



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

ERIKA MITSUO KIYOKO TEIXEIRA

**AVALIAÇÃO DO GRAU DE EXPOSIÇÃO DE CÃES A
MICOTOXINAS EM RAÇÃO SECA**

Londrina
2014

ERIKA MITSUO KIYOKO TEIXEIRA

**AVALIAÇÃO DO GRAU DE EXPOSIÇÃO DE CÃES A
MICOTOXINAS EM RAÇÃO SECA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina como um dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Elisabete Yurie Sataque Ono

Londrina
2014

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da
Universidade Estadual de Londrina**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

T266a Teixeira, Erika Mitsuo Kiyoko.

Avaliação do grau de exposição de cães a micotoxinas em ração seca / Erika Mitsuo Kiyoko Teixeira. – Londrina, 2014.
86 f. : il.

Orientador: Elisabete Yurie Sataque Ono.
Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2014.
Inclui bibliografia.

1. Biotecnologia animal – Teses. 2. Cães – Alimentação e rações – Teses. 3. Micotoxinas – Teses. 4. Rações – Avaliação – Teses. 5. Animais domésticos – Exposição a agentes biológicos – Teses. I. Ono, Elisabete Yurie Sataque. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. III. Título.

CDU 663.1:636.085

ERIKA MITSUO KIYOKO TEIXEIRA

**AVALIAÇÃO DO GRAU DE EXPOSIÇÃO DE CÃES A MICOTOXINAS
EM RAÇÃO SECA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina como um dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Elisabete Yurie Sataque Ono
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof^a. Dr^a. Roberta Lemos Freire
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof^a. Dr^a. Joice Sifuentes dos Santos
Universidade Norte do Paraná - UNOPAR

Londrina, 13 de Junho de 2014.

*Dedico este trabalho a Deus, por me ajudar a superar
as dificuldades e apontar o caminho nas horas incertas,
e aos meus pais, José Soares Teixeira e Sandra Kiyoko Fukuoka,
pela confiança, amor, carinho e incentivo.*

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Dr^a. Elisabete Yurie Sataque Ono pela orientação, mas, sobretudo pela paciência, diálogo e por acreditar em mim e compartilhar seus conhecimentos acadêmicos;

À Prof^a. Dr^a Elisa Yoko Hirooka pelo apoio.

À Prof^a. Dr^a. Roberta Lemos Freire pela parceria e colaboração com o Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia que participaram da minha formação e pelas disciplinas ministradas durante o curso.

Ao Dr. Higo Forlan Amaral pela amizade e auxílio nas análises estatísticas.

À Doutoranda Jaqueline Gozzi Bordini por dividir seu conhecimento, pelo seu tempo e ajuda para concluir esse trabalho.

À Doutora Michele Salmon Frehse do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual de Londrina pela disponibilização das amostras de ração destinadas a cães, assessoria e amizade.

Aos estagiários Maiyara Carolyne Prete, Carolina Barlera Brazolin, Rafael Campaner e ao mestrando Gervásio Hitoshi Saito que me ajudaram nas avaliações, pela troca de conhecimento e pelos momentos de descontração;

Aos funcionários do Departamento de Bioquímica e Biotecnologia em especial Nelson Janeiro Rodriguez, Elda Aparecida Jonas Aguiar, Sandra Aparecida Defende, Sérgio do Nascimento Evangelista e Edvaldo Santos da Silva.

Aos meus segundos pais Ozeti Vicentini e Iraci Brazão Vicentini pelo acolhimento e carinho.

Ao meu irmão Douglas Felipe Fukuoka de Oliveira pela ajuda incondicional e amizade.

À Renata Silva Teixeira pelo carinho, amizade e por ter me dado a alegria do sorriso da minha irmã Letícia Furbetta Teixeira para animar meus dias difíceis.

Ao meu esposo Marcelo Brazão Vicentini pelo amor, paciência, críticas e companheirismo;

Aos amigos Amanda Aleixo Moreira, Karina Maria Lima Milani, Juliana Barion Massi, Louise Rejane Forghieri, Nicole Caldas Pan, Pedro Henrique Alcalde do Nascimento, Odair José Andrade Pais dos Santos, Dieysi Alves dos Santos, Katia Miki Kuma pela amizade, incentivo e momentos de descontração.

A todas as pessoas que de alguma forma colaboraram no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Fundo Paraná/SETI, à Fundação Araucária, PSSUS/Ministério da Saúde, CNPq/MAPA e CAPES pelo apoio financeiro e pela concessão de bolsa de mestrado.

*“A mente que se abre a uma nova idéia
jamais volta ao seu tamanho original.”*

Albert Einstein

TEIXEIRA, Erika Mitsuo Kiyoko. **Avaliação do Grau de Exposição de cães a Micotoxinas em ração seca**. 2014. 86 f. Dissertação (Mestrado de Biotecnologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2014.

RESUMO

Grãos e cereais são matérias-primas comumente empregadas na fabricação de rações, e excelentes substratos para o desenvolvimento fúngico devido ao seu alto valor nutricional. Os fungos podem contaminar esses produtos durante o desenvolvimento no campo, estocagem ou durante o transporte. Práticas agrícolas inadequadas, assim como más condições de secagem, manuseio e armazenamento podem contribuir com o crescimento de fungos e aumentar o risco de contaminação por micotoxinas. Micotoxinas são metabólitos secundários tóxicos produzidos por fungos filamentosos que se desenvolvem em grãos e cereais do mundo todo. As micotoxinas podem causar diferentes efeitos tóxicos em animais, tais como imunossupressão, nefrotoxicidade, hepatotoxicidade, efeitos estrogênicos, carcinogênico e morte. A sensibilidade para as várias micotoxinas relaciona-se com o tipo de micotoxina consumida, o nível e a duração da ingestão, bem como a raça, a idade e a saúde geral do animal. O objetivo desse estudo foi avaliar o grau de exposição de cães a micotoxinas pela ingestão de rações naturalmente contaminadas. Assim, a ocorrência de aflatoxinas (AFs), fumonisinas (FBs) e zearalenona (ZEA) foi avaliada em três tipos de rações destinadas a cães (n=81), coletadas nas residências dos proprietários no Norte do Paraná, Brasil. AFs, FBs e ZEA foram detectadas em 100, 72,8 e 97,5% das amostras de ração para cães, respectivamente. Os níveis médios de aflatoxinas totais ($AFB_1+AFB_2+AFG_1+AFG_2$) nas rações do tipo *Standard*, *Premium* e *Super Premium* foram 1,29 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 0,49 $\mu\text{g}/\text{kg}$ e 0,53 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Os níveis médios de aflatoxinas nas rações *Standard* diferiram significativamente das rações *Premium* e *Super Premium* pelo teste de Kruskal-Wallis ($p<0,05$). Os níveis médios de fumonisinas (FB_1+FB_2) foram 272,43 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (*Standard*), 78,22 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (*Premium*) e 186,53 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (*Super Premium*). No entanto, não houve diferença significativa pelo teste de Kruskal-Wallis ($p>0,05$) nos níveis médios de fumonisinas entre todos os tipos de ração. Os níveis médios de ZEA foram 52,60 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (*Standard*), 10,60 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (*Premium*) e 17,55 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (*Super Premium*). Os níveis médios de ZEA nas rações *Standard* diferiram significativamente das rações *Premium* e *Super Premium* pelo teste de Kruskal-Wallis ($p<0,05$). A estimativa da ingestão diária de AFs (0,013 $\mu\text{g}/\text{kg}$ peso corpóreo /dia), FBs (1,479 $\mu\text{g}/\text{kg}$ peso corpóreo/dia) e ZEA (0,483 $\mu\text{g}/\text{kg}$ peso corpóreo/dia) para cães foram inferiores à ingestão diária aceitável (ADI) e ao nível de ingestão segura para animais de companhia (SPDL) para cada micotoxina, indicando que todas as rações foram consideradas seguras para o consumo de cães, em relação à contaminação por essas micotoxinas. Entretanto, o monitoramento contínuo da cadeia produtiva de rações é essencial, a fim de minimizar os perigos à saúde dos animais de companhia. Do nosso conhecimento, esse é o primeiro relato sobre o grau de exposição de cães a micotoxinas por meio de rações secas naturalmente contaminadas no Brasil.

Palavras-chave: Aflatoxinas. Fumonisinas. Zearalenona. NOAEL. LOAEL.

TEIXEIRA, Erika Mitsuo Kiyoko. **Evaluation of exposure degree of dogs to mycotoxins in dry feed.** 2014. 86 p. Dissertation (Master's degree in Biotechnology) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2014.

ABSTRACT

Grains and cereals are commonly used as raw materials for feed production, and are excellent substrates for fungal growth due to the high nutritional value. Fungi can contaminate these products during development in the field, storage or transport. Inadequate agricultural practices as well as bad conditions of drying, handling and storage may contribute to fungal growth and increase the risk for mycotoxin production. Mycotoxins are toxic secondary metabolites produced by filamentous fungi that contaminate grains and cereals worldwide. The mycotoxins can cause different toxic effects in animals such as immunosuppression, nephrotoxicity, hepatotoxicity, estrogenic effects, carcinogenic and death in severe cases. The sensitivity to the various mycotoxins is related to the type of mycotoxin consumed, level and duration of intake as well the breed, age and general health of the animal. The objective of this study was to evaluate the degree of exposure of dogs to mycotoxins through naturally contaminated feed in Northern Paraná State, Brazil. For this purpose, occurrence of aflatoxins (AFs), fumonisins (FBs) and zearalenone (ZEA) was evaluated in three feed types intended for dogs (n=81), collected from the residences of the owners. AFs, FBs and ZEA were detected in 100, 72.8 and 97.5% of dog feed samples, respectively. Mean levels of total aflatoxins (AFB₁+AFB₂+AFG₁+AFG₂) in Standard, Premium and Super Premium feed were 1.29 µg/kg, 0.49 µg/kg and 0.53 µg/kg, respectively. The mean aflatoxin levels in Standard feed differed significantly from Premium and Super Premium feed by the Kruskal-Wallis test (p<0.05). Mean FB levels were 272.43 µg/kg (Standard), 78.22 µg/kg (Premium), and 186.53 µg/kg (Super Premium). However, there was no significant difference in mean fumonisin levels among all the dog feed types by the Kruskal-Wallis test (p>0.05). ZEA mean levels were 52.60 µg/kg (Standard), 10.60 µg/kg (Premium) and 17.55 µg/kg (Super Premium). The mean ZEA levels in Standard feed differed significantly from Premium and Super Premium feed by the Kruskal-Wallis test (p<0.05). The estimated daily intake for AFs (0.013 µg/kg bw/day), FBs (1.479 µg/kg bw/day) and ZEA (0.483 µg/kg bw/day) for dogs was below the acceptable daily intake and the safe pet dietary level (SPDL) for each mycotoxin, indicating that all the feed samples were considered safe for dogs concerning these mycotoxins. Nevertheless, a continuous monitoring of the feed producing chain is essential in order to minimize pet health hazards. To our knowledge, this is the first report on degree of exposure of dogs to mycotoxins through naturally contaminated feed in Paraná State, Brazil.

Keywords: Aflatoxins. Fumonisins. Zearalenone. NOAEL. LOAEL.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Estrutura química das principais aflatoxinas.....	24
Figura 2 – Via biossintética das aflatoxinas	25
Figura 3 – Estrutura química das principais fumonisinas.....	28
Figura 4 – Via proposta para biossíntese de fumonisinas.....	29
Figura 5 – Estrutura química da zearalenona e seus principais metabólitos	32
Figura 6 – Via proposta para biossíntese de ZEA	33

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Características dos alimentos comerciais secos disponíveis para cães no Brasil.....	20
Tabela 2 – Propriedades físico-químicas dos análogos das aflatoxinas.....	39

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABINPET	Associação Brasileira Da Indústria de Produtos para Animais de Estimação
ADI	(<i>Acceptable daily intake</i>): Ingestão Diária Aceitável
AF	Aflatoxinas
A _w	(<i>Water activity</i>): Atividade de água
CIA	(<i>Immunoaffinity column</i>): Coluna de imunoafinidade
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
DL ₅₀	(Dose letal mediana): Dose de uma substância necessária para matar 50% de uma população em teste
FB	Fumonisinias
FF	(<i>Food factor</i>): Fator Alimentar
LD	(<i>Limit of detection</i>): Limite de detecção
LOAEL	(<i>Lowest observed adverse effect level</i>): Menor nível em que é observado efeito adverso
NOAEL	(<i>No observed adverse effect level</i>): Nível em que não é observado efeito adverso
SF	(<i>Safety factor</i>): Fator de Segurança
SINDIRAÇÕES	Sindicato Nacional da Indústria de Alimentação Animal
SPDL	(<i>Safe pet dietary level</i>): Nível de ingestão segura para animais de companhia
ZEA	Zearalenona

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	OBJETIVOS	19
2.1	Objetivo Geral	19
2.2	Objetivos Específicos	19
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
3.1	Alimentos industrializados para cães	20
3.2	Micotoxinas	21
3.2.1	Aflatoxinas	23
3.2.1.1	Estrutura Química e Propriedades	23
3.2.1.2	Toxicidade de Aflatoxinas e Mecanismo de Ação	26
3.2.2	Fumonisinias	27
3.2.2.1	Estrutura Química e Propriedades	28
3.2.2.2	Toxicidade de Fumonisinias e Mecanismo de Ação	30
3.2.3	Zearalenona	31
3.2.3.1	Estrutura Química e Propriedades	31
3.2.3.2	Toxicidade de Zearalenona e Mecanismo de Ação	33
3.3	Avaliação de Risco	34
3.4	Ocorrência de Micotoxinas em Rações	36
4	MATERIAL E MÉTODOS	38
4.1	Amostragem	38
4.1.1	Preparo da Amostra	38
4.2	Métodos Analíticos	38
4.2.1	Determinação de atividade de água (a_w)	38
4.2.2	Determinação de Aflatoxinas	39
4.2.2.1	Calibração de Padrões de Aflatoxinas	39
4.2.2.3	Extração de Aflatoxinas	39
4.2.2.4	Quantificação de Aflatoxinas	40
4.2.3	Determinação de Fumonisinias	40
4.2.3.1	Extração de Fumonisinias	40

4.2.3.2	Quantificação das fumonisinas.....	41
4.2.4	Determinação de Zearalenona.....	41
4.2.4.1	Calibração do Padrão de Zearalenona.....	41
4.2.4.2	Extração de Zearalenona.....	41
4.2.4.3	Quantificação de Zearalenona.....	42
4.3	Avaliação do Grau de Exposição de Cães.....	42
4.3.1	Estimativa do consumo diário de ração.....	43
4.3.2	Estimativa da exposição de cães a micotoxinas.....	43
4.3.3	Estimativa da ingestão diária aceitável (ADI) e nível seguro de dieta prescrita para animais de companhia (SPDL).....	43
4.4	Análise Estatística.....	44
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	45
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	62
	REFERÊNCIAS.....	63
	ANEXOS.....	74
	ANEXO A: Normas para submissão do artigo no periódico World Mycotoxin Journal.....	75
	ANEXO B: Parecer do Comitê de Ética em Experimentação Animal.....	85

1 INTRODUÇÃO

No Brasil, a população de animais de companhia compreende 37,1 milhões de cães, 21,3 milhões de gatos e 47,8 milhões de outros *pets* (aves, peixes, coelhos entre outros animais), levando-o a ocupar o quarto lugar no ranking mundial com população total de *pets* e segundo com maior população de cães e gatos (ABINPET, 2013a).

Atualmente, os alimentos destinados a cães, principalmente as rações, possuem espaço importante no mercado, proporcionando a comercialização de uma grande diversidade de produtos. O setor pet é dividido em quatro segmentos: *pet food* (alimentação); *pet care* (acessórios, produtos para higiene, beleza e equipamentos); *pet vet* (produtos veterinários) e *pet serv* (serviços). No ano de 2012, o faturamento do mercado pet nacional chegou a R\$ 14,2 bilhões, e a projeção para 2013 é de R\$ 15,4 bilhões, ou seja, um crescimento de 8,5% (ABINPET, 2013a). Especificamente para o setor *pet food* espera-se um aumento de 4,9% em relação ao ano de 2012. O mercado pet mundial gerou U\$ 94 bilhões em 2012. Os Estados Unidos lideram esse mercado, com 30% do faturamento. Nesse cenário, o Brasil divide espaço com o Japão em 8% cada, além disso, em um período de 10 anos as exportações brasileiras aumentaram 368,2% e as importações reduziram em 47,2%. Essas projeções otimistas do mercado pet têm estreita relação com a conscientização dos proprietários do cuidado preventivo da saúde animal baseada numa alimentação mais saudável e de alta qualidade nutricional (NEPONUCENA, 2012).

O desenvolvimento de fungos em grãos utilizados como matérias-primas tem causado sérios problemas para a indústria alimentícia de animais de companhia (pets), devido à redução da qualidade do produto final em função do consumo dos nutrientes e aumento do potencial de contaminação por micotoxinas (KUIPER-GOODMAN, 1991; MILLER, 1995; HOELTZ, 2005; SOUZA; SCUSSEL, 2012).

As micotoxinas são metabólitos secundários produzidos por fungos que se desenvolvem naturalmente em grãos e cereais e apresentam toxicidade aos seres humanos e animais. A principal via de exposição dos animais a micotoxinas é por meio da ingestão de alimentos contaminados, apesar de terem sido relatados casos de contaminação por inalação de micotoxinas e por contato dérmico (CAST, 2003). A incidência desses metabólitos associa-se à contaminação de grãos no campo, no transporte e durante o armazenamento em silos (BENNETT; KLICH 2003; CAST, 2003; JOUANY, 2007; RAI; VARMA, 2010).

As enfermidades causadas por micotoxinas são denominadas micotoxicoses e seus efeitos gerais sobre a saúde animal são dependentes da dose e toxicidade da micotoxina, tempo de exposição, espécie, raça, gênero e idade, sendo que, em geral, indivíduos jovens são mais suscetíveis que adultos (BENNETT; KLICH, 2003; CAST, 2003).

As classes de fungos que irão se desenvolver e os tipos de micotoxinas produzidas são determinados em função das condições climáticas de um país. Em países de clima tropical como o Brasil, o desenvolvimento de fungos e o potencial de contaminação por suas toxinas é aumentado. Vários autores têm reportado a ocorrência de micotoxinas em milho e seus derivados (ONO et al. 1999; ONO, et al. 2008; CRUZ, 2010).

Os fungos toxigênicos pertencem principalmente a três principais gêneros: *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp. e *Fusarium* spp. A presença dos dois primeiros gêneros normalmente associa-se aos processos de secagem e estocagem de alimentos, enquanto que o último é considerado patógeno de plantas, podendo produzir micotoxinas antes ou imediatamente após a colheita (FILHO, 2011; SMITH; MOSS, 1985).

As micotoxinas apresentam elevada termorresistência, sendo difícil a remoção pelo processamento industrial o que resulta em prejuízos de ordem econômica e de saúde animal (BULLERMAN; BIANCHINI, 2007). Tendo em vista que os cereais utilizados como matérias-primas na produção de rações possuem alta qualidade nutricional e são suscetíveis à contaminação por fungos toxigênicos, os riscos de enfermidades em animais de companhia têm sido aumentados devido à propagação de estabelecimentos que comercializam rações a granel (CAST, 2003; BRITO, 2009; ABINPET 2013a). Considerando que a presença de micotoxinas é um problema inevitável e de difícil controle, o monitoramento periódico de rações é essencial para minimizar a ingestão das mesmas e garantir a segurança dos animais. Assim, o presente estudo teve como objetivo avaliar o grau de exposição de cães a micotoxinas.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o grau de exposição de cães a micotoxinas por meio da ingestão de ração seca naturalmente contaminada.

2.2 Objetivos Específicos

Determinar a atividade de água nas rações amostradas.

Avaliar os níveis de aflatoxinas, fumonisinas e zearalenona em rações para cães.

Relacionar a presença de micotoxinas com a qualidade da ração consumida por cães.

Determinar o grau de exposição de cães a aflatoxinas, fumonisinas e zearalenona.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Alimentos industrializados para cães

A produção brasileira de alimentos completos para cães e gatos cresceu vertiginosamente nos últimos anos. Em 2012, a produção de alimentos para cães e gatos foi de 2,27 milhões de toneladas, com movimentação de R\$ 9,5 bilhões (SINDIRAÇÕES, 2013). Essas projeções positivas do mercado brasileiro de rações são reflexos do número expressivo de animais de companhia (106,2 milhões), dos quais 37,1 milhões são cães. Dessa maneira, a demanda por alimentos diferenciados tem estimulado a procura por novidades, onde os proprietários preocupados com a saúde de seus animais têm buscado alimentos de qualidade que supram os diferentes estados fisiológicos (ABINPET, 2013b). No mercado atual são oferecidas mais de 600 marcas de ração para cães. Essa diversidade de produtos estimula o mercado consumidor em busca de novidades no segmento *pet food*. A fabricação desses alimentos baseia-se em um preparo rigoroso e balanceado dos nutrientes, que é tão exigente quanto à fabricação de alimentos para o consumo humano. O mercado de rações deve oferecer, assim, produtos de qualidade que satisfaçam as expectativas do mercado pet em plena expansão (SINDIRAÇÕES, 2012; ABINPET, 2013b).

Segundo a Instrução Normativa nº 9 de 14 de julho de 2003 publicada pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), os alimentos completos para animais de companhia são divididos de acordo com seu processamento em alimentos secos, semi-úmidos e úmidos (BRASIL, 2003a). Dentre os alimentos produzidos para animais pet como cães e gatos, o alimento seco (ração) representa o principal tipo consumido (BAZOLLI, 2007). Além disso, as rações comerciais podem ser classificadas em Econômica (*Standard*), *Premium* e *Super Premium* (CASE et al., 1998) de acordo com a qualidade, tipo de matéria-prima, concentração de nutrientes, características do rótulo e preço (Tabela 1).

Tabela 1. Características dos alimentos comerciais secos disponíveis para cães no Brasil.

Itens	Standard	Premium	Super Premium
Formulação	Variável	Variável	Fixa
Apelo de venda	Preço	Palatabilidade e digestibilidade	Qualidade
Fontes de proteína	1 a 2	2 a 3	4 a 6
Fibras	Farelos	Farelos e específicas	Específicas
Digestibilidade	Até 75%	Até 84%	Acima de 84%

Adaptado de Fortes (2005).

As rações econômicas são balanceadas, entretanto, a qualidade da proteína utilizada é inferior. Estas rações geralmente possuem elevada quantidade de palatilizantes, corantes e conservantes. Além disso, a digestibilidade não é favorecida, devido ao elevado conteúdo fibroso que esses produtos apresentam. Essa alta percentagem de fibra é obtida a partir de ingredientes de menor digestibilidade, como farelos vegetais com alto teor de fibras (CARCIOFI et al., 2006). As rações do tipo *Premium* apresentam qualidade intermediária entre a Econômica e a *Super Premium*. Sua formulação possui maiores teores de lipídeos e proteínas, favorecendo a digestibilidade e reduzindo a quantidade de ração para alimentar os animais. As rações *Super Premium* possuem composição fixa e ideal, são produzidas com proteínas de origem animal, tais como bovina, suína, de frango ou de peixe, e no caso dos vegetais, são empregados os de melhor absorção pelos cães, como por exemplo, o arroz (SILVA; BARROS; SOUZA, 2010). Não utilizam conservantes, não contêm corantes e palatilizantes. No mercado *pet food*, é possível encontrar esse tipo de formulação específica para raças e até mesmo fase de crescimento do animal, entretanto, devido à alta qualidade nutricional dos ingredientes empregados, os preços destas rações são mais elevados.

As matérias-primas empregadas na fabricação de rações são excelentes substratos para o crescimento fúngico, tornando-se necessário o emprego das boas práticas de fabricação de alimentos a fim de se evitar contaminações (BRASIL, 2004). Os principais ingredientes utilizados para a produção de rações são as farinhas de carne e ossos, de peixes, de penas, de sangue, farelo de algodão, de arroz, de trigo, de soja, milho em grão e sorgo (SINDIRAÇÕES, 2012). Embora as etapas de fabricação dos alimentos sejam controladas, as micotoxinas podem persistir após o processamento térmico e, portanto, contaminar o produto final (BULLERMAN; BIANCHINI, 2007).

3.2 Micotoxinas

É crescente a preocupação com a presença de micotoxinas em alimentos e suas implicações na saúde, principalmente sobre a toxicidade para animais em relação a casos de intoxicações agudas e aos possíveis efeitos crônicos oriundos da sua ingestão.

A palavra micotoxina tem origem grega “mykes” (fungo) e latina “toxicum” (toxina). Assim, a expressão “mykes-toxicum” significa toxina produzida por fungo (LAZZARI, 1997; SABINO; RODRIGUES-AMAYA, 1993). Micotoxinas são produtos tóxicos decorrentes do metabolismo secundário fúngico, de baixa massa molecular, e ocorrência inevitável em

alimentos. Dentre os principais fungos produtores de micotoxinas destacam-se as espécies pertencentes aos gêneros *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp. e *Penicillium* spp. A maioria das espécies pertencentes a estes gêneros está amplamente distribuída na natureza, utilizando quaisquer tipos de substratos. Dessa forma, o potencial de contaminação é aumentado (CAST, 2003).

No contexto geral das principais toxinas naturais de interesse para a Saúde Pública e de importância agroeconômica, destacam-se as aflatoxinas, ocratoxinas, tricotecenos, zearalenona, fumonisinas e os alcalóides do ergot (CAST, 2003). No Brasil, devido às condições climáticas favoráveis, diversas micotoxinas têm sido detectadas em alimentos destinados ao consumo animal (MORENO, et al., 2009; SCUSSEL, 2006; CAMPOS et al., 2008; CRUZ, 2010; MAZIERO; BERSOT, 2010).

A classificação das micotoxinas fundamenta-se na espécie fúngica produtora, estrutura química e/ou modo de ação. Contudo, é importante ressaltar que uma única espécie de fungo pode produzir uma ou várias micotoxinas, e ainda uma micotoxina pode ser produzida por diferentes espécies (HUSSEIN; BRASEL, 2001).

A contaminação dos alimentos por fungos e outros microrganismos é um dos fatores que coloca em risco a saúde dos animais. Essa contaminação pode acometer desde a produção e o armazenamento de grãos utilizados como matéria-prima na fabricação de rações, até o processamento e embalagem do produto final (SILVA, 1998; BENNETT; KLICH, 2003; CAST, 2003; BULLERMAN; BIANCHINI, 2007). No entanto, a presença de fungos toxigênicos não implica necessariamente na produção de micotoxinas. Sua produção pode variar de acordo com as condições ambientais, sendo os principais fatores a umidade, atividade de água, teor de nutrientes, intensidade luminosa, nível de oxigênio, temperatura, pH, métodos de processamento e armazenamento dos produtos, condições físicas e sanitárias da semente, do grão ou das rações (DIONELLO et al., 2000; BUENO et al., 2004; ZLOTOWSKI et al., 2004). Caso seja favorecida a produção de micotoxinas, estas podem ser ingeridas, inaladas ou absorvidas pela pele, causando efeitos tóxicos e morte dos animais (CAST, 2003).

Portanto, deve-se ressaltar a importância das micotoxinas, não apenas pela frequência de ocorrência, mas sobretudo pelo elevado potencial tóxico sobre a saúde dos animais de companhia. O impacto na saúde animal baseia-se na quantidade consumida, na toxicidade do composto, peso corporal, presença de outras micotoxinas (sinergismo) e outros efeitos da dieta (KUIPER-GOODMAN, 1991; BENNETT; KLICH, 2003).

3.2.1 Aflatoxinas

As aflatoxinas são produzidas por fungos do gênero *Aspergillus* spp., principalmente por *A. flavus*, *A. parasiticus* e *A. nomius* (MOSS, 1998). Os esporos desses fungos encontram-se disseminados no solo, e quando sujeitos a condições ideais de germinação podem contaminar uma ampla variedade de alimentos e até produzirem suas toxinas (TANIWAKI; SILVA, 2001; BENNETT; KLICH, 2003; CAST, 2003).

Historicamente, as micotoxinas ganharam importância no cenário de contaminantes tóxicos dos alimentos durante o surto ocorrido na década de 1960 na Inglaterra, onde foi relatada a morte de 100 mil perus após consumirem torta de amendoim de origem brasileira. Posteriormente descobriu-se que a causa das mortes estava associada à presença de aflatoxinas (ASPLIN; CARNAGHAN, 1961).

Essas substâncias apresentam elevada toxicidade, podendo ser encontradas em concentrações significativas em matérias-primas empregadas na fabricação de rações (SABINO et al., 1988; SYLOS; RODRIGUEZ-AMAYA, 1996; ONO et al., 2008; MORENO et al., 2009) e, portanto destaca-se como parâmetro de elevada importância para saúde pública e animal.

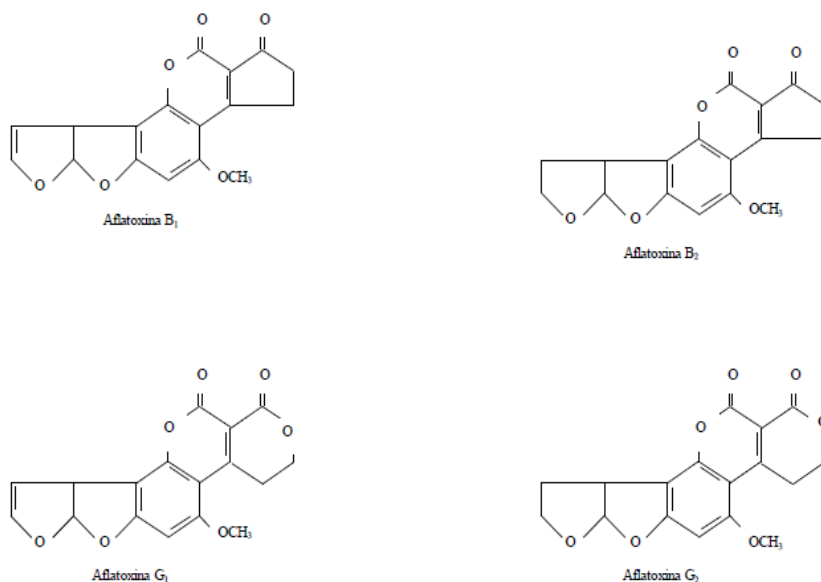
A presença de aflatoxinas em países de clima tropical ou subtropical, como o Brasil, é mais recorrente, pois as condições ambientais são favoráveis para o crescimento fúngico (MOSS, 1998). Além disso, essas toxinas possuem capacidade de se concentrar, ou seja, seus níveis são aumentados ao longo da cadeia produtiva devido à estabilidade que essas moléculas apresentam em diferentes meios bióticos e abióticos (QUEZADA et al., 2000). No Brasil, o limite máximo tolerado para aflatoxinas totais em qualquer matéria-prima a ser utilizada diretamente ou como ingrediente para rações destinadas ao consumo animal é de 50 µg/kg (BRASIL, 2007).

3.2.1.1 Estrutura Química e Propriedades

Existem cerca de 20 compostos similares conhecidos que são designados pelo termo aflatoxinas, entretanto, os principais análogos estudados devido ao interesse médico, sanitário e econômico são identificados como aflatoxina B₁ (AFB₁), B₂ (AFB₂), G₁ (AFG₁) e G₂ (AFG₂) (HUSSEIN; BRASEL, 2001; COULOMBE, 1991). Esses compostos heterocíclicos

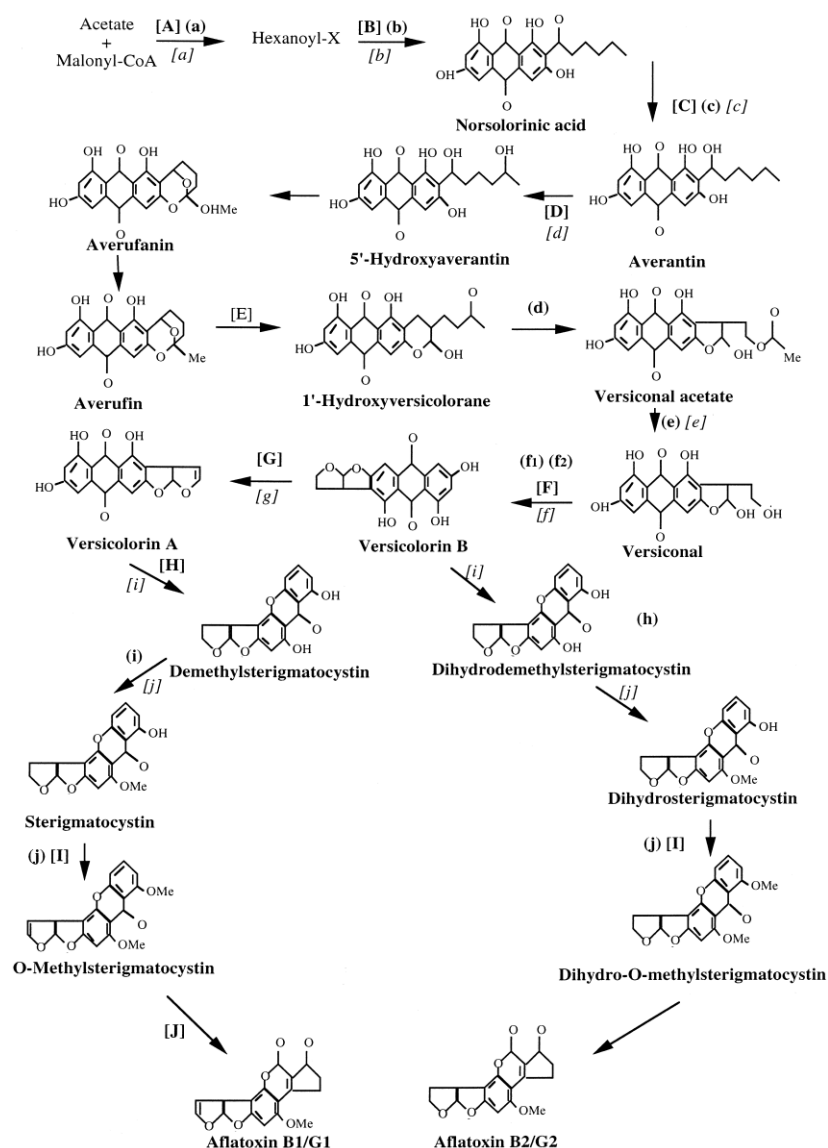
são sintetizados através da via de policetídeos e apresentam em sua estrutura um núcleo cumarínico associado a uma estrutura bi-furanóide (Figura 1).

Figura 1. Estrutura química das principais aflatoxinas



Fonte: DIAZ; BOERMANS (1994)

A biossíntese (Figura 2) ocorre através da ação da ácido graxo sintetase para conversão de acetato e malonil CoA em hexanoil CoA. Posteriormente, hexanoil CoA é convertido em ácido norsolorínico, pela ação de uma policetídeo sintase e após seguidas reações forma-se a Versicolorina B. Neste ponto, a via divide-se em dois percursos formando produtos diferentes. O primeiro refere-se à formação de aflatoxina B₁ e aflatoxina G₁ a partir de Versicolorina A. O outro percurso envolve a conversão de Versicolorina B em aflatoxina B₂ e aflatoxina G₂ (YU; BHATNAGAR; EHRLICH, 2002; BHATNAGAR; EHRLICH; CLEVELAND, 2003; SWEENEY; DOBSON, 1998).

Figura 2. Via biossintética das aflatoxinas

Fonte: SWEENEY; DOBSON (1998).

Embora apresentem semelhanças estruturais, algumas diferenças existentes entre as estruturas químicas das aflatoxinas implicam em alterações de sua atividade biológica como toxicidade e carcinogenicidade. Exemplo disso é a divergência dos compostos oriundos da série G em relação aos da série B devido à presença do anel lactona, ao invés do anel ciclopentanona. Há ainda a presença de uma dupla ligação entre os carbonos 8 e 9 que ocorre como vinil éter no terminal do anel furano em AFB₁ e AFG₁, mas não em AFB₂ e AFG₂. Essa pequena diferença resulta no reconhecimento de AFB₁ como a mais potente micotoxina produzida devido à alta toxicidade, seguida de AFG₁, AFB₂ e AFG₂ (LEESON DIAZ; SUMMERS, 1995; JAIMEZ et al., 2000).

As aflatoxinas são substâncias lipofílicas de baixa massa molecular que exibem diferentes graus de fluorescência quando expostas à luz ultravioleta, assim AFB₁ e a AFB₂ apresentam fluorescência azul, enquanto que a AFG₁ e a AFG₂ apresentam uma fluorescência verde amarelada (HUSSEIN; BRASEL, 2001). Além disso, são termoestáveis e solúveis em solventes orgânicos como o clorofórmio e metanol. Entretanto, podem ser destruídas em meio fortemente alcalino, como na presença de amônia e/ou hipoclorito (OPS, 1983). De maneira geral, a decomposição das aflatoxinas em diversos tipos de alimentos ocorre na faixa de temperatura entre 237–306 °C, variando de acordo com a atividade de água, pH do substrato e exposição ao calor. Um método eficiente de inativação consiste no emprego dos raios ultravioletas oriundos do sol, no entanto, a eficiência do processo relaciona-se diretamente com o grau de associação dessas moléculas ao substrato, atividade de água e o tipo de aflatoxinas presentes (RUSTOM, 1997).

3.2.1.2 Toxicidade de Aflatoxinas e Mecanismo de Ação

As aflatoxinas são substâncias altamente nocivas à saúde, apresentando efeitos anticoagulante, hepatotóxico, imunodepressor, nefrotóxico e carcinogênico, afetando mamíferos, aves e peixes. A Agência International de Pesquisa sobre o Câncer (IARC, 2002) classificou misturas de aflatoxinas que ocorrem naturalmente como a principal classe de carcinógenos para seres humanos (Grupo 1).

O consumo de aflatoxinas em altas doses é letal, no entanto, em baixas doses provocam efeitos tóxicos graves ao sistema hepático causando ascite, degeneração hepática, proliferação do ducto biliar e necrose hepática em várias espécies animais (CULLEN; NEWBERNE, 1994). Em animais de companhia, como cães e gatos, a DL₅₀ para aflatoxinas é baixa (0,5-1,8 µg/kg e 0,3-0,6 µg/kg de peso corpóreo, respectivamente) (NSCFS, 2013). No Texas (EUA), Garland e Reagor (2007) relataram um surto que levou a óbito 55 cães em 1998, após consumirem diferentes tipos de alimentos contaminados por aflatoxinas oriundos do mesmo fabricante. Um estudo realizado com nove cães que consumiram rações contaminadas com aflatoxinas, demonstrou o desenvolvimento de graves patologias nesses animais. Quatro cães morreram e cinco foram sacrificados depois de sinais de insuficiência hepática. Foi realizada análise de alimentos e amostras de fígado para confirmar a exposição à aflatoxina (NEWMAN et al., 2007). A toxicidade aguda das aflatoxinas em cães foi demonstrada por meio da administração de rações contaminadas ou cápsulas por via oral e por

injeção peritonial. Os cães apresentaram sinais clínicos de anorexia, perda de peso, icterícia e até morte. Do ponto de vista histopatológico, foi evidenciada semelhança entre a exposição por via oral e intraperitoneal por meio de lesões hepáticas moderadas e graves nos animais (NEWBERNE; RUSSO; WOGAN, 1966).

O metabolismo das aflatoxinas inicia-se no trato gastrointestinal por difusão passiva iniciando-se pela sua passagem no intestino delgado até a circulação porta-hepática, onde enzimas microsossomais do sistema de funções oxidases mistas, associadas ao citocromo P-450 auxiliam na sua biotransformação (CAST, 2003). A bioativação de AFB₁ ocorre através da formação de AFB₁-epóxido, substância altamente reativa, que possui afinidade por ligação com sítios nucleofílicos de macromoléculas como proteínas, RNA e principalmente DNA. Os efeitos mutagênicos e carcinogênicos provocados por AFB₁ são resultantes da modificação da estrutura e atividade biológica do DNA através da formação de adutos macromoleculares devido à ligação AFB₁-epóxido com as guaninas da molécula de DNA, na posição N₇ (CROY et al., 1978; BIEHL; BUCK, 1987; CAST, 2003). AFB₁ também pode ser convertida em aflatoxicol por redução pela enzima NAPH-dependente presente na fração solúvel do fígado. A toxicidade do aflatoxicol é menor do que do análogo AFB₁, porém esta conversão é reversível e o aflatoxicol pode servir como reservatório de AFB₁ ou até mesmo ser convertido em outra molécula tóxica (WONG; HSIEH, 1978; BIEHL; BUCK, 1987). O complexo de enzimas que realiza o metabolismo dessas moléculas varia entre os animais, além disso, também sofre influência de fatores como sexo, idade, estado de saúde e dieta alimentar (CAST, 2003; BISCHOFF; RAMAIAH, 2007). Os animais jovens são mais sensíveis a aflatoxinas que os animais adultos (CAST, 2003; COPPOCK; CHRISTIAN, 2007).

3.2.2 Fumonisinias

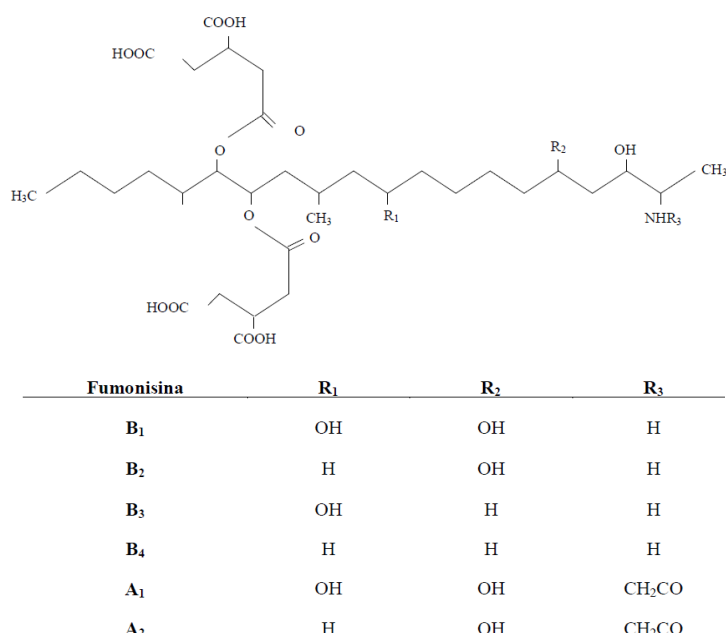
As fumonisinias são toxinas produzidas principalmente por *Fusarium verticillioides* (SHEPHARD et al., 1992), porém outras espécies de *Fusarium* também são produtoras, como *F. proliferatum* (ROSS et al., 1990), *F. nygamai*, *F. anthophilum*, *F. dlamini* e *F. napiforme* (NELSON, 1992). Entretanto, fungos do gênero *Alternaria* spp. também podem produzir fumonisinias (CHEN et al., 1992). São conhecidas 28 estruturas moleculares designadas pelo termo fumonisinias. Essas são divididas em séries A, B, C e P (SEO; LEE, 1999; RHEEDER; MARASAS; VISMER, 2002). A micotoxina predominantemente produzida por linhagens de *F. verticillioides* é a fumonisinina B₁ (FB₁) (NORRED, 1993).

As micotoxinas produzidas por *Fusarium* spp. geralmente se associam a regiões de clima temperado, uma vez que esses fungos se desenvolvem melhor e são mais toxigênicos em temperaturas mais baixas (PLACINTA; D'MELLO; MACDONALD, 1999). A contaminação de grãos e cereais pode ocorrer no campo ou durante o armazenamento em condições inadequadas (MILLER, 1995; DOOHAN; BRENNAN; COOKE, 2003).

3.2.2.1 Estrutura Química e Propriedades

As fumonisinas são compostos de alta polaridade, solúveis em água, metanol, acetonitrila-água e insolúveis em solventes orgânicos de baixa polaridade (DIAZ; BOERMANS, 1994). A estrutura geral das fumonisinas (Figura 3) é composta por um esqueleto linear de carbonos com um grupo amino e vários radicais hidroxilas, metil e tricarbálicos. Especificamente a FB₁ é denominada quimicamente como um diéster de propano 1, 2, 3 - ácido tricarbóxico e 2 - amino - 12,16 dimetil - 3, 5, 10, 14, 15 - pentahidroieicosano em que nos C-14 e C-15, os radicais hidroxila são esterificados com o grupo carboxiterminal de propano 1, 2, 3 - ácido tricarbóxico (BEZUIDENHOUT et al., 1988).

Figura 3. Estrutura química das principais fumonisinas

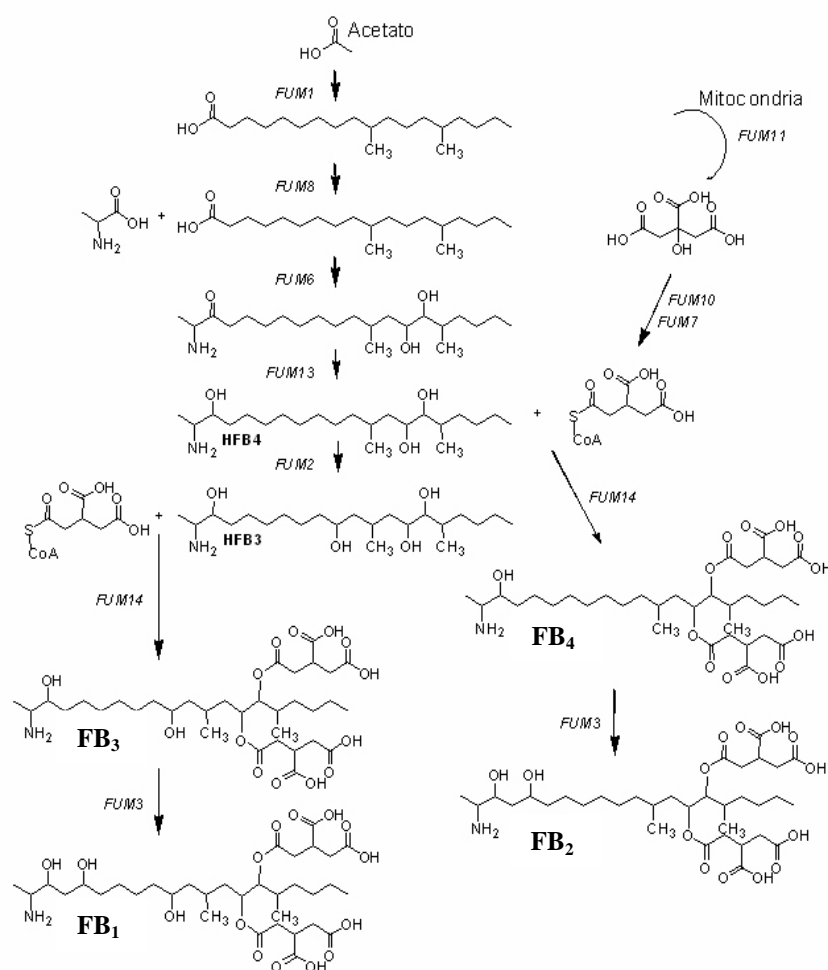


Fonte: DIAZ; BOERMANS (1994)

As fumonisinas da série B apresentam um grupo amino no C-2, enquanto nas outras séries, o grupo amino pode ser substituído por hidroxipiridina ou acetilado (MUSSEER et al., 1996). Além disso, não absorvem luz ultra-violeta ou luz visível, e portanto para serem identificadas é necessário realizar derivatização com o-ftaldialdeído e mercaptoetanol (CONCA et al., 2001).

A biossíntese das fumonisinas ainda não é um mecanismo muito bem elucidado. Proctor et al. (1999) descreveram as fumonisinas como compostos resultantes da síntese de policetidas ou de ácidos graxos. A biossíntese inicia-se a partir da condensação de acetil-CoA com 8 moléculas de malonil-CoA catalisada por uma policetida-sintase codificada pelo gene *FUM1* para formação de uma cadeia de policetídeo de 18 carbonos. Este é substituído em várias posições com radicais metil e amino, grupos hidroxilas, e de ácidos tricarbóxicos pela ação de enzimas codificadas pelos genes *FUM* (PROCTOR et al., 2003).

Figura 4. Via proposta para biossíntese de fumonisinas



Fonte: PROCTOR et al. (2003)

3.2.2.2 Toxicidade de Fumonisinias e Mecanismo de Ação

Na maioria dos animais, as fumonisinias alteram funções do sistema imunológico, provocam danos no fígado e rins, diminuem o ganho de peso e aumentam a taxa de mortalidade dependendo dos níveis de contaminação e tempo de exposição à toxina (CAST, 2003). Estudos realizados com hepatócitos de roedores demonstraram que as fumonisinias bloqueiam a formação de esfingolipídios. Esta evidência corrobora com a hipótese de que a inibição da enzima ceramida sintase provoca a interrupção da formação de esfingolipídios com consequente acúmulo de esfinganina e esfingosina. Isso ocorre devido à similaridade estrutural entre as fumonisinias e a esfinganina e esfingosina, constituindo o mecanismo pelo qual se manifestam os efeitos de toxicidade aguda e carcinogenicidade das fumonisinias (NORRED, 1993). Os esfingolipídios são importantes para a manutenção da integridade da membrana celular, além da regulação de receptores de superfície celular, bombas de íons e outros sistemas vitais para o funcionamento e sobrevivência da célula (LEESON; DIAZ; SUMMERS, 1995).

As fumonisinias apresentam elevada toxicidade para equinos e suínos, principalmente o análogo FB₁, classificado no grupo 2B pela Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer, como possível carcinógeno para seres humanos (IARC, 2002), entretanto, não existem relatos sobre a toxicidade para pets como cães e gatos.

Giannitti et al. (2011) relataram a morte súbita de cavalos Árabes na Argentina associada ao consumo de suplementos alimentares contendo altas concentrações de fumonisinias (12.490 µg/kg de FB₁ e 5.251 µg/kg de FB₂). Os animais apresentaram sinais neurológicos agudos, incluindo cegueira, ataxia nas quatro patas, hiperexcitabilidade, e andar sem rumo e em círculo, seguidos de morte. Análises histopatológicas revelaram características consistentes com leucoencefalomalácia equina (LEME).

Em estudo realizado por Dilkin et al. (2004), suínos (N=12) foram submetidos a dietas contendo 10 e 30 mg de FB₁/kg de ração. Após 23 dias, os animais que ingeriram a dose de 30 mg de FB₁/kg de ração apresentaram diminuição do consumo de ração e ganho de peso, sinais característicos de edema pulmonar. Nos suínos que apresentaram sinais clínicos de intoxicação foram observadas lesões pulmonares, hepáticas e diminuição de altura das vilosidades e profundidade das criptas e hiperplasia glandular em segmentos intestinais.

Gelderblom et al. (1991) relataram a ocorrência de cirrose, nefrite intersticial crônica e carcinoma hepatocelular primário com metástases no coração, pulmões e rins em ratos submetidos à dieta a base de milho contendo 50 mg/kg de FB₁.

Tran et al. (2006) e Espada et al. (1994) avaliaram os efeitos de diferentes doses de FB₁ em aves. Tran et al. (2006) submeteram patos (n=40) a doses crescentes de FB₁ (2, 8, 32 e 128 mg/kg) por 77 dias por meio da ingestão de rações contaminadas. Os animais desse estudo apresentaram alterações no peso do fígado e dos níveis séricos das enzimas alanina aminotransferase, aspartato aminotransferase, fosfatase alcalina e lactato desidrogenase, nos tratamentos com as duas maiores doses. Espada et al. (1994) demonstraram que dietas contendo 10, 30 e 300 mg/kg de fumonisina B₁ pura ou derivada de *F. verticillioides*, afetaram o desempenho de frangos de corte por induzirem a diminuição no ganho de peso, aumento no peso relativo do fígado e diminuição no peso relativo do baço. Também foram observados diarreia, diminuição dos níveis séricos de triglicerídeos, ácido úrico e da atividade da fosfatase alcalina, com aumento do colesterol sérico, e dos níveis das enzimas aspartato aminotransferase, gama glutamiltransferase, desidrogenase láctica e creatinina quinase.

3.2.3 Zearalenona

Zearalenona (ZEA) é um metabólito secundário produzido principalmente por *Fusarium graminearum*. Entretanto, também pode ser produzida por *F. culmorum*, *F. equiseti* e *F. crookwellense* (SMITH; HENDERSON, 1991).

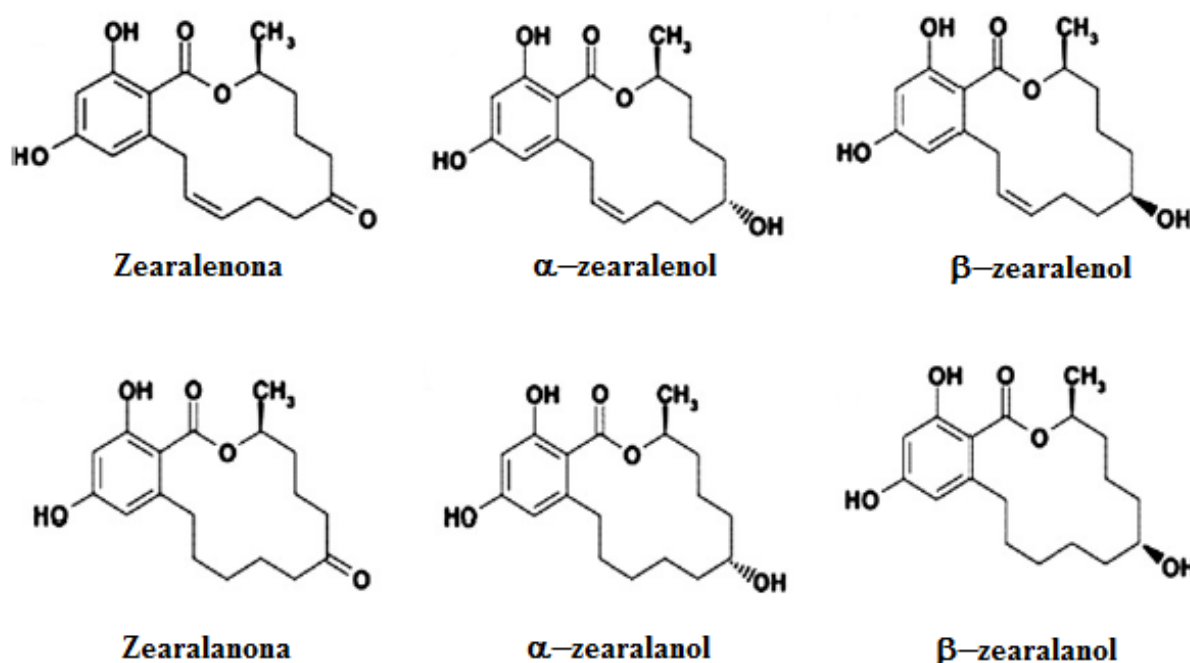
Fungos do gênero *Fusarium* spp. são considerados patógenos de plantas e tendem a se desenvolver em épocas de plantio de baixa temperatura e com alta umidade, em regiões temperadas e quentes do mundo (JIMÉNEZ, MÁÑEZ; HERNÁNDEZ, 1996). Esses fungos frequentemente colonizam grãos e cereais como milho, arroz, aveia, cevada e trigo. Entretanto há maior importância na produção de milho e trigo (EZEQUIEL; ODEBODE; FAPOHUNDA 2008; D' MELLO; PLACINTA; MACDONALD, 1999).

3.2.3.1 Estrutura Química e Propriedades

ZEA (C₁₈H₂₂O₅) é um composto cristalino branco de alta estabilidade térmica (Figura 5). É definida quimicamente como uma betalactona do ácido fenólico resorcílico pertencente ao grupo dos policetídeos (KIM et al., 2005). Possui ponto de fusão de 164-165 °C e exibe fluorescência azul-esverdeada quando excitado pelo comprimento de onda longo sob luz UV (360 nm) e uma fluorescência verde mais intensa quando excitada a um comprimento de onda

curto (260 nm) (GAUMY et al., 2001). Apresenta características predominantemente hidrofóbicas e, portanto, é solúvel em solventes orgânicos tais como acetona, éter, benzeno, alcoóis e álcalis. Existem cinco principais metabólitos: α -zearalenol, β -zearalenol, α -zearalanol, β -zearalanol e zearalanona (Figura 5). As estruturas α e β -zearalenol e α e β -zearalanol possuem radical hidroxila ligado ao C6, enquanto a zearalanona e zearalenona apresentam radical carbonílico. Além disso, o esqueleto carbônico da zearalanona e do α e β -zearalenol não contêm a ligação dupla entre C1-C2, no entanto, a mesma está presente em zearalenona e α e β -zearalanol (KIM et al., 2005; HUFFMAN; GERBER; DU, 2010).

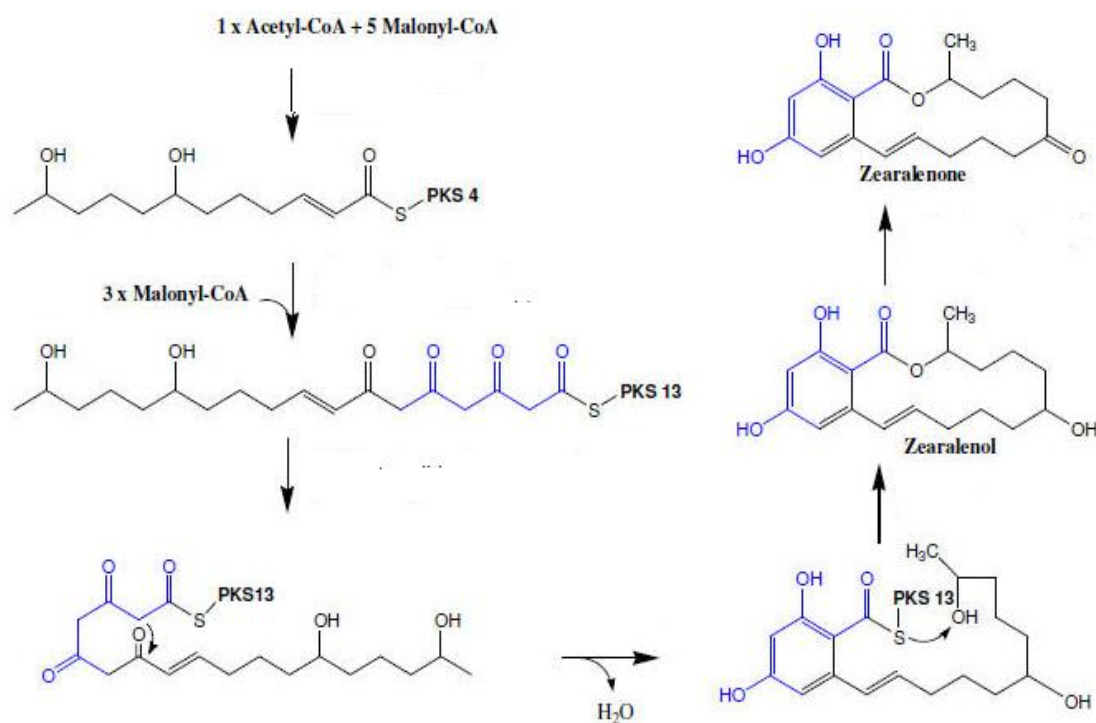
Figura 5 - Estrutura química da zearalenona e seus principais metabólitos



Fonte: (KUIPER-GOODMAN; SCOTT; WATANABE, 1987; KIM et al., 2005)

A síntese de ZEA ocorre pela via dos policetídeos. Sugere-se que α -e β -zearalenol são precursores da biossíntese desta toxina por *F. graminearum* (RICHARDSON; HAGLER; HAMILTON, 1984). Kim et al. (2005) elucidaram dois genes envolvidos nesse processo, o ZEA1 e o ZEA2. Embora esses genes possuam o mesmo promotor, são transcritos de maneira distinta. Estudos moleculares demonstraram que as enzimas policetidas sintase (PKSs), HR-PKS e NR-PKS, estão envolvidas no processo de síntese de ZEA (Figura 6), catalisando a formação da cadeia policetida através da adição sequencial de oito unidades de malonil-CoA a uma unidade de acetil-CoA (KIM et al., 2005).

Figura 6. Via proposta para biossíntese de ZEA



Fonte: (KIM et al., 2005; GAFFOOR; TRAIL, 2005)

3.2.3.2 Toxicidade de Zearalenona e Mecanismo de Ação

ZEA ou seus metabólitos provocam distúrbios reprodutivos após ligação competitiva aos receptores intracelulares de estrogênios e diminui os níveis de progesterona (KOLB, 1984). Esta ligação aumenta a síntese protéica e de RNA, induzindo o desenvolvimento celular e, portanto, acarretando um aumento da massa de órgãos (GAUMY et al., 2001; D' MELLO; PLACINTA; MACDONALD, 1999). Esta ligação foi demonstrada *in vivo* em ratos, sendo que a afinidade relativa dos receptores citoplasmáticos seguiu ordem decrescente: α -zearalanol > α -zearalenol > β -zearalanol > zearalenona > β -zearalenol (KIESSLING, 1982).

O metabolismo da ZEA é complexo, ocorre no fígado, sendo transformada em α -zearalenol, produzido em maior quantidade, e β -zearalenol, em menor quantidade, na maioria das espécies (POMPA et al., 1986; GAJECKA et al., 2013). A molécula de α -zearalenol apresenta toxicidade superior aos demais metabólitos, causando alterações fisiológicas significativas no sistema reprodutivo e glândulas mamárias de animais de companhia (GAUMY et al., 2001). Em seres humanos foi relatado que a zearalenona pode alterar a idade

em que as crianças atingem a puberdade, mesmo que ainda não tenha sido correlacionada à exposição à zearalenona e o aparecimento de doenças (COULOMBE, 1993; MILLER, 1995).

A maioria dos estudos relacionados à intoxicação por ZEA baseia-se em suínos devido à elevada sensibilidade deste animal em relação aos demais. Entretanto, foi demonstrado que este composto pode causar alterações no trato reprodutor de vários outros animais (KIESSLING, 1982; CAST, 2003; ZINEDINE, 2007). Os efeitos observados em cães incluem redução da fertilidade, aumento de absorção de embriões, redução do tamanho da ninhada, alterações dos níveis séricos de progesterona e estradiol e alterações no peso das adrenais, tireoide e hipófise (GOLINSKI; NOWAK, 2004; GAJECKA, 2013).

Golinski e Nowak (2004) sugeriram a possibilidade de ingestão de ZEA por meio das matérias-primas empregadas nas rações destinadas a cães. Procedimentos cirúrgicos realizados nesses animais revelaram a presença de cistos ovarianos. De maneira geral, os cistos ovarianos precedem o primeiro estágio da hiperplasia endometrial encontrada em cerca de 30% das fêmeas, assim, os autores assumiram que a ZEA presente na dieta dos cães estaria possivelmente relacionada às alterações morfológicas observadas nesses animais. Na Polônia, 20 cadelas Beagle saudáveis foram submetidas a baixas doses de ZEA, 50 e 75 μg de ZEA/kg de peso corpóreo, durante 42 dias. As análises histopatológicas dos ovários mostraram que a administração de ZEA em doses mais elevadas resulta em hiperestrogenismo, degeneração e atrofia das células do ovário e dos tecidos, assim como edema, hemorragia uterina, alterações dos níveis de 17β - estradiol e progesterona (GAJECKA, 2013; GAJECKA et al., 2013)

Apesar de possuir toxicidade aguda muito baixa, não ser genotóxico e sua ação teratogênica ser praticamente zero, a zearalenona pode causar câncer nos animais, e por isso requer atenção e monitoramento (GAUMY, 2001).

3.3 Avaliação de Risco

No âmbito da segurança alimentar, produzir um alimento seguro é o principal objetivo, pois sua ausência pode trazer consequências irreversíveis. Assim a avaliação de risco tem como objetivo auxiliar nas decisões operacionais para produção de alimentos seguros por meio da identificação, caracterização e quantificação do risco a um dado organismo alvo, sistema ou (sub) população, incluindo as incertezas esperadas, após a exposição a um agente particular, levando em consideração as características inerentes ao agente e ao sistema (IPCS, 2004).

O desenvolvimento de micotoxicoses é ocasionado principalmente pela ingestão de alimentos ou rações contaminados com micotoxinas, no entanto, a inalação destas em locais onde se processam os alimentos contaminados também pode representar risco. A sensibilidade a micotoxinas dependerá da toxicidade, extensão da exposição, estado nutricional do indivíduo e sinergismo com outros agentes químicos ou biológicos (BENNETT; KLICH, 2003). Dessa forma, as toxinas que apresentam baixa toxicidade podem resultar em riscos significativos se a exposição for frequente e em longo prazo. Entretanto, se a toxina exibir alta toxicidade, como no caso das aflatoxinas, pode não apresentar risco se a exposição for reduzida (BOERMANS; LEUNG, 2007).

A avaliação de risco é fundamentada em estudos toxicológicos que visam estimar o risco e entender os fatores que o influenciam, compreendendo quatro etapas denominadas identificação de perigo, caracterização do perigo, avaliação da exposição e caracterização do risco (FORSYTHE, 2002; JARDIM; CALDAS, 2009).

A identificação de perigo consiste na identificação de agentes capazes de causarem efeitos adversos à saúde. A etapa seguinte, caracterização do perigo, tem como objetivo avaliar a natureza e tipos dos efeitos adversos associados com perigos químicos, físicos e biológicos presentes no alimento. A caracterização do perigo pode ser realizada por meio de análises dose-resposta que incluem indicadores de toxicidade como NOAEL (*No-Observed-Adverse-Effect-Level*), nível onde não se é observado efeito adverso sobre um indivíduo e o LOAEL (*Lowest-Observed-Adverse-Effect-Level*), menor nível onde se é observado efeito adverso (BOERMANS; LEUNG, 2007). A avaliação da exposição visa determinar o nível de microrganismos e/ou substâncias tóxicas no alimento na ocasião do consumo. Dentre os parâmetros de ingestão crônicos seguros estimados para se avaliar essa exposição, destacam-se a determinação da ingestão diária aceitável (ADI, *Acceptable Daily Intake*) que se refere à quantidade de um agente químico/biológico presente no alimento que pode ser ingerido por meio da dieta, diariamente, durante toda a vida do indivíduo, sem provocar risco de intoxicação. Outro parâmetro é a determinação do nível seguro da dieta prescrita para o animal (SPDL, *Safe Pet Dietary Level*) que envolve a utilização de fatores específicos (fator de alimento e fator de segurança) referentes à espécie em estudo, peso corpóreo e o LOAEL (BOERMANS; LEUNG, 2007). Finalmente, a caracterização do risco é a estimativa quantitativa e/ou qualitativa, incluindo incertezas relacionadas, da probabilidade de ocorrência e gravidade dos efeitos adversos à saúde em uma dada população com base na integração dos dados obtidos nas etapas anteriores (FORSYTHE, 2002).

3.4 Ocorrência de Micotoxinas em Rações

É crescente a preocupação com a ocorrência e co-ocorrência de micotoxinas em alimentos e rações, uma vez que, segundo dados da FAO, 25% dos grãos do mundo estão contaminados com micotoxinas. A presença esporádica de altos níveis de micotoxinas em alimentos não é comum devido ao monitoramento da cadeia produtiva, porém a ocorrência destas em baixas doses em produtos de origem vegetal e seus subprodutos industrializados podem desencadear graves efeitos tóxicos em seres humanos e animais se a exposição for prolongada (CAST, 2003).

A produção de rações requer matérias-primas que possuam características desejáveis para o processo de extrusão, por exemplo, o amido (BAZOLLI, 2007). No entanto, os altos teores de carboidratos constituem substratos para o crescimento microbiano. Embora exista um controle rigoroso no processamento de rações, diversos trabalhos têm relatado a ocorrência de micotoxinas em rações pet (SCUDAMORE et al., 1997; MAIA; SIQUEIRA, 2002); NEWMAN et al., 2007, FERNÁNDEZ et al., 2009; CRUZ, 2010).

No Brasil, a incidência de micotoxinas associa-se, sobretudo ao milho, principal constituinte das rações. Moreno et al. (2009) analisaram amostras de milho (n=300) provenientes da região Norte do Paraná coletadas em dois pontos da cadeia produtiva e detectaram fumonisinas em níveis que variaram de 0,08 a 15,32 µg/g (recepção) e 0,11 a 18,78 µg/g (pré-secagem). Os níveis de aflatoxinas na etapa de recepção e pré-secagem do milho variaram de 5 a 54 µg/kg e 10 a 56 µg/kg, respectivamente.

Cruz (2010) analisou aflatoxinas (AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂) e fumonisinas (FB₁ e FB₂) em milho em grão (n=24), de diferentes produtores rurais, empregado na fabricação de ração para animais de companhia, coletado no município de Porto Ferreira, São Paulo. Das 24 amostras, 41,66% estavam contaminadas com baixos níveis de aflatoxinas (0,35 a 3,93 µg/kg) e 83,33% foram positivas para FB₁ e FB₂ com níveis variando de 539 a 9.707 µg/kg (média 3.275 µg/kg) e 0,01 a 6.672 µg/kg (média 1.307 µg/kg), respectivamente.

Maia e Siqueira (2002), no Brasil, investigaram a presença de aflatoxinas em 100 amostras de ração para animais de companhia (45 de cães, 25 de gatos, 30 de aves) e constataram que 12% das amostras estavam contaminadas, apresentando níveis que variaram entre 15 a 374 µg/kg (média 131 µg/kg). Akinrinmade e Akinrinde (2012) avaliaram a ocorrência de aflatoxinas em amostras de ração de cães (n=30) pertencentes a seis marcas diferentes em Ibadan, sudoeste da Nigéria, África. Todas as amostras foram positivas para aflatoxinas e apresentaram níveis entre 7,76 a 11,93 µg/kg (média 9,61 µg/kg).

Em Lisboa, Portugal, Martins; Martins e Bernardo (2003) investigaram a presença de aflatoxinas e fumonisinas em 60 amostras de ração (20 para cães, 20 para gatos e 20 para pássaros domésticos). Fumonisina B₁ foi detectada em apenas 15% das amostras com níveis que variaram de 12 a 24 µg/kg (média 17,3 µg/kg), entretanto as aflatoxinas não foram detectadas.

Por outro lado, Mwanza et al. (2013) analisaram amostras de ração para cães (n=60) coletadas na Província de Gauteng, África e detectaram alta frequência de contaminação por ZEA (96%), FB (98%) e AF (87%) com níveis variando de 2,5 a 2351,4 µg/kg (média 354,1 µg/kg), 5,2 a 4653,8 µg/kg (média 1556 µg/kg) e 1,2 a 352,7 µg/kg (média 248,3 µg/kg), respectivamente.

Böhm et al. (2010) avaliaram ZEA, FB e AF em amostras de ração para cães (n=76) coletadas em Viena, Áustria. ZEA e FB foram frequentemente detectadas nas rações (47% e 42%), com média de 80 µg/kg e máximo de 298 µg/kg para ZEA e média de 178 µg/kg e máximo de 568 µg/kg para FB. No entanto, AF não foram detectadas (<0,5 µg/kg) em nenhuma amostra de ração.

É importante ressaltar que a toxicidade de uma determinada micotoxina depende não apenas de sua concentração, mas também da ocorrência de outras micotoxinas. As rações e matérias-primas quando mal acondicionadas, podem favorecer a colonização de diversos tipos de fungos. Além disso, fungos do gênero *Fusarium* spp. apresentam capacidade de produzir múltiplas toxinas e, dessa forma, os efeitos toxicológicos podem ser sinérgicos (RUMBEIHA, 2000).

No Brasil, as micotoxicoses decorrentes da ingestão de alimentos contaminados são pouco e/ou mal diagnosticadas em animais de companhia. Além disso, não existe legislação que estabeleça os limites máximos tolerados (LMT) para AF, FB e ZEA em rações para animais de companhia. No entanto, o Grupo de trabalho sobre micotoxinas do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) recomenda o LMT para aflatoxinas (20 µg/kg) e fumonisinas (10.000 µg/kg) em matérias-primas destinadas à alimentação animal, e, a ABINPET de 20 µg/kg para AF, 4000 µg/kg para FB e 100 µg/kg para ZEA em rações destinadas a animais de companhia.

Assim, o controle adequado e contínuo das matérias-primas empregadas na elaboração de rações, assim como as condições de estocagem, são importantes para minimizar a contaminação fúngica, o potencial de produção de micotoxinas e os riscos à saúde dos animais de companhia.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Amostragem

Um total de 81 amostras de ração destinadas a cães foram coletadas de janeiro de 2012 a janeiro de 2013 nas residências dos proprietários dos animais, Região Norte do Paraná. Essas amostras faziam parte de um estudo observacional de caso-controle em neoplasia mamária em cadelas, desenvolvido no Hospital Veterinário (HV) da Universidade Estadual de Londrina (UEL). A coleta das rações foi realizada de acordo com os registros médicos de entrada de fêmeas da espécie canina diagnosticadas com ou sem neoplasia mamária. As amostras foram classificadas em *Standard*, *Premium* e *Super Premium* de acordo com a quantidade de proteína bruta (PB), extrato etéreo hidrólise ácida (EEA), fibra bruta (FB) e matéria mineral (MM) declarado pelo fabricante no rótulo das rações. Foram classificadas no grupo *Standard* as rações que apresentaram valores de PB menores que 21%; EEA menor que 10%; FB maior que 5% e MM maior que 10%. No grupo *Premium*, as de valores de PB entre 21 e 23%; EEA entre 10 e 13%; FB entre 2 e 3% e MM maior entre 6 e 10%. No grupo *Super Premium*, as que apresentaram valores de PB acima de 24%; EEA maior que 13%; FB entre 3 e 5% e MM menor que 6% (CARCIOFI et al. 2009).

4.1.1 Preparo da amostra

Foram coletadas aproximadamente 350 g de ração fornecida a cada animal selecionado. As amostras foram pesadas e acondicionadas em sacos de papel tipo “kraft” duplo, identificadas, datadas e armazenadas a 4°C por até 24 horas. Em seguida as amostras foram trituradas até a granulometria de 50 mesh e armazenadas a -20°C até o momento das análises.

4.2 Métodos Analíticos

4.2.1 Determinação de atividade de água (a_w)

Para determinação de atividade de água (a_w) foi utilizado higrômetro AQUA-LAB/Decagon, digital, modelo CX-2, calibrado com água destilada $a_w = 1,000 \pm 0,003$ a 20-25°C.

4.2.2 Determinação de Aflatoxinas

4.2.2.1 Calibração de Padrões de Aflatoxinas

A calibração da concentração do padrão de Aflatoxinas foi realizada conforme metodologia descrita por Sabino et al. (2008). A calibração baseou-se na medida de absorvância de solução de aflatoxinas (AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂), em comprimentos de onda distintos (Tabela 2). A verificação da concentração dos padrões de aflatoxinas diluídos em metanol foi realizada no espectrofotômetro UV/VIS (Jenway modelo 6705). A concentração de aflatoxinas foi calculada empregando-se a seguinte fórmula:

$$\text{Concentração } (\mu\text{g micotoxina/mL}) = \frac{(A \times CF \times MM \times 1000)}{\epsilon} \quad (1)$$

Onde:

A= absorvância

CF= fator de correção do espectrofotômetro

MM = massa molecular de aflatoxinas

ϵ = absortividade molar de aflatoxinas

Tabela 2- Propriedades físico-químicas dos análogos de aflatoxinas

Aflatoxinas	Comprimento de onda (λ) nm	Absortividade Molar (ϵ)	Peso molecular (g/mol)
AFB ₁	360	21800	312
AFB ₂	362	24000	314
AFG ₁	362	17700	328
AFG ₂	362	19300	330

Fonte: Sabino et al. (2008)

4.2.2.3 Extração de Aflatoxinas

Uma alíquota de 20 g de ração foi adicionada de 2 g de NaCl e 40 mL de metanol:H₂O (80:20, v/v), seguida de agitação (10 minutos - 150 rpm) e filtração em papel de filtro Whatman n° 1. Posteriormente, uma alíquota de 10 mL do extrato bruto foi diluída em 40 mL de água ultra-pura e filtrada em microfibras de vidro 0,2 μ m. Em seguida, foi realizada a pré-limpeza de 10 mL do filtrado em coluna de imunoafinidade (Aflatest[®] - VICAM) sob fluxo médio de 1-2 gotas/s. A coluna foi lavada com água ultra-pura e eluída com 1 mL de metanol

grau HPLC (1-2 gotas/s). O extrato final foi seco sob fluxo de N₂ a 45°C e armazenado para análises posteriores a -20°C.

4.2.2.4 Quantificação de aflatoxinas

As aflatoxinas (AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂) foram quantificadas segundo metodologia de Miyamoto et al. (2008). As amostras foram derivatizadas com 100 µL de ácido trifluoroacético (TFA), seguido de agitação de 30 segundos, sonicação por 5 minutos e incubação por 15 minutos a temperatura ambiente e no escuro. Após o período de incubação foram acrescentados 900 µL de solução de acetonitrila:água (1:9, v/v). As amostras foram agitadas por 15s, sendo as aflatoxinas determinadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE; bomba LC-10AT, injetor Rheodyne modelo 7725i e detector de fluorescência RF-10A XL), sistema isocrático de fase reversa, utilizando coluna Luna C-18 Phenomenex (250 x 4,6 mm de diâmetro interno, 5 µm, USA). O forno de colunas foi ajustado a 40°C. A fase móvel consistiu de acetonitrila:água (25:75, v/v) a 1,2 mL/min. Os comprimentos de onda de excitação e emissão foram de 365 e 450 nm, respectivamente.

Os limites de detecção (LD) dos análogos de aflatoxinas (AFB₁=0,13, AFB₂=0,59, AFG₁=0,03, AFG₂=0,22) foram calculados considerando a quantidade mínima de toxinas que pode gerar um pico cromatográfico 3 vezes acima da altura/ruído da linha de base (BRASIL, 2003b; INMETRO, 2007). A taxa de recuperação média (90%) foi determinada a partir da contaminação artificial de amostras de ração com concentrações de 10, 25, 50 e 100 µg/kg de aflatoxinas (AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂). A taxa de recuperação de cada análogo foi de 89% para AFB₁, 90% para AFB₂, 99% para AFG₁ e 82% para AFG₂.

4.2.3 Determinação de Fumonisinas

4.2.3.1 Extração de Fumonisinas

Uma alíquota de 10 g de ração foi agitada a 180 rpm com 30 mL metanol:água (3:1, v/v) por 30 minutos a 25°C. Após filtração em papel filtro Whatman n° 1, uma alíquota de 1 mL do filtrado foi adicionado em um cartucho de troca aniônica (Sep-Pak Accell Plus QMA – Waters) previamente acondicionada com 5 mL de metanol, seguida de 5 mL de solução metanol:água (3:1, v/v). O cartucho foi lavado com 6 mL de metanol:água (3:1) seguidos de 3 mL de metanol puro. Posteriormente, as fumonisinas foram eluídas com ácido acético 0,5%

em metanol (10 mL). O extrato foi seco a 45 °C. O resíduo resultante foi ressuspensão em 800 µL de metanol:água (3:1, v/v), fracionado em alíquotas de 200 µL e seco com nitrogênio gasoso a 45°C.

4.2.3.2 Quantificação de fumonisinas

As fumonisinas foram quantificadas conforme metodologia de Shephard et al. (1990), modificada por Ueno et al. (1993). A alíquota obtida foi ressuspensa em acetonitrila:água (1:1, v/v) e derivatizada com 200 µL de ortoformaldaldeído (OPA) (40 mg de OPA, 1 mL de metanol grau HPLC, 5 mL de tetraborato de sódio 0,1 M e 50 µL de 2-mercaptoetanol).

As fumonisinas foram determinadas por CLAE, empregando sistema isocrático de fase reversa (bomba Shimadzu LC-10AT e detector de fluorescência RF-10A XL), e coluna Luna C-18 Phenomenex (250 x 4,6 mm, 5 µm, USA). As amostras foram injetadas dentro de 1 minuto no sistema CLAE. A fase móvel consistiu de metanol: fosfato de sódio (CH₃OH:NaH₂PO₄) 0,1 mol/L (80:20, v/v) e pH 3,3 ajustado com ácido orto-fosfórico. O fluxo foi ajustado em 1,0 mL/min e os comprimentos de excitação e emissão a 335 e 450 nm, respectivamente. O LD para FB₁ foi 27,5 µg/kg e para FB₂ 35,3 µg/kg, determinado a partir da quantidade mínima de toxina que pode gerar um pico cromatográfico três vezes acima da altura/ruído da linha de base (BRASIL, 2003b; INMETRO, 2007).

4.2.4 Determinação de Zearalenona

4.2.4.1 Calibração do Padrão de Zearalenona

A verificação da concentração do padrão de zearalenona foi realizada no espectrofotômetro UV/VIS a partir de medidas de absorvância a 314 nm de uma solução-padrão de zearalenona dissolvida em metanol grau HPLC (SABINO, et al., 2008). A concentração de zearalenona no padrão foi calculada empregando-se a equação apresentada em (1), considerando a massa molecular de 318 e absortividade molar de 6000.

4.2.4.2 Extração de Zearalenona

A extração de ZEA e a pré-limpeza do extrato foram realizadas utilizando colunas de

imunoafinidade (CIA) Zearalatest® (Vicam), de acordo com o manual de instruções do fabricante com algumas modificações. Foram adicionados 100 mL de solução metanol:água (80:20 v/v) e 2 g de NaCl a uma alíquota de 20 g de ração. Em seguida, a suspensão foi agitada a 150 rpm por 30 minutos e filtrada em papel de filtro Whatman n° 1. Uma alíquota do extrato (10 mL) foi diluída em 40 mL de tampão fosfato salina 0,1 M (PBS), homogeneizada e filtrada em filtro de microfibras de vidro 0,2 µm. Uma alíquota de 30 mL do extrato filtrado foi transferida para uma CIA sob fluxo médio de 1-2 gotas/s. A CIA foi lavada com 30 mL de água ultra-pura (1-2 gotas/s) e a ZEA eluída com metanol grau HPLC (1 mL). O eluato foi seco sob fluxo de N₂ a 45°C

4.2.4.3 Quantificação de Zearalenona

A ZEA foi quantificada por CLAE, segundo metodologia proposta por Cervero et al. (2007). Os extratos secos foram ressuspensos em 200 µL de fase móvel metanol:água (70:30, v/v) e injetados 20 µL no sistema cromatográfico isocrático de fase reversa (bomba Shimadzu LC-10AD e detector de fluorescência RF-10A XL). A coluna utilizada foi a Luna C18 Phenomenex (250 x 4,6 mm de diâmetro interno, 5 µm, USA). A temperatura foi ajustada a 25°C, o fluxo a 1 mL/min e os comprimentos de onda de excitação e emissão em 280 nm e 460 nm, respectivamente. O LD para zearalenona foi de 3,95 µg/kg, determinado a partir da quantidade mínima de toxina que pode gerar um pico cromatográfico três vezes acima da altura/ruído da linha de base (BRASIL, 2003b; INMETRO, 2007). A taxa de recuperação média (87%) foi determinada a partir da contaminação artificial de amostras de ração nas concentrações de 100, 200 e 400 µg/kg de ZEA.

4.3 Avaliação do Grau de Exposição de Cães

O grau de exposição de cães a micotoxinas foi avaliado considerando-se a concentração média de micotoxinas nas rações (µg/kg), o consumo médio diário do alimento (kg/dia), peso corpóreo (kg) de um cão Beagle ativo ou de canil e os valores de NOAEL (*No-Observed-Adverse-Effect-Level*) e de LOAEL (*Lowest-Observed-Adverse-Effect-Level*) para aflatoxinas, fumonisinas e zearalenona.

4.3.1 Estimativa do consumo diário de ração

O consumo diário de ração foi estimado considerando um cão da raça Beagle, adulto, ativo ou de canil, fêmea, de 12 kg de peso corpóreo (CASE et al., 2011), de acordo com a seguinte fórmula:

$$\text{Quantidade de alimento (g/dia)} = \frac{\text{Exigência energética do animal}^*}{\text{Energia metabolizável da ração}^{**}}$$

* Exigência energética estimada = 130 kcal X (Peso em kg)^{0,75}

** Energia metabolizável da ração = 3,5 kcal/g

4.3.2 Estimativa da exposição de cães a micotoxinas

A exposição de cães a aflatoxinas, fumonisinas e zearalenona foi calculada de acordo com Jardim e Caldas (2009):

$$\text{Exposição (}\mu\text{g/kg/dia)} = \frac{\text{concentração média de micotoxinas}^* \times \text{Consumo diário de ração}}{\text{peso corpóreo}}$$

*Concentração média de aflatoxinas, fumonisinas ou zearalenona.

4.3.3 Estimativa da ingestão diária aceitável (ADI) e nível seguro de dieta prescrita para animais de companhia (SPDL)

A ingestão diária aceitável (ADI) e o nível seguro da dieta prescrita para animais de companhia (SPDL) foram calculados com base no nível médio de aflatoxinas, fumonisinas e zearalenona detectadas nas amostras e os seguintes critérios: a média verdadeira foi empregada quando todas as amostras apresentaram valores superiores ao LD. Entretanto, quando a proporção de observações foi inferior ou igual a 60%, a média foi calculada substituindo-se estas observações por LD/2 (IPCS/GEMS, 1995; BOERMANS; LEUNG, 2007). A ADI foi calculada conforme a seguinte fórmula:

$$\text{ADI (}\mu\text{g micotoxina/kg de peso corporal)} = \frac{\text{NOAEL}}{\text{SF}}$$

Onde

NOAEL: *No-Observed-Adverse-Effect-Level*

SF: fator de segurança (10)

Os fatores de segurança ou incerteza (SF) são valores numéricos (10, 100 ou 1000), ajustados conforme dados epidemiológicos sobre animais de companhia, sugeridos para explicar incertezas em dados, como espécies de extrapolação, natureza e gravidade do efeito, diferenças entre raças de animais de companhia e variabilidade na estimativa de LOAEL. O valor do SF (10) tem sido empregado na pesquisa animal para avaliar riscos químicos associados à alimentação destinada a animais de companhia (BOERMANS; LEUNG, 2007).

O Nível seguro de dieta prescrita para animais de companhia (*Safe Pet Dietary Level*, SPDL) foi calculado empregando-se a seguinte equação:

$$\text{SPDL } (\mu\text{g micotoxina/kg de ração}) = \frac{\text{LOAEL} \times \text{peso corpóreo médio}}{\text{SF} \times (\text{FF} \times \text{peso corpóreo médio})}$$

Onde:

LOAEL: *Lowest-observed-adverse-effect level*

FF: fator de alimento (20 g/kg)

O Fator de alimento (*Food Factor*, FF) é fundamentado na quantidade de alimento consumido diariamente por diferentes espécies animais (BOERMANS; LEUNG, 2007).

4.4 Análise Estatística

Os dados referentes aos níveis de micotoxinas presentes nas rações foram tratados estatisticamente utilizando-se o programa SPSS 21.0 (advanced statistical procedures companion) e BioEstat 5.0 (aplicações estatísticas nas áreas das ciências bio-médicas). Foi realizada análise de normalidade para verificar a significância da variância, sendo que não foi detectada a normalidade dos dados. Portanto, aplicou-se análise de resíduo para verificar dados *outliers*. Como os dados não apresentaram uma distribuição normal de probabilidade, optou-se pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis a 5% de significância.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados e discussão foram redigidos sob a forma de artigo científico a ser submetido para publicação no periódico World Mycotoxin Journal.

**Evaluation of exposure degree of dogs to mycotoxins in dry
feed**

Evaluation of exposure degree of dogs to mycotoxins in dry feed

Abstract

The objective of this study was to evaluate the degree of exposure of dogs to mycotoxins through naturally contaminated feed in Northern Paraná State, Brazil. For this purpose occurrence of aflatoxins (AFs), fumonisins (FBs) and zearalenone (ZEA) was evaluated in three feed types intended for dogs (n=81), collected from the residence of the owners. AFs, FBs and ZEA were detected in 100, 72.8 and 97.5% of dog feed samples, respectively. Mean levels of total aflatoxins (AFB₁+AFB₂+AFG₁+AFG₂) in Standard, Premium and Super Premium feed were 1.29 µg/kg, 0.49 µg/kg and 0.53 µg/kg, respectively. Mean FB levels were 272.43 µg/kg (Standard), 78.22 µg/kg (Premium), and 186.53 µg/kg (Super Premium) while ZEA mean levels were 52.60 µg/kg (Standard), 10.60 µg/kg (Premium) and 17.55 µg/kg (Super Premium). The probable mean daily intake of AFs (0.013 µg/kg bw/day), FBs (1.479 µg/kg bw/day) and ZEA (0.483 µg/kg bw/day) for dogs was below the acceptable daily intake (ADI) and the safe pet dietary level (SPDL) for each mycotoxin, indicating that all the feed samples were considered safe for dogs concerning these mycotoxins. Nevertheless, a continuous monitoring of the feed producing chain is essential in order to minimize pet health hazards. To our knowledge, this is the first report on degree of exposure of dogs to mycotoxins through naturally contaminated feed in Brazil.

Key-words: mycotoxins, exposure assessment, NOAEL, LOAEL.

1. Introduction

Recently the demand for food intended to pets has grown in significant rates. In 2012, the global pet market generated US\$ 94 billion. In Brazil, 2.3 million tons of feed intended to dogs and cats were produced (SINDIRAÇÕES, 2013). The billing pet market was US\$ 6.9 billion in 2013 and it is projected to increase 8.5%. Specifically for the pet food industry, an increase of 4.9% is expected in comparison to 2012 (ABINPET, 2013a). These projections are positive reflections of owners' awareness, regarding preventive care of their pets, which includes a healthy diet with high nutritional quality. Brazil has the second largest population of dogs (37.1 million) and cats (21.3 million) of the world (ABINPET, 2013a). Due to the high nutritional quality of the grains that are used for feedstuffs, these are excellent substrates for the development of toxigenic fungi.

Mycotoxins are secondary metabolites produced by filamentous fungi, which cause toxic effects in humans and animals, in addition to great economic losses. Aflatoxins, fumonisins and zearalenone are among the economically important mycotoxins due to the high occurrence in cereals and grains (CAST, 2003). Although the feed processing is a controlled and strict process, mycotoxins can remain after thermal processing, and thus contaminate the final product (Bullerman *et al.*, 2002).

Aflatoxins are a group of mycotoxins produced mainly by *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* and *A. nomius* (Moss, 1988; Marín *et al.*, 2012). Although 20 analogs have been characterized, the major naturally occurring toxins are AFB₁, AFB₂, AFG₁ and AFG₂. They have been shown to cause hepatotoxic, immunosuppressive, nephrotoxic, carcinogenic and anticoagulant effects, affecting mammals, birds and fish. In dogs, aflatoxins cause anorexia, depression, icterus, vomiting, diarrhea and sudden death (CAST, 2003). The International

Agency for Research on Cancer (IARC, 2002) has classified naturally-occurring mixtures of aflatoxins as carcinogenic to humans (Group 1).

Fumonisin (FB_s) are mainly produced by *Fusarium verticillioides* and *F. proliferatum* (Bullerman *et al.*, 2002). They occur worldwide and are detected predominantly in maize and animal feed based on maize (Böhm *et al.*, 2010; Dong-Geun *et al.*, 2013; Fernandez *et al.*, 2009; Ono *et al.*, 1999). Fumonisin B₁ (FB₁) is the most toxic analog and has been shown to cause tumors in rats, equine leukoencephalomalacia and pulmonary edema in swine (Marasas *et al.*, 1988; Ross *et al.*, 1990; Gelderblom *et al.*, 2001). Furthermore, FB₁ has been classified as Group 2B carcinogen, i.e, possibly carcinogenic for humans by the International Agency for Research on Cancer (IARC, 2002).

Zearalenone (ZEA) is a mycotoxin produced by *F. graminearum*, *F. equiseti*, *F. culmorum*, *F. cerealis*, and *F. semitectum*, which are often found in soil and contaminate cereals (Bennett and Klich, 2003). ZEA causes reproductive disorders due to the competitive binding to intracellular receptors for estrogens (Gaumy *et al.*, 2001). The adverse effects in dogs include reduced fertility, alterations in the ovaries, in serum levels of progesterone and estradiol and changes in weight of the adrenal, thyroid and hypophysis (Gajecka, 2012; Gajecka, 2013; Golinsk and Nowak, 2004;).

Aflatoxins, fumonisins and zearalenone have been detected in cereals and grains worldwide and their presence in pet food represent risk for pet health (Böhm *et al.*, 2010; Maia and Siqueira, 2002); Mwanza *et al.*, 2013; Scussel *et al.*, 2006). Böhm *et al.* (2010) evaluated the occurrence of ZEA, fumonisins and aflatoxins in dog feed samples (n=76) collected in Viena, Austria. ZEA was detected in 47% samples (median 51 µg/kg and maximum 298 µg/kg) and FBs in 42% samples (median 122 µg/kg and maximum 568 µg/kg), while AFs were not detected (<0.5 µg/kg) in any sample. In Brazil, Maia and Siqueira (2002) analysed aflatoxins in 100 pet feed samples (45 for dogs, 25 for cats, 30 for birds) and detected the mycotoxin in 12% of samples at levels ranging from 15 to 374 µg/kg (mean 131 µg/kg). Mwanza *et al.* (2013) analyzed dog feed samples (n=60) collected in Gauteng Province, Africa and detected high frequency of ZEA (96%), FB (98%) e AF (87%) contamination with levels ranging from 2.5 to 2351.4 µg/kg (mean 354.1 µg/kg), 5.2 to 4653.8 µg/kg (mean 1556 µg/kg) and 1.2 to 352.7 µg/kg (mean 248.3 µg/kg), respectively. Scussel *et al.* (2006) reported ZEA (56.1%), AF (81.3%) and FB (8.9%) frequency in feeds intended to pets (n=123) with levels ranging from 0.1 to 750 µg/kg, 0.9 to 209 µg/kg and 3.8 to 91.6 µg/kg, respectively.

There are few reports about toxicological effects of mycotoxins in dogs. Assessment of exposure degree of dogs to mycotoxins, as well as periodic monitoring of raw materials and feeds are required, since mycotoxins are resistant to industrial processing. Therefore the aim of this study was to evaluate the degree of exposure of dogs to aflatoxins, fumonisins and zearalenone through naturally contaminated feed in Northern Paraná State, Brazil.

2. Material and Methods

Sampling

A total of 81 feed samples intended for dogs were collected from January 2012 to January 2013. All the samples were part of the diet of animals evaluated in a case-control study in female dogs with mammary neoplasms.

Feed samples (350 g) were collected within two weeks at the residence of the owner of the animal according to the medical records of entry at the Veterinary Hospital of the State University of Londrina, Northern Paraná State, Brazil. The female of the canine species

diagnosed with mammary neoplasm was classified as cases and other reasons as control, except for cancer.

Feed samples were grouped into Standard, Premium and Super Premium according to the amount of crude protein (CP), ether extract (EE), crude fiber (CF) and mineral matter (MM) declared on the label of dry dog feed (Carciofi *et al.* 2009). After homogenization, 200 g of each sample were ground to 50-mesh and stored at -20 °C for aflatoxin, fumonisin and zearalenone analysis.

Aflatoxin analysis

An aliquot of feed sample (20 g) added to 2 g NaCl and 40 ml methanol: H₂O (80:20, v/v) was shaken (150 rpm). The extract was filtered through Whatman N^o1 filter paper. The filtrate (10 ml) was diluted with 40 ml ultra pure water and filtered through glass microfiber filter (0.2 µm, Sartorius Stedim Biotech GmbH). The resulting filtrate was applied (10 ml) to immunoaffinity column (IAC, AflaTest®, Vicam, USA). The column was washed with ultrapure water (20 ml) and aflatoxins were eluted with 1 ml methanol. The final extract was dried under a stream of nitrogen at 45 °C.

The aflatoxins (AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂) were analysed according to Miyamoto *et al.* (2008). The samples were derivatized with 100 µl trifluoroacetic acid (TFA), mixed for 30 seconds, sonicated for 5 min and incubated at 25°C for 15 min in the dark. After the incubation period, 900 µl acetonitrile:water (1:9, v/v) were added, mixed for 15 seconds and injected (20 µL) into high performance liquid chromatograph (HPLC). The aflatoxins were analysed by a reversed phase isocratic system (Shimadzu LC 10AD-pump and RF-10A XL fluorescence detector), using a C-18 Luna Phenomenex column (250 x 4.6 mm, 5 µm, Scharlau). The mobile phase was acetonitrile:water (25:75, v/v) and the flow rate was 1.2 ml/min. The oven temperature was set at 40°C. The limit of detection (LD) was defined as the minimum amount of toxin that could generate a chromatographic peak three times over the height/noise rate of the baseline (BRASIL, 2003b; INMETRO, 2007). The LD of AFB₁, AFB₂, AFG₁ and AFG₂ were 0.13, 0.59, 0.03 and 0.22 µg/kg, respectively. The recovery rates from feed samples artificially spiked at concentrations of 10, 25, 50 and 100 µg/kg of aflatoxins (sum of the four analogs) were obtained from two determinations of each concentration. The recovery rate for total aflatoxins was 90%, while recovery rate for each analog was 89% for AFB₁, 90% for AFB₂, 99% for AFG₁, and 82% for AFG₂.

Fumonisin analysis

Fumonisins were determined by HPLC according to Shephard *et al.* (1990), modified by Ueno *et al.* (1993).

An aliquot of 10 g of feed was shaken at 180 rpm with 30 ml of methanol:water (3:1, v/v) for 30 min at 25 °C. After filtration, 1 ml of crude extract was applied to preconditioned Sep-Pak Accell Plus QMA cartridge (Waters) with 5 ml methanol, followed by 5 mL methanol:water (3:1). The cartridge was washed with 6 ml of methanol:water (3:1) followed by 3 ml methanol. Then, fumonisins were eluted with 0.5% acetic acid in methanol (10 ml). The extract was dried at 45 °C. The sample residue was resuspended in 800 µl methanol:water (3:1, v/v), fractionated into 200 µl aliquots and dried under nitrogen gas at 45 °C. The sample residue was derivatized with 200 µl o-phthalaldehyde (OPA) (40 mg OPA, 1 ml methanol, 5 ml 0.1 M sodium tetraborate and 50 µl 2-mercaptoethanol).

Fumonisins were determined by a reversed-phase isocratic HPLC system (Shimadzu LC-10AT pump and RF-10A XL fluorescence detector), using a Luna C-18 Phenomenex column (250 x 4.6 mm, 5 µm, Scharlau). The samples were injected within 1 min into HPLC

system. The mobile phase was methanol: 0,1 M NaH₂PO₄ (80:20, v/v) adjusted to pH 3.3 with ortho-phosphoric acid. The flow rate was set at 1.0 ml/min and excitation and emission wavelengths were 335 and 450 nm, respectively. The LD was defined as the minimum amount of toxin that could generate a chromatographic peak three times over the height/noise rate of the baseline (BRASIL, 2003a; INMETRO, 2007). The LD for FB₁ and FB₂ were 27.5 µg/kg and 35.3 µg/kg, respectively.

Zearalenone analysis

ZEA extraction and clean-up of the extract were performed using ZearalaTest® WB immunoaffinity columns (Vicam), according to the manufacturer's instructions for feed samples, with some modifications. An aliquot of feed sample (20 g) added to 2 g NaCl and 100 ml methanol:water (80:20, v/v) was shaken at 150 rpm for 30 min and filtered through Whatman n°1 filter paper. An aliquot of the extract (10 ml) was diluted with 40 ml 0.1 M phosphate buffered saline (PBS), homogenized and filtered through a glass microfiber filter (Sartorius Stedim Biotech GmbH). The filtrate (30 ml) was applied to a ZearalaTest® WB IAC (Vicam) at a flow rate of 1-2 drops/s. The IAC was washed with 30 ml of ultrapure water (1-2 drops/s) and ZEA was eluted with methanol (1 ml). The eluate was dried under a stream of nitrogen at 45 °C.

ZEA was analysed according to Cerveró *et al.* (2007). The dried samples were resuspended in 200 µl methanol:water (70:30, v/v), and 20 µl was injected into HPLC. ZEA was determined by a reversed-phase isocratic HPLC system (Shimadzu LC-10 AD pump and RF-10A XL fluorescence detector), using a C-18 Luna Phenomenex column (4.6 x 250 mm, 5 µm, Scharlau). The temperature was set at 25 °C, flow rate at 1 ml/min and the excitation and emission wavelengths at 280 nm and 460 nm, respectively. The LD for ZEA was 3.95 µg/kg calculated by the minimum amount of toxin that could generate a chromatographic peak three times over the height/noise rate of the baseline (BRASIL, 2003b; INMETRO 2007). The mean recovery rate (87%) from feed samples artificially spiked at concentrations of 100, 200 and 400 µg/kg of ZEA was obtained from two determinations of each concentration.

Water activity (a_w) analysis

The water activity (a_w) was determined by AQUA-LAB/Decagon, calibrated with distilled water (a_w = 1.000 ± 0.003) at 20-25°C.

Mycotoxin Exposure Estimation

Exposure degree estimates the probable intake of toxic substances via food (Jardim and Caldas, 2009). Therefore the exposure of dogs was calculated considering the concentration of mycotoxins in feed (µg/kg), the daily feed intake (kg/day) and body weight (kg) of the animal studied, as well as NOAEL (*No-Observed-Adverse-Effect-Level*) and LOAEL (*Lowest-Observed-Adverse-Effect-Level*) for each mycotoxin.

Daily feed intake was estimated as proposed by Case *et al.* (2011), considering a dog belonging to beagle breed, adult, female and 12 kg of body weight (bw), according to the following formula:

$$\text{Amount of feed (g/day)} = \frac{\text{Estimated Energy requirement of the animal (kcal/day)}^*}{\text{Metabolizable energy of feed (kcal/g)}^{**}}$$

*Estimated Energy Requirement = 130 kcal x (bw in kg)^{0.75}

** Metabolizable energy of feed (kcal/g) = 3.5 kcal/g

The Estimated Daily Intake (EDI) by dogs for aflatoxins, fumonisins and zearalenone was calculated according to Jardim and Caldas (2009):

$$\text{EDI } (\mu\text{g/kg/day}) = \frac{\text{Mean level of mycotoxins* x daily feed intake}}{\text{mean body weight}}$$

*Mean level of aflatoxins, fumonisins and zearalenone

Estimation of mycotoxin levels was performed taking into account the following criteria. The true mean was used when all the samples had values above the LD. However, when the proportion of the observations was less than or equal to 60% the mean was calculated by replacing these observations by LD/2 (IPCS / GEMS, 1995).

In order to estimate the acceptable daily intake (ADI) and safe pet dietary level (SPDL), mean levels of mycotoxins detected in feed samples were considered. The acceptable daily intake (ADI) was calculated from the following equation (Boermans and Leung, 2007):

$$\text{ADI (mg mycotoxin/kg bw)} = \frac{\text{NOAEL}}{\text{SF}}$$

NOAEL: *No-Observed-Adverse-Effect-Level*

SF: Safety factor

Safety factors or uncertainty (SF) are numerical values (10, 100 or 1000), adjusted as epidemiological data on pets, suggested to explain uncertainties in data, such as species extrapolation, nature and severity of the effect, differences between pet breeds and variability in LOAEL.

Safe pet dietary level (SPDL) was calculated by the following equation (Boermans and Leung, 2007):

$$\text{SPDL } (\mu\text{g mycotoxin/kg pet food}) = \frac{\text{LOAEL x bw}}{\text{SF x (FF x bw)}}$$

LOAEL: *Lowest-Observed-Adverse-Effect-Level*

FF: food factor

bw: average body weight

Food factor (FF) is based on the amount of food consumed daily and differences in the quantity of food consumed by different animal species.

Statistical Analysis

The statistical analysis of the data was performed by SPSS 21.0 and BioEstat 5.0. The samples with mycotoxin levels higher than LD were considered positive samples. Analysis of normality was performed to assess the significance of the variance and the normality of the data was not detected. Therefore, residual analysis was applied to verify *outliers* in data. The significance of differences among the type of feeds was evaluated by Kruskal-Wallis. Differences were assumed to be significant when $p < 0.05$.

3. Results and discussion

Table 1 shows the water activity and aflatoxin, fumonisin and zearalenone levels in 81 feed samples intended for dogs collected in Northern Paraná State, Brazil.

Aflatoxins were detected in 100% dog feed samples (n=81) (Table 1). Total aflatoxin levels ($AFB_1+AFB_2+AFG_1+AFG_2$) in Standard, Premium and Super Premium feed ranged from 0.16 to 5.39 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (mean 1.29 $\mu\text{g}/\text{kg}$), 0.21 to 6.16 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (mean 0.49 $\mu\text{g}/\text{kg}$) and 0.19 to 2.64 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (mean 0.53 $\mu\text{g}/\text{kg}$), respectively. The mean aflatoxin levels (Table 1) in Standard feed differed significantly from the Premium and Super Premium feed by the Kruskal-Wallis test ($p<0.05$). Aflatoxin levels (Figure 1a) were lower than those reported by Akinrinmade and Akirinde (2012) and Scussel *et al.* (2006). Akirinmade and Akirinde (2012) evaluated 30 dog feed samples, belonging to six different brands in Nigeria and detected aflatoxins in 100% of samples ranging from 7.76 to 11.93 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (mean 9.61 $\mu\text{g}/\text{kg}$). In Southern Brazil, Scussel *et al.* (2006) analysed 46 dog feed samples and detected aflatoxins in 100% samples with levels ranging from 2.18 to 66.4 $\mu\text{g}/\text{kg}$. AFB_1 , AFG_1 , AFB_2 and AFG_2 were detected in 100%, 56.8%, 2.5% and 9.9% of the samples (Table 1). These results differed from those obtained by Böhm *et al.* (2010), Campos *et al.* (2008), Martins *et al.* (2003) and Mngadi *et al.* (2008), who have not detected aflatoxins in feed intended for dogs.

Fumonisin (FB) levels in Standard, Premium and Super Premium feed ranged from 37.44 to 1014.72 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (mean 272.43 $\mu\text{g}/\text{kg}$), from 31.32 to 509.64 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (mean 78.22 $\mu\text{g}/\text{kg}$), from 101.04 to 503.02 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (mean 186.53 $\mu\text{g}/\text{kg}$), respectively (Table 1). Souza and Scussel (2013) analysed fumonisins (FB_1+FB_2) in dog feed samples (n=30) and detected FB_1 in 76.7% samples and FB_2 in 43.3% samples ranging from 40.0 to 1600 $\mu\text{g}/\text{kg}$ and 40.0 to 270 $\mu\text{g}/\text{kg}$, respectively. Fumonisin (FB_1+FB_2) were detected in 77.6% Standard followed by Premium (72%) and Super Premium (42.9%) feed samples (Table 1). However, there was no significant difference by the Kruskal-Wallis test ($p>0.05$) in mean fumonisin levels among all the dog feed types (Table 1). Most feed samples (66.7%) showed fumonisin (FB_1+FB_2) levels below 450 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (Figure 1b). Concerning FB_1 analog, contamination levels ranged from 31.30 to 303.70 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (mean 96.40 $\mu\text{g}/\text{kg}$). These levels were higher than those reported by Fernández *et al.* (2009) and Martins *et al.* (2003). Fernández *et al.* (2009) reported FB_1 contamination in 85% dog feed samples from Argentina at levels ranging from 2.00 to 166.90 $\mu\text{g}/\text{kg}$. In Lisbon, Portugal, Martins *et al.* (2003) reported low levels of fumonisins (12.00 to 24.00 $\mu\text{g}/\text{kg}$) in dog feed samples (n=20).

ZEA was detected in 95.9% Standard and 100% Premium and Super Premium feed samples (Table 1). The levels ranged from 4.07 to 98.35 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (mean 52.60 $\mu\text{g}/\text{kg}$), 5.35 to 58.44 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (mean 10.60 $\mu\text{g}/\text{kg}$) and from 11.93 to 43.53 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (mean 17.55 $\mu\text{g}/\text{kg}$), respectively. The mean ZEA levels (Table 1) in Standard feed differed significantly from the Premium and Super Premium feed by the Kruskal-Wallis test ($p<0.05$). ZEA levels were lower than those reported by, Böhm *et al.* (2010), Mwanza *et al.* (2013) and Scussel *et al.* (2006). Böhm *et al.* (2010) evaluated 76 dog feed samples and detected ZEA in 47% of samples, at levels ranging from 10 to 298 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (mean 80 $\mu\text{g}/\text{kg}$). In Gauteng Province, South Africa, Mwanza *et al.* (2013) analysed ZEA in 60 dog feed samples and detected high frequency of ZEA contamination (96%) with levels ranging from 2.5 to 2351.4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (mean 354.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$). Scussel *et al.* (2006) detected ZEA in 67.4% of dog feed samples (n=46) collected in Southern Brazil, with levels ranging from 2.1 to 313 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

Figure 1c shows the distribution of ZEA levels in 81 dog feed samples from Northern Paraná State, Brazil. The high frequency of ZEA contamination (97.5%) has also been reported by Zwierzchowski *et al.* (2004) who detected ZEA in 84.2% of the feed samples (n=57).

Aflatoxins, fumonisins and zearalenone have been reported in grains and cereals specially maize and derived products (Nuryono, *et al.* 2005; Ono *et al.* 1999; Ono, *et al.* 2008; Scaff and Scussel, 2004, Scussel *et al.*, 2006). The Standard feed samples analyzed contained maize as main ingredient, and Premium and Super Premium feed showed greater diversity of vegetable protein such as rice, sorghum and barley (Carciofi, 2008). The differences in mycotoxin levels among the feed types can be attributed to the contrast existing between the compositions of these feeds.

Although the maximum allowed levels for AF, FB and ZEA have not been established for pet food, the Working Group on Mycotoxins has recommended the maximum tolerated limits for aflatoxins (20 µg/kg) and fumonisins (10.000 µg/kg) in raw materials for animal feed (BRAZIL, 2006). Despite the high frequency of ZEA, all the samples showed levels lower than the maximum tolerated limit (1000 µg/kg) for ZEA in compound feed in Japan (FAO, 2003). Furthermore, the maximum levels detected of aflatoxins (AFB₁+AFG₁+AFB₂+AFG₂) (6.16 µg/kg), fumonisins (FB₁+FB₂) (1014.72 µg/kg) and zearalenone (98.35 µg/kg) were below the maximum tolerable limit recommended by ABINPET (2013b) of 20 µg/kg for AF, 4000 µg/kg for FB and 100 µg/kg for ZEA.

Water activity is one of the factors that influence fungal growth and mycotoxin production in raw materials. The mean values of water activity (a_w) in feed samples ranged from 0.42 to 0.83 (mean 0.68). In Super Premium, Premium and Standard feed the mean a_w were 0.69, 0.65 and 0.68, respectively (Table 1). There was no significant difference by the Kruskal-Wallis test ($p>0.05$) in mean water activity among all the dog feed types (Table 1).

Generally, a_w values for aflatoxin production range from 0.86 to 0.99, with optimal a_w 0.98 (Mousa *et al.* 2011). Marín *et al.* (1995) evaluated the effect of different water activity (a_w , 0.968, 0.956, 0.944, 0.925) on fumonisin production by *Fusarium* species and showed low fumonisin production at a_w 0.925, with higher production at 0.956 a_w and 0.968 a_w . Jiménez *et al.* (1996) evaluated ZEA production by *F. graminearum*, *F. culmorum* and *F. oxysporum* at 0.95 a_w and 0.97 a_w . All the isolates showed ZEA production in both a_w , however, the highest values were obtained for *F. graminearum* at 0.97 a_w . These a_w values (Table 1) indicate that aflatoxin, fumonisin and zearalenone contamination may have occurred at the previous step of feed processing, that is, in raw material used for feed production.

The acceptable daily intake (ADI) and pet safe dietary level (SPDL) are shown in Table 2. The ADI and SPDL are important parameters to evaluate the exposure degree of dogs, that is, the level of toxic substances in the diet at the time of consumption. These parameters are related to the dose at no observable adverse effect level (NOAEL), and lowest observed adverse effect level (LOAEL) for each toxic substance with the amount of naturally contaminated feed consumed by animals (Jardim and Caldas, 2009; Boermans and Leung, 2007).

The values of ADI (20 µg/kg b.w./day) and SPDL (6 µg/kg pet food) for aflatoxins were calculated considering the doses reported in previous studies that cause hepatotoxicity in dogs. The NOAEL and LOAEL used for the calculations were 0.2 mg/kg b.w. and 1.2 µg/kg b.w., respectively (Boermans and Leung, 2007; NSCFs, 2013). Considering the ADI and SPDL values, the estimated daily intake (EDI) (0.013 µg/kg b.w./day) and mean aflatoxin levels detected (0.672 µg/kg) (Table 2), all the feed samples can be considered safe for dogs concerning hepatotoxicity. There are no NOAEL and LOAEL values for hepatocarcinogenicity, therefore the lowest possible dose of aflatoxin intake is considered for this effect.

In spite of the high frequency of fumonisin contamination in raw materials intended for feed production (Böhm *et al.* 2010; Dong-Geun *et al.* 2013; Fernández *et al.* 2009; Ono, *et al.* 1999), there have been no reports of adverse effects in dogs so far. Due to the lack of data about fumonisin levels that cause toxicity in dogs, swine has been used as experimental

model for evaluation of dogs and cats because it is a sensitive specie and monogastric. Thus, the NOAEL used for FB was 0.2 mg/kg b.w./day and the LOAEL 0.4 mg/kg b.w./day, concerning the dose which causes lung lesions in swine (EFSA, 2005). ADI and SPDL values were 20 µg/kg b.w./day and 2000 µg/kg dog feed, respectively. Therefore considering the estimated daily intake (1.479 µg/kg b.w./day) (Table 2), 100% feed samples were considered safe for dog consumption concerning fumonisins.

In order to estimate the exposure of dogs to ZEA the NOAEL of 0.05 mg/kg b.w. and LOAEL of 1.3 mg/kg b.w. were considered regarding the dose which causes metabolic changes (Gajecka *et al.* 2013; NSCFS, 2013). ADI and SPDL were 5 mg/kg b.w./day and 6500 µg/kg dog feed, respectively. Therefore, comparing the estimated daily intake (0.483 µg/kg b.w./day) with ADI (5 µg/kg b.w./day) and mean ZEA level (24.13 µg/kg) (Table 2), all the feed samples were safe for dog consumption concerning ZEA.

Although the feed samples intended to dogs collected in residence of owners in Northern Paraná State, Brazil, were often contaminated with AF, FB and ZEA, considering values of ADI and SPDL used to evaluate the exposure degree of dogs to mycotoxins, mean levels of AF, FB and ZEA and the estimated daily intake of these toxins in feed, all the feed types could be considered safe for dog consumption.

In Brazil and in most countries there are no specific guidelines for the maximum tolerated limits (MTL) for mycotoxins in pet feed. Nevertheless, results obtained in this study highlight the need for monitoring mycotoxin levels in pet feed because these substances are resistant to the industrial processing and can remain along the feed chain, causing economic losses and toxic effects in animals.

References

ABINPET- Associação Brasileira da Indústria de Produtos para Animais de Estimação. Setor pet deve crescer 8,1% no Brasil em 2013. Available at: <http://abinpet.org.br/imprensa/noticias/setor-pet-deve-crescer-81-no-brasil-em-2013/>. Acess: 25 september. 2013a.

ABINPET- Associação Brasileira da Indústria de Produtos para Animais de Estimação. Manual pet food Brasil. 7. ed. Available at: <http://www.mflip.com.br/pub/abinpet/index.jsp>. Acess: 30 october. 2013b.

Akinrinmade, J.F. and Akinrinde, A.S., 2012. Aflatoxin status of some commercial dry dog foods in Ibadan, Nigeria. *African Journal of Biotechnology* 11:11463-11467.

Bennett, J.W. and Klich, M., 2003. Mycotoxins. *Clinical Microbiology Reviews* 16:497-516.

Boermans, H. and Leung, M.C.K., 2007. Mycotoxins and the pet food industry: Toxicological evidence and risk assessment. *International Journal of Food Microbiology* 119:95-102.

Böhm, J., Koinig, L., Razzazi-Fazeli, E., Blajet-Kosicka, A., Twaruzek, M., Grajewski, J., and Lang, C., 2010. Survey and risk assessment of the mycotoxins deoxynivalenol, zearalenone, fumonisins, ochratoxin A, and aflatoxins in commercial dry dog food. *Mycotoxin Research* 26:147-153.

Bullerman, L.B., Ryu, I. D. and Jackson, L.S. Stability of fumonisins in food processing. In: VRIES, J. W.; TRUCKSESS, M. W.; JACKSON, L. S. *Mycotoxins and Food Safety*. Kluwer Academic/Plenum Publishers, Washington, D.C, 2002. pp. 195-204.

BRASIL, 2003. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. 2003. Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos. RE nº 889, 29/5/2003. Available at: <http://lawes.com.br/legislacao2/899.pdf>. Access 30 november. 2012.

BRASIL. Portaria nº 130, 24 de maio de 2006. O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento institui o Grupo de Trabalho sobre Micotoxinas em produtos destinados à alimentação animal. Diário Oficial da União da República Federativa do Brasil, Brasília, Distrito Federal, 25 de mai. 2006, Seção 2, p. 5.

Campos, S.G., Cavaglieri, L.R., Fernández-Juri, M.G., Dalcerro, A.M., Kruger, C., Keller, L. A.M., Magnoli, C. E. and Rosa, C. A. R., 2008. Mycobiota and aflatoxins in raw materials and pet food in Brazil. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 92:377–383.

Carciofi, A.C., 2008. Fontes de proteína e carboidratos para cães e gatos. *Revista Brasileira de Zootecnia* 37: 28-41.

Carciofi, A.C.; Teshima, E.L, Bazzoli, R.S., Brunetto, M.A., Vasconcellos, R.S., Pereira, G. T. and Oliveira, L. D., 2009. Qualidade e digestibilidade de alimentos comerciais de diferentes segmentos de mercado para cães adultos. *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal* 10: 489-50.0

Case, L.P., Daristotle, L., Hayek, M.G. and Raasch, M.F., 2011. *Canine and feline nutrition: a resource for companion animal professionals*. 3^a ed. Mosby Elsevier:Missouri, 538 pp.

CAST - Council for Agricultural Sciences and Technology - Task Force Report. 2003 *Mycotoxins: risks in plant, animal, and human systems*. Ames, Iowa, n. 139, 217 pp.

Cérvero, M.C., Castillo, M.A., Montes, R. and Hernández, E., 2007. Determination of trichothecenes, zearalenone and zearalenols in commercially available corn-based foods in Spain. *Revista Iberoamericana de Micologia* 24:52–55.

Dong-Geun, S., Chanvorleak, P., Dong-Ho, K. and Chan, L., 2013. Occurrence of *Fusarium* mycotoxin fumonisin B₁ and B₂ in Animal Feeds in Korea. *Mycotoxin Research* 29:159–167.

EFSA – European Food Safety Authority. Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in Food Chain on a request from the Commission related to fumonisins as undesirable substances in animal feed. *The EFSA Journal*. p. 1-32, 2005.

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. *Worldwide Regulations for Mycotoxins in Food and Feed in 2003*. Available at: <http://www.fao.org/docrep/007/y5499e/y5499e02.htm>. Access: 20 August. 2013.

Fernández, J.M.G., Astoreca, A.L., Barberis, C.L., Cavaglieri, L.R., Dalcerro, A.M. and Magnoli, C.E., 2009. Aflatoxins, fumonisins and toxigenic fungi in raw materials and ready dry dog food in central Argentina. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária* 31:109-109.

Gajecka, M., 2013. The effects of experimental administration of low doses of zearalenone on the histology of ovaries in pre-pubertal bitches. *Polish Journal of Veterinary Sciences*. 16:313–322.

Gajecka, M., 2012. The effect of low-dose experimental zearalenone intoxication on the immunoreexpression of estrogen receptors in the ovaries of pre-pubertal bitches. *Polish Journal of Veterinary Sciences* 15:685-691.

Gaumy, J.L., Bailly, J.D., Burgat, V. and Guerre, P., 2001. Zéaralénone: Propriétés et toxicité expérimentale. *Revue de médecine vétérinaire* 152:219-234

Gelderblom, W.C.A., Abel, S., Smuts, C.M.; Marnewick, J., Marasas, W.F.O.; Lemmer, E. and Ramljak, D., 2001. *Environmental Health Perspectives. Fumonisin-Induced Hepatocarcinogenesis: Mechanisms Related to Cancer Initiation and Promotion* 109:291-300.

Golinski, P.K. and Nowak, T. 2004. Dietary origin of mycotoxins with estrogenic potential and possible health implications to female dogs. *Polish Journal of Veterinary Sciences* 7:337-341.

International Agency for Research on Cancer (IARC), 2002. Working Group on the Evaluation of carcinogenic risks to human. Lyons. Geneva: World Health Organization, 82:171-249.

Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO), 2007. DOQ-CGCRE-008, Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos. Revisão: julho de 2007. Available at: http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/CGCRE/DOQ/DOQ-CGCRE-8_03.pdf.

International Programme on Chemical Safety (IPCS/GEMS), 1995. Reliable evaluation of low-level contamination of food. Workshop in the frame of GEMS/Food-EURO, 26-27 May 1995, Appendix 5. IPCS/GEMS, Kulmbach, Germany.

Jardim, A.N.O. and Caldas, E. D., 2009. Exposição humana a substâncias potencialmente tóxicas na dieta e os riscos para a saúde. *Química Nova* 32:1898-1909.

Jiménez, M.T., Mánez, M. and Hernández, E., 1996. Influence of water activity and temperature on the production of zearalenone in corn by three *Fusarium* species. *International Journal of Food Microbiology* 29:417-421.

Maia, P.P. and Siqueira, M.E.P.B., 2002. Occurrence of aflatoxins B₁, B₂, G₁ and G₂ in some Brazilian pet foods. *Food Additives and Contaminants* 19:1180-1183.

Marasas, W.F.O., Kellerman, T.S., Gelderblom, W.C.A., Coetzer, J.A.W., Thiel, P.G. and Vanderlugt, J.J., 1988. Leukoencephalomalacia in a horse induced by fumonisin B₁ isolated from *Fusarium moniliforme*. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research* 55:197-203.

Marín, S., Sanchis, V., Vinas, I., Canela, R. and Magan, N., 1995. Effect of water activity and temperature on growth and fumonisin B₁ and B₂ production by *Fusarium proliferatum* and *F. moniliforme* on maize grain. *Letters in Applied Microbiology* 21:298-301.

Marín, S., Ramos, A.J. and Sanchis, V. 2012. Modelling *Aspergillus flavus* growth and aflatoxins production in pistachio nuts. *Food Microbiology*. v. 32, p. 378-388.

Martins, M.L., Martins, H.M. and Bernardo, F., 2003. Fungal flora and mycotoxins detection in commercial pet food. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias* 98:179-183.

Miyamoto, K., Hamada, A. and Kawamura, O. 2008. Determination of aflatoxins in corn and peanut by an immunoaffinity column bound AF.2 monoclonal antibody-HPLC method. *Technical Bulletin of Faculty of Agriculture, Kawaga*, v. 60, n. 113, p. 75-81.

Mngadi, P. T.; Govinden, R. and Odhav, B., 2008. Co-occurring mycotoxins in animal feeds. *African Journal of Biotechnology* 7:2239-2243.

Moss, M.O., 1998. Recent studies of mycotoxins. *Journal of Applied Microbiology* 84:62S-72S

Mousa, W., Ghazali, F.M., Jinap, S., Ghazali, H.M. and Radu, S., 2011. Modelling the effect of water activity and temperature on growth rate and aflatoxin production by two isolates of *Aspergillus flavus* on paddy. *Journal of Applied Microbiology* 111:1262-1274

Mwanza, M., Ndou, R.V., Dzoma, B., Nyirenda, M. and Bakunzi, F., 2013. Canine aflatoxicosis outbreak in South Africa (2011): A possible multi-mycotoxins aetiology, *Journal of the South African Veterinary Association* 84:1-5

Norwegian Scientific Committee for Food Safety (NSCFS), 2013. Risk assessment of mycotoxins in cereal grain in Norway. Opinion of the Scientific Steering Committee of the Norwegian Scientific Committee for Food Safety. 1-237, 2013.

Nuryono, N., Noviandi, C.T., Böhm, J., and Razzazi-Fazeli, E., 2005. A limited survey of zearalenone in Indonesian maize-based food and feed by ELISA and high performance liquid chromatography. *Food Control*. 16:65-71.

Ono, E.Y.S., Sugiura, Y., Homechin, M., Kamogae, M., Vizzoni, E., Ueno, Y. and Hirooka, E.Y., 1999. Effect of climatic conditions on natural mycoflora and fumonisins in freshly harvested corn of the State of Paraná, Brazil. *Mycopathologia* 147:139–148.

Ono, E.Y.S., Silva, M.; Hashimoto, E.H., Vizoni, E., Ueno, Y., and Hirooka, E.Y., 2008. Mycotoxicological quality evaluation of corn samples used by processing industries in the Northern region of Paraná State, Brazil. *Food Additives & Contaminants: Part A, Chemistry, analysis, control, exposure & risk assessment*. 25:1392-1399.

Ross, P.F., Nelson, P.E., Richard, J.L., Osweiler, G.D., Rice, L.G., Plattner, R.D. and Wilson, T. M., 1990. Production of fumonisins by *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum* isolates associated with equine leukoencephalomalacia and a pulmonary edema syndrome in swine. *Applied and Environmental Microbiology* 56:3225-3226.

Scaff, R. M. C.; and Scussel, V., 2004. Fumonisins B₁ and B₂ in Corn-Based Products Commercialized in the State of Santa Catarina – Southern Brazil. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 47:911-919,

Scussel, V.M.; Giordano, B.N.E.; Simão, V.; Rocha, M.W.; Reis, L.F.C. and Xavier, J.J.M. Mycotoxin evaluation in feed for pets using tandem liquid chromatography mass/mass. pp. 182-188, 2006. In: 9th International Working Conference on Stored Product Protection.

Shephard, G.S., Sydenham, E.W., Thiel, P.G. and Gelderblom, W.C.A., 1990. Quantitative determination of fumonisin B₁ and B₂ by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Liquid Chromatography* 13: 2077-2087.

SINDIRAÇÕES - Sindicato Nacional da Indústria de Alimentação Animal. Setor de Alimentação animal, Boletim informativo do setor. 2013. Available at: <http://sindiracoes.org.br/produtos-e-servicos/boletim-informativo-do-setor/>.

Souza, K.K. and Scussel, V.M., 2013. Dogs and birds dry food fumonisin FB₁ and FB₂ contamination and their relation to ingredients and packaging characteristics. *Research Journal of Biological Sciences* 8:22-29.

Ueno, Y., Aoyama, S., Sugiura, Y., Wang, D. S., Lee, U. S., Hirooka, E. Y., Hara, S., Karki, T., Chen, G., and Yu, S-Z. 1993. A limited survey of fumonisins in corn and corn-based products in Asian countries. *Mycotoxin Research* 9:27-34.

Zwierzchowski, W., Gajecki, M., Obremski, K., Zielonka, L. and Baranowski, M., 2004. The occurrence of zearalenone and its derivatives in standard and therapeutic feeds for companion animals. *Polish Journal Veterinary Science* 7:289-293.

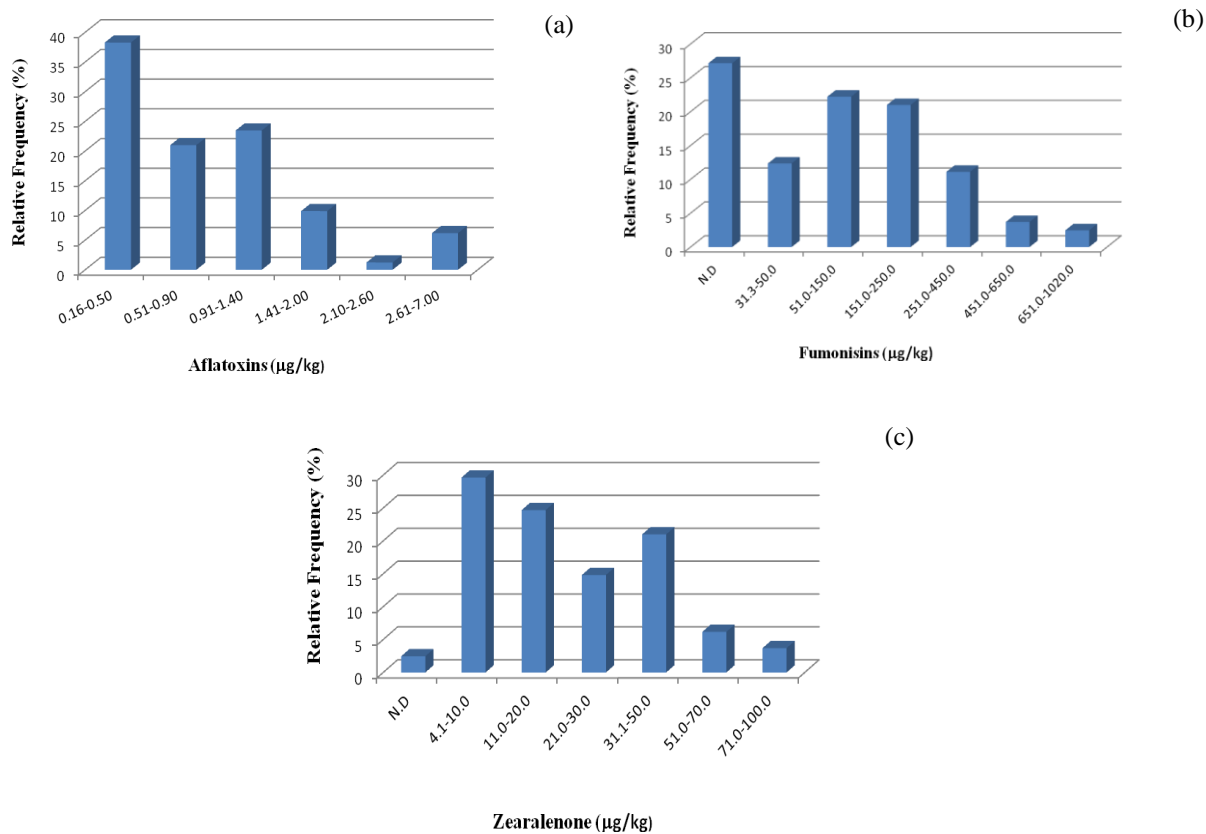


Figure 1. (a) Distribution of aflatoxin levels in feed samples (n=81), (b) Distribution of fumonisin levels in feed samples (n=81); (c) Distribution of zearalenone levels in feed samples (n=81) intended for dogs, in Northern Paraná State, Brazil.

Table 1. Water activity, occurrence and levels of aflatoxins, fumonisins and zearalenone in Standard, Premium and Super Premium feed intended for dogs (n=81), in Northern Paraná State, Brazil.

Type of Feed	N	¹ Aflatoxins (µg/kg)			² Fumonisin (µg/kg)			Zearalenone (µg/kg)			Positive Samples (%)							a _w	
		Range	Mean	Median	Range	Mean	Median	Range	Mean	Median	AFB ₁	AFG ₁	AFB ₂	AFG ₂	FB ₁	FB ₂	ZEA	Range	Mean
Standard	49	0.16 - 5.39	1.29 ^a	1.13	37.44 - 1014.72	272.43 ^a	293.31	4.07 - 98.35	52.60 ^a	45.82	100	61.2	-	10.2	77.6	49.0	95.9	0.50 - 0.83	0.68 ^a
Premium	25	0.21 - 6.16	0.49 ^b	0.42	31.32 - 509.64	78.22 ^a	43.68	5.35 - 58.44	10.60 ^b	10.88	100	48.0	4.0	-	72.0	60.0	100	0.42 - 0.82	0.65 ^a
S. Premium	7	0.19 - 2.64	0.53 ^b	0.37	101.04 - 503.02	186.53 ^a	154.48	11.93 - 43.53	17.55 ^b	13.41	100	57.1	-	42.9	42.9	57.1	100	0.55 - 0.75	0.69 ^a

Limit of Detection (LD) aflatoxins: AFB₁=0.13 µg/kg; AFG₁= 0.03 µg/kg; AFB₂= 0.59 µg/kg; AFG₂= 0.22 µg/kg

LD fumonisins: FB₁= 27.50 µg/kg; FB₂= 35.30 µg/kg

LD zearalenone 3.95 µg/kg

Means followed by different letters in a column differ statistically by the Kruskal-Wallis test (p<0.05)

1. Aflatoxins= AFB₁+AFG₁+AFB₂+AFG₂

2. Fumonisin= FB₁+FB₂

Table 2. Mean mycotoxins levels, estimated daily mycotoxin intake, acceptable daily intake (ADI) and safe pet dietary level (SPDL) for dogs through naturally contaminated feed in Northern Paraná State, Brazil.

	Mean levels ($\mu\text{g}/\text{kg}$) ^a	EDI ($\mu\text{g}/\text{kg}$ bw/day) ^b	ADI ($\mu\text{g}/\text{kg}$ bw/day) ^b	SPDL ($\mu\text{g}/\text{kg}$ pet food) ^b
Aflatoxins	0.67	0.013	20.00	6
Fumonisin	73.94	1.479	20.00	2000
Zearalenone	24.13	0.483	5.00	6500

^a Mean levels calculated according to the IPCS/GEMS (1995) criteria

^b Considering a Beagle dog breed, adult, female and 12 kg of average body weight consuming an average of 240 g of feed per day

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Considerando a alta frequência de contaminação das rações por aflatoxinas, fumonisinas e zearalenona e a falta de legislação específica que estabeleça limites para a presença destas em rações destinadas a animais de companhia, estudos de monitoramento da contaminação natural de rações e a avaliação do grau de exposição de cães a micotoxinas são necessários para assegurar a qualidade dos produtos, minimizar a ingestão de rações contaminadas e os riscos associados a ingestão destas à saúde dos animais de companhia.

REFERÊNCIAS

ABINPET- Associação Brasileira da Indústria de Produtos para Animais de Estimação. Manual pet food Brasil. 7. ed. Disponível em: <<http://www.mflip.com.br/pub/abinpet/index.jsp>>. Acesso: 30 de outubro de 2013b.

ABINPET- Associação Brasileira da Indústria de Produtos para Animais de Estimação. Setor pet deve crescer 8,1% no Brasil em 2013. Disponível em: <http://abinpet.org.br/imprensa/noticias/setor-pet-deve-crescer-81-no-brasil-em-2013/>. Acesso 25 de setembro de 2013a.

AKINRINMADE, J. F.; AKINRINDE, A. S. Aflatoxin status of some commercial dry dog foods in Ibadan, Nigeria. **African Journal of Biotechnology**, v. 11, n. 52, p. 11463-11467, 2012.

ASPLIN, F. D.; CARNAGHAN, R. B. A. The toxicity of certain groundnut meals for poultry with especial reference to their affect on ducklings and chickens. **Veterinary Record**, v. 73, p. 1215-1219, 1961.

BAZOLLI, R. S. **Influência do grau de moagem de ingredients amiláceos utilizados e rações extrusadas sobre os aspectos digestivos e respostas metabólicas em cães**. 2007. 82 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2007.

BENNETT, J.W.; KLICH, M. Mycotoxins. **American Society for Microbiology**, v. 16, n. 3, p. 497-516, 2003.

BEZUIDENHOUT, S. C.; GELDERBLUM, W. C. A.; GORST-ALLMAN, C. P.; HORAK, R. M.; MARASAS, W. F. O.; SPITELLER, G.; VLEGGAAR, R. Structure elucidation of the fumonisins, mycotoxins from *Fusarium moniliforme*. **Journal of Chemistry of the Society of Chemical Community**, v. 1988, p. 743-745, 1988.

BHATNAGAR, D.; EHRLICH, K.C.; CLEVELAND, T.E. Molecular genetic analysis and regulation of aflatoxin biosynthesis. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 61, p. 83-93, 2003.

BIEHL, M.; BUCK, W. B. Chemical contaminants: Their Metabolism and their residues. **Journal of food protection**, v. 50, n. 12, p. 1058-1073, 1987.

BISCHOFF, K.; RAMAIAH, S.K. Liver Toxicity. In: GUPTA, R.C. **Veterinary Toxicology – Basic and Clinical Principles**. San Diego: Academic Press, p. 145-160, 2007.

BOERMANS, H.; LEUNG, M.C.K. Mycotoxins and the pet food industry: Toxicological evidence and risk assessment. **International Journal of Food Microbiology**, v. 119, p. 95-102, 2007.

BÖHM, J.; KOINIG, L.; RAZZAZI-FAZELI, E.; BLAJET-KOSICKA, A.; TWARUZEK, M.; GRAJEWSKI, J.; LANG, C. Survey and risk assessment of the mycotoxins

deoxynivalenol, zearalenone, fumonisins, ochratoxin A, and aflatoxins in commercial dry dog food, **Mycotoxin Research**, v. 26, n. 3, p. 147-153, 2010.

BRASIL, 2003. Instrução Normativa do Ministério de Agricultura Pecuária e Abastecimento – MAPA nº. 9, de 09 de julho de 2003. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Seção 1, p. 7. Disponível em: www.ipef.br/legislacao/bdlegislacao/arquivos/17508.rtf

BRASIL, 2004. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. 2004. Cartilha de Boas Práticas na Alimentação. **Resolução RDC nº 216/2004, 15/09/2004**. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/alimentos/bp.htm>. Acesso 30 de novembro de 2012.

BRASIL, 2003. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. 2003; Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos. **RE nº 889, 29/5/2003**. Disponível em: <http://lawes.com.br/legislacao2/899.pdf>. Acesso 30 de novembro de 2012.

BRASIL, 2006. Portaria nº 130, 24 de maio de 2006. O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento institui o Grupo de Trabalho sobre Micotoxinas em produtos destinados à alimentação animal. **Diário Oficial da União da República Federativa do Brasil**, Brasília, Distrito Federal, 25 de mai. 2006, Seção 2, p. 5.

BRASIL, 2007. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. 2002. **RDC nº 274/2002, 15/10/2002**. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/anvisalegis/resol/2002/274_02rdc.htm . Acesso em 30 novembro de 2012.

BRITO, C. B. M. **Efeito de diferentes níveis de umidade com e sem utilização de antifúngico em dietas para cães**. 2009. 51 f. Tese (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.

BUENO, D.J.; SILVA, J.O.; OLIVERA, G. Fungal isolation and enumeration in foods. **Methods in Molecular Biology**, v. 268, p. 127-131, 2004.

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

BULLERMAN, L. B.; RYU, I. D.; JACKSON, L. S. Stability of fumonisins in food processing. **Mycotoxins and Food Safety**, p. 195-204, 2002.

CAMPOS, S. G.; CAVAGLIERI, L. R.; FERNÁNDEZ-JURI, M. G.; DALCERO, A. M.; KRUGER, C.; KELLER, L. A. M.; MAGNOLI, C. E.; ROSA, C. A. R.. Mycobiota and aflatoxins in raw materials and pet food in Brazil. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 92, p. 377–383, 2008.

CARCIOFI, A. C. Fontes de proteína e carboidratos para cães e gatos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 37, p. 28-41, 2008.

CARCIOFI, A. C.; TESHIMA, E.L; BAZOLLI, R. S.; BRUNETTO, M. A.; VASCONCELLOS, R. S.; PEREIRA, G. T.; OLIVEIRA, L. D. Qualidade e digestibilidade de alimentos comerciais de diferentes segmentos de mercado para cães adultos. **Revista Brasileira de Saúde Produção Animal**, v. 10, n. 2, p. 489-500, 2009.

CARCIOFI, A.; VASCONCELLOS, R. S.; BORGES, N. C.; MORO, J. V.; PRADA, F.; FRAGA, V. O. Composição nutricional e avaliação de rótulo de rações secas para cães comercializadas em Jaboticabal-SP. Arquivo **Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, n. 3, p. 421-426, 2006.

CASE, L. P.; DARISTOTLE, L.; HAYEK, M. G.; RAASCH, M. F. **Canine and feline nutrition: a resource for companion animal professionals**. 3^a ed. Mosby Elsevier:Missouri, 2011, 538 p.

CAST - Council for Agricultural Sciences and Technology - Task Force Report. **Mycotoxins: risks in plant, animal, and human systems**. Ames, Iowa, n. 139, p. 191, 2003.

CÉRVERO, M.C.; CASTILLO, M.A.; MONTES, R.; HERNÁNDEZ, E. Determination of trichothecenes, zearalenone and zearalenols in commercially available corn-based foods in Spain. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 24, p. 52–55, 2007.

CHEN, J.; MIROCHA, C.J.; XIE, W.; HOGGE, L.; OLSON, D. Production of the mycotoxin fumonisin B1 by *Alternaria alternata* f. *sp.lycopersici*. **Applied Environmental microbiology**, v. 58, p. 3928-3931, 1992.

CONCA, R.; BRUZZONITI, M.C.; MENTASTI, E.; SARZANINI, C.; HAJOS, P. Ion chromatographic separation of polyamines: putrescine, spermidine and spermine. **Analytical Chimica Acta**, 2001.

COPPOCK, R.W.; CHRISTIAN, R.G. Aflatoxins In: GUPTA, R.C. **Veterinary Toxicology – Basic and Clinical Principles**. San Diego: Academic Press, 2007, p. 939-950.

COULOMBE, R.A. Aflatoxins. In: Sharma, R.P. & Salunkhe, D.K. **Mycotoxins and phytoalexins**. BocaRaton: CRC Press, p. 103-143, 1991.

COULOMBE, R. J. J. Biological action of mycotoxins. **Journal of Dairy Science**, v. 76, n. 3, p. 880-891, 1993.

CROY, R. G.; ESSIGMANN, J. M.; REINHOLD; V. N, WOGAN, G. N. Identification of the principal aflatoxin B₁-DNA adduct formed in vivo in rat liver. **Proceedings of the national academy of sciences**, v. 75, n. 4, p. 1745-1749, 1978.

CRUZ, J.V.S. **Ocorrência de aflatoxinas e fumonisinas em produtos à base de milho e milho utilizado como ingrediente de ração para animais de companhia, comercializados na região de Pirassununga**. 2010. 73f. Tese (Doutorado em Engenharia dos Alimentos) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

CULLEN, J.M; NEWBERNE, P.M. Acute hepatotoxicity of aflatoxins. In: EATON, D.L.; GROOPMAN, J.D. (eds.) **The Toxicology of aflatoxins: Human health, veterinary, and agricultural significance**. Academic Press Inc., p. 3-26, 1994.

DIAZ, G.J.; BOERMANS, H.J. Fumonisin toxicosis in domestic animals: a review. **Veterinary Human Toxicology**, v. 36, p. 548-555, 1994.

DILKIN, P.; HASSEGAWA, R.; REIS, T. A.; MALLMANN, C. A.; CORRÊA, B. Intoxicação experimental de suínos por fumonisinas. **Ciência Rural**, v. 34, n. 1, p. 175-181, 2004.

DIONELLO, R.G.; RADIINZ, L.L; ELIAS, M.C.; MEIRELLES, M.C.A. Método de secagem e sistema de armazenamento na ocorrência de micotoxinas em milho. **Revista Brasileira de Armazenamento**, v. 25, p. 9-15, 2000.

D' MELLO, J. P. F.; PLACINTA, C. M.; MACDONALD, A. M. C. *Fusarium* Mycotoxins: a review of global implications for animal health, welfare and productivity. **Animal Feed Science and Technology**, v. 80, n. 3-4, p.183-205, 1999.

DONG-GEUN, S.; CHANVORLEAK, P.; DONG-HO, K.; LEE, C. Occurrence of Fusarium Mycotoxin Fumonisin B₁ and B₂ in Animal Feeds in Korea. **Mycotoxin Research**, v. 29, p. 159–167, 2013.

DOOHAN, F. M.; BRENNAN, J.; COOKE, B. M. Influence of climatic factors on Fusarium species pathogenic to cereals. **European Journal of Plant Pathology**, v. 109, p. 755–768, 2003.

EFSA – European Food Safety Authority. Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in Food Chain on a request from the Commission related to fumonisins as undesirable substances in animal feed. **The EFSA Journal**, p. 1-32, 2005.

ESPADA, Y.; GOPEGUI, R.R.; CUADRADAS, C.; CABAÑES, F.G. Fumonisin mycotoxicosis in broilers. Weights and sérum chemistry modifications. **Avian Diseases**, v. 38, p. 454-460, 1994.

EZEQUIEL, C. N.; ODEBODE, A. C.; FAPOHUNDA, S. O. Zearalenone Production by Naturally Occurring *Fusarium Species* on Maize, Wheat and Soybeans from Nigeria. **Journal Biology Environmental Science**, v. 2, n. 6, p. 77-82, 2008.

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. Worldwide Regulations for Mycotoxins in Food and Feed in 2003. Disponível em: <http://www.fao.org/docrep/007/y5499e/y5499e02.htm>. Acesso: 20 de Agosto de 2013.

FERNÁNDEZ, J. M. G.; ASTORECA, A. L.; BARBERIS, C. L.; CAVAGLIERI, L. R.; DALCERO, A. M.; MAGNOLI, C. E. Aflatoxins, fumonisins and toxigenic fungi in raw materials and ready dry dog food in central Argentina. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 31, p. 109-109, 2009.

FILHO, Edar Ferrari. **Métodos e temperatura de secagem sobre a qualidade físico-química e microbiológica de grãos de milho no armazenamento**. 2011. 95 f. Tese (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

FORSYTHE, S.F. **Microbiologia da segurança alimentar**. Porto Alegre: Artmed, p. 425, 2002.

FORTES, M. L. S. Formulação de Rações para Cães. In: **Anais do ZOOTEC**, 2005, Campo Grande-MS, p. 1-15, 2005.

GAFFOOR, I.; TRAIL, F. Characterization of Two Polyketide Synthase Genes Involved in Zearalenone Biosynthesis in *Gibberella zeae*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 3, p. 1793–1799, 2006.

GAJECKA, M. The effect of low-dose experimental zearalenone intoxication on the immunoexpression of estrogen receptors in the ovaries of pre-pubertal bitches. **Polish Journal of Veterinary Sciences**, v. 15, n. 4, p. 685-691, 2012.

GAJECKA, M. The effects of experimental administration of low doses of zearalenone on the histology of ovaries in pre-pubertal bitches. **Polish Journal of Veterinary Sciences**, v. 16, n. 2, p. 313–322, 2013.

GAJECKA, M.; ZIELONKA, L.; DABROWSKI, M.; MRÓZ, M. GAJECKI, M. The effect of low doses of zearalenone and its metabolites on progesterone and 17 β -estradiol concentrations in peripheral blood and body weights of pre-pubertal female Beagle dogs. **Toxicol**, v. 76, p. 260-269, 2013.

GARLAND, T.; REAGOR, J. Chronic canine aflatoxin and management of na epidemic. In: **Poisonous plants: global research and solutions**, p. 307-312, 2007.

GAUMY, J. L.; BAILLY, J.D.; BURGAT, V.; GUERRE, P. Zéaralénone: Propriétés et toxicité expérimentale. **Revue de médecine vétérinaire**, v. 152, n. 3, p.219-234, 2001.

GELDERBLOM, W. C. A.; ABEL, S.; SMUTS, C. M.; MARNEWICK, J.; MARASAS, W. F.O.; LEMMER, E.; RAMLJAK, D. **Environmental Health Perspectives**. Fumonisin-Induced Hepatocarcinogenesis: Mechanisms Related to Cancer Initiation and Promotion. v. 109, p. 291-300, 2001.

GELDERBLOM, W.C.A., JASKIEWICZ, K., MARASAS, W.F.O. Toxicity and carcinogenicity of the *Fusarium moniliforme* metabolite, fumonisin B₁, in rats. **Carcinogenesis**, v. 12, p. 1247-1251, 1991.

GIANNITTI, F.; DIAB, S. S.; PACIN, A. M.; BARRANDEGUY, M.; LARRERE, C.; ORTEGA, J., UZAL, F. A. Equine leukoencephalomalacia (ELEM) due to fumonisins B₁ and B₂ in Argentina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, n. 5, p. 407-412, 2011.

GOLINSKI, P. K.; NOWAK, T. Dietary origin of mycotoxins with estrogenic potential and possible health implications to female dogs. **Polish Journal of Veterinary Sciences**, v. 7, p. 337-341, 2004.

HOELTZ, Michele. **Estudo de manejos pós-colheita na incidência de fungos e micotoxinas no arroz (*Oriza sativa L.*)**. 2005. 88 f. Tese (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

HUFFMAN, J.; GERBER, R.; DU, L. Recent advancements in the biosynthetic mechanisms for polyketide-derived mycotoxins. **Biopolymers**, v. 93, n. 9, p. 764-776, 2010.

HUSSEIN, H.S.; BRASEL, J.M. Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. **Toxicology**, v. 167, p. 101-134, 2001.

International Agency for Research on Cancer (IARC). Working Group on the Evaluation of carcinogenic risks to human. Lyons. **Geneva: World Health Organization**, v. 82, 2002.

Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO), 2007. DOQ-CGCRE-008, Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos. Revisão: julho de 2007. Available at: http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/CGCRE/DOQ/DOQ-CGCRE-8_03.pdf.

International Programme on Chemical Safety (IPCS); **Risk Assessment Terminology**. Harmonization Project. WHO, Geneva, 2004.

International Programme on Chemical Safety (IPCS/GEMS), 1995. Reliable evaluation of low-level contamination of food. Workshop in the frame of GEMS/Food-EURO, 26-27 May 1995, Appendix 5. IPCS/GEMS, Kulmbach, Germany.

JAIMEZ, J.; FENTE, C.A; VAZQUEZ, B.I; FRANCO, C.M; CEPEDA, A.; MAHUZIER, G.; PROGNON, P. Application of the assay of aflatoxins by liquid chromatography with fluorescence detection in food analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 882, p. 1-10, 2000.

JARDIM, A. N. O.; CALDAS, E. D. Exposição humana a substâncias potencialmente tóxicas na dieta e os riscos para a saúde. **Química Nova**, v. 32, n. 7, p. 1898-1909, 2009.

JIMÉNEZ, M. T.; MÁÑEZ, M.; HERNÁNDEZ, E. Influence of water activity and temperature on the production of zearalenone in corn by three *Fusarium* species **International Journal of Food Microbiology**, v. 29, p. 417-421, 1996.

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

KIESSLING K.H.: The effect of zearalenone on growth rate, organ weight and muscle fibre composition in growing rats. **Acta Pharmacologica et Toxicologica**, v. 51, p. 154-158, 1982.

KIM, Y.T; LEE, Y.R; JIN, J.; HAN, K.H; KIM, J.C; LEE, T; YUN, S.H; LEE, Y.W. Two different polyketide synthase genes are required for synthesis of zearalenone in *Gibberella zeae*. **Molecular Microbiology**, v. 58, n. 4, p. 1102-1113, 2005.

KOLB, E. Recent knowledge on the mechanism of action and methabolism of mycotoxins. **Zeitschrift für die gesamte innere Medizin und ihre Grenzgebiete**, v. 39, p. 353-358, 1984.

KUIPER-GOODMAN, T. Risk assessment to humans of mycotoxins in animal derived food products. **Veterinary and Human Toxicology**, v. 33, n. 4, p. 325-333, 1991.

KUIPER-GOODMAN, T.; SCOTT, P. M.; WATANABE, H. Risk Assessment of the Mycotoxin Zearalenone. **Regulatory toxicology and pharmacology**. v. 7, p. 253-306, 1987.

LAZZARI, F. A. **Umidade, fungos e micotoxinas na qualidade de sementes, grãos e rações**. 2. ed. Curitiba: [s.n.], 1997. 148 p.

LEESON, S.; DIAZ, G.J.; SUMMERS, J.D. **Poultry metabolic disorders and mycotoxins**. Guelph: University Books, 1995.

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

MAIA, P. P.; SIQUEIRA, M. E. P. B. Aflatoxinas em rações destinadas a cães, gatos e pássaros – Uma revisão. **Revista da FZVA**. Uruguaiana, v.14, n. 1, p. 235-257, 2007.

MARASAS, W. F. O.; KELLERMAN, T. S.; GELDERBLOM, W. C. A.; COETZER, J. A. W.; THIEL, P. G.; VANDERLUGT, J. J. Leukoencephalomalacia in a horse induced by fumonisin B₁ isolated from *Fusarium moniliforme*. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v. 55, n. 4, p.197-203, 1988.

MARÍN, S.; SANCHIS, V.; VINAS, I.; CANELA, R.; MAGAN, N. Effect of water activity and temperature on growth and fumonisin B₁ and B₂ production by *Fusarium proliferatum* and *F. moniliforme* on maize grain. **Letters in Applied Microbiology**, v. 21, p. 298-301, 1995.

MARÍN, S.; RAMOS, A. J.; SANCHIS, V. Modelling *Aspergillus flavus* growth and aflatoxins production in pistachio nuts. **Food Microbiology**, v. 32, p. 378-388, 2012.

MARTINS, M.L; MARTINS, H.M; BERNARDO, F. Fungal flora and mycotoxins detection in commercial pet food. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v. 98, n. 548, p. 179-183, 2003.

MAZIERO, M. T.; BERSOT, L. S.; Micotoxinas em alimentos produzidos no Brasil. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**. v. 12, n. 1, p. 89-99, 2010.

MILLER, J.D. Fungi and mycotoxins in grain: Implications for stored product research. **Journal of Stored Products Research**, v. 31, n. 1, p. 1-16, 1995.

MIYAMOTO, K.; HAMADA, A.; KAWAMURA, O. Determination of aflatoxins in corn and peanut by an immunoaffinity column bound AF2 monoclonal antibody-HPLC method. **Technical Bulletin of Faculty of Agriculture**, v. 60, n. 113, p. 75-81, 2008.

MNGADI, P. T.; GOVINDEN, R.; ODHAV, B. Co-occurring mycotoxins in animal feeds. **African Journal of Biotechnology**, v. 7, n. 13. p. 2239-2243, 2008.

MORENO, E. C.; GARCIA, G. T.; ONO, M. A.; VIZONI, E.; KAWAMURA, O.; HIROOKA, E. Y.; ONO, E. Y. S. Co-occurrence of mycotoxins in corn samples from the Northern region of Paraná State, Brazil. **Food Chemistry**, v. 116, p. 220–226, 2009.

MOSS, M. O. Recent studies of mycotoxins. **Journal of Applied Microbiology**, v. 84, n. 27, p. 62S-72S, 1998.

MOUSA, W.; GHAZALI, F. M.; JINAP, S.; GHAZALI, H. M.; RADU, S. Modelling the effect of water activity and temperature on growth rate and aflatoxin production by two isolates of *Aspergillus flavus* on paddy. **Journal Applied Microbiology**, v. 111, p. 1262-1274, 2011.

MUSSER, S.M.; GAY, M. L.; MAZZOLA, E. P.; PLATTNER, R. D. Identification of a New Series of Fumonisin Containing 3-Hydroxypyridine. **Journal of Natural Products (Lloydia)**, Cincinnati, v. 59, n. 10, p. 970-972, 1996.

MWANZA, M.; NDOU, R. V.; DZOMA, B.; NYIRENDA, M.; BAKUNZI, F. Canine aflatoxicosis outbreak in South Africa (2011): A possible multi-mycotoxins aetiology, **Journal of the South African Veterinary Association**, v. 84, n. 1, p. 1-5, 2013.

NELSON, P.E. Taxonomy and biology of *Fusarium moniliforme*. **Mycopathologia**, v. 117, p. 29-36, 1992.

NEPONUCENA, Y. Cresce consumo de rações para animais domésticos. **Diário do Nordeste**, pet food, 2012. Disponível em: <http://diariodonordeste.globo.com/materia.asp?codigo=1127721>>. Acesso em 19 de junho de 2012.

NEWBERNE, M.; RUSSO, R.; WOGAN, G. N. Acute Toxicity of Aflatoxin B₁ in the Dog. **Pathologia Veterinaria**, v. 3, p. 331-340, 1966.

NEWMAN, S.J.; SMITH, J.R.; STENSKE, K.A.; NEWMAN, L.B.; DUNLAP, J.R.; IMERMAN, P.M.; KIRK, C.A. Aflatoxicosis in nine dogs after exposure to contaminated commercial dog food. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 19, p. 168-175, 2007.

NORRED, W.P. Fumonisin – mycotoxins produced by *Fusarium moliniforme*. **Journal Toxicology Environmental Health**, v. 38, p. 309-328, 1993.

NSCFS - Norwegian Scientific Committee for Food Safety. **Risk assessment of mycotoxins in cereal grain in Norway**. Opinion of the Scientific Steering Committee of the Norwegian Scientific Committee for Food Safety. p. 1-237, 2013.

NURYONO, N.; NOVIANDI, C.T.; BÖHM, J.; RAZZAZI-FAZELI, E. A limited survey of zearalenone in Indonesian maize-based food and feed by ELISA and high performance liquid chromatography. **Food Control**. v.16, p. 65-71, 2005.

ONO, E. Y. S.; SUGIURA, Y.; HOMECHIN, M.; KAMOGAE, M.; VIZZONI, E. UENO, Y.; HIROOKA, E. Y. Effect of climatic conditions on natural mycoflora and fumonisins in freshly harvested corn of the State of Paraná, Brazil. **Mycopathologia**, v. 147, p. 139-148, 1999.

ONO, E. Y. S.; SILVA, M.; HASHIMOTO, E. H.; VIZONI, E.; KAWAMURA, O.; SUGIURA, Y.; HIROOKA, E. Y. Mycotoxicological quality evaluation of corn samples used by processing industries in the Northern region of Paraná State, Brazil. **Food Additives & Contaminants: Part A**, Chemistry, analysis, control, exposure & risk assessment. v. 25, p. 1392-1399, 2008.

Organización Panamericana de la Salud (OPS). **Criterios de salud ambiental – 11: Micotoxinas**. Washington, 1983. p.131.

PLACINTA, C.M; D’MELLO, J.P.F.; MACDONALD, A.M.C. A review of worldwide contamination of cereal grains and animal feed with *Fusarium* mycotoxins. **Animal Feed Science and Technology**, v. 78, n. 1-2, p. 21-37, 1999.

POMPA, G.; MONTESISSA, C.; DI LAURO, F.M.; FADINI, L. The metabolism of zearalenone in subcellular fractions from rabbit and hen hepatocytes and its estrogenic activity in rabbits. **Toxicology**, v. 42, p. 69–75, 1986.

PROCTOR, R. H.; DESJARDINS, A. E.; PLATTNER, R. D.; HOHM, T. M. A Polyketide Synthase Gene Required for Biosynthesis of Fumonisin Mycotoxins in *Gibberella fujikuroi* Mating Population A. **Fungal Genetics and Biology**, v. 27, p. 100-112, 1999.

PROCTOR, R. H.; BROWN, D. W.; PLATTNER, R. D.; DESJARDINS, A. E. Co-expression of 15 contiguous genes delineates a fumonisin biosynthetic gene cluster in *Gibberella moniliformis*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 38, p. 237–249, 2003.

QUEZADA, T.; CUÉLLAR, H.; JARAMILLO-JUÁREZ, F.; VALDIVIA, A.G.; REYES, J.L. Effects of aflatoxin B₁ on the liver and kidney of broiler chickens during development. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C** 125, n. 3, p. 265-272, 2000.

RAI, M.; VARMA, A. **Mycotoxins in food, feed and bioweapons**. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 450 p, 2010.

RHEEDER, J. P.; MARASAS, W. F. O.; VISMER, H.F. Production of Fumonisin analogs by *Fusarium* Species. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 5, p. 2101–2105, 2002.

RICHARDSON, K.E., HAGLER, W.M., HAMILTON, P.B. Bioconversion of α -[14C] zearalenol and β -[14C] zearalenol into [14C] zearalenone by *Fusarium roseum* ‘Gibbosum’. **Applied Environmental Microbiology**, v. 47, p. 1206-1209, 1984.

ROSS, P.F.; NELSON, P.E.; RICHARD, I.D.; OSWEILER, G.D.; RICE, G.L.; PLATTNER, R.D.; WILSON, T.M. Production of fumonisins by *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum* isolates associated with equine leukoencephalomalacia and pulmonary edema syndrome in swine. **Applied Environmental Microbiology**, v. 56, p. 3225-3226, 1990.

RUMBEIHA, W.K. Clinical implications of mycotoxicosis in companion animals. **Technical Symposium on Mycotoxin**, Alltech, Inc, Nicholasville, KY, 2000.

RUSTOM, I. Y. S. Aflatoxin in food and feed: occurrence, legislation, and inactivation by physical methods. **Food Chemistry**, v. 59, n. 1, p. 57-67, 1997.

SABINO, M.; LAMARDO, L.C.A.; INOMATA E.I.; HARUKO, A.; GIANNATTASIO, C. M. P. Ocorrência de aflatoxina B₁ em produtos alimentícios e rações animais consumidos no estado de São Paulo e em várias outras regiões do Brasil, no período de 1980 a 1987. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 48, p. 81-85, 1988.

SABINO, M.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Mycotoxin research in Brazil. **Ciência e Cultura**, v. 45, p. 359-371, 1993.

SABINO, M.; LAMARDO, L. C. A.; SHUNDO, L.; NAVAS, S. A.; MILANEZ, T. V. Micotoxinas. In: ZENEBON, O.; PASCUET, N. S.; TIGLEA, P. **Métodos Físico-Químicos para Análise de Alimentos** – 5. Ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, p. 1020, 2008.

SCAFF, R. M. C.; SCUSSEL, V. Fumonisin B₁ and B₂ in Corn-Based Products Commercialized in the State of Santa Catarina – Southern Brazil. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 47, n. 6, p. 911-919, 2004.

SCUDAMORE, K.A.; HETMANSKI, M.T.; NAWAZ, S.; NAYLOR, J.; RAINBIRD, S. Determination of mycotoxins in pet foods sold for domestic pets and wild birds using linked-column immunoassay clean-up and HPLC. **Food Additives and Contaminants**, v. 14, n. 2, p. 175-186, 1997.

SCUSSEL, V. M.; GIORDANO, B. N. E.; SIMÃO, V.; ROCHA, M. W.; REIS, L.F.C., XAVIER, J. J. M. Mycotoxin evaluation in feed for pets using tandem liquid chromatography mass/mass. p. 182-188, 2006. In: 9th International Working Conference on Stored Product Protection. **Artigo**, 2006.

SEO, J.A; LEE, Y.W. Natural occurrence of the C series of fumonisins in moldy corn. **Applied Environmental Microbiology**, v. 65, p.1331-1334, 1999.

SHEPHARD, G.S.; SYDENHAM, E.W.; THIEL, P.G.; GELDERBLUM, W.C.A. Quantitative determination of fumonisin B₁ and B₂ by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. **Journal of Liquid Chromatography**, v. 13, p. 2077-2087, 1990.

SHEPHARD, G.S.; THIEL, P.G.; SYDENHAM, E.W. Initial studies on the toxicokinetics of fumonisin B₁ in rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 30, p. 277-279, 1992.

SILVA, L.O.N. **Sistema de qualidade (NB 9000) em fábricas de rações**. 1998. 205f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Engenharia Agrícola, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1998.

SILVA, C. V.; BARROS, F.; SOUZA, C. F. V. Qualidade nutricional de rações secas para cães adultos comercializadas em Lajeado-RS. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, v. 4, n. 2, p. 153-160, 2010.

SINDIRAÇÕES - Sindicato Nacional da Indústria de Alimentação Animal. Setor de Alimentação animal, **Boletim informativo do setor**. 2012. Disponível em: http://sindiracoes.org.br/wp-content/uploads/2012/05/sindiracoes_boletim-informativo-versao-portugues-atual-maio2012.pdf

SINDIRAÇÕES - Sindicato Nacional da Indústria de Alimentação Animal. Setor de Alimentação animal, **Boletim informativo do setor**. 2013. Disponível em: <http://sindiracoes.org.br/produtos-e-servicos/boletim-informativo-do-setor/>. Acesso 25 de setembro de 2013.

SMITH, J. E.; HENDERSON, R. S. **Mycotoxins and animal foods**. London: CRC Press, p. 816-841, 1991.

SMITH, J.E.; MOSS, M.O. **Mycotoxins: Formation, Analysis and Significance**, Chichester, New York: John Wiley and Sons, U.K., p. 36-41, 1985.

SOUZA, K. K.; SCUSSEL, V. M. Occurrence of Dogs and Cats Diseases Records in the Veterinary Clinics Routine in South Brazil and Its Relationship to Mycotoxins. **International Journal of Applied Science and Technology**, v. 2, n. 8, p. 129-134, 2012.

SOUZA, K. K.; SCUSSEL, V. M. Dogs and birds dry food fumonisin FB₁ and FB₂ contamination an their relation to ingredients an packaging characteristics. **Research Journal of Biological Sciences**, v. 8, n. 1, p. 22-29, 2013.

SYLOS, C.M.; RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Estudo comparativo de métodos para determinação de aflatoxina M1. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 56, p. 87-97, 1996.

SWEENEY, M.J.; DOBSON, A.D.W. Mycotoxin production by *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium* species. **International Journal of Food Microbiology**, v. 43, p. 141–158, 1998.

TANIWAKI, M. H.; SILVA, N. **Fungos em alimentos: ocorrência e detecção**. Campinas: ITAL, Núcleo de microbiologia, 2001. 82p.

TRAN, S. T.; TARDIEU, D.; AUVERGNE, A.; BAILLY, J. D.; BABILÉ, R.; DURAND, S.; BENARD, G; GUERRE, P. Serum sphinganine and the sphinganine to sphingosine ratio as a biomarker of dietary fumonisins during chronic exposure in ducks. **Chemico-Biological Interactions**, v. 10, n. 1, p. 41-50, 2006.

UENO, Y.; AOYAMA, S.; SUGIURA, Y.; WANG, D. S.; LEE, U. S.; HIROOKA, E. Y.; HARA, S.; KARKI, T.; CHEN, G.; S-Z, Y. A limited survey of fumonisins in corn and corn-based products in Asian countries. **Mycotoxin Research**, v. 9, p. 27-34, 1993.

WONG, Z. A, HSIEH, D. P. H. Aflatoxicol, major aflatoxin B₁ metabolite in rat plasma. **Science**. v. 200, p. 325-7, 1978.

YU, J.; BHATNAGAR, D.; EHRLICH, K.C. Aflatoxin biosynthesis. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v. 19, p. 191-200, 2002.

ZINEDINE, A.; SORIANO, J.N.; MOLTO, J.C.; MAÑES, J. Review on the toxicity, occurrence, metabolism, detoxification, regulations and intake of zearalenone: An oestrogenic mycotoxin. **Food and Chemical Toxicology**, v. 45, p. 1–18, 2007.

ZLOTOWSKI, P.; CORREA, A.M.R.; ROZZA, D.B.; DRIEMEIER, D.; MALLMANN, C.A.; MIGLIAVACCA, F.A. Surto de aflatoxicose em suínos nos Estados do Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 24, n. 4, p. 207-210, 2004.

ZWIERZCHOWSKI, W.; GAJECKI, M.; OBREMSKI, K.; ZIELONKA, L.; BARANOWSKI, M. The occurrence of zearalenone and its derivatives in standard and therapeutic feeds for companion animals. **Polish Journal Veterinary Science**, v. 7, p. 289-293, 2004.

ANEXOS

ANEXO A: Normas para submissão do artigo no periódico World Mycotoxin Journal.



Instructions for authors of World Mycotoxin Journal

Submitting a paper to World Mycotoxin Journal

Submit your paper via internet through the Journal Webpage (<http://www.WorldMycotoxinJournal.org>) which contains our link to Manuscript Central. New authors are requested to create an account on the site before submitting the manuscript. An online user guide is accessible from the Manuscript Central site.

If you are unable to submit your manuscript via internet you can contact the editorial office. Contributions to World Mycotoxin Journal must be original (research) and will be subject to peer review.

Submitted papers must follow the authors guidelines to be considered for review and publication. Refereeing of

papers is conducted anonymous and the identity of the referees is not disclosed.

Submission of a manuscript implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or thesis), that it is not under consideration for publication

elsewhere. The publication must be approved by all authors and tacitly by the institute where the work was carried out.

Authors are encouraged to submit a manuscript to World Mycotoxin Journal in any of the following categories:

- **Research articles (peer reviewed)**

A full length report of original research with added value to mycotoxin research or policy. A research article

must be provided with abstract, keywords, introduction, and when applicable materials and methods, results,

discussion and reference list. A research article has a length between 8 and 10 pages in the Journal.

- **Short communications (peer reviewed)**

Short original research articles, rapid publications, as well interesting case reports worth publishing but with less body than for a full length report. A short communication must be provided with abstract, keywords, introduction, and when applicable materials and methods, results, discussion and reference list. A short communication should not exceed 4 pages in the Journal.

- **Review article (peer reviewed)**

Review articles provide a focused, current discussion of a scholarly topic relevant to mycotoxins. A review article contains an overview of current research in the field, supplies links between research areas, discusses and provides new ideas and possibilities for further research. It contains an extensive reference list.

Proposals to reviews should be submitted to a Section Editor or the Editor in Chief prior to preparation. A review article has a length between 10 and 15 pages in the Journal.

- **Short review (peer reviewed)**

Short review articles are identical to the larger review articles, except that they are devoted to a smaller subject of mycotoxin research. Proposals for short reviews should be submitted to the appropriate Section Editor prior to preparation. A short review has a length between 4 and 8 pages in the Journal.

- **Letter to the editor**

A letter to the editor provides a means to react to published articles. They should be received within 3 months of the mailing of the journal and should not exceed one page. Introduction of new data will not be permitted. Each letter will be submitted to the author of the original paper so that any reply may be published simultaneously with the letter.

- **Opinion paper**

Articles especially focused on policy and policy makers. How mycotoxin research is or should be translated into health and safety regulation issues, as well as critical commentaries on mycotoxin policy statements and regulations. An opinion paper has a maximum length of 4 pages in the Journal and must contain a reference list.

- **Hypothesis paper (peer reviewed)**

A hypothesis paper is both speculative and innovative. It contains ideas, hypotheses and theories, but hard evidence for them is yet lacking. It should motivate to start new paths of research and further thinking. A hypothesis paper has a length between 4 to 6 pages and must contain a reference list.

- **Book review**

A book review is a condensed 1-page discussion of a recently published book on subjects broadly relevant to mycotoxin research and policy. The reviewer gives his comments on the relevance and contents of the book. Book title, author(s)/editor(s), publisher, ISBN and price are given as well.

- **Curriculum vitae**

When a renowned scientist in the field of mycotoxin research retires, wins a prestigious prize or dies, the Journal can devote an article on his/her scientific career and most important achievements. Proposals for a curriculum vitae should be submitted to the Editor-in-chief prior to preparation. A curriculum is between 2 and 4 pages in the Journal and contains a reference list with selected publications of the scientist.

Submitting events for World Mycotoxin Journal Agenda

The events agenda in World Mycotoxin Journal will provide an overview of the important international and national mycotoxin conferences, seminars and meetings world wide, announcements of international projects, as well as mycotoxin-related courses and events. Conference and workshop organisers, as well as project leaders are encouraged to submit their information to the editorial office of the journal.

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to transfer copyright to the publisher. After copyright transfer, the paper may not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, without the written consent of the publisher. If excerpts from other copyrighted works are included in the manuscript, the author(s) must obtain written permission from the copyright owner(s).

Your Choice for Open Access

Authors whose manuscripts have been accepted for publication have the option to pay a one-off fee of 1800 Euro to make their article free to read online, i.e. 'Open access' at the journal content website. Choosing this option also allows authors to post the publishers PDF-version of their article in an institutional or subject repository immediately upon publication.

Reprints and pdf

Corresponding authors will receive the issue of 'World Mycotoxin Journal' in which their manuscript appears, as well as a pdf of their article, which can be printed and distributed upon specific request by colleagues. The pdf may not be systematic distributed or posted on a website (see CTA for specific details). Authors can order reprints of their article prior to (printed) publication. If you are interested (minimum order is 100 copies), please notify us in the stage of proof reading. The costs for reprints are 5 Euro per copy and include postage.

Page charges

There are no page charges to individuals or institutions.

Colour illustrations

World Mycotoxin Journal is published in black-and-white. Authors should restrict their use of colour to figures where it is necessary on scientific, and not merely cosmetic, grounds. Online publication of colour illustrations is free of charge. For colour in the print version, authors will be expected to make a contribution towards the extra costs. You will receive information regarding the costs from Wageningen Academic Publishers after receipt of your accepted article.

Language editing services

Prior to submission, authors who believe their manuscripts would benefit from professional editing, are encouraged to use a language-editing service experienced in scientific biosciences such as the ones available at the web sites or e-mail address given below. World Mycotoxin Journal does not take responsibility for or endorse these services and their use has no bearing on acceptance of a manuscript for publication.

- The language gap. Contact S. McElroy [thelanguagegap@gmail.com]
- <http://www.biomeditor.com/>
- <http://www.bostonbioedit.com/>
- <http://www.biosciencewriters.com/>
- <http://www.internationalscienceediting.com/>
- <http://www.sciencedocs.com/>
- <http://www.americanjournalexperts.com/>
- <http://www.bioscienceeditingsolutions.com>
- <http://www.bioedit.co.uk/>
- <http://www.enago.com>

Guidelines for authors of World Mycotoxin Journal

General

- Submit your manuscript as MS Word file.
- Use font Times New Roman 12, single spacing, A4 paper and 2.5 cm margins on all sides. Symbol font can be used for special characters.
- Indicate the type of manuscript. Your manuscript must contain title, author(s) and affiliation(s) and the requirements for the manuscript type (See the Table below).
- Your paper should be within the range of pages given for the type of manuscript (See the Table below).
Contact the editorial office if your manuscript exceeds the page range.
- Use British English spelling.
- The maximum size in Manuscript Central for your manuscript, including figures and additional files is 50 Mb. If you need more space please contact the editorial office.

Manuscript type	As a MS-word file	In the Journal	Manuscript should contain
			title, authors, affiliations +
Research articles	11-14 pages	8-10 pages	abstract, keywords, introduction, materials and methods, results, discussion and conclusion (combined or separate), acknowledgements (optional), references
Short communications	2-6 pages	1-4 pages	abstract, keywords, introduction, materials and methods, results, discussion and conclusion (combined or separate), acknowledgements (optional), references
Review article	14-20 pages	10-15 pages	abstract, keywords, introduction, several subject sections, acknowledgements (optional), references
Short review	6-11 pages	4-8 pages	abstract, keywords, introduction, subject sections, acknowledgements (optional), references
Letter to the editor	2 pages	1 page	original article title and authors, commentary text, references
Hypothesis paper	6-8 pages	4-6 pages	abstract, keywords, introduction, subject sections, acknowledgements (optional), references
Opinion paper	2-6 pages	2-4 pages	abstract, keywords, introduction, subject sections, acknowledgements (optional), references
Book review	2 pages	1 page	book name, authors and publisher, review text

Manuscript heading

- Title: bold, sentence case, 14 pt Times New Roman.
- Authors: italic, all sentence case. Use initials for the first names of the authors.
- Affiliations: italic, all sentence case; affiliations include the full address of all authors and including the email address of the corresponding author.

Abstract and keywords

- The abstract should be clear on itself and not containing more than 300 words.
- Use 3-5 keywords (do not repeat any of the words of the title of the manuscript). Keywords should be lowcase, separated by a comma.

Text

- Use a maximum of two heading levels:
 - o Level 1: Boldface, sentence case.
 - o Level 2: Italic, sentence case.
- Italics should be used for Latin expressions, e.g. species names like *Aspergillus* and words like *in vivo*.
- Commas are used for numbers greater than 1,000. Ordinal numbers less than 10 are preferably spelled out.

Periods are used for decimals. Use a 0 before the decimal point for numbers below 1 (e.g. 0.005).

- Authors should use SI units. Units should be given as kg/ha rather than kg ha⁻¹.
- Abbreviations should be used for all units and numerical values should be given in figures except where the number begins a sentence. Other abbreviations should be given in full where first mentioned in the main text and are followed by the abbreviation in parentheses. A list of mycotoxin abbreviations used in World

Mycotoxin Journal can be found at the end of this pdf.

- Manufacturer or supplier names and location (city and country) are given for special chemicals, software, equipment and other products.
- Use single quotation marks in the text.
- Numbered lists should be provided with Arabic numbers or lower case alphabet. Use a period after the number or letter (e.g. 1. or a.). Unnumbered lists should be provided with bullets.
- Do not indent paragraphs. Use the tab function to place words at a certain position in the text, not spaces.

Footnotes

- Footnotes should be avoided. If absolutely necessary, they should be numbered in the text, indicated by superscript numbers.

Appendices

- Appendices appear after the references.
- They must contain a title and should be numbered when more than one.
- They are referred in the text as Appendix A, B1, etc.

Tables

- Avoid large tables. Tables should fit within the journal size (maximum size per page 20x27 cm).
- Tables should be numbered in Arabic numbers according to their sequence in the text.
- Each table should have a title.
- The text should include reference to all tables. Use Table followed by the number in the text, not an abbreviation.
- Tables should be included in the text at the right place.
- Tables should be clear without reading the text. Column headings should be brief and clear.
- Any necessary explanations essential for understanding the table should be given as a footnote at the bottom of the table. Use either numbers or letters for footnotes.

Formulae and equations

- Formulae should be typewritten, if possible.
- Subscripts and superscripts should be clear.

- Give the meaning of all symbols immediately after the equation in which they are first used.
- Equations should be numbered in Arabic numbers serially at the right-hand side in parentheses.
- When referring to equations in the text use Equation followed by the number, not Eq.

Illustrations

- All illustrations should be black and white. Full colour illustrations will be converted to black & white in print. If coloured illustrations are needed in print you will receive information regarding the extra costs from the publisher. Online publication of colour illustrations is free of charge.
- Do not insert your illustrations in the Word.doc file, but submit them separately. **Never** submit illustrations as PowerPoint files, with the exceptions of cladograms or as PDF.
- If photographs are necessary, submit original photographs with good contrast and intensity. Sharp and glossy copies are required. Reproductions of photographs already printed can not be accepted.
- Resolution of photos and pictures should be at least 300 dpi. For line drawings use at least 900 dpi.
- Illustrations should be numbered in Arabic numbers according to their sequence in the text. The text should include reference to all illustrations. Use Figure followed by the number in the text, not Fig.
- Each illustration should have a title. Type this title in the text where the illustration should be placed.
- Any necessary explanations essential for understanding the figure should be given as a footnote at the bottom of the table. Use either numbers or letters for footnotes.

References

- References concerning submitted, but not yet accepted manuscripts, unpublished data or 'personal communications' should not be cited in the reference list, but may be mentioned in the text as (unpublished data) or (Initials + Family name, personal communications).
- Work accepted for publication, but not yet published or first published online should be referred to as 'in press'. If possible provide a DOI for these manuscripts.
- In the text, refer to the author's name (without initials) and year of publication. Publications from the same authors in a single year should use a, b, etc.
- If reference is made to a publication written by more than two authors, the name of the first author should be followed by '*et al.*'. Use 'and' and not '&' for two authors.
- References without an author should be referred as Anonymous.
- References cited together in the text should be arranged alphabetically.
- All publications cited in the text should be presented in an alphabetical list of references at the end of the manuscript (no numbering).

- The list of references should be arranged alphabetically by authors' names, and chronologically per author.
- All authors of each article should be mentioned in the reference list. Institutional authors, like World Health Organisation (WHO) or United States Department of Agriculture (USDA), should be written out in the reference list.
- Use full journal names for the references.
- For internet resources use the direct link to the website of the paper if possible. If a paper is undated use the date (year) of access.
- Use the following system for arranging your references (see also the reference list in the example research article):

a. *For periodicals:*

Shephard, G.S., Thiel, P.G., Stockenstrom, S. and Sydenham, E.W., 1996. Worldwide survey of fumonisin contamination of corn and corn-based products. *Journal of AOAC International* 79: 671-687.

Edwards, S.G., 2009. *Fusarium* mycotoxin content of UK organic and conventional oats. *Food Additives and Contaminants part A*, in press. DOI 10.1080/02652030902788953
 Anonymous, 1999. Testing urged if feeding stunted crops to animals. *New York Times* August 21, 1999.

b. *For books:*

Van der Meulen, B. and Van der Velde, M., 2008. *European food law handbook*. Wageningen Academic Publishers, Wageningen, the Netherlands, 640 pp.

Barug, D., Bhatnagar, D., Van Egmond, H.P., Van der Kamp, J.W., Van Ossenbruggen, W.A. and Visconti, A. (eds.), 2006. *The mycotoxin factbook, food and feed topics*. Wageningen Academic Publishers, the Netherlands, 384 pp.

c. *For multi-author books and conference proceedings:*

Wu, F., Miller, J.D. and Casman, E.A., 2005. Bt corn and mycotoxin reduction: an economic perspective. In: Abbas, H.K. (ed.) *Aflatoxin and food safety*. Taylor and Francis, New York, USA, pp. 459-482.

Bacon, C.W. and Hinton, D.M., 2000. Biological control of *Fusarium moniliforme* in corn by competitive exclusion using *Bacillus mojaveensis*. In: USDA-ARS (ed.) *Proceedings of the aflatoxin/fumonisin workshop*. October 25–27, 2000. Yosemite, CA, USA, pp. 35-37.

d. *For internet resources:*

World Health Organisation, 2004. *Surveillance programme for control of foodborne infections and intoxications in Europe. Seventh report. The 1993–1998 Country reports*. Available at: [http://www.bgvv.de/internet/7th report/threp fr.htm](http://www.bgvv.de/internet/7th%20report/threp%20fr.htm). Accessed 7 July 2004.

List of used mycotoxin abbreviations in World Mycotoxin Journal

Full mycotoxin name	Abbreviation	Full mycotoxin name	Abbreviation
<i>Aflatoxins</i>		<i>Ochratoxins</i>	
Aflatoxin B ₁	AFB ₁	Ochratoxin A	OTA
Aflatoxin B ₂	AFB ₂	Ochratoxin B	OTB
Aflatoxin G ₁	AFG ₁		
Aflatoxin G ₂	AFG ₂	<i>Trichothecenes</i>	
Aflatoxin M ₁	AFM ₁	Deoxynivalenol	DON
		Diacetoxyscirpenol	DAS
<i>Alternaria toxins</i>		Fusarenone X	FUS-X
AAL-toxin TA	AAL-toxin TA	HT-2 toxin	HT-2
Alternariol	AOH	Nivelenol	NIV
Alternariol methyl ether	AME	T-2 toxin	T-2
Altermuene	ALT		
Altertoxin I, II and III	ALTX-I, ALTX-II and ALTX-III	<i>Zearalenone and variants</i>	
Tetramic acid derivates	TeA	Zearalenone	ZEA (not ZON or ZEN)
		α -Zearalenol	α -ZOL
<i>Epipolythiodioxopiperazines</i>		β -Zearalenol	β -ZOL
Gliotoxin	GLI	Zearalanol	ZAL (α -ZAL and β -ZAL)
<i>Fumonisin and variants</i>		<i>Other mycotoxins</i>	
Fumonisin B ₁	FB ₁	Citrinin	CIT
Fumonisin B ₂	FB ₂	Cyclopiazomic acid	CPA
Fumonisin B ₃	FB ₃	Patulin	PAT
<i>o</i> -phthalaldehyde	OPA	Fusarochromanone	FCH

ANEXO B: Parecer do Comitê de Ética em Experimentação Animal.



COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL

OF. CIRC. CEEA Nº 35/2010

Londrina, 24 de abril de 2010.

Prezada Pesquisadora

O CEEA/UEL, reunido em 13 de abril do ano corrente, avaliou o projeto de pesquisa intitulado "**Estudo de caso-controle em neoplasia mamária canina e a associação com a micotoxina Zearalenona em tecido mamário neoplásico e ração comercial**", registrado no CEEA sob o nº 13/10, pesquisa do centro de Ciências Agrárias, desenvolvido sob sua responsabilidade, julgando-o *aprovado* para execução por entender que os princípios éticos postulados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal estão respeitados.

Serão utilizadas fêmeas caninas adultas e idosas, sendo colhidas amostras de 88 com tumor de mama e 176 que serão o controle, porém atendidas por outros motivos no Hospital Veterinário da UEL. Será realizado um questionário epidemiológico com variáveis, contendo dados como nome do paciente, nome do proprietário, idade do paciente, raça, se aplicou contraceptivo alguma vez, histórico de ovariectomia, idade do primeiro cio, idade do primeiro parto e número de gestações, aplicado aos proprietários dos animais em estudo. Todos os animais que fizerem parte do estudo e se alimentarem de ração, terão amostras colhidas para análise e pesquisa de zearalenona, aflatoxina B1 e M1. Dos animais com câncer serão coletadas amostras dos nódulos mamários para realização de exames citológico, histopatológico e imunohistoquímicos. O projeto está previsto para ser desenvolvido entre junho de 2010 e maio de 2012. Este comitê sugere a avaliação de micotoxina no tecido mamário.

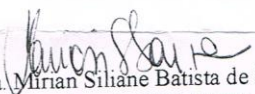
Ilma. Sra.
Profa. Dra. Roberta Lemos Freire
Coordenadora do Projeto
Departamento de Medicina Veterinária Preventiva
Centro de Ciências Agrárias



Cumpre orientar que caso se pretendam quaisquer alterações no protocolo experimental aprovado, deve-se submeter o novo protocolo à apreciação do CEEA/UEL anteriormente à execução das modificações.

Sem mais para o momento, subscrevo-me.

Cordialmente,


Profa. Dra. Mirian Siliâne Batista de Souza
Coordenadora do CEEA/UEL