à higroscopia, quando o melaço é adicionado à ração peletizada, este pode aumentar o teor de umidade do produto, favorecendo a contaminação por fungos e outros microrganismos (GOES; SILVA; SOUZA, 2013).

## 3.3 PROCESSAMENTO DE RAÇÃO

A tecnologia envolvida no processamento de ração visa minimizar a perda de nutrientes formulando produtos mais sofisticados e com maior valor agregado. Os

cuidados na produção de rações têm início na seleção da matéria-prima com padrões de qualidade garantidos (BELLAYER; MAZZUCO, 2013). Além disso, para que as rações apresentem valores nutricionais satisfatórios é indispensável à adição de nutrientes, sais minerais, vitaminas e outros micronutrientes (SALMAN; OSMARI; SANTOS, 2011). Após a formulação, as etapas envolvidas na fabricação de ração são: transporte e armazenamento da matéria-prima, dosagem, moagem, adição dos micronutrientes, mistura, peletização e a expedição granel ou ensacada (FUCILLINI; VEIGA, 2015). A Figura 1 esboça as etapas envolvidas na produção de ração peletizada.

Figura 1 - Processo de fabricação de ração peletizada



Fonte: Modificado de Ferraz (2016).

A mistura dos micro e macro componentes visa garantir o fornecimento de alimentos aos animais com todos os nutrientes estabelecidos para um bom desempenho, conforme previsto na formulação (BELLAYER; NONES, 2000). Após a mistura, a ração pode ser expedida em sua forma farelada sem nenhum processo de umidificação ou térmico (REIS et al., 2012). No caso de ração peletizada, a ração farelada é processada em uma estrutura firme chamada de *pellet*, através de um processo físico-químico, com adição de vapor e pressão (LARA, 2008). A forma física da ração representa uma diversificação do produto com valor agregado, além de influenciar no desempenho zootécnico dos animais (KENNY; ROLLINS, 2008).

Na peletização, o pré-cozimento dos ingredientes promove a gelatinização parcial do amido, plastificação de partículas sólidas e amolecimento das fibras. Estas modificações promovem uma melhora na palatabilidade e digestibilidade e aumento da densidade da ração, resultando em maior consumo, melhor conversão alimentar e menor desperdício (FLEMMING et al., 2002; IWHASHITA, 2014; KLEIN, 2009; MURAMATSU, 2013). Além disso, a ração em *pellets* facilita o transporte e manuseio, eliminando a possibilidade de desmistura no transporte granel (NETO, 2006).

Destaca-se ainda que o tratamento térmico na peletização diminui as perdas e contaminação por microrganismos advindos da matéria-prima. No entanto, o *pellet* quente e úmido é direcionado para o resfriador, resultando em uma evaporação intensa de água devendo essa etapa ser rigorosamente controlada, pois a alta umidade e temperatura podem levar a recontaminação por microrganismos (KLEIN, 2009).

### 3.4 CONTAMINAÇÃO FÚNGICA

Grandes quantidades de alimentos e rações são perdidas anualmente devido à deterioração por fungos (HASSAN; KADI; SAND, 2015). As matérias-primas de origem vegetal utilizadas na fabricação de rações são susceptíveis à contaminação fúngica desde o campo, armazenamento, até seu processamento (HILLMANN et al., 2015; FAO, 2017).

Diversas condições relacionadas ao meio ambiente e às circunstâncias em que os produtos são armazenados influenciam no desenvolvimento de microrganismos nos alimentos. Esses fatores podem ser separados em intrínsecos, associado às próprias características do alimento, e extrínsecos, relacionados ao ambiente em que se encontra (WAREING; STUART; FERNANDES, 2011).

Os principais fatores intrínsecos e extrínsecos para o desenvolvimento de fungos são a umidade do grão ou da ração pronta, atividade de água (Aa), umidade relativa (UR) e potencial hidrogeniônico (pH) (QUEIROZ et al., 2005; FRANCO, 2008). Em sua maioria, fungos filamentosos e leveduras suportam faixas de pH baixas, podendo se desenvolver em faixas de 3,0 a 6,8 (FRANCO, 2008). Quando estocados em ambientes com UR superior à sua Aa, os produtos possuem predisposição a incorporar a umidade do ambiente, aumentando a Aa e favorecendo o crescimento fúngico (AZEREDO, 2012).

A contaminação por bolores pode acarretar em prejuízos econômicos na indústria alimentícia, estando relacionadas à redução de nutrientes, alterações de sabor e odor, além do risco de produção de micotoxinas (SCUSSEL, 2002; PEREIRA et al., 2005).

A legislação brasileira não estabelece limites máximos para contaminação fúngica e nem limite máximo tolerado em ração animal. De acordo com o padrão utilizado nos Estados Unidos e em países da União Europeia para certificação de ração animal (GOOD MANUFACTURE PRACTICE - GMP, 2008), recomendam-se contagens inferiores a 4 Log UFC/g.

Os fungos presentes nos grãos e cereais são classificados conforme suas necessidades de água em duas categorias: fungos de campo e fungos de armazenamento. Os fungos de campo atacam as sementes no campo e requerem, para o desenvolvimento elevada umidade relativa do ar (70 - 90 %) e altos teores de umidade nos grãos (20 - 21 %). Neste grupo, predominam os gêneros *Alternaria*, *Cladosporium*, *Helminthosporium* e *Fusarium*. Já os fungos de armazenamento, são encontrados em armazéns, moinhos, silos, moegas, equipamentos, etc. Neste grupo, os principais representantes são os gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*, que requerem teores de umidade entre 13 e 18 % (ALMEIDA et al., 2005; MÁRCIA; LÁZZARI, 1998; DICONSTANZO; MURPHY, 2012).

O armazenamento em condições de atividade de água (Aa) menor que 0,69, controle da temperatura e aeração eficientes, devem garantir o controle do crescimento fúngico e da produção de micotoxinas durante o período de estocagem (MÁRCIA; LÁZZARI, 1998; MALLMANN; DILKIN; MALLMANN, 2014). No entanto, a recontaminação por microrganismos durante o armazenamento é um grande problema para a indústria processadora de alimentos. Esporos de fungos, que são resistentes a processamentos severos, podem permanecer dormentes no alimento processado até que condições mais favoráveis permitam sua proliferação (FAO, 2017).

A ração contaminada torna-se menos palatável, levando a redução da ingestão de nutrientes e da digestibilidade em ruminantes, comprometendo os níveis de produção de leite, ganho de peso, além de tornar o animal menos resistente a doenças infecciosas (OMAFRA, 2013; ADAMS et al., 2017). Embora a incidência de fungos na ração não constitua fundamentalmente a presença de micotoxinas, altas contagens de algumas espécies fúngicas são apontadas como indicativo da possível



contaminação por micotoxinas no alimento (PEREIRA; CARVALHO; PRADO, 2002; FAO, 2004).

A qualidade da dieta dos animais e das matérias-primas utilizadas na produção de rações constitui uma preocupação de saúde pública em virtude da probabilidade de produção de micotoxinas, prejudiciais à saúde humana e animal (MOTTA et al., 2015). As principais micotoxinas de ocorrência no Brasil são aflatoxinas, fumonisinas, zearalenona e desoxinivalenol, produzidas principalmente pelos gêneros *Aspergillus* e *Fusarium* (PATERSON; VENÂNCIO; LIMA, 2004; MALLMANN; DILKIN; MALLMANN, 2014; PEREIRA et al., 2005; ROSA et al., 2006).

A maior parte das toxinas é termo resistente e mantém sua toxicidade, mesmo após a etapa de peletização de rações (CRUZ, 2010). Rações contaminadas por micotoxinas diminuem o desempenho e afetam a condição de saúde do animal, causam redução da produtividade, vulnerabilidade a infecções e doenças e, em casos mais graves, a mortalidade. Os alimentos produzidos pelos animais como carne, leite e ovos podem conter resquícios de micotoxinas causando danos também à saúde do homem (KAWASHIMA; SOARES; MASSAGUER, 2002; FAO, 2010).

#### 3.4.1 *Aspergillus flavus*

Os fungos do gênero *Aspergillus* são caracterizados pela produção de esporos assexuais, e se desenvolvem em colônias coloridas e brilhantes, sendo amplamente distribuído na natureza. *A. flavus* se apresenta em colônias com colorações verdes e amarelo-oliva, podendo ocasionalmente apresentar coloração amarelo puro (KLICK; PITT, 1988; PITT; HOCKING, 1997). São encontrados principalmente em grãos, cereais, sementes oleaginosas e demais alimentos armazenados, sendo milho e algodão as culturas mais atingidas e economicamente mais importantes (GEISEN, 2000; RODRIGUES et al., 2007; MARTINS; MARTINS; GIMENO, 2003; SINGH; SINGH; SINGH, 2005; PITT; HOCKING, 2009).

A temperatura é uma das condições determinantes para o crescimento de fungos e a produção de micotoxinas. *A. flavus* é considerado de clima tropical, se desenvolve melhor sob temperaturas na faixa de 24 a 40 °C, com uma temperatura ótima de crescimento de 35 °C (DANTIGNY et al., 2005; KLICK, 2007). Taniwaki e Silva (2001) relatam que a temperatura mínima e máxima de crescimento de *A. flavus* é próxima de 12 e 48 °C, respectivamente.

Devido às características de fungo de armazenamento, *A. flavus* possui a capacidade de se desenvolver com umidade relativa do ar – UR mínima de 80 e máxima de 90 %, sendo variável de acordo com outros fatores como temperatura do ambiente (CAST, 2003; SCUSSEL, 1998), e umidade do produto, cujos níveis de desenvolvimento variam de 13 a 18 % (PEZZINI; VALDUGA; CANSIANI, 2005; RUPOLLO et al., 2006).

A atividade de água mínima necessária para o desenvolvimento de *A. flavus* é de 0,71, com valor ótimo de 0,98 (INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS - ICMSF, 1996; KOZAKIEWCZ; SMITH, 1994). Em relação ao pH, *A. flavus* se desenvolve em faixas que variam de 2 a 11. Em faixa de pH 3,0 a 8,0 são pouco afetados pelas alterações de pH, mas a velocidade de crescimento é reduzida gradativamente, quando distanciam-se do pH ótimo (próximo a 5). Além disso, se houver outros fatores que possam intervir, como temperatura e atividade de água, sua velocidade de crescimento também será mais ou menos acentuada (TANIWAKI; SILVA, 2001).

Assim, devido às suas características, *A. flavus*, além de ser um contaminante comumente presente em matéria-prima de rações, o risco maior decorre da contaminação por aflatoxina, que pode ocorrer durante a pré e pós-colheita (EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY – EFSA, 2007).

### 3.4.2 Aflatoxinas

As aflatoxinas (AFs) são metabólitos secundários, produzidas principalmente por *A. flavus*, *A. parasiticus* e *A. nomius* (MOSS, 1998; FRISVAD et al., 2007). A taxa e o grau de contaminação dependem de diferentes fatores, tais como temperatura, umidade, atividade da água, microbiota concorrente, danos físicos e outras condições de armazenamento (EFSA, 2007).

No Brasil, o clima quente e úmido e a falta de desenvolvimento tecnológico para as técnicas de plantio, colheita, secagem e armazenamento dos produtos agrícolas proporcionam condições propícias à proliferação de fungos produtores de AFs (COLAÇO et al., 1994). As condições que influenciam a produção de AFs podem ser separadas em três categorias: física, nutricional e biológica (GOURAMA; BULLERMAN, 1995).

Os alimentos mais suscetíveis a aflatoxinas, em geral, são cereais, principalmente milho, algodão, amendoim, farelo de arroz, e a maioria dos cereais processados pós-colheita em regiões tropicais e subtropicais, com temperaturas elevadas e alta umidade relativa (FAO, 2010).

A atividade de água necessária para o desenvolvimento de AF está entre 0,82 a 0,99, estando de 0,95 a 0,99 níveis ótimos (ICMSF, 1996). Em condições de umidade de 25 % a 30 °C, com umidade relativa entre 83 e 88 %, a AF atinge seu ponto máximo de produção em alimentos (DIENER; DAVIS, 1996). De acordo com o ICMSF (1996) os limites de crescimento para a produção de AF é de 13 a 37 °C, tendo temperatura ótima nas faixas de 16 a 31 °C.

O pH ideal para a produção de AF, depende da composição do meio em que se encontra (BUCHANAN; AYRES, 1975). Gourama e Bullerman (1995), observaram uma maior produção de AF em pH entre 4 e 6, e que pH menor que 6 favorece a produção da AFB<sub>1</sub> e AFB<sub>2</sub>, e pH maior que 6, favorece a produção de AFG<sub>1</sub> e AFG<sub>2</sub>.

Assim como o crescimento de fungos, a produção de AF ocorre em processo aeróbio (JARVIS, 1971). Por essa razão, a produção de AF é inibida em concentração de CO<sub>2</sub> de 40 a 60 % a 25 °C e 86 % de UR. Em concentração de 20 % de CO<sub>2</sub> já não há mais formação de micotoxina, apenas o desenvolvimento fúngico, e com 100 % de CO<sub>2</sub>, ocorre total inibição do crescimento de fungos e micotoxinas (SCUSSEL, 1998).

Os principais análogos de AF de ocorrência natural são AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub> e AFG<sub>2</sub>. A nomenclatura B e G são derivadas da fluorescência azul (*Blue*) e verde (*Green*) produzida sob a luz UV, utilizada para sua detecção (CAST; 2003; PILDAIN; VAAMOND; CABRAL, 2004).

A aflatoxina B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>) é a substância mais tóxica e carcinogênica encontrada em alimentos. Possui propriedades mutagênicas, nefrotóxicas, teratogênicas e acarretam encefalopatias, além de ser um imunossupressor natural que afeta humanos e animais (WILLIAMS et al., 2009). O maior problema decorre da ação crônica das AFs no homem, pois promovem distúrbios imunológicos e a manifestação de câncer hepático (AMARAL et al., 2006). A AFB<sub>1</sub> é classificada no grupo 1, carcinógeno ao homem, pela Agencia Internacional para Pesquisa em Câncer – IARC (IARC, 2002).

A AFB<sub>1</sub> pode ser biotransformada no fígado de animais, em vários outros metabólitos tóxicos, tais como aflatoxina M<sub>1</sub> (AFM<sub>1</sub>), que é excretada pelo leite. A taxa de transferência de AFB<sub>1</sub> da ração para o leite de vacas é de cerca de 1,5 %, os

valores podem variar de acordo com o nível de AFB<sub>1</sub> ingerido, produção de leite, saúde do animal e sensibilidade às aflatoxinas (OLIVEIRA et al., 2010).

No Brasil, a ANVISA estabelece os limites máximos toleráveis (LMT) para micotoxinas em alimentos através da RDC nº 7 de 2011 (BRASIL, 2011). A resolução lista e classifica através de seus quatro anexos os alimentos e estabelece os LMT de AFs, fumonisinas, zearalenona, desoxinivalenol, ocratoxina A e patulina. A resolução não especifica um limite para rações, mas determina o limite máximo de 20 µg.kg<sup>-1</sup> para milho, milho em grão (inteiro, partido, amassado, moído), farinhas ou sêmolas de milho. Já a União Europeia, através da Instrução Normativa 2003/100 (REGULAMENTO DA COMUNIDADE EUROPEIA - CE, 2003) estabelece os limites de AFB<sub>1</sub> em produtos destinados à alimentação animal. Para o milho utilizado na fabricação de rações o limite é de 20 µg.kg<sup>-1</sup> e para rações prontas o limite é de 10 µg.kg<sup>-1</sup>.

### 3.4.3 Efeitos do processamento para aflatoxinas

Embora a maioria das micotoxinas seja de difícil remoção, algumas etapas dos processos industriais podem reduzir estes contaminantes (BULLERMAN; BIANCHINI, 2007). A exemplo, a etapa de classificação, através da remoção do material contaminado como grãos quebrados e ardidos, altamente contaminados por fungos, ajuda a reduzir as concentrações de micotoxinas (SCUDAMORE; BANKS; MACDONALD, 2003). Um experimento avaliando a limpeza física, através da separação dos grãos danificados por bolores, mostrou uma redução de 40-80 % dos níveis de AFs em cereais (PARK, 2002).

Um estudo analisando a distribuição dos níveis de AFs em diversas frações de milho (germens, farelos, partículas maiores e menores e rações) mostrou que o processo de moagem não destrói micotoxinas, mas a contaminação pode ser redistribuída e concentrada em determinadas porções da moagem (BRERA et al., 2004). As micotoxinas tendem a concentrar-se nos fragmentos de germens e farelos no processo de moagem (PARK, 2002).

O tratamento térmico exercido durante a peletização da ração auxilia na redução dos níveis de contaminação fúngica. A diminuição irá depender de alguns fatores como temperatura, tempo de condicionamento, umidade e nível de contaminação (MACIOROWSKI et al., 2006).

A extrusão é amplamente utilizada para produção de cereais matinais, lanches, alimentos texturizados e também para rações da linha *pet food*. As temperaturas empregadas neste processo geralmente são superiores a 150 °C, com inclusão de vapor aliada à pressão (FRANCIS, 2000). A estabilidade das micotoxinas no processo de extrusão depende de fatores como temperatura utilizada, tempo de condicionamento, tipo de produto acabado e nível de contaminação (BULLERMAN; BIANCHINI, 2007).

As AFs são muito estáveis e podem resistir a tratamentos térmicos como torrefação, extrusão, peletização e cozimento. Por esse motivo, tornam-se um potencial problema nos alimentos processados (MARIN et al., 2013). As AFs resistem altas temperaturas, requerendo faixas de 267 a 306 °C para sua inativação, temperaturas muitas vezes inviáveis ao processamento de alimentos (JALILI, 2015). A remoção de AFs pelo efeito do processamento em produtos à base de milho foi pesquisada em produto cozido, assado e tratado por vapor. A porcentagem de remoção variou de 50-70 %, sendo dependente de vários fatores: a concentração de AFs, os componentes presentes no alimento, penetração de calor, teor de umidade, pH, fonte de contaminação e condições de processamento (REDDY; RANI, 2004; HWANG; LEE, 2006).

### 3.5 CONTROLE DE AFLATOXINAS

Para prevenir a contaminação fúngica e de micotoxinas em grãos, é de extrema importância que sejam adotadas medidas de prevenção pré-colheita e controle pós-colheita (BETI et al., 1995; DILKIN et al., 2016).

Na pré-colheita, as principais estratégias envolvidas no campo se referem ao desenvolvimento de híbridos adaptados às condições climáticas, locais, fertilidade do solo, controle agrônômico utilizado e maior resistência ao ataque fúngico (GOMES et al., 2002; MALLMANN et al., 2006).

No processo de colheita, é relevante que o grão não seja acometido fisicamente, pois o dano facilitará a contaminação fúngica. Após o recebimento nas unidades armazenadoras, outra etapa significativa é a limpeza dos grãos, pois os resíduos que ficam misturados e grudados, em geral, são portadores de espécies fúngicas com potencial micotoxigênico (MALLMANN et al., 2006).

O clima quente e úmido no Brasil, principalmente na colheita do milho, em que ocorrem mais chuvas, não favorecem a secagem dos grãos (GOMES et al., 2002). Aliada a dificuldade de secagem dos grãos, a armazenagem também contribui para o desenvolvimento fúngico acentuado. O excesso de impurezas causado pela classificação incorreta dos grãos antes de serem armazenados nos silos, aliados a temperaturas elevadas devido à aeração insuficiente, formam pontos de calor dentro do silo, favorecendo a alta prevalência de aflatoxinas como contaminantes frequentes dos cereais no Brasil e em países de clima semelhante (MALLMANN et al., 2006).

A prevenção da contaminação de aflatoxinas pré ou pós-colheita e durante o armazenamento, nem sempre é possível, sendo necessária, a descontaminação antes da utilização de alimentos para animais e humanos. Diversos descontaminantes desempenham um papel importante na preservação da exposição ao efeito tóxico e carcinogênico das aflatoxinas. A descontaminação pode ocorrer por remoção ou eliminação dos produtos contaminados, ou pela inativação das toxinas presentes nos produtos, através de fatores físicos, químicos ou biológicos (KABAK; DOBSON; VAR, 2006; RILEY; NORRED, 1999).

### 3.5.1 Controle físico

Dentre os métodos físicos de descontaminação que podem ser aplicadas no controle ou redução das aflatoxinas estão limpeza, separação por densidade, tratamento térmico, resfriamento, cozimento, uso de adsorventes em rações animais, radiação, etc. (PASTER et al., 1988; RILEY; NORRED, 1999).

A eficiência da radiação gama para eliminar microrganismos tem sido estudada desde o final do século 19. A eliminação completa de aflatoxina em grãos foi observada em doses de 5 a 10 kGy (AZIZ; MOUSSA, 2002).

O efeito da radiação gama foi estudada no crescimento de *Aspergillus flavus* e em amostras de milho na degradação de AFB<sub>1</sub> e AFB<sub>2</sub> em umidade relativa (UR) de 97-99 % e atividade de água (Aa) de 0,88 - 0,94. A radiação gama foi efetiva na redução de *A. flavus* e provocou uma parcial redução dos níveis de AFB<sub>1</sub> e AFB<sub>2</sub>, nas doses de 2 e 5 kGy, e degradação completa a 10 kGy (AQUINO et al., 2005). Em amendoim, a dose de 10 kGy resultou na completa inibição fúngica, e doses de 15 a 30 kGy foram suficientes para destruição de aflatoxina B<sub>1</sub> de 55 a 74 % (PRADO et al., 2003).

Outra alternativa existente no mercado para reduzir os efeitos tóxicos destes metabólitos fúngicos é a inclusão de aditivos anti-micotoxinas (AAM) na dieta dos animais. Os AAM podem ter diversos mecanismos de ação, destacando-se a adsorção, inativação ou favorecendo a biotransformação das micotoxinas. Os aluminossilicato de cálcio e sódio hidratado (HSCAS) são adsorventes cujo potencial adsorvente é gerado pela deficiência em cargas positivas, característica dos aluminossilicatos, que cria um potencial para adsorver compostos carregados positivamente (HUWIG et al., 2001). As bentonitas possuem uma estrutura com maior área de superfície e alta predisposição de troca de cátions do grupo das esmectitas tornando-se eficaz para adsorver substâncias orgânicas (GREGORIO et al., 2014). Devido às características de potencial de ligação com as aflatoxinas, as bentonitas apresentam disposição de adsorver cerca de 95 % das aflatoxinas, estando essa superior à capacidade de adsorver outras micotoxinas como a zeralenona e a ocratoxinas (HUWIG et al., 2001).

Os adsorventes, geralmente são adicionados na alimentação animal em doses que variam de 0,15 a 0,5 % nas dietas (DILKIN et al., 2016; LEITÃO et al., 2016). Como esses adsorventes têm como objetivo prevenir a absorção das micotoxinas no trato gastrointestinal do animal, os mesmos não removem a toxina da dieta. Estudos sugerem que a ingestão de ração contaminada adicionada desses adsorventes, promovam a excreção do composto formado adsorvente-micotoxina pelas fezes (MIL et al., 2015; GREGORIO et al., 2014).

### 3.5.2 Controle biológico

A aplicação de microrganismos para degradar aflatoxinas gerando produtos atóxicos é uma alternativa para o controle dessas toxinas (ALBERTS et al., 2006). Bactérias, leveduras e fungos filamentosos, vêm sendo testados para controle biológico de contaminação por aflatoxinas (RAHAIE et al., 2012).

Entre os inúmeros tipos de microrganismos empregados, as bactérias ácido lácticas (BAL) têm ocasionado bons resultados (ELNEMAZI et al., 1998). Alguns estudos mostram que cepas de *Bacillus subtilis* podem ser capazes de inibir o crescimento de *Aspergillus* e promovem a adsorção de AFB<sub>1</sub> (FOLDES et al., 2000; HAI, 2006).

As bactérias lácticas colaboram para a biotransformação de micotoxinas em metabólitos que não são prejudiciais aos animais e a redução do pH consequentemente inibe o desenvolvimento de esporos fúngicos (ŁAZICKA; ORZECOWSKI, 2010). A atividade inibidora das BAL pode ser decorrente da produção de ácidos orgânicos, dióxido de carbono, etanol, peróxido de hidrogênio, diacetil, reuterina e outros metabólitos, pelo crescimento antagonista e decréscimo do pH acarretado pela produção de ácidos, ou por uma combinação de todos estes fatores (BIANCHINI; BULLERMAN, 2010).

Alguns estudos têm demonstrado que *Saccharomyces cerevisiae* (SC) é um dos microrganismos com maior capacidade de remoção de AFB<sub>1</sub> (SHETTY; HALDE; JESPERSEN, 2007). A inclusão de SC em produtos comerciais como rações peletizadas é conveniente devido à resistência a altas temperaturas e às condições químicas e físicas do trato digestivo dos animais (DEVEGOWDA et al., 1996; PERRY, 1995; BAPTISTA et al., 2004).

A capacidade de ligação de *S. cerevisiae* a aflatoxina foi avaliada em nozes pistache. Os resultados demonstraram que SC possuía capacidade de se ligar à superfície da aflatoxina de 40 a 70 % em concentrações iniciais de aflatoxina de 10 e 20 ppb (RAHAIE et al., 2010).

Avaliou-se a eficácia de quatro diferentes fontes de *Saccharomyces cerevisiae* (SC) em ligar aflatoxinas, *in vitro* (solução tampão fosfato salina em temperatura ambiente, pelos tempos de contato 05, 10, 20 e 30 minutos) e *in vivo* (20 vacas de raça holandesa em estágio médio de lactação por 10 dias) visando à redução da excreção de AFM<sub>1</sub> no leite de vacas leiteiras. A aflatoxina encapsulada foi fornecida aos animais nos 3 primeiros dias, totalizando 480 µg de AFB<sub>1</sub>/dia. Do quarto ao sétimo dia as vacas receberam AFB<sub>1</sub> junto com uma fonte de SC, e do oitavo ao décimo dia as vacas receberam somente fonte de SC, período de detoxificação. No estudo *in vitro* foi possível verificar que a viabilidade celular não é pré-requisito para adsorção e que o tempo de incubação não interfere na capacidade de adsorção de AFB<sub>1</sub>. No estudo *in vivo*, não foi verificado efeito da AFB<sub>1</sub> e nem nas diferentes fontes de biomassa de SC sobre o escore de condição corporal, produção e composição do leite (GONÇALVES et al., 2017).



### 3.5.3 Controle químico

A utilização de conservantes químicos é de suma importância, principalmente em países de clima tropical, que oferecem condições favoráveis de temperatura e umidade para desenvolvimento microbiano. O interesse no uso de conservantes se acentua também, quando as condições de transporte e armazenamento são precárias (RODRIGUES et al., 2016).

O controle químico pode ser realizado desde o campo através da aplicação de fungicidas, inibindo o crescimento fúngico e a produção de micotoxina. No entanto, considerando os efeitos tóxicos destes agentes, os mesmos não devem ser aplicados na indústria. Os métodos químicos são os mais utilizados na indústria alimentícia, por serem mais rápidos e de baixo custo. Podem ser realizados por tratamento com atmosfera modificada (ozônio –O<sub>3</sub>, nitrogênio – N<sub>2</sub>, gás carbônico – CO<sub>2</sub>) e por meio de produtos químicos (compostos orgânicos e inorgânicos) (BORTOLOTTI, 2014).

O efeito dos conservantes BHA (butilhidroxianisol), BHT (hidroxitolueno butilado) (BHT), THB (tri-hidroxibutirofenona) e PP (propil parabeno) em concentrações de 1, 10 e 20 mM foram avaliados para germinação, crescimento e produção de aflatoxina B<sub>1</sub> por *A. flavus* e *A. parasiticus*. Os antioxidantes mais eficientes no controle de crescimento de *A. flavus* foram PP, BHT e BHA, sendo que, quando adicionado 1 mM os antioxidantes PP e BHA inibiram completamente a produção de aflatoxina B<sub>1</sub>. (NESCI; RODRIGUEZ; ETCHEVERRY, 2003).

O gás ozônio (O<sub>3</sub>) foi classificado em 2011 pelo FDA (*Food and Drug Administration*) como seguro para aplicação direta em alimentos. No controle de fungos em alimentos, o O<sub>3</sub> atua na inativação ou inibição do desenvolvimento de inúmeras espécies de fungos em grãos e cereais (RAILA et al., 2006; WU et al., 2006), e não causa alterações na composição nutricional dos alimentos, nem são prejudiciais à saúde humana e animal (KIM; YOUSEF; KHADRE, 2003; MENDEZ et al., 2003; YOUNG et al., 2006). A completa inibição dos fungos *Aspergillus* e *Penicillium* spp. foi observada em grãos de arroz ozonizados na concentração de 5 mg L<sup>-1</sup>, em fluxo contínuo de 13,97 min de exposição (SANTOS et al., 2016).

A fim de evitar a deterioração fúngica, alguns compostos químicos são utilizados como conservantes em alimentos. Os ácidos orgânicos são comumente utilizados na indústria devido as suas propriedades antimicrobianas (STRATFORD et al., 2009).

### 3.6 ÁCIDOS ORGÂNICOS E SEU USO COMO ANTIFÚNGICO

No Brasil, segundo a legislação vigente do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) “Os aditivos são substâncias ou microrganismos adicionados intencionalmente que normalmente não se consomem como alimento, tenha ou não valor nutritivo, que afetem ou melhorem as características do alimento ou dos produtos animais.” (BRASIL, 2004). O uso de aditivos em ração animal é regulamentado pelo Regulamento Técnico sobre aditivos para produtos destinados à alimentação animal - Instrução Normativa nº 13, de 30/11/2004, e Instrução Normativa nº 42 de 16/12/2010, que estabelece os critérios e os procedimentos para a fabricação, fracionamento, importação e comercialização dos produtos isentos de registro, através do anexo IV, que lista os ingredientes e aditivos utilizados na alimentação humana e susceptíveis de emprego na alimentação animal (BRASIL, 2010).

Dentre os aditivos químicos, os ácidos orgânicos (AOs) utilizados na ração animal, tratam-se de ácidos fracos, de cadeia curta (C1-C7) (ADIL et al., 2011). Os AOs são de grande importância em nutrição animal por sua capacidade em reduzir o pH dos alimentos, possuem ação antifúngica e bactericida contribuindo para sua conservação (BELLAYER; SCHEUERMANN, 2005).

O uso de ácidos orgânicos e seus sais para prevenir a contaminação fúngica e a produção de aflatoxinas, é uma das alternativas mais apropriadas a ser utilizadas pelas indústrias, levando em conta a toxicidade apresentada por outros fungicidas, que embora eficazes, apresentam riscos para os animais e humanos (MORENO; RAMÍREZ, 1985).

Os AOs atualmente disponíveis no mercado apresentam-se na forma líquida ou pó, podendo ser oferecidos aos animais via água ou ração. HAYASHI (2012) relata que devido às características dos AOs, também são utilizados na indústria como sanitizantes, aditivo nutricional promotor de crescimento e para o prolongamento da vida de prateleira de produtos após processamento.

Há de se considerar que, como todos os materiais higroscópicos, grãos e rações tendem a ganhar ou perder água do ambiente em que estão expostos, e se armazenados em locais quentes, com umidade relativa próxima a 80 % ou mais, propiciam o desenvolvimento fúngico, e risco de produção de micotoxinas. Esse fato destaca a importância do uso de inibidores capazes de impedir o desenvolvimento

fúngico durante o armazenamento de grãos e rações. Infelizmente, as únicas informações disponíveis destes produtos são do tipo comercial (MARTÍNEZ; BADILLO; PARRA, 2000).

Os ácidos orgânicos com eficácia antimicrobiana são preferencialmente ácidos graxos de cadeia curta, produtores de menores quantidades de prótons por molécula ao se dissociarem. Os ácidos mais utilizados são os monocarboxílicos como o propiônico, fórmico, butírico e acético, e os com o grupo hidroxila, como benzóico, láctico, tartárico, cítrico e málico, componentes naturais de animais e plantas (PICKLER et al., 2012).

Os AOs inibem o crescimento dos microrganismos através da entrada nas células e dissociação no seu interior. A acidificação do citoplasma acarreta na inibição do transporte de nutrientes, o pH da célula reduz devido à presença de íons  $H^+$ . A fim de manter a homeostase, a célula bombeia os íons de  $H^+$ , cessando a energia da célula. A perturbação da permeabilidade da membrana pode causar redução na absorção celular de aminoácidos e de nutrientes, e em conjunto com os ânions formados inibir a síntese de componentes da parede celular, DNA, RNA, proteínas e lipídios (JOSAN; YEO, 2010; PIPER et al., 2001). Também ocasionam o aumento da pressão osmótica celular devido aos mecanismos de compensação de carga elétrica, provocando aumento da pressão mecânica sobre a parede do microrganismo, fazendo com que ele se rompa (MACHINSKY et al., 2010).

A utilização de conservantes autorizados pode ser benéfica, na medida em que tais ácidos são eficazes na inibição de fungos e previnem a produção de micotoxinas (FAO, 2010). Além disso, a maioria dos ácidos não tem o seu limite máximo de ingestão diária aceitável para animais estabelecido (BRASIL, 2010). Essas características tornam conveniente o uso destes produtos em rações, tanto como promotores de crescimento na alimentação de aves e suínos como conservantes para ruminantes e demais espécies animais.

### 3.6.1 Ácido propiônico

O ácido propiônico é um ácido orgânico fraco, conhecido também como propanoico (IUPAC) e se apresenta em estado natural, como um dos produtos responsáveis pela digestão da celulose através das bactérias do rúmen. Usado para preservar os alimentos, em faixas de pH próximo a 4,5 é um forte bactericida e

fungicida, agindo principalmente na sua forma não dissociada (pKa 4,88) (LOPEZ; GARCIA; MALO, 2012).

O ácido propiônico é um dos mais eficazes em ação microbiana, em sua forma pura ou em sais de propionato. Quando adicionado às rações, impede o desenvolvimento de fungos e a produção de micotoxinas (HAQUE; CHOWDHURY; AKBAR, 2009). É um antifúngico amplamente utilizado e eficaz para prolongar a vida útil de grãos, cereais e rações, podendo ser adicionado diretamente à formulação da ração (POVERENOV; GRANIT; GABAI, 2013). Os ruminantes são altamente tolerantes à utilização de ácido propiônico em alimentos, uma vez que produzem grandes quantidades de ácidos graxos voláteis (AGV) por fermentação no rúmen (EFSA, 2011).

O ácido propiônico e alguns de seus sais, como o propionato de amônia e o propionato de sódio, reduzem o crescimento de leveduras e fungos filamentosos por afetarem a membrana celular, principalmente a um pH baixo (próximo de 4,5), sendo que o ácido propiônico, assim como o ácido acético, também apresentam a capacidade de inibir o crescimento de certos microrganismos por impedir que estes utilizem os aminoácidos presentes no meio (WOOLFORD, 1984; EKLUND, 1989).

### 3.6.2 Ácido acético

O ácido acético é um ácido monocarboxílico com odor pungente e sabor acentuado, é o principal componente de vinagres de uso doméstico. Altamente solúvel em água, considerado um produto seguro (FDA, 2016; LÓPEZ; GARCIA; MALO, 2012).

Pode ser utilizado como conservante em alimentos e rações sem restrição, incluindo água para beber. A utilização do ácido acético, em geral está associada a uma pré-mistura contendo outros ácidos orgânicos. Além do ácido, também podem ser utilizadas suas formas de sais, em uma proporção de 200 a 2500 mg.kg<sup>-1</sup>, dependendo do pH, teor de umidade, tempo de armazenamento pretendido e a contaminação inicial de microrganismos (EFSA, 2012).

O ácido acético é um ácido natural que se forma através do vinagre, por meio da ação da bactéria *Acetobacter* (PARTANEN; MROZ, 1999). Seus compostos não agem somente preventivamente, mas atuam como sequestrantes, acidulantes e agentes flavorizantes (SMULDERS; GREER, 1998). Sua ação antimicrobiana é maior

para bactérias como *Salmonella*, *E. coli* e *Staphylococcus aureus*, e os fungos do gênero *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus* e leveduras *Saccharomyces* apresentam maior sensibilidade à ação do ácido acético (CONSIDINE; CONSIDINE, 1982).

### 3.6.3 Ácido sórbico

O ácido sórbico e seu sal sorbato de potássio são agentes antimicrobianos utilizados como conservantes predominantemente para evitar o crescimento de fungos filamentosos e leveduras (EFSA, 2014). São compostos comumente utilizados na preservação de alimentos, ração animal, cosméticos e produtos farmacêuticos. Os métodos de aplicação incluem: adição direta no produto, imersão, pulverização, ou pó do produto, ou inclusão através de cápsulas (SMITH; ROLLIN, 1954; MONSANTO, 1979).

O ácido sórbico é relativamente insolúvel em água 0,15 % a 20 °C, dificultando seu uso em alguns produtos. Porém, a sua solubilidade aumenta com o aumento do pH devido à alteração parcial do ácido em seus sais mais solúveis. Dentre os sais, o sorbato de potássio é muito utilizado na conservação de alimentos principalmente pela sua elevada solubilidade em água, que é de 58,2 % a 20 °C (MENDONCA, 1992).

A forma ácida possui maior poder antimicrobiano, enquanto os sais propiciam uma maior solubilidade. Assim, quando utilizado no estado de sal, para manter a mesma capacidade conservante, são necessárias quatro frações de sorbato de potássio para suprir três frações de ácido sórbico (SOFOS, 1989).

Em produtos com a vida de prateleira prolongada, acondicionadas em locais passíveis de recontaminação microbiológica, juntamente com umidade e temperatura ambiente elevadas, são necessários níveis maiores de sorbatos para sua efetiva preservação (SMITH, 2011).

A eficácia do sorbato de potássio decorre essencialmente do pH, sendo mais efetivo para a inibição de bolores em faixas de pH levemente ácidas (pH 5,5-6,0). Em produtos com pH 7,0 o uso do sorbato de potássio como conservante não é suficiente para garantir a segurança microbiológica (GUYNOT et al., 2002).

#### 3.6.4 Ácido láctico

O ácido láctico é um ácido orgânico de grande importância comercial devido à sua vasta aplicação. Pode ser obtido por meio de processo fermentativo com bactérias lácticas ou industrialmente através de síntese química (KISHOR; TRIVEDI; PATEL, 2007).

O ácido láctico é o principal metabólito de bactérias lácticas por acarretar redução de pH no meio, podendo assim causar a inibição de vários microrganismos (MUYNCK et al., 2004). A forma não dissociada, que é mais hidrofóbica, atravessa a membrana dissociando-se no interior da célula e liberando íons H<sup>+</sup> que acidificam o citoplasma (PIARD; DESMAZEAUD, 1991).

O ácido láctico possui uma ampla aplicação na indústria alimentícia como agente acidulante, aromatizante, conservante, antimicrobiano, estabilizador, emulsificador e é considerado seguro pelo *Food and Drug Administration* (FDA). Possui características que aumentam o sabor e aroma dos produtos em que é aplicado. É utilizado em produtos cárneos curados, leites fermentados, picles e produtos marinados, além de refrescos e refrigerantes (THERON; LUES, 2011; ZHANG et al., 2008; GUILHERME; PINTO; RODRIGUES, 2009).

#### 3.6.5 Combinações de ácidos

A utilização de combinações de antimicrobianos pode apresentar um maior efeito sobre vários microrganismos. Há um efeito sinérgico na combinação dos ácidos, que podem tornar a membrana das células mais permeáveis a outros ácidos. Estudos demonstram que a mistura de ácidos apresenta resultados mais eficazes em rações, em comparação com a utilização de um único ácido orgânico (ADDCON et al., 2014; AZEREDO, 2012).

Peláez et al. (2012), determinaram a concentração inibitória mínima (CIM) utilizando a combinação do ácido láctico com o acético, demonstrando um efeito sinérgico entre eles, reduzindo a concentração individual necessária de cada ácido quando misturados, para a inibição de *Aspergillus flavus*.

A combinação de conservantes pode favorecer a sua capacidade de inibição em relação ao composto separado. Quando dois compostos são combinados para conservação de um produto e eles reagem sinergicamente, são necessárias 40 % da

CIM de cada composto utilizado individualmente para atingir 100 % da inibição do microrganismo teste (LIEWEN; MARTH, 1985).

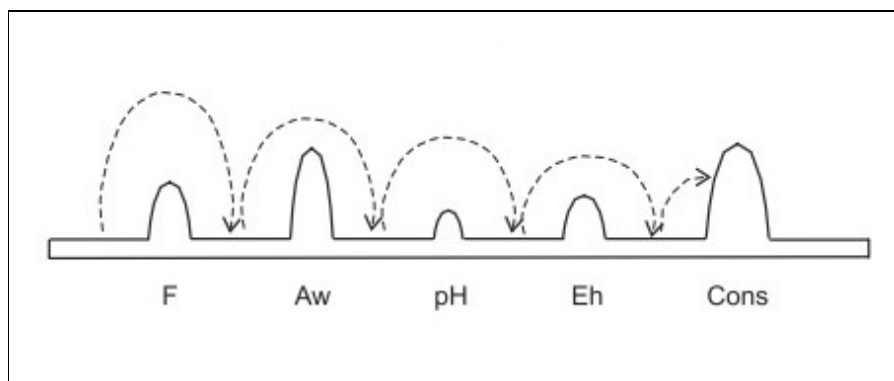
A eficácia das combinações de ácidos orgânicos, bem como a sua capacidade sinérgica devem ser avaliadas em função das características do produto a ser adicionado. A sinergia é comprovada quando a combinação de dois compostos é mais eficaz do que o composto sozinho, ou quando a inibição é maior do que a prevista pela adição do composto sozinho (PERIAGO; PALOP; FERNÁNDEZ, 2001).

### 3.7 ESTABILIDADE AO LONGO DO ARMAZENAMENTO

O *shelf life* é o tempo de vida de prateleira um produto, período que um alimento pode ser armazenado em condições apropriadas mantendo a sua segurança, qualidade e estabilidade. O tempo de vida útil tem início a partir do momento em que o alimento é produzido e depende de vários fatores, como a matéria-prima utilizada, o processo de produção, o tipo de embalagem utilizada e condições de armazenamento (EUFIC, 2013).

O entendimento dos fatores intrínsecos e extrínsecos que atuam sobre os alimentos possibilitam pressupor a sua vida de prateleira e estabilidade microbiológica ao longo do armazenamento. O estudo das interações entre os vários fatores que afetam a capacidade de sobrevivência e de multiplicação dos microrganismos nos alimentos deu origem ao conceito dos obstáculos de Leistner (*Hurdle Theory*), cujo objetivo é a obtenção de produtos estáveis, de prolongada vida de prateleira, e seguros à saúde dos consumidores (FRANCO, 2008). A Figura 2 ilustra a teoria dos obstáculos de *Leistner*, mostrando o efeito da combinação de cinco fatores de estresse.

Figura 2 - Efeito de cinco obstáculos ao crescimento microbiano



Tratamento térmico brando (F); atividade de água (Aw); pH; potencial de oxirredução (Eh); e conservante químico (Cons.).

Fonte: AZEREDO, 2012.

Os alimentos são sistemas ativos, os quais estão suscetíveis a alterações físicas, químicas e microbiológicas. O entendimento das alterações que ocorrem em alimentos é essencial para escolher e otimizar os métodos de conservação a serem usados, a fim de limitar de modo eficaz as alterações responsáveis por sua perda de qualidade (AZEREDO, 2012).

Existem essencialmente dois métodos para a realização de vida útil e estudos de desafio de alimentos. Métodos diretos, armazenam o produto sob condições pré-determinadas por um período maior do que o prazo de validade esperado, verificando o produto em intervalos regulares para determinar quando ele começa a se deteriorar. Esta determinação é feita utilizando uma combinação de testes sensoriais, químicos e microbiológicos de acordo com as características do produto a ser analisado (VALERO et al., 2012).

Outro método para a determinação da vida de prateleira é a utilização de métodos acelerados, que avaliam a estabilidade dos alimentos expostos a condições abusivas de estocagem, a fim de reduzir o tempo requerido para se determinar a vida de prateleira. Para aplicar o teste acelerado é necessário estabelecer quais são as principais alterações que afetarão significativamente o produto, condições de armazenamento e que devem ser usadas como índices de perda de qualidade (AZEREDO, 2012).

A qualidade de grãos de cambre foi avaliada para o armazenamento a longo prazo. Os grãos secos foram armazenados por um período de doze meses e mantidos em três ambientes: Sala climatizada com UR constante (próxima de 80 %); Estufa agrícola, sem controle de ambiente, simulando uma condição de “armazenagem a céu



aberto” e sala não climatizada, sem controle de ambiente, simulando uma condição de “armazém tradicional”. O tempo máximo de armazenamento, 12 meses apresentou níveis inseguros de qualidade para os grãos, independente da embalagem ou ambiente. A câmara climatizada com UR constante apresentou deterioração em todas as condições analisadas, nas embalagens de bolsa hermética e sacaria convencional (BEZERRA et al., 2015).

Os estudos de desafio são utilizados para avaliar se a formulação e as condições de armazenamento de um alimento podem controlar o crescimento de quaisquer agentes deteriorantes presentes durante a vida de prateleira designada. São extremamente importantes para garantir a qualidade dos produtos alimentícios antes da sua liberação para o consumidor final. O procedimento pode envolver a inoculação do produto com microrganismos relevantes, seguido de incubação sob condições ambientais controladas, a fim de avaliar a segurança alimentar, bem como a qualidade. Os fabricantes de alimentos estão sempre interessados em maximizar a vida útil para reduzir custos, e a realização de estudos acelerados auxilia nestes esforços (FDA, 2015; RUMPF, 2007).

### 3.7.1 Estabilidade de rações

Quando um alimento para animal é produzido, sua qualidade precisa ser assegurada até o momento em que será consumido. O prazo de validade das rações pode ser afetado principalmente pelos fatores atividade de água (Aa), umidade, temperatura de armazenamento e ataque microbiológico, especialmente de bolores. Por essas razões, a indústria precisa estar protegida contra todos os tipos de alterações que podem afetar a estabilidade das rações, principalmente as de origem microbiológica, que são as mais frequentes e causadoras de maiores contaminações e prejuízos. Inibidores de bolores à base de ácidos orgânicos são um método naturalmente aceito para aumentar a estabilidade de alimentos para animais. O resultado final é o controle de bolores mais eficaz, com uma vida de prateleira maior e clientes satisfeitos (CARTER, 2014).

Além das rações farelada e peletizada citadas anteriormente (Item 3.3), existem também no mercado as rações extrusadas, cujo processamento proporciona maior estabilidade a vida de prateleira devido às altas temperaturas e pressões á que

são submetidas. As rações extrusadas são classificadas de acordo com o seu processamento (WORTINGER, 2009).

A classificação das rações extrusadas é dividida em úmida, semiúmida e secas. As rações úmidas e semiúmidas são embaladas em sachês ou latas, e sofrem rápida deterioração após abertas. Seu processamento é realizado com uma extrusão mais leve, onde são adicionados conservantes, acidulantes, antioxidantes e umectantes (SANTOS et al., 2012; WORTINGER, 2009). Já as rações extrusadas secas são os alimentos mais vendidos no comércio de *pet foods*, podem ser armazenados por um período maior de tempo, devido sua baixa umidade e a inclusão de aditivos como os antioxidantes, antifúngicos e acidificantes (SANTOS et al., 2012).

Devido ao elevado nível de gordura de algumas formulações, a rancidez oxidativa pode estar presente em produtos acabados, armazenados incorretamente causando redução da palatabilidade, cor, aroma, textura e nutricionais. A rancidez se inicia pela reação do oxigênio nas duplas ligações dos ácidos graxos insaturados que compõe um lipídeo (LIMA, 2013; CONEGLIAN, et al. 2011), essa reação do oxigênio pode produzir peróxidos e radicais livres, que são quimicamente reativos (PUPA, 2004). Quando a ração é acondicionada aberta em locais com elevada umidade e temperaturas, é possível ocorrer o desenvolvimento de peróxidos que leva a produção de radicais livre, álcoois, acetona e aldeídos podendo o alimento ser tóxico ao animal (LIMA, 2013).

Com base em informações comerciais das rações existentes no mercado, no segmento *pet food* e de animais de produção, os prazos de validade variam de acordo com o processamento em que o produto é submetido, conservantes adicionados e embalagem utilizada para o armazenamento. Em geral, rações peletizadas e fareladas possuem prazo de validade de 2 a 4 meses. Por outro lado, rações extrusadas a seco possuem prazos de validade maiores, em torno de 6 a 18 meses, oscilando de acordo com as matérias-primas utilizadas e conservantes.

A Instrução Normativa 15 do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2005) regulamenta os testes de estabilidade para produtos de uso veterinário. Os testes de estabilidade nas rações destinadas a animais de companhia (*pet food*) e de produção são baseados nessa normativa. As metodologias para análises microbiológicas e físico-químicas são realizadas de acordo com IN 62 e Portaria 108 do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2003; BRASIL, 1991).

A estabilidade dos alimentos pode ser avaliada por meio de testes acelerados, no qual são expostos a condições forçadas de armazenagem, como temperaturas elevadas e alta umidade relativa, a fim de minimizar o tempo previsto para se determinar a vida de prateleira (AZEREDO, 2012).

### 3.7.2 Estudo de estabilidade para controle fúngico

Para conduzir um estudo de desafio microbiológico, os fatores pH, umidade, atividade de água e concentração do conservante utilizado podem influenciar o crescimento microbiológico, sendo fundamentais para determinar a estabilidade do produto contra os microrganismos de desafio durante o armazenamento. As alterações nestes parâmetros determinam a vida útil, a estabilidade microbiológica e a segurança do produto (CEYLAN, 2006).

O número de limite necessário para causar deterioração varia de acordo com o tipo de organismo. No Brasil, não há padrões legais para contagem de fungos filamentosos em ração animal, mas, segundo o padrão utilizado nos Estados Unidos e em países da União Europeia para certificação de ração animal, recomendam-se contagens inferiores a 4 Log UFC/g (GMP, 2008), e as indústrias utilizam esses valores como parâmetros, bem como o bolor visível como indicativo para o fim da estabilidade microbiológica.

A tecnologia de obstáculos foi utilizada para prevenir o crescimento fúngico de isolados de *Eurotium*, *Aspergillus* e *Penicillium*, contaminantes comuns de produtos de padaria. Foram testados níveis de (0,003 %, 0,03 % e 0,3 %) de propionato de cálcio, sorbato de potássio e benzoato de sódio, em diferentes condições de pH (4,5 6 e 7,5) e atividade de água (0,80, 0,85, 0,90 e 0,95). O sorbato de potássio mostrou-se ser o conservante mais eficiente quando combinado com os níveis de pH nas faixas de 4,5 a 6 e Aa de 0,80 a 0,85 (MARIN, et al., 2002).

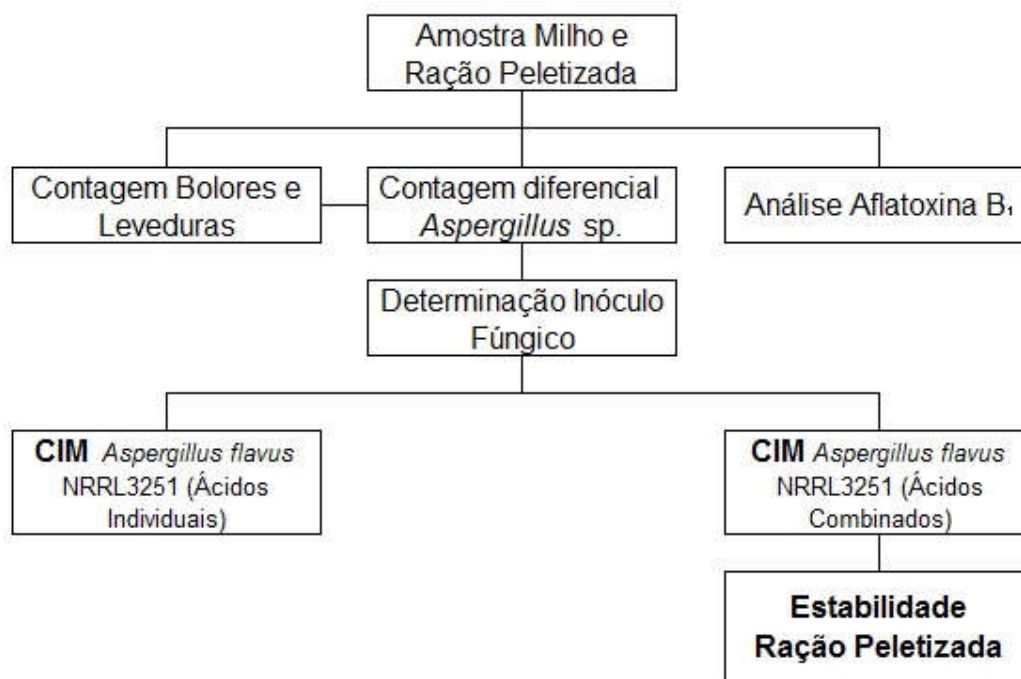
A alimentação animal utiliza em sua produção principalmente grãos e cereais, os quais estão sujeitos a ataque fúngicos desde a colheita, até o seu processamento, comprometendo a segurança e qualidade dos alimentos, principalmente devido ao risco de produção de micotoxinas. Mesmo que algumas etapas do processamento da ração possam reduzir o nível de contaminação, não há prevenção contra a recontaminação, sendo imprescindível o uso de recursos que visem garantir a estabilidade dos produtos ao longo do armazenamento. A aplicação de ácidos

orgânicos como inibidores de desenvolvimento fúngico tem demonstrado bons resultados, no entanto são necessários mais estudos na nutrição animal para determinar as concentrações necessárias individualmente e de forma combinada dos ácidos que sejam economicamente viáveis e eficazes.

#### 4 MATERIAL E MÉTODOS

A Figura 3 representa o fluxograma experimental do trabalho. Inicialmente foi realizada a caracterização sanitária de amostras de milho (matéria-prima) e ração peletizada (produto final) de uma indústria processadora de ração, a fim de determinar a quantidade de inóculo fúngico a ser utilizada para determinação da concentração inibitória mínima de *Aspergillus flavus* NRRL 3251. Foi determinada a CIM dos ácidos orgânicos: acético, láctico, propiônico e sal sorbato de potássio, individualmente para delimitar as concentrações a serem utilizadas para determinação da CIM dos ácidos orgânicos e sal combinados. As melhores concentrações da CIM obtidas nas combinações foram utilizadas para realizar o teste de estabilidade em rações peletizadas com melaço externo.

Figura 3 - Fluxograma experimental do trabalho



Fonte: Autora

## 4.1 AMOSTRAGEM

### 4.1.1 Milho e ração para caracterização sanitária

No período de junho a agosto de 2016, um total de 60 amostras, sendo: 30 amostras de milho e 30 de ração foram coletadas diretamente de uma indústria localizada no centro-sul do Estado do Paraná, para a realização de contagem total de bolores e leveduras e determinação de aflatoxinas a fim de se caracterizar a qualidade sanitária da matéria-prima e da ração, à que se destinou o experimento. As amostras de milho e ração peletizada foram coletadas criteriosamente na mesma sequência de produção, de maneira que o milho coletado na balança de dosagem como matéria-prima, no processo industrial, resultou na mesma batelada de ração produzida coletada no resfriador. Foram coletadas 10 amostras de ração e milho por data de coleta. As amostras foram acondicionadas em pacotes selados e direcionados ao complexo de laboratórios da UTFPR-FB para a realização das análises.

### 4.1.2 Ração peletizada para teste de estabilidade

Para realizar os testes com adição de antifúngicos (Item 4.5) foi necessário coletar as amostras de ração peletizada, anteriormente ao processo de melaceamento externo. No laboratório da UTFPR-FB foram adicionados o melaço e as matérias-primas que o envolvem seguindo criteriosamente a mesma formulação utilizada pela indústria. As amostras de ração peletizada coletadas na indústria foram acondicionadas em pacotes selados, transportadas em caixas de isopor com temperatura inferior a 25 °C, até o complexo de laboratórios da UTFPR-FB. A ração foi processada nas seguintes condições: temperatura no condicionador 80 °C, 4 bar de pressão, condicionamento de 45 segundos, temperatura de saída do resfriador 22 °C.

## 4.2 CONTAGEM TOTAL DE BOLORES E LEVEDURAS

Para determinação de contagem total de bolores e leveduras nas amostras de milho e ração peletizada, empregou-se o método de contagem padrão em placas, determinando o número de unidades formadoras de colônias (UFC) através do

plaqueamento *Pour plate*, seguindo os procedimentos descritos por Silva et al., (2007).

A contagem de bolores e leveduras foi realizada a partir de 10 g da amostra assepticamente triturada e homogeneizada. As amostras foram adicionadas em erlenmeyer contendo 90 mL de solução peptonada a 0,1 %, resultando na diluição  $10^{-1}$ . Procedeu-se a diluição seriada com solução peptonada de  $10^{-1}$  a  $10^{-5}$ . Depois de realizadas as diluições, pipetou-se assepticamente 1 mL do inóculo diluído, em duplicata, em placas de Petri. Em cada uma das placas foram adicionados 20 mL de Ágar Batata Dextrose (BDA) acidificado com ácido tartárico 10 % e homogeneizadas. Após a solidificação do meio, as placas foram incubadas por 7 dias em estufa BOD a 25 °C.

### 4.3 DETERMINAÇÃO DE AFLATOXINA

A determinação de aflatoxinas foi realizada nas amostras de milho e ração peletizada coletadas no período de junho a agosto de 2016. Foi empregada a técnica de fluorimetria em colunas de imunoafinidade - Aflatest®, (VICAM, 2002), e a quantificação através da cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao espectrofotômetro de massa tipo triploquadropolo - UPLC (Acquity UPLC-MS/MS, modelo Xevo TDQ Waters). Coluna: Acquity UPLC BEH C18 (1,7µm, 2,1mm d.i. x 100 mm); Fase móvel A: H<sub>2</sub>O + 0,1 % Ácido fórmico; Fase móvel B: Acetonitrila + 0,1 % Ácido fórmico, utilizando padrão para aflatoxina *Sigma-Aldrich*, concentrações: 2,1; 4,2; 8,4; 16,8; 33,6; 67,2; 106,4 µg.kg<sup>-1</sup> cujo limite de detecção para aflatoxinas é de 2 µg.kg<sup>-1</sup>. As análises foram realizadas pelo laboratório central da empresa onde se desenvolveu o estudo, o qual é certificado pelo Inmetro na norma ISO/IEC 17025, e acreditado para análise de micotoxinas.

### 4.4 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) DOS COMPOSTOS ANTIFÚNGICOS

#### 4.4.1 Preparo do inóculo

A cepa de *Aspergillus flavus* NRRL 3251 foi reativada em placas de Petri contendo meio BDA (Ágar Batata Dextrose), por meio da técnica de estria por

esgotamento em superfície, as placas foram incubadas a 25 °C por 7 dias em estufa BOD. Após o período de incubação foi preparado suspensões de esporos da cepa NRRL 3251 em solução de *Tween* 80 (0,1 %). A contagem dos esporos foi realizada em câmara de Neubauer, através de microscópio ótico (Motic, type 102M).

#### 4.4.2 Preparo das concentrações dos compostos antifúngicos

As concentrações dos compostos orgânicos testados estão apresentadas na Tabela 1. O preparo das soluções testes levou em consideração a pureza do princípio ativo presente no rótulo, e confirmação através de titulações dos ácidos para a correção do percentual real de cada reagente. As concentrações testadas para determinação da concentração inibitória mínima (CIM) basearam-se nos valores sugeridos em literatura, e além destas, foram testadas concentrações superiores e inferiores às recomendadas.



Tabela 1 - Ácidos orgânicos e concentrações testadas

Composto	Concentração (%)	Molaridade (mM)
Ácido Acético CH <sub>3</sub> COOH MM: 60,05 g/mol Princípio Ativo: 97,70 % pKa: 4,75	0,05	8,32
	0,1	16,65
	0,2	33,30
	0,5	83,26
	0,8	133,22
Ácido Lático C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub> MM: 90,08 g/mol Princípio Ativo: 71,35 % pKa: 3,88	0,05	5,55
	0,1	11,01
	0,2	22,20
	0,5	55,50
	0,8	88,80
	1,2	133,21
	1,5	166,51
	1,8	199,82
2,0	222,02	
Ácido Propiônico C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub> MM: 74,08 g/mol Princípio Ativo: 97,12 % pKa: 4,88	0,05	6,74
	0,1	13,49
	0,2	26,99
	0,5	67,49
	0,8	107,99
Sorbato de Potássio C <sub>6</sub> H <sub>7</sub> KO <sub>2</sub> MM: 150,22 g/mol Princípio Ativo: 98,00 % pKa: 4,76 (ácido sórbico)	0,05	3,32
	0,1	6,65
	0,2	13,31
	0,5	33,28
	0,8	53,25
	1,2	79,88
	1,5	99,85
1,8	119,82	
2,0	133,13	

Fonte: Autora

Após o preparo das concentrações foi adicionado 1 mL de cada solução teste em 19 mL de BDA (Ágar Batata Dextrose) seguida de homogeneização. O controle negativo consistiu de 1 mL de água destilada estéril. Uma alíquota de 1 mL da suspensão de *A. flavus* NRRL 3251 foi inoculado *Pour plate* para atingir a concentração final de 10<sup>4</sup> esporos. mL<sup>-1</sup> em placas de Petri contendo BDA acidificado com as soluções testes. As placas foram incubadas em estufa do tipo BOD a 25 °C por sete dias e após esse período foi realizada a leitura para observar o crescimento do *A. flavus*. O pH do meio BDA acidificado com as soluções testes foi determinado em meio liquefeito (temperatura aproximada de 40 °C) em pH metro (Del Lab, modelo DLA-PH) devidamente calibrado.

#### 4.4.3 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) da combinação de ácidos orgânicos

Para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) dos antimicrobianos combinados, foi realizado o mesmo procedimento descrito na seção 4.4.2. As concentrações foram determinadas com base nos resultados obtidos na determinação da CIM dos compostos testados individualmente e também em testes prévios realizados. A Tabela 2 apresenta as combinações dos compostos testados e suas concentrações. Para as combinações do ácido acético com sorbato de potássio, e ácido propiônico com sorbato de potássio, foram incluídos tratamentos adicionais, baseado em resultados prévios da CIM de cada agente.

Tabela 2 - Concentrações dos ácidos orgânicos combinados

		Combinação de ácidos (%)									
AA	AP	AA	SP	AL	SP	AA	AL	AL	AP	AP	SP
0,025	0,025	0,025	0,25	0,40	0,40	0,025	0,40	0,40	0,025	0,025	0,40
0,250	0,025	0,250	0,25	1,00	0,40	0,250	0,40	1,00	0,025	0,10	0,40
0,025	0,10	0,025	1,00	0,40	1,00	0,025	1,00	0,40	0,10	0,025	1,00
0,250	0,10	0,250	1,00	1,00	1,00	0,250	1,00	1,00	0,10	0,10	1,00
0,137	0,062	0,137	0,625	0,70	0,70	0,137	0,70	0,70	0,062	0,062	0,70
Adicionais		0,250	0,10							0,10	0,10
		0,025	0,10							0,025	0,250
										0,025	0,10
										0,10	0,250

AA: ácido acético; AP: ácido propiônico, AL: ácido láctico; SP: sorbato de potássio

Fonte: Autora

#### 4.5 APLICAÇÃO DOS ÁCIDOS ORGÂNICOS NAS RAÇÕES PELETIZADAS COM MELAÇO EXTERNO

Um total de 40 kg de ração peletizada foi fornecido por uma indústria processadora de ração, antes do melaceamento (Item 4.1.2). No laboratório da UTFPR-FB, 2,5 kg de melaço líquido foi aquecido a uma temperatura de 50 °C. As soluções testes foram misturadas, adicionando 0,8 g por 100 g de melaço. As concentrações utilizadas foram determinadas a partir do resultado do teste de concentração inibitória mínima (CIM) das combinações, conforme descrito no item 4.4.3. A Tabela 3 apresenta as concentrações finais aplicadas na ração peletizada com melaço externo.

Foram preparados 07 tratamentos em 3 repetições (Tabela 3) com os ácidos aplicados no melaço. Para cada tratamento procedeu-se o melaceamento externo na ração em um tacho para aquecimento em banho-maria de aço inox, estrutura tubular modelo Ta Oglp/50 com capacidade para 50 litros, tipo basculante, mecanizado, com mexedores internos helicoidais, conforme a Figura 4. Antes de iniciar o processo e entre cada tratamento o equipamento foi higienizado com água e sanitizado com álcool 70 %.

Figura 4 - Tacho para homogeneização da ração



Fonte: RUSCHEL, 2017.

Para conseguir a concentração final desejada, respeitando o volume de antifúngico adicionado pela indústria (8 kg/ton), foi necessário preparar concentrações maiores dos ácidos orgânicos. Para os tratamentos 5 e 6, que são combinações, adicionou-se 0,4 g de cada agente. No tratamento 7, levando em conta a pureza do ácido láctico, foi necessário adicionar 0,8 g de cada agente. As concentrações reais preparadas foram confirmadas através da titulação dos ácidos para a correção do percentual de cada reagente encontram-se na Tabela 3.

Tabela 3 - Tratamentos e concentrações de ácidos orgânicos para o teste de estabilidade

<b>Tratamento</b>	<b>Concentração Preparada (%)</b>	<b>Concentração Final na Ração % (mM)</b>
T1 Controle sem ácido	0	0
T2 Ácido Propiônico Comercial	65	0,5 (67,49)
T3 Ácido Propiônico 1	3,25	0,025 (3,37)
T4 Ácido Propiônico 2	13	0,1 (13,49)
T5 Ácido Propiônico + Ácido Acético	6,5 + 65	0,025 (3,37) + 0,25 (41,63)
T6 Ácido Propiônico + Sorbato Potássio	6,5 + 65	0,025 (3,37) + 0,25 (16,64)
T7 Ácido Propiônico + Ácido Lático	13 + 52	0,1 (13,49) + 0,4 (44,40)

Fonte: Autora

Foram adicionados 86 % de ração peletizada juntamente com 7,5 % de aveia laminada no equipamento e procedeu-se uma pré-homogeneização por 20 segundos. O melaço (6 %) já acidificado foi adicionado a 0,5 % de óleo degomado. A mistura melaço com óleo degomado foi homogeneizada por 15 segundos e adicionada ao equipamento juntamente com os demais constituintes da formulação. Após a adição de todas as matérias-primas a ração peletizada, realizou-se a homogeneização por um período de 180 segundos (Figura 5), logo após foram embaladas em pacotes de polietileno e selados para a realização dos testes de estabilidade.

Figura 5 - Homogeneização das rações com melaço externo



Fonte: Autora

#### 4.6 DETERMINAÇÃO DA ESTABILIDADE DE RAÇÕES PELETIZADAS COM MELAÇO EXTERNO

O teste de estabilidade das rações peletizadas com melaço externo foi realizado com adaptações da IN 15 (BRASIL, 2005), para testes de estabilidade em medicamentos para uso veterinário.

O experimento foi realizado no laboratório da UTFPR-FB, em estufa tipo BOD com temperatura de 30 °C nos primeiros 30 dias e 40 °C por mais 30 dias, totalizando 60 dias do experimento. As amostras foram dispostas em pacotes de polietileno de baixa densidade selados, enumerados aleatoriamente. No interior da BOD, foram adicionados recipientes com água, objetivando aumentar a umidade relativa do ambiente e consequentemente a atividade de água das amostras. A temperatura e umidade relativa foram acompanhadas diariamente com o auxílio de um termohigrômetro (Incoterm, modelo 7663.02.0.00), a partir do 30° dia, foram adicionados mais recipientes com água no interior da BOD para que a umidade relativa chegasse a 80 %.

As análises realizadas nas amostras foram contagem total de bolores e leveduras, atividade de água (Aa) umidade, pH e acidez através dos métodos descritos no Instituto Adolfo Lutz, Portaria 108 e IN 62 do MAPA nos tempos 1, 7, 14, 30, 45 e 60 dias (IAL, 2008; BRASIL, 1991; BRASIL, 2003).

A determinação da estabilidade das rações peletizadas com melaço externo foi estabelecida a partir dos resultados das análises físico-químicas (atividade de água – Aa, umidade, pH e acidez total), e análises microbiológicas (contagem total de bolores e leveduras). Com base nos resultados apresentados, foi avaliada a ação dos ácidos orgânicos sobre a estabilidade das rações nas suas características físico-químicas e microbiológicas.

##### 4.6.1 Contagem de bolores e leveduras

A contagem total de bolores e leveduras nas amostras de ração peletizada com melaço externo adicionadas de antifúngico submetidas ao teste de estabilidade, foram realizadas em laboratório acreditado na ISO/IEC 17025, conforme descrito anteriormente no item 4.2. A determinação foi realizada em duplicata através da IN 62 MAPA (BRASIL, 2003).

#### 4.6.2 Determinação do pH

Para determinação de pH, foi pesado 10 g da amostra e diluída em 100 mL de água destilada. A determinação do pH foi realizada no laboratório da UTFPR-FB em triplicata com pHmetro (Del Lab, modelo DLA-PH) devidamente calibrado com os padrões 4 e 7 (IAL, 2008).

#### 4.6.3 Determinação da acidez

A determinação de acidez nas amostras de ração foi realizada no laboratório LANALI, credenciado pelo MAPA, acreditado na ISO/IEC 17025 e acreditado pela Cgcre (Inmetro) CRL 628, para ensaios microbiológicos e físico químicos. As análises foram realizadas em triplicata de acordo com a Portaria 108, do Ministério Da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 1991). Pesou-se 5 g de amostra e transferiu-se para um erlenmeyer de 250 mL, juntamente com 150 mL de álcool etílico absoluto previamente neutralizado, e deixou-se em repouso por 30 minutos, com agitações ocasionais (5 em 5 minutos). O sobrenadante foi filtrado em papel de filtro para um erlenmeyer de 300 mL, em seguida adicionou-se ao resíduo 100 mL de álcool etílico absoluto previamente neutralizado, deixou-se em repouso por 15 minutos com agitações ocasionais e filtrou-se sobre o mesmo papel de filtro, juntando ao filtrado obtido anteriormente. Procedeu-se a titulação com solução de NaOH 0,1 N, utilizando 4 a 5 gotas de fenolftaleína 1 % até atingir coloração rósea persistente por 30 segundos.

#### 4.6.4 Determinação de umidade

A determinação de umidade foi realizada em triplicata em estufa a 105 °C no laboratório da UTFPR-FB. Em uma balança analítica, foram pesadas 2 g das amostras previamente trituradas e homogeneizadas, em cápsulas de porcelana previamente secas em estufa. Após a pesagem, as amostras foram secas em estufa com circulação de ar na temperatura de 105 °C, até obter peso constante e resfriadas em dessecador (IAL, 2008).

#### 4.6.5 Determinação da atividade de água

Foi realizada determinação da atividade de água nas amostras de ração no laboratório da UTFPR-FB. Cerca de 2 g de amostra previamente triturada e homogeneizada foi introduzida no equipamento, em triplicata, utilizando o aparelho Aqualab (Decagon LITE WP4C) previamente calibrado com os padrões 0,250, 0,500 e 0,760.

#### 4.7 TRATAMENTO DOS DADOS

Os resultados obtidos para a concentração inibitória mínima (CIM) dos ácidos individuais e combinados, bem como os resultados do teste de estabilidade: pH, atividade de água, umidade e acidez foram submetidos a verificação de normalidade através do teste de *Shapiro Wilk*. Em seguida, foi realizada análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey para comparação das médias. Para todos os testes mencionados anteriormente, foi utilizado o intervalo de 95 % de confiança utilizando o *software* STATISTICA TRIAL (STATSOFT INC, 2017).

## REFERÊNCIAS

- ADAMS, R.S. et al. Mold and Mycotoxin Problems in Livestock Feeding. **Dairy & Animal Science**, p.1-16, 2017.
- ADDCON, C.L. et al. **Organic Acids in animal nutrition**. Livro digital, 2014. Disponível em: <[http://www.platform-fefana.org/Website/DOCS/2014\\_08\\_20-BOOKLET-OA.PDF](http://www.platform-fefana.org/Website/DOCS/2014_08_20-BOOKLET-OA.PDF)>. Acesso em: 03 out. 2015.
- ADIL, S. et al. Response of broiler chicken to dietary supplementation of organic acids. **Journal of Central European Agriculture**, v. 12, n. 3, p. 498-508, 2011.
- ALBERTS, J.F. et al. Biological degradation of aflatoxin B1 by *Rhodococcus erythropolis* cultures. **International Journal of Food Microbiology**, v. 109, p.121-126, 2006.
- ALMEIDA, A.P. et al. Milho recém-colhido no Brasil: interação da microbiota fúngica, fatores abióticos e ocorrência de fumonisinas. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v.64, n.1, p.1-9, 2005.
- AMARAL, K. A. et al. Aflatoxinas em produtos à base de milho comercializados no Brasil e riscos para a saúde humana. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.26, n.2, p.336-342, 2006.
- ANDRADE, C.E. et al. Efeitos da granulometria e da forma física da ração sobre o desempenho de frangos de corte. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.68, n.2, p.483-488, 2016.
- AQUINO, S. et al. Evaluation of viability of *Aspergillus flavus* and aflatoxins degradation in irradiated samples of maize. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.36, p. 352-356, 2005.
- AZEREDO, H.M.C. **Fundamentos de Estabilidade de Alimentos**. 2ed. Brasília: Embrapa, 2012.
- AZIZ, N.H.; MOUSSA, L.A.A. Influence of gamma-radiation on mycotoxin producing molds and mycotoxins in fruits. **Food Control**, v.12, p. 281-288, 2002.
- BAPTISTA, A. et al. The capacity of manno-oligosaccharides, thermolysed yeast and active yeast to attenuate aflatoxicosis. **World Journal of Microbiology e Biotechnology**, v. 20, n.5, p. 475-481, 2004.
- BELLAVER, C.; MAZZUCO, H. 2013. **Fábrica de rações**. Agência Embrapa de Informação Tecnológica. Disponível em <[http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/frango\\_de\\_corte/arvore/CONT000fc69luvv02wx5eo0a2ndxyagjbq0z.html](http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/frango_de_corte/arvore/CONT000fc69luvv02wx5eo0a2ndxyagjbq0z.html)>. Acesso em: 20 dez. 2016.



BELLAVER, C.; NONES, K. A importância da granulometria, da mistura e da peletização da ração avícola. In: IV Simpósio Goiano de Avicultura, 2000, Goiânia. **Anais**. Goiânia: [s.n.], p. 1-18, 2000.

BELLAVER, C.; SCHEUERMANN, G. Aplicações dos ácidos orgânicos na produção de aves de corte. In: CONFERENCIA AVISUI, 2005, Florianópolis. **Anais**. Florianópolis: [s.n.], p. 1-16 2005.

BETI J.A. et al. Effects of maize weevils (Coleoptera: *Curculionidae*) on production of aflatoxin B1 by *A. flavus* in stored corn. **Journal of Economic Entomology**, v.6, p.1776-1782, 1995.

BEZERRA, P.H.S. et al. Efeito do armazenamento na qualidade dos grãos e do óleo de crambe para produção de biodiesel. **Revista Energia na Agricultura**, v. 30, n.3, p.310-318, 2015.

BIANCHINI, A.; BULLERMAN, L.B. Biological control of molds and mycotoxins in foods. In: ACS SYMPOSIUM SERIES. **Mycotoxin prevention and control in agriculture**. Washington: American Chemical Society, 2010.

BORTOLOTTI, G.D. **Estratégias de controle e descontaminação do trigo em grãos (*Triticum aestivum* L.) com relação a fungos, micotoxinas e agrotóxicos utilizando compostos químicos e ozônio gasoso**. 2014. 323f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-graduação em Ciências dos Alimentos do Centro de Ciências Agrárias. Universidade federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2014.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº. 13/04**. Regulamento técnico sobre aditivos para produtos destinados à alimentação animal. Diário Oficial da União, Brasília-DF, 1 dez. 2004, Seção 1, p. 1-14.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº. 42/10**. Regulamento técnico para a fabricação, fracionamento, importação e comercialização de produtos isentos de registro. Diário Oficial da União, Brasília-DF, 16 dez. 2010, Seção 1, p. 1-5.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº. 60/11**. Regulamento técnico do milho. Diário Oficial da União, Brasília-DF, 23 dez.2011, Seção 1, p.1-6.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº. 62/03**. Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água. Diário Oficial da União, Brasília-DF, 26 ago.2003, Seção 1, p.1-14.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Portaria N° 108/91**. Métodos Analíticos para Controle de Alimentos para uso Animal. Diário Oficial da União, Brasília-DF, 04 set.1991, Seção 1.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº. 15/05**. Regulamento técnico para teste de estabilidade de produto farmacêutico de uso veterinário. Diário Oficial da União, Brasília-DF, 9 mai.2005, Seção 1, p.1-4.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **RDC nº 7/11**. Regulamento Técnico sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos. Diário Oficial da União, Brasília-DF, 18 fev.2011. Seção 1, p. 66-67.

BRERA, C. et al. Effect of industrial processing on the distribution of fumonisin B<sub>1</sub> in dry milling corn fractions. **Journal Food Protection**, v. 67, p. 1261-1266, 2004.

BRITO, C.B.M. et al. CO<sub>2</sub> production in extruded dry foods for dogs exposed to different moisture levels with and without use of mold. **Ciências Agrárias**, v.34, n.2, p.921-926, 2013.

BUCHANAN JR, R. L.; AYRES, J. C. Effect of initial pH on aflatoxin production. **Applied Microbiology**, v. 30, n. 6, p.1050-1051, 1975.

BULLERMAN, L.B.; BIANCHINI, A. Stability of mycotoxins during food processing. **International Journal of Food Microbiology**, v.119, p.140–146, 2007.

BUTOLO, J.E. **Qualidade de Ingredientes na alimentação animal**. 2.ed. Campinas: Colégio Brasileiro de Nutrição Animal, 2010.

CARTER, T. Innovative Feed Additives for Fine-Tuning Novel Pet Food Formulations. **Revista Pet Food Supplement**, v.13, n.1, p. 26-29, 2014.

CEYLAN, D. 2006. **Coping with Shelf-Life**. Food Quality & Safety. Disponível em: <<http://www.foodqualityandsafety.com/article/coping-with-shelf-life/>>. Acesso em: 01 fev. 2017.

COLAÇO, W. et al. Incidência de aflatoxinas em amendoim e produtos derivados consumidos na Cidade de Recife, no período de 1989 a 1991. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v.54, n.1, p.1-4, 1994.

**COMPÊNDIO BRASILEIRO DE ALIMENTAÇÃO ANIMAL**. 3.ed. São Paulo: Sindirações, 2013.

CONEGLIAN, S.M. et al. Utilização de antioxidantes nas rações. **PUBVET**, v. 5, n. 5, p.1-33, 2011.

CONSIDINE, D.M.; CONSIDINE, G.D. **Foods and food production encyclopedia**. Nova York: Van Nostrand Reinhold Company, 1982.

COUNCIL FOR AGRICULTURAL SCIENCE AND TECHNOLOGY (CAST). **Mycotoxins: risks in plant, animal and human systems**. Task Force Report, Ames, Iowa, USA, n.193, 2003.

CRUZ, J.V.S. **Ocorrência de Aflatoxinas e Fumonisinias em Produtos à base de Milho Utilizado como Ingrediente de Ração para Animais de Companhia, Comercializados na Região de Pirassununga, Estado de São Paulo**. 73f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo. Pirassununga, 2010.

DANTIGNY, P. et al. Basis of predictive mycology. **International Journal of Food Microbiology**, v.100, p.187-196, 2005.

DENLI, M. IMPLICATIONS OF MYCOTOXINS IN LIVESTOCK FEEDS. **Agro Life Scientific Journal**, v.4, n.1, p.52 – 55, 2015.

DEVEGOWDA, G.; ARVIND, B.; MORTON, M.G. *Saccharomyces cerevisiae* and manna oligosaccharides to counteract aflatoxicosis in broilers. In: AUSTRALIAN POULTRY SCIENCE SYMPOSIUM, 1996. **Anais**. v. 8, p. 103-106. 1996.

DICONSTANZO, A.; MURPHY, M. **Strategies for Feeding Mycotoxin and Mold Contaminated Grains to Cattle**. 2012. University of Minnesota: Beef Cattle. Disponível em: <[https://www.extension.umn.edu/agriculture/beef/components/docs/strategies\\_for\\_feeding\\_mycotoxin\\_and\\_mold\\_contaminated\\_grain.pdf](https://www.extension.umn.edu/agriculture/beef/components/docs/strategies_for_feeding_mycotoxin_and_mold_contaminated_grain.pdf)>. Acesso em: 02 fev. 2017.

DIENER, U. H.; DAVIS, N. D. Aflatoxin production by isolates of *Aspergillus flavus*. **Phytopathology Journal**, v. 56, p. 1390-1393, 1996.

DILKIN, P. et al. Testes in vitro, in vivo e registro de aditivos antimicotoxinas. In: 30ª REUNIÃO ANUAL DO CBNA - CONGRESSO SOBRE NUTRIÇÃO DE AVES E SUÍNOS – MICOTOXINAS, 8-10 de Novembro, 2016, Campinas. **Anais**. Campinas: Colégio Brasileiro de Nutrição Animal, 2016.

EKLUND, T. Organic acids and esters in: G. W. Gould (Ed.), **Mechanisms of action of food preservation procedures**. Nova York: Elsevier, 1989.

ELNEMAZI, H. et al. Ability of dairy strains of lactic bacteria to bind a common food carcinogen, aflatoxin B<sub>1</sub>. **Food and Chemical Toxicology**, v.36, n.4, p.321-326, 1998.

ENSMINGER, M.E.; OLDFIELD, J.E.; HEINEMANN, W.W. In **Feed Processing Feeds and nutrition**. 2ed. cap.14, p. 527-552, 1990.

European Food Safety Authority (EFSA), 2007. **Opinion of the Scientific Panel on contaminants in the food chain related to the potential increase of consumer health risk by a possible increase of the existing maximum levels for aflatoxins in almonds, hazelnuts and pistachios and derived products**. EFSA, v.446, p. 1-127, 2007.

European Food Safety Authority (EFSA), 2011. **Scientific Opinion on the safety and efficacy of propionic acid, sodium propionate, calcium propionate and ammonium propionate for all animal species**. EFSA, v.9, n. 12, p. 2-22, 2011.

European Food Safety Authority (EFSA), 2012. **Scientific Opinion on the safety and efficacy of acetic acid, sodium diacetate and calcium acetate as preservatives for feed for all animal species**. EFSA, v.10, n. 2, p. 3-15, 2012.

European Food Safety Authority (EFSA), 2014. **Scientific Opinion on the safety and efficacy of sorbic acid and potassium sorbate when used as technological additives for all animal species**. EFSA, v.12, n.7. p.1-18, 2014.

European Food Information Council (EUFIC), 2013. **Normas da Indústria Alimentar – foco no HACCP**. Food Today 02/2013. Disponível em: <<http://www.eufic.org/article/pt/artid/Food-industry-standards-focus-on-HACCP/>>. Acesso em: 03 out. 2015.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Storage Problems of Feedstuffs**. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/X5738E/x5738e0e.htm#TopOfPage>>. Acesso em: 01 fev. 2017.

FAO. **Good Practices for the Feed Industry** - Implementing the Codex Alimentarius Code of Practice on Good Animal Feeding. n.9 Roma: Fao Animal Production and Health, 2010.

FAO. 2004. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **Almacenaje**. Disponível em:<<http://www.fao.org>>. Acesso em: 23 jan. 2017.

FDA. 2015. Food and Drug Administration. **Evaluation and Definition of Potentially Hazardous Foods** - Chapter 6. Microbiological Challenge Testing. Disponível em <<http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/SafePracticesforFoodProcesses/ucm094154.htm>>. Acesso em: 01 fev. 2017.

FDA. 2016. **Acetic Acid**. Chapter i--food and drug administration. Disponível em:<<http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?fr=184.1005>>. Acesso em: 15 jan. 2017.

FERRAZ. 2016. **Ração estruturada para maior produção animal – novos desafios para o processamento de alimentos em fábricas de ração 2016**. Disponível em: <<http://www.ferrazmaquinas.com.br/conteudo/racao-estruturada-para-maior-producao-animal-novos-desafios-para-o-processamento-de-alimentos-em-fabricas-de-racao.html>>. Acesso em: 25 jan. 2017.

FLEMMING, J.S et al. Efeito da forma física e do valor de energia metabolizável da dieta sobre o desempenho de frangos de corte. **Archives of Veterinary Science**, v.7, n.2, p.27-34, 2002.

FOLDES, T. et al. Isolation of Bacillus strains from the rhizosphere of cereals and in-vitro screening for antagonism against phytopathogenic, food-borne pathogenic and spoilage microorganisms. **Journal Applied Microbiology**, v.89, n.5, p. 840–846, 2000.

FRANCIS, J.F. **Encyclopedia of Food Science and Technology**, 2. ed. Nova York: John Wiley & Sons, 2000.

FRANCO, B.D. **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo: Editora Atheneu, 2008.

FREIRE, F.C.O. et al. **Micotoxinas: Importância na Alimentação e na Saúde Humana e Animal**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2007.

FRISVAD, J. C. et al. Secondary metabolite profiling, growth profiles and other tools for species recognition and important *Aspergillus* mycotoxins. **Studies in Mycology**, v. 59, n. 1, p. 31-37, 2007.

FUCILLINI, D.G.; VEIGA, C.H.A. Controle da capacidade produtiva de uma fábrica de rações e concentrados: um estudo de caso. **Custos e @gronegócios on line**, v. 10, n. 4, p.221-240, 2014.

GEINSEN, R. PCR. **Methods for detection of Mycotoxin** – producing Fungi. Applications of PCR in mycology. 2ed. Cambridge: University Press, 2000.

GOES, R.H.T.B.; SILVA, L.H.X.; SOUZA, K.A. **Alimentos e Alimentação Animal**. Dourados: Editora UFGD, 2013.

GOMES, M. S. et al. Adaptabilidade e estabilidade de cultivares de milho para produtividade de matéria seca e degradabilidade ruminal de silagem. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v.1, n.2 p. 83-90. 2002.

GONÇALVES, B.L. et al. Effects of different sources of *Saccharomyces cerevisiae* biomass on milk production, composition, and aflatoxin M<sub>1</sub> excretion in milk from dairy cows fed aflatoxin B<sub>1</sub>. **Journal of Dairy Science**, v.100, n.7, p.5701-5708, 2017.

GONÇALVES, L.C.; BORGES, I.; FERREIRA, P.D.S. **Alimentos para Gado de Leite**. Belo Horizonte: FEPMVZ, 2009.

GOOD MANUFACTURING PRACTICES (GMP). **Certification Scheme Animal Feed**. Sector 2008, Appendix 1: Product standards; Regulations on Product Standards in the Animal Feed Sector. GMP14, p. 1- 39. 2008. Disponível em:< [http://www.bezpecna-krmiva.cz/soubory/gmp\\_standard\\_08\\_EN.pdf](http://www.bezpecna-krmiva.cz/soubory/gmp_standard_08_EN.pdf)> Acesso em: 23 jan. 2017.

GOURAMA, H.; BULLERMAN, L. B. Detection of moulds in foods and feeds: potential rapid and selective methods. **Journal Food Protect**, v. 58, n.12, p. 1389-1394, 1995.

GREGORIO, M.C. et al. Mineral adsorbents for prevention of mycotoxins in animal feeds. **Journal Toxin Reviews**, v.3, n. 3, p.125-135, 2014.

GU, C. et al. Effect of Soybean Variety on Anti-Nutritional Factors Content, and Growth Performance and Nutrients Metabolism in Rat. **International Journal of Molecular Science**, v. 11, n. 3, p. 1048–1056, 2010.

GUILHERME, A.A.; PINTO, G.A.S.; RODRIGUES, S. Avaliação da produção de ácido láctico por *Leuconostoc mesenteroides* B512F em xarope de caju. **Food Science and Technology**, v.29, n.4, p. 738-747, 2009.

GUYNOT, M.E. et al. Combined effects of weak acid preservatives, pH and water activity on growth of Eurotium species on a sponge cake. **International Journal of Food Microbiology**, v.76, p. 39–46, 2002.

GWIRTZ, J.A.; CASAL, M.N.G. Processing maize flour and corn meal food products. **New York Academy of Sciences**, v. 1312, p. 66-75, 2014.

HAI, N.N. *Bacillus subtilis* possibly used for aflatoxin control. In: INTERNATIONAL WORKSHOP ON BIOTECHNOLOGY IN AGRICULTURE, 2006, p. 75-77. USA. **Anais**. Nong Lam University Ho Chi Minh City, 2006.

HALE, W.H. Influence of processing on the utilisation of grains (starch) by ruminants. **Journal of Animal Science**, p.37, 1973.

HASSAN, R.; KADI, S.E.; SAND, M. Effect of some organic acids on some fungal growth and their toxins production. **International Journal of Advances in Biology**, v. 2, n .1, p. 1-11, 2015.

HAYASHI, R.M. Acidificantes ganham espaço na alimentação animal. **Revista a Lavoura**, v. 689, p. 20-23, 2012.

HAQUE, M.N.; CHOWDHURY, K.M.S. AKBAR. Propionic acid is an alternative to antibiotics in poultry diet. **Bangladesh Journal of Animal Science**, v.38, p.115 – 122, 2009.

HILLMANN, B et al., Analise Microbiológica de Rações para Cães Comercializadas a Granel e em Embalagem Fechada. **Revista Enciclopédia Biosfera**, v.11 n.21, p. 134, 2015.

HUWIG, A. et al. Mycotoxin detoxification of animal feed by different adsorbents. **Journal of Toxicology Letters**, v. 122, n.2, p. 179–188, 2001.

HWANG, J.H.; LEE, K.G. Reduction of aflatoxin B1 contamination in wheat by various cooking treatments. **Food Chemistry**, v. 98, n.1, p. 71–75, 2006.

IARC (International Agency for Research on Cancer). (2002). **Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene**. In Monograph on the evaluation of carcinogenic risk to humans. Lyon, France, v. 82, p. 1 e 556.

INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS (ICMSF). **Microorganismos de los alimentos: características de los patógenos microbianos**. Zaragoza: Acribia, 1996.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ (IAL). **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz: Métodos Químicos para Análise de Alimentos**. 4. ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008.

INTERNATIONAL FEED INDUSTRY FEDERATION. IFF. **Global feed production** 2015. Disponível em: <<http://www.iff.org/pages/t/Global+feed+production>>. Acesso em: 27 jan. 2017.

IPHARREGUERRE, I.R.; CLARK, J.H. Review: soyhulls for dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.86, n.4, p.1052-1073, 2003.

IWASHITA, M.K.C. Incorporação de Aditivos na Ração de Peixes. **Circular Técnica EMBRAPA**, v.1, n.1, p.1-4, 2014. Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/121884/1/CNPASA-Cit.pdf>>. Acesso em: 02 out. 2015.

JALILI, M. A Review on Aflatoxins Reduction in Food. **Iranian Journal of Health, Safety and Environment**, v.3, n.1, p. 445-459, 2015.

JARVIS, B. Factors affecting the production of mycotoxins. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 34, n. 1, p. 199-213, 1971.

JOSAN, P.D.; YEO, N.S. **Protection of feed and grain from mould contamination.** Animal Feed, 2010. Disponível em: <<http://en.engormix.com/MA-feed-machinery/formulation/articles/protection-feed-grain-mould-t1564/800-p0.htm/>> Acesso em: 01 out. 2016.

KABAK, B.; DOBSON, A.D.W.; VAR, I. Strategies to prevent mycotoxin contamination of food and animal feed: A review. **Crit. Food Science and Nutrition**, v.46, n.8, p.593-619, 2006.

KAWASHIMA, L. M.; SOARES, L. M. V.; MASSAGUER, P. R. The development of analytical method for two micotoxins, patulin and verruculagem, and survey of their presence in commercial tomato pulp. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.33, p.269-273, 2002.

KENNY, M.; ROLLINS, D. A Qualidade Física da Ração. **Revista Aviagen Brasil Tecnologia**, v.1, n.1, p.1-6, 2008.

KIM, J.G.; YOUSEF, A.E.; KHADRE, MA. **Ozone and its current and future application in the food industry.** In: TAYLOR, S.L. (Ed.) *Advances in Food and Nutrition Research*. Nova York: Academic Press, v.45, p.167-218, 2003.

KIRCHOF, B. **Alternativas de alimentação para bovinos de leite.** 7 ed. Porto Alegre: EMATER RS. 2005.

KISHOR C.; TRIVEDI U.; PATEL K. C. Statistical screening of medium components by Plackett-Burman design of lactic acid production by *Lactobacillus* sp. KCP01 using date juice. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 1, p. 98-103, 2007.

KLICK, M.A.; PITT, J.I. **A laboratory guide to common *Aspergillus* and their teleomorphs.** North Ryde: Common Wealth Scientific and Industrial Research Organization, 1988.

KLICK, M.A. Environmental and developmental factors influencing aflatoxin production by *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. **Mycoscience Journal**, v.48, p.71–80, 2007.

KLEIN, A. Peletização de Rações Aspectos Técnicos Custo e Benefício e Inovações Tecnológicas. Conferência: FACTA de Ciência e Tecnologia Avícola 21º. **Anais**. Congresso Brasileiro de Avicultura, 2009.

KOZAKIEWCZ, Z.; SMITH, D. **Physiology of Aspergillus**. Nova York: Plenum Press, 1994.

LANA, R.P. **Sistema Viçosa de formulação de rações**. 4 ed. Viçosa: Editora UFV, 2007.

LARA, L.J.C. et al. Influência da forma física da ração e da linhagem sobre o desempenho e rendimento de cortes de frangos de corte. **Archives of Veterinary Science**, v.60, n.4, p.970-978, 2008.

ŁAZICKA, K.; ORZECOVWSKI, S. The characteristics of the chosen mycotoxins and their toxic influence on the human and animal metabolism. **Natural Science**, v. 2, n.6, p. 544-550, 2010.

LEITÃO, D.F.G.M. et al. Eficácia de aditivo à base de parede celular de levedura na dieta de leitões intoxicadas com zearalenona. **Veterinária e Zootecnia**, v.23, n.4, p.696-705, 2016.

LIEWEN, M.B.; MARTH, E.H. Growth and Inhibition of Microorganisms in the Presence of Sorbic Acid: A Review. **Journal of Food Protection**, v.48, n.4, p.364-375, 1985.

LIMA, D. C. et al. Estabilidade de Alimentos Extrusados para cães armazenados em embalagens abertas e fechadas. In: V Congresso Internacional e XII Simpósio sobre Nutrição de Animais de Estimação. CBNA - 24 e 25 de abril de 2013: Valinhos, SP. **Anais**. Valinhos, SP. Colégio Brasileiro de Nutrição Animal. 2013.

LOPEZ, M.E.; GARCIA, H.S.; MALO, L. Organic acids as antimicrobials to control *Salmonella* in meat and poultry products. **Food Research International**, v. 45, n2, p. 713 – 721, 2012.

LORINI, I.; MIIKE, L. H.; SCUSSEL, V. M. **Armazenagem de grãos**. Campinas: Instituto Bio Geneziz, 2002.

MACIOROWSKI, K.G. et al. Cultural and immunological detection methods for *Salmonella* spp. in animal feeds - A review. **Veterinary Research Communications**, v.30, p.127-137, 2006.

MACHINSKY, G.T et al. Digestibilidade de nutrientes e balanço de Ca e P em suínos recebendo dietas com ácido butírico, fitase e diferentes níveis de cálcio. **Ciência Rural**, v.40, n.11, p. 2350-2355, 2010.



MALLMANN, C.A. DILKIN, P.; MALLMANN, A.O. Panorama das micotoxinas. In: VI Congresso Latino-Americano de Nutrição Animal - 23 a 26 de Setembro de 2014, Estância de São Pedro, SP. **Anais**. Estância de São Pedro, SP, 2014.

MALLMANN, C.A. et al. Critérios para seleção de um bom sequestrante para micotoxinas. In: Conferência APINCO de Ciência e Tecnologia Avícolas 2006, p. 213-224. Campinas – SP. **Anais**. Campinas: Fundação Apinco de Ciência e Tecnologia Avícolas, 2006.

MALLMANN, C.A. et al. Prevalência de aflatoxinas em amendoim e seus derivados, destinados ao consumo humano, no estrado do Rio Grande do Sul. In: 2º Simpósio em Ciência de Alimentos, 2013, Florianópolis.

**Anais**. Florianópolis. Disponível em: < <http://www.lamic.ufsm.br/papers/2.pdf>>. Acesso em: 27 jan. 2017.

MÁRCIA, B.A.; LÁZZARI, F.A. Monitoramento de fungos em milho em grão, grits e fubá. **Food Science and Technology**, v.18, n.4, Campinas, 1998.

MARIN, S. et al. Mycotoxins: Occurrence, toxicology, and exposure assessment. **Food and Chemical Toxicology**, v.60, p.218–237, 2013.

MARÍN, S. et al. Risk assessment of the use of sub-optimal levels of weak-acid preservatives in the control of mould growth on bakery products. **International Journal of Food Microbiology**, v.79, p.203–211, 2002.

MARTÍNEZ, M.E.; BADILLO, M.V.; PARRA, F.F. Uso de sales del ácido propiônico para inhibir la producción de aflatoxinas em granos almacenados de maíz. **Agrociencia**, v.34, n.4, p.477-484, 2000.

MARTINS, M.L.; MARTINS, H.M.; GIMENO, A. Incidence of microflora and of ochratoxin A in green coffee beans (*Coffea arabica*). **Food Additives and Contaminants**, v.20, p.1127–1131, 2003.

MENDEZ, F. et al. Penetration of ozone into columns of stored grains and effects on chemical composition and performance. **Journal of Stored Products Research**, v.39, n.1, p.33-44, 2003.

MENDONCA, A.F. **Mechanism of inhibitory action of potassium sorbate in *Escherichia coli***. Tese (Doutorado) - Iowa State University. Ames, Iowa, 1992.

MENEGHETTI, C.C.; DOMINGUES, J.L. Características nutricionais e uso de subprodutos da agroindústria na alimentação de bovinos. **Revista Eletrônica Nutritime**. v.5, n.2, p.512-536, 2008.

MIL, T. et al. Characterization of 27 mycotoxin binders and the relation with *in vitro* zearalenone adsorption at a single concentration. **Journal of Toxins (Basel)**, v. 7, n.1, p. 21-33, 2015.

MONSANTO COMPANY. 1979. Sorbic acid as a food preservative. **Food Processing Industry**, v. 48, n.1, p.36 - 41, 1979.

MOSS, M.O. Recent studies of mycotoxins. **Journal of Applied Microbiology**, v.84, p.62-76, 1998.

MORENO, M.E.; RAMÍREZ, G.J. Protective effect on fungicides on corn seed stored with low and high moisture content. **Science Technology**, v.13, n.1, p. 285-290, 1985.

MOTTA, T.P. et al. Estudo sobre a ocorrência de fungos e aflatoxina B<sub>1</sub> na dieta de bovinos leiteiros em São Paulo. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.35, n.1, p.23-28, 2015.

MOURÃO, R.C. et al. Aditivos alimentares para vacas leiteiras. **Revista Eletrônica Nutritime**, v. 9, n.5, p. 2011 – 2040, 2012. Disponível em: <[http://www.nutritime.com.br/arquivos\\_internos/artigos/Nutritime%20-%20artigo%20179\\_.pdf](http://www.nutritime.com.br/arquivos_internos/artigos/Nutritime%20-%20artigo%20179_.pdf)>. Acesso em: 15 out. 2016.

MURAMATSU, K. **Aplicação de modelagem preditiva no processo de peletização de rações para frangos de corte**. 2013. 99 f. Tese (Doutorado) - Curso de Veterinária, Universidade Federal do Paraná, Rio Grande do Sul, 2013.

MUYNCK, C.D. et al. Potential of selected lactic acid bacteria to produce food compatible antifungal metabolites. **Microbiological Research**, v.159, p.339-346, 2004.

NESCI, A.; RODRIGUEZ, M.; ETCHEVERRY, M. Control of *Aspergillus* growth and aflatoxin production using antioxidants at different conditions of water activity and pH. **Journal of Applied Microbiology**, v.95, n.2, p.279–287, 2003.

NETO, F.N. Recomendações Básicas para a Aplicação das Boas Práticas Agropecuárias e de Fabricação na Agricultura Familiar. **Embrapa Informação Tecnológica**, v.1, p. 1-243, 2006.

OLIVEIRA, C.A.F. et al. Determinação de aflatoxina B<sub>1</sub> em rações e aflatoxina M<sub>1</sub> no leite de propriedades do Estado de São Paulo. **Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.30, n.1, p.221-225, 2010.

OMAFRA. 2013. **Molds and Mycotoxins – Effects of moldy Feed and Mycotoxins on Cattle**. Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs. Disponível em: <<http://www.omafra.gov.on.ca/english/livestock/dairy/herd/food/mico2.htm>>. Acesso em: 05 fev. 2017.

PAES, M. C. D. **Aspectos físicos, químicos e tecnológicos do grão de milho**. 1ed. Sete Lagoas: Ministério da Agricultura, Pecuária e abastecimento, 2006.

PARK, D.L. Effect of processing on aflatoxin. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v.504, p.173–179, 2002.

PARTANEN, K.H.; MROZ, Z. Organic acids for performance enhancement in pig diets. **Nutrition Research Reviews**, v.12, n.1, p. 117-145, 1999.

PASTER, N., JUVEN, B. J.; HARSHEMESH, H. Antimicrobial activity and inhibition of aflatoxin B1 formation by olive plant tissue constituents. **Journal of Applied Bacteriology**, v.64, n.4, p.293-297, 1988.

PATERSON, R. R. M.; VENÂNCIO, A.; LIMA, N. Solutions to *Penicillium* taxonomy crucial to mycotoxin research and health. **Research in Microbiology**, v.155, n.7, p.507- 513, 2004.

PAYNE, J.; RATTINK, W.; WINOWISKI, T. **A guide for production staff in the compound feed industry**. Nova York: Pelleting Handbook, 2001.

PELÁEZ, A.M. et al. Inhibitory activity of lactic and acetic acid on *Aspergillus flavus* growth for food preservation. **Revista Food Control**, v. 24, p.177-183, 2012.

PEREIRA, M. M. G. et al. Aflatoxinas em alimentos destinados a bovinos e em amostras de leite da região de Lavras, Minas Gerais – Brasil, **Ciência e Agrotecnologia**, v. 29, n. 1, p. 106-112, 2005.

PEREIRA, M.M.G.; CARVALHO, E.P.; PRADO, G. Crescimento e produção de aflatoxinas por *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*. **Boletim CEPPA**, v.20, n.1, p. 141-156, 2002.

PERIAGO, P.M.; PALOP, A.; FERNÁNDEZ, P.S. Combined effect of nisin, carvacrol and thymol on the viability of *Bacillus cereus* heat-treated vegetative cells. **Food Science and Technology**, v.7, n.6, p.487-492, 2001.

PERRY, F.G. Biotechnology in animal feeds and feeding, an overview. In: WALLACE, R. J.; CHESSON, A. **Biotechnology in animal feeds and feeding**. Nova York: VCH, 1995.

PEZZINI, V.; VALDUGA, E.; CANSIANI, R.L. Incidência de fungos e micotoxinas em grãos de milho armazenados sob diferentes condições. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v.64, n.1, p.91-96, 2005.

PIARD, J. C., DESMAZEAUD, M. Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria. oxygen metabolites and catabolism end-products. **Revista Lait**, v.71, p.525–541, 1991.

PICKLER, L. et al. Avaliação microbiológica, histológica e imunológica de frangos de corte desafiados com *Salmonella enteritidis* e Minnesota e tratados com ácidos orgânicos. **Revista Veterinária Brasileira**, v.32, n.1, p.27-36, 2012.

PILDAIN, MB.; VAAMOND, G.; CABRAL, D. Analysis of population structure of *Aspergillus flavus* from peanut based on vegetative compatibility, geographic origin, mycotoxin and sclerotia production. **International Journal Food Microbiology**, v.93, p.31-40, 2004.

PIMENTEL, M.A.G.; FONSECA, M.JO. **Cultivo do milho: Secagem e armazenamento**. 7ed. Versão eletrônica: Embrapa Milho e Sorgo, 2011. Disponível em:>[http://www.cnpms.embrapa.br/publicacoes/milho\\_7\\_ed/colsecagem.htmgranel](http://www.cnpms.embrapa.br/publicacoes/milho_7_ed/colsecagem.htmgranel)>. Acesso em: 02 set. 2016.

PIPER, P. et al. Weak acid adaptation: the stress response that confers yeasts with resistance to organic acid food preservatives. **Microbiology**, v.147, p.2635-2642, 2001.

PITT, J.I.; HOCKING, A.D. **Fungi and food spoilage**. 2 ed. London: Blackie Academic and Professional, 1997.

PITT, J. I.; HOCKING, A. D. **Fungi and food spoilage**. 3 ed. Dordrecht: Springer, 2009.

POVERENOV, E.; GRANIT, R.; GABAI, S. Encapsulation and controlled release of antifungal propionic acid utilizing biodegradable active films based on natural polymers. **European Food Research and Technology**, v. 237, n. 1, p. 19-26, 2013.

PRADO, G. et al. Effect of gamma irradiation on the inactivation of aflatoxin B<sub>1</sub> and fungal flora in peanut. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.34, p.138-140, 2003.

PUPA, J.M.R. Óleos e gorduras na alimentação de aves e suínos. **Revista Eletrônica Nutritime**, v. 1, n. 1, p.69-73, 2004. Disponível em: <[http://www.nutritime.com.br/arquivos\\_internos/artigos/009V1N1P69\\_73\\_JUL2004.p](http://www.nutritime.com.br/arquivos_internos/artigos/009V1N1P69_73_JUL2004.p)>. Acesso em: 10 jan. 2013.

QUEIROZ, B.D et al., Avaliação de Substratos Vegetais Destinados à Alimentação Animal como Suportes para a Produção de Ochratoxina A por espécies do gênero *Aspergillus* FR. **Revista Universidade Rural**, v. 25, n. 1, p.64-70, 2005.

RAHAIE, S. et al. Evaluation of aflatoxin decontaminating by two strains of *Saccharomyces cerevisiae* and *Lactobacillus rhamnosus* strain GG in pistachio nuts. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 47, n.8, p. 1647–1653, 2012.

RAHAIE, S. et al. Immobilized *Saccharomyces cerevisiae* as a potential aflatoxin decontaminating agent in pistachio nut. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.41, p. 82-90, 2010.

RAILA, A. et al. Application of ozone for reduction of mycological infection in wheat grain. **Environmental Medicine**, v.13, n.2, p.287-294, 2006.

REDDY, U.M.; RANI, P.C. Effect of processing on detoxification of aflatoxins in maize. **Indian Journal of Nutrition and Dietetics**, v.43 n.1, p. 54-59, 2004.

REGULAMENTO DA COMUNIDADE EUROPÉIA (CE). **Instrução Normativa 2003/100**. Substâncias Indesejáveis nos Alimentos para Animais. Diário Oficial da União Europeia. 31 out. 2003, p.31-37.

REIS, E.S. et al. Processamento da ração no desempenho de juvenis de jundiá (*Rhamdia voulezi*) cultivados em tanques-rede. **Revista Ciência Animal Brasileira**, v.13, n.2, p. 197-204, 2012.

RILEY, R.T.; NORRED, W.P. Mycotoxin prevention and decontamination- a case study on maize. **Food Nutrition and Agriculture Alimentations**, v. 23 p.25-30, 1999.

RODRIGUES, C. et al. **Bioprocessos na produção de aditivos alimentos**. 4 ed. São Paulo: Blucher, 2016.

RODRIGUES, P. et al. Identification and characterization of *Aspergillus flavus* and aflatoxins. **Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology**, p. 527-534, 2007.

ROSA, C. A.R. et al. Mycoflora of poultry feeds and ochratoxin-producing ability of isolated *Aspergillus* and *Penicillium* species. **Veterinary Microbiology**, v. 113, p.89-96, 2006.

RUMPF, A. 2007. **Top Shelf Quality: Shelf-life Crucial in Validating Quality and Safety**. Food Quality & Safety: Disponível em: <<http://www.foodqualityandsafety.com/article/top-shelf-quality/>>. Acesso em: 05 fev. 2017.

RUPOLLO, G. et al. Efeito da umidade e do período de armazenamento hermético na contaminação natural por fungos e a produção de micotoxinas em grãos de aveia. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 30, n.1, p.118-125, 2006.

RUSCHEL, J. **Combinação de ácidos orgânicos no controle de *Aspergillus* spp. micotoxigênico**. 2017. 67f. Trabalho de Conclusão de Curso (Tecnologia em Alimentos) – Curso Superior de Tecnologia em Alimentos. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Francisco Beltrão, 2017.

RYDLO, T.; MILTZ, J.; MOR.A. Eukaryotic Antimicrobial Peptides: Promises and Premises in Food Safety. **Journal of food science**, v. 71, n.9, p.125-135, 2006.

SALMAN, AK.D.; OSMARI, E.K.; SANTOS, M.G.R. **Manual prático para formulação de ração para vacas leiteiras**. 1 ed. Porto Velho: EMBRAPA Rondônia, 2011.

SANTOS, J.M. et al. **Armazenagem de rações secas: Estudo de caso Pet Shop**. 2012. Disponível em <[http://www.fatecguaratingueta.edu.br/fateclog/artigos/Artigo\\_51.PDF](http://www.fatecguaratingueta.edu.br/fateclog/artigos/Artigo_51.PDF)>. Acesso em: 22 ago. 2016.

SANTOS, R.R. et al. Ozone as fungicide in rice grains. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.20, n.3, p.230-235, 2016.

SCUDAMORE, K.A.; BANKS, J.; MACDONALD, S.J. Fate of ochratoxin A in the processing of whole wheat grains during milling and bread production. **Food Additives and Contaminants**, v.20, n.12, p.1153–1163, 2003.

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

SCUSSEL, V.M. **Fungos em grãos armazenados**. In: Lorini, I., Miike, LH, Scussel, VM Armazenagem de grãos. Campinas: IBG, 2002.

SHETTY, P.H.; HALDE, B.; JESPERSEN, L. Surface binding of aflatoxin B<sub>1</sub> by *Saccharomyces cerevisiae* strains with potential decontaminating abilities in indigenous fermented foods. **International Journal Food Microbiology**, v.113, n.1, p. 41-46, 2007.

SILVA, et al. **Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos**. 3 ed. São Paulo: Varela, 2007.

SILVA, J.S.; FILHO, L.A.F.; DEVILLA, I.A. **Aeração de grãos armazenados**. In: Silva, J.S. Secagem e armazenagem de produtos agrícolas. Viçosa: Editora Aprenda Fácil, 2000.

**SINDIRAÇÕES**. 2016. Alimentação animal mantém estabilidade em 2016. Boletim informativo: Dezembro, 2016. Disponível em: <[http://sindiracoes.org.br/wpcontent/uploads/2016/12/boletim\\_informativo\\_do\\_setor\\_dez\\_2016\\_vs\\_final\\_port.pdf](http://sindiracoes.org.br/wpcontent/uploads/2016/12/boletim_informativo_do_setor_dez_2016_vs_final_port.pdf)>. Acesso em: 05 jan. 2017.

SINGH, K.; SINGH, A. K.; SINGH, R. P. Detection of seed mycoflora of chick pea (*Cicer arietinum* L.). **Department of Plant Pathology**, v.13, n.1, p.167–171, 2005.

SMITH, A.A. Preservatives in Food Products – Review. **International Journal of Pharmaceutical and Biological Archives**, v.2, n.2, p.583-599, 2011.

SMITH, D.P.; ROLLIN, N.J. Sorbic acid as a fungistatic agent for foods. VIII. Need for efficacy in protecting packaged cheese. **Food Technology**, v.8, p.133-135, 1954.

SMULDERS, F.J.M.; GREER, G.G. Integrating microbial decontamination with organic acids in HACCP programmes for muscle foods: prospects and controversies. **International Journal of Food Microbiology**, v.44, n.3, p.149–169, 1998.

SOFOS, J. N. **Sorbic Food Preservatives**. CRC Press. Florida: CRC Press, 1989.

SOUZA, R.V.; SILVA, V.A. Implicações do uso de aditivos na alimentação animal: resíduos e barreiras às exportações. In: Congresso nordestino de produção animal, 5; simpósio nordestino de alimentação de ruminantes. Simpósio sergipano de produção animal, 2008, Aracaju. **Anais**. Aracaju: Sociedade Nordestina de Produção Animal; Embrapa Tabuleiros Costeiros. 2008.

STRATFORD, M. et al. Inhibition of spoilage mould conidia by acetic acid and sorbic acid involves different modes of action, requiring modification of the classical weak-acid theory. **International Journal of Food Microbiology**, v.136, p.37-43, 2009.

TANIWAKI, M.H. SILVA, N. **Fungos em alimentos: ocorrência e detecção**. Campinas: Núcleo de Microbiologia do ITAL, 2001.

THERON, M.M.; LUES, J.F.R. **Organic acids and food preservation**. 2ed. London: CRC Press, 2011.

THIAGO, L.R.L.S.; SILVA, J.M. **Soja na alimentação de bovinos**. Circular Técnica n. 31, Embrapa – Dez. 2003. Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/104635/1/Soja-na-alimentacao-de-bovinos.pdf>>. Acesso em: 16 jan. 2017.

THOMAS, M.; VAN ZUILICHEM, D. J.; POEL, A. F. B. Physical quality of pelleted animal feed 2. Contribution of processes and its conditions. **Animal Feed Science and Technology**, v.64, n.2., p. 173-192, 1997.

TURLINGTON, H. Contamination and animal feed, 2014. **Food Quality & Safety**. Disponível em: <<http://www.foodqualityandsafety.com/article/contamination-and-animal-feed/?singlepage=1>>. Acesso em: 05 fev. 2017.

VALERO, A. et al. 2012. **Principles and Methodologies for the Determination of Shelf–Life in Foods**. Trends in Vital Food and Control Engineering. Disponível em <[http://cdn.intechopen.com/pdfs/35124/InTech-Principles\\_and\\_methodologies\\_for\\_the\\_determination\\_of\\_shelf\\_life\\_in\\_foods.pdf](http://cdn.intechopen.com/pdfs/35124/InTech-Principles_and_methodologies_for_the_determination_of_shelf_life_in_foods.pdf)>. Acesso em: 01 fev. 2017.

VICAM. **Aflatest instruction manual**. Vicam, Watertown, MA: Vicam, 2002.

VIEIRA, S. M. **Química dos cereais**. Fortaleza: SENAI – CE/CERTREM, 2006.

WAREING, P.; STUART, F.; FERNANDES, R. **Factors affecting the growth of micro-organisms in foods**. Nova York: Softcover, 2011.

WEIGEL, J.C.; LOY, D.; KILMER, L. **Feed Co-Products of the Dry Corn Milling Process**. Whashington: US Grains Council, 2005.

WILLIAMS, D. E. et al., Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and ultra-low dose cancer studies. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 149, n. 2, p. 175– 181, 2009.

WOOLFORD, M.K. Microbiological screening of the straight chain fatty acids (C1–C12) as potential silage additives. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.26, p.219–228, 1975.

WORTINGER, A. **Nutrição para Cães e Gatos**. São Paulo: Roca, 2009.

WU, J. et al. Investigation of gaseous ozone as an antifungal fumigant for stored wheat. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v.81, n.7, p.1288-1293, 2006.

YOUNG, J.C.; ZHU, H.; ZHOU, T. Degradation of trichothecene mycotoxins by aqueous ozone. **Food and Chemical Toxicology**, v.44, p.417-424, 2006.

ZAIN, M.E. Impact of mycotoxins on humans and animals, **Journal of Saudi Chemical Society**, v.15, p.129-144, 2011.

ZHANG, S. et al. Effects of vitamins on the lactic acid biosynthesis of *Lactobacillus paracasei* NERCB 0401. **Biochemical Engineering Journal**, v.38, p.189-197, 2008.



## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados desta dissertação serão apresentados no formato de artigos científicos conforme anexo:

ARTIGO 1 – SINERGISMO DE ÁCIDOS ORGÂNICOS E SORBATO DE POTÁSSIO PARA CONTROLE DE *Aspergillus flavus* TOXIGÊNICO.

ARTIGO 2 – ESTABILIDADE DE RAÇÕES PELETIZADAS COM MELAÇO EXTERNO UTILIZANDO COMBINAÇÕES DE ÁCIDOS ORGÂNICOS E SAL.

## ARTIGO 1 – SINERGISMO DE ÁCIDOS ORGÂNICOS E SORBATO DE POTÁSSIO PARA CONTROLE DE *Aspergillus flavus* TOXIGÊNICO.

### RESUMO

Esta pesquisa teve como objetivo determinar a concentração inibitória mínima (CIM) de ácidos orgânicos e suas combinações para o controle de *Aspergillus flavus* produtor de aflatoxina. A CIM dos ácidos acético (AA), láctico (AL), propiônico (AP) e sorbato de potássio (SP) para inibição de *A. flavus*  $10^4$  esporos.mL<sup>-1</sup> do fungo filamentosos foi avaliada *in vitro*. Os melhores resultados das combinações foram de AA (83,26 mM) + AP (6,74 mM), AA (8,32 mM) + SP (13,31mM) e AP (6,74 mM) + SP (33,28 mM). A redução das concentrações testadas em relação àquelas recomendadas, com possibilidade de redução de custos para as indústrias. Enfatiza-se a importância dos testes *in vitro* para determinação das concentrações suficientes para controle fúngico.

**Palavras-chave:** Conservantes. Fungo. Ácido fraco. Atividade antifúngica. Inibição do crescimento. Sinergia.

### INTRODUÇÃO

*Aspergillus flavus* é caracterizado como fungo de armazenamento responsável pela deterioração dos alimentos e também pela produção de aflatoxinas. Estas micotoxinas são substâncias tóxicas e cumulativas na cadeia alimentar, provocando riscos à saúde humana e animal (DIDWANIA; JOSHI, 2013). Devido a termo resistência destes compostos, os riscos da contaminação devem ser minimizados pelo controle do desenvolvimento fúngico.

A substituição dos fungicidas químicos tóxicos à saúde humana se faz necessária para melhoria da tecnologia de prevenção e controle microbiano. Os ácidos orgânicos são conservantes comumente utilizados em alimentos e rações com o objetivo de prolongar sua estabilidade, impedindo assim o crescimento de microrganismos indesejáveis. Os ácidos e sais orgânicos mais utilizados são o ácido láctico, acético, propiônico e sorbato de potássio. Estes compostos são classificados como geralmente reconhecidos como seguros (GRAS) pela Food and Drug Administration - FDA (2015 a,b,c,d).

A eficiência dos ácidos orgânicos depende de fatores como constante de dissociação, atividade de água, pH, temperatura de estocagem dentre outros (FAO, 2010; HUANG et al., 2010). Inibidores fúngicos à base de ácidos orgânicos são cada

vez mais utilizados pelas indústrias a fim de garantir a qualidade dos alimentos e aumentar a sua vida de prateleira, pois são considerados simples, rápidos, baratos e eficientes (BELLAYER; SCHEUERMANN, 2005).

O uso de substâncias químicas com ação antifúngica é difundido, mas ainda restrito quando comparado com o número de antimicrobianos disponíveis no mercado, gerando dúvidas quanto ao melhor produto a ser utilizado (NOBRE et al., 2012). A ação combinada de compostos antimicrobianos pode apresentar efeitos sinérgicos, reduzindo as concentrações necessárias para controle fúngico. Portanto, o trabalho teve como objetivo avaliar combinações de compostos antimicrobianos compostos por ácidos orgânicos para o controle de *A. flavus* produtor de aflatoxina.

## MATERIAL E MÉTODOS

Para avaliar o nível de contaminação por *Aspergillus flavus* e por aflatoxina, foram coletadas 30 amostras de milho e 30 de ração peletizada de uma indústria localizada no centro-sul do Estado do Paraná, no período de junho a agosto de 2016. Sendo que as amostras de ração foram referentes a ração processada a partir do lote de milho amostrado.

A contagem total de bolores e leveduras foi realizada de acordo com Silva et al (2007). A aflatoxina B<sub>1</sub> foi extraída por coluna de imunoafinidade - Aflatest®, (VICAM, 2002), e a quantificação através da cromatografia líquida de alta eficiência acoplado ao espectrofotômetro de massa tipo triploquadropolo – UPLC (Acquity UPLC-MS/MS, modelo Xevo TDQ Waters). Coluna: Acquity UPLC BEH C18 (1,7µm, 2,1mm d.i. x 100 mm); Fase móvel A: H<sub>2</sub>O + 0,1 % Ácido fórmico; Fase móvel B: Acetonitrila + 0,1 % Ácido fórmico, utilizando padrão para aflatoxina *Sigma-Aldrich*, com limite de detecção para aflatoxinas de 2 µg.kg<sup>-1</sup>.

Os seguintes agentes antimicrobianos foram avaliados: Ácido Acético (p.a., 97,70 %, pKa: 4,75), Ácido Lático (71,35 %, pKa: 3,88), Ácido Propiônico (97,12 %, pKa: 4,88), Sorbato de Potássio (98,00 %, pKa: 4,76 do ácido sórbico) diluídos em água destilada (pH 7,0) estéril. A determinação da concentração inibitória mínima foi realizada com os ácidos e suas combinações (Tabela 4) frente a cepa *Aspergillus flavus* NRRL 3251 produtora de aflatoxina B<sub>1</sub>.

Tabela 4 - Concentrações dos ácidos orgânicos combinados

Combinção de ácidos (%)											
AA	AP	AA	SP	AL	SP	AA	AL	AL	AP	AP	SP
0,025	0,025	0,025	0,25	0,40	0,40	0,025	0,40	0,40	0,025	0,025	0,40
0,250	0,025	0,250	0,25	1,00	0,40	0,250	0,40	1,00	0,025	0,10	0,40
0,025	0,10	0,025	1,00	0,40	1,00	0,025	1,00	0,40	0,10	0,025	1,00
0,250	0,10	0,250	1,00	1,00	1,00	0,250	1,00	1,00	0,10	0,10	1,00
0,137	0,062	0,137	0,625	0,70	0,70	0,137	0,70	0,70	0,062	0,062	0,70
Adicionais		0,250	0,10							0,10	0,10
		0,025	0,10							0,025	0,250
										0,025	0,10
										0,10	0,250

AA: ácido acético; AP: ácido propiônico; AL: ácido láctico; SP: sorbato de potássio

Fonte: Autora

Alíquotas de  $10^4$  esporos.  $\text{mL}^{-1}$  da cepa NRRL 3251 foram inoculada *Pour plate* (1 mL) e *Spread plate* (100  $\mu\text{L}$ )  $10^4$  esporos.  $\text{mL}^{-1}$  com 19 mL de ágar BDA adicionado de cada agente antifúngico. As placas foram incubadas em estufa BOD a 25 °C por 7 dias, seguido da contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFC). A partir da determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de cada agente testado isoladamente, foram testadas combinações de dois agentes sobre o inóculo fúngico. O pH do meio foi determinado de acordo com os procedimentos descritos pelo Instituto Adolfo Lutz (IAL, 2008).

O índice da concentração fracionária inibitória (ICFI) foi determinada de acordo com Odds (2003).

$$\text{ICFI} = \sum \text{FIC} = \text{FIC}_{A1} + \text{FIC}_{A2} = \frac{C_{A1}}{\text{CIM}_{A1}} + \frac{C_{A2}}{\text{CIM}_{A2}} \quad (1)$$

Onde  $C_{A1}$  e  $C_{A2}$  = menor concentração da combinação dos agentes A1 e A2 com atividade antimicrobiana,  $\text{CIM}_{A1}$  e  $\text{CIM}_{A2}$  a concentração inibitória mínima dos agentes A1 e A2 quando isolados, respectivamente. Para análise da interação entre os agentes combinados, considerou  $\text{FICI} \leq 0,5$  efeito sinérgico;  $0,5 < \text{FICI} < 4$  indiferente; e  $\text{FICI} \geq 4$  antagonismo (ODDS, 2003).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A concentração do inóculo fúngico que foi testado nos testes *in vitro*, foi definida baseado na contagem de bolores e leveduras de amostras de milho e ração de uma indústria processadora, conforme apresenta a Tabela 5.

Tabela 5 - Contagem total de bolores e leveduras em amostras de milho e ração peletizada

Contagem (Log UFC.g <sup>-1</sup> )	Número de amostras contaminadas			
	<i>Aspergillus flavus</i>		Bolores e leveduras (Total)	
	Milho	Ração	Milho	Ração
n.d.-2	0	15	0	23
3 -3,9	23	15	13	6
4-4,7	8	0	17	1

N =60, sendo: milho n=30, ração n=30.

Fonte: Autora

O maior nível de contaminação por *Aspergillus flavus* foi de 3,3, e 4,7 Log UFC.g<sup>-1</sup> em amostras de ração e de milho, respectivamente. Considerando que o milho representa em torno de 40 % da formulação das rações e que o milho no caso foi a matéria prima para processar esta ração, uma redução na contaminação era esperada. Além disso, há de se considerar o tratamento térmico aplicado na peletização das rações que reduziu a contaminação microbiológica no produto final (MACIOROWSKI et al., 2007). Além da presença de *A. flavus* outro fator a ser controlado é a contaminação por micotoxinas. Pois embora o tratamento térmico reduza a contaminação fúngica, as suas toxinas são termorresistentes. Entre as amostras de milho e ração analisadas, aflatoxina B<sub>1</sub> foi detectada em apenas 3 amostras de milho em concentrações de 2 a 15 µg.kg<sup>-1</sup>, valores de acordo com os limites estabelecidos por legislação nacional e internacional (BRASIL, 2011, CE, 2003). Destaca-se ainda a importância do controle de armazenamento pós processamento térmico, visto que o produto pode sofrer recontaminação (CORADI et al., 2013).

Baseado na contagem máxima de colônias de *A. flavus* (~4 Log UFC.g<sup>-1</sup>) nas amostras analisadas (Tabela 5), foi definido a concentração de (10<sup>4</sup> esporos.mL<sup>-1</sup>) para o inóculo fúngico nos testes *in vitro*. A Tabela 6 apresenta as concentrações inibitórias mínimas (CIM) e o pH de cada composto testado.

Tabela 6 - Concentração inibitória mínima (CIM) dos compostos antimicrobianos testados contra *Aspergillus flavus* NRRL 3251 (10<sup>4</sup> esporos.mL<sup>-1</sup>) e pH

Composto (pKa)	CIM % (mM)	pH
Ácido acético (4,75)	0,5 (83,26)	4,14 ± 0,020
Ácido propiônico (4,88)	0,2 (26,99)	4,59 ± 0,010
Ácido láctico (3,88)	>2,0 (222,02)	3,35 ± 0,009
Sorbato de potássio (4,76) <sup>#</sup>	2,0 (133,13)	7,04 ± 0,008

<sup>#</sup>pKa referente ao ácido sórbico

Fonte: Autora

Os compostos antimicrobianos em alimentos e ração são aplicados industrialmente misturados na matriz alimentar. Mas há de considerar que a

contaminação fúngica pode se dar por matéria-prima contaminada ou por recontaminação após o processamento. Para avaliar estas condições foram testadas duas técnicas de inoculação: 1 mL em profundidade (*Pour plate*) e 100 µl em superfície (*Spread plate*). As concentrações inibitórias mínimas (CIM) dos compostos testados (Tabela 6) foram as mesmas independente da técnica de inoculação.

Entre os ácidos testados, o ácido propiônico (pKa = 4,88) foi o ácido que apresentou menor CIM para inibir *A. flavus* NRRL 3251 (26,99 Mm) com valor de pH 4,59, um pouco abaixo de seu pKa (Tabela 6). Os valores de CIM para os compostos testados foram 0,5 % (83,26Mm) pH 4,14 para ácido acético (pKa 4,75) e o ácido láctico (pKa 3,88) não apresentou atividade inibitória mesmo na maior concentração testada (222,02 mM, pH 3,35). A capacidade de inibição dos ácidos é relacionada ao valor do pH do meio que deve ser menor que o pKa do ácido em questão, pois a ação antimicrobiana é atribuída a forma não dissociada do ácido (CRAMER; PRESTEGARD, 1977).

Devido à baixa solubilidade do ácido sórbico de 0,25g em 100 mL de água a 30 °C (O'NEIL, 2013), neste experimento foi testado o seu sal, sorbato de potássio que apresenta solubilidade 58,2 g/100 mL de água à 25 °C (WEAST, 1979). A CIM do SP para inibir a cepa NRRL 3251 foi de 113,13 mM (2,0 %). Considerando o pK do ácido sórbico, 4,76, o pH do meio 7,04 (Tabela 6) interferiu diretamente na ação do SP, que se manteve dissociado. Em matriz acidificada com ácido cítrico (pH 4,5) favorece a protonação do sal, sendo que nestas condições 0,3% do SP foram suficientes para controle de  $10^6$  esporos. mL<sup>-1</sup> de *Aspergillus* sp. em massa de pão (GUYNOT et al., 2005).

A avaliação da contaminação fúngica do tipo de alimento que pretende-se aplicar determinado agente antimicrobiano é importante para determinação da CIM. Além disso, os testes *in vitro*, deve simular também a forma de aplicação pretendida do composto. Dependendo da concentração do inóculo e forma de aplicação diferentes concentrações de CIM são relatadas para controle de *A. flavus*. Em um estudo de cepas *A. flavus* toxigênicas e não toxigênicas, a CIM apresentada pelo ácido acético variou de 38,1 mM - pH 4,69 a 41,6 mM - pH 4,62, sendo as cepas toxigênicas mais sensíveis (PELÁEZ et al., 2012). O maior valor, ou seja, a CIM para cepas não toxigênicas correspondeu a metade da CIM apresentada para controle de *A. flavus* NRRL3251 (83,26 mM, Tabela 6). No entanto Peláez et al. (2012) inocularam  $10^2$  esporos por placa (10 µL de  $10^4$  UFC.mL<sup>-1</sup>), já a cepa NRRL 3251 foi inoculada em

maior número de esporos ( $10^3$ ) sendo necessário então uma concentração maior de ácido acético para inibir seu crescimento (Tabela 6). Por outro lado, em suporte sólido (disco de papel) o inóculo de  $5,0 \times 10^5$  UFC.mL<sup>-1</sup> de *A. flavus* foi inibido com 0,35% (57,85 mM) de ácido acético (HIGGINS; BRINKHAUS, 1999).

O ácido lático um ácido fraco de cadeia curta ( $\text{CH}_3\text{-CHOH-COOH}$ ) é considerado um eficiente antimicrobiano, sendo sua ação mais relatada para o controle de bactérias (MUYNCK et al., 2004). O controle de bolores por sua vez, requer concentrações mais elevadas de ácido lático. Concentrações de 405,4 mM em pH 2,69 foi necessária para inibir cepa toxigênica de *A. flavus* AFUNL1 (PELÁEZ et al., 2012), ou seja, o dobro da maior concentração testada frente à cepa NRRL 3251 (Tabela 6), sendo esta resistente a 222,2 mM de ácido lático. Os dados indicam que para a atividade antifúngica é necessário que o ácido esteja predominantemente na sua forma não ionizada.

A avaliação do efeito do pH na determinação CIM dos ácidos propiônico, acético e lático demonstrou uma maior efetividade destes ácidos em pH 3,0 quando comparado à pH 5,0 e 7,0 para controle de bolores. Em pH 7, todos os ácidos requereram concentrações  $\geq 500$  mM para a inibição das cepas *A. fumigatus* J9 e *A. nidulans* J283. Em pH 5,0 os valores de CIM para ácido propiônico e acético foram 50 e 80 mM, respectivamente, e acima de 500 mM para ácido lático. Em pH 3, os valores de CIM foram de  $\leq 20$  mM para ácido propiônico e acético, e  $\geq 200$  mM para o ácido lático (LIND; JONSSON; SCHNÜRER, 2005). Os resultados atestam a importância da forma não dissociada na ação antimicrobiana de ácidos orgânicos.

Outros mecanismos de ação dos ácidos orgânicos podem ser em decorrência do estresse oxidativo e perturbação na membrana plasmática (PIPER, 1999; STRATFORD; ANSLOW, 1998). Os ácidos fracos podem inibir a glicólise, uma vez que uma enzima chave da glicólise, a fosfofrutoquinase é sensível a valores baixos de pH (KREBS et al., 1983). A análise da atividade enzimática de *A. niger*, sugere uma redução substancial na atividade enzimática à medida que o pH reduz para valores inferiores a 6,0 as enzimas mais sensíveis ao pH testado foram hexoquinase e fosfofrutoquinase (LEGISA; GRDADOLNIK, 2002).

A interação de ácidos orgânicos pode apresentar um efeito sinérgico, tornando a membrana das células mais permeáveis a outros ácidos. A sinergia é detectada quando a combinação de dois compostos é mais eficaz do que o composto sozinho, quando a inibição é superior a individual ou quando ocorre uma redução de

1 Log em comparação ao composto sozinho (LACHOWICZ et al., 1998; NAZER et al., 2005; PERIAGO; PALOP; FERNÁNDEZ, 2002). Uma medida para avaliar a sinergia é a determinação do índice da concentração fracionária inibitória (ICFI), que calculado a partir da CIM dos agentes isolados e combinados (ODDS, 2003). A Tabela 7 apresenta a CIM, pH e os valores do ICFI dos ácidos combinados sobre *A. flavus* NRRL 3251.

Tabela 7 - Concentração inibitória mínima (CIM) e índice da concentração fracionária inibitória (ICFI) para controle de *Aspergillus flavus* NRRL 3251 ( $10^4$  esporos.mL<sup>-1</sup>) e pH

Composto combinado (mM)	CIM %	pH	ICFI
AA (41,63) + AP (3,37)	0,25 + 0,025	4,29 ± 0,005	0,62
AA (4,16) + SP (6,65)	0,025 + 0,1	5,45 ± 0,010	0,09
AL (44,40) + SP (26,62)	0,4 + 0,4	4,22 ± 0,020	-
AA (41,63) + AL (44,40)	0,25 + 0,4	3,81 ± 0,010	-
AL (44,40) + AP (13,49)	0,4 + 0,1	3,81 ± 0,010	-
AP (3,37) + SP (16,64)	0,025 + 0,25	5,81 ± 0,010	0,25

AA: ácido acético (pKa:4,75); AP.: ácido propiônico (pKa: 4,88), AL: ácido lático (pKa: 3,88); SP: sorbato de potássio (pKa: 4,76 ácido sórbico).

Os valores de ICFI indicaram o efeito sinérgico (IFCI<0,5) foi detectado na combinação de sorbato de potássio com ácido acético (ICFI= 0,09, pH 5,45) e com ácido propiônico (ICFI= 0,25, pH 5,81). Isoladamente o sorbato de potássio apresentou CIM (133,13 mM) em pH 7,04 (Tabela 6), mas a sua ação antifúngica é mais efetiva se aplicado em condições ácidas (Guynot et al., 2005). Quando combinado o sorbato de potássio apresentou atividade em pH que variou de 4,22 a 5,81 em concentrações de 6,25 a 26,62 mM, para ácido acético e lático, respectivamente (Tabela 7). Em condições ácidas há o predomínio do ácido sórbico (pKa 4,76), indicando a contribuição direta do ácido lático para este efeito. Considerado o ácido mais forte entre os testados (pKa 3,88), o ácido lático não apresentou atividade antifúngica isoladamente (Tabela 6), mas foi capaz, quando combinado de inibir o *A. flavus* NRRL 3251 na concentração de 44,40 mM, contribuindo para ação do sorbato de potássio e demais ácidos.

O pH do citoplasma é considerado neutro, assim o ácido sórbico (pKa 4,76), além de reduzir o pH intracelular, exerce ação no metabolismo (STRATFORD; ANSLOW, 1998). As enzimas sulfidrílicas fumarase, aspartase e succinato desidrogenase são inibidas pelo ácido sórbico, impedindo a assimilação oxidativa da glicose, acetato, succinato e fumarato (YORK; VAUGHN, 1964).



A permeabilidade na membrana depende da lipofilicidade do composto e contribui para a ação antimicrobiana. A concentração do ácido propiônico combinado com ácido láctico (13,49 mM) e acético (3,37 mM) foi duas e oito vezes inferior (Tabela 7), respectivamente, quando comparado com a sua CIM isoladamente (26,99 mM, Tabela 6). Considerando os coeficientes de partição (Log P), entre os ácidos testados, o ácido propiônico é o mais lipofílico Log P = 0,33, já os ácidos láctico (Log P = -0,72) e acético (Log P = -0,17) são considerados hidrofílicos (HANSCH et al., 1996). Assim, a combinação com o ácido láctico e acético contribuiu para a forma não ionizada do ácido propiônico favorecendo a sua permeabilidade na membrana.

A principal atividade dos ácidos é atribuída às moléculas não dissociadas, que ocorre em valores de pH baixos. O predomínio da forma não dissociada de ácidos lipofílicos favorece a sua permeabilidade na membrana plasmática por difusão. No citoplasma, com o pH próximo a 7,0 as moléculas de ácido são dissociadas e se acumulam dentro da célula, diminuindo o pHi (pH intracelular), acidificando-o e inibindo o metabolismo, especialmente as enzimas glicolíticas (BRUL; COOTE, 1999; STRATFORD; ANSLOW, 1998). A interferência no metabolismo provocadas por ácidos orgânicos, reduz da taxa de crescimento e estende a fase de declínio microbiano (PELÁEZ et al., 2012; MOLINA; GIANUZZI, 1999).

Com os resultados obtidos *in vitro* é possível propor a indústria testes *in loco*, em concentrações mais baixas de ácidos orgânicos em relação às concentrações recomendadas pelos fornecedores de agente antifúngico comercial. Exemplificando, atualmente é recomendado para rações melaçadas, o uso de ácido propiônico na concentração de 0,5 % (67,49 mM) no melaço. Considerando o preço destes agentes, o ácido acético (80 %) é o de menor custo (US\$ 1,43 / kg), seguido do ácido propiônico (US\$ 3,51 / kg, 65 %), ácido láctico (US\$ 5,68/kg, 85 %) e sorbato de potássio (US\$ 7,45 / kg, 98 %), considerando a cotação em setembro de 2017. Considerando o valor do ácido propiônico comumente utilizado pelas indústrias, calculou-se o custo relativo das combinações (Tabela 8) Devido a maior concentração requerida e maior custo, as combinações com ácido láctico se revelaram as mais caras. Mas as demais combinações apresentariam menor custo que o ácido propiônico utilizado industrialmente. Embora o sorbato de potássio seja o mais caro a combinação com ácido propiônico poderia reduzir 24,63 % do custo deste último sozinho. Destaca-se ainda a combinação do ácido acético e sorbato de potássio, que representaria uma economia de 70,19 % para a indústria. Economia ainda mais vantajosa de 78,42 %

seria possível se aplicada a combinação de ácido acético e propiônico. O uso de compostos antimicrobianos em alimentos é resultante primeiramente de testes obtidos *in vitro* onde as condições do experimento são controladas. Há de considerar que estes valores são estimados e na escala industrial os ajustes são necessários, mas ainda assim, os valores são expressivos.

Tabela 8 – Custo relativo da combinação de ácidos orgânicos de sorbato de potássio em relação ao ácido propiônico comercial.

<b>Compostos comerciais * (US\$.kg<sup>-1</sup>)</b>	<b>Concentração (%)</b>	<b>Custo relativo** (%)</b>
<b>AP comercial (5,40)</b>	<b>0,5</b>	
AA (1,79) + AP (5,40)	0,25 + 0,025	-78,42
AA (1,79) + SP (7,60)	0,025 + 0,1	- 70,19
AL (6,68) + SP (7,60)	0,4 + 0,4	+111,55
AA (1,79) + AL (6,68)	0,25 + 0,4	-1,03
AL (6,68) + AP (5,40)	0,4 + 0,1	+18,96
AP (5,40) + SP (7,60)	0,025 + 0,25	-24,63

\* preço considerando 100 % do produto; \*\* custo relativo ao AP comercial

Fonte: Autora.

Para aplicação de ácidos orgânicos como agentes antifúngicos em rações, há de se considerar os constituintes da ração, e também do melaço, no caso de rações melaçadas, que poderão interferir para que não haja a mesma redução de pH obtida nos testes *in vitro*. O crescimento de bolores em alimentos depende de diversos fatores como a composição do produto, pH, atividade de água, temperatura, umidade relativa, presença e concentração de conservantes, bem como tempo de armazenamento (KOSEGARTEN et al., 2017). Se armazenadas em locais com temperaturas e umidade relativa elevadas, a ração absorverá a água do ambiente, elevando sua atividade de água e umidade, proporcionando condições favoráveis a proliferação fúngica. O uso de conservantes com ação antifúngica, poderá servir então de barreira para o controle dessas condições de armazenamento.

## CONCLUSÃO

Considerando que as contagens de bolores e leveduras nas amostras de milho e ração chegaram à valores de 4 Log UFC.g<sup>-1</sup>, além da presença do gênero *Aspergillus* sp. e a presença de AFB<sub>1</sub> em três amostras de milho, mesmo que abaixo dos limites aceitáveis, o alerta se dá aos riscos de recontaminação do produto final. Os ácidos acético e propiônico apresentaram sinergismo *in vitro* quando combinados com sorbato de potássio no controle de *Aspergillus flavus*. As determinações da CIM

e do ICFI se destacam, pois, revelaram menores concentrações necessárias para controle fúngico, com possibilidade de redução de custos quando comparados as doses de ácido propiônico comumente aplicado na indústria.

## REFERÊNCIAS

BELLAVER, C.; SCHEUERMANN, G. Aplicações dos ácidos orgânicos na produção de aves de corte. In: Conferência Avisul, 2005, Florianópolis. **Anais**. Florianópolis: [s.n.], 2005. p. 1-16.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **RDC nº 7/11**. Regulamento Técnico sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos. Diário Oficial da União, Brasília-DF, 18 fev. 2011. Seção 1, p.66-67.

BRUL, S.; COOTE, P. Preservative agents in foods Mode of action and microbial resistance mechanisms. **International Journal of Food Microbiology**, v. 50, p. 1-17, 1999.

CORADI, P.C. et al. Effects of the feed processing in the reduction of the microbiological contamination on the final product. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v.15, n.1, p.81-92, 2013.

CRAMER, J. A.; PRESTEGARD, J. H. NMR studies of pH/induced transport of carboxylic acids across phospholipids vesicle membranes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.75, p.295-301, 1977.

DIDWANIA, N.; JOSHI, M. Mycotoxins: a critical review on occurrence and significance. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v.5, p.1014-1019, 2013.

FAO. **Good Practices for the Feed Industry** - Implementing the Codex Alimentarius Code of Practice on Good Animal Feeding. n.9 Roma: Fao Animal Production and Health, 2010.

FDA- Food and Drug Administration. Select Committee on GRAS Substances (SCOGS) Opinion: Calcium Lactate, Lactic Acid. **GRAS Substances (SCOGS) database**. US Food and Drug Administration. 2015a.

FDA- Food and Drug Administration. Select Committee on GRAS Substances (SCOGS) Opinion: Acetic Acid; Sodium Acetate; Sodium Diacetate. **GRAS Substances (SCOGS) database**. US Food and Drug Administration. 2015b.

FDA- Food and Drug Administration. Select Committee on GRAS Substances (SCOGS) Opinion: Calcium propionate; Dilauryl thiodipropionate; Propionic acid; Sodium propionate; Thiodipropionic acid. **GRAS Substances (SCOGS) database**. US Food and Drug Administration. 2015c.

FDA- Food and Drug Administration. Select Committee on GRAS Substances (SCOGS) Opinion: Calcium sorbate, Potassium sorbate, Sodium sorbate, Sorbic acid. **GRAS Substances (SCOGS) database**. US Food and Drug Administration. 2015d.

GUYNOT, M.E.; RAMOS, A.J.; SANCHIS, V.; MARÍ, S. Study of benzoate, propionate, and sorbate salts as mould spoilage inhibitors on intermediate moisture bakery products of low pH (4.5–5.5). **International Journal of Food Microbiology**, v.101, p.161-168, 2005.

HANSCH, C. et al. Exploring QSAR - Hydrophobic, Electronic, and Steric Constants. **Washington, DC: American Chemical Society**, v.39, p.1189-1191, 1996.

HIGGINS, C.; BRINKHAUS, F. Efficacy of several organic acids against mold. **Journal of Applied Poultry Research**, v.8, p.480-487, 1999.

HUANG, Y. et al. Evaluation of the efficacy of four weak acids as antifungal preservatives in low-acid intermediate moisture model food systems. **International Journal of Food Microbiology**, v.27, p.33-36, 2010.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ (IAL). **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz: Métodos Químicos para Análise de Alimentos**. 4. ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008.

KOSEGARTEN, C.E. et al. Description of *Aspergillus flavus* growth under the influence of different factors (water activity, incubation temperature, protein and fat concentration, pH, and cinnamon essential oil concentration) by kinetic, probability of growth, and time-to-detection models. **International Journal of Food Microbiology**, v.240, p.115-123, 217.

LACHOWICZ, K.J. et al. The synergistic preservative effects of the essential oils of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.) against acid-tolerant food microflora. **Letters in Applied Microbiology**, v. 26, p.209-214, 1998.

LEGISA, M.; GRDADOLNIK, S.G. Influence of Dissolved Oxygen Concentration on Intracellular pH and Consequently on Growth Rate of *Aspergillus niger*. **Food Technology and Biotechnology**, v.40, p.27-32, 2002.

LIND, H.; JONSSON, H.; SCHNÜRER, J. Antifungal effect of dairy propionibacteria contribution of organic acids. **International Journal of Food Microbiology**, v.98, p. 157-65, 2005.

MACIOROWSKI, K.G. Effects on poultry and livestock of feed contamination with bacteria and fungi. **Animal Feed Science and Technology**, v.133, p.109-136, 2007.

MOLINA, M.; GIANNUZZI, L. Combined effect of temperature and propionic acid concentration on the growth of *Aspergillus parasiticus*. **Food Research International**, v. 32, p.677-688, 1999.

MUYNCK, C. et al. Potential of selected lactic acid bacteria to produce food compatible antifungal metabolites. **Microbiological Research**, v.54, p.339-346, 2004.

NAZER, A.I. et al., Combinations of food antimicrobials at low levels to inhibit the growth of *Salmonella* sv. *Typhimurium*: a synergistic effect?. **Food Microbiology**, v.22, p.391-398, 2005.

NOBRE, M.O. NASCENTE, P.S.; MEIRELES, M.C.; FERREIRO, L. Drogas Antifúngicas para Pequenos e Grandes Animais. **Ciência Rural**. v.32, n.1, p.175-184, 2002.

ODDS, F. C. Synergy, antagonism, and what the checkerboard puts between them. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 52, n. 1, 2003.

O'Neil, M.J. (ed.). The Merck Index - An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals. Cambridge, UK: Royal Society of Chemistry, p. 1613, 2013.

PELÁEZ, A.M et al. Inhibitory activity of lactic and acetic acid on *Aspergillus flavus* growth for food preservation. **Food Control**, v. 24, p.177-183, 2012.

PERIAGO, P.M.; PALOP, A.; FERNÁNDEZ, P.S. Combined effect of nisin, carvacrol and thymol on the viability of *Bacillus cereus* heat-treated vegetative cells. **Food Science and Technology**, v.7, n.6, p.487-492, 2002.

PIPER, P.W. Yeast superoxide dismutase mutants reveal a pro-oxidant action of weak organic acid food preservatives. **Free Radical Biology and Medicine**, v.27, n.11, p.1219-1227, 1999.

REGULAMENTO DA COMUNIDADE EUROPEIA (CE). **Instrução Normativa 2003/100**. Substâncias Indesejáveis nos Alimentos para Animais. Diário Oficial da União Europeia. 31 out.2003, p.31-37.

SILVA, et al. **Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos**. 3 ed. São Paulo: Varela, 2007.

STRATFORD, M.; ANSLOW, P.A. Evidence that sorbic acid does not inhibit yeast as a classic 'weak acid preservative'. **Letters in Applied Microbiology**, v. 27, p.203-206, 1998.

VICAM. **Aflatest instruction manual**. Vicam, Watertown, MA: Vicam, 2002.

YORK, G.K., VAUGHN, R.H. Mechanisms in the inhibition of microorganisms by sorbic acid. **Journal of Bacteriology**, v.88, p.411-417, 1964.

WEAST, R.C. **Handbook of Chemistry and Physics**. 60th ed. Boca Raton, Florida: CRC Press Inc., 1979.

## ARTIGO 2 – ESTABILIDADE DE RAÇÕES PELETIZADAS COM MELAÇO EXTERNO UTILIZANDO COMBINAÇÕES DE ÁCIDOS ORGÂNICOS E SAL.

### RESUMO

As rações destinadas à animais, são produzidas a partir de grãos e cereais, os quais são naturalmente contaminados por bolores. Devido a produção de micotoxinas por algumas espécies fúngicas, a presença destes representa um risco à saúde humana e animal. Os ácidos orgânicos e suas combinações são uma alternativa para controlar o crescimento fúngico em grãos e rações. No entanto, as dosagens a serem utilizadas para sua real efetividade requerem mais estudos. O objetivo desta pesquisa foi determinar a estabilidade de rações peletizadas com melaço externo adicionadas de combinações de ácidos orgânicos. Foram preparados 7 tratamentos (T1: Controle sem ácido, T2: AP comercial, T3: AP1 0,025%, T4: AP2 0,1%, T5: AP+AC 0,025+0,25%, T6: AP+SP 0,025+0,25% e T7: AP+AL 0,1+0,4%) com concentrações de ácidos orgânicos e avaliado a estabilidade na ração armazenada por um período de 60 dias. As análises de contagem total de bolores e leveduras, umidade, pH, atividade de água e acidez, foram realizadas nos tempos 1, 7, 14, 30, 45 e 60 dias. Não foi possível avaliar os diferentes tratamentos quanto a estabilidade das rações peletizadas com melaço externo ao longo do armazenamento. Sendo que, a atividade de água foi o principal interferente no estudo de estabilidade da ração, pois os valores de  $A_w$  ao longo do armazenamento foram inferiores aos limites mínimos necessários para o desenvolvimento de fungos deteriorantes (0,80). Ocorreu a redução de 2 Log UFC.g<sup>-1</sup> para 1 Log UFC.g<sup>-1</sup> na contagem de bolores e leveduras ao final do experimento para todos os tratamentos, independente da concentração de ácido. Não foi possível estabelecer uma correlação da redução da contaminação fúngica e a adição dos ácidos orgânicos, visto que, os fatores intrínsecos e extrínsecos tiveram influência direta nos resultados obtidos.

**Palavras-chave:** Antifúngico. Vida de prateleira. Nutrição animal. Preservação. Alimentação e Rações.

### INTRODUÇÃO

A inocuidade alimentar é um desafio incessante na formulação da dieta das diferentes espécies animais, principalmente porque diversas classes de contaminantes podem ser veiculados pelos alimentos, afetando a saúde, a produção e ainda entrar na cadeia alimentar (DILKIN et al., 2016).

A ração animal em função da sua composição e de suas matérias-primas serem grãos e cereais é naturalmente contaminada por diversos fungos, os quais podem ser também produtores de micotoxinas, representando um risco de saúde para

animais e humanos (GONÇALVES; CORASSIN; OLIVEIRA, 2015; ALONSO et al., 2013). Além dos riscos de produção de micotoxinas, fungos em rações para animais de produção remetem a perdas econômicas, redução de nutrientes, afetam a palatabilidade e desempenho dos animais (DANTIGNY et al., 2005).

A ocorrência de fungos em ração está relacionada principalmente à utilização de produtos contaminados. No entanto, algumas espécies podem resistir ao processamento e tratamento térmico, como é o caso da peletização das rações, e se desenvolver em rações armazenadas desde que expostas a ambientes com condições propícias ao desenvolvimento fúngico, como alta umidade relativa e temperaturas (FAO, 2004).

Uma alternativa para o controle da contaminação fúngica, é o uso de ácidos orgânicos de cadeia curta, que possuem um vasto campo de aplicação em alimentos, matérias-primas e rações. Podem ser utilizados como acidulantes, antimicrobianos e como melhoradores de desempenho à animais (RICKE et al., 2003).

A utilização de combinações de ácidos orgânicos e sais pode propiciar a redução das concentrações utilizadas individualmente, garantido a eficácia no controle de bolores e leveduras (SAVARD et al., 2002). Portanto, o trabalho teve como objetivo determinar a estabilidade de rações peletizadas com melaço externo adicionadas de combinações de ácidos orgânicos e sal através de 7 tratamentos com ácido propiônico, e suas combinações com ácido acético, láctico e sorbato de potássio para o controle do desenvolvimento fúngico.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Amostragem**

Para realização do teste de estabilidade em ração peletizada com melaço externo com adição de combinação de ácidos orgânicos e sal, foram coletadas amostras da ração e das demais matérias-primas que compunham a formulação em uma indústria processadora. Foram coletados 40 kg de ração peletizada, 2,5 kg de melaço líquido, 3,5 kg de aveia laminada e 500 g de óleo degomado. No laboratório da UTFPR-FB adicionou-se o melaço e as demais matérias-primas que o envolvem, seguindo criteriosamente a mesma formulação utilizada pela indústria.

## Aplicação dos ácidos orgânicos nas rações peletizadas com melão externo

As concentrações de ácidos orgânicos utilizadas foram determinadas a partir do resultado do teste de concentração inibitória mínima (CIM), de acordo com o Artigo 1, dos ácidos combinados (Tabela 9).

Tabela 9 - Tratamentos e concentrações de ácidos orgânicos para o teste de estabilidade

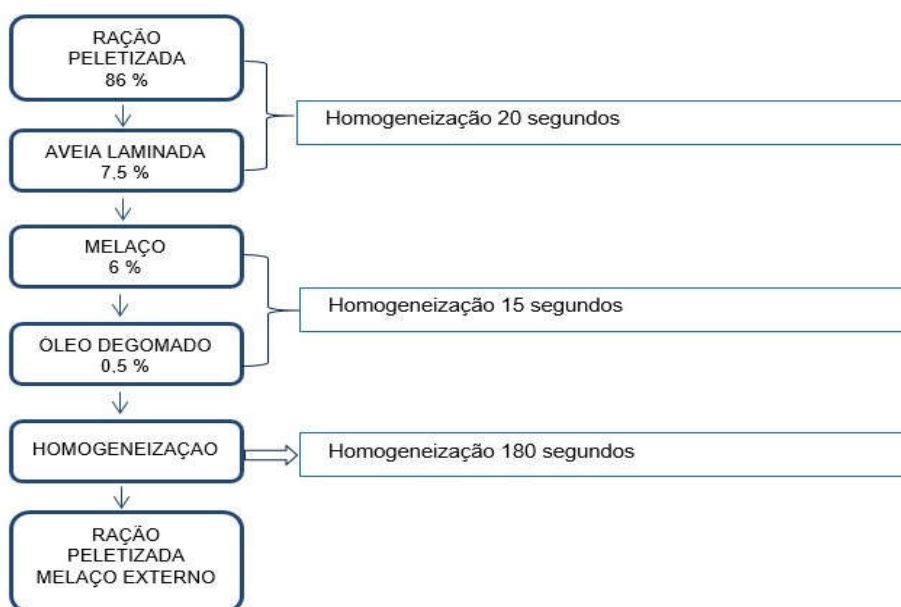
Tratamento	Concentração Preparada (%)	Concentração Final na Ração % (mM)
T1 Controle sem ácido	0	0
T2 Ácido Propiônico Comercial	65	0,5 (67,49)
T3 Ácido Propiônico 1	3,25	0,025 (3,37)
T4 Ácido Propiônico 2	13	0,1 (13,49)
T5 Ácido Propiônico + Ácido Acético	6,5 + 65	0,025 (3,37) + 0,25 (41,63)
T6 Ácido Propiônico + Sorbato Potássio	6,5 + 65	0,025 (3,37) + 0,25 (16,64)
T7 Ácido Propiônico + Ácido Lático	13 + 52	0,1 (13,49) + 0,4 (44,40)

Fonte: Autora

As soluções testes foram misturadas, adicionando 0,8 g da solução teste por 100 g de melão. Foram preparados 07 tratamentos em 3 repetições, totalizando 126 amostras. Após a adição das soluções testes ao melão e homogeneização, realizou-se a inclusão de 86 % de ração peletizada juntamente com 7,5 % de aveia laminada e procedeu-se uma pré-homogeneização por 20 segundos. O melão (6 %) já acidificado foi adicionado a 0,5 % de óleo degomado. A mistura melão com óleo degomado foi homogeneizada por 15 segundos e adicionada ao equipamento juntamente com os demais constituintes da formulação. Após a adição de todas as matérias-primas a ração peletizada, realizou-se a homogeneização por um período de 180 segundos em um tacho de aço inox mecanizado, com aquecimento em banho-maria, tipo basculante, com mexedores internos helicoidais. As amostras foram embaladas em pacotes e selados para a realização dos testes de estabilidade. A Figura 6 representa o fluxograma de produção da ração peletizada com melão externo.



Figura 6 - Fluxograma do processo de produção de ração peletizada com melação externo



Fonte: Autora.

### Determinação da estabilidade de rações peletizadas com melação externo

O teste de estabilidade das rações peletizadas com melação externo foi realizado com adaptações da IN 15 (BRASIL, 2005), para testes de estabilidade em medicamentos para uso veterinário.

O teste de estabilidade acelerada foi realizado por um período de 60 dias em estufa BOD. Nos primeiros 30 dias a estufa BOD foi mantida a 30 °C e nos 30 dias subsequentes, a 40 °C. No interior da estufa foram adicionados recipientes com água, para aumentar a umidade relativa. A temperatura e umidade relativa foram acompanhadas diariamente com o auxílio de um termohigrômetro, a partir do 30° dia, foram adicionados mais recipientes com água no interior da BOD para que a umidade relativa chegasse a 80 %, aumentando a atividade de água da ração.

As análises realizadas nas amostras de ração foram contagem total de bolores e leveduras, atividade de água (Aa) umidade, pH e acidez através dos métodos descritos no Instituto Adolfo Lutz, Portaria 108 e IN 62 do MAPA nos tempos 1, 7, 14, 30, 45 e 60 dias (IAL, 2008; BRASIL, 1991, BRASIL, 2003).

A estabilidade das rações foi determinada com base nos resultados apresentados para Aa, umidade, pH, contagem de bolores e leveduras, e acidez total,

avaliando a ação da combinação dos ácidos orgânicos nas características físico-químicas e microbiológicas das rações peletizadas com melaço externo.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **Determinação da estabilidade de rações peletizadas com melaço externo**

O crescimento de bolores em alimentos depende de diversos fatores como a composição do produto, pH, atividade de água, temperatura, umidade relativa, presença e concentração de conservantes, bem como tempo de armazenamento (KOSEGARTEN et al., 2017).

A maioria das pesquisas voltadas em avaliar o tempo de crescimento ou deterioração causada por um microrganismo é realizada em meios apropriados para o seu desenvolvimento, os fatores como composição dos alimentos, capacidade de interações microbianas e a presença de agentes antimicrobianas não são considerados (GOUGOULI et al., 2011).

Para verificar a possível eficiência no controle fúngico de rações peletizadas com melaço externo, foram realizados testes com agentes antifúngicos adicionando ácidos orgânicos e sal. Considerando que as matérias-primas das rações são grãos e cereais, e que esses estão naturalmente contaminados por fungos desde o campo até o armazenamento e processamento, a ração também apresenta uma carga inicial de contaminação. Aliada a presença do melaço adicionado externamente a ração, a sua característica higroscópica pode favorecer a absorção de água do ambiente. Se armazenadas em locais com temperaturas e umidade relativa elevadas, a ração absorverá a água do ambiente, elevando sua atividade de água e umidade, proporcionando condições favoráveis a proliferação fúngica.

As amostras de ração foram armazenadas por um período de 60 dias e analisadas ao longo do tempo em relação a alterações físico-químicas e microbiológicas. A Tabela 10 expressa os resultados das análises microbiológicas na ração ao longo do armazenamento.

Tabela 10 - Contagem total de bolores e leveduras ração ao longo do armazenamento

Tratamento	Contagem (Log UFC.g <sup>-1</sup> )					
	1 dia	7 dias	14 dias	30 dias	45 dias	60 dias
T1	2,56 ± 0,37	2,71 ± 0,05	2,05 ± 0,17	2,36 ± 0,41	1,93 ± 0,06	n.d**
T2	2,46 ± 0,09	2,57 ± 0,21	1,84 ± 0,33	2,42 ± 0,40	1,53 ± 0,20	0,9 ± 0,85
T3	2,32 ± 0,21	2,54 ± 0,26	1,29 ± 1,12	2,64 ± 0,40	1,62 ± 0,28	0,83 ± 0,75
T4	2,65 ± 0,19	2,63 ± 0,09	1,74 ± 0,46	2,32 ± 0,47	1,29 ± 1,12	1,63 ± 0,59
T5	2,55 ± 0,06	2,55 ± 0,38	2,05 ± 0,20	2,40 ± 0,22	1,83 ± 0,08	1,10 ± 1,01
T6	2,41 ± 0,17	2,65 ± 0,26	2,00 ± 0,15	2,24 ± 0,81	1,74 ± 0,16	0,87 ± 0,80
T7	2,25 ± 0,09	2,36 ± 0,25	1,53 ± 0,40	2,29 ± 0,32	1,81 ± 0,31	n.d**

\*Os resultados acima se referem à média ± desvio padrão de três repetições analisadas em duplicata.

\*\* n.d: Não detectado. T1: Controle sem ácido; T2: AP comercial; T3: AP1 (0,025%); T4: AP2 (0,1%); T5: AP+AC (0,025+0,25%); T6: AP+SP (0,025+0,25%); T7: AP+AL (0,1+0,4%).

Fonte: Autora.

Os resultados da análise realizada no primeiro e sétimo dia de coleta para contagem total de bolores e leveduras, demonstram que a contaminação natural inicial da ração e após 7 dias na BOD a 30 °C variou de 2,25 a 2,71 Log UFC.g<sup>-1</sup> para todos os tratamentos realizados. Pode-se verificar um pequeno aumento nas contagens de uma semana para a outra, no entanto, mantendo-se na mesma escala logarítmica, 2 Log UFC.g<sup>-1</sup>. Não sendo possível verificar diferenças entre os tratamentos realizados.

Após 14 dias de armazenamento, em todos os tratamentos, incluindo controle sem ácido (T1) é possível verificar uma redução da contagem fúngica. Os tratamentos 2, 3, 4 e 7 passaram de 2 Log UFC.g<sup>-1</sup> para cerca de 1 Log UFC.g<sup>-1</sup>. O tratamento 3 (Ácido propiônico 0,025 %), foi o que sofreu a maior redução, passando de 2,54 para 1,29 Log UFC.g<sup>-1</sup>.

Após 30 dias de armazenamento, a contagem fúngica apresentou uma alteração de 1 Log para Log 2 UFC.g<sup>-1</sup> em todas as amostras, independente do tratamento, variando de 2,29 Log UFC.g<sup>-1</sup> (T7) a 2,64 Log UFC.g<sup>-1</sup> (T3).

Os resultados da análise realizada aos 45 dias demonstram um decréscimo na contagem de bolores e leveduras para todas as amostras. Sem exceção, os tratamentos sofreram redução de 2 Log UFC.g<sup>-1</sup> para 1 Log UFC.g<sup>-1</sup>, em contagens que variaram de 1,29 Log UFC.g<sup>-1</sup> para o tratamento 4 (Ácido propiônico 0,1 %), até 1,93 Log UFC.g<sup>-1</sup> para o tratamento 1 (controle). No final do experimento, em 60 dias de armazenamento a contagem fúngica variou de n.d (T1 e T7) a 1,63 Log UFC.g<sup>-1</sup> (T4)

A contaminação fúngica inicial das rações para animais de produção apresenta bastante variações entre as indústrias, podendo ser em decorrência das

matérias-primas utilizadas, bem como as técnicas de armazenamento e controle de qualidade. Alguns estudos sugerem contaminações de 2 a 3 Log UFC.g<sup>-1</sup> (GABBI; CYPRIANO; PICCININ, 2011; GUERRA et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2006) até 5 Log UFC.g<sup>-1</sup> (ROSA et al., 2005; GUERRA et al., 2005).

A legislação brasileira não estabelece padrões legais para contaminação fúngica e nem limite máximo tolerado em ração animal. No entanto, padrões utilizados em outros países, recomenda-se contagens inferiores a 4 Log UFC/g (Good Manufacture Practice – GMP, 2008).

Os baixos valores de contagem fúngica (Tabela 10), não podem ser associados à efetividade dos ácidos orgânicos ao controle microbiano, visto que, o tratamento controle (T1) também sofreu inibição. Os fatores intrínsecos relacionados à ração, atividade de água e pH, e os fatores extrínsecos, temperatura e umidade relativa durante a armazenagem foram os principais interferentes (PITT; HOCKING, 2009). Para avaliar a estabilidade das rações armazenadas através da contaminação por bolores e leveduras, é necessário estabelecer a correlação com os teores de atividade de água do produto (AQUINO; POTENZA, 2013). A Tabela 11 demonstra os resultados de atividade de água para a ração armazenada.

Tabela 11 - Atividade de água ração ao longo do armazenamento

T	Atividade de Água					
	1 dia	7 dias	14 dias	30 dias	45 dias	60 dias
T1	0,59±0,014 <sup>bA</sup>	0,56±0,010 <sup>bA</sup>	0,48±0,043 <sup>cA</sup>	0,51±0,003 <sup>cA</sup>	0,76±0,0002 <sup>aA</sup>	0,77±0,003 <sup>aA</sup>
T2	0,60±0,012 <sup>bA</sup>	0,55±0,005 <sup>cA</sup>	0,50±0,023 <sup>dA</sup>	0,51±0,009 <sup>dA</sup>	0,75±0,003 <sup>aA</sup>	0,75±0,015 <sup>aAB</sup>
T3	0,61±0,003 <sup>bA</sup>	0,54±0,025 <sup>cA</sup>	0,49±0,010 <sup>dA</sup>	0,51±0,004 <sup>cdA</sup>	0,76±0,004 <sup>aA</sup>	0,75±0,010 <sup>aAB</sup>
T4	0,60±0,013 <sup>bA</sup>	0,55±0,002 <sup>cA</sup>	0,51±0,008 <sup>dA</sup>	0,51±0,005 <sup>dA</sup>	0,75±0,005 <sup>aA</sup>	0,74±0,005 <sup>aB</sup>
T5	0,59±0,016 <sup>bA</sup>	0,54±0,038 <sup>cA</sup>	0,50±0,013 <sup>cA</sup>	0,51±0,005 <sup>cA</sup>	0,76±0,002 <sup>aA</sup>	0,75±0,004 <sup>aAB</sup>
T6	0,61±0,011 <sup>bA</sup>	0,55±0,004 <sup>cA</sup>	0,50±0,014 <sup>dA</sup>	0,51±0,004 <sup>dA</sup>	0,76±0,005 <sup>aA</sup>	0,74±0,008 <sup>aB</sup>
T7	0,60±0,015 <sup>bA</sup>	0,54±0,034 <sup>cA</sup>	0,50±0,007 <sup>cA</sup>	0,50±0,001 <sup>cA</sup>	0,76±0,002 <sup>aA</sup>	0,75±0,012 <sup>aAB</sup>

\*Os resultados acima se referem à média ± desvio padrão de três repetições analisadas em triplicata. Letras iguais minúsculas nas linhas e letras iguais maiúsculas na coluna e indicam média estatisticamente iguais pelo teste de Tukey com 5% de significância. T1: Controle sem ácido; T2: AP comercial; T3: AP1 (0,025%); T4: AP2 (0,1%); T5: AP+AC (0,025+0,25%); T6: AP+SP (0,025+0,25%); T7: AP+AL (0,1+0,4%).  
Fonte: Autora.

A atividade de água da ração armazenada variou de 0,48 a 0,61 nos tempos 1 a 30 dias de armazenamento. Alguns trabalhos que relacionam a atividade de água com o crescimento fúngico em rações apresentaram contagens baixas de bolores e leveduras em faixas de atividade de água que variaram de 0,48 a 0,69 (AQUINO; POTENZA, 2013; GARCIA, 2004).

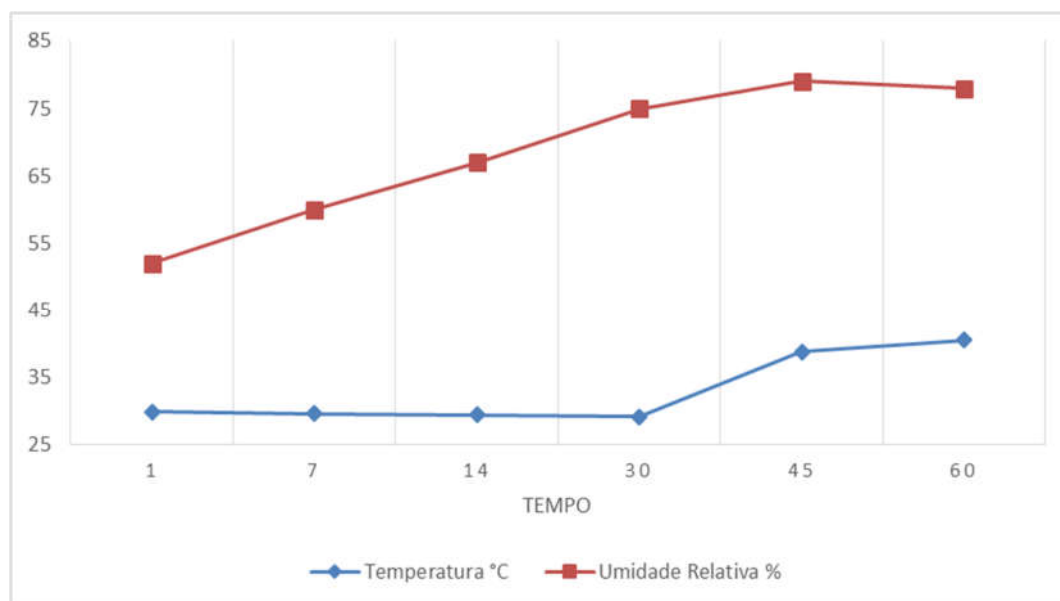
Independentemente do tratamento ou concentração de ácido aplicada, os valores de atividade de água nas faixas representadas são considerados muito baixos para o desenvolvimento de qualquer microrganismo, até mesmo fungos xerofílicos, que suportam atividade de água até a 0,65 (PITT; HOCKING, 2009). Ainda assim, nessas faixas de atividade de água, seria fundamental a combinação de outros fatores como temperatura e umidade para que houvesse o desenvolvimento. Fungos deteriorantes exigem Aa mínima de 0,80 (FRANCO, 2008).

Nesse contexto, os fungos *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium* representam o maior risco e preocupação em rações, pois são vinculados a prejuízos econômicos e nutricionais, além da possibilidade de produção de micotoxinas, que podem acometer animais e humanos (SCUSSEL, 2002; FRISVAD; NIELSEN; SAMSON, 2006). As faixas de atividade de água para *A. flavus*, e *Penicillium* que são fungos de armazenamento estão próximas a 0,80 (CÁNOVAS et al., 2007), já *Fusarium* que acomete os grãos principalmente no campo, necessita de teores mais elevados de atividade de água, no mínimo 0,88 (GIMENO; MARTINS, 2011). Para micotoxinas, a atividade de água requerida é maior, estando em faixas de 0,85 a 0,99 para aflatoxina, ocratoxina e fumonisina (ICMSF, 1996; MALLOZZI; CORRÊA, 1998).

Considerando que os fungos deteriorantes são os de maior interesse no que diz respeito ao controle fúngico em rações, e que esses requerem teores de atividade de água mínima próximo a 0,80, para verificar a eficácia dos ácidos orgânicos com potencial antifúngico, é de extrema importância que o produto seja exposto a condições favoráveis para que ocorra o desenvolvimento fúngico, e se possa avaliar o efeito dos ácidos e concentrações testadas.

A atividade de água e a UR exercem correlação importante, visto que o produto tende a estabilizar de acordo com a umidade relativa em que está exposto (GAVA, 2008). O resultado das médias de temperatura e umidade relativa ao longo do armazenamento estão expressos na Figura 7.

Figura 7 - Umidade relativa e temperatura ao longo do armazenamento



Fonte: Autora.

No primeiro dia de armazenamento, as amostras de ração apresentaram atividade de água média de 0,60 e a umidade relativa estava em 52 %. O primeiro resultado representa a característica da ração, onde após o processamento sua atividade de água é próxima a 0,60.

Após 7 dias de armazenamento, a atividade de água das amostras foi de 0,54 e umidade relativa de 60 %. As análises realizadas aos 14 dias de armazenamento, demonstraram uma redução ainda maior na atividade de água da ração, estando em média com 0,49 de Aa e UR de 67 %. Com 30 dias de armazenamento, a média da Aa subiu para 0,50 e a UR estava na faixa de 75 %. É possível verificar um aumento nos níveis de UR até os 30 dias de armazenamento, no entanto esse mesmo aumento não refletiu na atividade de água das amostras. Este aumento reflete as condições climáticas do período chuvoso (15/05 a 01/06), indicando que a estufa não foi capaz de assegurar a umidade relativa nestas condições.

A temperatura na qual as amostras foram submetidas nos primeiros 30 dias de armazenamento (30 °C) pode ter influenciado para que não houvesse uma maior absorção da umidade, visto que, baixas temperaturas com umidade relativa alta, a quantidade de vapor d'água é menor (AL-MUHTASEB; MCMINN; MAGEE, 2002).

Com o intuito de acelerar o estudo de estabilidade do produto, após 30 dias a temperatura da BOD em que as amostras foram armazenadas foi alterada para 40 °C

objetivando-se aumentar a pressão de vapor d'água, para que umidade relativa chegasse a 80 % e conseqüentemente a atividade de água das amostras aumentasse, e assim fosse possível estudar os efeitos de cada tratamento. Quando estocados em ambientes com UR superior à sua Aa, os alimentos tendem a absorver umidade do ambiente, aumentando Aa e criando condições favoráveis ao desenvolvimento microbiano (AZEREDO, 2012).

A atividade de água e a umidade relativa estão interligadas. Quando um alimento está em equilíbrio com o ambiente, sua Aa se iguala à UR do ambiente. No caso das rações, esse equilíbrio só pode ser verificado a partir do 45° dia de armazenamento, em que os valores de atividade de água da ração foram de 0,75 e a UR 79 %, bem como no 60° dia que Aa era de 0,75 e a UR 78 % (Figura 7).

Para que fosse possível verificar a diferença entre os tratamentos com ácidos orgânicos e sal, seria necessário que as amostras apresentassem valores de atividade de água mais elevados, próximo a 0,80, bem como a umidade relativa na faixa de 80 % ou mais. Quando foi realizado o aumento da temperatura da BOD de 30 para 40 °C, a capacidade de absorção de água do ar aumentou, elevando também a umidade relativa. Dessa forma, se a UR fosse superior a 80 % os fungos encontrariam condições ideais para o seu desenvolvimento, e a ação dos antifúngicos poderia ser verificada.

Os resultados de atividade de água na ração armazenada influenciaram diretamente na contagem de bolores e leveduras (Tabela 10). Uma vez que, valores de atividade de água inferiores a 0,80 impedem o desenvolvimento de fungos filamentosos em matérias-primas e rações destinadas à alimentação animal (VALSECHI, 2006; JOUANY, 2007). Assim, mesmo com o aumento dos valores de atividade de água na ração, após 30 dias de armazenamento, próximos a 0,75 não foi suficiente para o desenvolvimento fúngico (Tabela 11).

Um estudo realizado com rações destinadas a frangos de corte avaliou a atividade de água para verificar a capacidade de crescimento fúngico durante o armazenamento em granjas avícolas. Os resultados confirmaram o aumento da atividade de água ao longo do armazenamento. Na fábrica, a ração apresentou Aa de 0,681 e após 10 dias de armazenamento, 0,693. No entanto, os valores de atividade de água apresentados mesmo depois do armazenamento, não estavam inseridos nos limites mínimos para desenvolvimento fúngico (0,78 Aa) (GARCIA, 2004).

Embora o tempo de armazenamento avaliado por Garcia (2004), tenha sido inferior ao realizado no presente estudo, as análises foram realizadas em condições de armazenamento cotidianas UR 70 %, umidade 12 % e atividade de água 0,69 (valores médios ao longo do armazenamento). Os resultados refletem o aumento da atividade de água durante o armazenamento devido as condições do ambiente, e também apresentou valores de atividade de água abaixo dos limites para o desenvolvimento fúngico.

O efeito da temperatura, pH, atividade de água e nove antifúngicos comerciais foram avaliados no crescimento de *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*. O crescimento máximo para os dois fungos ocorreu a 33 °C a pH 5 e atividade de água 0,99. Quando submetidos a 15 °C sem os agentes antifúngicos, houve crescimento com atividade de água 0,99, mas não a Aa 0,90. Todos os antifúngicos testados apresentaram atividade inibitória, e sua ação foi maior à medida que a atividade de água era reduzida (HOLMQUIST; WALKER; STAHR, 1983).

A baixa atividade de água nas rações peletizadas com melaço externo adicionadas dos ácidos orgânicos representou a principal barreira ao desenvolvimento fúngico. A atividade da água (Aa) e a temperatura são os fatores mais importantes que controlam o crescimento de fungos (NORTHOLT; EGMOND, PAULSCH, 1977).

Três rações para equinos, peixe e avestruz foram analisadas durante 4 meses, perante a qualidade microbiológica e físico-química. As rações foram armazenadas em três locais: Indústria, distribuidor ideal (T °C e UR controladas), e distribuidor problema (litoral de São Paulo, sem controle de T °C e UR). As rações armazenadas no distribuidor problema apresentaram contagens de bolores e leveduras, umidade e atividade de água superiores àquelas armazenadas na indústria e no distribuidor ideal, sendo que no 3° mês de análise as amostras já não estavam mais próprias para consumo, com contagens de bolores e leveduras acima de 4 Log UFC.g<sup>-1</sup> e bolor aparente até nas embalagens (GABBI; CYPRIANO; PICCININ, 2011).

As condições de armazenamento influenciam diretamente a qualidade e a estabilidade das rações. O maior desafio para as indústrias processadoras é garantir a estabilidade dos produtos nos distribuidores e clientes finais. Algumas condições como utilização da matéria-prima de qualidade, aliadas ao controle do processo na indústria, correto resfriamento da ração peletizada, controle de umidade, atividade de água e em alguns casos o uso de conservantes, viabilizarão a garantia da qualidade dos produtos. No entanto, é de suma importância o controle após a expedição da



indústria. A etapa de armazenamento seja nos distribuidores ou clientes finais deve ser realizada em locais livres de umidade e temperaturas elevadas, possibilitando que o produto mantenha a sua estabilidade ao longo do armazenamento.

As rações animais são classificadas como alimentos de umidade intermediária, apresentando valores de Aa entre 0,60 a 0,85, dependendo das condições de processamento e armazenamento. Possuem pH variável (5,0 a 7,0) que podem ser delimitados sobretudo pela inclusão de ácidos orgânicos na formulação, como conservante microbiano ou aditivo nutricional (JAY, 1978). A análise de pH nas amostras de ração peletizada com melaço externo analisadas durante o armazenamento para 7 tratamentos com ácidos orgânicos e sal estão representadas na Tabela 12.

Tabela 12 - pH ração ao longo do armazenamento

T	pH					
	1 dia	7 dias	14 dias	30 dias	45 dias	60 dias
T1	6,30±0,124 <sup>aA</sup>	6,17±0,019 <sup>abB</sup>	6,15±0,040 <sup>bA</sup>	6,25±0,022 <sup>abA</sup>	6,20±0,013 <sup>abA</sup>	5,94±0,010 <sup>cA</sup>
T2	6,24±0,015 <sup>aA</sup>	6,17±0,013 <sup>aB</sup>	6,08±0,044 <sup>abA</sup>	6,24±0,023 <sup>aA</sup>	6,26±0,144 <sup>aA</sup>	5,92±0,075 <sup>bA</sup>
T3	6,37±0,041 <sup>aA</sup>	6,25±0,051 <sup>abcA</sup>	6,18±0,065 <sup>bcA</sup>	6,30±0,065 <sup>abA</sup>	6,17±0,022 <sup>cA</sup>	5,92±0,023 <sup>dA</sup>
T4	6,25±0,036 <sup>aA</sup>	6,17±0,021 <sup>abcB</sup>	6,12±0,037 <sup>cA</sup>	6,21±0,020 <sup>abA</sup>	6,16±0,029 <sup>bcA</sup>	5,93±0,031 <sup>dA</sup>
T5	6,26±0,025 <sup>aA</sup>	6,19±0,016 <sup>abB</sup>	6,08±0,075 <sup>bA</sup>	6,19±0,018 <sup>abA</sup>	6,22±0,089 <sup>aA</sup>	5,88±0,014 <sup>cA</sup>
T6	6,28±0,049 <sup>aA</sup>	6,20±0,012 <sup>aB</sup>	6,15±0,070 <sup>aA</sup>	6,26±0,081 <sup>aA</sup>	6,16±0,020 <sup>aA</sup>	5,94±0,008 <sup>bA</sup>
T7	6,22±0,039 <sup>aA</sup>	6,13±0,022 <sup>bB</sup>	6,16±0,047 <sup>abA</sup>	6,15±0,015 <sup>abA</sup>	6,15±0,012 <sup>abA</sup>	5,88±0,024 <sup>cA</sup>

\*Os resultados acima se referem à média ± desvio padrão de três repetições analisadas em triplicata. Letras iguais minúsculas nas linhas e letras iguais maiúsculas na coluna e indicam média estatisticamente iguais pelo teste de Tukey com 5% de significância. T1: Controle sem ácido; AP comercial; T3: AP1 (0,025%); T4: AP2 (0,1%); T5: AP+AC (0,025+0,25%); T6: AP+SP (0,025+0,25%); T7: AP+AL (0,1+0,4%).  
Fonte: Autora.

O pH nas amostras de ração variou de 5,88 a 6,37 entre os 7 tratamentos testados durante o período de armazenamento de 60 dias (Tabela 12). Nos tempos 1 e 30 os valores de pH apresentam resultados mais elevados estando entre 6,15 (T7: AP+AL: 0,1+0,4%) e 6,37 (T3: AP1: 0,025%). Nos tempos 7, 14 e 45 dias de armazenamento ocorreu uma redução nos valores de pH para todos os tratamentos, incluindo controle sem ácido (T1). No último dia de coleta, foram obtidos os menores valores de pH entre 5,88 (T5: AP+AC: 0,025+0,25% e T7: AP+AL: 0,1+0,4%) e 5,94 (T1 controle e T6: AP+SP: 0,025+0,25%). O tratamento 7 (AP + AL) recebeu a maior concentração de ácido, apresentando os menores valores de pH durante todo o armazenamento. No entanto, mesmo na maior concentração testada (T7), os valores de pH estiveram bem acima do pKa dos ácidos (ácido láctico: 3,88; ácido propiônico: 4,88).

Cabe ressaltar que, as concentrações utilizadas nos tratamentos com combinações de ácidos orgânicos na ração peletizada com melaço externo foram as mesmas obtidas na concentração inibitória mínima (CIM) para *Aspergillus flavus* NRRL3251 produtor de aflatoxina. No entanto, quando aplicadas na ração, os constituintes da formulação e do melaço podem ter influenciado para que não houvesse a redução do pH nos mesmos níveis que obtidos *in vitro*. Para o experimento, os ácidos foram aplicados no melaço, que possui pH próximo a 5,58 (valores não representados), quando adicionado dos ácidos, a exemplo, o Tratamento 7 (AP+AL) atingiu pH de 5,09, quando no teste *in vitro* o valor foi de 3,81 (Artigo 1).

O uso de compostos antimicrobianos em alimentos é resultante em sua maioria de testes obtidos previamente *in vitro* onde se podem controlar as condições em que o experimento será realizado. No entanto, quando o mesmo composto/concentração é aplicado em produtos alimentares, cuja fabricação envolve diferentes formulações, com diferentes matérias-primas e processos, a eficácia pode ser substancialmente reduzida, podendo exigir dosagens maiores para obter a mesma eficácia obtida *in vitro* (WEISS; LOEFFLER; TERJUNG, 2015). Cabe ressaltar que, no presente estudo, a dosagem recomendada por um fabricante de ácido propiônico comercial para nutrição animal, cuja concentração é superior aos demais tratamentos realizados, foi avaliada (T2 0,5 %) e não foi verificado efeito.

A umidade é um fator extrínseco importante para a estabilidade de grãos e rações, quanto menor a umidade, menor a oportunidade de desenvolvimento fúngico. A faixa de umidade ótima para crescimento de fungos de armazenamento é acima de 14 %, com umidade relativa acima de 65 % (PEZZINI; VALDUGA; CANSIANI, 2005). Os resultados obtidos para análise de umidade da ração ao longo do armazenamento estão expressos na Tabela 13. Para a análise de umidade, não houve diferença significativa entre os tempos testados, por isso não serão representados na tabela.

Tabela 13 - Umidade ração ao longo do armazenamento

Tratamento	Umidade (%)					
	1 dia	7 dias	14 dias	30 dias	45 dias	60 dias
T1	11,5±0,42 <sup>a</sup>	11,8±0,35 <sup>a</sup>	11,5±0,25 <sup>a</sup>	11,5±0,91 <sup>a</sup>	11,4±0,43 <sup>a</sup>	11,5±0,35 <sup>a</sup>
T2	11,2±0,09 <sup>a</sup>	11,8±0,03 <sup>a</sup>	11,3±0,23 <sup>a</sup>	10,5±0,86 <sup>a</sup>	11,1±0,78 <sup>a</sup>	12,0±0,61 <sup>a</sup>
T3	11,3±0,28 <sup>a</sup>	11,7±0,19 <sup>a</sup>	11,4±0,27 <sup>a</sup>	10,6±0,81 <sup>a</sup>	11,2±0,45 <sup>a</sup>	11,1±0,30 <sup>a</sup>
T4	11,3±0,32 <sup>ab</sup>	12,1±0,46 <sup>a</sup>	11,3±0,45 <sup>ab</sup>	11,0±0,59 <sup>b</sup>	11,2±0,14 <sup>ab</sup>	11,6±0,29 <sup>ab</sup>
T5	11,2±0,13 <sup>bc</sup>	11,9±0,12 <sup>ab</sup>	11,2±0,32 <sup>abc</sup>	11,1±0,44 <sup>c</sup>	11,3±0,16 <sup>abc</sup>	11,9±0,26 <sup>a</sup>
T6	11,7±0,19 <sup>ab</sup>	12,2±0,15 <sup>a</sup>	11,4±0,36 <sup>ab</sup>	11,0±0,39 <sup>b</sup>	11,2±0,33 <sup>b</sup>	11,9±0,44 <sup>ab</sup>
T7	11,5±0,31 <sup>ab</sup>	12,4±0,71 <sup>a</sup>	11,7±0,13 <sup>ab</sup>	11,2±0,56 <sup>ab</sup>	10,7±0,45 <sup>b</sup>	11,3±0,48 <sup>ab</sup>

\*Os resultados acima se referem à média ± desvio padrão de três repetições analisadas em triplicata.

T1: Controle sem ácido; T2: AP comercial; T3: AP1 (0,025%); T4: AP2 (0,1%); T5: AP+AC

(0,025+0,25%); T6: AP+SP (0,025+0,25%); T7: AP+AL (0,1+0,4%).

Fonte: Autora.

Os valores de umidade sofreram poucas alterações durante o armazenamento e nos tempos de coleta. Os resultados variaram de 10,5 a 12,4 %. A baixa umidade encontrada inicialmente na ração pode ser resultado da etapa de resfriamento, que ocorre após a peletização, o produto é direcionado para o resfriador, visando o abaixamento da temperatura e também a redução da umidade a níveis inferiores a 13 %.

Em consequência dos valores de umidade, as baixas contagens de bolores e leveduras (Tabela 10) possivelmente estiveram relacionadas com os níveis de umidade considerados seguros para o não desenvolvimento fúngico nas rações. Mesmo que as amostras tenham sido submetidas a um ambiente com altos índices de umidade relativa (próximo a 80 %) e temperatura elevada, a embalagem de polietileno selada utilizada no experimento pode ter proporcionado uma barreira para a absorção da umidade. O tipo de embalagem, aliada a umidade relativa do local de estocagem influenciam na troca de umidade do meio (MARSH; BUGUSU, 2007; GENKAWA et al., 2008).

Para que pudesse ser verificada as diferenças entre os tratamentos com ácidos orgânicos e sal, poderiam ser utilizados sacos de polipropileno, os quais, em algumas indústrias ainda são utilizados para o armazenamento de rações. Essas bolsas, são permeáveis permitindo a troca de calor e umidade no decorrer do armazenamento (LESSARD, 2002). Em trabalho realizado por Rupollo e colaboradores (2004), foi possível identificar as diferenças nos teores de umidade avaliados (8, 11 e 14 %) durante o período de 12 meses de armazenamento de grãos de aveia acondicionados em sacos de polipropileno. Outra alternativa, é a utilização de embalagens de papel. O papel é altamente poroso, podendo absorver a umidade

e as trocas de temperatura a que for submetido (AZEREDO, 2012). Dessa forma, a embalagem não se torna uma barreira, o produto será submetido ao estresse causado pelo armazenamento, sendo possível avaliar sua estabilidade e ação dos antifúngicos adicionados.

A acidez é proveniente dos ácidos orgânicos presentes nos alimentos e rações, dos inseridos intencionalmente, assim como os resultantes das alterações químicas (IAL, 2008). Os ácidos orgânicos fornecem informações sobre a estabilidade, conservação e qualidade dos produtos, podem provocar alterações de cor, sabor, odor, sendo essas características desejáveis ou não em alguns alimentos (CECCHI, 2003). A Tabela 14 apresenta os dados para acidez da ração ao longo do armazenamento. Para a análise de acidez, não houve diferença significativa entre os tempos testados, por isso não serão representados na tabela.

Tabela 14 - Acidez na ração ao longo do armazenamento

T	Acidez mg.g <sup>-1</sup>					
	1 dia	7 dias	14 dias	30 dias	45 dias	60 dias
T1	2,59±0,19 <sup>ab</sup>	2,76±0,37 <sup>ab</sup>	2,65±0,37 <sup>ab</sup>	2,93±0,07 <sup>a</sup>	2,14±0,20 <sup>b</sup>	2,92±0,12 <sup>a</sup>
T2	2,70±0,16 <sup>a</sup>	2,63±0,34 <sup>a</sup>	2,78±0,29 <sup>a</sup>	3,14±0,32 <sup>a</sup>	2,55±0,13 <sup>a</sup>	3,00±0,02 <sup>a</sup>
T3	2,43±0,07 <sup>ab</sup>	2,76±0,42 <sup>ab</sup>	2,83±0,34 <sup>a</sup>	2,91±0,13 <sup>a</sup>	1,96±0,45 <sup>b</sup>	2,94±0,07 <sup>a</sup>
T4	2,60±0,14 <sup>a</sup>	2,46±0,11 <sup>a</sup>	2,68±0,28 <sup>a</sup>	3,16±0,18 <sup>a</sup>	1,65±0,59 <sup>b</sup>	3,06±0,05 <sup>a</sup>
T5	2,61±0,16 <sup>ab</sup>	2,83±0,27 <sup>a</sup>	2,54±0,24 <sup>ab</sup>	3,26±0,42 <sup>a</sup>	1,83±0,56 <sup>b</sup>	3,08±0,13 <sup>a</sup>
T6	2,58±0,20 <sup>ab</sup>	2,87±0,39 <sup>a</sup>	2,71±0,35 <sup>ab</sup>	3,13±0,17 <sup>a</sup>	1,77±0,72 <sup>b</sup>	3,00±0,14 <sup>a</sup>
T7	2,48±0,08 <sup>a</sup>	2,64±0,31 <sup>a</sup>	2,80±0,32 <sup>a</sup>	2,97±0,37 <sup>a</sup>	2,06±0,68 <sup>a</sup>	2,96±0,10 <sup>a</sup>

\*Os resultados acima se referem à média ± desvio padrão de três repetições analisadas em triplicata. Letras iguais minúsculas nas linhas indicam médias estatisticamente iguais pelo teste de Tukey com 5% de significância. T1: Controle sem ácido; T2: AP comercial; T3: AP1 (0,025%); T4: AP2 (0,1%); T5: AP+AC (0,025+0,25%); T6: AP+SP (0,025+0,25%); T7: AP+AL (0,1+0,4%).  
Fonte: Autora.

Os resultados para acidez na ração armazenada variaram de 1,65 mg.g<sup>-1</sup> a 3,26 mg.g<sup>-1</sup>. Os tratamentos 1 e 7 (controle e AP+AL) apresentaram resultados de acidez semelhantes no decorrer do armazenamento, variando de 2,14 a 2,93 mg.g<sup>-1</sup> (T1) e 2,06 a 2,97 mg.g<sup>-1</sup> (T7). O tratamento 2 (AP comercial) foi o que apresentou os maiores índices de acidez desde o primeiro dia de coleta, variando de 2,55 a 3,14 mg.g<sup>-1</sup>. O tratamento 2 foi realizado com um ácido comercial utilizado em fábrica de rações, cuja concentração de ácido propiônico é de 0,5 %. Os maiores índices de acidez podem ter sido influenciados pela ação do ácido comercial, bem como dos constituintes da ração.

No último dia de coleta, houve um aumento nos índices de acidez na ração para todos os tratamentos. Durante o armazenamento, as condições de temperatura,

umidade relativa, composição do produto, presença de luz dentre outros, acarretam em transformações químicas que afetam o índice de acidez (ELIAS, 2008).

O índice de acidez em ração farelada e peletizada foi avaliado ao longo de 90 dias de armazenamento, utilizando farelo de arroz como um dos constituintes da matéria-prima. Ambas as rações iniciaram o armazenamento com índice de acidez em torno de 2,0 mg.g<sup>-1</sup>. No final do armazenamento, os teores de acidez foram maiores na ração farelada, estando próximo de 5,0 mg.g<sup>-1</sup> e na ração peletizada ficou próximo a 3,0 mg.g<sup>-1</sup> (CARRERA et al., 2010). Mesmo que a peletização tenha apresentado um valor mais baixo para acidez em relação a ração farelada, demonstra o aumento da acidez ao longo do armazenamento, independente da adição de ácidos orgânicos.

Portanto, os valores de acidez da ração peletizada com melaço externo, não podem ser apenas considerados pelos ácidos adicionados através dos tratamentos, mas também pelo fato de os constituintes da ração poderem ter influenciado e a temperatura da BOD, pode ter proporcionado à aceleração dos processos químicos de deterioração, além da ação dos ácidos orgânicos adicionados.

Na literatura, são escassas as pesquisas sobre a estabilidade de rações destinadas a animais de produção, estabelecendo valores de atividade de água mínimos, contaminação fúngica ao longo do armazenamento, concentrações de antifúngicos utilizadas e sua real efetividade, sendo ácidos orgânicos ou não.

Em testes *in vitro* realizados anteriormente, demonstraram a efetividade dos ácidos orgânicos isolados ou combinados para o controle de *Aspergillus* sp. Devido à falta de informações na literatura, e legislações que estabeleçam limites e metodologias, a pesquisa serve para elucidar esses pontos e auxiliar em pesquisas futuras.

Os resultados encontrados para contagem total de bolores e leveduras na ração peletizada com melaço externo avaliada por 60 dias, aliados aos dados de atividade de água (Aa), pH, umidade e umidade relativa (UR), servem de informações para possíveis testes futuros, uma vez que, deverão ser os principais fatores a ser considerados para um teste de estabilidade. Atualmente, os fornecedores de ácidos orgânicos comerciais, recomendam doses elevadas de antifúngicos a serem adicionados na ração/melaço. O estudo demonstrou que, os fatores intrínsecos e extrínsecos devem ser priorizados em testes de estabilidade para que se possa avaliar a efetividade e as concentrações necessárias a serem utilizadas de ácidos orgânicos

para o controle do desenvolvimento fúngico na ração e produtos armazenados, garantindo a segurança e qualidade do produto.

Para realizar um teste de estabilidade em rações ao longo do armazenamento, avaliando a ação de ácidos orgânicos no controle fúngico, os fatores atividade de água, umidade, temperatura de armazenamento, umidade relativa e embalagem devem ser considerados. Os fungos deteriorantes necessitam de  $A_a$  mínima próxima a 0,80 para o seu desenvolvimento. Para que esse nível de  $A_a$  seja alcançado na ração, a UR do ambiente deve ser ajustada em pelo menos 80 %, para que os fungos encontrem condições ideais para o seu desenvolvimento.

Além disso, no presente estudo, a estabilidade da ração foi avaliada considerando apenas a contaminação natural da ração, oriunda das matérias-primas utilizadas e do produto final após o processamento, cuja a contagem microbiana inicial foi baixa  $\sim 2 \text{ Log UFC.g}^{-1}$ . Alternativamente, pode-se realizar a contaminação artificial, com quantidade de inóculo e espécie previamente definidas, de modo a padronizar e homogeneizar a contaminação inicial da ração. A escolha da espécie fúngica pode ser realizada de acordo com as características do produto e armazenamento, histórico de contaminação e deterioração pelos microrganismos.

O tipo de embalagem também deve ser considerada, de maneira que propicie as trocas de temperatura e umidade em que o produto está sendo submetido, e não se torne uma barreira. Controlando os fatores intrínsecos e extrínsecos relacionados à ração e ao ambiente, será possível avaliar o efeito dos ácidos orgânicos para controle fúngico na ração.

## **CONCLUSÃO**

Devido à baixa atividade de água das amostras de ração peletizada, não foi possível avaliar o efeito dos tratamentos aplicados na estabilidade das rações peletizadas com melaço externo para controle fúngico. A contagem de bolores e leveduras na ração sofreu um decréscimo de  $2 \text{ Log UFC.g}^{-1}$  para  $1 \text{ Log UFC.g}^{-1}$  ao longo do armazenamento em todos os tratamentos testados, devido à falta de disponibilidade de água livre para o seu desenvolvimento. Os valores de atividade de água da ração não estiveram inseridos dentro do limite mínimo para crescimento de fungos filamentosos (0,80). Os baixos valores de  $A_a$  apresentados, aliados com o

baixo percentual de umidade interferiram diretamente para que não ocorresse o desenvolvimento fúngico nas rações.

## REFERÊNCIAS

AL- MUHTASEB, A.H.; McMINN, W.A.M.; MAGEE, T.R.A. Moisture sorption isotherm characteristics of food products: a review. **Food and Bioproducts Processing**, v.80, n.2, p.1027-1034, 2002.

ALONSO, V.A. et al. Fungi and mycotoxins in silage: a review. **Journal of Applied Microbiology**, v. 115, p. 637-643, 2013.

AQUINO, S.; POTENZA, M.R. Análise da microbiota associada à entomofauna em rações a granel para animais domésticos. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.80, n.2, p.243-247, 2013.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº. 15/05**. Regulamento técnico para teste de estabilidade de produto farmacêutico de uso veterinário. Diário Oficial da União, Brasília-DF, 9 mai.2005, Seção 1, p.1-4.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Portaria N° 108/91**. Métodos Analíticos para Controle de Alimentos para uso Animal. Diário Oficial da União, Brasília-DF, 04 set.1991, Seção 1.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº. 62/03**. Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água. Diário Oficial da União, Brasília-DF, 26 ago.2003, Seção 1, p.1-14.

CÁNOVAS, G.V.B. et al. **Water Activity in Foods: Fundamentals and Applications**. Iowa: Blackwell Publishing and the Institute of Food Technologists, 2007.

CARRERA, C.C. et al. Avaliação do índice de acidez e de peróxido em farelo de arroz integral e rações. In: Simpósio Internacional de Iniciação Científica e Tecnológica da USP, 18° Edição, 2010, **Anais**. Campinas, 2010.

CECCHI, H.M. **Fundamentos teóricos e práticos em análise de alimentos**. 2ed. Campinas: Editora da Unicamp, 2003.

DANTINGNY, P. et al. Basis of Predictive Mycology. **Journal of Food Microbiology**, v. 100, p.187- 196, 2005.

DILKIN, P. et al. Testes *in vitro*, *in vivo* e registro de aditivos antimicotoxinas. In: 30ª REUNIÃO ANUAL DO CBNA - CONGRESSO SOBRE NUTRIÇÃO DE AVES E SUÍNOS – MICOTOXINAS, 8-10 de Novembro, 2016, Campinas. **Anais**. Campinas: Colégio Brasileiro de Nutrição Animal, 2016.

ELIAS, M.C. **Manejo tecnológico da secagem e do armazenamento de grãos**. Pelotas: Editora Santa Cruz, 2008.

FAO. 2004. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **Almacenaje**. Disponível em: <<http://www.fao.org>>. Acesso em: 23 jan. 2017.

FRANCO, B.D. **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo: Editora Atheneu, 2008.

FRISVAD, J.C.; NIELSEN, K.F.; SAMSON, R.A. Recommendations concerning the chronic problem of misidentification of mycotoxigenic fungi associated with foods and feeds. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v.571, p.33-46, 2006.

GABBI, A.M.; CYPRIANO, L.; PICCININ, I. Aspectos microbiológicos e físico-químicos de três rações comerciais sob diferentes condições de armazenamento. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.12, n.3, p.784-793, 2011.

GARCIA, D.M. **Análise de atividade de água em alimentos armazenados no interior de granjas de integração avícola**. 50f. Dissertação (Mestrado) – Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2004.

GAVA, A.J. **Tecnologia de Alimentos: Princípios e Aplicações**. São Paulo: Nobel, 2008.

GIMENO, A.; MARTINS, M.L. **Micotoxinas y Micotoxicosis em Animales y humanos**. 3ed. Mexico: Inc. USA, 2011.

GENKAWA, T. et al. Development of mathematical model for simulating moisture content during the re-wetting of brown rice stored in film packaging. **Biosystems Engineering**, v.101, n.4, p.445-451, 2008.

GUERRA, M.M. et al. Considerations on sanitary safety of mixed feed for horses. **Revista Portuguesa de Zootecnia**, v. 12, n.2, p.63-75, 2005.

GOOD MANUFACTURING PRACTICES (GMP). **Certification Scheme Animal Feed**. Sector 2008, Appendix 1: Product standards; Regulations on Product Standards in the Animal Feed Sector. GMP14, p. 1- 39. 2008. Disponível em: <[http://www.bezpecna-krmiva.cz/soubory/gmp\\_standard\\_08\\_EN.pdf](http://www.bezpecna-krmiva.cz/soubory/gmp_standard_08_EN.pdf)>. Acesso em: 23 jan. 2017.

GONÇALVES, B.L.; CORASSIN, C.H.; OLIVEIRA, C.A.F. Mycotoxicoses in dairy cattle: a review. **Asian Journal of Animal and Veterinary Advances**, v.10, p. 752-760, 2015.

GOUGOULI, M. et al. Development and application of predictive models for fungal growth as tools to improve quality control in yogurt production. **Food Microbiology**, v.28, p.1453-1462, 2011.



HOLMQUIST, G.U.; WALKER, H.W.; STAHR, H.M. Influence of Temperature, pH, Water Activity and Antifungal Agents on Growth of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus*. **Journal of Food Science**, v.48, p.778-782, 1983.

INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS (ICMSF). **Microorganismos de los alimentos: características de los patógenos microbianos**. Zaragoza: Acribia, 1996.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ (IAL). **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz: Métodos Químicos para Análise de Alimentos**. 4. ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008.

JAY, J.M. **Microbiologia moderna de los alimentos**. 2ed. Acribia: Zaragoza, 1978.

JOUANY, J.P. Methods for preventing, decontaminating and minimizing the toxicity of mycotoxins in feeds. **Animal Feed Science and Technology**, v. 137, p.342-362, 2007.

KOSEGARTEN, C.E. et al. Description of *Aspergillus flavus* growth under the influence of different factors (water activity, incubation temperature, protein and fat concentration, pH, and cinnamon essential oil concentration) by kinetic, probability of growth, and time-to-detection models. **International Journal of Food Microbiology**, v.240, p.115-123, 217.

LESSARD, F.F. Qualitative reasoning and integrated management of the quality of stored grain: a promising new approach. **Journal of Stored Products Research**, v.38, n.3, p.191-218, 2002.

MALLOZZI, A.B.; CORRÊA, B. Fungos Toxigênicos e Micotoxinas. **Boletim Técnico Instituto Biológico**, n.12, p.5- 26, 1998.

MARSH, K.; BUGUSU, B. Food Packaging—Roles, Materials, and Environmental Issues. **Journal of Food Science**, v. 72, n.3, p.39-55, 2007.

NORTHOLT, M.D.; EGMOND, H. P. V.; PAULSCH, W.E. Differences Between *Aspergillus flavus* Strains in Growth and Aflatoxin B<sub>1</sub> Production in Relation to Water Activity and Temperature. **Journal of Food Protection**, v.40, n.11, p.778-781, 1977.

OLIVEIRA, G.R. et al. Mycobiota in poultry feeds and natural occurrence of aflatoxins, fumonisins and zearalenone in the Rio de Janeiro State, Brazil. **Mycopathologia**, v.162, p.355-362, 2006.

PEZZINI, V.; VALDUGA, E.; CANSIANI, R.L. Incidência de fungos e micotoxinas em grãos de milho armazenados sob diferentes condições. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v.64, n.1, p.91-96, 2005.

PITT, J.I.; HOCKING, A.D. **Fungi and Food Spoilage**. 3 ed. Nova York: Springer, 2009.

RICKE, S.C. Perspectives on the Use of Organic Acids and Short Chain Fatty Acids as Antimicrobials. **Poultry Science**, v.82, p.632-639, 2003.

ROSA, C.A.R. et al. Mycoflora of poultry feeds and ochratoxin-producing ability of isolated *Aspergillus* and *Penicillium* species. **Veterinary Microbiology**, v. 113, p.89-96, 2006.

RUPOLLO, G. et al. Sistemas de armazenamento hermético e convencional na conservabilidade de grãos de aveia. **Ciência Rural**, v.34, n.6, p.1715-1722, 2004.

SAVARD, T. et al. Characterization of spoilage yeasts isolated from fermented vegetables and inhibition by lactic, acetic and propionic acids. **Food Microbiology**, v.19, n.3, p.363-373, 2002.

SCUSSEL, V.M. **Fungos em grãos armazenados**. In: Lorini, I., Miike, LH, Scussel, VM Armazenagem de grãos. Campinas: IBG, 2002.

VALSECHI, O.A. **Microbiologia dos Alimentos**. Araras: UFSCAR, 2006.

WEISS, J.; LOEFFLER, M.; TERJUNG, N. The antimicrobial paradox: why preservatives lose activity in foods. **Current Opinion in Food Science**, v.4, p.69-75, 2015.

## 6 CONCLUSÃO

As amostras de milho e ração peletizada coletadas na indústria demonstraram níveis de contaminação de até 4 Log UFC.g<sup>-1</sup>, além da presença do gênero *Aspergillus* sp. e AFB<sub>1</sub> em três amostras de milho, mesmo que abaixo dos limites aceitáveis, aponta para os riscos de recontaminação do produto final. A CIM dos compostos testados contra *Aspergillus flavus* NRRL 3251 foi determinada com os ácidos isolados acético, láctico, propiônico e sal sorbato de potássio, e as combinações que expressaram os melhores resultados foram o ácido propiônico combinado com o ácido acético ou o sal sorbato de potássio, demonstrando a redução nas concentrações necessárias quando combinados. Para a determinação da estabilidade de rações peletizadas com melaço externo, não foi possível analisar o efeito dos tratamentos com combinações de ácidos orgânicos e sal devido à baixa atividade de água que amostras de ração apresentaram, não estando dentro dos limites mínimos necessários para o desenvolvimento de fungos deteriorantes.

## 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A determinação da concentração inibitória mínima (CIM) para *Aspergillus flavus* NRRL 3251 demonstrou a efetividade dos ácidos orgânicos e sal quando combinados. O ácido acético é o de menor custo comercial, seguido do ácido propiônico e sorbato de potássio. Há de se considerar a possibilidade de redução de custos na produção com a utilização das combinações de ácidos orgânicos. Os fatores atividade de água, umidade, temperatura de armazenamento, umidade relativa e embalagem devem ser considerados na realização de testes de estabilidade para que se possa avaliar a efetividade e as concentrações a serem utilizadas para o controle do desenvolvimento fúngico na ração e produtos armazenados. As condições de armazenamento influenciam diretamente a qualidade e a estabilidade das rações. Para as indústrias, a utilização de matéria-prima de qualidade, aliadas ao controle do processo, como resfriamento da ração peletizada, controle de umidade e Aa possibilitarão a estabilidade do produto por um maior tempo. Já para os distribuidores e clientes, o correto armazenamento em locais livres de umidade e temperaturas elevadas será determinante para assegurar a qualidade do produto final.