



Eficácia de ácidos orgânicos em rações experimentalmente contaminadas com *Aspergillus flavus*

Efficacy of organic acids in feed experimentally contaminated with *Aspergillus flavus*

Rogerio Aleson Dias Bezerra^{*1} , Maria Eduarda Ribeiro Ratão¹ , Thainá Silva Blasques¹ , Bruna Barnei Saraiva¹ , Gabriel Amaral de Araújo¹ , Paulo Cesar Pozza¹ , Magali Soares dos Santos Pozza¹ 

1 Universidade Estadual de Maringá (UEM), Maringá, Paraná, Brasil 

*autor correspondente: rogerioaleson@hotmail.com

Recebido: 05 de junho de 2024. Aceito: 31 de janeiro de 2025. Publicado: 13 de junho de 2025. Editor: Rondineli P. Barbero

Resumo: Os ácidos orgânicos têm se mostrado uma alternativa promissora aos compostos químicos devido à sua capacidade de inibir o crescimento microbiano. O objetivo deste estudo foi avaliar a atividade antifúngica de ácidos orgânicos em rações animais experimentalmente contaminadas com *Aspergillus flavus*. A cepa de *A. flavus* (ACFV) foi ativada em meio Ágar Sabouraud Dextrose e incubada a 25 °C por 7 dias. Após a incubação, foi realizada a preparação de suspensões de esporos e a contagem em câmara de Neubauer, padronizando o inóculo em $5,0 \times 10^6$ esporos/mL. Foram preparadas suspensões de esporos (discos de ágar 10 mm) em água peptonada tamponada (1000 mL) e as rações foram tratadas com ácidos orgânicos comerciais, incluindo ácido propiônico ou um blend de ácidos (propíônico, tartárico, cítrico, fórmico, sôrbico e lático). A ração foi analisada nos dias 1, 3, 5 e 7 de vida de prateleira, com análise microbiológica de bolores e contagem de *Aspergillus* spp., além de medidas de atividade de água, matéria seca, pH e temperatura. Os ácidos orgânicos reduziram a contagem total de fungos filamentosos ao longo do período de avaliação. Observou-se uma redução significativa nas contagens de *Aspergillus* spp. nas rações tratadas com ácidos orgânicos ($p<0,05$). Além disso, houve redução da matéria seca e do pH nas rações. Conclui-se que os ácidos orgânicos têm grande potencial para inibir o crescimento fúngico em rações, assegurando sua qualidade e segurança durante o armazenamento.

Palavras-chave: ácido fraco; atividade antifúngica; vida de prateleira.

Abstract: Organic acids have been shown to be a promising alternative to chemical compounds due to their ability to inhibit microbial growth. The aim of this study was to evaluate the antifungal activity of organic acids in animal feed experimentally contaminated with *Aspergillus flavus*. The *A. flavus* strain (ACFV) was activated in the Sabouraud Dextrose Agar way and incubated at 25 °C for 7 days. After incubation, it was carried out the preparation of the spore suspensions and counted in a Neubauer chamber, standardizing the inoculum at 5.0×10^6 spores/mL. Spore suspensions (10 mm agar discs) were prepared in buffered peptone water (1000 mL) and the feeds were treated with commercial organic acids, including propionic acid or a blend of acids (propionic, tartaric, citric, formic, sorbic and lactic). The feed was analyzed on days 1, 3, 5 and 7 of shelf life, with microbiological analysis of mold and *Aspergillus* spp. count, in addition to measurements of water activity, dry matter, pH and temperature. Organic acids reduced the total count of filamentous fungi throughout the evaluation period. A significant reduction in *Aspergillus* spp. counts was observed in feeds treated with organic acids ($p<0.05$). Furthermore, there was a reduction in dry matter and pH in the feeds. It is concluded that organic acids have great potential to inhibit fungal growth in diets, ensuring their quality and safety during the storage.

Key-words: weak acid; antifungal activity; shelf life.



1. Introdução

A degradação de rações por fungos é fonte de risco à saúde dos animais, em função de aspectos correlacionados à frequência de micotoxinas produzidas por estes⁽¹⁾. Esse contágio pode se manifestar desde as etapas primárias da produção e do armazenamento da matéria-prima na fabricação até as etapas finais de comercialização⁽²⁾. Para evitar a contaminação, é essencial realizar o controle de fungos por meio de medidas preventivas e do monitoramento das condições que favorecem sua disseminação, como alta umidade, temperatura elevada e má ventilação durante o armazenamento. Esses fatores não apenas promovem o crescimento de fungos, mas também estimulam a produção de micotoxinas, especialmente as aflatoxinas. As aflatoxinas são metabólitos secundários que podem ser produzidos por fungos, como: *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* e *Aspergillus nomius*⁽²⁾.

O *A. flavus*, produtor de aflatoxinas, considerado patógeno oportunista, é um fungo filamentoso de armazenamento, amplamente distribuído pelo mundo, principalmente em regiões de clima tropical com temperatura e umidade ideais para o seu desenvolvimento. O quadro clínico da aflatoxicose está diretamente relacionado ao grau de contaminação do produto, ao tempo e à quantidade de ração contaminada ingerida pelo animal e seu estado nutricional. São relatados atraso no crescimento, neoplasias, teratogênese e hepatopatias agudas, subagudas e crônicas⁽³⁾. Medidas alternativas para bloquear a atuação desses fungos e suas toxinas são pertinentes, uma vez que os fungos apresentam elevada resistência a procedimentos físicos e químicos⁽³⁾.

Diante disso, o uso de ácidos orgânicos (AO) é uma alternativa válida frente a aspectos associados à contaminação fúngica⁽⁴⁾. Esses ácidos são resultantes do metabolismo animal e vegetal, sendo, frequentemente, encontrados na natureza⁽⁵⁾. Tais compostos orgânicos apresentam, em sua composição, o radical carboxila e, embora considerados fracos, são capazes de adentrar nas células com uma configuração inicial não dissociada, começando a dissociar-se no interior destas.

Esse mecanismo de ação altera a faixa de pH no citoplasma das células microbianas, promovendo a inibição de suas funções vitais e, consequentemente, levando à morte celular⁽⁶⁾. Entre os compostos mais utilizados com essa finalidade, destacam-se os ácidos acético, benzoico, butírico, cítrico, fórmico, lático, málico, propiônico e tartárico⁽⁷⁾. Com relação ao modo de ação, os ácidos orgânicos não dissociados podem difundir-se através da membrana celular bacteriana, interferindo na síntese de DNA, na divisão celular e na captação de nutrientes, como aminoácidos, ácidos orgânicos e fosfato. Inibidores com baixo pKa são particularmente eficazes no ambiente ácido do fluido intestinal⁽⁸⁾.

Portanto, objetivou-se avaliar o efeito dos ácidos propiônico, tartárico, cítrico, fórmico, sórbico e lático, frente ao desenvolvimento fúngico de *A. flavus*, durante a vida de prateleira de rações fareladas para suínos, no que diz respeito à aplicabilidade e à assertividade dos produtos selecionados para controle de fungos e qualidade físico-química das rações.

2. Material e métodos

O experimento foi realizado na Fazenda Experimental Iguatemi (FEI), pertencente à Universidade Estadual de Maringá (UEM). A cepa de *A. flavus* (ACFV), isolada por Variani et al.⁽⁹⁾, foi ativada em placas de Petri, contendo meio Ágar Sabouraud Dextrose, por meio da técnica de estrias. As placas foram incubadas a 25 °C por 7 dias em estufa tipo BOD. Após o período de incubação, foram realizadas suspensões de esporos (discos de ágar 10 mm) em água peptonada tamponada (1000 mL) e efetuada

a contagem em câmara de Neubauer, até a obtenção da padronização do inóculo em $5,0 \times 10^6$ esporos mL^{-1} .

Foram preparados 300 kg de ração farelada para suínos em fase de terminação (Tabela 1) sem antifúngicos e inoculado 1 mL da suspensão de esporos ($5,0 \times 10^6$ esporos mL^{-1}) para cada 100 g de ração e utilizados dois produtos comerciais, sendo ácido propiônico (AP) (ácido propiônico 490 g/kg pka 4,88, dióxido de silício, hidróxido de amônio, água) e blend de ácidos (BA) (carbonato de cálcio, ácido propiônico 250 g/kg/ pka 4,88, dióxido de silício, propilenoglicol, hidróxido de amônio, água, ácido L (+)-tartárico pka 2,98, cítrico pka 3,13, fórmico 6800 mg/kg pka 3,75; sórbico 6000 mg/kg, pka 4,76; lático pka 3,83, vitamina C 990 mg/kg).

O experimento foi realizado em esquema fatorial 6x4, sendo 6 tratamentos (CN; CP; AP2000; AP4000; BA2000 e BA4000) e 4 períodos de avaliação (1, 3, 5 e 7 dias). Os tratamentos avaliados foram: ração controle sem inóculo e ácidos orgânicos (controle negativo; CN); ração controle inoculada com fungo sem ácidos orgânicos (controle positivo; CP); ração inoculada com ácido propiônico 2.000g/tonelada (AP2000); ração inoculada com ácido propiônico 4.000g/tonelada (AP4000); ração inoculada com blend de ácidos (ácido propiônico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido fórmico, ácido sórbico e ácido lático) 2.000 g/tonelada (BA2000); ração inoculada com blend de ácidos (ácido propiônico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido fórmico, ácido sórbico e ácido lático) 4.000g/tonelada (BA4000).

Tabela 1. Composição da ração farelada formulada para suínos em fase de terminação.

Ingredientes (%)	CN	CP*	AP2000*	AP4000*	BA2000*	BA4000*
Grão de milho	80,78	80,78	80,78	80,78	80,78	80,78
Grão de soja	14,08	14,08	14,08	14,08	14,08	14,08
Óleo de soja	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
Fosfato dicálcio	0,80	0,80	0,80	0,80	0,80	0,80
Calcário	0,63	0,63	0,63	0,63	0,63	0,63
Sal	0,39	0,39	0,39	0,39	0,39	0,39
L-Lisina HCL 78,4%	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40
DL-Metionina 99,0%	0,11	0,11	0,11	0,11	0,11	0,11
L-Treonina 98,0%	0,14	0,14	0,14	0,14	0,14	0,14
L-Triptofano 98,5%	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
L-Valina 99,9%	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
Vitaminas e Minerais ¹	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40
Enramicina	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02
BHT ²	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
Ácido propiônico ³	-	-	2000	4000	-	-
Blend de ácidos ⁴	-	-	-	-	2000	4000

¹Suplementação de vitaminas, minerais e aditivos por kg de produto: Vit A - 30000 UI; Vit D3 - 5000 UI; Vit E - 120 UI; Vit B12 - 120 mcg; Vit K - 5 mg; Niacina - 150 mg; Pantotenato de Cálcio - 75 mg; Ácido Fólico - 8 mg; Cloridrato de Colina - 0,48 g; Ferro - 350 mg; Cobre - 15 mg; Magnésio - 250 mg; Zinco - 0,75 g; Iodo - 10 mg; Selênio 3 mg; 2Hidroxitolueno butilado; 3Ácido propiônico (g/ton); 4blend de ácidos (g/ton): ácido propiônico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido fórmico, ácido sórbico e ácido lático.

As amostras foram armazenadas por um período de 7 dias e analisadas ao longo do tempo em relação a alterações físico-químicas e microbiológicas. Análises microbiológicas de bolores foram realizadas nos dias 1, 3, 5 e 7. As Contagens de *Aspergillus* ssp. foram realizadas nos dias 1 e 7. Análises de matéria seca, temperatura da ração, pH e atividade de água (Aw) foram realizadas nos dias 1, 3, 5 e 7.

2.1 Análise de bolores e *Aspergillus* ssp

Para a análise microbiológica, 10 g das amostras foram diluídas em 90 mL de água peptonada 0,1% (Himedia®). A partir dessa diluição, foram realizadas diluições decimais seriadas até 10⁻⁶. Após o procedimento, a semeadura por spread plate, em placas de Petri, contendo ágar BDA (Ágar Batata Dextrose), foi realizada em triplicata. As placas foram incubadas a 25 °C por 7 dias. A leitura foi realizada pela contagem de unidades formadoras de colônias e de expresso em UFC/g⁽¹⁰⁾. O mesmo procedimento foi usado para as amostras semeadas em Ágar Sabouraud Dextrose para a contagem de *Aspergillus* ssp.

2.2 Determinação da atividade de água (Aw)

A determinação da atividade de água foi realizada em equipamento AQUALAB (Decagon devices, WP4C). Com o aparelho calibrado, foram pesadas alíquotas de 2g de amostra nas cápsulas do medidor de atividade de água. As cápsulas foram posicionadas no equipamento para leitura.

2.3 Determinação de matéria seca

A matéria seca foi determinada de acordo com os métodos para análise de alimentos, conforme descrito por Detmann⁽¹¹⁾, por meio da secagem da amostra em estufa de ventilação forçada a 105 °C até peso constante. Esse procedimento visa a eliminar a água presente no material, permitindo quantificar apenas os componentes sólidos, o que é fundamental para padronizar a análise dos nutrientes em base seca. Em seguida, foram pesadas cerca de 2 g da ração triturada para secagem em estufa pré-aquecida a 105 °C. As amostras permaneceram na estufa por 5 horas ou até atingir peso constante, em seguida foram resfriadas em dessecador e pesadas em balança analítica.

2.4 Determinação de pH

Para a determinação do pH, 10 g de ração foram dissolvidas em 100 mL de água destilada. Agitou-se até que as partículas se tornassem uniformes. Em seguida, foi realizada a leitura de pH com o auxílio de um pHmetro (NT PHM) previamente calibrado.

2.5 Determinação da temperatura da ração

A análise foi realizada com o auxílio de um termômetro analógico de mercúrio (Incotherm) inserido nos sacos de polietileno que continham 5 kg de ração. As temperaturas internas foram aferidas em três pontos diferentes. A temperatura da sala de armazenamento também foi aferida, com o termômetro higrômetro (Incotherm), três vezes ao dia.

2.6 Análise estatística

Os dados obtidos no experimento foram submetidos à análise estatística no pacote computacional (SAEG 2000) e as médias, quando significativas, submetidas à comparação no teste de Tukey a 5% de significância.

3. Resultados e discussão

3.1 Análise microbiológica

A quantidade de inóculo utilizado para contaminação das amostras foi baseada na contaminação usual para esse tipo de produto. Assim, o inóculo utilizado inicialmente continha $5,0 \times 10^6$ UFC/mL. Ao semear nas placas, a contagem total de fungos obtida foi de $4,4 \times 10^4$ UFC/mL para a ração controle

e de $5,35 \times 10^4$ UFC/mL para as rações experimentalmente contaminadas. Quantidade semelhante⁽⁴⁾ (10^4 esporos mL⁻¹) foi utilizada para avaliar sinergismo entre ácidos orgânicos e sorbato de potássio no controle de *Aspergillus flavus* em amostras de milho e ração para suínos.

O meio de cultura Sabouraud proporcionou condições ideais para isolar e quantificar *A. flavus*, sendo evidenciado por meio de sua morfologia com coloração de azul de metileno. Conforme esperado, o CP apresentou maior quantidade de UFC quando comparado ao CN ($p<0,05$) (Tabela 2). Os tratamentos AP4000, BA2000 e BA4000 apresentaram médias equivalentes ao controle negativo (CN), demonstrando a eficiência dos ácidos em inibir o *A. flavus*. O tratamento AP2000 foi menos eficiente, pois apresentou média equivalente ao CP de UFC. Entretanto, a avaliação ao longo do tempo de armazenamento (Tabela 3) demonstrou uma tendência na redução dos valores das contagens microbiológicas das rações ($y=4,277-0,096620x$).

Além disso, a avaliação ao longo do tempo torna-se valiosa, visto que o processo de armazenamento propicia condições favoráveis para o desenvolvimento de fungos que exigem baixa umidade e tempo prolongado para se desenvolver. Quanto maior o período de armazenagem, maior a chance de ocorrer crescimento fúngico e a possível produção e contaminação do alimento por aflatoxinas⁽¹⁴⁾.

Em estudo realizado por Ojeda *et al.*⁽¹⁵⁾, combinações de ácidos orgânicos foram usadas para o controle de *Aspergillus* spp. micotoxigênico. Os autores demonstraram que acidificantes são eficazes na inibição do crescimento de fungos do gênero *Aspergillus*. Além disso, o estudo constatou que a combinação ácido ascórbico 67%, ácido cítrico 16,5% e ácido láctico 16,5% permitiu redução da dose aplicada para o controle fúngico, associando aspectos de sinergismo entre os compostos, estratégia promissora no combate ao desenvolvimento microbiano, demonstrando que o inibidor formado pela mistura de ácido ascórbico, ácido cítrico e ácido láctico foram altamente eficazes para a inibição do crescimento nas rações avaliadas a uma concentração de 1.000 ppm.

3.2 Atividade de água (Aw)

Para Aw (Tabela 2), o efeito significativo para tratamento, o tempo e a interação tratamento e tempo ($p<0,05$) foram observados. A Aw da ração armazenada variou de 0,565 a 0,637. Contudo, o CN apresentou médias inferiores às demais rações avaliadas. A ração farelada apresenta pouca água livre disponível para o desenvolvimento fúngico. Desta forma, os valores de atividade de água obtidos no estudo permaneceram abaixo do ideal para o desenvolvimento fúngico. Fungos deteriorantes precisam de Aw mínima de 0,80⁽¹⁶⁾ mais especificamente, o *A. flavus* demanda ao menos 0,71 de Aw para o seu crescimento, com valor ótimo de 0,98 (International Commission on Microbiological Specifications for Foods ICMSF, 1996). Isso significa que não foi possível avaliar a efetividade dos tratamentos frente à Aw, uma vez que os valores obtidos não estavam dentro do limite mínimo para o desenvolvimento de fungos filamentosos, conforme relatado por Rebonatto *et al.*⁽⁴⁾.

Entretanto, vale ressaltar que manter uma Aw baixa é prática útil para reduzir danos fúngicos em grãos e em alimentos durante o armazenamento e o risco de contaminação potencial por micotoxinas⁽¹⁷⁾. Rosa *et al.*⁽¹⁷⁾ Ao avaliar milho e grãos cervejeiros, ingredientes utilizados na ração para suínos, verificaram-se maiores valores de atividade de água nas amostras de grãos cervejeiros, com média variando de 0,936 e 0,082. Para as amostras de grãos de milho e da ração final, a Aw variou de 0,627-0,112 e 0,628-0,055, respectivamente.

3.3 Teor de umidade (%)

O teor de umidade influencia na incidência fúngica durante o armazenamento, sendo mais evidente a presença de fungos em umidades maiores (Tabela 2). A interação entre tratamento e tempo não foi significativa ($p>0,05$). O tratamento ração controle inoculada com fungo e sem ácidos (CP) apresentou média superior em relação aos outros tratamentos. As condições de umidade ideais para a sua proliferação variam de 13% a 18%, verificando-se, neste estudo, que os valores médios atingiram o mínimo para a sua proliferação. As aflatoxinas, produzidas pelas espécies *A. flavus* e *A. parasiticus*, têm um efeito mais pronunciado no fígado e ocasionam distúrbios mais graves na saúde dos suínos quando comparadas a outras microtoxinas⁽¹⁸⁾.

3.4 Temperatura

Um dos fatores que podem afetar a vida-de-prateleira de rações é a temperatura, a qual afeta consideravelmente a velocidade das reações que ocorrem após o processamento, a distribuição e a estocagem. Para temperatura (Tabela 2 e 4), efeitos significativos para tratamento, tempo e interação entre tratamento e tempo ($p<0,05$) foram observados.

O CP foi o único que apresentou média inferior aos outros tratamentos (Tabela 2). Essa menor temperatura poderia limitar o crescimento do fungo e desacelerar sua atividade metabólica, porém ainda se encontra em níveis aceitáveis para o desenvolvimento de *A. flavus*. A temperatura do ambiente em que foram armazenados os sacos contendo as rações variou de 24 a 32 °C ao longo do período de armazenamento, permanecendo dentro da faixa relatada como ideal para o crescimento de *Aspergillus* ssp. Efeitos ($p<0,05$) foram observados na temperatura ao longo do período de armazenamento (Tabela 4). As maiores temperaturas (28 °C) foram observadas no início do período de armazenamento nas rações BA2000 e BA4000 acima, comparativamente, aos demais tratamentos avaliados (CN; CP; AP2000; AP4000). Ao longo do tempo, alterações puderam ser observadas com variação de até um ponto percentual para todos os tratamentos. Vale salientar que ambas as temperaturas apresentadas permaneceram dentro da faixa recomendada para o desenvolvimento de *A. flavus*. Portanto, a faixa de temperatura para crescimento de *A. flavus* varia entre 24 a 40 °C e a temperatura ótima se dá aos 35 °C⁽¹⁹⁾.

Tabela 2. Contagens microbiológicas de *A. flavus* (\log_{10}) e características de ração farelada para suínos em terminação inoculada com *A. flavus* ($5,0 \times 10^6$ esporos mL^{-1}) contendo ácidos orgânicos.

Tratamento	Aspergillus flavus (UFC)	Atividade de água	% Umidade	Temperatura (°C)	pH
CN	$3,75 \pm 0,48^B$	$0,565 \pm 0,022^B$	$12,19 \pm 2,12^B$	$26,80 \pm 0,29^A$	$6,00 \pm 0,08^A$
CP	$4,43 \pm 0,90^A$	$0,637 \pm 0,007^A$	$7,53 \pm 0,20^A$	$26,00 \pm 0,00^B$	$6,02 \pm 0,09^A$
AP2000	$4,03 \pm 0,41^{AB}$	$0,626 \pm 0,035^A$	$12,63 \pm 1,42^B$	$26,67 \pm 0,75^A$	$5,79 \pm 0,05^B$
AP4000	$3,73 \pm 0,50^B$	$0,625 \pm 0,032^A$	$13,37 \pm 2,28^B$	$26,67 \pm 0,6^A$	$5,57 \pm 0,04^C$
BA2000	$3,71 \pm 0,28^B$	$0,626 \pm 0,024^A$	$12,99 \pm 3,08^B$	$26,67 \pm 0,74^A$	$5,93 \pm 0,10^A$
BA4000	$3,70 \pm 0,52^B$	$0,623 \pm 0,017^A$	$13,56 \pm 3,43^B$	$26,80 \pm 0,74^A$	$5,82 \pm 0,14^B$

CN: controle negativo (ração sem inóculo e ácidos orgânicos); CP: controle positivo (ração inoculada com fungo sem ácidos orgânicos); AP2000: ácido propiônico 2000g/ton; AP4000: ácido propiônico 4000g/ton; BA2000: *blend* de ácidos 2000g/ton; BA4000: *blend* de ácidos 4000g/ton. Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes na mesma coluna diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância.

3.5 pH

Para o pH (Tabela 2), o blend de ácidos 2.000 g/tonelada (BA2000) foi o único tratamento com adição dos ácidos em que não foi observada a queda de pH, entretanto semelhante estatisticamente ao CP e ao CN. O controle do potencial hidrogeniônico se faz muito importante na prevenção da contaminação microbiológica, uma vez que, em condições específicas, o fungo pode produzir aflatoxinas, tornando o ambiente menos propício ao desenvolvimento fúngico, prolongando a vida útil da ração⁽²⁰⁾.

Em trabalho realizado por Miguel *et al.*⁽²¹⁾, os valores de pH das rações pré-inicial, inicial 1 e inicial 2 estavam próximos a 6,0 e apresentaram reduções significativas com o uso de 1,0% de diformiato de potássio, 1,0% ácido fumárico, 1,0% ácido cítrico e 1,0% ácido benzóico. A adição dos acidificantes resultou em reduções que variaram de 0,56 a 1,64 unidades de pH.

Os efeitos da inclusão dietética de misturas de ácidos orgânicos ou ácidos graxos podem depender da composição da mistura. Não está claro se existe um efeito sinérgico das misturas. A inclusão dietética de 4,16 mM fumárico reduziu o pH da dieta de 4,69 para 4,41⁽²²⁾. O efeito dos ácidos propiônico, acético e láctico, em *A. fumigatus*, *A. nidulans*, *P. commune*, *P. roqueforti* e *F. sporotrichioides*, foi investigado. Os autores concluíram que os fungos foram inibidos em faixas de concentração entre 4 e 30 mM para ácido propiônico e acético, enquanto uma concentração de 160 mM ou superior de ácido láctico foi necessária para a inibição total⁽²³⁾. Em pH 5,0, todos os fungos foram inibidos com 60 mM ou menos de ácido propiônico, 120 mM ou menos de ácido acético, porém concentrações de ácido láctico acima de 500 mM foram requeridas para inibir a maioria das espécies. No intestino, essa redução do pH promove a atividade das enzimas digestivas. Portanto, aumenta o aproveitamento de nutrientes e reduz a colonização de microrganismos patogênicos⁽¹⁶⁾.

Os ácidos orgânicos com alto valor de pKa são ácidos mais fracos e, por isso, conservantes mais eficazes para a ração, uma vez que, presentes nos ingredientes da dieta em sua forma indissociada em maior proporção, podem defender a ração contra fungos e bactérias. Essa é uma das razões pelas quais os ácidos, como o ácido propiônico, com alto valor de pKa, são usados, principalmente, como conservantes de grãos ou ração⁽²⁴⁾.

Verificou-se alto valor de pH para as rações testadas (valor médio de pH 5,85). Para maior efetividade dos antifúngicos nas rações, o pH destas deveriam ser inferiores ao pKa dos ácidos testados, para haver uma maior proporção dos ácidos da forma não dissociada. O trabalho apresentou redução dos valores de pH ao longo do período de armazenamento das rações ($y = 5,9014 - 0,01284x$). De acordo com Franco & Landgraf⁽²⁵⁾, fungos filamentosos e leveduras são capazes de suportar faixas de pH baixas, variando de 3,0 a 6,8. A tolerância variável entre as espécies de fungos está diretamente relacionada com as atividades enzimáticas e com os processos metabólicos. Em relação ao *A. flavus*, este é capaz de se desenvolver em intervalos de pH que variam de 2 a 11⁽²⁶⁾.

Crescimento fúngico não foi identificado por Moon *et al.*⁽²⁷⁾ em trabalho in vitro quando o meio foi tratado com 0,05% de ácido benzóico, 0,1% de ácido sórbico, 0,5% de ácido acético ou 0,5% de ácido butírico. O ácido propiônico, o ácido butírico, o ácido benzóico e o ácido sórbico também exibiram potentes efeitos antiaflatoxigénicos em uma concentração de 0,1%. O efeito inibidor do crescimento fúngico não depende apenas do pH, mas também da quantidade de ácido não dissociado presente. No entanto, o ácido propiônico é geralmente considerado mais eficaz contra o crescimento de fungos do que o ácido fórmico⁽²⁸⁾.

Entre os ácidos avaliados, o ácido acético (10%) demonstrou o maior efeito inibitório sobre o crescimento de *A. flavus*, resultando em uma inibição de 45,21%, com um pH final registrado de 3,25. Em contrapartida, tanto o ácido tartárico quanto o ácido cítrico apresentaram um efeito inibitório mínimo na concentração de 5%, registrando apenas 0,42% de inibição para ambos, com pHs finais medidos em 3,12 e 3,24, respectivamente⁽²⁹⁾.

3.6 Contagens microbiológicas de bolores (log10)

Para contagem total de bolores (Tabela 3), não houve efeito significativo para tratamento ou tempo ($p>0,05$). Entretanto, a interação entre tratamento e tempo foi significativa ($p<0,05$). Observou-se maior valor em delta (log10) na ração controle contaminada com fungo (CP) ao longo do período de armazenamento, quando comparada aos demais tratamentos.

Redução dos bolores totais (Tabela 3) foi observada com o uso da maior concentração de ácidos orgânicos (AP4000 e do BA2000). É importante ressaltar que o Ágar Batata Dextrose (BDA) é um meio não seletivo para fungos, portanto a contagem abrange outras colônias além do *A. flavus* inoculado experimentalmente, como contaminações provenientes dos ingredientes e do ambiente da manipulação da ração.

Embora não tenha havido uma significativa redução dos fungos totais, a diferença média em torno de 14% entre o CP e as demais rações com ácidos orgânicos evidencia comportamento bastante satisfatório frente à atuação microbiana⁽¹²⁾. Podemos sugerir que o uso dos ácidos orgânicos foi eficaz em barrar o desenvolvimento fúngico nas rações, uma vez que seu mecanismo de ação se dá pela capacidade de incidir sobre a membrana celular, evitando a utilização de aminoácidos presentes no substrato, impedindo a proliferação microbiana⁽¹³⁾.

Para contagem total de bolores, não houve efeito significativo para tratamento e tempo ($p>0,05$). Entretanto, a interação entre tratamento e tempo foi significativa ($p<0,05$). Observou-se que o controle positivo apresentou maior valor em delta (log10) ao longo do período de armazenamento, quando comparado aos demais tratamentos.

Efeito de redução dos bolores foi observado com o uso da concentração maior de ácido propiônico 4000 g/ton e do blend de ácidos 2000 g/ton. É importante ressaltar que o ágar BDA é um meio não seletivo para fungos, por isso a contagem abrange outras colônias além do *A. flavus* inoculado experimentalmente, como contaminações provenientes dos ingredientes e do ambiente de manipulação da ração.

Embora não evidente no presente estudo uma significativa redução dos fungos totais, o ácido propiônico apresenta comportamento bastante satisfatório frente à atuação microbiana⁽¹²⁾, uma vez que seu mecanismo de ação se dá pela capacidade de incidir sobre a membrana celular e barrar a utilização de aminoácidos presentes no substrato, impedindo, dessa forma, o desenvolvimento microbiano⁽¹³⁾.

O meio de cultura Sabouraud proporcionou condições para isolar e quantificar *A. flavus*. Houve efeito significativo para tratamento e tempo ($p<0,05$), sendo a interação entre tratamento e tempo não significativa ($p>0,05$). Conforme esperado, o controle positivo foi o que apresentou a maior média quando comparado aos demais tratamentos (Tabela 3). Os tratamentos contendo ácido propiônico 4000 g/ton e blend de ácidos 2000 g/ton e 4000 g/ton apresentaram médias equivalentes ao controle negativo, demonstrando a eficiência dos ácidos em inibir o *A. flavus*. O tratamento contendo o ácido propiônico 2000 g/ton foi o menos eficiente, pois apresentou média equivalente ao controle positivo.

Tabela 3. Contagens total de bolores (\log^{10}) em Agar BDA de ração farelada para suínos em terminação inoculada com *Aspergillus flavus* ($5,0 \times 10^6$ esporos mL $^{-1}$) avaliada durante vida de prateleira.

Tempo (dias)	CN	CP	AP2000	AP4000	BA2000	BA4000
1	$3,93 \pm 0,36^{\text{bcB}}$	$3,68 \pm 0,49^{\text{cB}}$	$4,42 \pm 0,39^{\text{abA}}$	$4,46 \pm 0,11^{\text{abA}}$	$4,55 \pm 0,05^{\text{abAB}}$	$4,36 \pm 0,09^{\text{abcA}}$
3	$4,32 \pm 0,23^{\text{aAB}}$	$4,34 \pm 0,28^{\text{aA}}$	$4,45 \pm 0,38^{\text{aA}}$	$4,08 \pm 0,20^{\text{aA}}$	$4,12 \pm 0,27^{\text{aB}}$	$4,42 \pm 0,48^{\text{aA}}$
5	$4,37 \pm 0,14^{\text{aAB}}$	$4,49 \pm 0,23^{\text{aA}}$	$4,28 \pm 0,26^{\text{aA}}$	$4,22 \pm 0,15^{\text{aA}}$	$4,30 \pm 0,12^{\text{aAB}}$	$4,22 \pm 0,35^{\text{aA}}$
7	$4,37 \pm 0,22^{\text{abAB}}$	$4,54 \pm 0,33^{\text{abA}}$	$4,51 \pm 0,15^{\text{abA}}$	$4,32 \pm 0,11^{\text{abA}}$	$4,20 \pm 0,18^{\text{abAB}}$	$4,06 \pm 0,23^{\text{bA}}$
Delta \log_{10}	+0,44	+0,86	+0,09	-0,14	-0,35	-0,30

CN: controle negativo (ração sem inóculo e ácidos orgânicos); CP: controle positivo (ração inoculada com fungo sem ácidos orgânicos); AP2000: ácido propiônico 2000g/ton; AP4000: ácido propiônico 4000g/ton; BA2000: blend de ácidos 2000g/ton; BA4000: blend de ácidos 4000g/ton; Delta (\log_{10}) = (Contagem final – contagem inicial). Médias seguidas de letras minúsculas diferentes na mesma linha diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância. Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes na mesma coluna diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância.

3.7 Atividade de água

Para atividade de água, houve efeito significativo para tratamento, tempo e interação entre tratamento e tempo ($p<0,05$). A atividade de água da ração armazenada variou de 0,5647 a 0,6366. O controle negativo apresentou média inferior aos demais tratamentos (Tabela 4).

Os valores de atividade de água obtidos no presente estudo são muito baixos para o desenvolvimento microbiano. A ração farelada apresenta pouca água livre disponível para o desenvolvimento fúngico. Fungos deteriorantes precisam de Aw mínima de 0,80⁽²⁵⁾; mais especificamente, o *A. flavus* demanda ao menos 0,71 de atividade de água para o seu crescimento, com valor ótimo de 0,98⁽³⁰⁾ (International Commission on Microbiological Specifications for Foods - ICMSF, 1996). Isso significa que não foi possível avaliar a efetividade dos tratamentos frente à Aw, uma vez que os valores obtidos não estavam dentro do limite mínimo para o desenvolvimento de fungos filamentosos⁽⁴⁾.

3.8 Temperatura

Para temperatura, houve efeito significativo para tratamento, tempo e interação entre tratamento e tempo ($p<0,05$). O controle positivo foi o único que apresentou média inferior aos outros tratamentos. Essa menor temperatura poderia limitar o crescimento do fungo e desacelerar sua atividade metabólica, porém ainda se encontra em níveis aceitáveis para o desenvolvimento de *A. flavus* (Tabela 4). *A. flavus* apresenta faixa de temperatura para crescimento entre 24 e 40 °C, cuja temperatura ótima se dá perto dos 35 °C⁽¹⁹⁾. A temperatura do ambiente em que foram armazenados os sacos contendo as rações variou de 24 a 32 °C ao longo do armazenamento. Essa faixa de temperatura descreve-se como ideal para o crescimento de *A. flavus*. Vale ressaltar que a temperatura de um meio pode ser influenciada por dois fatores principais: a temperatura ambiente e a influência de sistemas de refrigeração ou aquecimento. No entanto, neste estudo, o local de armazenamento das amostras das rações não continha mecanismos para manipular a temperatura. Isso significa que houve variação na temperatura ambiente, sem que, necessariamente, isso fosse explicado pelo metabolismo do fungo.

Tabela 4. Atividade de água e Temperatura de ração farelada para suínos em terminação inoculada com *Aspergillus flavus* ($5,0 \times 10^{-6}$ esporos mL⁻¹) avaliada durante vida de prateleira.

Tempo (dias)	CN	CP	AP2000	AP4000	BA2000	BA4000
<i>Atividade de água</i>						
1	0,55 ± 0,02 ^{cAB}	0,64 ± 0,00 ^{abA}	0,57 ± 0,03 ^{bC}	0,58 ± 0,02 ^{bC}	0,62 ± 0,01 ^{abBC}	0,61 ± 0,03 ^{abcB}
3	0,59 ± 0,01 ^{cAB}	0,63 ± 0,01 ^{abcA}	0,64 ± 0,02 ^{abcA}	0,61 ± 0,02 ^{abcBC}	0,59 ± 0,02 ^{cc}	0,60 ± 0,01 ^{bcB}
5	0,54 ± 0,01 ^{bB}	0,63 ± 0,01 ^{aA}	0,65 ± 0,01 ^{aA}	0,65 ± 0,01 ^{aAB}	0,64 ± 0,02 ^{aABC}	0,62 ± 0,01 ^{aB}
7	0,58 ± 0,00 ^{bAB}	0,64 ± 0,00 ^{abA}	0,63 ± 0,00 ^{abA}	0,63 ± 0,01 ^{abABC}	0,62 ± 0,01 ^{abBC}	0,62 ± 0,00 ^{abB}
<i>Temperatura</i>						
1	26,67 ± 0,58 ^{bcA}	26,00 ± 0,00 ^{cA}	27,33 ± 0,58 ^{abcAB}	27,67 ± 0,58 ^{abcAB}	28,00 ± 0,00 ^{abA}	28,00 ± 0,00 ^{abA}
3	27,00 ± 0,00 ^{aA}	26,00 ± 0,00 ^{aA}	26,33 ± 1,15 ^{aB}	26,67 ± 0,58 ^{aB}	26,33 ± 0,58 ^{aB}	27,00 ± 0,00 ^{aB}
5	27,00 ± 0,00 ^{aA}	26,00 ± 0,00 ^{aA}	26,33 ± 0,58 ^{aB}	26,67 ± 0,58 ^{aB}	26,67 ± 0,58 ^{aB}	26,00 ± 0,00 ^{aC}
7	27,00 ± 0,00 ^{aA}	26,00 ± 0,58 ^{aA}	27,00 ± 0,00 ^{aAB}	27,00 ± 0,00 ^{aAB}	27,00 ± 0,00 ^{aB}	27,00 ± 0,00 ^{aB}

CN: controle negativo (ração sem inóculo e ácidos orgânicos); CP: controle positivo (ração inoculada com fungo sem ácidos orgânicos); AP2000: ácido propiônico 2000g/ton; AP4000: ácido propiônico 4000g/ton; BA2000: *blend* de ácidos 2000g/ton; BA4000: *blend* de ácidos 4000g/ton; Médias seguidas de letras minúsculas diferentes na mesma linha diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância. Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes na mesma coluna diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância.

4. Conclusão

Os ácidos utilizados mostraram eficácia na redução das contagens de *A. flavus* nas rações. Além disso, os ácidos promoveram a diminuição do pH das rações, embora não tenham influenciado a temperatura nem a atividade de água. Dessa forma, o uso de ácidos orgânicos apresenta-se como uma alternativa promissora para o controle do crescimento de fungos contaminantes em rações fareladas, contribuindo para a manutenção da qualidade e segurança durante o período de vida útil do produto.

Declaração de conflito de interesses

Os autores declaram não haver conflitos de interesses.

Declaração de disponibilidade de dados

Os dados serão fornecidos mediante solicitação ao autor correspondente.

Contribuições do autor

Conceituação: Bezerra, R. A. D. Pozza, M. S. S.; Pozza, P.C. Curadoria de dados: Saraiva, B. B. Análise formal: Saraiva, B. B. Aquisição de financiamento: Pozza, M. S. S.: Pozza, P.C. Gerenciamento do projeto: Pozza, M. S. S.; Pozza, P.C. Metodologia: Bezerra, R. A. D. Ratão, M.E.R.; Araújo, G.A.; Pozza, M. S. S. Supervisão: Pozza, M. S. S.. Bezerra, R. A. D. Investigação: Bezerra, R. A. D.; Ratão, M.E.R.; Blasques, T. S. Visualização: Bezerra, R. A. D.; Pozza, M. S. S. Redação (esboço original): Bezerra, R. A. D. Pozza, M. S. S. Redação (revisão e edição): Bezerra, R. A. D. Pozza, M. S. S.

Agradecimentos

Agradecemos e reconhecemos os esforços de colaboração entre o Departamento de Zootecnia, o Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Estadual de Maringá. Este estudo foi financiado em parte pelo Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia da Cadeia Produtiva do Leite (INCT-LEITE/UEL/UEM-PR), Londrina/Maringá, Paraná, Brasil.

Referências

1. Scaglioni PT, Furlong EB. Mitigação da contaminação fúngica e produção de micotoxinas em cultivos de trigo e milho pela aplicação de extratos de microalgas. Realidades e perspectivas. 2020;6. Disponível em: <https://doi.org/10.46420/9786588319031>
2. Lins JL, da Silva JM, da Silva LP, dos Santos TMC, Santos EL. Ocorrência de fungos de campo e armazenamento em ingredientes e rações para suínos. Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável. 2014;9(2):3. ISSN-e 1981-8203. Disponível em: <https://www.gvaa.com.br/revista/index.php/RVADS/article/view/2094>
3. Martínez-Martínez TO, Martínez-Camacho AP, Rodríguez-Guerra R, Mariscal-Amaro LA, Rivas-Valencia P. Isolation and identification of antagonistic fungi of fungi associated with chili wilt in southern Guanajuato, Mexico. Revista mexicana de fitopatología. 2023;41(2):268–84. https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0185-33092023000200268
4. Rebonatto B, Ruschel J, Prado NV, Hirooka EY, Machado-Lunkes A, Hashimoto EH. Sinergismo entre ácidos orgânicos e sorbato de potássio no controle de *Aspergillus latus*. Segurança Alimentar e Nutricional. 2018;25(3):114–25. <https://doi.org/10.20396/san.v25i3.8652765>
5. Alves JB, Valdiviezo MJ, da Silva CA, Bracarense APFRL. O outro lado dos ácidos orgânicos e fitogênicos. Pubvet. 2021;15:181. <https://doi.org/10.31533/pubvet.v15n06a837.1-8>
6. Grigoletti, C. Associação de ácidos orgânicos no controle de fungos em grãos de milho armazenados [Português]. (Master's thesis). Universidade Federal do Paraná (Curitiba), 2007. <https://acervodigital.ufpr.br/xmlui/discover>
7. Pickler L, Hayashi RM, Lourenço MC, Miglino LB, Caron LF, Beirão BCB, et al. Avaliação microbiológica, histológica e imunológica de frangos de corte desafiados com *Salmonella Enteritidis* e Minnesota e tratados com ácidos orgânicos. Pesquisa Veterinária Brasileira. 2012;32:27–36. <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2012000100006>
8. Wang LF, Bergstrom JR, Hahn JD, Young MG, Zijlstra RT. Acid-binding capacity of feed in swine nutrition. Anim Feed Sci Technol. 2023;295:115519. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2022.115519>
9. Variani, AC, Santos FC, Castro, AF, Tessmann IPB, Santos, GT, Pozza, MSS. 2018. The Occurrence of Aflatoxigenic *Aspergillus* spp. in Dairy Cattle Feed in Southern Brazil. Brazilian Journal of Microbiology (ONLINE), v. 49:919-928. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2018.05.005>

10. da Silva N, Junqueira VCA, de Arruda Silveira NF, Taniwaki MH, Gomes RAR, Okazaki MM. Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água. Editora Blucher; 2017.
11. Detmann E, Souza M, Valadares Filho SC, Queiroz AC, Berchielli TT, Saliba EOS, et al. Métodos para análise de alimentos-INCT. Viçosa, MG, Brazil: Suprema Gráfica. 2012.
12. Haque MN, Chowdhury R, Islam KMS, Akbar MA. Propionic acid is an alternative to antibiotics in poultry diet. *Bangladesh Journal of Animal Science*. 2009;38(1–2):115–22. <https://doi.org/10.3329/bjas.v38i1-2.9920>
13. Woolford MK. Microbiological screening of the straight chain fatty acids (C1-C12) as potential silage additives. *J Sci Food Agric.* 1975;26(2):219–28. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740260213>
14. Arrus K, Blank G, Abramson D, Clear R, Holley RA. Aflatoxin production by *Aspergillus flavus* in Brazil nuts. *J Stored Prod Res.* 2005;41(5):513–27. <https://doi.org/10.1016/j.jspr.2004.07.005>
15. Ojeda MM, Cabrera MG, Aquino MEM, Maldonado GAE, Franco JYM. Eficacia in vitro de ácidos orgánicos para el control de *Aspergillus flavus*, *A. fumigatus* y *Fusarium verticillioides*. *Revista Impacto*. 2022;2(1):51–8. https://www.researchgate.net/publication/364822504_Eficacia_in_vitro_de_acidos_organicos_para_el_control_de_Aspergillus_flavus_A_fumigatus_y_Fusarium_verticillioides
16. Herrera F V, Ciro J, Parra J. La adición de Enterococcus faecium aumenta la respuesta inmune intestinal en cerdos en crecimiento. *Archivos de zootecnia*. 2016;65(251):389–98. <https://doi.org/10.21071/az.v65i251.701>
17. Rosa CAR, Keller KM, Keller LAM, Pereyra MLG, Pereyra CM, Dalcerio AM, et al. Mycological survey and ochratoxin A natural contamination of swine feedstuffs in Rio de Janeiro State, Brazil. *Toxicon*. 2009;53(2):283–8. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2008.11.015>
18. Péricas BR, de Avila AL, Correia CE, Bagio P, Haskel KC, Germano AC, et al. Fungos causadores de micotoxicoses em suínos. *Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP*. 2021;19(1). <https://doi.org/10.36440/reclmv.v20i1.38141>
19. Dantigny P, Guilmart A, Bensoussan M. Basis of predictive mycology. *Int J Food Microbiol*. 2005;100(1–3):187–96. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.10.013>
20. Rydló T, Miltz J, Mor A. Eukaryotic antimicrobial peptides: promises and premises in food safety. *J Food Sci*. 2006;71(9):R125–35. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2006.00175.x>
21. Miguel, WC., Trindade Neto, MA., Berto, DA., Kobashigawa, E. Gandra, ERS. 2011. Suplementação de acidificantes em rações de leitões desmamados: desempenho e digestibilidade. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, 48:141–146. <https://doi.org/10.11606/S1413-95962011000200006>
22. Zentek J, Ferrara F, Pieper R, Tedin L, Meyer W, Vahjen W. Effects of dietary combinations of organic acids and medium chain fatty acids on the gastrointestinal microbial ecology and bacterial metabolites in the digestive tract of weaning piglets. *J Anim Sci*. 2013;91(7):3200 <https://doi.org/10.2527/jas.2012-5673>
23. Lind H, Jonsson H, Schnürer J. Antifungal effect of dairy propionibacteria—contribution of organic acids. *Int J Food Microbiol*. 2005;98(2):157–65. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.05.020>
24. Sivakumaar, P. K.; Joe, M. M.; Sukesh, K. An introduction to industrial microbiology. New Delhi: S. Chand & Company Ltd., 2010.
25. Franco B, Landgraf M. Microbiologia dos alimentos. Editora Atheneu, São Paulo. 2008;
26. Taniwaki MH, Silva N da. Fungos em alimentos: ocorrência e detecção. Campinas: Núcleo de microbiologia/ITAL. 2001.
27. Moon YS, Kim HM, Chun HS, Lee SE. Organic acids suppress aflatoxin production via lowering expression of aflatoxin biosynthesis-related genes in *Aspergillus flavus*. *Food Control*. 2018;88:207–16. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.01.017>
28. Smith JE, Moss MO. Mycotoxins. Formation, analysis and significance. John Wiley & Sons Ltd.; 1985.
29. Hassan RA, Sand MI, El-Kadi SM. Effect of some organic acids on fungal growth and their toxins production. *Journal of Agricultural Chemistry and Biotechnology*. 2012;3(9):391–7. <https://doi.org/10.21608/jacb.2012.55011>
30. (ICMSF) IC on MS for F. Microorganismos de los alimentos: Características de los patógenos microbianos. Acribia; 1996.