

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

CLEUSA BERNARDETE MARCON DE BRITO

**EFEITO DE DIFERENTES NÍVEIS DE UMIDADE COM E SEM UTILIZAÇÃO DE  
ANTIFÚNGICO EM DIETAS PARA CÃES**

CURITIBA

2009

CLEUSA BERNARDETE MARCON DE BRITO

**EFEITO DE DIFERENTES NÍVEIS DE UMIDADE COM E SEM UTILIZAÇÃO DE  
ANTIFÚNGICO EM DIETAS PARA CÃES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Área de Concentração em Produção Animal, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciências Veterinárias.

Orientador: Prof. Dr. Alex Maiorka  
Co-orientador: Dr. Everton Luis Krabbe

CURITIBA

2009

Brito, Cleusa Bernardete Marcon de  
Efeito de diferentes níveis de umidade com e sem utilização de  
antifúngico em dietas para cães / Cleusa Bernardete Marcon de Brito.—  
Curitiba, 2009.

51 f.

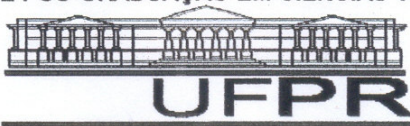
Orientador: Alex Maiorka.

Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Setor de  
Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná.

1. Cão – Alimentação e rações. 2. Micotoxinas. 3. Fungos  
toxigênicos. 4. Nutrição animal. I. Título.

CDU 636.7.084  
CDD 636.7084

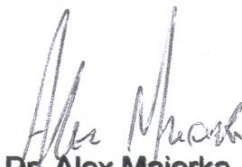
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS



PARECER

A Comissão Examinadora da Defesa da Dissertação intitulada "EFEITO DE DIFERENTES NÍVEIS DE UMIDADE COM E SEM UTILIZAÇÃO DE ANTIFÚNGICO EM DIETAS PARA CÃES" apresentada pela Mestranda Cleusa Bernardete Marcon de Brito, declara ante os méritos demonstrados pela Candidata, e de acordo com o Art. 78 da Resolução nº 62/03-CEPE/UFPR, que considerou a candidata APTA para receber o Título de Mestre em Ciências Veterinárias, na Área de Concentração em Produção Animal.

Curitiba, 16 de fevereiro de 2009

  
Prof. Dr. Alex Maiorka  
Presidente/Orientador

  
Prof.ª Dr.ª Ana Vitória Fischer da Silva  
Membro

  
Dr. Everton Luis Krabbe  
Membro

*Dedico aos homens de minha vida:  
Jorge, Rafael e Felipe*

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a DEUS pela oportunidade de realizar meus sonhos, ter uma família unida e feliz, e pelo caminho já percorrido encontrar tantas pessoas formidáveis.

Aos meus pais VITALINO (*in memorium*) e MARIA DELMIRA, pela vida e exemplo.

Aos amores de minha vida, meu esposo JORGE e meus filhos RAFAEL e FELIPE, pela ajuda, paciência, incentivo.

Ao Professor ALEX MAIORKA, meu orientador, muito obrigada pela confiança e incentivo.

Ao doutor EVERTON LUIS KRABBE, meu co-orientador, pela oportunidade e grande ajuda no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Professor EDSON GONCALVES DE OLIVEIRA, pela grande ajuda.

A UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ e a todos os professores, que de alguma forma colaboraram em minha formação.

Aos Amigos do Laboratório de Nutrição Animal – ALDO, HAIR, MARCELO, RUY e TEREZINHA, pela grande ajuda nas análises, cooperação e compreensão nos momentos mais críticos.

A minha amiga sucessora de mestrado ANANDA, pela força e ajuda na elaboração deste trabalho e grande amor e cuidado dedicados aos nossos cães.

Aos estagiários do LENUCAN - Carolina, Letícia, Pâmela, Reginaldo, Renata, Rogério e Samuel - Graduandos de Zootecnia – UFPR, pela ajuda e dedicação, meu muito obrigado.

Aos cães do LENUCAN – Belo, Crica, Estrela, Zé, Tadeu, Romeu, Vampira, Gracinha, Fofinha, Mel, Bob, Rufi, Tati, Hanna, Flor, sem vocês esta trabalho não teria sido realizado.

Aos meus Cães: Moranguinho, Thor, Max e Madox, pela inspiração em seguir este caminho e recarga das baterias pela energia recebida.

As empresas: KEMIN DO BRASIL, SANEX, KOWALSKI ALIMENTOS, CANIL RANCHO DA PEDRA, pela colaboração para a realização deste trabalho.

Aos demais amigos que de alguma forma contribuíram para a realização de mais esta etapa de minha vida.

Cleusa Bernardete Marcon de Brito

**“Os animais dividem conosco o privilégio de terem uma alma”**

**Pitágoras**

## SUMÁRIO

### LISTA DE FIGURAS

### LISTA DE TABELAS

### LISTA DE ABREVIACÕES, SIGLAS E SÍMBOLOS

<b>RESUMO</b> .....	1
<b>ABSTRACT</b> .....	2
<b>CAPÍTULO I – CONSIDERAÇÕES GERAIS</b> .....	3
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	3
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	5
2.1 Origem da contaminação dos alimentos por microrganismos .....	5
2.1.1 Contaminações em produtos vegetais e rações .....	7
2.2 Emprego de ácidos orgânicos como conservantes em alimentos .....	9
2.3 Características dos ácidos orgânicos.....	10
2.3.1 Mecanismos de ação dos ácidos orgânicos no microrganismo..	11
2.3.2 Mecanismos de ação dos ácidos orgânicos no animal.....	12
2.3.3 Métodos de aplicação.....	13
2.4 Atividade de água .....	13
<b>3. CONCLUSÃO</b> .....	16
<b>4. REFERÊNCIAS</b> .....	17
<b>CAPITULO II - EFEITO DE DIFERENTES NÍVEIS DE UMIDADE COM E SEM UTILIZAÇÃO DE ANTIFÚNGICO EM DIETAS PARA CÃES NA PRODUÇÃO DE CO<sub>2</sub> COM 90 DIAS DE DESAFIO</b>	21
<b>RESUMO</b> .....	21
<b>ABSTRACT</b> .....	22
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	23
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	24
2.1 Tratamentos e delineamento experimental.....	24
2.2 Processamento e controle de qualidade das rações.....	25
2.3 Procedimento e análise estatística .....	26



<b>3. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	27
<b>4. CONCLUSÃO</b> .....	30
<b>5. REFERÊNCIAS</b> .....	31
<b>CAPÍTULO III – EFEITO DE DIFERENTES DE NÍVEIS DE UMIDADE EM ALIMENTOS PARA CÃES, COM OU SEM ANTIFÚNGICO SOBRE A PREFERÊNCIA ALIMENTAR</b>	32
<b>RESUMO</b> .....	32
<b>ABSTRACT</b> .....	33
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	34
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	35
2.1 Preparo das dietas.....	35
2.2 Animais e dietas experimentais.....	36
<b>3. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	37
<b>4. CONCLUSÃO</b> .....	39
<b>5. REFERÊNCIAS</b> .....	40
<b>CAPÍTULO IV - DIGESTIBILIDADE DE DIETAS CONTENDO DIFERENTES NÍVEIS DE UMIDADE, COM OU SEM ANTIFÚNGICO EM CÃES</b>	41
<b>RESUMO</b> .....	41
<b>ABSTRACT</b> .....	42
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	43
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	44
2.1 Animais e delineamento experimental.....	44
2.2 Tratamentos e ração referência.....	44
2.3 Processamento e controle de qualidade das rações.....	44
2.4 Fornecimento das dietas e coleta de fezes.....	46
2.5 Análises laboratoriais.....	46
2.6 Características das fezes.....	47
2.7 Análise estatística.....	48
<b>3. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	48
<b>4. CONCLUSÃO</b> .....	50
<b>5. REFERÊNCIAS</b> .....	51

## LISTA DE FIGURAS

### **CAPÍTULO III - EFEITO DE NÍVEIS DE UMIDADE EM ALIMENTOS PARA CÃES, COM OU SEM ANTIFÚNGICO SOBRE A PREFERÊNCIA ALIMENTAR**

- FIGURA 1 - Primeira escolha dos tratamentos: T1 - 8,12% de umidade sem ácido propiônico; T2 - 10,21% de umidade sem ácido propiônico; T3 - 10,21% de umidade e 0,065% de ácido propiônico e T4 - 10,21% de umidade e 0,13% de ácido propiônico, por cães (n = 20)..... 38
- FIGURA 2 - Consumo médio dos tratamentos: T1 - 8,12% de umidade sem ácido propiônico; T2 - 10,21% de umidade sem ácido propiônico; T3 - 10,21% de umidade e 0,065% de ácido propiônico e T4 - 10,21% de umidade e 0,13% de ácido propiônico por cães (n = 20)..... 38

## LISTA DE TABELAS

### **CAPÍTULO I - CONSIDERAÇÕES GERAIS**

TABELA 1 - Limite mínimo de atividade de água (Aa) para fungos toxigênicos.....	15
TABELA 2- Níveis máximos de micotoxinas permitidos em produtos acabados utilizados na nutrição de animais de companhia.....	15

### **CAPÍTULO II - EFEITO DE DIFERENTES NÍVEIS DE UMIDADE COM E SEM UTILIZAÇÃO DE ANTIFÚNGICO EM DIETAS PARA CÃES NA PRUDUÇÃO DE CO<sub>2</sub> COM 90 DIAS DE DESAFIO**

TABELA 1 - Ingredientes e composição química da dieta experimental.....	25
TABELA 2 - Regulagem do secador para a obtenção de dois níveis de umidade em dieta para cães.....	26
TABELA 3 - Concentração de CO <sub>2</sub> (%) em dietas secas extrusadas para cães com diferentes níveis de umidade, com e sem ácido propiônico, armazenadas durante 90 dias.....	28

### **CAPÍTULO III - EFEITO DE NÍVEIS DE UMIDADE EM ALIMENTOS PARA CÃES, COM OU SEM ANTIFÚNGICO SOBRE A PREFERÊNCIA ALIMENTAR**

TABELA 1 - Regulagem do secador para a obtenção de dois níveis de umidade em dieta para cães.....	35
TABELA 2 - Ingredientes e composição química da dieta experimental.....	36

### **CAPÍTULO IV - DIGESTIBILIDADE DE DIETAS CONTENDO DIFERENTES NÍVEIS DE UMIDADE, COM OU SEM ANTIFÚNGICO EM CÃES**

TABELA 1 - Ingredientes e composição química da dieta experimental.....	45
TABELA 2 - Regulagem do secador para a obtenção de dois níveis de umidade em dieta para cães.....	46
TABELA 3 - Coeficientes de digestibilidade aparente (CDA) da matéria seca (MS), matéria orgânica (MO), proteína bruta (PB), extrato etéreo hidrólise ácida (EEA), extrativos não-nitrogenados (ENN) e energia metabolizável (EM) de dietas contendo diferentes níveis de umidade e ácido propiônico (média ± erro padrão).....	48
TABELA 4 – Teor de matéria seca, amônia e escorre das fezes de cães alimentados com dietas contendo diferentes níveis de umidade e ácido propiônico (média ± erro padrão).....	49

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

Aa - Atividade de água  
Ca - cálcio  
CDA – coeficiente de digestibilidade aparente  
CV – coeficiente de variação  
EB – energia bruta  
EM – energia metabolizável  
EEA - extrato etéreo ácido  
ENN – extrativo não-nitrogenado  
FB - fibra bruta  
MM - matéria mineral  
MO – matéria orgânica  
MS - matéria seca  
P - fósforo  
PB - proteína bruta  
TGI – trato gastrointestinal  
UFC – unidade formadora de colônia  
UM - umidade

## **EFEITO DE DIFERENTES NÍVEIS DE UMIDADE COM E SEM UTILIZAÇÃO DE ANTIFÚNGICO EM DIETAS PARA CÃES**

### **RESUMO**

Em virtude da importância que os animais de estimação representam na vida de seus donos, as indústrias se preocupam cada vez mais em oferecer alimentos palatáveis, nutricionalmente balanceados e que não coloquem em risco a saúde dos animais que os consomem. Para prevenir o desenvolvimento fúngico, pode-se tomar alguns cuidados como uso de aditivos, controle da umidade e atividade de água. Pela falta de estudos com cães utilizando ácidos orgânicos como conservante foram realizados três experimentos, utilizando quatro tratamentos: T1 (8,12% de umidade sem ácido propiônico); T2 (10,21% de umidade sem ácido propiônico); T3 (10,21% de umidade com 0,065% de ácido propiônico) e T4 (10,21% de umidade com 0,13% de ácido propiônico). No primeiro experimento as dietas foram armazenadas em câmara com umidade relativa do ar de 75% e temperatura de 25 a 28°C para a determinação de CO<sub>2</sub> nos tempos zero, 30, 60 e 90 dias por meio de titulação, a fim de estimar o desenvolvimento fúngico. Houve interação entre tratamentos e tempo de armazenamento, havendo diferença significativa apenas para o T2 medido aos 90 dias, na qual foi encontrada a maior concentração de CO<sub>2</sub>. O segundo experimento, para determinação de primeira escolha e consumo voluntário, foi realizado com 20 cães adultos, onde todos os tratamentos foram confrontados, dois a dois, durante três dias seguidos para cada teste, totalizando 60 observações. Os animais apresentaram preferência, tanto para consumo como primeira escolha, para os tratamentos T3 e T4 em relação ao T1. Dietas com maior umidade associadas com ácido propiônico proporcionam melhor resposta de consumo e primeira escolha. No terceiro experimento foi determinado a digestibilidade e produção de amônia das quatro dietas por meio da colheita total de fezes, foram utilizados oito cães adultos da raça Beagle, distribuídos em quadrado latino duplo (4x4). Não houve diferença na digestibilidade das dietas, porém no T4 houve diminuição na produção de amônia nas fezes.

Palavras-chave: Ácido propiônico. Alimento seco extrusado. Atividade de água. Digestibilidade. Fungo. Palatabilidade.

## **EFFECT OF DIFFERENT MOISTURE LEVELS WITH OR WITHOUT UTILIZATION OF MOLD INHIBITOR IN DOG DIETS**

### **ABSTRACT**

Due to the importance that pets represents to their owners, industries worried about to offer palatable foods, nutritionally balanced and that to avoid any risk to the animal. To prevent mold growth, they must to take some cares, as the use of some food additives and control of moisture and water activity. Due to the lack of studies with dogs using organic acids as food preservatives, they were conducted three trials with four treatments: T1 (8.1% moisture without propionic acid), T2 (10.2% moisture without propionic acid), T3 (10.2% moisture with 0.065% propionic acid) and T4 (10.2% moisture with 0.130% propionic acid). On the first trial the diets were storied in a chamber with air relative moisture of 75% and temperature of 25 to 28°C for CO<sub>2</sub> determination on times: 0, 30, 60 and 90 days through titulation, to estimate mold growth. It was interaction among diets and storied time. It was significative difference only to the diet T2 measured in 90 days, in which was found the highest CO<sub>2</sub> concentration and, therefore, the highest mold growth. The second trial to the determination of first choice and food intake was conducted with 20 adult dogs, where all treatments were confronted, two by two, during three consecutive days to each test, totalizing 60 observations. The animals presented preference, as is to food intake as first choice, to treatments T3 and T4 comparing with T1. Diets with higher moisture content associated with propionic acid results in better answers to food intake and first choice. On the third trial it was determinate the digestibility and the production of ammonia of four treatments through total fecal collection method, they were utilized eight adult Beagles dogs, allocated in a double latin square desing (4 x 4). They were no difference on digestibility of diets, however on T4 it was a decrease on fecal ammonia concentration of dogs

Key words: Digestibility. Dry extruded dog food. Fungus. Palatability. Propionic acid. Water activity.

## **CAPÍTULO I – CONSIDERAÇÕES GERAIS**

### **1 INTRODUÇÃO**

Por várias razões a indústria de alimentos para cães e gatos visa produzir alimentos com maior tempo de prateleira e que mantenha a saúde dos animais que os consomem. A principal técnica empregada para prevenir ou retardar a deterioração dos alimentos é a combinação de parâmetros, os quais podem atuar de maneira sinérgica para prevenir ou retardar o desenvolvimento microbiano. Os parâmetros mais comumente empregados são reduções da atividade de água (Aa), redução do pH, tratamento térmico e uso de antimicrobianos (CHIRIFE e FAVETTO, 1992; LEISTNER, 1994).

O alto teor de umidade favorece o aparecimento de fungos tanto nos grãos, ainda no campo ou mal armazenados, quanto nos alimentos já processados e prontos para consumo. A falta de controle da umidade durante o armazenamento é condição favorável para o desenvolvimento de fungos, podendo comprometer todo o alimento, devido ao contato de partículas contaminadas.

A melhor medida da concentração de água, em termos de propriedades físico-químicas, nos produtos, refere-se à medição de sua atividade (Aa), ou seja, medida do teor de água livre no produto. A água pode estar como água ligada e água livre, resultando em conteúdo total de água (umidade). Pode apresentar-se intimamente ligada às moléculas constituintes do produto, não podendo ser removida ou utilizada para qualquer tipo de reação, onde o metabolismo dos microorganismos é paralisado, não havendo desenvolvimento ou reprodução; ou pode encontrar-se livre, estando disponível para as reações físicas (evaporação), químicas (escurecimento) e microbiológicas, tornando-se a principal responsável pela deterioração do produto.

Um dos fatores de risco para a saúde dos animais se refere a contaminação dos alimentos por fungos e outros microrganismos. Esta contaminação tem início na lavoura e pode agravar-se durante a produção e armazenamento da matéria-prima, principalmente os grãos, que são amplamente utilizados na fabricação de rações para várias espécies animais, até a industrialização e embalagem. Outros fatores de

risco estão inerentes aos estabelecimentos comerciais, no que se refere ao armazenamento e a oferta do produto para os consumidores.

Grande parte das rações para animais de companhia, comumente consideradas como alimentos completos, formula-se à base de cereais e devem incluir todos os nutrientes necessários para uma alimentação adequada. No alimento balanceado consumido por cães, os cereais constituem-se na matéria prima principal. Entretanto, estes ingredientes são substratos ótimos para o crescimento de fungos (GONZÁLEZ *et al.*, 1998).

A lista de substâncias químicas com ação antifúngica é bastante extensa, mas ainda muito restrita ao ser comparada com o número de drogas antibacterianas disponíveis, (NOBRE, 2002). O que gera dúvidas quanto à melhor dosagem e tipos de antifúngicos a serem adicionados. O desenvolvimento fúngico em grãos, matérias-primas e rações, além de comprometer sua qualidade, pode causar sérios problemas à saúde humana e animal, sendo um tema que merece atenção.

Os danos causados pelos fungos estão relacionados às perdas nutricionais de matérias-primas e alimentos completos e, dependendo da espécie e condições favoráveis, estes produzem toxinas. Com a deterioração causada pelos fungos, o odor do alimento é alterado e pode fazer com que os cães deixem de ingerir este alimento.

A ingestão dos alimentos obedece a diversos fatores bioquímicos e neuroendócrinos que agem sobre o sistema nervoso (hipotálamo) promovendo a fome ou a saciedade. O hipotálamo exerce influência na auto-seleção de alimentos, nas respostas a dietas com alto conteúdo protéico, no desbalanceamento de aminoácidos, no estresse alimentar, na textura dietética, na consistência e paladar, na aprendizagem aversiva (experiências negativas), no olfato e nos efeitos de manipulações hormonais (BERNARDIS e BELLINGER, 1996). Quando um alimento é aceito pelo cão deduzimos que é palatável, mas precisamos conhecer também a sua composição e digestibilidade, só assim teremos certeza que o animal estará bem nutrido e saudável.

Como os cães preferem alimentos de sabor adocicado e mais úmido, poderia ocorrer a rejeição dos alimentos com aditivos ácidos. Os ácidos orgânicos em sua maioria possuem dupla finalidade, acidulante e conservante. O ácido propiônico é usado pelas suas propriedades fungistáticas e fungicidas. Entretanto, em virtude do limitado número de pesquisas utilizando este ácido orgânico em alimentos para



animais de companhia, objetivou-se investigar a ação do ácido propiônico sobre o controle do desenvolvimento fúngico nos alimentos e possíveis benefícios deste aos cães.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Origem da contaminação dos alimentos por microrganismos

Desde o tempo em que o homem primitivo começou a cultivar vegetais e a estocar alimentos, a contaminação fúngica tem demandado sua atenção. Os fungos têm invadido, fermentando, descolorindo e deteriorando os alimentos e, assim, transformando nutritivos produtos agrícolas em produtos tóxicos e insalubres. Os produtos fúngicos têm ampliado cada vez mais sua importância no cenário mundial, com suas propriedades antibióticas, anabolizantes, estrogênicas, carcinogênicas, mutagênicas, teratogênicas, etc., a ponto das micotoxinas serem consideradas como "poluentes ambientais" (CAMPOS, 2007).

As micotoxinas são compostos orgânicos (produzidos pelos fungos), biologicamente ativos, que podem causar problemas de intoxicações agudas, subagudas ou crônicas, com efeitos carcinogênicos, teratogênicos e mutagênicos, entre outros (ROSA, 2002). Os metabólitos secundários de origem fúngica possuem diversas estruturas químicas. Ademais, são sintetizados por diferentes vias a partir de um ou mais metabólitos provenientes do metabolismo primário. As principais micotoxinas têm sido reconhecidas como produtos do metabolismo dos gêneros *Aspergillus*, *Penicilium* e *Fusarium*. A maioria das espécies produtoras de micotoxinas são saprófitas e umas poucas são patogênicas facultativas de vegetais (KALE e BENNET, 1999; PITT, 2000).

Quantificar e qualificar o crescimento de fungos filamentosos é muito difícil quando se compara com a aplicação da técnica para bactérias e leveduras. Essas dificuldades residem, principalmente, nas características morfológicas desses microrganismos, pois suas hifas não se destacam facilmente do substrato, além de serem formadas por vários segmentos que podem transformar-se em colônias isoladas. Em geral, tem sido demonstrado que os propágulos fúngicos constituem um indicador da condição higiênica sanitária das rações, sendo que as contagens não devem exceder os valores de  $1 \times 10^4$  UFC.g<sup>-1</sup> (Good Manufacture Practice -

GMP, 2005). A legislação brasileira atual seja por parte da área da Agricultura ou da Saúde, não enquadram a contaminação fúngica em nenhum limite máximo tolerado, e consideram os fungos como simples agentes de deterioração.

Dos microrganismos capazes de colonizar os grãos, os fungos são os mais tolerantes a baixa atividade de água e, portanto mais importantes na deterioração dos grãos (CAST, 1989). Estes organismos estão implicados nas perdas de matéria seca do grão, devido à utilização de reservas de carboidratos, proteínas e lipídios destruindo o poder de germinação, diminuindo o valor nutricional e a digestibilidade, com conseqüente produção de micotoxinas.

Em geral, o crescimento fúngico ocorre numa faixa mais ampla de Aa (1,0 a 0,80), em comparação com a produção de micotoxinas (1,0 a 0,95) (NORTHOLT *et al.*, 1979). A temperatura tem notável influência sobre a Aa. Quando a temperatura é ótima, a Aa requerida para o crescimento pode ser baixa e, deve ser ótima nos extremos mínimos e máximos de temperatura (BULLERMAN *et al.*, 1984). Alguns estudos têm demonstrado que as espécies de *Penicillium* podem crescer e produzir micotoxinas, sobre uma faixa de temperaturas mais ampla que as espécies de *Aspergillus*. Uma espécie fúngica pode requerer diferentes condições de Aa e temperatura para a produção de duas micotoxinas diferentes ou, uma mesma toxina fúngica pode ser produzida em diferentes condições ambientais por duas espécies (KROGH, 1987).

A concentração de íons hidrogênio pode ser alterada nos grãos com alto conteúdo de umidade, pela incorporação de conservantes tais como: ácido propiônico e ácido láctico. Estas mudanças podem afetar os processos metabólicos, especialmente os relacionados com a esporulação e a morfogênese, modificando os limites de Aa nos quais ocorrem a germinação e o crescimento dos conídios fúngicos sobre a superfície dos grãos.

O tipo de substrato é outro fator determinante na produção de micotoxinas, afetando tanto a qualidade como o tipo de metabólito tóxico produzido. A variabilidade na produção de toxinas em diferentes alimentos pode atribuir-se às características físicas e químicas do substrato. Os parâmetros físicos incluem disponibilidade de água, a qual determina a disponibilidade de oxigênio e de ar residual no produto, e a condutividade térmica, que influi sobre a temperatura nos grãos. Entre as características químicas, destacam-se os conteúdos de proteínas, gorduras, aminoácidos e minerais.

A forma mais eficaz para prevenir os problemas causados por micotoxinas é evitar que o fungo cresça sobre o substrato, deixar a umidade abaixo dos requisitos do fungo, monitorar a temperatura dos grãos armazenados. Outra ação seria evitar a germinação dos esporos de fungos, bem como o desenvolvimento do micélio no substrato que poderia estar contaminado com estas micotoxinas, utilizando produtos químicos inibidores. (MORENO *et. al.*, 2000).

### **2.1.1 Contaminações em produtos vegetais e rações**

Diversos trabalhos sobre a contaminação de alimentos e rações por fungos toxígenos foram publicados nos últimos anos. *Aspergillus flavus* foi isolado em 86,6% de 90 amostras de milho provenientes de diversas regiões do Brasil (ASEVEDO *et al.*, 1994).

ROSA (2002) estudou a microbiota toxígena de produtos vegetais e rações destinadas à alimentação de frangos de corte em quatro fábricas de ração do estado do Rio de Janeiro e observou que o gênero *Aspergillus sp.* foi prevalente (40,6%), seguido de *Penicilium sp.* (39,8%) e *Fusarium sp.* (14,7%), dentre outros.

Outro estudo em 150 amostras de milho recém-colhidos de várias regiões do Paraná demonstrou que a ocorrência natural de representantes dos gêneros *Fusarium* e *Penicilium* foi de 98,7 a 100%, enquanto a ocorrência natural de espécies de *Aspergillus* foi de 2,7 a 27,7% nas regiões Norte e Centro-Oeste do Estado, respectivamente. As amostras provenientes do Centro-Sul do Estado demonstraram a prevalência de espécies de *Fusarium sp.* (23,5 a 82,5% de espigas infectadas) e de *Penicilium sp.* (15 a 89% de espigas infectadas), segundo ONO *et al.* (1999).

MAIA e SIQUEIRA (2002) estudaram 100 amostras de ração para animais domésticos, sendo 45 para cães, 25 para gatos e 30 para pássaros. Estes autores detectaram aflatoxinas em 12% das amostras utilizando a metodologia de cromatografia em camada delgada de sílica. A concentração total de aflatoxinas foi de 15 a 374 ng/g, com média de 131 ng/g. Todas as amostras de ração que continham amendoim ou derivados foram positivas para aflatoxinas. Estudos realizados em 130 amostras de milho recém-colhido e milho armazenado em São Paulo provenientes da colheita do ano de 1991 demonstraram que *Fusarium sp.* foi o gênero fúngico dominante (84%), seguido de *Penicilium sp.* (55%) e *Aspergillus sp.* (41%) (POZZI *et al.*, 1995).

MAGNOLI *et al.* (1998) estudaram a microbiota de 120 amostras de ingredientes de uma planta de produção em Córdoba (Argentina) onde detectaram a presença de espécies pertencentes a 15 gêneros fúngicos. Os gêneros predominantes foram *Fusarium* sp. e *Penicillium* sp. em 67,5% das amostras, seguidos de espécies do gênero *Aspergillus* sp. em 57,5% das amostras analisadas. As contagens de UFC/g de ração para frangos esteve dentro da faixa compreendida entre  $2,0 \times 10^3$  a  $3,0 \times 10^5$  UFC/g de amostra. Estes autores ressaltaram que o valor limite que estabelece a qualidade higiênica de uma ração é considerado como o de  $1 \times 10^4$  UFC/g pelo Good Manufacture Practice (GMP, 2005). SCUDAMORE *et al.* (1997) informaram que os alimentos balanceados para cães estavam mais contaminados que as matérias primas utilizadas em sua elaboração.

Após examinarem 330 amostras de ingredientes para a elaboração de ração animal, SCUDAMORE *et al.* (1998) relataram que a aflatoxina B1 é a micotoxina mais comumente detectada e que o glúten de milho foi o ingrediente que mais apresentou-se contaminado com os níveis mais elevados de AFB1 (41 ng/g). Diversos autores, SCUDAMORE *et al.* (1997); HENKE *et al.* (2001) e MAIA e SIQUEIRA (2002), informaram que as aflatoxinas têm sido detectadas em alimentos comerciais na América do Norte e do Sul, devido à incorporação de milho e de oleaginosas como ingredientes significativos de elaboração. Os alimentos comerciais para cães e gatos geralmente têm baixos níveis de aflatoxinas, entretanto, os percentuais de amostras positivas variaram segundo a qualidade da amostra. Quase todas as amostras positivas continham menos de 20 µg/kg de aflatoxina B1.

Mesmo níveis mínimos de micotoxinas podem causar danos aos órgãos dos animais, pelo sinergismo que ocorre entre elas aumentando a sua capacidade de ação nos órgãos alvos como fígado e rins principalmente. SHARMA e MÄRQUEZ (2001) estudaram os níveis de contaminação por aflatoxinas (AFB1, B2, G1, G2, M1, M2 e P1) em 35 rações para cães no México, relatando que AFB1 foi detectada em 79% das amostras; AFB2 em 26%; AFG1 em 63%; AFG2 em 21%; AFM1 em 63%; AFM2 em 89%; AFP1 em 58% das amostras; e, Aflatoxicol em 47% das amostras. Os níveis mais elevados de aflatoxina B1 foram de 39,7 ng/g de ração. A contaminação com fungos toxicogênicos e micotoxinas foi avaliada em Portugal por MARTINS *et al.* (2003). Neste estudo os autores isolaram espécies toxigênicas do gênero *Aspergillus* e *Fusarium*, e se detectaram as micotoxinas fumonisinas (FBs),

deoxinivalenol (DON) e ocratoxina A (OTA). Sendo que *Aspergillus flavus* foi prevalente em 14 a 16% de amostras em Portugal.

Estudo realizado na Universidade da Carolina do Norte, E.U.A. em 2002 revelou os seguintes números: milho em grãos: 70% das amostras positivas para Deoxinivalenol, 37% para as fumonisinas, zearalenona em 11%, 9% para a aflatoxina e 6% para toxina T2, um total de 231 amostras analisadas. (WHITLOW e HAGLER, 2002).

## **2.2 Emprego de ácidos orgânicos como conservantes em alimentos**

Pode-se definir como conservante toda a substância que impede ou retarda a alteração dos alimentos provocada por microrganismos ou enzimas. O controle do crescimento de microrganismos em alimentos por conservantes químicos a base de ácidos orgânicos está relacionado com o pH do meio. A forma não dissociada da molécula é que confere a característica antimicrobiológica dos conservantes. Os valores de pKa (pH nos quais 50% da molécula se encontram na forma dissociada) da maioria dos conservantes encontram-se na faixa de pH entre 3,0 e 5,0, portanto a concentração da forma não-dissociada aumenta com o aumento da acidez, garantindo uma maior eficiência no controle dos microrganismos (AZEREDO, 2004). A escolha de um agente de conservação deve ser baseada no conhecimento do seu espectro antimicrobiano, as propriedades químicas e físicas tanto do alimento quanto do conservante, as condições de manuseio, processo e estocagem e, a segurança de uma alta qualidade inicial do alimento a ser conservado.

Como aditivos para a indústria alimentícia, os ácidos possuem uma dupla finalidade: acidulante e conservante. O ácido fosfórico é usado na indústria de refrigerantes do tipo cola para reduzir o pH. O ácido acético é usado na fabricação de maioneses e molhos para saladas para dar aos mesmos um sabor levemente picante. Outros ácidos orgânicos tais como o cítrico, tartárico, málico, láctico e o fumárico são utilizados em uma grande variedade de alimentos, em funções similares. Os ácidos propiônico e sórbico são usados pela sua ação antimicrobiana, é particularmente usado pelas suas propriedades fungicidas. O ácido propiônico, em solução de 10%, é aplicado na superfície de queijos para evitar a formação de mofos. O efeito como fungicida é maior em pH por volta de 4,0 que em pH 5,0. Os sais de cálcio e de sódio do ácido propiônico também apresentam propriedades antimicrobianas.

As drogas antifúngicas exercem ações fungistáticas e fungicidas, direta ou indiretamente. Os antifúngicos têm características especiais quanto ao mecanismo de ação, via de administração, ação em micoses superficiais e ou sistêmicas, podendo ser classificados com base no sítio-alvo e estrutura química, sendo que estes atuam em sua maioria na membrana celular, excetuando-se a fluocitosina e a griseofulvina, que atuam na síntese do ácido nucléico (LACAZ *et al*, 1991).

KRABBE *et al.* (1996), avaliando a eficiência de antifúngicos observaram que o sulfato de cobre adicionado a milho triturado durante o armazenamento, foi ineficiente. Por outro lado, estes mesmos autores observaram que o ácido propiônico utilizado em dosagem correta foi eficiente no controle de fungos, reduzindo perdas de valor nutricional em milho.

Os danos causados pelos fungos estão relacionados às perdas nutricionais em matérias-primas e alimentos completos e, dependendo da espécie e condições favoráveis estes produzem toxinas. KRABBE e MACIEL, (1995), observaram que o ácido propiônico foi eficiente no controle de fungos, reduzindo perdas do valor nutricional em milho. Entretanto, o uso de antifúngico a base de ácido propionico é pouco utilizado em alimentos para cães e não há informações publicadas disponíveis, apesar de sua inocuidade para a saúde animal e humana.

GOMEZ *et al.* (2008), avaliaram o desenvolvimento fúngico em milho contaminado, durante sete semanas. Os testes foram em nível de laboratório, com uso de três produtos que tinham como base o ácido propiônico, todos foram eficientes na redução dos fungos ao longo do tempo.

### **2.3 Características dos ácidos orgânicos**

São substâncias que apresentam uma carboxila (COOH) na estrutura carbonada. (HART e SCHUETZ, 1972). Assim, ácidos graxos de cadeia curta ou longa, aminoácidos, vitaminas e diversos outros compostos orgânicos podem ser considerados ácidos orgânicos. Entretanto, são considerados como aditivos de rações apenas os ácidos de cadeia curta e voláteis, seus sais ou ésteres. Muitos pesquisadores questionam o termo ácido orgânico, já que em alguns casos, ácidos como o fosfórico, que não apresenta carboxila, são utilizados em produtos comerciais, e sugerem os termos acidificantes ou acidulantes para designar de forma genérica, produtos compostos por ácidos orgânicos associados ou não a ácidos inorgânicos.

O ácido propanóico conhecido usualmente por ácido propiônico ou ácido propílico (C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>O<sub>2</sub>) é um ácido monocarboxílico, saturado, de cadeia aberta, líquido, incolor e que produz vapores irritantes, apresenta fórmula estrutural: CH<sub>3</sub> – CH<sub>2</sub> – COOH. O nome usual ácido propiônico é de origem grega: *pro* (primeiro), *pion* (graxo, gordura).

As primeiras formulações de ácido propiônico que saíram no mercado foram utilizadas para o tratamento de grãos de milho com alto teor de umidade (20 a 30%) para a alimentação de bovinos (SAUER e BURROUGHS, 1974), porém o uso deste ácido apresenta a desvantagem de ser altamente corrosivo e volátil. As vantagens especiais da utilização de compostos (sais) que contêm ácido propiônico e amônio propionato é que estes são menos corrosivos que os ácidos puros, além disso, não geram gases nocivos que poderiam causar intoxicações nas pessoas que os aplicam e previnem eficazmente o desenvolvimento de fungos e seus metabólitos (micotoxinas) em grãos armazenados.

Recentemente encontramos no mercado outras formas de derivados do ácido propiônico para proteger contra a contaminação por fungos os grãos armazenados e alimentos completos para animais. Por exemplo, ácido propiônico produzido por processos especiais de modo a formar um complexo (dipropionato de amônio, com dois íons propionato e um íon amônio), que proporciona uma maior capacidade "Tampão", um convencional sal-ácido. Este complexo dissocia-se na presença de umidade nos alimentos e grãos, que libera o propionato livre e proporciona uma máxima inibição de fungos.

### **2.3.1 Mecanismos de ação dos ácidos orgânicos no microrganismo**

Este ponto ainda não está completamente elucidado, sugere-se que uma primeira forma de ação pode ser o controle de microrganismos que não se desenvolvem em pH ácido. Assim, alguns ácidos orgânicos podem difundir-se através da membrana acidificando o conteúdo celular ou ainda podem interferir na permeabilidade da membrana celular, desarranjando o transporte do substrato bem como a fosforilação oxidativa do transporte de elétrons desta membrana. (KIESSLING e PETTERSSON, 1991), citado por SANTÚRIO (1993). Portanto, alterações do pH citoplasmático e desnaturações de proteínas, bloqueio de enzimas envolvidas no metabolismo de carboidratos, bloqueio da reprodução assexuada e do desenvolvimento de esporos, são evidenciadas quando se usa ácido orgânico de

cadeia curta. Já os ácidos orgânicos insaturados, como o ácido ascórbico, são capazes de inibir o transporte de elétrons nas mitocôndrias da célula.

Segundo ADAMS (1999) os ácidos orgânicos têm sido considerados como responsáveis pela quebra no metabolismo de aminoácidos, síntese do DNA e metabolismo energético dos microrganismos. Os ácidos diminuem o pH intracelular e podem causar alteração na permeabilidade da membrana com o bloqueio do substrato do sistema de transporte de elétrons. Os ácidos lipofílicos fracos como láctico, acético ou propiônico são capazes de passar através da membrana celular de microrganismos em seu estado não dissociado e dissociam-se no interior da célula, produzem íons  $H^+$  que diminuem o pH da célula. As células reagem eliminando os prótons tentando manter o pH constante e esse mecanismo faz com que o gasto energético seja maior, reduzindo o crescimento celular microbiano. Por sua vez os ânions  $RCOO^-$  do ácido, impedem a síntese de DNA fazendo com que a proteína não se replique NURSEY, (1997), citado por CHOCT (2004).

### **2.3.2 Mecanismos de ação dos ácidos orgânicos no animal**

Segundo EIDELSBURGER (2001), os ácidos orgânicos atuam pelos seguintes mecanismos: Efeito antimicrobiano nos alimentos em si e, cuja concentração ótima, para higienizar os alimentos, é menor do que a necessária para acidificar o trato digestivo; pela diminuição do pH na parte inicial do trato digestório e conseqüentes efeitos sobre a produção de pepsina e na digestão; pela sua capacidade aniônica tamponante com cátions das dietas ( $Ca^{++}$ ,  $Mg^{++}$ ,  $Fe^{++}$ ,  $Cu^{++}$ ,  $Zn^{++}$ ), aumentando a digestibilidade e retenção desses elementos e pela utilização da energia do ácido no metabolismo demonstrado por HUME *et al.* (1993) com ácido propiônico. Para ADAMS (1999) a eficácia dos ácidos orgânicos puros ou combinados é o resultado da sua concentração, do pKa e da capacidade de quelação dos ácidos.

Outro possível mecanismo seria, segundo KIRCHGESSNER e ROTH (1982), a redução do pH gástrico em suínos jovens, recém desmamados, resultando no aumento da conversão de pepsinogênio em pepsina. Sugere-se que este aspecto retardaria o crescimento de *Escherichia coli* permitindo com isso, um maior desenvolvimento de bactérias produtoras de ácido láctico. Paralelamente a esta ação sobre populações microbianas do trato gastrointestinal (TGI), os ácidos orgânicos podem proporcionar uma melhora significativa na utilização dos nutrientes



da dieta. KIRCHGESSNER e ROTH (1982) verificaram aumento na retenção de nitrogênio, cálcio e fósforo em suínos alimentados com ácidos orgânicos. Entretanto, este benefício deve ser questionado nas aves, pois, o pH do proventrículo já é baixo e uniforme desde a eclosão, não alterando no decorrer de sua vida (HERPOL, 1966 citado por PENZ *et al.*, 1993).

SMITH (1965) citado por PENZ (1993) observou redução no pH do papo de aves alimentadas com ácidos orgânicos, mas não na moela e intestino. O mesmo autor observou que a redução do pH do papo inibiu a multiplicação de microrganismos resultando em uma concentração extremamente baixa de microrganismos na moela e intestino delgado sugerindo que o local de ação dos ácidos orgânicos, em aves, seja o papo.

### **2.3.3 Métodos de aplicação**

Os propionatos podem ser aplicados utilizando-se de vários métodos, sendo que a escolha depende das conveniências no processo e do tipo de produto a ser conservado. Os cinco métodos mais comuns de aplicação são: adição ou incorporação direta no produto, imersão, vaporização, polvilhamento ou incorporação na embalagem. Mais de um método poder ser usado para garantir uma perfeita aplicação do conservante ao produto. Acima de 60°C, o ácido propiônico começa a sublimar, sendo volátil com o vapor, sem decompor-se. Esta volatilidade deve ser considerada quando o propionato é aplicado antes de uma fase de aquecimento no processo existente.

## **2.4 Atividade de água**

Os macro e micro nutrientes, que compõem os produtos destinados à alimentação humana e animal, dependem da presença de água, que confere textura, disponibilidade orgânica, palatabilidade, estabilidade e maior peso. Entretanto, esta água pode ser o principal fator intrínseco na decomposição do produto (NETO *et al.*, 1976). Umidade, valor quantitativo de água em uma amostra em base seca ou base úmida, propriedade que depende da quantidade da amostra. Atividade de água, medida do estado de energia da água em um sistema (qualitativo), propriedade que não depende da quantidade de amostra.

A melhor medida da concentração de água, em termos de propriedades físico-químicas, nos produtos, refere-se à medição de sua atividade (Aa), ou seja,

medição do teor de água livre no produto. A água pode ocorrer como água ligada e água livre, resultando em conteúdo total de água (umidade). Podendo apresentar-se intimamente ligada às moléculas constituintes do produto, não podendo ser removida ou utilizada para qualquer tipo de reação, onde o metabolismo dos microorganismos é paralisado, não havendo desenvolvimento ou reprodução; ou pode encontrar-se livre, estando disponível para as reações físicas (evaporação), químicas (escurecimento) e microbiológicas, tornando-se a principal responsável pela deterioração do produto (SCOOT, 1957). A velocidade das reações químicas, desejáveis ou não, depende da mobilidade e concentração dos compostos e enzimas envolvidos, que são conferidas pela quantidade de água livre.

O conhecimento dos níveis da atividade de água permite controlar inibição da reprodução microbiana, reações enzimáticas, oxidativas e hidrolíticas do produto, assegurando embalagem e condições de armazenamento adequado, valorizando o produto, economicamente. O produto com atividade de água estabelecida pode apresentar maior qualidade e rendimento, melhor preservação e tempo de vida determinado com maior rigor.

A diferença entre umidade e presença de atividade de água num produto pode ser evidenciada através de uma força motriz, presente no produto, que proporciona o transporte da água livre de um ponto de atividade de água mais intensa, para outro ponto em que a atividade de água seja reduzida, embora, ambos os pontos encontrem-se com igual teor de umidade (que representa a água total = água combinada + água livre). Quando não existe água livre, a medida de atividade de água será igual a  $A_a = 0,000$ , porém, se a amostra é constituída em sua totalidade por água pura, então  $A_a = 1,000$ . Portanto, as medições de  $A_a$  dos produtos estão compreendidas entre 0,000 e 1,000.

O comportamento microbiano frente à  $A_a$  é extremamente variável, sendo que as bactérias são mais exigentes, quanto à disponibilidade de água livre, em relação aos fungos e leveduras. Os substratos com  $A_a$  inferior a 0,600 estão assegurados quanto à contaminação microbiana. Na Tabela 1 está demonstrado o limite mínimo de  $A_a$  para alguns fungos toxigênicos e na Tabela 2 as concentrações máximas de micotoxinas permitidas em alimentos para animais de companhia.

Tabela 1 - Limite mínimo de atividade de água (Aa) para fungos toxigênicos

Fungos	Aa para Crescimento	Aa para Produção de Toxinas
<i>Aspergillus clavatus</i>	0,85	0,99 (patulina)
<i>A. flavus</i>	0,78 - 0,80	0,83 – 0,87 (aflatoxina)
<i>A. ochraceus</i>	0,77 – 0,83	0,83 – 0,87 (ocratoxina A)
<i>A. ochraceus</i>	0,76 – 0,81	0,80 – 0,88 (ácido penicílico)
<i>A. parasiticus</i>	0,82	0,87 (aflatoxina)
<i>Penicillium cyclopium</i>	0,82 – 0,87	0,97 (ácido penicílico)
<i>P. cyclopium</i>	0,81 – 0,85	0,87 – 0,90 (ocratoxina)
<i>P. expansum</i>	0,83 – 0,85	0,99 (patulina)
<i>P. isladicum</i>	0,83	-
<i>P. martensii</i>	0,79 – 0,83	0,99 (ácido penicílico)
<i>P. patulum</i>	0,81 – 0,85	0,85 – 0,95 (patulina)
<i>P. veridicatum</i>	0,83	0,83 – 0,86 (ocratoxina A)
<i>Trichotecium roseum</i>	0,90	-

Adaptado de Boletim Técnico Informativo BRASEQ (Brasileira de Equipamentos Ltda, 1998).

Tabela 2 Níveis máximos de micotoxinas permitidos em produtos acabados utilizados na nutrição de animais de companhia

Micotoxinas	Limites para Produto Acabado (ppb)
Aflatoxina Total(B1+B2+G1+G2)	20
Aflatoxina B1	10
Ocratoxina A	50
Fumonisina (B1+B2)	5000
Zearalenona	200
Don (Vomitoxina)	1000
Citrinina	500
Nivalenol	100
T2	100

ppb - µg/kg

Adaptado do Manual do Programa Integrado de Qualidade Pet (PIQPET – ANFAL PET, 2007).

### **3. CONCLUSÃO**

A maioria dos alimentos destinados à alimentação animal, quer seja animais de produção ou animais de companhia têm como base grãos, dentre eles o milho é o mais utilizado, que também é a matéria-prima mais contaminada por fungos e seus metabólitos (micotoxinas). Esta contaminação ocorre no campo, transporte, armazenamento, processamento e nos produtos acabados. Os estudos utilizando ácidos orgânicos, entre eles o ácido propiônico, como inibidores do desenvolvimento fúngico, confirmam inibição na atividade destes e conseqüentemente menor produção de micotoxinas. No entanto há necessidade de mais estudos para determinar as concentrações destes inibidores fúngicos que sejam eficientes e economicamente viáveis.

#### 4 REFERENCIAS

ADAMS, C.A. **Nutricines Food components in Health and Nutrition**. Nottingham. Nottingham Univ. Press, 1999.

ASSOCIAÇÃO NACIONAL DOS FABRICANTES DE ALIMENTOS PARA ANIMAIS DE ESTIMAÇÃO – ANFALPET. **Guia de identidade e qualidade pet**. 1.ed. Anfalpet, São Paulo. 2007, 48p.

ASEVEDO, I.G. *et al.* Mycoflora and aflatoxigenic species of *Aspergillus* spp. Isolates from stored maize. **Rev. Microbiol.**, v. 25, n. 1, p. 46-50, 1994.

AZEREDO, H.M.C. **Fundamentos de estabilidade de alimentos**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2004. 195p.

BERNARDIS L.L, BELLINGER L.L. The lateral hypothalamic area revised: ingestive behavior. **Neuroscience Biobehavior**. v.20, n.2, p.189-287, 1996.

Boletim Técnico Informativo BRASEQ (Brasileira de Equipamentos Ltda, 1998). Disponível em: <http://www.braseq.com.br/>. Acesso em 03/06/2008.

BULLERMAN, L.B. *et al.* Formation and control of mycotoxins in food. **J. Food Prot.**, v. 47, n.8, p. 637-646, 1984.

CAMPOS, S.C. **Monitoramento de aflatoxinas, fungos toxigênicos e níveis de contaminação em matérias primas e alimentos balanceados. Aflatoxicose natural em cães no estado do Rio de Janeiro**. Seropédica: Instituto de Veterinária: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2007. 70p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinária - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2007.

CAST. Mycotoxins. Economic and health risks. In: Task Force Report 116. **Ames: Council for Agricultural Science and Technology**, 1989. 199 p.

CHIRIFE, J.; FAVETTO, G.J. Some physico-chemical basis of food preservation by combined methods. **Food Research International**, v. 25, n. 5, p. 389-396, 1992.

CHOCT M. Effects of Organic Acids, Prebiotics and Enzymes on Control of Necrotic Enteritis and Performance of Broiler Chickens. University of New England Armidale, NSW, 2004.

EIDELSBURGER, U. **Feeding short-chain organic acids to pigs**. Nottingham. Nottingham University Press. p.107-121, 2001.

GMP. **Regulations on product standards in the animal feed sector**. Neederland: Den Haag, 2005. 25 p.

GOMEZ, D.G.J. *et al.* Efecto de las propiedades inhibitorias de mohos a escala de laboratorio de tres productos comerciales compuestos por sales derivados del acido propionico llamados fungitek dry, action y grain sobre los mohos presentes en el

maíz (zea mays) **Estado Lara Venezuela Bacteriología y Laboratorio Clínico UDES**, Facultad de Salud, Cúcuta Colombia, 2008

GONZÁLES, M. *et al.* Characterization of mexican isolates of *Coletotrichum lidemuthianum* by using diferencial cultivars and molecular markers. **Phytopathology**, v. 88, p. 292-299, 1998.

HART, H., SCHUETZ, R.D. **Organic chemistry: A short curse.** 4<sup>a</sup> Ed. Michican State University. 1972, 500p.

HENKE, S. E. *et al* Survey of aflatoxin concentration in wild bird seed purchased in Texas. **J. Wildlife Dis.**, v. 37, p. 831-835, 2001.

HUME, M. E. *et al.* Metabolism of [14 C] propionic acid in broiler chicks. **Poultry Science**, v. 72, p. 786-793, 1993.

KALE, S.; BENNET, J. W. Strain instability in filamentous fungi. In: BHATNAGAR, D.; LILLEHOJ, E. B.; ARORA, D. K. (Org.). Handbook of applied mycology: **Mycotoxins in ecological systems.** 5. ed. New York: Marcel Dekker, Inc. p.311-331, 1999.

KIRCHGESSNER, M., ROTH, F.X. Fumaric acid as a feed additive in pig nutrition. **Pig News Inf., Farnham Royal**, v.3, p.259-263, 1982.

KRABBE, E.L.; MACIEL, J.E.S. Efeito da Umidade e do Ácido Propiônico Sobre as Características Bromatológicas e Microbiológicas de Grãos de Milho. In: XXXIV Reunião da SBZ, **Anais...** Juiz de Fora – MG, 1995.

KRABBE, E.L. *et al.* Efeito da Utilização de ácido Propiônico e Sulfato de Cobre sobre a Atividade Fúngica Durante a Armazenagem de Milho com dois Níveis de Umidade. In: XXXIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia. **Anais...** Fortaleza, CE.p.347-48, 1996.

KROGH, P. Ochratoxins in food. In: KROGH, P. (Org.). **Mycotoxins in food.** London: Academic Press, 1987. p. 97-121.

LACAZ, C.S. *et al.* **Micologia Médica Fungos, Actinomicetos e Algas de Interesse Médico.** São Paulo, Cap.38. p.616-651, 1991.

LEISTNER, AGUILERA, J.M.; CHIRIFE, J. Combined methods for the preservation of foods: in Latin America and the CYTED-D project. **Journal of Food Engeneering**, v. 22, n.1, v.4, p.433-444, 1994.

MAIA, P. P.; SIQUEIRA, M. E. P. B. Occurence of aflatoxins B1, B2, G1 and G2 in some Brazilian pet foods. **Food Addit. Contam.**, v.19, n.12, p.1180-1183, 2002.

MAGNOLI, C.; *et al* Enumeration and identification of *Aspergillus* group and *Penicilium* species in poultry feeds from Argentina. **Mycopathologia**, v.142, p.27-32, 1998.

MARTINS, M. L. *et al.* Fungal flora and mycotoxins detection in commercial pet food. **Rev. Port. Cienc. Vet.**, v. 98, p.179-183, 2003.

MORENO, M.E., *et al.* Use of propionic acid salts to inhibit aflatoxin production in stored grains of maize. **Revista Agrociencia**. V.34, p.477-484, 2000.

NOBRE, M.O. *et al.* Drogas Antifúngicas Para Pequenos e Grandes Animais. **Ciência Rural**, v.32, n.1, p.175-184, 2002.

NORTHOLT, M. D. *et al.* Penicilic acid production by some fungal species in relation to water activity and temperature. **J. Food Prot.**, v. 42, p. 476-484, 1979.

NETO R.A.T. *et al.* **Coletânea do Instituto de Tecnologia de Alimentos**, v7, p 191-206, 1976.

ONO, E. Y. S.; *et al.* Effect of climatic conditions on natural mycoflora and fumonisins in freshly harvested corn of the state of Paraná, Brazil. **Mycopathologia**, v.47, p.139-148, 1999.

PENZ, A.M., *et al.* Ácidos orgânicos na alimentação das aves In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 1993. **Anais ... Santos**, p.111-119, 1993.

PITT, J.I. Toxigenic fungi and mycotoxins. **Br. Med. Bul.**, v.56, p.184-192, 2000.

POZZI, C. R.; *et al.* Post harvested and stored corn in Brazil: mycoflora interaction, abiotic factors and mycotoxin occurrence. **Food Addit. Contam.**, v.12, n. 3, p.313-319, 1995.

ROSA, C.A.R. **Micobiota toxígena e ochratoxinas em rações destinadas à alimentação de aves, bovinos, suínos e importância em saúde animal**. 2002. 180 f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica.

SANTÚRIO, J.M. Micotoxina na produtividade avícola: Tipos; seus efeitos; como detectá-las e preveni-las In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 1993. **Anais ... São Paulo**, p.223-257. 1993.

SAUER, D.B AND R. BURROUGHS "Efficacy of various chemicals as grain mould inhibitors." **Trans. Am. Soc. Of Agric Enq**:17. Págs. 557-559, 1974

SCOTT, W.J. Water relation of food spoiling microorganisms **Adv Food Res**.7:83-127, 1957

SCUDAMORE, K. A.; *et al.* S. Determination of mycotoxins in pet foods sold for domestic pets and wild birds using linked-column immunoassay clean-up and HPLC. **Food Addit. Contam.**, v. 14, p. 175-186, 1997.

SCUDAMORE, K. A.; *et al* Mycotoxins in ingredients of animal feeding stuffs: I determination of mycotoxins in maize and maize products. **Food Addit. Contam.**, v. 15, p. 30-55, 1998.

SHARMA, M.; MÁRQUEZ, C. Determination of aflatoxins in domestic pet foods (dog and cat) using immunoaffinity column and HPLC. **Anim. Feed. Sci. Technol.**, v.93, p. 109-114, 2001.

WHITLOW, L.Y; HAGLER,W. **Mycotoxin contamination of feedstuffs - An additional stress factor for dairy cattle.** *North Carolina State University. Department of Animal Science, 2002.*



## **CAPITULO II - EFEITO DE DIFERENTES NÍVEIS DE UMIDADE COM E SEM UTILIZAÇÃO DE ANTIFÚNGICO EM DIETAS PARA CÃES NA PRODUÇÃO DE CO<sub>2</sub>**

### **RESUMO**

O desenvolvimento fúngico compromete a qualidade de grãos e rações comerciais, podendo, até mesmo, gerar efeitos adversos à saúde humana e animal. Para evitar a deterioração dos alimentos por fungos, vários antifúngicos são utilizados e testados, porém ainda há dúvidas sobre a melhor dosagem e forma a ser utilizada. Foram produzidas quatro dietas extrusadas para cães com diferentes níveis de umidade, com adição ou não de ácido propiônico, com o objetivo de avaliar a produção de CO<sub>2</sub>. As dietas (tratamentos) foram: T1 com 8,1% de umidade sem adição de ácido propiônico; T2 com 10,2% de umidade sem adição de ácido propiônico; T3 com 10,2% de umidade e adição de 0,065% de ácido propiônico e T4 com 10,2% de umidade e adição de 0,13% de ácido propiônico. Estas foram armazenadas em câmara com umidade relativa do ar de 75% e temperatura de 25 a 28°C para a determinação de CO<sub>2</sub> nos tempos zero, 30, 60 e 90 dias por meio de titulação com ácido clorídrico (HCl) 0,05N, a fim de estimar o produção de CO<sub>2</sub>. O experimento seguiu delineamento inteiramente casualizado em parcela subdividida no tempo. Os resultados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey. Houve interação entre dietas e tempo de armazenamento, apenas para a dieta T2 medida aos 90 dias, na qual foi encontrada a maior concentração de CO<sub>2</sub> e, portanto, o maior desenvolvimento fúngico. Alimentos secos extrusados para cães com umidade superior a 10% sem antifúngico podem apresentar expressivo desenvolvimento fúngico com 90 dias de armazenamento em câmara com umidade relativa do ar e temperatura controlada.

Palavras-chave: Ácido propiônico. Alimento seco extrusado. Atividade de água. Fungo.

## **EFFECT OF DIFFERENT MOISTURE LEVELS WITH OR WITHOUT MOLD INHIBITOR IN DOG DIETS ON CO<sub>2</sub> PRODUCTION**

### **ABSTRACT**

Mold growth undertakes grain and commercial rations quality, it may further, to generate adverse effects to human and animal health. To avoid food deterioration by fungus, many mold inhibitor are used and tested, however it still having doubts about the best dose and way to be used. They were produced four extruded diets for dogs with different moisture content, with or without propionic acid, with the objective to evaluate CO<sub>2</sub> production. The diets (treatments) were: T1 (8.1% moisture without propionic acid), T2 (10.2% moisture without propionic acid), T3 (10.2% moisture with 0.065% propionic acid) and T4 (10.2% moisture with 0.130% propionic acid). The diets were stored in a chamber with air relative moisture of 75% and temperature of 25 to 28°C to the determination of CO<sub>2</sub> on times: 0, 30, 60 and 90 days through titulation with chlorid acid (HCl) 0,05N, to estimate mold growth. The experiment followed a completely randomized desing in split-plot. The results were submited to ANOVA and the means were compared through Tukey's test. It was interaction among diets and stored time. It was significative difference only to the diet T2 measured in 90 days, in which was found the highest CO<sub>2</sub> concentration and, therefore, the highest mold growth. Dry extruded dog foods with moisture content higher than 10% without mold inhibitor may present expressive mold growth with 90 days stored in controled moisture and temperature chamber.

Key words: Dry extruded food. Fungus. Propionic acid. Water activity.

## 1. INTRODUÇÃO

A lista de substâncias químicas com ação antifúngica é bastante extensa, mas ainda muito restrita ao ser comparada com o número de drogas antibacterianas disponíveis (NOBRE, 2002), o que gera dúvidas quanto à melhor dosagem e tipos de antifúngicos a serem adicionados. O desenvolvimento fúngico em grãos, matérias-primas e rações, além de comprometer sua qualidade, pode causar sérios problemas à saúde humana e animal, sendo um tema que merece atenção.

A prevenção do desenvolvimento fúngico deve iniciar na armazenagem dos grãos, por meio do controle da umidade dos mesmos. Além disso, para cada nível de umidade devem ser adicionados níveis adequados de inibidores de fungos, tendo em vista um determinado período de estocagem, pois geralmente seu desenvolvimento pode ocorrer ainda a campo e uma má estocagem de grãos faz com que esse processo seja acelerado.

Cuidados devem ser tomados para evitar o desenvolvimento fúngico e garantir a melhor alimentação aos animais quanto ao armazenamento da ração: as embalagens devem ser mantidas em ambiente ventilado, afastadas do sol e de outros animais que possam dela utilizar-se como (roedores e insetos, por exemplo) e o aumento da umidade deve ser evitado, pois propicia o aparecimento de fungos produtores de toxinas.

Uma vez que a técnica mais antiga e ainda muito utilizada para conservação de alimentos é a remoção da umidade, a atividade da água (Aa) pode explicar a estabilidade do produto por meio da determinação da disponibilidade de água. A água pode ocorrer como água ligada e água livre, resultando no conteúdo total de água (umidade). Essa dissociação permite a previsão das condições da participação dessa água em reações químicas e enzimáticas ou do crescimento microbiológico.

Segundo AZEREDO (2004) o objetivo principal da redução da atividade de água nos alimentos é a diminuição das alterações microbiológicas e LABUZA *et al.* (1970) constataram que o ganho de umidade leva à alterações na textura dos alimentos e ao aumento da atividade de água, favorecendo as reações de escurecimento enzimático e não-enzimático, e ao desenvolvimento de microrganismos nas rações.

Os antifúngicos têm características especiais quanto ao mecanismo de ação, via de administração, ação em micoses superficiais e, ou sistêmicas, podendo ser

classificados com base no sítio-alvo e estrutura química, sendo que estes atuam em sua maioria na membrana celular, (LACAZ *et al.*, 1991).

Além dos antifúngicos, outros fatores alteram o crescimento dos fungos, tais como umidade, temperatura, quantidade adicionada de antifúngico e disponibilidade de O<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub>. Os ácidos orgânicos produzem acidez, a qual por sua vez age como flavorizante e também retarda a degradação enzimática. Atuam como agentes quelantes que se ligam a metais formando os quelatos metálicos, os quais previnem ou reduzem a oxidação oriunda da catálise dos íons metálicos. Agem diretamente como fortes inibidores do crescimento microbiano podendo ter uso na preservação de grãos e rações, sanitização da carne e como aditivo promotor de crescimento na ração (BELLAYER e SCHEUERMANN, 2004).

Estudos que relacionem diferentes níveis de umidade com adição ou não de antifúngicos em alimentos ainda são muitos escassos na literatura, então, com base nisso, foi avaliado o desenvolvimento fúngico em alimentos secos extrusados para cães em condições favoráveis ou não ao seu crescimento, utilizando como inibidor fúngico ácido propiônico.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Tratamentos e delineamento experimental**

Foi avaliado o desenvolvimento fúngico, por meio da determinação da produção de CO<sub>2</sub>, por meio do método adaptado de STOTZKY (1965), de quatro dietas secas extrusadas (tratamentos) para cães: T1 com 8,1% de umidade sem adição de ácido propiônico; T2 com 10,2% de umidade sem adição de ácido propiônico; T3 com 10,2% de umidade e adição de 0,065% de ácido propiônico e T4 com 10,2% de umidade e adição de 0,130% de ácido propiônico. A composição nutricional encontra-se na Tabela 1.

As dietas foram armazenadas em duplicata, sendo 700g de alimento em cada pote plástico (A e B de cada tratamento) em câmara com umidade relativa do ar de 75% e temperatura de 25 a 28°C para a determinação de CO<sub>2</sub> nos tempos zero, 30, 60 e 90 dias por titulação com ácido clorídrico (HCl) 0,05N. O experimento seguiu delineamento inteiramente casualizado em parcela subdividida no tempo.

Tabela 1 – Ingredientes e composição química da dieta experimental

Ingredientes	g/kg
Milho	440,0
Quirera de arroz	40,0
Farelo de soja	150,0
Farinha de carne e ossos	150,0
Farinha de peixe	10,0
Farinha de vísceras de frango	140,0
Gordura de frango	30,0
Palatabilizante (hidrolizado de vísceras de ave)	30,0
Premix vit/min <sup>1</sup>	5,0
Cloreto de sódio	5,0
Composição química analisada (% na matéria seca)	
Matéria seca (MS) %	89,36
Matéria orgânica (MO)	90,04
Matéria mineral (MM)	9,96
Proteína bruta (PB)	30,59
Extrato etéreo ácido (EEA)	8,51
Fibra bruta (FB)	2,34
Extrativos não-nitrogenados (ENN) <sup>2</sup>	37,96
Energia metabolizável (kcal/g) (EM) <sup>3</sup>	3,12

<sup>1</sup>Enriquecimento/kg de alimento: Vit. A – 20000 UI; Vit. D – 2000 UI; Vit. E – 48 mg; Vit. K - 48 mg; Vit. B1 - 4 mg; Vit. B2 – 32 mg; Ácido Pantotênico – 16 mg; Niacina – 56 mg; Colina – 800 mg; Zinco – 150 mg; Ferro – 100 mg; Cobre – 15 mg; Iodo – 1,5 mg; Manganês – 30 mg; Selenio – 0,2 mg e antioxidante 240 mg.

<sup>2</sup>Estimado por:  $ENN\% = MS\% - (MM\% + PB\% + EEA\% + FB\%)$

<sup>3</sup>Estimado por:  $EM (kcal/g) = (3,5 \times PB + 8,5 \times EEA + 3,5 \times ENN)$

## 2.2 Processamento e controle de qualidade das rações

A dieta referência foi produzida em janeiro de 2007. A temperatura ambiente estava entre 25°C e 28°C e a umidade relativa do ar em torno de 75%.

Primeiro foi produzida a dieta referência com 8,1% de umidade e atividade de água de 0,524 (26,5 °C). Após, o secador foi regulado para aumentar a umidade para 10,2% e atividade de água para 0,622 (26,7 °C) (Tabela 2). As leituras de atividade de água foram feitas com equipamento da *Rotronic HigoPalm®*.

Tabela 2 - Regulagem do secador horizontal para a obtenção de dois níveis de umidade em dieta para cães

Esteira	Dieta referência (8,1 % UM*)		Dieta teste (10,2% UM*)	
	Tempo (minutos)	Temperatura (°C)	Tempo (minutos)	Temperatura (°C)
1 <sup>a</sup>	10,0	134	10,0	118
2 <sup>a</sup>	11,6	134	10,9	118
3 <sup>a</sup>	12,4	134	10,0	118

\*UM (umidade)

Depois de secas as dietas foram encaminhadas para o recobrimento em misturador tipo betoneira com capacidade para 25 kg. Primeiramente foi aplicado, por meio de pistola para pintura com ar comprimido, o ácido propiônico nos tratamentos T3 (0,065%) e T4 (0,13%), em seguida foi adicionado 3% de óleo de frango e por último 3% do hidrolisado de fígado de ave em todos os tratamentos. Houve um período de 15 dias antes da utilização para estabilização da dieta.

### 2.3 Procedimento e análise estatística

Foram pesadas, aproximadamente, 25g de ração, as quais foram colocadas em frascos escuros com boca larga e com vedação (tampa revestida internamente por uma arruela de borracha para que não ocorra troca de gases com meio externo). Todas as leituras foram feitas em triplicata (para A e B), produzindo seis repetições de cada tratamento em cada tempo de armazenamento. Junto da amostra foi colocado um copo descartável contendo 20 mL de NaOH 0,05N padronizado, sendo o frasco hermeticamente fechado em seguida.

O frasco foi mantido em temperatura ambiente e sem presença de luz. Após 24 horas, o copo descartável foi retirado e adicionado cloreto de bário (1 mL) e fenolftaleína (2 gotas) como indicador. O copo foi colocado em agitador (imã) e titulado com HCl 0,05N padronizado. Foram realizadas cinco provas em branco, utilizando peças de isopor para equivaler ao volume de ração.

Foi titulado até a mudança de rosa para incolor e então se registrou o quanto de ácido foi gasto. Quanto maior o volume de ácido gasto significa que mais O<sub>2</sub> foi consumido e mais CO<sub>2</sub> liberado pelos microrganismos.

O teor de CO<sub>2</sub> foi obtido segundo a fórmula:

$$\% \text{ CO}_2 = \{[(B-A) \times N \times FC \times 22] \times 100\} / \text{ peso amostra}$$

B = Volume do ácido gasto na titulação da prova em branco

A = Volume do ácido gasto na titulação da amostra

N = Normalidade do ácido

FC = Fator de correção do ácido

22 = Equivalente grama do CO<sub>2</sub>

Os resultados foram analisados quanto à normalidade dos resíduos e homogeneidade das variâncias, sendo os dados transformados para logaritmo quando necessário. Posteriormente os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey (p<0,05).

Em todos os tratamentos foram feitas as determinações das micotoxinas: Aflatoxina (B1, B2, G1 e G2); Fumonisina (B1 e B2); Ocratoxina A; Tricotecenos; Vomitoxina (DON); e Zearalenona, no início e no final do experimento por Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O Tratamento T2, com 10,2% de umidade e sem adição de ácido propiônico, apresentou maior concentração de CO<sub>2</sub> em relação aos outros tratamentos (Tabela 3), significando maior desenvolvimento fúngico. Entretanto, segundo BUENO *et al.* (2001) o teor de umidade inferior a 11,5% é suficiente para suprimir o desenvolvimento fúngico em alimentos para cães e gatos, uma vez que os fungos necessitam de água disponível nos alimentos para o seu desenvolvimento.

Quando o fator analisado é o tempo de armazenamento (desafio), o tratamento com maior umidade e sem adição de antifúngicos (T2) apresentou maior concentração de CO<sub>2</sub> aos 90 dias, enquanto que os outros tratamentos não diferiram entre si ao longo do tempo (p>0,05) (Tabela 3). Resultados semelhantes foram obtidos por KRABBE e MACIEL (1995), os quais descreveram que o uso de ácido propiônico em rações de frangos, com 11,6% de umidade, na dosagem de 1,2 kg/t de ração foi eficaz no controle da produção de CO<sub>2</sub> até os sete dias de armazenamento.

Tabela 3 - Concentração de CO<sub>2</sub> (%) em 25g/24horas em dietas secas extrusadas para cães com diferentes níveis de umidade, com e sem ácido propiônico, armazenadas durante 90 dias

Tempo (dias)	Tratamentos*			
	T1	T2	T3	T4
0	0,25	1,09 <sup>b</sup>	3,32	4,74
30	0,86	2,49 <sup>b</sup>	2,64	2,82
60	1,44	3,58 <sup>b</sup>	4,01	3,68
90	1,09	145,76 <sup>a</sup>	4,70	2,19
Médias	0,91 ± 0,23 <sup>B</sup>	38,23 ± 17,10 <sup>A</sup>	3,67 ± 0,40 <sup>B</sup>	3,36 ± 0,26 <sup>B</sup>
CV (%)	12,08	200,55	17,16	10,83

Médias seguidas por letras maiúscula na linha e minúscula na coluna diferentes diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05)

CV = Coeficiente de variação

\*Tratamentos: T1 = 8,1% de umidade sem ácido propiônico; T2 = 10,2% de umidade sem ácido propiônico; T3 = 10,2% de umidade com 0,065% de ácido propiônico; T4 = 10,2% de umidade com 0,13% de ácido propiônico

Na determinação de CO<sub>2</sub>, os tratamentos com maior umidade apresentaram um nível de CO<sub>2</sub> pouco acima do T1. Como o método utilizado foi a titulação, esta pode não ter detectado uma possível diferença na produção de CO<sub>2</sub> entre os tratamentos. Sugere-se neste caso, para trabalhos futuros, a complementação com outros métodos, como com colunas de afinidade para CO<sub>2</sub>.

A atividade de água aos 90 dias foi de: T1 = 0,651; T2 = 0,801; T3 = 0,719 e T4 = 0,695. Como podemos observar a maior Aa favoreceu a produção de CO<sub>2</sub> no T2 com maior umidade e sem antifúngico, este tratamento também foi o único que apresentou a micotoxina Fumonisina B1 (393,3 µg/kg), no final do experimento. As outras micotoxinas analisadas não foram detectadas em nenhum dos tratamentos, tanto no início quanto aos 90 dias de desafio. Fungos produzem água em seu metabolismo, devido ao consumo de nutrientes. Embora T2, T3 e T4 foram produzidos no mesmo lote e logo mesma Aa, ao longo dos 90 dias, como o T2 teve maior ação microbiológica, deve ter gerado água e colaborado para o aumento da Aa.

O alto teor de umidade favorece o aparecimento de fungos tanto nos grãos, ainda no campo ou mal armazenados, quanto nos alimentos já processados e prontos para ingestão. O não controle da umidade durante o armazenamento é a



condição propícia para o desenvolvimento de fungos, podendo comprometer todo o alimento devido ao contato de partículas contaminadas com partículas não-contaminadas.

Na indústria durante a secagem, pode ocorrer que alguns extrusados fiquem com umidade superior ao esperado, tornando-se assim foco para desencadear o desenvolvimento fúngico, já que grande parte da matéria-prima vem contaminada. A atividade dos fungos produz água em seu metabolismo, favorecendo a propagação dos mesmos, e com mais água disponível, propicia também a produção de micotoxinas.

Avaliando a eficiência de antifúngicos, KRABBE *et al.* (1996) observaram que o sulfato de cobre adicionado ao milho triturado durante o armazenamento foi ineficiente. Por outro lado, estes mesmos autores observaram que o ácido propiônico utilizado em dosagem correta foi eficiente no controle de fungos, reduzindo perdas de valor nutricional em milho. Resultados semelhantes foram obtidos por GOMES *et al.* (2008), os quais avaliando o desenvolvimento fúngico em milho contaminado, durante sete semanas, em laboratório, com uso de três produtos que tinham como base o ácido propiônico, relataram que todos foram eficientes na redução dos fungos ao longo do tempo. Desse modo, os ácidos orgânicos têm sido utilizados para preservar grãos de cereais contendo alta umidade e como preventivo de fungos nos alimentos.

Avaliando o efeito da umidade e do armazenamento no desenvolvimento fúngico em grãos de aveia, RUPOLLO *et al.* (2006) verificaram que as maiores incidências dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* ocorreram com 18% de umidade, seguindo-se de 21% e 15% e para o gênero *Fusarium* a maior incidência foi verificada em grãos armazenados com 21% de umidade. Quanto ao tempo de armazenamento, os fungos do gênero *Aspergillus* apresentaram maiores incidências aos três meses e seis meses de armazenamento. Esse experimento mostra que umidade relativa do ar equivalente a 75% e três meses armazenados são suficientes para o desenvolvimento fúngico, umidade esta que não é difícil de se obter a campo ou em unidades de armazenamento. Como demonstrado por RAMOS *et al.* (2008), os quais analisando a contaminação em grãos de milho detectaram a presença de *Aspergillus* spp. em 100% das amostras provenientes de regiões em que houve chuva na época de colheita, sendo que quando armazenados tinham umidade de

13%, o que confirma o fato de que os grãos podem ser contaminados ainda no campo e no processo de armazenagem, perdurando ao processamento do grão.

Uma vez crescidos e estabelecidos junto aos grãos e rações, os fungos dele se alimentam e tem os nutrientes como a sua principal fonte de alimento, sendo como alvo principal a gordura e carboidratos, visto que esses são fontes de energia, o que é o crucial para o seu crescimento. Tal fato foi verificado por RUPOLLO *et al.* (2006), que com o desenvolvimento de *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*, a uma umidade de grãos superior a 12%, houve intensificação da redução dos conteúdos de ácidos graxos insaturados, com predominância de ação sobre o linoléico e linolênico.

#### **4. CONCLUSÃO**

Alimentos secos extrusados para cães sem antifúngico com nível de umidade acima de 10% e Aa de 0,801, propiciam intensa produção de CO<sub>2</sub> quando armazenados por três meses. Já umidade menor que 8,1% ou uso de 0,065% de ácido propiônico e Aa menor que 0,719 controlaram a produção de CO<sub>2</sub>.

## 5 REFERÊNCIAS

- AZEREDO, H.M.C. **Fundamentos de estabilidade de alimentos**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2004. 195 p.
- BELLAVER, C.; SCHEUERMANN, G. **Aplicações dos ácidos orgânicos na produção de aves de corte**. Palestra apresentada na Conferencia AVESUI 2004. Florianópolis SC
- BUENO, D.J. *et al.* Microflora in commercial pet foods. **J. Food Prot.** v.64, 741-743, 2001.
- GOMEZ, D.G.J. *et al.* Efecto de las propiedades inhibitorias de mohos a escala de laboratorio de tres productos comerciales compuestos por sales derivados del acido propionico llamados fungitek dry, action y grain sobre los mohos presentes en el maíz (zea mays) **Estado Lara Venezuela Bacteriología y Laboratorio Clínico UDES**, Facultad de Salud, Cúcuta Colombia, 2008
- KRABBE, E.L.; MACIEL, J.E.S. Efeito da Umidade e do Ácido Propiônico Sobre as Características Bromatológicas e Microbiológicas de Grãos de Milho. In: XXXIV Reunião da SBZ, **Anais...** Juiz de Fora – MG, 1995.
- KRABBE, E.L. *et al.* Efeito da Utilização de ácido Propiônico e Sulfato de Cobre sobre a Atividade Fúngica Durante a Armazenagem de Milho com dois Níveis de Umidade. In: XXXIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia. **Anais...** Fortaleza, CE.p.347-48, 1996.
- LABUZA, T.P. *et al.* Water content and stability of low moisture and intermediate moisture foods. **Food Technology**, Chicago, v.24, n.5, p.35-42, 1970.
- LACAZ, C.S. *et al.* **Micologia Médica Fungos, Actinomicetos e Algas de Interesse Médico**. São Paulo, Cap.38. p.616-651, 1991.
- NOBRE, M.O. *et al.* Drogas Antifúngicas Para Pequenos e Grandes Animais. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.32, n.1, p.175-184, 2002
- RAMOS, C.R.B.A. *et al.* Contaminação por aflatoxinas em híbridos de milho cultivados em três regiões do estado de Goiás. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 38, n. 2, p. 95-102, jun. 2008. **Disponível em:** [www.agro.ufg.br/pat](http://www.agro.ufg.br/pat). Acesso em 21/01/2009
- 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. **Ciênc. agrotec.**, Lavras, v. 30, n. 1, p. 118-125, jan./fev., 2006
- STOTZKY, G. **Methods of soil analysis**. Madison, American Society of Agronomy. v.2. cap. 113, p.1550-1572, 1965.

### **CAPÍTULO III - EFEITO DE DIFERENTES NÍVEIS DE UMIDADE EM ALIMENTOS PARA CÃES, COM OU SEM ANTIFÚNGICO SOBRE A PREFERÊNCIA ALIMENTAR**

#### **RESUMO**

A prevenção do desenvolvimento fúngico em *pet food* tem sido um desafio para a indústria, uma vez que os fungos são potenciais produtores de toxinas, prejudicial à saúde animal, podendo ser letal. Assim, a utilização de antifúngicos se faz necessário devido contaminação das matérias-primas utilizadas na indústria *pet food* e recontaminação do alimento. O ácido propiônico é potencial controlador de fungos, entretanto seu uso em *pet food* é pouco estudado, constituindo o objetivo deste estudo. Foram avaliados o consumo voluntário e a primeira escolha de alimentos secos extrusados para cães adultos com dois níveis de umidade, com e sem antifúngico (ácido propiônico). Foram comparados quatro tratamentos: T1 (8,12% de umidade sem ácido propiônico); T2 (10,21% de umidade sem ácido propiônico); T3 (10,21% de umidade com 0,065% de ácido propiônico) e T4 (10,21% de umidade com 0,13% de ácido propiônico), totalizando seis testes com comparação entre dois tratamentos cada. Foram utilizados 20 cães adultos machos e fêmeas, de diferentes raças. As observações foram feitas durante três dias seguidos para cada teste, totalizando 60 observações para cada comparação. O experimento seguiu delineamento inteiramente casualizado. Os resultados do consumo foram comparados pelo Teste T a 5% e a primeira escolha pelo Teste Qui-quadrado a 5%. Nos testes T1 vs T3 e T1 vs T4 os animais apresentaram preferência tanto para consumo como primeira escolha para os tratamentos T3 e T4 em relação ao T1. Dietas com maior umidade associadas com ácido propiônico proporcionam melhor resposta de consumo e primeira escolha.

Palavras-chave: Ácido propiônico. Alimento seco extrusado. Palatabilidade.

## **EFFECT OF DIFFERENT MOISTURE LEVELS IN DOG FOOD, WITH OR WITHOUT MOLD INHIBITOR ON FOOD PREFERENCE**

### **ABSTRACT**

The prevention of mold growth in pet food is an extreme challenge for the industry, considering that mold are potential toxin producers, dangerous to the animal health being potentially lethal. In this way, the use of mould inhibitors is a need once raw materials are naturally contaminated and the final pet food could recontaminate. Propionic acid is a potential mold controller, however its use in pet food is not well studied yet, which was the proposal of the current study. Voluntary intake and first choice of dry extruded dog foods for adult dogs with two moisture levels, with or without mold inhibitor (propionic acid) have been evaluated. Four treatments were compared: T1 (8.12% moisture without propionic acid), T2 (10.21% moisture without propionic acid), T3 (10.21% moisture with 0.065% propionic acid) and T4 (10.21% moisture with 0.13% propionic acid), resulting in six trials comparing two treatments each time. Twenty adult dogs, males and females of different breeds were utilized. Each trial was conducted during three consecutive days for each test, resulting in 60 observations for each comparison. The experiment followed a completely randomized design. Food intake was compared by Test T at 5% significance level and the first choice by Chi-Square Test at 5%. In trails T1 vs T3 and T1 vs T4 the dogs presented significant preference for food intake and first choice for treatments T3 and T4 than T1. Diets with propionic acid associated with the highest moisture level positively influenced food intake and first choice by dogs.

Key words: Extruded dry dog food. Palatability. Propionic acid.

## 1. INTRODUÇÃO

A ingestão dos alimentos obedece a diversos fatores bioquímicos e neuroendócrinos que agem sobre o sistema nervoso (hipotálamo) promovendo a fome ou a saciedade. O hipotálamo exerce influência na auto-seleção de alimentos, nas respostas a dietas com alto conteúdo protéico, no desbalanceamento de aminoácidos, no estresse alimentar, na textura dietética, na consistência e paladar, na aprendizagem aversiva (experiências negativas), no olfato e nos efeitos de manipulações hormonais (BERNARDIS e BELLINGER, 1996).

O olfato, gustação e visão são de fundamental importância, além de informações mecânicas que podem partir do esôfago (deglutição) ou do próprio estômago (plenitude ou vacuidade gástrica), também afetam a motivação para o consumo de alimento pelos sons associados à alimentação e pela observação do processo mastigatório.

Dependendo da raça do cão, o olfato pode variar em função da superfície da mucosa olfativa, do número de receptores, assim como da anatomia facial, que determina a direção da corrente aérea (PIZZATO e DOMINGUES, 2008).

A palatabilidade é importante mensuração da preferência de um alimento para cães, sendo essencial a qualquer alimento, pois além de minimizar o impacto de certos erros educativos de consumo, ela pode ampliar o laço afetivo entre o proprietário e o animal (PIZZATO e DOMINGUES, 2008). O método mais comum de avaliar a palatabilidade nos cães é o teste com dois comedouros, que envolve a comparação do consumo de dois alimentos diferentes (FARRELL, 1984; GRIFFIN *et al.*, 1984).

Os níveis de umidade em alimentos processados devem ao mesmo tempo prevenir a ação de microrganismos e manter a melhor forma física do extrusado oferecido aos cães estimulando assim a aceitação do alimento.

O ácido propiônico é usado pelas suas propriedades fungicidas. Os danos causados pelos fungos estão relacionados às perdas nutricionais de matérias-primas e alimentos completos e, dependendo da espécie e condições favoráveis estes produzem toxinas. KRABBE e MACIEL, 1995, observaram que o ácido propiônico foi eficiente no controle de fungos, reduzindo perdas do valor nutricional em milho. Entretanto, o uso de antifúngico a base de ácido propiônico é pouco conhecido em

alimentos para cães e não há informações disponíveis, apesar de sua inocuidade para a saúde animal e humana.

O presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito de diferentes níveis de umidade, com e sem antifúngico em alimentos secos extrusados para cães, quanto ao consumo voluntário e primeira escolha.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Preparo das dietas

Foi avaliado o efeito de dois níveis de umidade (8,12 e 10,21%) com e sem antifúngico (0,065 e 0,13% de ácido propiônico) em alimentos secos extrusados para cães adultos. Os alimentos foram produzidos com diferentes níveis de umidade, por meio do ajuste do tempo de secagem após extrusão (Tabela 1). Depois de secas as dietas foram encaminhadas para o recobrimento em misturador tipo betoneira com capacidade para 25 kg, sendo primeiro aplicado, por meio de pistola para pintura com ar comprimido, o ácido propiônico nos tratamentos T3 (0,065%) e T4 (0,13%), em seguida foi aplicado 3 % de óleo de frango e por último 3% do hidrolisado de fígado de ave em todos os tratamentos. Houve um período de 15 dias antes da utilização para estabilização da dieta. Os ingredientes e a composição química da dieta estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 1 - Regulagem do secador horizontal para a obtenção de dois níveis de umidade em dieta para cães

Esteira	Dieta referência (8,1 % UM*)		Dieta teste (10,2% UM*)	
	Tempo (minutos)	Temperatura (°C)	Tempo (minutos)	Temperatura (°C)
1 <sup>a</sup>	10,0	134	10,0	118
2 <sup>a</sup>	11,6	134	10,9	118
3 <sup>a</sup>	12,4	134	10,0	118

\*UM (umidade)

Tabela 2 – Ingredientes e composição química da dieta experimental

Ingredientes	g/kg
Milho	440,0
Quirera de arroz	40,0
Farelo de soja	150,0
Farinha de carne e ossos	150,0
Farinha de peixe	10,0
Farinha de vísceras de frango	140,0
Gordura de frango	30,0
Palatabilizante (hidrolizado de vísceras de ave)	30,0
Premix vit/min <sup>1</sup>	5,0
Cloreto de sódio	5,0
Composição química analisada (% na matéria seca)	
Matéria seca (MS) %	89,36
Matéria orgânica (MO)	90,04
Matéria mineral (MM)	9,96
Proteína bruta (PB)	30,59
Extrato etéreo ácido (EEA)	8,51
Fibra bruta (FB)	2,34
Extrativos não-nitrogenados (ENN) <sup>2</sup>	37,96
Energia metabolizável (kcal/g) (EM) <sup>3</sup>	3,12

<sup>1</sup>Enriquecimento/kg de alimento: Vit. A – 20000 UI; Vit. D – 2000 UI; Vit. E – 48 mg; Vit. K - 48 mg; Vit. B1 - 4 mg; Vit. B2 – 32 mg; Ácido Pantotênico – 16 mg; Niacina – 56 mg; Colina – 800 mg; Zinco – 150 mg; Ferro – 100 mg; Cobre – 15 mg; Iodo – 1,5 mg; Manganês – 30 mg; Selenio – 0,2 mg e antioxidante 240 mg.

<sup>2</sup>Estimado por:  $ENN\% = MS\% - (MM\% + PB\% + EEA\% + FB\%)$

<sup>3</sup>Estimado por:  $EM (kcal/g) = (3,5 \times PB + 8,5 \times EEA + 3,5 \times ENN)$

## 2.2 Animais e dietas experimentais

Foram utilizados 20 cães adultos machos e fêmeas, vacinados, desverminados e avaliados clinicamente, sendo oito da raça Beagle, quatro Basset Hound, quatro Labrador e quatro Husky Siberiano, os quais foram distribuídos inteiramente ao acaso e receberam alimento necessário para a manutenção diária de energia segundo a fórmula:  $130 \times \text{peso corporal}^{0,75}$ , preconizada pelo NRC (2006), mais 30% de cada tratamento teste. Para estes testes os animais



selecionados foram treinados desde jovens, e não apresentavam desvio de comportamento.

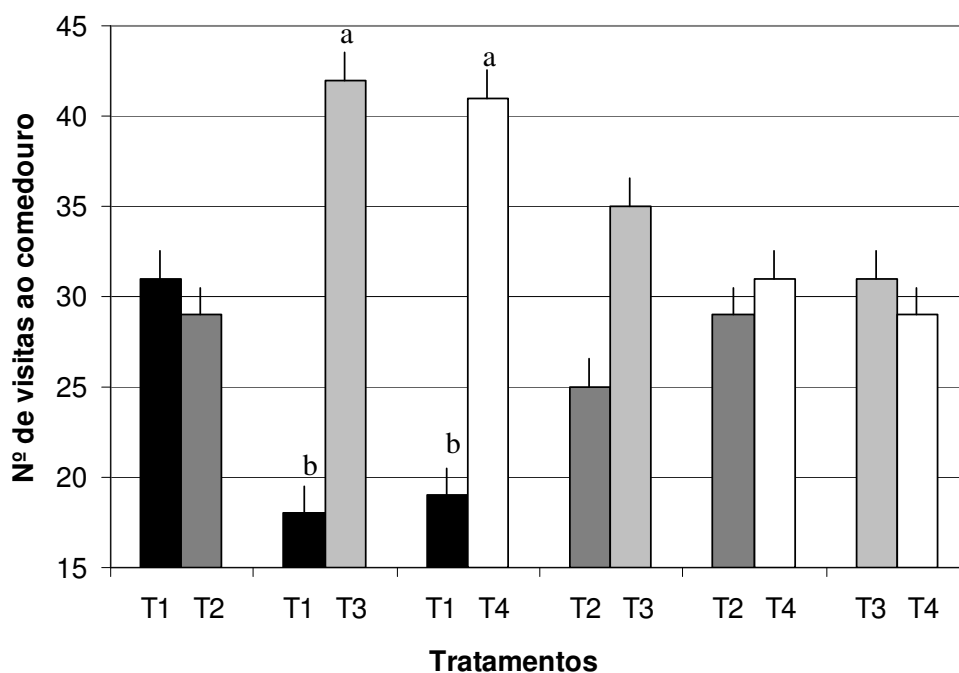
Os cães foram alojados em canil individual revestido de cimento liso e com solário. Foram comparados quatro tratamentos (dois a dois) perfazendo seis testes (comparações): T1 (8,12% de umidade e 0,00% de ácido propiônico); T2 (10,21% de umidade e 0,00% de ácido propiônico); T3 (10,21% de umidade com 0,065% de ácido propiônico) e T4 (10,21% de umidade com 0,13% de ácido propiônico).

As dietas foram oferecidas em dois comedouros, uma vez ao dia, as 17:00 horas, por um período de 30 minutos. A posição dos comedouros foi alternada a cada dia, com três dias para cada comparação, gerando 60 observações. Foi realizado um período de adaptação de dois dias às dietas testes. O consumo voluntário da dieta foi avaliado pela diferença na pesagem do oferecido e as sobras, e adicionalmente foi observada a primeira escolha, (adaptado de Griffen, 2003). Os resultados do consumo foram comparados pelo teste T de Student a 5% de significância e a primeira escolha pelo teste Qui-quadrado a 5%.

### **3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

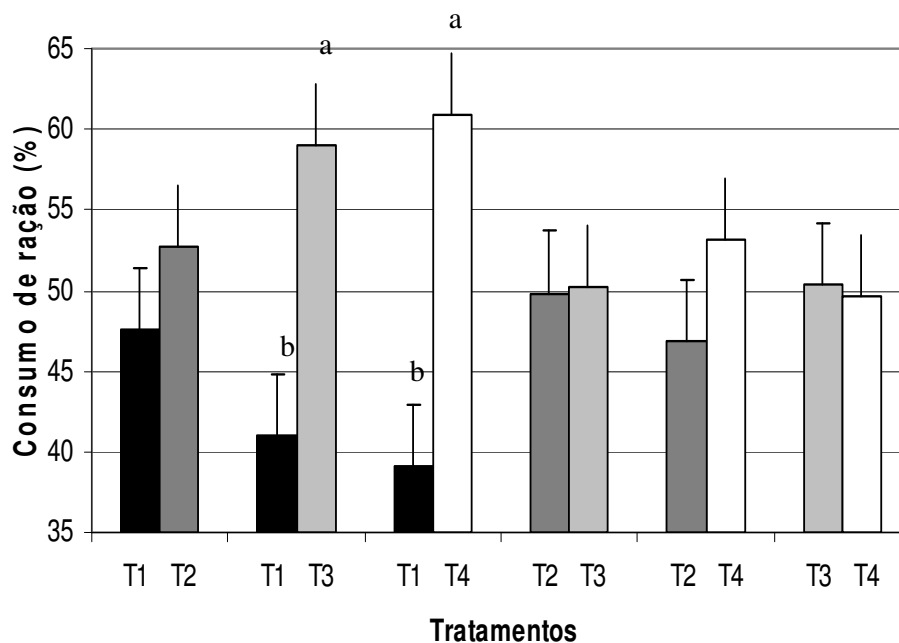
Nos testes T1 vs T3 e T1 vs T4 os animais apresentaram preferência ( $P < 0,05$ ) tanto para primeira escolha (Figura 1) quanto ao consumo voluntário (Figura 2) para T3 e T4 em relação ao T1.

Segundo BOURGEOIS (2004), HOUPPT *et al.* (1978) e KITCHELL (1972) os cães preferem alimentos mais úmidos e de sabor adocicado, entretanto, no presente estudo o uso de ácido propiônico não inibiu o consumo, havendo preferência pelos alimentos mais úmidos e com inclusão de ácido propiônico, independente da concentração empregada (0,065 e 0,13%).



<sup>a,b,c</sup> Médias sem uma letra em comum diferem pelo teste Qui-quadrado ( $P < 0,05$ )

Figura 1 – Primeira escolha dos tratamentos: T1 - 8,12% de umidade sem ácido propiônico; T2 - 10,21% de umidade sem ácido propiônico; T3 - 10,21% de umidade e 0,065% de ácido propiônico e T4 - 10,21% de umidade e 0,13% de ácido propiônico, por cães ( $n = 20$ )



<sup>a,b,c</sup> Médias sem uma letra em comum diferem pelo teste t Student ( $P < 0,05$ )

Figura 2 - Consumo médio dos tratamentos: T1 - 8,12% de umidade sem ácido propiônico; T2 - 10,21% de umidade sem ácido propiônico; T3 - 10,21% de umidade e 0,065% de ácido propiônico e T4 - 10,21% de umidade e 0,13% de ácido propiônico por cães ( $n = 20$ )

Quando comparados os tratamentos T1 vs T2 não houve diferença significativa, tanto para primeira escolha como para consumo, permitindo concluir que o aumento de umidade isoladamente não interferiu na primeira escolha, nem no consumo voluntário, como proposto por KITCHELL (1972). Entretanto, considerando que a palatabilidade de alimento é um conjunto de características, é possível que o diferencial de umidade não tenha sido suficiente para impactar significativamente a preferência alimentar. Por outro lado, do ponto de vista industrial, há um limite para a elevação da umidade, uma vez que, quando muito elevado, constitui um desafio intenso, sobrepondo o poder de controle fúngico de substâncias como o ácido propiônico. KITCHELL (1972) observou maior preferência por alimentos úmidos e semi-úmidos em relação aos secos pelos cães. Neste caso, os diferenciais de umidade são muito superiores aos níveis testados neste trabalho.

Há escassez de trabalhos atuais, sendo necessários mais estudos sobre a preferência alimentar, já que os poucos dados disponíveis são gerados principalmente pela indústria de alimentos para cães e gatos, mantendo os em caráter de desenvolvimento interno e restrito.

#### **4. CONCLUSÃO**

O uso de ácido propiônico combinado à umidade ligeiramente mais elevada de alimentos secos extrusados não afetou a palatabilidade de alimento para cães e quando comparados com um alimento tradicional menos úmido, apresentaram melhor resposta de consumo voluntário e primeira escolha dos alimentos pelos cães.

## 5. REFERÊNCIAS

BERNARDIS L.L, BELLINGER L.L. The lateral hypothalamic area revised: ingestive behavior. **Neuroscience Biobehavior**. v.20, n.2, p.189-287, 1996.

BOURGEOIS, H. **O livro de palatabilidade em cães e gatos**. Centro de Pesquisa e Desenvolvimento da Royal Canin: França, 2004.

FARREL, F. Effects of restricted dietary flavor experience before weaning on postweaning food preference in puppies. **Neuroscience Biobehavior**, v.8, p.199-203, 1984.

GRIFFEN, R. Palatability testing methods: Parameters and analyses that influence test conditions. In **Petfood Technology**. 1ed. Watt Publishing Co.: Mt. Morris, IL. p 187–193, 2003.

GRIFFIN, R.W. *et al.* Food preferences of dogs housed in testing-kennels and in consumers' homes: some comparisons. **Neuroscience Biobehavior** v.8, p.253-259, 1984.

HOUP, K.A. *et al.* The role of olfaction in canine food preferences. **Chem. Senses.**, v. 3, p.281-290, 1978.

KITCHELL, R.L. Dogs know what they like. **Friskies Res. Digest**. v.8, p.1-4, 1972.

KRABBE, E. L; MACIEL, J. E. S. Efeito da Umidade e do Ácido Propiônico Sobre as Características Bromatológicas e Microbiológicas de Grãos de Milho. In: XXXIV REUNIÃO DA SBZ. **Anais...** Juiz de Fora – MG, 1995.

NUTRIENT REQUIREMENTS OF DOGS AND CATS - NRC. **National Research Council**. The National Academy Press: Washington, D.C. 2006. 398 p.

PIZZATO, D.A.; DOMINGUES, J.L. Palatabilidade de alimentos para cães. **Revista Eletrônica Nutritime**. v.5, n.2, p.504-511, 2008.

## CAPÍTULO IV – DIGESTIBILIDADE DE DIETAS CONTENDO DIFERENTES NÍVEIS DE UMIDADE, COM OU SEM ANTIFÚNGICO EM CÃES

### RESUMO

A prevenção do desenvolvimento fúngico em *pet food* tem sido um desafio para a indústria, uma vez que os fungos são potenciais produtores de toxinas, as quais são prejudiciais à saúde animal, podendo ser letal. Assim, a utilização de antifúngicos se faz necessária, devido à contaminação das matérias-primas e recontaminação do alimento. O ácido propiônico é potencial controlador de fungos, entretanto seu uso em *pet food* é pouco estudado, constituindo o objetivo deste estudo. Foi avaliada a digestibilidade e a produção de amônia de alimentos secos extrusados para cães adultos com dois níveis de umidade, com e sem ácido propiônico. Foram comparados quatro tratamentos: T1 (8,1% de umidade sem ácido propiônico); T2 (10,2% de umidade sem ácido propiônico); T3 (10,2% de umidade com 0,065% de ácido propiônico) e T4 (10,2% de umidade com 0,13% de ácido propiônico). Foram utilizados oito cães adultos da raça Beagle, os quais foram distribuídos em delineamento quadrado latino duplo (4 x 4) com quatro tratamentos e quatro repetições no tempo (períodos), com duas unidades experimentais por repetição. Cada período experimental foi composto por cinco dias de adaptação e cinco dias para coleta total de fezes. Não houve diferença na digestibilidade e metabolizabilidade da energia das dietas e na consistência das fezes, porém cães alimentados com a dieta contendo 0,13% de ácido propiônico (T4) apresentaram menor teor de amônia nas fezes. A adição de até 0,13% de ácido propiônico não interfere na digestibilidade e consistência das fezes, entretanto diminui a concentração de amônia fecal em cães.

Palavras-chave: Ácido propiônico. Alimento seco extrusado. Coeficiente de digestibilidade.

## **DIGESTIBILITY OF DIETS WITH DIFFERENTS LEVELS OF MOISTURE, WITH OR WITHOUT MOLD INHIBITOR IN DOGS**

### **ABSTRACT**

The prevention of mold growth in pet food has been a challenge to the industry, because fungi are potenciales producers of micotoxins, that are harmful to the animal health and may be lethal. On this way, the utilization of mold inhibitor is necessary, due to the contamination of ingredients and recontamination of food. Propionic acid is a potential mold inhibitor, however it use in pet food is less studied, being the objective of the current study. It was evaluated the digestibility and ammonia production of dry extruded adult dog foods with two moisture levels, with or without propionic acid. They were compared four treatments: T1 (8.1% moisture without propionic acid), T2 (10.2% moisture without propionic acid), T3 (10.2% moisture with 0.065% propionic acid) and T4 (10.2% moisture with 0.130% propionic acid). They were utilized eight adult Beagle dogs, which were assigned in a double latin square desing (4 x 4), with four treatments and four periods, with two experimental units per period. Each experimental period were composed by five days adaptation and five days total feces collection. They were no differences on digestibility and metabolizability of energy of diets and on fecal consistency, however, dogs fed the diet with 0.130% propionic acid (T4) presented less fecal ammonia concentration. The addition of 0.130% propionic acid on diet did not affect digestibility and fecal consistency, however it decrease fecal ammonia concentration of dogs.

Key words: Coefficient of digestibility. Dry extruded food. Propionic acid.

## 1. INTRODUÇÃO

Quando se avalia um alimento para cães, os valores da composição são importantes, porém não menos importantes que os valores de digestibilidade e palatabilidade. A melhor digestibilidade está associada à formulação de dietas balanceadas, produzidas com ingredientes de qualidade. Além disso, pesquisas têm demonstrado que o uso de aditivos, como probióticos, prebióticos e ácidos orgânicos podem ser importantes adjuvantes no aproveitamento dos nutrientes das dietas (KIRCHGESSNER e ROTH, 1982; SWANSON *et al.*, 2002).

A maioria dos ácidos orgânicos possui dupla finalidade, acidulante e conservante. O ácido propiônico é usado pelas suas propriedades fungistáticas e fungicidas, além disso, estudos com suínos demonstram sua eficiência na melhora da digestibilidade (KIRCHGESSNER e ROTH, 1982). Segundo EIDELSBURGER (2001) o efeito dos ácidos orgânicos sobre a digestibilidade ocorre em função da diminuição do pH na parte inicial do trato digestório e consequentes efeitos sobre a produção de pepsina, bem como pela ação bactericida e bacteriostática na microbiota (bactérias, fungos e leveduras) do trato digestório.

Não foram encontrados trabalhos que avaliassem os efeitos do ácido propiônico em alimentos para cães, sendo assim, o presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito de diferentes níveis de umidade, com e sem antifúngico em alimentos secos extrusados para cães, quanto à digestibilidade e concentração de amônia nas fezes.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

O ensaio de metabolismo foi conduzido no Laboratório de Estudos de Nutrição Canina (LENUCAN) do Departamento de Zootecnia do Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná – Curitiba.

### 2.1 Animais e delineamento experimental

Foram utilizados oito cães adultos (quatro machos e quatro fêmeas), em manutenção, da raça Beagle, em boas condições corporais e clinicamente saudáveis. Todos os cães foram previamente submetidos a exame clínico, e coproparasitológico

para atestar seu estado de saúde. Estes foram alojados individualmente em gaiolas metálicas para estudos metabólicos, com dimensões de (0,7 m altura x 0,6 m profundidade x 0,5 m largura).

Os animais foram distribuídos em delineamento quadrado latino duplo (4 x 4) com quatro tratamentos e quatro períodos, com duas unidades experimentais por repetição, totalizando oito repetições por tratamento. Todos os tratamentos foram distribuídos em cada período, de forma que ao término das repetições todos os cães tivessem consumido todos os tratamentos.

## **2.2 Tratamentos e ração referência**

Os tratamentos consistiram em uma ração referência (Tabela 1), formulada com níveis nutricionais acima dos recomendados pela ASSOCIATION OF AMERICAN FEED CONTROL OFFICIALS - AAFCO (2003) para cães adultos em manutenção. Com base na ração referência foram preparados quatro tratamentos: T1 (8,1% de umidade sem ácido propiônico) a própria ração referência; T2 (10,2% de umidade sem ácido propiônico); T3 (10,2% de umidade com 0,065% de ácido propiônico) e T4 (10,2% de umidade com 0,13% de ácido propiônico).

## **2.3 Processamento e controle de qualidade das rações**

A dieta referência foi produzida em janeiro de 2007. A temperatura ambiente estava entre 25°C e 28°C e a umidade relativa do ar em torno de 75%.

Primeiro foi produzida a dieta referência com 8,1% de umidade e atividade de água de 0,524 (26,5 °C). Após, o secador foi regulado para aumentar a umidade para 10,2% e atividade de água para 0,622 (26,7 °C) (Tabela 2). As leituras de atividade de água foram feitas com equipamento da *Rotronic HigrOPalm®*.



Tabela 1 – Ingredientes e composição química da dieta experimental

Ingredientes	g/kg
Milho	440,0
Quirera de arroz	40,0
Farelo de soja	150,0
Farinha de carne e ossos	150,0
Farinha de peixe	10,0
Farinha de vísceras de frango	140,0
Gordura de frango	30,0
Palatabilizante (hidrolizado de vísceras de ave)	30,0
Premix vit/min <sup>1</sup>	5,0
Cloreto de sódio	5,0
Composição química analisada (% na matéria seca)	
Matéria seca (MS)	89,36
Matéria orgânica (MO)	90,04
Matéria mineral (MM)	9,96
Proteína bruta (PB)	30,59
Extrato etéreo ácido (EEA)	8,51
Fibra bruta (FB)	2,34
Extrativos não-nitrogenados (ENN) <sup>2</sup>	37,96
Energia metabolizável (kcal/g) (EM) <sup>3</sup>	3,12

<sup>1</sup>Enriquecimento/kg de alimento: Vit. A – 20000 UI; Vit. D – 2000 UI; Vit. E – 48 mg; Vit. K - 48 mg; Vit. B1 - 4 mg; Vit. B2 – 32 mg; Ácido Pantotênico – 16 mg; Niacina – 56 mg; Colina – 800 mg; Zinco – 150 mg; Ferro – 100 mg; Cobre – 15 mg; Iodo – 1,5 mg; Manganês – 30 mg; Selenio – 0,2 mg e antioxidante 240 mg.

<sup>2</sup>Estimado por:  $ENN\% = MS\% - (MM\% + PB\% + EEA\% + FB\%)$

<sup>3</sup>Estimado por:  $EM (kcal/g) = (3,5 \times PB + 8,5 \times EEA + 3,5 \times ENN)$

Tabela 2 - Regulagem do secador horizontal para a obtenção de dois níveis de umidade em dieta para cães

Esteira	Dieta referência (8,1 % UM*)		Dieta teste (10,2% UM*)	
	Tempo (minutos)	Temperatura (°C)	Tempo (minutos)	Temperatura (°C)
1ª	10	134	10	118
2ª	11,6	134	10,9	118
3ª	12,4	134	10	118

\*UM (umidade)

Depois de secas todas as dietas foram encaminhadas para o recobrimento em misturador tipo betoneira com capacidade para 25 kg, sendo primeiro aplicado por meio de pistola para pintura com ar comprimido o ácido propiônico nos tratamentos T3 (0,065%) e T4 (0,13%), em seguida foi aplicado 3 % de óleo de frango e por último 3% do hidrolisado de fígado de ave em todos os tratamentos. Houve um período de 15 dias antes da utilização para estabilização da dieta.

## 2.4 Fornecimento das dietas e coleta de fezes

O experimento foi composto por períodos de adaptação à dieta e as gaiolas de cinco dias e de cinco dias para coleta total de fezes considerando as recomendações da AAFCO (2003). Em todos os períodos os animais foram alimentados às oito e dezesseis horas, em quantidade suficiente para atender sua demanda energética, segundo recomendações do NRC (2006). A água foi fornecida à vontade.

As fezes foram coletadas duas vezes ao dia logo após a alimentação e acondicionadas em recipientes plásticos individuais, previamente identificados, fechados e armazenados em freezer, para posteriores análises. Cada amostra foi composta pelo total de fezes recolhida ao longo dos cinco dias.

## 2.5 Análises laboratoriais

As análises bromatológicas das dietas e fezes foram realizadas no Laboratório de Nutrição Animal do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Agrárias, em duplicata e repetidas quando variavam mais de 5%.

As amostras de fezes de cada cão foram descongeladas separadamente, homogeneizadas, formando uma amostra composta de cada animal. Posteriormente, foi retirada uma alíquota de cada amostra (composta fecal), a qual foi pré-seca em estufa de ventilação forçada (SOC. FABBE LTDA) a 60°C, por 72 horas. Em seguida, as amostras das dietas experimentais e fezes foram moídas em moinho de faca com peneira de 1 mm.

As dietas e fezes foram analisadas quanto à matéria seca (MS), proteína bruta (PB), extrato etéreo ácido (EEA), fibra bruta (FB), matéria mineral (MM), cálcio (Ca) e fósforo (P) segundo AOAC (1995). A energia bruta (EB) das fezes e dietas foi determinada por meio da combustão em bomba calorimétrica (IKA® - WERKE C 2000). A fração correspondente aos extrativos não-nitrogenados (ENN) foi determinada pela fórmula:  $ENN\% = 100 - (\%UM + \%PB + \%FB + \%EEA + \%MM)$ , sendo UM o teor de umidade da amostra ( $100 - \%MS$ ). A matéria orgânica (MO) foi calculada pela diferença entre a matéria seca e a matéria mineral.

Com base nos resultados laboratoriais obtidos, foram calculados os coeficientes de digestibilidade aparente (CDA) da MS, MO, PB, EEA e ENN, segundo equação:

$$CDA\% = [(nutriente\ ingerido - nutriente\ excretado) / nutriente\ ingerido] \times 100$$

A energia metabolizável aparente (EM) foi estimada segundo a AAFCO (2003):

$$EM\ (kcal/g) = \{kcal/g\ EB\ ingerida - kcal/g\ EB\ das\ fezes - [(g\ PB\ ingerida - g\ PB\ das\ fezes) \times 1,25kcal/g]\} / g\ ração\ ingerida$$

## 2.6 Características das fezes

As características das fezes foram avaliadas a partir da concentração de amônia (AOAC, 1995), matéria seca total e escore fecal. O escore fecal foi avaliado sempre pelo mesmo pesquisador e seguiu as seguintes pontuações: 1 = fezes pastosas e sem forma; 2 = fezes macias, mal formadas e que assumem o formato do recipiente de colheita; 3 = fezes macias, formadas e úmidas, que marcam o piso; 4 = fezes bem formadas e consistentes e que não aderem ao piso; 5 = fezes bem formadas, duras e secas (SÁ-FORTES, 2005).

## 2.7 Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância utilizando o procedimento Mixed do pacote estatístico SAS (1996). As médias obtidas foram comparadas pelo Teste de Tukey ( $P < 0,05$ ).

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Não foi encontrada diferença estatística entre os coeficientes de digestibilidade da MS, MO, PB, EEA, ENN dos tratamentos.

Tabela 3 - Coeficientes de digestibilidade aparente (CDA) da matéria seca (MS), matéria orgânica (MO), proteína bruta (PB), extrato etéreo hidrólise ácida (EEA), extrativos não-nitrogenados (ENN) e energia metabolizável (EM) de dietas contendo diferentes níveis de umidade e ácido propiônico (média  $\pm$  erro padrão)

CDA %	T1*	T2*	T3*	T4*	CV %
MS	78,7 $\pm$ 0,7	78,2 $\pm$ 1,1	79,4 $\pm$ 1,6	79,7 $\pm$ 0,9	3,9
MO	85,2 $\pm$ 0,5	84,2 $\pm$ 0,8	85,1 $\pm$ 1,1	85,4 $\pm$ 0,7	2,6
PB	83,6 $\pm$ 0,5	83,3 $\pm$ 0,9	83,4 $\pm$ 1,1	83,7 $\pm$ 0,8	2,9
EEA	85,8 $\pm$ 0,7	84,9 $\pm$ 0,8	85,3 $\pm$ 1,0	86,5 $\pm$ 0,4	2,5
ENN	88,5 $\pm$ 0,4	86,3 $\pm$ 0,7	87,5 $\pm$ 1,0	87,9 $\pm$ 0,6	2,4
EM (kcal/kg)	3350,6 $\pm$ 22,5	3460,4 $\pm$ 33,8	3467,9 $\pm$ 47,5	3392,1 $\pm$ 24,0	3,0

CV%: Coeficiente de variação

\*Tratamentos: T1 = 8,1% de umidade sem ácido propiônico; T2 = 10,2% de umidade sem ácido propiônico; T3 = 10,2% de umidade com 0,065% de ácido propiônico; T4 = 10,2% de umidade com 0,13% de ácido propiônico

Com o objetivo de avaliar a digestibilidade de alimentos secos de diferentes segmentos de mercado para cães, FELIX *et al.* (2007) encontraram valores médios para os CDA da MS, MO, PB, ENN e EEA de, respectivamente 82,8; 86,1; 88,2; 86,8 e 92,6 para dieta super-prêmio avaliada. Sendo estes valores próximos aos encontrados para o alimento avaliado neste estudo (Tabela 3).

Em cães o pH gástrico é mais baixo, em relação ao pH gástrico dos suínos, portanto o efeito do ácido pode ser menos pronunciado no estomago dos cães. Além

disso, a dose usada para prevenir a ação dos fungos no alimento é menor do que a dose usada para a melhora do desempenho de animais de produção.

Outro possível mecanismo seria, de acordo com KIRCHGESSNER e ROTH (1982), a redução do pH gástrico em suínos jovens, recém desmamados, resultando no aumento da conversão de pepsinogênio em pepsina. Sugere-se que este aspecto retardaria o crescimento de *Escherichia coli* permitindo com isso, um maior desenvolvimento de bactérias produtoras de ácido láctico. Paralelamente a esta ação sobre populações microbianas do trato gastrointestinal (TGI), os ácidos orgânicos podem proporcionar uma melhora significativa na utilização dos nutrientes da dieta. KIRCHGESSNER e ROTH (1982) verificaram aumento na retenção de nitrogênio, cálcio e fósforo em suínos alimentados com ácidos orgânicos.

A consistência das fezes não variou entre os tratamentos, entretanto, a concentração de amônia foi menor nas fezes dos cães alimentados com a dieta contendo o maior nível de ácido propiônico (0,13%) (Tabela 4).

Tabela 4 – Teor de matéria seca, amônia e escore das fezes de cães alimentados com dietas contendo diferentes níveis de umidade e ácido propiônico (média  $\pm$  erro padrão)

Tratamentos	Matéria seca (%)	Amônia (%)	Escore
T1	38,8 $\pm$ 0,85	0,40 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>	4,0
T2	36,9 $\pm$ 0,78	0,40 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>	4,0
T3	37,1 $\pm$ 0,68	0,40 $\pm$ 0,02 <sup>a</sup>	4,0
T4	38,4 $\pm$ 0,55	0,38 $\pm$ 0,01 <sup>b</sup>	4,0
CV%	5,60	3,86	-

CV%: Coeficiente de variação

<sup>a,b</sup> Médias na mesma coluna com letras distintas diferem pelo teste Tukey ( $p < 0,05$ )

Escore: 1 = muito mole, quase líquida; 2 = mole, mal formada; 3 = normal; 4 = seca; dura; 5 = muito seca, quebradiça

Estudo desenvolvido por ECKEL *et al.* (1992) demonstrou redução na concentração de amônia no ceco de suínos alimentados com 1,25% de ácido fórmico na dieta. Segundo os autores isto pode ser explicado devido à redução na desaminação microbiana de aminoácidos no intestino, em função do aumento da atividade enzimática e, por conseguinte, da maior digestibilidade da proteína dietética e inibição do desenvolvimento de microrganismos proteolíticos, como *Clostridium perfringens*.

A diminuição da quantidade de amônia produzida nas fezes no tratamento quatro pode ser um fator extremamente positivo, pois poderia estar associada ao menor odor nas fezes, e maior aproveitamento da proteína da dieta, embora este resultado não tenha sido observado na digestibilidade da proteína bruta.

Os valores de escore fecal variaram pouco entre as dietas, mantendo-se dentro do ideal (3-4).

#### **4. CONCLUSÃO**

A inclusão de ácido propiônico associado ao aumento de umidade não afeta a digestibilidade e a consistência das fezes, entretanto a adição de 0,13% de ácido propiônico diminui a concentração de amônia nas fezes. Há necessidade de mais estudos para confirmar doses ideais de ácido propiônico como conservante em alimentos para cães. Doses maiores poderiam aumentar a digestibilidade da proteína e melhorar ainda mais as características das fezes, desde que não haja efeito adverso na palatabilidade.

## 5. REFERÊNCIAS

AAFCO – ASSOCIATION OF AMERICAN FEED CONTROL OFFICIALS. **Official Publications** 2003. Association of American Feed Control Officials, 2003.

ASSOCIATION OF THE OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS – AOAC. **Official and tentative methods of analysis**, 16.ed. Arlington, Virginia: AOAC International, 1995.

EIDELSBURGER, U. Feeding short-chain organic acids to pigs. **Nottingham. Nottingham University Press**. p.107-121, 2001.

ECKEL, B., F. X. *et al* Zum einfluss von ameisensaure auf die konzentrationen anammoniak und biogenen aminen im gastrointestinaltrakt. **J. Anim.Physiol. A. Anim. Nutr.** V.67, p.198–205,1992.

FELIX, A.P. *et al*. Digestibilidade de uma dieta caseira e dois alimentos comerciais, econômico e super-prêmio, para cães adultos. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 2007, Jaboticabal. **Anais...** Jaboticabal: Sociedade Brasileira de Zootecnia, [2007]. CD-ROM. Nutrição de não-ruminantes.

KIRCHGESSNER, M., ROTH, F.X. Fumaric acid as a feed additive in pig nutrition. **Pig News Inf.**, Farnham Royal, v.3, p.259-263, 1982.

MATTERSON, L.D. *et al*. The metabolizable energy of feed ingredients for chickens. Storrs: The University of Connecticut, Agricultural Experiment Station, 1965. 11p. (Research Report, 7)

NACIONAL RESEARCH COUNCIL – NRC. **Nutrient requirements of dogs and cats**. National Academy Press. Washington, 2006. 424p.

SÁ-FORTES, C.M.L. **Valor nutricional de ingredientes energéticos e protéicos para cães**. Jaboticabal: Universidade Estadual Paulista, 2005. 82p. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Universidade Estadual Paulista, 2005.

SAS INSTITUTE. **Statistical analysis system**: users guide. Cary, 1996.

SWANSON, K. *et al*. Fructooligosaccharides and *Lactobacillus acidophilus* modify gut microbial populations, total tract nutrient digestibilities and fecal protein catabolite concentrations in healthy Adult dogs. **Journal of Nutrition**, n.132, p.3721–3731, 2002.