



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

LUCAS YAMASAKI BISSOQUI

**AVALIAÇÃO DO RISCO DE EXPOSIÇÃO DE CÃES À  
CONTAMINAÇÃO NATURAL POR MICOTOXINAS**

---

Londrina  
2012

LUCAS YAMASAKI BISSOQUI

**AVALIAÇÃO DO RISCO DE EXPOSIÇÃO DE CÃES À  
CONTAMINAÇÃO NATURAL POR MICOTOXINAS**

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

Orientador: Profa. Dra. Elisabete Yurie Sataque Ono.

Londrina  
2012

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

**Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)**

B623a Bissoqui, Lucas Yamasaki.  
Avaliação do risco de exposição de cães à contaminação natural em  
micotoxinas / Lucas Yamasaki Bissoqui. – Londrina, 2012.  
104 f. : il.

Orientador: Elisabete Yurie Sataque Ono  
Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de  
Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em  
Biotecnologia, 2012.  
Inclui bibliografia.

1. Micotoxinas – Teses. 2. Ração – Teses. 3. Agricultura Canine – Teses.  
4. Co-contaminação – Teses. 5. Risco de exposição – Teses. I. Ono, Elisabete  
Yurie Sataque. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências  
Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. III.  
Universidade Estadual de Londrina. IV. Título.

CDU 663.1:636.085

LUCAS YAMASAKI BISSOQUI

**AVALIAÇÃO DO RISCO DE EXPOSIÇÃO DE CÃES À  
CONTAMINAÇÃO NATURAL POR MICOTOXINAS**

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

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Elisabete Yurie Sataque Ono  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Roberta Lemos Freire  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Tereza Cristina Rocha Moreira de  
Oliveira  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 13 de abril de 2012.

Dedico este trabalho a Deus pelo dom da vida, a Jesus Cristo por me libertar e salvar e ao Espírito Santo que um dia me convenceu do pecado, da justiça e do juízo.

Agradeço aos meus familiares: ao meu pai Jubrair, à minha mãe Maria, à minha irmã Jéssica e ao meu irmão Matheus, pelo amor, apoio e ajuda no momento mais difícil da minha vida

## AGRADECIMENTOS

À Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Elisabete Yurie Sataque Ono pela orientação, diálogo e confiança, assim como pelo respeito, apoio e ensinamentos indispensáveis para a realização desse trabalho.

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

À Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Elisa Yoko Hirooka pelo apoio.

À Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Roberta Lemos Freire pela colaboração.

Ao Prof. Dr. Osamu Kawamura (Kagawa University/Japan) pela colaboração.

À Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Eiko Nakagawa Itano pela colaboração.

Às professoras Dr<sup>ª</sup>. Tereza Cristina Rocha Moreira de Oliveira e Margarida Masami Yamaguchi que estiveram presentes na banca de qualificação e contribuíram com este trabalho.

Aos professores do Programa de Mestrado em Biotecnologia, pelo auxílio e colaboração em diversos aspectos.

À Doutoranda Michele Salmon Frehse do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva pela disponibilização das amostras de ração destinada a cães, ajuda e amizade.

Aos funcionários do Departamento de Bioquímica e Biotecnologia (BBTEC/UEL): Nelson Rodriguez, Elda Aguiar, Sílvia Borba, Sérgio Evangelista, Sandra Aparecida Defende pela amizade, colaboração e ajuda.

Agradeço o acolhimento, apoio e sugestões das minhas veteranas e companheiras de micotoxinas: Carolina Nachi Rossi e Aline Francisca de Souza.

Aos amigos do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos (DCTA/UEL), Thiago Souza, Angélica Ishikawa, Lygia Martins, Cássia Reika Takabayashi e Patrícia Sambatti, pela amizade e colaboração.

Aos amigos, colegas de curso, de laboratório e estagiários, Bruna Caroline M. Gonçalves, Valéria Stefania Lopes, Gesiele A. Barros de Carvalho, Rebeca Fuzzinato Dall Agnol, Arthur Fernandes Siqueira, Luciano Nobuhiro Aoyagi, Renata Ferreira Colli Baldini, Danielle Camelo Cardoso, Paulo Ricardo Marcelino, Leonardo Alves Cardoso, Alessandra Gasperini, Ana Carolina Corazza de Souza, Andressa Lofrano, Thaís Lemes, Thiago Zaninelli, Marina Montilha, Melissa Sbroggio, Luciane Thalísie Casagrande, Ismael Amador,

Emilyn Matsumura, Ana Elisa Vercelheze e Adriana Petri pela amizade e companheirismo no decorrer do curso e no dia-a-dia.

Aos amigos e amigas de estudo bíblico na sala do HPLC: Jaqueline Gozzi Bordini, Patrícia Bittencourt da Silva, Gervásio Hitoshi Saito, Emilyn Matsumura, Flávia Debiaggi, Nelson Januário, Tiago Andrade Marques, Karita dos Reis Costa, Danille Camelo Cardoso, Vinícios, Wallace e Prof. João Buzzato, que vocês possam perseverar nesse caminho.

Aos meus tios, Paulo Barreto e Tokiko Yamasaki Barreto, e primas Marisa Barreto e Lídia Yamasaki Barreto pela compreensão, apoio, força e acolhimento na cidade de Londrina. Graças a vocês tive condição de me preparar para a seleção do mestrado e iniciar este trabalho.

Aos amigos e casais, Alexandre e Thalita Rodrigues, Cristiano e Daniela Kreuscher, Rosan e Angela Souza, pela força e alegria, assim como aos integrantes do Ministério de Comunicação da Igreja Metodista Central de Londrina pelo intenso aprendizado.

Aos meus pastores, Fernando Cesar Monteiro, Don Carlo Rodrigues Reina e Reinaldo Asth de Oliveira, pelo companheirismo e direção espiritual nesta caminhada.

À minha esposa Sheila por suas orações, por sempre me apoiar, ouvir, incentivar, e às vezes criticar quando necessário. Obrigado pela paciência, pelo suporte, pela atenção e dedicação neste período de intensa atividade. Sempre presente na elaboração e execução deste trabalho. Benção de Deus para mim!

A todos que colaboraram para a realização deste trabalho.

“Reconhecer a ignorância torna-se, então, o outro lado da obrigação do saber, e com isso torna-se uma parte da ética que deve instruir o autocontrole, cada vez mais necessário, sobre o nosso excessivo poder”.

*Hans Jonas (1903 – 1993)*

“Há caminho que ao homem parece direito,  
mas ao cabo dá em caminhos de morte”.

*Provérbios 14:12*

BISSOQUI, L. Y. **Avaliação do risco de exposição de cães à contaminação natural por micotoxinas.** 2012. 104f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2012.

## RESUMO

O Brasil possui a segunda maior população de cães (34,3 milhões) e gatos (18,3 milhões) do mundo, sendo que em 2010 o consumo de ração para animais de companhia foi de aproximadamente 1,83 milhões de toneladas, movimentando um total de R\$ 7,26 bilhões de reais. Portanto, é necessário avaliar não apenas a composição nutricional da ração, mas a sua inocuidade com o monitoramento, entre outros contaminantes, das micotoxinas. Micotoxinas são metabólitos secundários tóxicos produzidos por fungos filamentosos que podem contaminar naturalmente os cereais utilizados como matéria prima na fabricação de ração destinada a cães. Além de prejuízos financeiros, a contaminação natural da ração por uma ou mais micotoxina pode gerar efeitos tóxicos sinérgicos ou aditivos. No Brasil e no mundo são poucos os trabalhos que relatam a ocorrência de micotoxinas em ração destinada a cães e a avaliação do nível de exposição desses animais. Dessa forma, o objetivo deste estudo foi analisar a ocorrência de fumonisinas, zearalenona e aflatoxinas em 100 amostras de ração destinada a cães coletadas na residência do proprietário do animal na região norte do Estado do Paraná, no período de dezembro 2010 a dezembro 2011, assim como avaliar o risco de exposição desses animais a essas micotoxinas. As concentrações de fumonisinas, zearalenona e aflatoxinas foram determinadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) sistema isocrático de fase reversa. A exposição de cães a micotoxinas foi avaliada por meio da estimativa de parâmetros como a ingestão diária aceitável (ADI) e o nível seguro na dieta animal (SPDL) de fumonisinas, zearalenona e aflatoxinas. Fumonisinas, zearalenona e aflatoxinas foram detectadas em 68, 95 e 68% do total de amostras, com níveis que variaram de 0,03 a 0,38  $\mu\text{g.g}^{-1}$  (média = 0,12  $\mu\text{g.g}^{-1}$ ), 5,45 a 442,24  $\text{ng.g}^{-1}$  (média = 49,20  $\text{ng.g}^{-1}$ ) e 0,34 a 3,88  $\text{ng.g}^{-1}$  (média = 1,54  $\text{ng.g}^{-1}$ ), respectivamente. Em 80, 86 e 90% das amostras os níveis de fumonisinas, zearalenona e aflatoxinas foram inferiores a 0,2  $\mu\text{g.g}^{-1}$ , 80  $\text{ng.g}^{-1}$  e 2,0  $\text{ng.g}^{-1}$ , respectivamente, entretanto a co-contaminação por diferentes micotoxinas, e a possibilidade de efeitos sinérgicos e aditivos, deve ser levada em consideração. Neste estudo a co-contaminação por duas ou três micotoxinas foi detectada em 50 a 68% do total de amostras. A frequência de contaminação por fumonisinas, zearalenona e aflatoxinas foi alta, porém os níveis médios detectados são considerados baixos, uma vez que, a provável ingestão diária (1,823  $\mu\text{g}$  fumonisinas/Kg peso animal/dia, 0,936  $\mu\text{g}$  zearalenona/Kg peso animal/dia e 0,024  $\mu\text{g}$  aflatoxinas/Kg peso animal/dia) em comparação com os níveis de ingestão diária aceitável (ADI) e o nível seguro na dieta animal (SPDL) foram baixos. Assim sendo, o risco de exposição de cães alimentados com as rações analisadas pode ser considerado baixo e a ração segura quanto à presença dessas micotoxinas. No entanto, considerando que as micotoxinas constituem um problema difícil de evitar e que a co-contaminação pode produzir uma potencialização dos efeitos tóxicos, o monitoramento da cadeia de produção é essencial para avaliar os riscos de exposição animal. Os resultados indicam a necessidade de uma legislação específica de micotoxinas que atenda os critérios de segurança para animais de companhia, assim como, a adoção de medidas de prevenção e monitoramento da contaminação natural no processo de fabricação da ração.

**Palavras-chave:** Micotoxinas. Ração. Canine. Co-contaminação. Risco de exposição.

BISSOQUI, L. Y. **Evaluation of dogs exposure degree to fumonisins, zearalenone and aflatoxins contamination in Brazil.** 2012. 104f. Dissertation (Master in Biotechnology) – State University of Londrina, Londrina. 2012.

### ABSTRACT

Brazil has the second largest population of dogs (34.3 million) and cats (18.3 million) in the world, and in 2010, consumption of feed for dogs and cats was 1.83 million tons, which accounted for \$4.34 billion in Brazil. Therefore, it is necessary to evaluate not only the nutritional composition of dog feed but the sanitary conditions concerning mycotoxins contamination. Mycotoxins are toxic secondary metabolites produced by filamentous fungi which can naturally contaminate the grains used as feedstock for feed production intended for dogs. In addition to economic losses, natural contamination of feed by one or more mycotoxins can cause toxic effects on animal health, however, the co-occurrence can cause additive effects. In Brazil and in the world there are few data about the occurrence of mycotoxins in dog feed and about exposure assessment of dogs to mycotoxins. Thus, the objective of this study was to analyze the occurrence of fumonisins, zearalenone and aflatoxins in 100 dog feed samples collected at the dog's owner house in the northern region of Paraná State, from December 2010 to December 2011, as well as assess the exposure degree of animals to these mycotoxins. Fumonisin, zearalenone and aflatoxin concentrations were determined by reversed-phase isocratic high performance liquid chromatography (HPLC). The exposure degree of dogs to mycotoxins were estimated by acceptable daily intake (ADI) and safe pet dietary level (SPDL) for fumonisins, zearalenone and aflatoxins in dog feed. Fumonisin, aflatoxins and zearalenone were detected in 68, 95 and 68% of the samples, with levels ranging from 0.03 to 0.38  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  (mean = 0.12  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ), from 5.45 to 442.24  $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$  (mean = 49.20  $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ ) and from 0.34 to 3.88  $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$  (mean = 1.54  $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ ), respectively. In 80, 86 and 90% samples fumonisins, zearalenone and aflatoxins levels were lower than  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ , 80  $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ , and 2.0  $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ , respectively, however mycotoxins co-contamination and the possible synergistic and additive effects must be taken into account. Co-occurrence of fumonisins, zearalenone and aflatoxins was detected in 50 to 68% of the total samples. Despite the high frequency of fumonisin, zearalenone and aflatoxin contamination in feed samples, the mean levels detected were low. Since the probable daily intake (1.823  $\mu\text{g}$  fumonisins/Kg body weight/day, 0.936  $\mu\text{g}$  zearalenone/Kg bw/day and 0.024  $\mu\text{g}$  aflatoxins/Kg bw/day) values in comparison with acceptable daily intake and safe pet food level were low, the exposure degree of dogs in northern Paraná State could be assumed to be low and, therefore, the feed sample were safe. However, taking into account that mycotoxin is a difficult problem to avoid and the co-occurrence of mycotoxins can cause potentiation of toxic effects, monitoring the production chain is essential to assess the risks to which animals are exposed. The results indicate the need for specific mycotoxin guidelines that meet the safety criteria for pets, as well as the adoption of preventive measures and monitoring of natural contamination in the feed manufacturing process.

**Keywords:** Mycotoxins. Feed. Canine. Co-contamination. Risk assessment.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b> - Estrutura química das principais fumonisinas.....	23
<b>Figura 2</b> - Estrutura química da esfinganina, esfingosina e fumonisina B <sub>1</sub> .....	25
<b>Figura 3</b> - Mecanismo de ação das fumonisinas .....	26
<b>Figura 4</b> - Estrutura química da zearalenona .....	27
<b>Figura 5</b> - Estrutura química (a) Zearalenona, (b) $\alpha$ -zearalenol ( $\alpha$ -zol), (c) $\beta$ -zearalenol ( $\beta$ -zol).....	28
<b>Figura 6</b> - Provável via biossintética da zearalenona.....	29
<b>Figura 7</b> - Estrutura geométrica da AFB <sub>1</sub> .....	32
<b>Figura 8</b> - Estrutura química das aflatoxinas AFB <sub>1</sub> , AFB <sub>2</sub> , AFG <sub>1</sub> , AFG <sub>2</sub> .....	33
<b>Figura 9</b> - Via biossintética das aflatoxinas .....	34
<b>Figura 10</b> - Formação de AFB <sub>1</sub> -8,9-epóxido .....	35
<b>Figura 11</b> - Representação esquemática de possíveis mecanismos de toxicidade pela inibição de serina-proteases por AFB <sub>1</sub> .....	36
<b>Figura 12</b> - (1) Fotografia de um fígado em cão .....	38
<b>Figura 13</b> - Fluxograma de determinação de fumonisinas em ração .....	45
<b>Figura 14</b> - Fluxograma de extração de zearalenona .....	46
<b>Figura 15</b> - Determinação de zearalenona em ração .....	47
<b>Figura 16</b> - Fluxograma de extração de aflatoxinas.....	48
<b>Figura 17</b> - Fluxograma de determinação de aflatoxinas.....	49
<b>Artgo:</b>	
<b>Figura 1</b> - Distribution of fumonisins levels (FB <sub>1</sub> + FB <sub>2</sub> ) in 100 feed samples intended for dogs.....	76
<b>Figura 2</b> - Distribution of zearalenone levels in 100 feed samples intended for dogs .....	77
<b>Figura 3</b> - Distribution of aflatoxin levels in 100 feed samples intended for dogs.....	78

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Legislação para micotoxinas em pet food .....	42
---	----

### **Artigo:**

<b>Tabela 1</b> - Water activity, fumonisin, zearalenone and aflatoxin levels in 100 feed samples intended for dogs .....	75
<b>Tabela 2</b> - Fumonisin, zearalenone and aflatoxin co-occurrence in 100 feed samples intended for dogs from Northern Paraná State, Brazil, 2011 .....	79
<b>Tabela 3</b> - Probable daily intake of mycotoxins in dog feed, acceptable daily intake (ADI) and safe pet dietary level (SPDL), Northern Parana State, Brazil, 2011 .....	80

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADI	(Acceptable daily intake): Ingestão diária aceitável
AF	Aflatoxinas
ANFALPET	Associação Nacional de Fabricantes de Alimentos para Animais de Estimação
A <sub>w</sub>	(Water activity) Atividade de água
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
FB	Fumonisinias
FF	(Food factor) Fator alimentar
LOAEL	(Lowest observed adverse effect level) Menor nível em que é observado efeito adverso
NOAEL	(No observable adverse effect level) Nível em que não é observado efeito adverso
PDI	(Probable daily intake) Ingestão diária provável
SF	(Security factor) Fator de segurança
SPDL	( Safe pet dietary level) Nível de ingestão seguro
ZEA	Zearalenona

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	15
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	17
2.1	MERCADO DE PET FOOD NO BRASIL E NO MUNDO .....	17
2.2	MICOTOXINAS .....	20
2.2.1	Fumonisinias.....	21
2.2.1.1	Estrutura .....	22
2.2.1.2	Metabolismo .....	23
2.2.1.3	Toxicidade .....	24
2.2.2	Zearalenona .....	27
2.2.2.1	Estrutura .....	27
2.2.2.2	Biossíntese/Metabolismo.....	28
2.2.2.3	Toxicidade .....	29
2.2.3.1	Estrutura .....	32
2.2.3.2	Biossíntese/Metabolismo.....	33
2.2.3.3	Toxicidade .....	36
2.3	OCORRÊNCIA E CO-OCORRÊNCIA DE FUMONISINAS, ZEARALENONA E AFLATOXINAS EM MATÉRIA PRIMA E EM RAÇÕES DESTINADA A CÃES .....	38
2.4	MÉTODOS ANALÍTICOS PARA DETERMINAÇÃO DE MICOTOXINAS .....	40
2.5	LEGISLAÇÃO.....	40
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	42
3.1	OBJETIVO GERAL .....	42
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	42
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	43
4.1	AMOSTRAS DE RAÇÃO.....	43
4.2	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE ÁGUA .....	43
4.3	DETERMINAÇÃO DE FUMONISINAS .....	43
4.3.1	Extração de Fumonisinias.....	43
4.4	DETERMINAÇÃO DE ZEARALENONA .....	45
4.4.1	Extração de Zearalenona .....	45

4.4.2	Determinação de Zearalenona .....	46
4.5	DETERMINAÇÃO DE AFLATOXINAS .....	47
4.5.1	Extração de Aflatoxinas .....	47
4.5.2	Determinação de Aflatoxinas .....	48
4.6	ESTIMATIVA DA INGESTÃO DIÁRIA DE RAÇÃO, INGESTÃO DIÁRIA ACEITÁVEL (ADI) E NÍVEL SEGURO NA DIETA (SPDL): .....	49
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>51</b>
<b>6</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>81</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>82</b>
	<b>ANEXOS</b> .....	<b>94</b>
	ANEXO A - Termo de Consentimento Livre Esclarecido .....	95
	ANEXO B - Questionário Epidemiológico .....	96
	ANEXO C - Normas de publicação da revista Animal Science Food and Technology .....	98

## 1 INTRODUÇÃO

No Brasil, cães e gatos são os animais de estimação mais populares e frequentemente considerados como membros da família. De acordo com os dados da Associação Nacional dos Fabricantes de Produtos para Animais de Estimação (ANFALPET, 2011) o Brasil possui a segunda maior população de cães (34,3 milhões) e gatos (18,3 milhões) do mundo. Nos últimos anos houve um grande crescimento no segmento de animais de estimação e de rações no Brasil. Em 2010, o consumo de rações para cães e gatos (pet food) foi de 1,83 milhões de toneladas, movimentando cerca de 7,26 bilhões de reais (ANFALPET, 2011; ZANNI, 2011).

Em 2006 existiam mais de 300 marcas de rações registradas destinadas a cães no Brasil, sendo produzidas por mais de 70 fabricantes com preço e qualidade variáveis (CARCIOFI et al., 2006). No processo de fabricação de ração seca os ingredientes são misturados e submetidos a um tratamento térmico, denominado extrusão, que leva à redução da atividade de água, substâncias antimicrobianas, como ácidos orgânicos e antibióticos, também são adicionadas (CASE; CAREY; HIRAKAWA, 1998). O emprego em conjunto desses obstáculos é útil para prevenir o deterioramento e aumentar o tempo de vida de prateleira de produtos alimentícios pela inibição do crescimento microbiano (CHIRIFE; FAVETTO, 1992).

No Brasil, a recomendação nutricional para alimentos secos para cães adultos, em manutenção, é 12% de umidade (máximo), 16% de proteína bruta (mínimo), 4,5% de extrato etéreo (mínimo), 6,5% de fibra bruta (máximo), 12% de matéria mineral (máximo), 2,4% de cálcio (máximo) e 0,6% de fósforo (mínimo) (BRASIL, 2002). De modo geral, a qualidade das rações secas para cães comercializadas no Brasil é boa sob o ponto de vista nutricional, uma vez que atendem os limites máximos e mínimos de ingredientes estabelecidos pela legislação vigente (CARPIM; OLIVEIRA, 2009). No entanto, é necessário avaliar as condições sanitárias do produto, a fim de monitorar, entre outros contaminantes, a presença de micotoxinas.

As micotoxinas são metabólitos secundários tóxicos de baixa massa molecular produzidos por fungos filamentosos que se desenvolvem naturalmente em produtos agrícolas (PERAICA et al., 1999). Apresentam grande estabilidade química e térmica, e podem persistir no produto final mesmo após o processamento e industrialização da matéria-prima (CAST, 2003).

Alguns estudos relatam a co-contaminação de micotoxinas em ração destinada a cães, no entanto, é necessário avaliar o risco de exposição desses animais, uma vez que as micotoxinas podem apresentar efeitos sinérgicos ou aditivos (SPEIJERS; SPEIJERS, 2004).

A contaminação da ração por micotoxinas pode causar riscos à saúde animal alterando as funções hepática, renal, digestiva e reprodutiva de cães, além de prejuízos financeiros na cadeia produtiva de rações. É de suma importância que os fabricantes de pet food invistam em sistemas de gestão da qualidade na cadeia de produção, tais como Boas Práticas de Fabricação (BPF) e Análises de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC), o que poderia ser um diferencial de mercado.

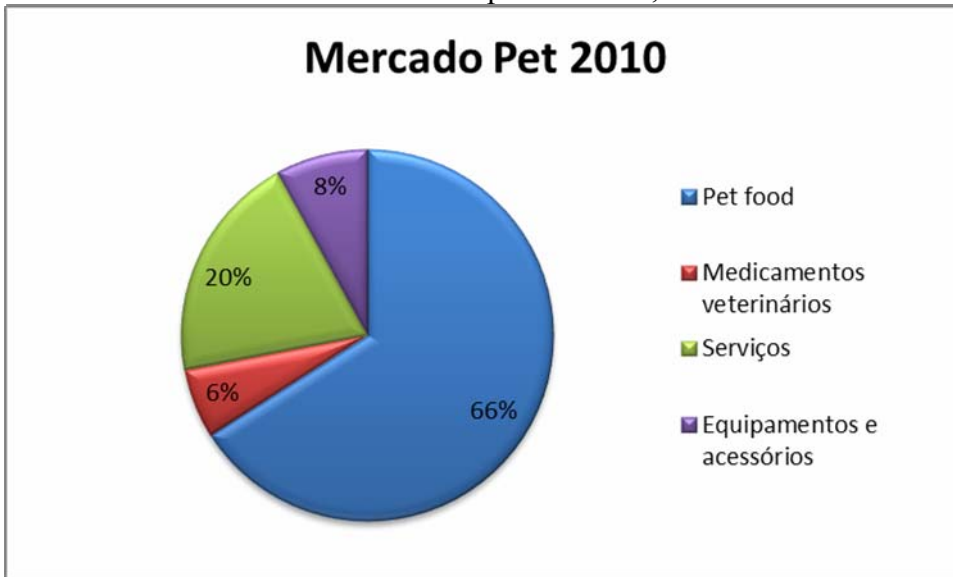
## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 MERCADO DE PET FOOD NO BRASIL E NO MUNDO

O vínculo ser humano-animal é muito antigo e estudos de fósseis mostram a existência de cães pré-históricos, identificados como cães paleolíticos, convivendo com o homem há 30 mil anos, e sugere que a domesticação de cães teria acontecido no período Aurignaciano (ELGIER, 2009; GERMOMPRES et al., 2009). Atualmente são reconhecidas mundialmente mais de 300 raças de cães domésticos, *Canis familiares*, por diversas entidades como American Kennel Club (AKC; <http://www.akc.org/>) e a Fédération Cynologique Internationale (FCI; <http://www.fci.be/presentation.aspx>).

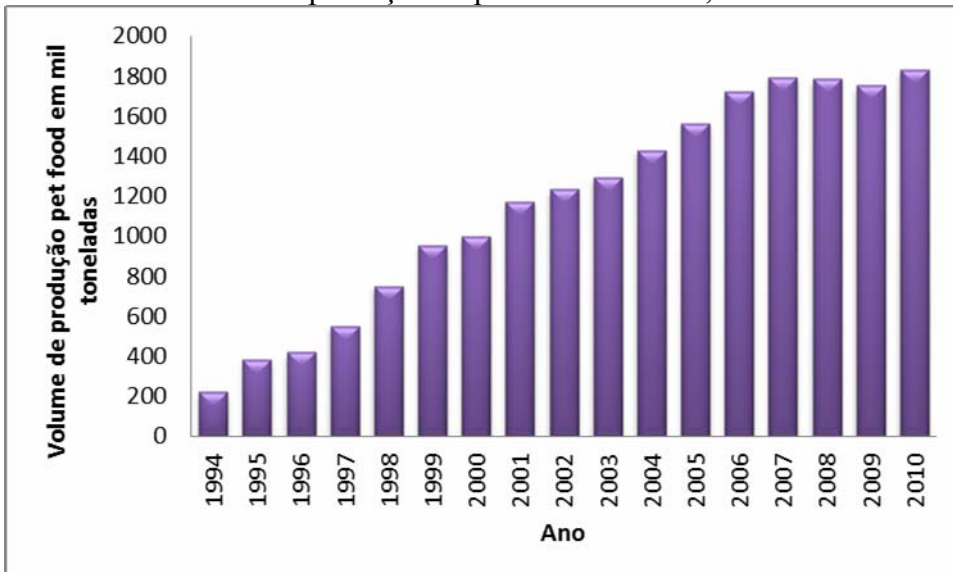
As espécies criadas e mantidas pelo homem em seu lar para seu entretenimento, sem propósito de fornecimento de produtos ou subprodutos de interesse econômico são considerados animais de estimação (PET) (BRASIL, 2009). No Brasil, cães e gatos são os animais de estimação mais populares e são frequentemente considerados como membros da família. De acordo com dados da Associação Nacional dos Fabricantes de Produtos para Animais de Estimação (ANFALPET, 2011), o Brasil possui a segunda maior população de cães (34,3 milhões) e gatos (18,3 milhões) do mundo.

O principal objetivo das rações é fornecer uma dieta que proporcione benefícios nutricionais, estéticos e de desempenho adequado às necessidades de cada animal. Em 2010, o mercado de alimentação animal cresceu 5%. Foram produzidos 61,4 milhões de toneladas de rações que movimentaram R\$ 33 bilhões em matérias primas. O consumo de rações para cães e gatos (pet food) foi de 1,83 milhões de toneladas ou 2,98% desse total (ZANNI, 2011). Em termos financeiros o mercado pet movimentou cerca de R\$ 11 bilhões no ano de 2010, dos quais R\$ 7,26 bilhões (66%) foram referentes à comercialização de alimentos destinados a esses animais (gráfico 1).

**Gráfico 1** - Faturamento do mercado pet no Brasil, 2010.

Fonte: ANFALPET (2011)

O mercado de rações é um segmento que apresentou um crescimento de 832,27% nos últimos 16 anos. De 1994 a 2010 a produção aumentou de 220 mil para 1,831 milhões de toneladas e de acordo com a ANFALPET (2011), em 2010, o Brasil apresentou uma produção recorde de 1,831 milhões de toneladas, um crescimento de 4,31% em relação ao ano de 2009 (gráfico 2). Além disso, do ano de 1998 a 2010 as importações brasileiras de pet food diminuíram de 13 para 4 milhões de toneladas, uma redução de 306%.

**Gráfico 2** - Volume de produção de pet food no Brasil, 1994 – 2010.

Fonte: ANFALPET (2011)

Uma das dificuldades do setor é a alta carga tributária (49,90%) em relação aos Estados Unidos (7%) e Europa (18,50%). Esse quadro na opinião de analistas é um

reduz o crescimento do segmento, uma vez que encarece o produto final, reduz a competitividade das exportações brasileiras e prejudica o acesso de milhões de compradores à linha de consumo (quadro 1) (ANFALPET, 2011; JÚNIOR; NOGUEIRA, 2011; ZANNI, 2011).

**Quadro 1 - Carga tributária direta sobre o faturamento de pet food, Brasil, 2011.**

<b>Imposto</b>	<b>Impostos Pecuários</b>	<b>Pet food</b>	<b>Alimento humano básico</b>
IPI	0%	10%	0%
PIS/CONFINS	9,25%	9,25%	0%
ICMS	Diferido (max. 6%)	18%	7%
<b>Total</b>	<b>15,25%</b>	<b>39,90%</b>	<b>7%</b>
Substituição tributária no ICMS	0%	10%	0%
<b>Total Geral</b>	<b>15,25%</b>	<b>49,90%</b>	<b>7%</b>

Fonte: ANFALPET (2011)

A nutrição é crítica para a saúde dos animais e, de um modo geral, as rações são compostas por subprodutos de origem animal como carnes e farinha de ossos, além de cereais como farelo de soja, arroz, trigo e/ou milho. O pet food pode ser composto por poucos ingredientes ou formulações específicas contendo mais de 50 ingredientes diferentes para o desenvolvimento de rações “superpremium” (quadro 2) (THOMPSON, 2008; JÚNIOR; NOGUEIRA, 2011).

**Quadro 2 - Classificação e características das rações para cães e gatos.**

<b>Standard</b>	<b>Premium</b>	<b>Super premium</b>
Rações balanceadas, entretanto a qualidade da proteína utilizada é inferior.	Possui um balanceamento ideal, entretanto, utiliza proteína vegetal em sua formulação.	São rações balanceadas com composição ideal para os animais. Elas são produzidas com 100% de proteína animal.
Necessário ingerir um volume grande de alimento para adquirir os nutrientes na quantidade necessária.	O volume ingerido necessário para nutrir o animal é menor, e conseqüentemente o volume das fezes e frequência das evacuações também.	Maior digestibilidade; quanto melhor a digestibilidade, mais fácil a assimilação e menor o volume das fezes e frequência das evacuações
Grande quantidade de palatáveis. Corantes e conservantes também são muito utilizados.	Contém conservantes, corantes e palatáveis.	Utilizam conservantes naturais, não contém corantes e palatáveis.

Fonte: Júnior e Nogueira, 2011

O mercado de rações do tipo premium, super premium e terapêuticas está em franco crescimento. Existe uma tendência de mercado em que os modelos de alimentação humana chegue ao mercado pet em forma de rações probióticas, vegetarianas, holísticas e terapêuticas (SILVEIRA, 2010). Dessa forma, a competitividade do setor é determinada pelo lançamento de novos produtos, popularização de alimentos funcionais, exploração de nichos de mercado orientados para determinadas raças, idades, estilo de vida e terapêutica (JÚNIOR; NOGUEIRA, 2011). Assim, é possível alimentar cadelas da raça Buldogue gestantes com uma ração enriquecida com ácido fólico para evitar que os filhotes nasçam com o palato aberto, como é tradicional da raça (PET FOOD BRASIL, 2010).

A estratégia de mercado da Royal Canin, líder de mercado premium e superpremium, é o investimento contínuo na segmentação do portfólio, sendo que dos 140 produtos do seu portfólio, 130 pertencem aos mercados premium e superpremium (PET FOOD BRASIL, 2010).

A fabricante brasileira Premier que há 15 anos atua nos segmentos premium e superpremium cresceu 30% nas vendas em 2009 e primeiro semestre de 2010, em comparação a um crescimento de 4% do setor. A empresa investiu R\$ 1,5 milhão em um laboratório de pesquisa e desenvolvimento e controle de qualidade (BRASIL ECONÔMICO, 2010).

Para o desenvolvimento de uma formulação alguns fatores devem ser analisados como os níveis de nutrientes, funcionalidade, palatabilidade, digestibilidade, disponibilidade e custo. Cada ingrediente deve ser seguro e resultar em um produto final seguro, uma vez que o setor é influenciado pelas decisões e capacidade de compra do consumidor e suas exigências em relação ao suprimento e segurança dos alimentos (ZANNI, 2011). O tema segurança de alimentos foi o destaque de duas edições da revista especializada Pet Food Brasil (2010; 2011), que chamavam a atenção para os prejuízos econômicos e ao desenvolvimento tecnológico do setor estimulado pela preocupação quanto à presença de micotoxinas em rações.

## 2.2 MICOTOXINAS

O termo micotoxina é uma combinação da palavra grega “*mykes*” para fungos e a palavra latina “*toxin*” que significa veneno, constituindo um termo genérico para descrever toxinas produzidas durante o crescimento fúngico (TURNER et al., 2009). As micotoxinas são metabólitos secundários tóxicos de baixa massa molecular produzidos por fungos filamentosos que se desenvolvem naturalmente em produtos agrícolas (PERAICA et

al., 1999). A contaminação desses produtos pode ocorrer desde o campo até as etapas de pós-colheita, transporte e armazenamento (CAST, 2003).

A presença de micotoxinas foi relatada em vários países e continentes, tanto em regiões de clima temperado como de clima tropical. Estima-se que a microbiota fúngica de cereais esteja em torno de 200.000 a 300.000 espécies, tendo sido identificadas mais de 400 micotoxinas (BETINA, 1984; LINO et al., 2004). A FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) estima que, em todo o mundo, cerca de 25% dos alimentos estejam contaminados por micotoxinas (WHO, 1991).

É importante destacar que o potencial tóxico das micotoxinas está associado à grande variabilidade de estruturas químicas que podem interagir de diversas maneiras com o sistema orgânico de homens e animais. As micotoxinas apresentam grande estabilidade térmica e química, e mesmo com todos os avanços e tecnologias disponíveis ainda não é possível assegurar que todos os alimentos e gêneros alimentícios estejam completamente isentos de micotoxinas.

As aflatoxinas, produzidas principalmente por *Aspergillus flavus* e *A. parasiticus*; e as fumonisinas e a zeralenona, produzidas por diversas espécies do gênero *Fusarium* constituem micotoxinas de grande interesse pelo seu impacto na saúde e nas indústrias de alimentos e rações (BINDER et al., 2007). O consumo de alimentos contaminados por micotoxinas pode induzir efeitos agudos e crônicos dependentes do nível de contaminação e toxicidade da micotoxina, tempo de exposição, espécie, idade e estado nutricional do organismo (BENNET; KLICH, 2003).

A presença de micotoxinas em rações comerciais para cães tem sido detectada por vários autores (GARLAND; REAGOR, 2000; SCUDAMORE et al., 1997; STENSKE et al., 2006). Essa contaminação pode representar uma importante ameaça para esses animais, uma vez que interferem nas funções hepáticas, renais, circulatórias e neurológicas, além da possibilidade de efeitos mutagênicos e carcinogênicos (LEUNG; DÍAZ-LLANO; SMITH, 2006). Somado a este quadro, a co-ocorrência de duas ou mais micotoxinas pode combinar a ação de efeitos tóxicos e potencializar a ação biológica em um organismo (SPEIJERS; SPEIJERS, 2004).

### 2.2.1 Fumonisinias

As fumonisinas (FB) constituem um grupo de micotoxinas produzidas principalmente por *F. verticillioides* e *F. proliferatum*, detectadas principalmente na cultura

do milho e alimentos à base de milho no Brasil e no mundo (BATATINHA et al., 2007; BROGGI et al., 2007; CORTEZ-ROCHA et al., 2003; MANOVA; MLADENOVA et al., 2009; MAZZANI et al., 2001; MORENO et al., 2009; OLIVEIRA, 2006; ONO et al., 2006).

Os níveis de fumonisinas em milho dependem de fatores ambientais como temperatura, umidade, condições de armazenagem e períodos de chuva na colheita e pós-colheita (BROGGI et al., 2007; ONO et al., 1999; 2008).

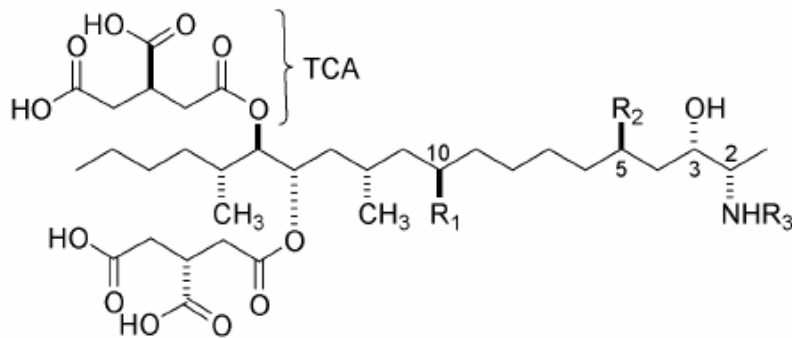
A ocorrência natural de FB<sub>1</sub> em milho na região de Transkei na África do Sul, foi relatada pela primeira vez em janeiro de 1990 por Sydenham et al. (1990). As fumonisinas podem causar grandes prejuízos financeiros, além de riscos à saúde humana e animal.

#### 2.2.1.1 Estrutura

As estruturas químicas das fumonisinas foram descritas em 1988 e as análises de espectrometria de massas e ressonância magnética revelaram as moléculas como sendo um diéster de propano 1, 2, 3-ácido tricarbóxico e 2-amino-12, 16-dimetil-3, 5, 10, 14, 15-pentahidroieicosano. Em todos os análogos tanto os grupos hidroxilas do C<sub>14</sub> quanto o do C<sub>15</sub> estão esterificados com o grupo carboxila terminal do ácido propano-1, 2, 3-tricarbóxico (BEZUIDENHOUT et al., 1988).

Desde 1988, foram identificados 28 análogos de fumonisinas que são divididos em quatro grupos principais, identificados como fumonisinas das séries A, B, C e P. No entanto, FB<sub>1</sub>, FB<sub>2</sub> e FB<sub>3</sub> são as mais abundantes como contaminantes naturais de milho e derivados, sendo a FB<sub>1</sub> detectada em percentagens mais elevadas (70 – 80%), FB<sub>2</sub> de 15 a 25% e FB<sub>3</sub> de 3 a 8% das fumonisinas totais (REEHDER et al., 2002).

Estruturalmente as FB<sub>2</sub> e FB<sub>3</sub> são homólogos da FB<sub>1</sub>, visto que falta um dos grupos hidroxilas no esqueleto carbônico. A FB<sub>2</sub> não possui o grupamento hidroxila na posição C<sub>10</sub>, enquanto a FB<sub>3</sub> não possui a hidroxila em C<sub>5</sub> (NELSON et al., 1993).

**Figura 1** - Estrutura química das principais fumonisinas.

	<b>R<sub>1</sub></b>	<b>R<sub>2</sub></b>	<b>R<sub>3</sub></b>
<b>FB<sub>1</sub></b>	OH	OH	H
<b>FB<sub>2</sub></b>	H	OH	H
<b>FB<sub>3</sub></b>	OH	H	H

Fonte: Humpf e Voss, 2004

A presença de grupos carboxilas e hidroxilas conferem polaridade às moléculas de fumonisinas, sendo solúveis em água e em solventes polares como metanol (MeOH) e acetonitrila (ACN) (KRSKA et al., 2007).

O tratamento térmico (cozimento, fritura, extrusão) em temperaturas entre 150 a 200°C pode reduzir as concentrações de fumonisinas em alimentos e rações em até 85%. No entanto, o efeito na redução depende da temperatura, tempo de processamento, pH, umidade, o tipo e a quantidade de carboidrato presente no alimento (BULLERMAN; BIANCHINI, 2007; HUMPF; VOSS, 2004).

Apesar de todos os avanços e tecnologias disponíveis ainda não é possível assegurar que todos os alimentos e gêneros alimentícios estejam completamente isentos de fumonisinas.

#### 2.2.1.2 Metabolismo

Estudos toxicocinéticos mostraram que as fumonisinas são muito pouco absorvidas no trato gastrintestinal, rapidamente eliminadas, ocorrendo pequeno acúmulo no fígado e rins (NORRED et al., 1996; VOSS et al., 2001). Após a administração de uma única dose de FB<sub>1</sub> (7,5 µg.g<sup>-1</sup>) por via intraperitoneal em ratos, o tempo de concentração máxima plasmática foi de aproximadamente 20 minutos e o tempo de meia vida de eliminação sérica de aproximadamente 18 minutos (VOSS et al., 2001). Em macacos, estudos toxicocinéticos demonstraram que a FB<sub>1</sub> apresenta baixa biodisponibilidade e uma curta meia vida de

eliminação. Os níveis séricos após uma dose oral atingem um máximo dentro de duas horas, diminuindo rapidamente em níveis abaixo do limite de detecção (VAN DER WESTHUIZEN; SHEPARD; VAN SCHALKWYK, 2001).

### 2.2.1.3 Toxicidade

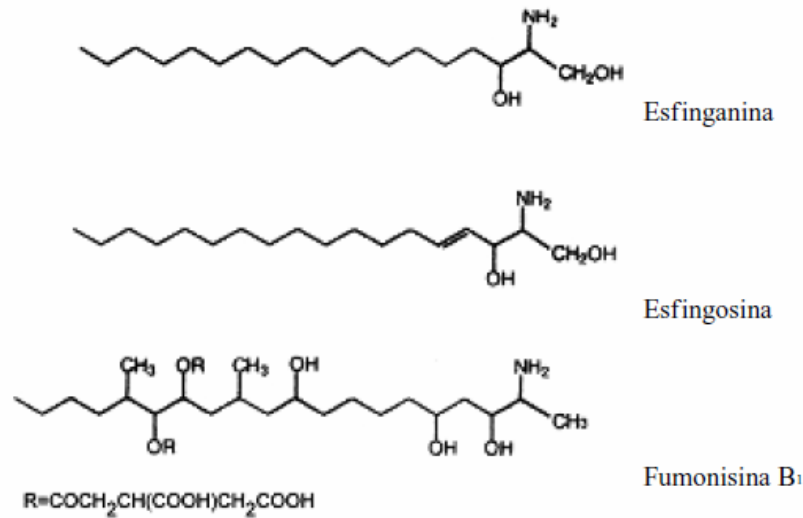
Uma série de estudos comprovou que a exposição à FB<sub>1</sub> induz à leucoencefalomalácia em equinos (MARASAS et al., 1988; ROSS et al., 1990; THIEL, et al., 1991), hepato e nefrotoxicidade em ratos (GELDERBLUM et al., 1991), edema pulmonar em suínos (DILKIN et al., 2004; SMITH et al., 1996). Em seres humanos, estudos epidemiológicos relacionam a alta incidência de câncer de esôfago na África do Sul e China, e defeitos do tubo neural em embriões no Texas, aos altos níveis de contaminação de milho por fumonisinas (CHU; LI, 1994; MARASAS et al., 1988; MISSNER, et al., 2006).

A Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC, 2002) avaliou o risco de carcinogenicidade das fumonisinas em seres humanos e classificou-as no grupo 2B (provavelmente carcinogênico).

O mecanismo de ação das fumonisinas ainda não está totalmente elucidado, no entanto, muitos trabalhos apontam para a inibição competitiva da enzima ceramida sintase como possível mecanismo de ação das fumonisinas e, dessa forma, como evento principal na desregulação da biossíntese *de novo* de esfingolipídios (RILEY et al., 1996; WANG et al., 1991;1992). Adicionalmente alguns estudos indicam que as fumonisinas também podem causar lesões no DNA e estresse celular oxidativo (DOMIJAN et al., 2007; RUMORA et al., 2007; THEUMER et al., 2010).

As fumonisinas são estruturalmente semelhantes às bases esfingóides esfinganina (Sa) e esfingosina (So), intermediários na biossíntese de ceramida e esfingolipídios complexos (LINO et al., 2007; MERRILL et al., 1993; NORRED et al., 1996).

**Figura 2** - Estrutura química da esfinganina, esfingosina e fumonisina B<sub>1</sub>.



Fonte: Lino et al., 2007

A inibição da biossíntese de esfingolipídeos pode ter efeito pronunciado sobre a célula, uma vez que esses componentes têm papel importante na estrutura da membrana, homeostase do cálcio, comunicação e matriz celular, regulação de fatores de crescimento, incluindo interleucina 1 (IL-1) e o fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ) (MERRIL et al., 2001).

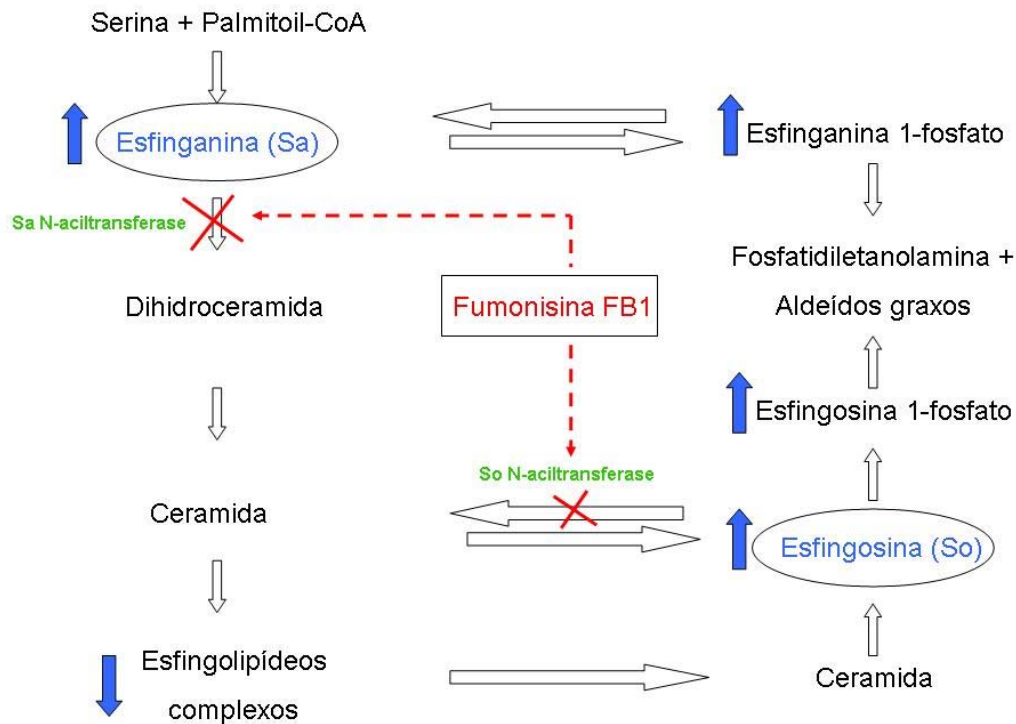
O TNF- $\alpha$  é uma importante citocina envolvida na regulação da apoptose, reestruturação dos tecidos e processos inflamatórios (HE; RILEY; SHARMA, 2001). Também são relatadas mudanças na expressão gênica de proteínas envolvidas na regulação da progressão do ciclo celular, tais como ciclina D1, p21, p27, e c-myc em resposta à exposição a fumonisinas (HUMPF; VOSS, 2004). Essa complexidade aumenta a dificuldade de elucidar o mecanismo de ação das fumonisinas e a via metabólica que conduz aos efeitos biológicos.

Wang et al. (1991) comprovaram que as fumonisinas promovem a desregulação da biossíntese de esfingolipídios ao incubar hepatócitos de ratos macho Sprague-Dawley com FB<sub>1</sub> na concentração de 1  $\mu$ M. Essa exposição elevou o nível de esfinganina por inibição da atividade da esfinganina N-aciltransferase (ceramida sintase).

A esfingosina é sintetizada no retículo endoplasmático por meio da combinação de palmitoil-CoA e o aminoácido serina, formando o intermediário dihidroceramida que é reduzido à esfinganina (figura 3). Potencialmente, as fumonisinas inibem a acilação da esfinganina e a reacilação da esfingosina para formar a ceramida. O sítio específico de ação da FB<sub>1</sub> parece ser as enzimas esfinganina e esfingosina N-acetiltransferase, uma vez que a inibição desta via metabólica resulta na depleção de esfingolipídios complexos

(glicoesfingolípídios e esfingomielina), aumento intracelular da concentração das bases esfingóides e seus metabólitos 1-fosfato, assim como a alteração da concentração celular de determinados glicoesfingolípídios (RENTZ et al., 2005; VOSS et al., 2007).

**Figura 3** - Mecanismo de ação das fumonisinas.



**Fonte:** Adaptado de RENTZ et al., 2005

Quando as bases esfingóides acumulam no meio intracelular, esses compostos atravessam a membrana celular e aparecem no sangue periférico acompanhado pelo aumento da razão esfinganina:esfingosina (Sa:So) (MERRIL et al., 2001).

A elevação da razão Sa:So, após a exposição a fumonisinas, foi observada em ratos (VOSS et al., 1995), coelhos (GUMPRECHT et al., 1995), suínos (MARTINS, 2005; RILEY et al., 1993), pôneis (WANG et al., 1992), macacos (VAN DER WESTHUIZEN; SHEPHARD; SCHALKWYK, 2001), aves (CARVALHO, 2006), e em seres humanos (SILVA et al., 2009).

Como essas alterações ocorrem antes de outros marcadores bioquímicos de lesão celular, foi proposto que a razão Sa:So poderia ser um possível biomarcador para avaliação e monitoramento da exposição a fumonisinas (LINO et al., 2007; WANG et al., 1991).

## 2.2.2 Zearalenona

Zearalenona (ZEA) é um metabólito secundário tóxico produzido por fungos do gênero *Fusarium* spp., incluindo *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. cerealis*, *F. equiseti*, *F. crookwellense* e *F. semitectum* (BENNET; KLICH, 2003; IARC,1997; ZINEDINE et al., 2007).

A zearalenona é amplamente descrita como contaminante natural, em vários continentes, de muitos cereais como milho, trigo, soja, sorgo, cevada, centeio, aveia e arroz, e também de rações animais destinadas a aves e, principalmente, a suínos (DOLL; DANICKE, 2011; ZINEDINE et al., 2007). É um composto estável, tanto durante o armazenamento como no processamento do alimento, uma vez que não se degrada facilmente a altas temperaturas.

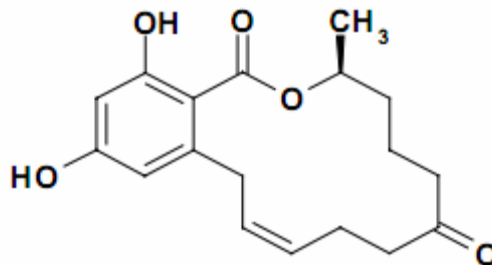
Apesar de a ZEA apresentar uma estrutura não esteroideal, possui a propriedade de estimular os receptores estrogênicos, causando assim alterações morfológicas e funcionais de órgãos reprodutores.

### 2.2.2.1 Estrutura

A zearalenona foi isolada em 1962 a partir da cultura de *F. graminearum* (STOB, 1962) e sua estrutura determinada em 1966 por Urry et al. (1966).

O nome zearalenona é uma combinação do organismo produtor “*Gibberella zae*” (forma assexuada do *Fusarium graminearum*), da dupla ligação entre os carbonos C1' e C2' (“-eno”) e do grupo cetona (“-ona”) no C6' da molécula (figura 4) (URRY et al., 1966).

**Figura 4** - Estrutura química da zearalenona.



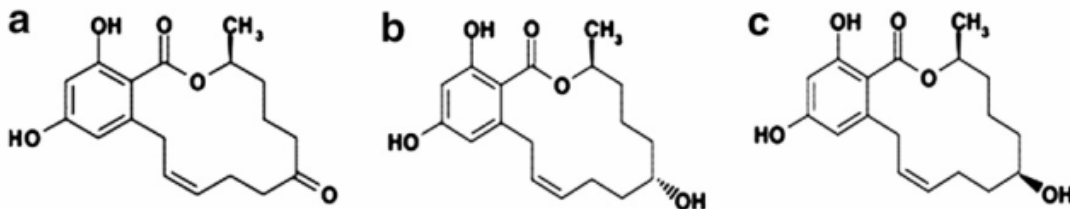
**Fonte:** Urraca et al., 2004

É constituída por uma lactona ácida resorcílica, quimicamente descrita como (S)-(-)-3,4,5,6,9,10-hexahidro-14,16 - dihidroxi - 3 - metil - 1H - 2 - benzoxacilotetradecim-1,7-(8H)-diona. Apresenta massa molecular de 318,4 e fórmula

química (C<sub>18</sub>H<sub>22</sub>O<sub>5</sub>), sendo um cristal branco a temperatura ambiente e insolúvel em água, mas solúvel em solventes orgânicos como acetonitrila, metanol, benzeno e acetona. É estável até 120 °C; 69% é decomposta a 200°C quando submetido a um tempo mínimo de 60 minutos (DOLL; DANICK, 2011; IARC, 1997).

Em mamíferos o grupo cetona no carbono C8 é reduzido para dois metabólitos estereoisômeros de zearalenona ( $\alpha$ - e  $\beta$ -isômeros) (figura 5). Esses metabólitos são também produzidos por fungos, mas em concentrações muito menores do que a ZEA (ZINEDINE et al., 2007).

**Figura 5** - Estrutura química (a) Zearalenona, (b)  $\alpha$ -zearalenol ( $\alpha$ -zol), (c)  $\beta$ -zearalenol ( $\beta$ -zol).

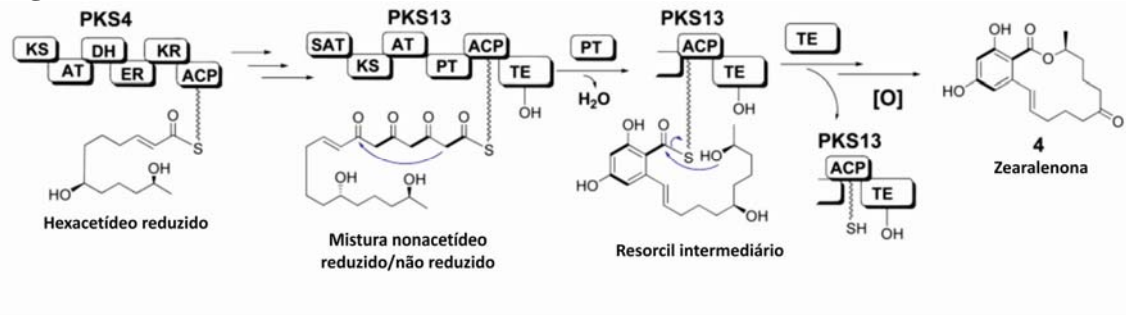


Fonte: Zinedine et al., 2007

#### 2.2.2.2 Biossíntese/Metabolismo

Foram identificados dois genes em *F. graminearum*, ZEA1 e ZEA2, necessários à biossíntese de zearalenona, sendo ambos considerados essenciais para a produção da toxina, apesar de possuírem um mesmo promotor e serem transcritos de forma divergente (HUFFMAN; GERBER; DU, 2010). Assim, foi proposto um modelo biossintético que utiliza duas vias policetidas; a via HR-PKS catalisa a formação da cadeia hexacetida reduzida que é transcetilada pela via não reduzida (NR-PKS), que posteriormente é alongada por mais três ciclos para formar uma cadeia nonacetídeo de zearalenona. Nos três últimos ciclos de alongamentos, o grupo  $\beta$ -ceto, depois de cada reação de condensação, permanece não-reduzido, e somado a sete carbonos da cadeia nonacetídeo formam um resorcilato via condensação aldol intramolecular nos carbonos C<sub>2</sub>-C<sub>7</sub> (figura 6).

**Figura 6** - Provável via biossintética da zearalenona



**Fonte:** Adaptado de HUFFMAN et al., 2010

Uma vez ingerida a ZEA é rapidamente absorvida (80-85%) via trato gastrintestinal e metabolizada no fígado, sendo seus metabólitos detectados no sangue cerca de 30 minutos após a ingestão ligados a globulinas humanas (MINERVINI; AQUILLA, 2008). Estudos sugerem duas vias principais de biotransformação de zearalenona em animais: i) a hidroxilação de ZEA pelas enzimas 3 $\alpha$ - e 3 $\beta$ -hidroxiesteróide dehidrogenases (HSDs) com formação dos metabólitos  $\alpha$ -zol e  $\beta$ -zol; ii) e a conjugação de ZEA e seus metabólitos com o ácido glucurônico pela ação da enzima uridina difosfato glucuronil transferases (UDPGT). Também existem possíveis diferenças na biotransformação hepática de ZEA em diferentes espécies animais. A ZEA pode ser excretada na bile ou na urina e seus metabólitos excretados na urina na forma de glucuronídeos (ZINEDINE et al., 2007).

### 2.2.2.3 Toxicidade

Há evidências limitadas para carcinogenicidade de zearalenona em animais experimentais (IARC, 1997). O mecanismo de ação e toxicidade baseiam-se na competição da zearalenona e seus metabólitos com estradiol pelos sítios de ligação específicos dos receptores de estrógeno (ERs) que estão distribuídos em diferentes órgãos. A ligação de ZEA e seus metabólitos aos ERs, como agonistas, iniciam uma sequência de eventos conhecida como hiperestrogenismo em órgãos alvo (MINERVINI; AQUILA, 2008).

Experimentos *in vitro* comprovaram a ligação competitiva da ZEA e seus metabólitos a receptores estrogênicos, sendo que o  $\alpha$ -zol se liga a esses receptores de forma mais intensa, seguido, em ordem decrescente, por ZEA e  $\beta$ -zol (JEFCA, 2011). O complexo receptor-ZEA é rapidamente transferido para o núcleo da célula, onde se liga a receptores nucleares específicos e gera resposta estrogênica por meio da ativação do gene, resultando na produção de RNAm, que codifica as proteínas normalmente expressas pela ligação receptor-estrógeno (BAUER, 2002). Isto ocorre devido à estrutura da micotoxina ser semelhante a

estrógenos naturais, o que permite a sua ligação com um receptor específico (SCHUH, 1997; SHIER et al., 1998).

Além disso, foi relatado que  $\alpha$ -zol e  $\beta$ -zol podem ser citotóxicos pela inibição da proliferação celular, da síntese de proteínas totais e da síntese de DNA com formação de adutos. Adicionalmente, pode haver outra via de dano oxidativo da ZEA, uma vez que foi demonstrado a indução de Hsp 27 e Hsp 70, proteínas consideradas marcadoras de stress oxidativo.  $\beta$ -zol foi mais ativo que  $\alpha$ -zol e ambos os metabólitos exibiram uma menor toxicidade quando comparados com ZEA em células Vero. A biotransformação de ZEA pode ser considerada uma via de detoxificação ao invés de uma bioativação (OTHMEN et al., 2008).

A ZEA e seus análogos têm efeitos estrogênicos como infertilidade, edema vulvar, prolapso vaginal e hipertrofia mamária em fêmeas e feminização de machos, atrofia testicular e aumento de tamanho das glândulas mamárias em várias espécies animais (PERAICA et al., 1999).

Gajecka et al. (2008a; 2008b) analisaram 9 cadelas expostas à contaminação artificial por zearalenona nos níveis de 25 e 50  $\mu\text{g} \cdot \text{Kg}^{-1}$  de peso do animal por dia. As análises histopatológica e imunohistoquímica nos ovários mostraram degeneração celular granular e atrofia, assim como edemas e hemorragias. A intensidade do efeito foi proporcional à dose administrada. Adicionalmente ocorreu diminuição da atividade dos folículos ovarianos, atrofia de conexões intercelulares e o surgimento de espaços intercelulares que pode representar uma redução da atividade dessa camada. Além disso, foram caracterizadas alterações na morfologia das mitocôndrias, retículo endoplasmático rugoso e do complexo de Golgi sugerindo influência da ZEA no metabolismo celular e nos processos de secreção. Os autores sugeriram que, em cadelas e outros animais monogástricos, intoxicações induzidas por essa micotoxina causem alterações ultra-estruturais nas células granulosas de folículos ovarianos.

Em outro estudo Gajecka et al. (2007) relataram lesões regressivas, como degeneração e atrofia no endométrio e miométrio, além de edema e extravasamento sanguíneo no útero de cadelas. A administração de 25  $\mu\text{g}$  ZEA/Kg animal/dia a cadelas por via oral por 100 dias promoveu a disfunção do útero.

De forma geral, os efeitos da ZEA, na maior parte dos animais são semelhantes àqueles decorrentes da exposição a grandes concentrações de estrógeno. A síndrome resultante é denominada de hiperestrogenismo, sendo caracterizada por

infertilidade, lactação anormal, além da ocorrência de natimortos, abortos, mastite, vulvovaginite e prolapso retal ou vaginal (SUNDLOF; STRICKLAND, 1986).

### 2.2.3 Aflatoxinas

As aflatoxinas (AFs) são metabólitos secundários tóxicos produzidos por fungos do gênero *Aspergillus* spp., principalmente pelas espécies *A. flavus* e *A. parasiticus*, mas também por outras espécies como *A. nominus*, *A. bombycis*, *A. ochraceoroseus* e *A. pseudotamari* (KLICH et al., 2000; MOSS, 2002; PETERSON et al., 2001).

Historicamente, a descoberta das aflatoxinas ocorreu devido a um surto misterioso que acometeu perus na Inglaterra em 1960. Esta doença ficou conhecida como “Turkey-X-disease” e foi associada ao consumo de torta de amendoim importada do Brasil. Posteriormente, após análises, a aflatoxina foi identificada como agente etiológico da doença (BLOUNT, 1961; VAN DER ZJIDEN et al., 1972).

O nome aflatoxina é derivado do nome da sua principal espécie produtora (*Aspergillus flavus* toxina) e embora existam mais de 20 análogos estruturais de aflatoxinas (AFs), as mais estudadas e conhecidas são B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>), B<sub>2</sub> (AFB<sub>2</sub>), G<sub>1</sub> (AFG<sub>1</sub>) e G<sub>2</sub> (AFG<sub>2</sub>), devido a sua ocorrência e toxicidade (GOLDBLATT, 1971; YU et al., 2005). Os análogos denominados AFM<sub>1</sub> e AFM<sub>2</sub> foram detectados em leite, urina e fezes e identificados como resultantes do metabolismo hepático das AFB<sub>1</sub> e AFB<sub>2</sub> (HUSSEIN; BRASEL, 2001).

A exposição humana e animal a aflatoxinas é uma grande preocupação, uma vez que existem relatos da ocorrência dessas micotoxinas em diversos cereais como arroz, trigo, cevada, aveia, milho, sorgo, feijão, ervilha, grão de bico, cacau e soja (SOLEIMANY; JINAP; ABAS, 2012; IBÁÑEZ-VEA, 2011; MORENO et al., 2009; LUTFULLAH; HUSSAIN, 2011; COPETTI et al., 2011), assim como a possibilidade de exposição indireta por meio do consumo de leite, carne, ovos, fígado, e exposição de animais pelo consumo de ração contaminada (DECASTELLI et al., 2007; KHAYOON et al., 2010; HERZALLAH, 2009; PRANDINI et al., 2009).

Além dos riscos à saúde, a contaminação de cereais por aflatoxinas causa prejuízos econômicos devido à redução do desempenho na produção animal, aumentando o custo do setor produtivo (MOSS, 1991; WU, 2007; ZAIN, 2011).

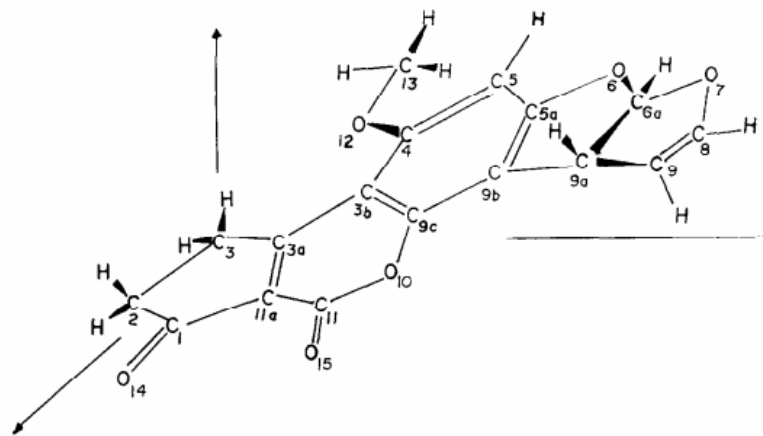
Devido à distribuição global de aflatoxinas e seu potente efeito biológico mesmo em baixas concentrações, muitas pesquisas em diferentes áreas tem sido realizadas com foco na toxicidade, métodos de detecção e ocorrência natural.

### 2.2.3.1 Estrutura

Muitos métodos de análises que utilizam raio-X, absorção ultravioleta, infravermelho, e ressonância magnética nuclear tem sido empregados para o estudo da estrutura das aflatoxinas (ASAO et al., 1963; VAN SOEST; PEEDERMAN, 1970). Estruturalmente as aflatoxinas são caracterizadas como bisfurano cumarinas derivadas de decacetídeos (SMITH; MOSS, 1985).

A molécula de AFB<sub>1</sub> contém um grupo carbonila em um anel de cinco carbonos e conjugados com a função  $\alpha$   $\beta$  lactona insaturada, apresenta fórmula molecular C<sub>17</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub> e possui quatro prótons em um anel dihidrofurano, (figura 7). A aflatoxina B<sub>2</sub> (C<sub>17</sub>H<sub>14</sub>O<sub>6</sub>) é considerada como um produto de redução da AFB<sub>1</sub> (PAVÃO et al., 1995).

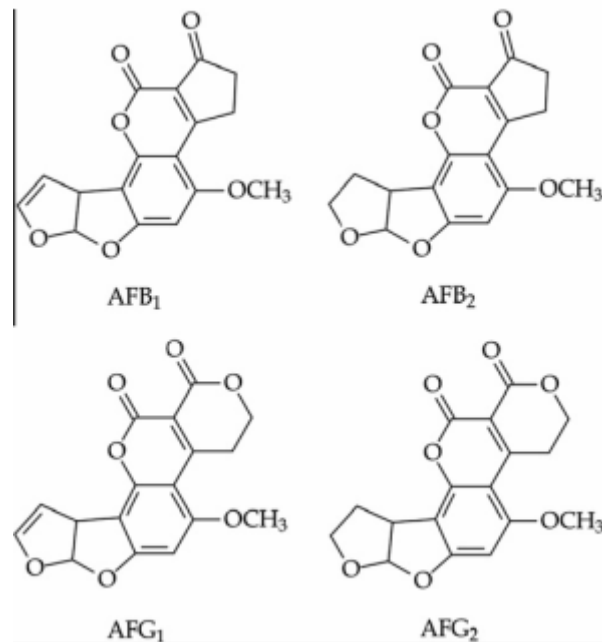
**Figura 7** - Estrutura geométrica da AFB<sub>1</sub>.



**Fonte:** Pavão et al., 1995

A série G apresenta em sua estrutura um anel 3-lactona, ao invés do anel ciclopentanona característico da série B. Por outro lado, a presença de uma dupla ligação que ocorre entre o carbono 8 e 9 como vinil éter no anel furano é característica da estrutura das AFB<sub>1</sub> e AFG<sub>1</sub>, influenciando a atividade e toxicidade de AFB<sub>1</sub> e AFG<sub>1</sub> em relação a AFB<sub>2</sub> e AFG<sub>2</sub>, (figura 8) (JAIMEZ et al., 2000).

**Figura 8** - Estrutura química das aflatoxinas AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub>, AFG<sub>2</sub>.



Fonte: Rawal et al., 2010

As aflatoxinas da série B são caracterizadas por apresentar fluorescência azul (blue, emissão cerca de 425nm) e as da série G, fluorescência verde (green, emissão cerca de 540nm), sob radiação ultravioleta. Esta propriedade é amplamente utilizada para a detecção de cepas aflatoxigênicas bem como para detecção de aflatoxinas (ASAO et al., 1963; HUSSEIN; BRASEL, 2001). Dessa forma, as nomenclaturas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub> estão relacionadas à propriedade fluorescente das aflatoxinas sob luz ultravioleta, assim como na sua mobilidade durante a realização de cromatografia de camada delgada (SHEPHARD et al., 2009).

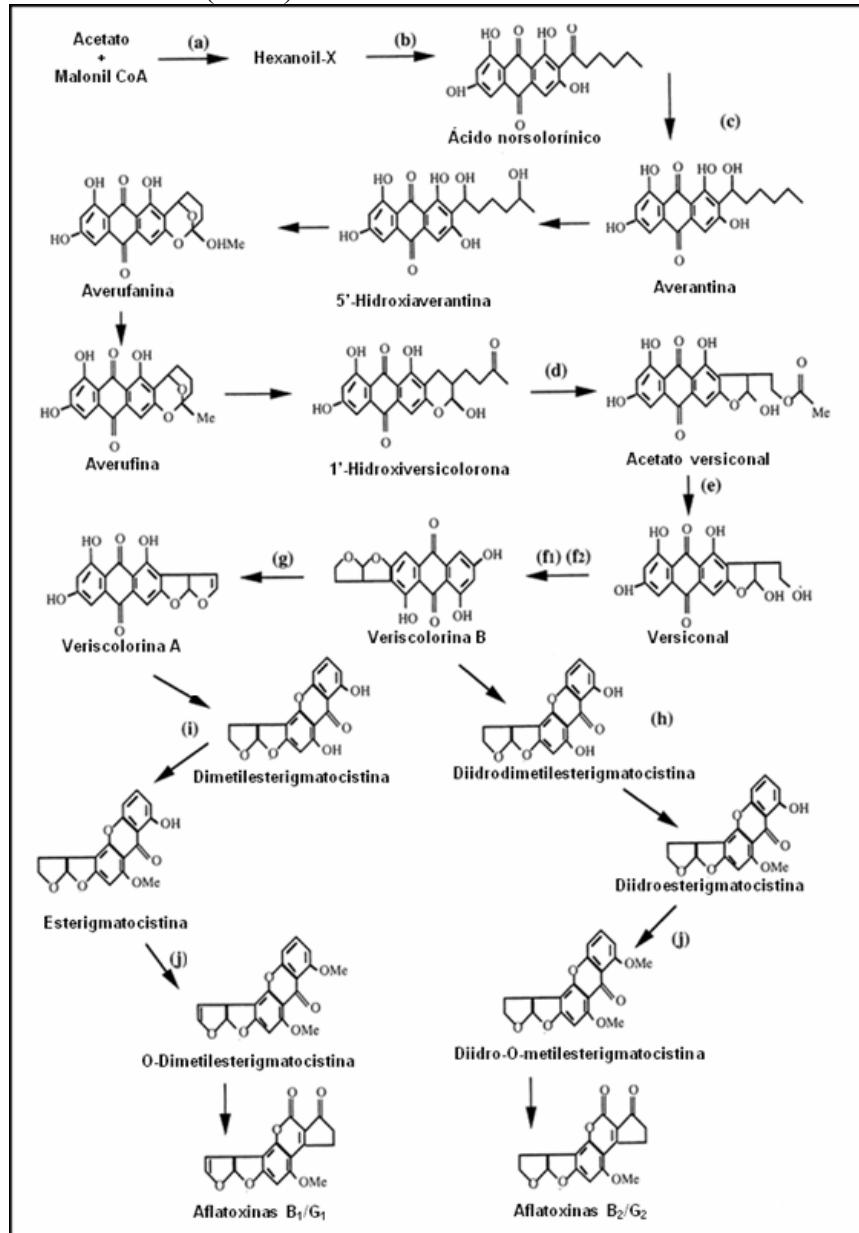
#### 2.2.3.2 Biossíntese/Metabolismo

A via biossintética da aflatoxina inicia-se com a conversão de acetato e malonil CoA a uma unidade hexanoil iniciadora, pela ação de duas ácido graxo sintase (HexA/HexB). O hexanoato resultante é utilizado como um iniciador pela ação da enzima multidomínio policetida sintase A (PksA) que combina uma unidade de hexanoil iniciadora e 7 unidades extensoras de malonil-Coa para formar o ácido norsolorínico decacetida que é o primeiro precursor estável na biossíntese da aflatoxina B<sub>1</sub>, (figura 9) (HUFFMAN et al., 2010; KORMAN et al., 2010).

O policetídeo sofre de 12 a 17 transformações enzimáticas originando uma série de intermediários como a averantina, 5'-hidroxiaverantina, averufanina, averufina, 1'-hidroxiversicolorona, acetato versiconal, versiconal e versicolorina B. Posteriormente, a via

divide-se originando as aflatoxinas B<sub>1</sub> e G<sub>1</sub> a partir da dimetilesterigmatocistina (DMST), e as AFB<sub>2</sub> e AFG<sub>2</sub> a partir da dihidrodimetilesterigmatocistina (DHDMSST).

**Figura 9** - Via biossintética das aflatoxinas. Enzimas envolvidas: (a) ácido graxo sintase, (b) policetida sintase, (c) ácido norsolorínico redutase, (d) versiconal hemiacetal acetato redutase, (e) esterase, (f<sub>1</sub>) versicolorina B sintase, (f<sub>2</sub>) versiconil ciclase, (g) desaturase, (h) O-metiltransferase (MT-II), (i) O-metiltransferase, (j) O-metiltransferase (MT-I).

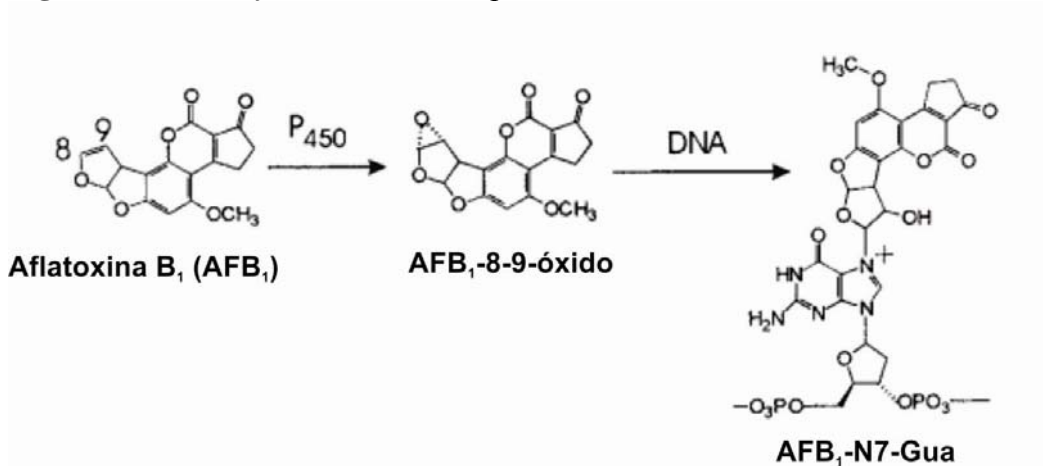


Fonte: adaptado de SWEENEY; DOBSON, 1999.

A exposição a aflatoxinas ocorre principalmente pela ingestão oral, no entanto, a intoxicação por via tópica e inalação pode ocorrer (CAST, 2003). Após a exposição, as aflatoxinas são metabolizadas no tecido intestinal e no fígado (McLEAN; DUTTON, 1995).

A AFB<sub>1</sub> é ativada após sua metabolização pelo sistema microsomal (citocromo P-450, NADPH e oxigênio molecular) para formar AFB<sub>1</sub>-8,9-epóxido, o qual é altamente reativo. Uma vez formado, este composto pode se ligar ao DNA nuclear ocasionando graves danos, (figura 10).

**Figura 10** - Formação de AFB<sub>1</sub>-8,9-epóxido.



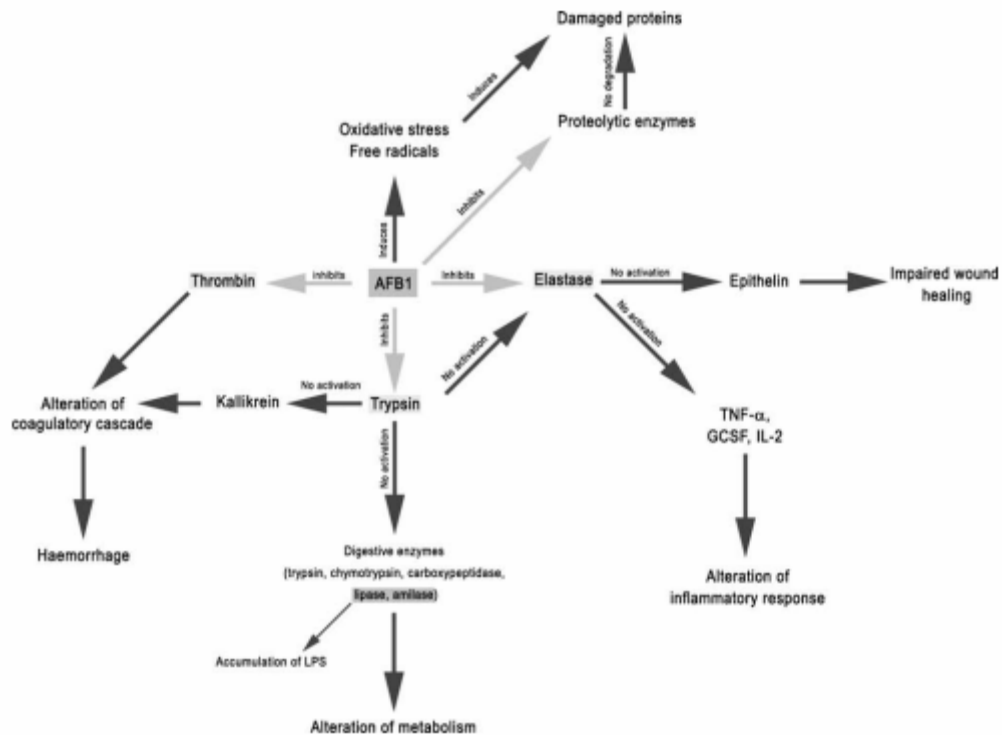
**Fonte:** Adaptado de SMELA et al. (2002)

A AFB<sub>1</sub> também pode ser reversivelmente convertida pela enzima NAPH-redutase em aflatoxicol, que pode agravar a intoxicação ou atuar como um reservatório de AFB<sub>1</sub>.

O sistema monooxigenases microsomal é também responsável pela transformação de AFB<sub>1</sub> em AFM<sub>1</sub>, aflatoxina P<sub>1</sub> (AFP<sub>1</sub>), e aflatoxina Q<sub>1</sub> (AFQ<sub>1</sub>). No entanto, o efeito carcinogênico e mutagênico da AFB<sub>1</sub> é atribuído à afinidade eletrofílica do AFB<sub>1</sub>-8,9-epóxido pela posição N<sup>7</sup> das bases de guanina do DNA e RNA, e formação de adutos macromoleculares, (figura 10).

Cucciolini et al. (2009) investigaram o efeito exercido pela AFB<sub>1</sub> em serina-proteases e relataram a ligação reversível de AFB<sub>1</sub> à elastase, trombina e tripsina, que são importantes enzimas envolvidas em desordens inflamatórias, na cascata de coagulação e no processo digestório. A AFB<sub>1</sub> pode atuar como um inibidor competitivo das serina-proteases desregulando o equilíbrio fisiológico do organismo, (figura 11).

**Figura 11** - Representação esquemática de possíveis mecanismos de toxicidade pela inibição de serina-proteases por AFB<sub>1</sub>.



Fonte: Cuccioloni et al., 2009

Na biotransformação de AFB<sub>1</sub> são formados vários metabólitos como AFM<sub>1</sub>, AFB<sub>1</sub>-dihidrodiol (AFB<sub>1</sub>-DHD) e AFB<sub>1</sub> conjugada com glutatona (AFB<sub>1</sub>-GSH) que são excretados principalmente na urina e bile.

### 2.2.3.3 Toxicidade

A susceptibilidade aos efeitos das aflatoxinas varia de acordo com a espécie, exposição, idade, sexo, dieta e estado fisiológico, além da sensibilidade individual dentro de uma mesma espécie. Os sinais de intoxicação por aflatoxinas dependem da sua concentração, tipo e tempo de ingestão (DOERR et al., 1983).

A AFB<sub>1</sub> é o análogo mais frequente e tóxico do grupo das aflatoxinas, classificada pela International Agency for Research on Cancer (IARC, 2002) no Grupo 1, i.e. carcinógeno a seres humanos, seguido por AFG<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub> e AFG<sub>2</sub> com toxicidades de aproximadamente 50, 20 e 10%, respectivamente, em relação à AFB<sub>1</sub> (BETINA, 1989; SQUIRE, 1981; LEESON et al., 1995).

O fígado é o órgão mais afetado pela AFB<sub>1</sub>. As lesões primárias a esse órgão incluem necrose hemorrágica, infiltração de ácidos graxos e proliferação de dutos

biliares, sendo que, em patos e ratos a região periportal é o principal sítio de ação da toxina (COULOMBE, 1993).

Os cães são considerados altamente sensíveis a aflatoxinas devido ao baixo nível de glutatona hepatocelular basal (CHAFFEE et al., 1969; KETTERER et al., 1975).

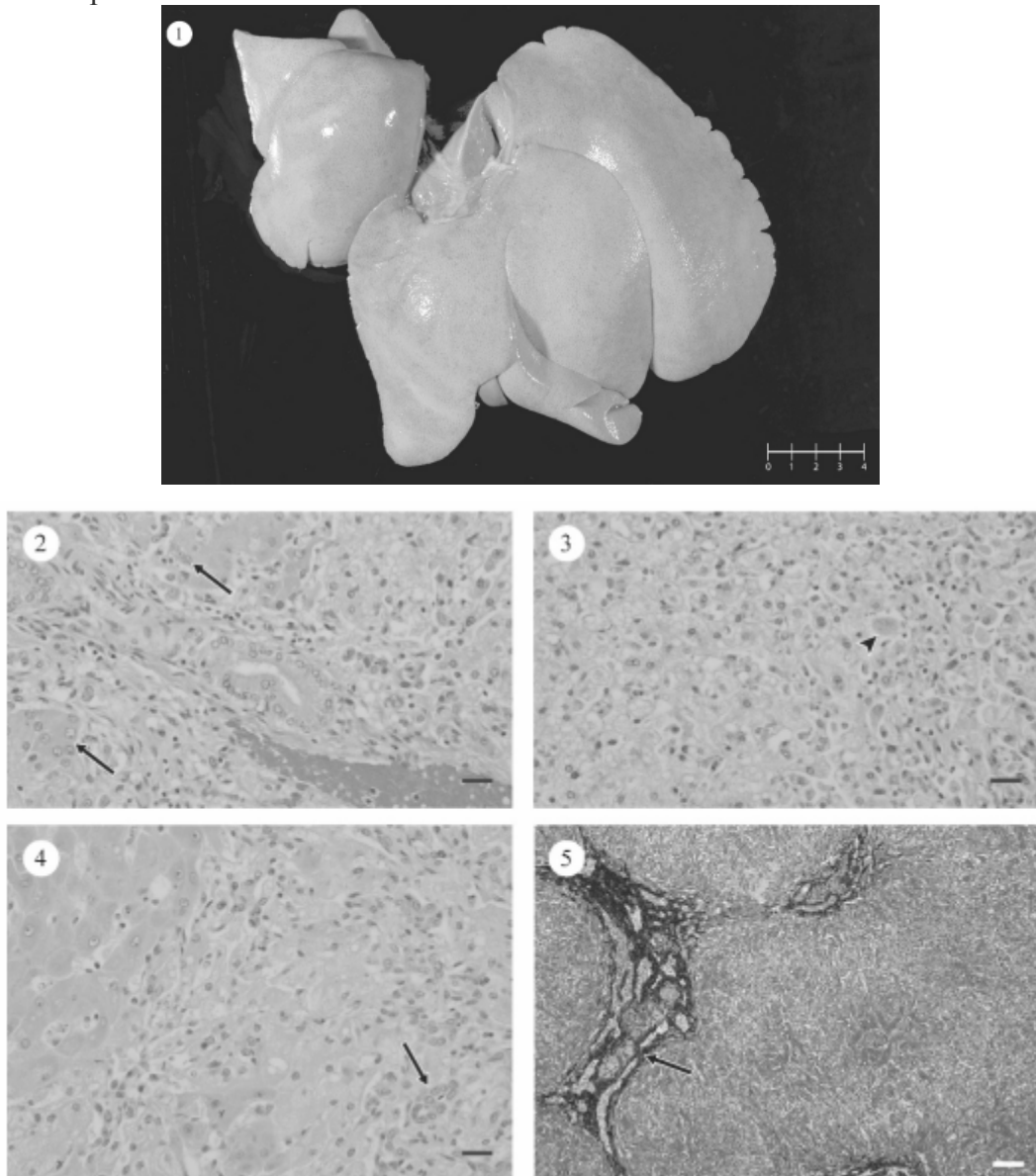
As aflatoxicoses em cães normalmente são casos de intoxicação aguda e fatal. O diagnóstico é realizado pela análise da ração e exames anatomopatológicos do fígado (BAILLY et al., 1997). Os sintomas clínicos incluem anorexia, depressão, icterícia, melena, vômitos, diarreia, coagulopatias e morte súbita. Neste tipo de intoxicação os exames bioquímicos demonstraram altos níveis de alanina aminotransferase (ALT), leve aumento na gama glutamil transferase (GGT) e bilirrubina total, com variações na aspartato aminotransferase (AST) e nas atividades da creatina fosfoquinase (CK). As lesões histológicas incluíram hiperplasia biliar, colestase, lipídose e necrose (BRUCHIM et al., 2011; GARLAND; REAGOR, 2000; NEWMAN et al., 2007; STENSKE et al., 2006).

Em 2005, nos Estados Unidos, oito cães foram diagnosticados com aflatoxicose após a confirmação da contaminação pela ingestão de ração contaminada por aflatoxinas. Dentre os sinais clínicos os cães apresentaram letargia, anorexia, vômito seguido por icterícia, sangue nas fezes, aumento de enzimas hepáticas (ALT 269 a 2.259 U/L / valor de referência (VR): 25 a 106 U/L; AST 75 a 1090 / VR: 16 a 50) e bilirrubina total (0,3 a 8,6 / VR: 0,1 a 0,2 mg/dL), icterícia, tempo de protrombina aumentado (de 32 para mais de 70 segundos, VR: 10 a 16,8 s) (STENSKE et al., 2006).

Recentemente, no ano de 2011, 50 cães foram internados em um hospital veterinário em Israel devido à exposição a aflatoxinas pela ingestão de ração contaminada, cujos níveis variaram de 80 a 300 ng.g<sup>-1</sup>. Os sinais clínicos mais frequentes foram : letargia (78%), vômito (76%), anorexia (74%), icterícia (66%), depressão (66%), melena (60%), hematúria (36%), diarreia (36%). Também foram observadas alterações neurológicas, especialmente em cães não sobreviventes, como depressão, alteração de comportamento e vocalização e coma (BRUCHIM et al., 2011).

Diversos estudos relataram alterações anatômicas e histológicas com observação de hepatomegalia, petéquia sistêmica, edema agudo e hemorragia nos tecidos subcutâneos, úlceras gástricas com melena, icterícia grave, degeneração citoplasmática vacuolar, hiperplasia do ducto biliar em cães, (figura 12) (BRUCHIM et al., 2011; NEWMAN et al., 2007; STENSKE et al., 2006).

**Figura 12** - (1) Fotografia de um fígado amarelo pálido consistente com aflatoxicose subaguda em cão. (2) Fotomicrografia do fígado canino. Hepatócitos vacuolizados, binucleados e multinucleados dispersos (seta). (3) Fotomicrografia de fígado canino mostrando lipidose hepática difusa e necrose hepática (seta). (4) Fotomicrografia de fígado canino mostrando hiperplasia biliar moderada (seta) e fibroplasia portal. (5) Fotomicrografia de fígado canino mostrando aumento de tecido conjuntivo fibroso que se estende desde região portal.



**Fonte:** Newman et al., 2007

### 2.3 OCORRÊNCIA E CO-OCORRÊNCIA DE FUMONISINAS, ZEARALENONA E AFLATOXINAS EM MATÉRIA PRIMA E EM RAÇÕES DESTINADA A CÃES

Estudos sobre a ocorrência e co-ocorrência de micotoxinas em rações destinada a cães são importantes para análise da exposição e dos níveis de contaminação,

além dos fatores de ordem econômica. A presença de micotoxinas nesse tipo de alimento tem sido detectada por diversos autores em diferentes países (BASALAN et al., 2004; BOHM et al., 2010; CRUZ, 2010; NURYONO et al., 2005; SHARMA; MÁRQUEZ, 2001).

Na Indonésia, Nuryono et al., (2005) analisaram 17 amostras de milho destinado à fabricação de ração para alimentação animal, sendo que em 3 amostras (17,6%) foram detectados níveis de zearalenona variando de 6,6 a 61,9 ng.g<sup>-1</sup>.

Basalan et al. (2004) avaliaram a contaminação natural de 21 amostras de ração destinada a cães e 20 amostras de ração para equinos por AFB<sub>1</sub> na Turquia e detectaram níveis médios de contaminação de 6,69 ± 1,65 ng.g<sup>-1</sup> e 1,98 ± 0,71 ng.g<sup>-1</sup>, respectivamente. Os autores concluíram que apesar de ambas serem consideradas seguras para o consumo houve uma diferença significativa (p<0,05) de contaminação na ração destinada a cães.

A co-ocorrência de micotoxinas em ração destinada a cães foi avaliada por Bohm et al. (2010) na Áustria. Foram analisadas 76 amostras de ração e detectada a presença de desoxinivalenol, zearalenona, fumonisinas e ocratoxina A em 83, 47, 42 e 5% do total de amostras, respectivamente. Por outro lado, a co-ocorrência de duas ou mais micotoxinas variou de 3 a 47% das amostras.

Sharma e Márquez (2001) avaliaram a presença de aflatoxinas em 35 amostras de ração comercial destinada a cães (n=19) e gatos (n=16) no México. As aflatoxinas foram detectadas em 88,5% do total de amostras com níveis de AFB<sub>1</sub> mais elevados de 27,0 e 39,7 ng.g<sup>-1</sup> em ração de cães.

Cruz (2010) analisou 24 amostras de milho destinadas à fabricação de ração para animais de companhia (pet) em Porto Ferreira, São Paulo. Do total de 24 amostras foram detectadas aflatoxinas totais em 10 amostras (41,66%) variando de 0,35 a 3,93 ng.g<sup>-1</sup>, sendo que todas as amostras apresentaram níveis de contaminação abaixo de 5,0 ng.g<sup>-1</sup>. Fumonisinas foram detectadas em 100% das amostras analisadas com níveis que variaram de 0,539 a 9,707 µg.g<sup>-1</sup>, e média de 3,275 µg.g<sup>-1</sup> para FB<sub>1</sub>. FB<sub>2</sub> foi detectada em 20 amostras (83,3%) com níveis variando de 0,01 a 6,672 µg.g<sup>-1</sup> e média de 1,307 µg.g<sup>-1</sup>.

Considerando que o milho e outros cereais são importantes componentes na formulação de rações destinadas a cães, e que fumonisinas, zearalenona e aflatoxinas têm sido detectadas como contaminantes em matérias-primas e rações, é necessário o constante desenvolvimento e aprimoramento de métodos analíticos para determinação e monitoramento de micotoxinas em diferentes matrizes alimentares.

## 2.4 MÉTODOS ANALÍTICOS PARA DETERMINAÇÃO DE MICOTOXINAS

Para a análise de micotoxinas as amostras devem ser coletadas, preparadas e homogeneizadas com cuidado, a fim de refletir a condição na época em que o produto foi amostrado, uma vez que a contaminação do cereal é heterogênea, e em um lote apenas alguns grãos podem estar contaminados, porém com níveis extremamente elevados de toxinas (KRSKA et al., 2008; ONO et al., 2006).

Assim, a análise de micotoxinas deve ser precedida por etapas de amostragem, homogeneização, extração e limpeza-concentração do extrato, para que o analito de interesse possa ser determinado por métodos cromatográficos, físico-químicos e/ou imunoquímicos (BERTHILLER et al., 2007).

O monitoramento de micotoxinas em alimentos e rações depende do desenvolvimento de métodos analíticos sensíveis, precisos e exatos, com baixo custo de execução, no entanto, em muitos países exportadores de matérias-primas essa realidade ainda é distante (ANKLAM et al., 2002).

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), cromatografia gasosa (GS) e espectrometria de massas (LC/MS) são os métodos mais empregados para análise de micotoxinas e apresentam como vantagens a sensibilidade, exatidão e precisão (KRSKA et al., 2008).

## 2.5 LEGISLAÇÃO

Os limites máximos toleráveis de micotoxinas e outros contaminantes em alimentos e rações são estabelecidos por agências governamentais de regulação de cada país ou blocos comerciais de acordo com a matriz alimentar, a toxicidade da micotoxina e o destino do produto final.

A legislação para micotoxinas em ração animal é focada principalmente em animais de produção como frangos, galinhas e suínos, não havendo uma legislação específica para animais de companhia. Na maioria dos países a segurança da ração pet é avaliada pelos níveis máximos de micotoxinas permitidos para ração animal em geral (BOHM et al., 2010).

Nos Estados Unidos e Canadá, o nível máximo tolerado de aflatoxinas totais para qualquer ração animal é de 20 ng.g<sup>-1</sup>, por outro lado, na Europa o nível máximo permitido de AFB<sub>1</sub> para toda ração animal é de 20 ng.g<sup>-1</sup>. Para fumonisinas, nos Estados Unidos, a recomendação também é válida para todas as rações destinadas à alimentação animal, porém no Canadá a recomendação do nível máximo de zearalenona vale somente para

ração destinada à alimentação de gado, frangos, e suínos, e portanto, não se aplica a pet food (tabela 1).

**Tabela 1** - Legislação para micotoxinas em pet food.

	<b>Aflatoxinas<sup>a</sup></b> (ng.g <sup>-1</sup> )	<b>Aflatoxina B<sub>1</sub></b> (ng.g <sup>-1</sup> )	<b>Zearalenona</b> (ng.g <sup>-1</sup> )	<b>Fumonisinias</b> (FB <sub>1</sub> +FB <sub>2</sub> ) (µg.g <sup>-1</sup> )
<b>Canadá</b>	20	NR	NR	NR
<b>União Européia<sup>b</sup></b>	NR	20	NR	5
<b>Japão</b>	20	NR	1000	NR
<b>Estados Unidos</b>	20	NR	NR	10 <sup>c</sup>
<b>Brasil</b>	50	NR	NR	NR

**Fonte:** Leung et al., 2006

NR = não regulamentado

a = AFB<sub>1</sub>+AFB<sub>2</sub>+AFG<sub>1</sub>+AFG<sub>2</sub>

b = cada país membro pode regulamentar

c = 5 µg.g<sup>-1</sup> para ração de coelho

No Brasil, no ano de 2011, foi aprovada uma nova regulamentação para micotoxinas, no entanto, os limites estabelecidos não se aplicam aos níveis de micotoxinas encontrados em ração destinada a animais (BRASIL, 2011). O limite máximo tolerável de fumonisinas e zearalenona em matéria-prima ou ração destinada ao consumo animal ainda não foi definido no Brasil, assim como não existe uma legislação específica de micotoxinas para pet food, porém o limite máximo tolerável de aflatoxinas totais (B<sub>1</sub>+B<sub>2</sub>+G<sub>1</sub>+G<sub>2</sub>) em qualquer matéria-prima a ser utilizada diretamente ou como ingrediente para rações destinadas ao consumo animal é de 50 ng.g<sup>-1</sup> (BRASIL, 1988).

No MERCOSUL, bloco comercial formado por Brasil, Argentina, Uruguai, Paraguai e Venezuela, o limite máximo tolerável para AFB<sub>1</sub> é de 20 ng.g<sup>-1</sup> para qualquer ração animal.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 OBJETIVO GERAL**

- Avaliar o risco de exposição de cães a micotoxinas

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Avaliar os níveis de fumonisinas, zearalenona e aflatoxinas em ração destinada a cães;
- Avaliar o grau de exposição de cães a fumonisinas, zearalenona e aflatoxinas por meio da comparação da provável ingestão diária de ração naturalmente contaminada em relação a ingestão diária aceitável e ao nível seguro de micotoxina na dieta animal.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 AMOSTRAS DE RAÇÃO

Foram analisadas 100 amostras de ração comercial destinada à alimentação de cadelas. Todas as amostras pertenciam à dieta de animais avaliados em um estudo epidemiológico de caso-controle em cadelas com neoplasia mamária do Programa de Pós-graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual de Londrina (UEL). Os animais provinham do atendimento de rotina do setor de teriogenologia do Hospital Veterinário da UEL, localizado em Londrina, cidade do norte do Estado do Paraná, que possui uma população de 506.701 habitantes, produto interno bruto (PIB) de R\$ 5.789.237 e um Índice de Desenvolvimento Humano Municipal (IDH-M) superior a 0,800, classificado como de alto desenvolvimento humano (IBGE, 2010).

As amostras de ração (300 g) foram coletadas, no período de dezembro/2010 a dezembro/2011, no local de residência do proprietário do animal, após entrevista e aplicação de um questionário epidemiológico aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA nº 13/10).

Após a homogeneização, as amostras foram mantidas a 4°C. Para a determinação de aflatoxinas, fumonisinas e zearalenona, 200g de cada amostra foram trituradas a uma granulometria de 50 mesh e estocadas a -20°C até o momento da análise.

### 4.2 Determinação da Atividade de Água

A atividade de água das amostras de ração foram determinadas em medidor Aqua Lab/Decagon CX-2 calibrado com água destilada  $A_w = 1,000 \pm 0,003$  a 20 – 25°C.

### 4.3 DETERMINAÇÃO DE FUMONISINAS

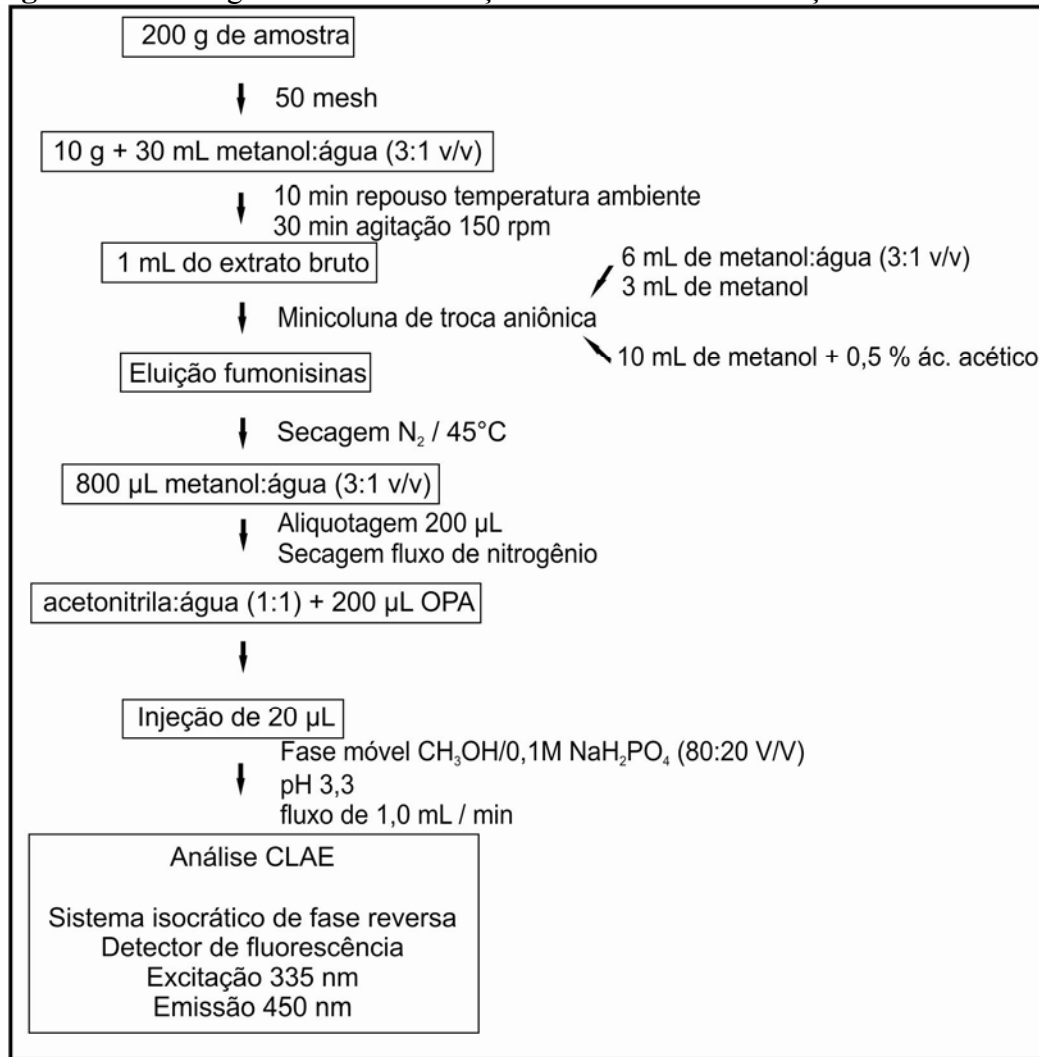
#### 4.3.1 Extração de fumonisinas

Para extração de fumonisinas, uma alíquota de 10 g de ração triturada adicionada de 30 mL de metanol:água (3:1, v/v) foi agitada a 150 rpm por 30 minutos e, posteriormente, filtrada em papel de filtro Whatman nº 1. O filtrado (1 mL) foi submetido à pré-limpeza em minicoluna de troca aniônica Sep-Pak accell plus QMA (Waters Co., Ltda),

previamente acondicionada com 5 mL de metanol seguido de 5 mL de metanol:água (3:1, v/v). Após lavagem da coluna com 6 mL de metanol:água (3:1, v/v) seguidos por 3 mL de metanol, as fumonisinas foram eluídas com 10 mL de ácido acético 0,5% em metanol. O eluato foi seco a 45 °C e o resíduo ressuspenso em 800 µL de metanol:água (3:1, v/v). Este foi fracionado em alíquotas de 200 µL, as quais foram secas sob fluxo de gás N<sub>2</sub> a 45 °C, procedendo-se ao acondicionamento em freezer (-20 °C) para posterior análise de fumonisinas.

#### 4.3.2 Determinação de Fumonisinas

A determinação de fumonisinas (FB<sub>1</sub> e FB<sub>2</sub>) foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) segundo o método de Shephard et al. (1990) modificado por Ueno et al. (1993). A alíquota de 200 µL foi ressuspensa em acetonitrila:água (1:1, v/v) e submetida à derivatização com 200 µL de o-ftaldialdeído (OPA) (40 mg de OPA, 1 mL de metanol, 5 mL de tetraborato de sódio 0,1 M e 50 µL de 2-mercaptoetanol). A amostra foi injetada dentro de 1 minuto no sistema cromatográfico (isocrático de fase reversa) utilizando como fase móvel metanol:NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,1 mol.L<sup>-1</sup> (80:20, v/v) pH 3,3 ajustado com ácido ortofosfórico e fluxo de 1 mL.min<sup>-1</sup>. O sistema constituiu-se de bomba LC-10 AD (Shimadzu), detector de fluorescência RF-10A XL e coluna C18 Luna 5µ 100Å (4,6 x 250 mm, Phenomenex). Os comprimentos de onda de excitação e emissão foram de 335 nm e 450 nm, respectivamente, (figura 13).

**Figura 13** - Fluxograma de determinação de fumonisinas em ração.

Fonte: De acordo com Shephard et al. (1990) modificado por Ueno et al. (1993)

Os limites de detecção (LD) para FB<sub>1</sub> e FB<sub>2</sub> foram 27,5 ng.g<sup>-1</sup> e 35,3 ng.g<sup>-1</sup>, respectivamente, definido como a concentração mínima de toxina que pode gerar um pico cromatográfico 3 vezes acima da razão altura/ruído da linha de base.

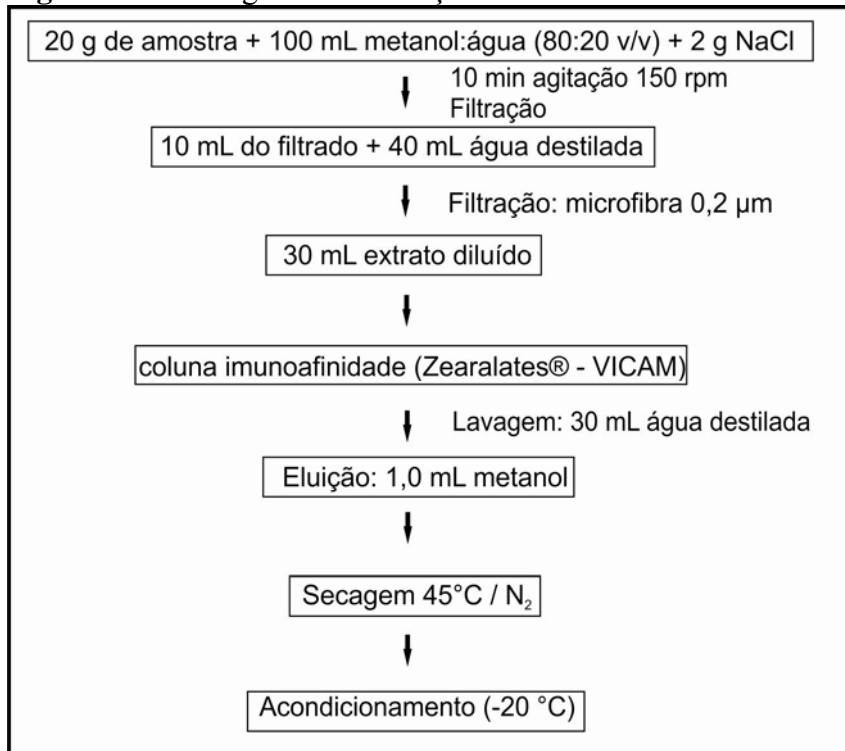
#### 4.4 Determinação de Zearalenona

##### 4.4.1 Extração de zearalenona

Para extração de zearalenona, uma alíquota de 20 g de ração triturada adicionada de 100 mL de metanol:água (80:20, v/v) e 2 g de NaCl foi agitada a 150 rpm por 5 minutos. Após a filtração com papel de filtro Whatman nº 1, 10 mL do filtrado foram diluídos com 40 mL de água destilada. A seguir 30 mL do extrato diluído foi filtrado com membrana

de microfibras de vidro ( $0,2\ \mu\text{m}$ ) e submetido à pré-limpeza em uma coluna de imunoafinidade (Zearalatest®). A coluna foi então lavada com 30 mL de água destilada e a zearalenona eluída com 1,0 mL de metanol. O eluato foi seco sob fluxo de gás  $\text{N}_2$  a  $45\ ^\circ\text{C}$ , procedendo-se ao acondicionamento em freezer ( $-20\ ^\circ\text{C}$ ) para posterior análise (figura 14).

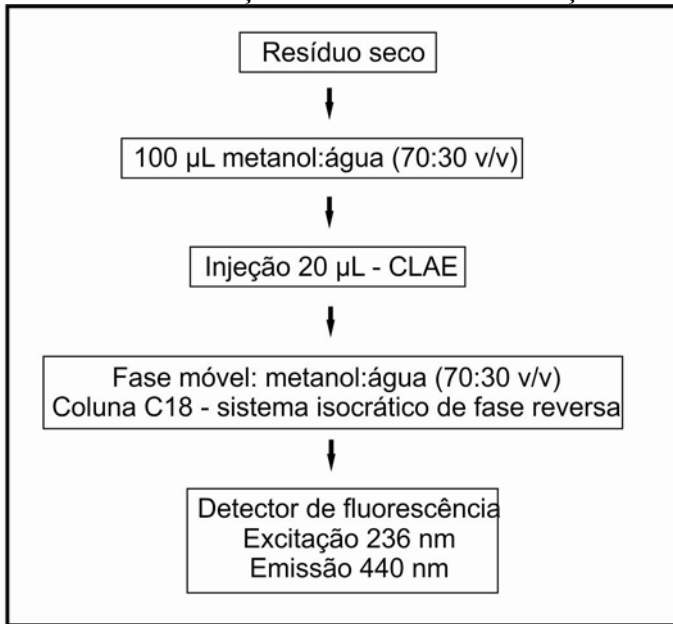
**Figura 14** - Fluxograma de extração de zearalenona.



Fonte: Zearalatest® modificado por De Saeger 2003

#### 4.4.2 Determinação de Zearalenona

A determinação de ZEA foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) segundo o método de Sabater-Vilar et al. (2007) adaptado. Uma alíquota foi ressuspensa em  $100\ \mu\text{L}$  de fase móvel composta por metanol:água (70:30, v/v), sendo então injetada ( $20\ \mu\text{L}$ ) no sistema cromatográfico (isocrático de fase reversa), a temperatura de  $25\ ^\circ\text{C}$ , e fluxo de  $1\ \text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ . O sistema constitui-se de bomba Shimadzu LC-10 AD, detector de fluorescência RF-10A XL e coluna C18 Luna  $5\ \mu\text{m}$   $100\ \text{\AA}$  ( $4,6 \times 250\ \text{mm}$ , Phenomenex). Os comprimentos de onda de excitação e emissão foram de  $236\ \text{nm}$  e  $440\ \text{nm}$ , respectivamente (figura 15).

**Figura 15** - Determinação de zearalenona em ração.

Fonte: Adaptado de Sabater-Vilar et al. (2007).

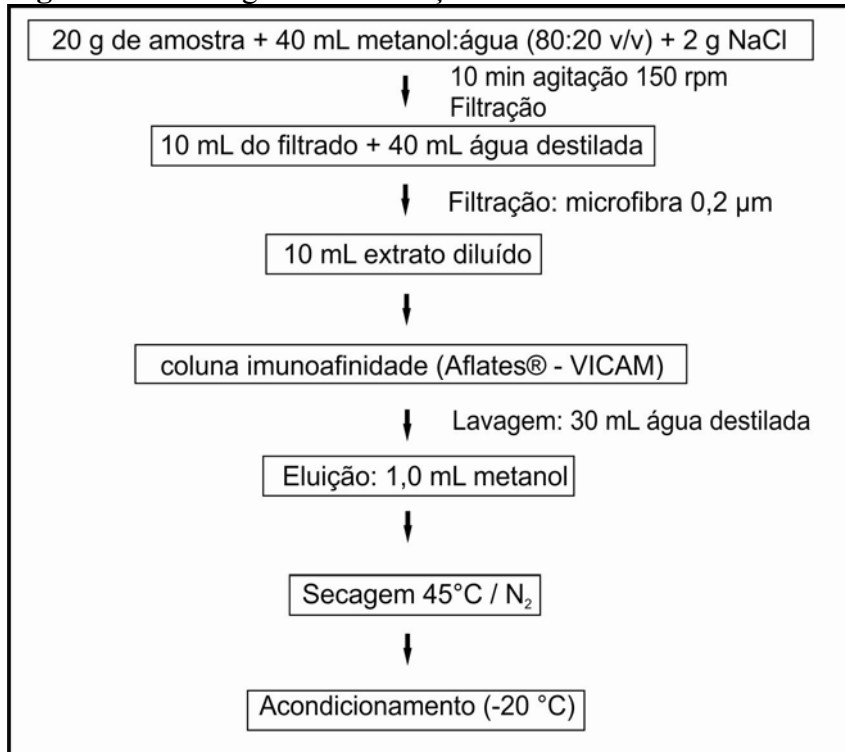
O LD para ZEA foi de  $3,95 \text{ ng.g}^{-1}$ , definido como a concentração mínima de toxina que pode gerar um pico cromatográfico 3 vezes acima da razão altura/ruído da linha base.

As taxas de recuperação de ZEA a partir de ração artificialmente contaminada na faixa de 100 a  $400 \text{ ng.g}^{-1}$  variou de 85 a 89% com média de 87% e coeficiente de variação de 2,34%, baseando-se em duas repetições e análises em duplicata.

#### 4.5 DETERMINAÇÃO DE AFLATOXINAS

##### 4.5.1 Extração de Aflatoxinas

A extração de aflatoxinas das amostras de ração e a pré-limpeza do extrato foram realizadas utilizando colunas de imunoafinidade (CIA) Aflatest® (Vicom) de acordo com as recomendações do fabricante (figura 16). Uma alíquota de 20 g de ração adicionada de 2 g de NaCl e 40 mL de metanol: H<sub>2</sub>O (80:20) foi agitada a 150 rpm por 10 minutos, sendo, posteriormente, filtrada em papel de filtro Whatman n° 1. A 10 mL do filtrado foram adicionados 40 mL de água destilada e a solução foi filtrada em filtro de microfibras de vidro. Em seguida, 10 mL foram submetidos à pré-limpeza em CIA e a coluna foi então lavada com 30 mL de água destilada, sendo as aflatoxinas eluídas com 1,0 mL de metanol. O eluato foi seco a 45°C sob fluxo de N<sub>2</sub>.

**Figura 16** - Fluxograma de extração de aflatoxinas.

Fonte: Aflatest®

#### 4.5.2 Determinação de Aflatoxinas

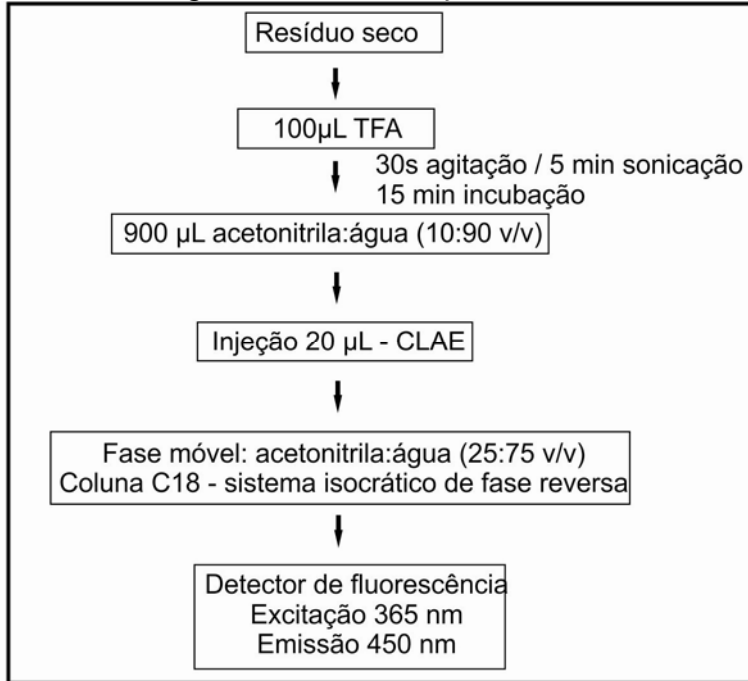
A determinação de aflatoxinas (AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub> e AFG<sub>2</sub>) foi realizada por CLAE de acordo com Miyamoto et al. (2008), (figura 17). As amostras foram submetidas à derivatização, pela adição de 100 µL de ácido trifluoroacético (TFA), agitadas por 30 segundos, sonicadas por 5 minutos e incubadas por 15 minutos a temperatura ambiente, na ausência de luz. Após o período de incubação, foram adicionados 900 µL de acetonitrila:água (1:9, v/v) seguido de agitação por 15 segundos, sendo uma alíquota de 20 µL injetados no cromatógrafo líquido de alta eficiência.

O sistema cromatográfico isocrático de fase reversa constituiu-se de bomba LC-10AT (Shimadzu), injetor Rheodyne modelo 7725i, detector de fluorescência RF-10A XL e coluna Luna C-18 Phenomenex (250 x 4,6 mm de diâmetro interno, 5 µm, Scharlau, Barcelona, Spain). A determinação de aflatoxinas foi realizada utilizando comprimentos de onda de excitação e emissão de 365 nm e 450 nm, respectivamente, utilizando como fase móvel acetonitrila:água (25:75, v/v) a um fluxo de 1,2 mL min<sup>-1</sup>.

Os limites de detecção para AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub> e AFG<sub>2</sub> foram 0,128 ng.g<sup>-1</sup>, 0,027 ng.g<sup>-1</sup>, 0,593 ng.g<sup>-1</sup>, 0,222 ng.g<sup>-1</sup>, respectivamente, definidos como as concentrações

mínimas de toxinas que podem gerar um pico cromatográfico 3 vezes acima da razão altura/ruído da linha base.

**Figura 17** - Fluxograma de determinação de aflatoxinas.



Fonte: Miyamoto et al. (2008)

#### 4.6 ESTIMATIVA DA INGESTÃO DIÁRIA DE RAÇÃO, INGESTÃO DIÁRIA ACEITÁVEL (ADI) E NÍVEL SEGURO NA DIETA (SPDL):

A estimativa da quantidade de ração ingerida por dia (g/dia) foi calculada, considerando como modelo um cão da raça Beagle, adulto, fêmea e peso médio de 12 Kg, conforme a expressão (CASE et al., 2011):

Quantidade de alimento (g/dia) = necessidade energética do animal (kcal/dia)\* / energia metabolizável do alimento (kcal/g)\*\*

\* Estimativa da necessidade energética = 130 Kcal. (Peso em kg)<sup>0,75</sup>

\*\* Energia metabolizável adotado = 3,5 Kcal/g

A estimativa da ingestão diária aceitável e o nível seguro na dieta foram calculados adotando os níveis médios de micotoxinas detectados nas amostras analisadas (BOERMANS; LEUNG, 2007). A exposição de cães a fumonisinas, zearalenona e aflatoxinas foi avaliada considerando os níveis de contaminação abaixo do limite de detecção como ½

LOD, de acordo com a recomendação do IPCS/GEMS (1995), critério que é adotado para estimar a exposição a micotoxinas quando são observados valores abaixo do LOD. De acordo com este critério, quando todas as observações forem acima do LOD a média verdadeira é calculada; quando a proporção de observações abaixo do LOD for menor ou igual a 60%, a média é calculada substituindo aquelas observações por LOD/2 e quando a proporção for acima de 60%, são informadas duas estimativas: a primeira substituindo aquelas observações por 0 (zero) e outra substituindo os valores pelo LOD. No presente estudo, uma proporção abaixo de 60% de observações apresentaram níveis abaixo do LOD, portanto a média foi calculada substituindo aquelas observações por LOD/2.

A ingestão diária aceitável (ADI, mg micotoxina/kg peso do animal) foi calculada de acordo com a fórmula (BOERMANS; LEUNG, 2007):

$$ADI = NOAEL/SF$$

NOAEL (No observable adverse effect level): Nível em que não é observado efeito adverso

SF: Fator de segurança ou fator de incerteza são valores numéricos (10, 100 ou 1000) aplicados ao NOAEL para considerar alguma incerteza nos dados, como a extrapolação entre espécies, a natureza e a gravidade dos efeitos e a variabilidade na estimativa do LOAEL. O SF pode ser ajustado de acordo com dados epidemiológicos em animais de companhia.

O nível seguro na dieta (SPDL, µg micotoxina/Kg ração) foi calculado de acordo com a fórmula (BOERMANS; LEUNG, 2007):

$$SPDL = (LOAEL \times \text{média peso animal})/SF \times FF \times \text{média peso animal}$$

LOAEL (Lowest observed adverse effect level): Menor nível em que é observado efeito adverso

FF: Fator alimentar é a ingestão diária de ração e leva em consideração as diferenças na quantidade de alimento consumido por diferentes espécies.

## **5 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Os resultados e discussão foram redigidos sob a forma de artigo científico a ser submetido para publicação e de acordo com as normas do periódico *Animal Feed Science and Technology*.

Exposure assessment of dogs to mycotoxins through consumption of dry feed

**Abstract**

The exposure degree of dogs was estimated by acceptable daily intake (ADI) and safe pet dietary level (SPDL) for fumonisins, zearalenone and aflatoxins in dog feed. For this purpose, natural occurrence of fumonisins, zearalenone and aflatoxins were evaluated in 100 dog feed samples collected from December 2010 to December 2011 at the owner's residence of the animal, in Londrina, northern Paraná State, Brazil. A reversed phase HPLC method with fluorescence detection was used for mycotoxin determination. Fumonisins, zearalenone and aflatoxins were detected, respectively, in 68, 95 and 68% of samples. In 80, 86 and 88% samples, fumonisin, zearalenone and aflatoxin levels were below  $0.2 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ,  $80 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$  and  $2.0 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ , respectively. Co-occurrence of fumonisins, zearalenone and aflatoxins with two or three mycotoxins were detected from 50 to 68% of samples. Despite the high frequency of fumonisin, zearalenone and aflatoxin contamination in feed samples, the mean levels detected were low. Therefore the probable daily intake ( $1.823 \mu\text{g}$  fumonisins/Kg body weight /day,  $0.936 \mu\text{g}$  zearalenone/Kg body weight bw/day and  $0.024 \mu\text{g}$  aflatoxins/Kg body weight bw/day) values in comparison with ADI and SPDL were low, the exposure degree of dogs could be assumed to be very low. However the co-occurrence of several mycotoxins, and possible synergic or additive effects, should be taken into account when determining the maximum allowed levels or risk assessment. These results indicate the need for specific mycotoxin guidelines that meets safety standards for pet food, and thus contribute to improving the safety and quality of the final product, as well as animal health.

*Keywords:* pet food; dog feed; mycotoxin exposure degree; co-occurrence.

*Abbreviations:* FB, fumonisins; ZEA, zearalenone; AF, aflatoxins; Aw, water activity.

## 1. Introduction

Brazil has the second largest population of dogs (34.3 million) and cats (18.3 million) in the world, and in 2010, consumption of pet food was 1.83 million tons, which accounted for \$4.34 billion (ANFALPET, 2011). Nutrition is critical for animal health and, in general, dog feed are composed by products of animal origin (meat and bone meal) and cereals (soybean meal, rice, wheat and/or maize) (Thompson, 2008). Due to the high nutritional quality, cereals are a good substratum for toxigenic fungi contamination.

Mycotoxins are toxic secondary metabolites produced by fungi that can contaminate cereals used as raw material along the production chain of dog feed. In Brazil and other tropical countries, fumonisins, zearalenone and aflatoxins are mycotoxins of great importance, since they can cause toxic effects to human and animals, in addition to economic losses in the feed production chain.

Fumonisin are produced mainly by *Fusarium verticillioides*, a primary corn phytopathogen. Twenty-eight different fumonisins have been identified (Rheeder et al., 2002), although only fumonisin FB<sub>1</sub>, FB<sub>2</sub>, and FB<sub>3</sub> are detected as natural contaminants at significant levels in corn and corn-based products. Exposure to fumonisin FB<sub>1</sub> induces leukoencephalomalacia in horses (Marasas et al., 1988), hepato-nephrotoxicity in rats (Gelderblom et al., 1991), pulmonary edema in pigs (Harrison et al., 1990). In humans, epidemiological studies have associated the high levels of FB contamination in corn with incidence of esophageal cancer in South Africa and China (Chu and Li, 1994; Marasas et al., 2001) and neural tube defects in embryos from the Texas – Mexico border (Missner et al., 2006). The International Agency for Research on Cancer (IARC, 2002) classified FB<sub>1</sub> as a Group 2B carcinogen (possible human carcinogen).

Zearalenone (ZEA) is produced especially by *F. graminearum* (Bennet and Klich, 2003; Zinedine et al., 2007). The effects of zearalenone, in most animals are similar to those arising

from exposure to high concentrations of estrogen characterized by infertility, abnormal lactation, as well as stillbirth, abortion, mastitis, vaginitis or vaginal and rectal prolapse (Sundlof and Strickland, 1986).

Aflatoxins are a group of mycotoxins produced mainly by *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus* and the major naturally-occurring toxins are aflatoxin B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>), AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub>, and AFG<sub>2</sub> (CAST, 2003). They have been shown to cause mutagenic, teratogenic and hepatocarcinogenic effects (Wogan, 1969). The International Agency for Research on Cancer (IARC, 2002) has classified naturally-occurring mixtures of aflatoxins as carcinogenic to humans (Group 1). In dogs clinical symptoms include anorexia, depression, jaundice, melena, vomiting, diarrhea, coagulopathy and sudden death (Stenske et al., 2006; Newman et al., 2007; Bruchim et al., 2011).

Mycotoxin occurrence in commercial feeds for dogs have been reported by several researchers (Scudamore et al., 1997; Garland and Reagor, 2000; Stenske et al., 2006), however, there is a lack of data on natural exposure degree of dogs to mycotoxins in Brazil.

Taking into account that mycotoxin is a difficult problem to avoid and the co-occurrence of mycotoxin can cause potentiation of toxic effects, monitoring the production chain is essential to assess the risks to which animals are exposed. Therefore, the aim of this study was to evaluate the occurrence of fumonisins, zearalenone and aflatoxins in dog feed from the Northern region of Parana State, Brazil, as well as the estimation of exposure degree of dogs to mycotoxins through the consumption of feed.

## 2. Material and methods

### 2.1 Sampling

A total of 100 feed samples intended for dogs were collected from December 2010 to December 2011 in the owner's residence after interview and an epidemiological questionnaire of the Veterinary Hospital of the State University of Londrina (UEL), Northern Paraná, State, Brazil. The municipality of Londrina, located in northern Paraná State, has a population of 506,701 inhabitants and a Human Development Index (HDI) higher than 0.800, ranked as high human development (IBGE, 2010). All the samples belonged to the diet of animals assessed on case-control study in dogs with mammary tumors of the Post Graduate Program in Animal Science, UEL.

After homogenization, feed samples (300g) were sent to the laboratory for analysis. For fumonisins, zearalenone and aflatoxin determination, 200 g of each sample were ground to 50 mesh and stored at - 20 °C.

### 2.2 Water activity (*aw*) determination

Water activity was determined by Aqua Lab/Decagon CX-2 using distilled water for calibration ( $aw = 1,000 \pm 0,003$ ) at 20 – 25 °C.

### 2.3 Fumonisin analysis

Fumonisin B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> were analyzed according to Shephard et al. (1990) with some modification (Ueno et al., 1993).

Sub-samples (10 g) of feed were mixed with 30 ml methanol:water (3:1, v/v), shaken at 150 rpm for 30 min, and filtered through Whatman n° 1 filter paper. The filtrate (1.0 ml) was applied to preconditioned Sep-Pak Accell Plus QMA cartridge (Waters Corporation, Milford, MA) with methanol (5 ml) followed by methanol:water (3:1, 5 ml). After washing

the cartridge with methanol:water (3:1, 6 ml) followed by methanol (3 ml), fumonisins were eluted with 10 ml methanol containing 0.5% acetic acid. The eluate was evaporated to dryness at 40 °C.

The sample residue was dissolved in methanol–water (3:1, 800 µl) and a 200 µl aliquot dried under nitrogen. After derivatisation with 200 µl O-phthaldialdehyde reagent (40 mg OPA, 1 ml methanol, 5 ml 0.1 M sodium borate and 50 µl 2-mercaptoethanol), HPLC injections were made within 1 min. Fumonisins were analyzed by a reversed-phase isocratic HPLC system (Shimadzu LC-10 AD pump and RF-10A XL fluorescence detector), using a Luna C-18 Phenomenex column (250 x 4.6 mm, 5 µm, Scharlau, Barcelona, Spain). Excitation and emission wavelengths were 335 and 450 nm, respectively. The eluent was CH<sub>3</sub>OH:0.1 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (80:20, v/v) adjusted to pH 3.3 with orthophosphoric acid. The flow rate was 1 ml min<sup>-1</sup>. The detection limits for FB<sub>1</sub> and FB<sub>2</sub> were 27.5 and 35.3 ng g<sup>-1</sup>, respectively, defined as the minimum amount of toxin that could generate a chromatographic peak three times over the height/noise rate of the baseline.

#### *2.4 Zearalenone analysis*

ZEA extraction and clean up were carried out using ZearalaTest<sup>®</sup> immuno-affinity columns (Vicam), according to the manufacturer instructions for feed samples with some modification (De Saeger, 2003). An aliquot of feed sample (20 g) added to 2 g NaCl was shaken at 150 rpm for 10 min with 100 ml methanol: water (80:20, v/v). The extract was filtered through Whatman n° 1 filter paper. The filtrate (10 ml) was diluted with 40 ml ultra-pure water and then filtered through a glass microfibre filter. Then, an aliquot of 10 ml was applied to immuno-affinity column at a flow rate of 1 to 2 drops s<sup>-1</sup>. The column was washed with 30 ml ultra-pure water. Finally, zearalenone was eluted with 1 ml methanol. The eluate was evaporated to dryness under a stream of nitrogen at 45 °C.

ZEA was analyzed according to Sabater-Villar et al. (2007). The dried sample was dissolved with 100  $\mu$ l methanol–water (70:30, v/v), mixed for 1 min and an aliquot (20  $\mu$ l) was injected into HPLC. ZEA was analyzed 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 (250 x 4.6 mm, 5  $\mu$ m, Scharlau, Barcelona, Spain). Excitation and emission wavelengths were 236 and 440 nm, respectively. The mobile phase was CH<sub>3</sub>OH:H<sub>2</sub>O (70:30, v/v) and the flow rate was 1.0 ml min<sup>-1</sup>.

The detection and quantification limits were defined as three and five times, respectively, the area standard deviation of seven spiked standards at lower concentration (2 ng.g<sup>-1</sup>) detectable by HPLC in different days. Detection limits and quantification limits for HPLC were 3.95 ng.g<sup>-1</sup> and 6.08 ng.g<sup>-1</sup>, respectively. The method accuracy was evaluated by zearalenone recovery rates from feed samples artificially spiked with zearalenone at concentrations of 100, 200 and 400 ng g<sup>-1</sup> obtained from two determinations of each concentration (ANVISA, 2003). Recovery rates for ZEA ranged from 85 to 89% with mean of 87 $\pm$  2.34%.

### *2.5 Aflatoxins analysis*

AF extraction and clean up were carried out using AflaTest<sup>®</sup> imuno-affinity columns (Vicam), according to the manufacturer instructions for feed samples. An aliquot of feed sample (20 g) added to 2 g NaCl was shaken at 150 rpm for 10 min with 40 ml methanol: water (80:20, v/v). The extract was filtered through Whatman n<sup>o</sup> 1 filter paper. The filtrate (10 ml) was diluted with 40 ml ultra-pure water and then filtered through a glass microfibre filter. Then, an aliquot of 10 ml was applied to imuno-affinity column at a flow rate of 1 to 2 drops s<sup>-1</sup>. The column was washed twice with 10 ml ultra-pure water and aflatoxins were eluted with 1 ml methanol. The eluate was evaporated to dryness under a stream of nitrogen at 45 °C.

Aflatoxins (AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub> and AFG<sub>2</sub>) were analyzed according to Miyamoto et al. (2008). The dried samples were derivatized with 100 µl Trifluoroacetic acid (TFA), mixed for 30, sonicated for 5 min and incubated at 25 °C for 15 min in the dark. Then, 900 µl acetonitrile: water (1:9, v/v) were added following mixing for 15 seconds and an aliquot (20 µl) was injected into HPLC.

AF were analyzed 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 (250 x 4.6 mm, 5 µm, Scharlau, Barcelona, Spain). Excitation and emission wavelengths were 365 and 450 nm, respectively. The mobile phase was CH<sub>3</sub>CN: H<sub>2</sub>O (25:75, v/v) and the flow rate was 1.2 ml min<sup>-1</sup>.

The detection and quantification limits were defined as three and five times, respectively, the area standard deviation of seven spiked standards at lower concentration (2 ng g<sup>-1</sup>) detectable by HPLC in different days. Detection limits for HPLC were 0.13 ng g<sup>-1</sup> (AFB<sub>1</sub>), 0.03 ng g<sup>-1</sup> (AFG<sub>1</sub>), 0.59 ng g<sup>-1</sup> (AFB<sub>2</sub>) and 0.22 ng g<sup>-1</sup> (AFG<sub>2</sub>). The LOQs were 0.32 ng g<sup>-1</sup> (AFB<sub>1</sub>), 0.15 ng g<sup>-1</sup> (AFG<sub>1</sub>), 1.09 ng g<sup>-1</sup> (AFB<sub>2</sub>) and 0.48 ng g<sup>-1</sup> (AFG<sub>2</sub>).

The method accuracy was evaluated by aflatoxin recovery rates from feed samples artificially spiked with aflatoxins at concentrations of 10, 25, 50 and 100 ng.g<sup>-1</sup> (sum of the four analogues) obtained from two determinations of each concentration (Anvisa, 2003). Recovery rates for total aflatoxins ranged from 80 to 103% with mean of 90% (RSD: 5.22 – 13.05%) while the mean recovery rates for each analogue spiked at concentrations from 2.5 to 25 ng g<sup>-1</sup> were 89% for AFB<sub>1</sub>, 99% for AFG<sub>1</sub>, 90% for AFB<sub>2</sub> and 82% for AFG<sub>2</sub> (mean CV 7.75%).

*2.6 Estimate of daily feed intake, acceptable daily intake (ADI) and safe pet dietary level (SPDL):*

The estimate of daily feed intake (g/day) was calculated considering as a model an adult Beagle dog, female and 12 kg weight, according to the formula (Case et al., 2011):

$$\text{Amount of food (g/day)} = \frac{\text{energy requirement of the animal (kcal/day)} *}{\text{metabolizable energy of feed (kcal/g)}} **$$

\* Estimated energy requirement = 130 Kcal. (Body weight in kg)<sup>0.75</sup>

\*\* Metabolizable energy of feed adopted = 3.5 Kcal/g

The estimate of acceptable daily intake and safe pet dietary level were calculated using the mean levels of mycotoxins detected in the samples analysed (Boermans and Leung, 2007). Fumonisin, zearalenone and aflatoxin contamination in 100 dog feed samples from Paraná State, Brazil was evaluated, considering the values below detection limit as  $\frac{1}{2}$  LOD, according to the recommendation of the IPCS/GEMS (1995) criteria adopted to estimate mycotoxin contamination when values lower than the LOD are observed. The criteria were as following: When all observations were over the LOD then the true mean is calculated; when the proportion of observations less than LOD is lower than or equal to 60%, the mean is calculated replacing those observations by LOD/2 and when the proportion is over 60%, two estimates are informed: one obtained replacing those observations by 0 and the other replacing them by LOD. In the present study, lower than 60% of observations were less than LOD, the mean was calculated replacing those observations by LOD/2.

Acceptable daily intake (ADI, mg mycotoxin/kg BW) was calculated according to the formula (Boermans and Leung, 2007):

$$\text{ADI} = \text{NOAEL} / \text{SF}$$

NOAEL: No observable adverse effect level

SF: Safety factor (uncertainty factors) are numerical values (10, 100 or 1000) applied to the NOAEL or other effect levels to account for any uncertainty in the data, like species extrapolation, the nature and severity of effect, differences in pet breeds, and variability in LOAEL estimation. SF's could be adjusted according to epidemiological data on pets.

Safe pet dietary level (SPDL,  $\mu\text{g}$  mycotoxin/Kg pet food) was calculated according to the formula (Boermans and Leung, 2007):

$$\text{SPDL} = (\text{LOAEL} \times \text{average BW}) / \text{SF} \times \text{FF} \times \text{average BW}$$

LOAEL: Lowest observed adverse effect level

FF: Food factor is the amount of food consumed daily and accounts for the differences in the quantity of food consumed by different species.

### 3. Results

#### 3.1 Occurrence of fumonisins, zearalenone and aflatoxins

Table 1 shows the water activity ( $A_w$ ) and FB, ZEA and AF levels in 100 feed samples intended for dogs from Northern Paraná, State, Brazil. Water activity ( $A_w$ ) in 100 dog feed samples ranged from 0.38 to 0.82 (mean 0.61) (Table 1).

FB<sub>1</sub> was detected in 68% of the samples, with levels ranging from 0.02 to 0.22  $\mu\text{g.g}^{-1}$  (mean 0.09  $\mu\text{g.g}^{-1}$ ), while FB<sub>2</sub> was detected in 35% of the samples with levels ranging from 0.04 to 0.16  $\mu\text{g.g}^{-1}$  (mean 0.07  $\mu\text{g.g}^{-1}$ ). Total fumonisin levels (FB<sub>1</sub> + FB<sub>2</sub>) ranged from 0.03 to 0.38  $\mu\text{g.g}^{-1}$  (mean 0.12  $\mu\text{g.g}^{-1}$ ), and, most of the samples (80%) showed low levels ranging from 0.03 to 0.2  $\mu\text{g.g}^{-1}$  (figure 1).

ZEA was detected in 95% of samples with levels ranging from 5.45 to 442.24  $\text{ng.g}^{-1}$  (mean 49.20  $\text{ng.g}^{-1}$ ) (Table 1), and, in most samples (86%) levels below 80.0  $\text{ng.g}^{-1}$  were detected (Figure 2).

AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub>, AFG<sub>2</sub> were detected in 68%, 1%, 4%, 2%, of feed samples (n = 100), respectively. Total aflatoxin (AFB<sub>1</sub>+AFB<sub>2</sub>+AFG<sub>1</sub>+AFG<sub>2</sub>) levels ranged from 0.34 to 3.88  $\text{ng.g}^{-1}$  (mean 1.54  $\text{ng.g}^{-1}$ ) (table 1), and, most samples (88%) showed levels below 2.0  $\text{ng.g}^{-1}$  (Figure 3).

In the present study, zearalenone was the most prevalent mycotoxin (95%), followed by fumonisins (68%) and aflatoxins (68%). Co-occurrence of fumonisins and zearalenone, zearalenone and aflatoxins, fumonisins and aflatoxins, fumonisins, zearalenone and aflatoxins, were detected in 68%, 66%, 51% and 50% of the samples (Table 2).

### *3.2 Estimation of acceptable daily intake (ADI) and safe pet dietary level (SPDL):*

Although the maximum allowed levels for FB, ZEA and AF have not been established for pet food, determining the exposure degree is an important parameter in the risk assessment of chemicals.

The daily feed intake (g/day) was estimated at 240 g/day by dividing the estimated energy requirement (838.5 Kcal) by the metabolizable energy of feed (3.5 Kcal/g) (Case et al., 2011).

Therefore, considering the mean levels of FB ( $91.68 \text{ ng.g}^{-1}$ ), ZEA ( $46.84 \text{ ng.g}^{-1}$ ) and AF ( $1.20 \text{ ng.g}^{-1}$ ) detected in the samples and the feed intake estimation of 240 g per day, the total FB, ZEA and AF consumption would be 21.88, 11.24 and 0.29  $\mu\text{g}$  per day respectively, which would lead to a maximum probable daily intake ( $\text{PDI}_M$ ) value of 1.823, 0.936 and 0.024  $\mu\text{g/Kg}$  body weight (bw)/day of FB, ZEA and AF, respectively (as considered 12-Kg bw animal).

Taking into account the results of this study and the daily feed intake by an female adult, Beagle (12 Kg) dog, used as a model by veterinary laboratory, the ADI and SPDL for fumonisins, zearalenone and aflatoxins can be calculated (Table 3).

## 4. Discussion

### 4.1 Occurrence and co-occurrence of fumonisins, zearalenone and aflatoxins

FB levels detected in this study (table 1) were similar to those reported by Bohm et al. (2010) but higher than those reported by Martins et al. (2003). In Austria, Bohm et al. (2010) analyzed 76 feed samples for dogs and detected fumonisins (FB<sub>1</sub> + FB<sub>2</sub>) in 42% of the samples with mean of 0.178 µg.g<sup>-1</sup> and the maximum level of 0.568 µg.g<sup>-1</sup>. Martins et al. (2003) analyzed 20 dog feed samples from Portugal and FB<sub>1</sub> was detected in 15% of samples with levels ranging from 0.012 to 0.024 µg.g<sup>-1</sup> (mean = 0.017 µg.g<sup>-1</sup>).

ZEA contamination frequency was similar to those reported by Scussel et al. (2006) but ZEA mean levels (Table 1) were lower than those reported by Bohm et al. (2010). Scussel et al. (2006) analyzed 46 feed samples intended for dogs in Santa Catarina, Brazil, and detected ZEA in 67% of samples with levels ranging from 2.14 to 313 ng.g<sup>-1</sup>. Bohm et al. (2010) detected ZEA in 47% of samples (n = 27) with levels ranging from 10 to 298 ng.g<sup>-1</sup> and a mean of 80 ng.g<sup>-1</sup>.

Aflatoxin levels (Table 1) were lower than data reported by Basalan et al. (2004), Scussel et al. (2006), Sharma and Marquez (2001). Basalan et al. (2004) detected aflatoxins in 21 feed samples for dogs with a mean level of 6.69 ± 1.65 ng.g<sup>-1</sup> in Turkey. In Mexico, Sharma and Marquez (2001) detected AFB<sub>1</sub> in 79% of samples (n = 19) for dogs, and the highest levels of aflatoxin contamination were 27.0 and 39.7 ng.g<sup>-1</sup> (mean = 5.0 ng.g<sup>-1</sup>). Scussel et al. (2006) analyzed 46 feed samples for dogs from Santa Catarina, Brazil, and detected AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub>, AFG<sub>2</sub> in 100%, 71.7%, 93.4% and 95.6% of samples, respectively. Total aflatoxin (AFB<sub>1</sub> + AFB<sub>2</sub> + AFG<sub>1</sub> + AFG<sub>2</sub>) levels ranged from 2.18 to 66.4 ng.g<sup>-1</sup>.

Although there are no specific guidelines for mycotoxin levels in pet food, the maximum levels detected of total fumonisin ( $FB_1 + FB_2$ ) ( $0.38 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ), zearalenone ( $442.24 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ ) and total aflatoxins ( $AFB_1 + AFG_1 + AFB_2 + AFG_2$ ) ( $3.88 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ ) were below the maximum tolerable limit of  $5 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  for FB,  $1000 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$  for ZEA and  $20 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$  for AF for general feed in the European Union, Japan and the United States, respectively (Leunge et al., 2006).

Water activity ( $A_w$ ) was similar to those obtained by Copetti (2005) who analysed 20 feed samples for dogs in Rio Grande do Sul, Brazil, and detected  $A_w$  ranging from 0.507 to 0.802.  $A_w$  is one of the factors that influence mycotoxin production, together with temperature. In maize,  $FB_1$ ,  $FB_2$  and ZEA, production by *Fusarium* species, occurs at  $A_w$  ranging from 0.95 to 1.0 (Montani et al., 1988; Cahagner et al., 1995; Jiménez et al., 1995). Aflatoxin production occurs at  $A_w$  ranging from 0.86 to 0.99, however, the best condition is  $A_w$  around 0.98 (Mousa et al., 2011).

$A_w$  in feed samples ranged from 0.38 to 0.82 (Table 1) and in 38 samples  $A_w$  were lower than 0.60, which doesn't allow any microbial proliferation (Beuchat, 1981). Moreover, mycotoxins are resistant to heat treatment, therefore FB, ZEA and AF contamination, probably resulted from the conditions of the crop management and grain storage used as raw materials in feed formulation.

A few number of surveys have shown natural co-occurrence of mycotoxins in dog feed, however, after ingestion the interactive effect of mycotoxins could be synergistic or additive (Speijers and Speijers, 2004). In this study, co-occurrence by fumonisins and zearalenone (Table 2) were higher than those reported by Bohm et al. (2010), who found a co-occurrence of these mycotoxins in 33% of feed samples intended for dogs ( $n = 76$ ).

The combination of  $FB_1$  and ZEA produces a synergistic inhibition of porcine cell proliferation (Luongo et al., 2008).  $AFB_1$  and  $FB_1$  interaction had an additive effect in mice,

causing increased injuries to liver and kidneys of the experimental animals (Gelderblom et al. (2002).

Because of the economic impact, the potential toxic effects of mycotoxins, and considering that, in most countries, pet food is regulated by a maximum mycotoxin contamination for all feedstuffs rather than pet-specific legislation (Leung et al., 2006), these results demonstrate the need for monitoring mycotoxins levels and a specific regulation for mycotoxins in pet food.

#### *4.2 Exposure assessment of dogs to fumonisins, zearalenone and aflatoxins*

Although there is no specific legislation for mycotoxins in dog feed and few data about fumonisin, zearalenone and aflatoxin toxicity in dogs (Bruchim et al, 2011; Gajecka et al, 2011) it is possible to assess the exposure degree through the estimation of acceptable daily intake (ADI) and safe pet dietary level (SPDL).

Considering that NOAEL for FB<sub>1</sub> in a short-term study in pigs was 0.2 mg FB<sub>1</sub>/kg bw/day and that LOAEL for FB<sub>1</sub> at a dose of 0.4 mg FB<sub>1</sub>/kg bw/day lung lesions were observed in pigs (EFSA, 2005), the ADI and SPDL calculated were 20.00 µg fumonisins/Kg body weight bw/day and 2000 µg fumonisins/Kg dog feed, respectively.

Thus comparing the probable daily intake (1.823 µg fumonisins/Kg bw/day) with the ADI value (20.00 µg fumonisins/Kg body weight bw/day) and the mean level detected (91.68 µg fumonisins/Kg dog feed) with the SPDL (2000 µg fumonisins/Kg dog feed), 100% samples were safe for dog consumption.

For estimation of dog exposure to ZEA, it was adopted the NOAEL at a dose of 0.1 mg ZEA/Kg bw/day recommended by the European Food Safety Authority – EFSA (2011) in female pigs, considered the most sensitive animal for oestrogenic effect of zearalenone. Gajecka et al. (2011), reported toxic effects in dogs after intake of 20 µg ZEA/Kg bw/day

after 48 days. The calculated ADI was 10  $\mu\text{g}$  zearalenone/Kg bw/day and considering the probable daily intake (0.936  $\mu\text{g}$  zearalenone/Kg bw/day), 100% samples can be regarded as safe (table 3). On the other hand, LOAEL values have not been established because it was not possible to conclude that effects of ZEA at LOEL are adverse in terms of later fertility and reproductive performance. Thus it was not possible to calculate the SPDL.

Concerning aflatoxins, Bruchim et al. (2011) reported fatal aflatoxicosis in 50 dogs due to contaminated commercial diet with levels ranging from 80 to 300  $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ . According to the EFSA (2004), the margin between toxic doses ( $> 1.5 \mu\text{g g}^{-1}$  feed) and the statutory limit (20  $\text{ng g}^{-1}$  feed), of at least 75-fold, would provide adequate protection from adverse effects to animal health.

Moreover, the ADI and SPDL were calculated at 0.048  $\mu\text{g}$  aflatoxins/Kg bw/day and 6  $\mu\text{g}$  aflatoxins/Kg dog feed, respectively, therefore compared with probable daily intake (0.024  $\mu\text{g}$  aflatoxins/Kg bw/day) and the mean level detected (1.20  $\mu\text{g}$  aflatoxins/Kg dog feed), 100% samples were safe for dog consumption.

In general, these results indicate that dog feed traded in Londrina, Northern Parana State, Brazil, are safe concerning to exposure to FB, ZEA and AFs.

## **5. Conclusions**

Despite the high frequency of FB, ZEA and AF contamination in feed samples and although there are no specific guidelines for mycotoxin levels in pet food, the maximum levels detected for different mycotoxins were below the maximum allowed levels established for mycotoxins in animal.

The mean levels detected for FB, ZEA and AF and the probable daily intake values in comparison to acceptable daily intake and safe pet food level were low and the exposure degree of dogs could be assumed to be very low. However the co-occurrence of several mycotoxins, and therefore possible synergic or additive effects, should be taken into account when determining the maximum allowed levels or risk assessment.

These results indicate the need for specific legislation that meets safety standards for pet food, and thus contribute to improving the safety and quality of the final product, as well as animal health and Brazilian exports.

## **Acknowledgements**

The authors thank the FINEP, CNPq (the Brazilian Government Organisation for Grant Aid and Fellowship to Brazilian Researchers), the Araucária Foundation, PPSUS/Brazilian Ministry of Health, Paraná Fund/SETI and CAPES (Co-ordination for Formation of High Level Professionals) for the financial support.

## References

- ANFALPET, 2011. Perfil Pet 2011. Available on: [http://www.anfalpet.org.br/portal/pdf/mercado\\_pet/mercado%20pet%202011%20-%20folder.pdf](http://www.anfalpet.org.br/portal/pdf/mercado_pet/mercado%20pet%202011%20-%20folder.pdf). Access: 01 dez. 2011.
- ANVISA (2003). Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasil -Resolução RE nº 899, de 29/05/2003.
- Basalan, M., Hismiogullari, S.E., Hismiogullari, A.A., Filazi, A., 2004. Fungi and aflatoxin B1 in horse and dog feeds in Western Turkey. *Rev Med Vet.* 156:5, 248-252.
- Beuchat, L.R., 1981. Microbial Stability as Affected by Water Activity. *Cereal Foods World.* 26:7, 345-348.
- Bennet, J.W., Klich, M., 2003. Mycotoxins. *Clin Microbiol Rev.* 16:3, 497-516.
- Bohn, J., Koinig, L., Razzazi-Fazeli, E., Blajet-Kosicka, A., Twaruzek, M., Grajewski, J., Lang, C., 2010. Survey and risk assessment of the mycotoxins deoxynivalenol, zearalenone, fumonisins, ochratoxin A, and aflatoxins in commercial dry dog food. *Mycotox Res.* 26, 147-153.
- Bruchim, Y., Segev, G., Sela, U., Bdolah-Abram, T., Salomon, A., Aroch, I., 2011. Accidental fatal aflatoxicosis due to contaminated commercial diet 50 dogs. *Res. Vet. Sci.* doi:10.1016/j.rvsc.2011.07.024.
- Cahagnler, B., Melclon, D., Richard-Molard, D., 1995. Growth of *Fusarium moniliforme* and its biosynthesis of fumonisin B1 on maize grain as a function of different water activities. *Lett Appl Microbiol.* 20, 247-251.
- Council for Agricultural Science and Technology (CAST)., 2003. Mycotoxins: Risks in Plant, Animal and Human Systems. Task Force Report. 139, Iowa, USA.

- 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., 2008. Mycobiota and aflatoxins in raw materials and pet food in Brazil. *J Anim Physiol Anim Nutr.* 92, 377–383.
- Carciofi, A. C., 2008. IV Curso Teórico-Prático sobre Nutrição de Cães e Gatos: uma visão industrial. Jaboticabal:FUNEP.
- Carpim, W.G., Oliveira, M.C., 2009. Qualidade nutricional de rações secas para cães adultos comercializadas em Rio Verde-GO. *Rev Biotemas.* 22:2, 181-186.
- Case, L.P., Daristotle, L., Hayek, M.G., Raasch, M.F., 2011. Canine and feline nutrition: a resource for companion animal professionals. 3<sup>rd</sup> ed. Mosby Elsevier:Missouri, 538.
- Chu, F.S., Li, G.Y., 1994. Simultaneous Occurrence of Fumonisin B1 and Other Mycotoxins in Moldy Corn Collected from the People's Republic of China in Regions with High Incidences of Esophageal Cancer. *Appl Environ Microbiol.* 60:3, 847-852.
- Copetti, M.V., 2005. Mycological evaluation of commercial dogs and cats feed and mycotoxigenic potential of selected species. 2005. 68 f. Dissertation (Master veterinary science) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- De Saeger, S., Sibanda, L., Van Peteghema, C., 2003. Analysis of zearalenone and  $\alpha$ -zearalenol in animal feed using high-performance liquid chromatography. *Anal Chim Acta.* 487, 137–143.
- Doll, S., Danicke, S., 2011. The Fusarium toxins deoxynivalenol (DON) and zearalenone (ZON) in animal feeding. *Prev Vet Med.* 102, 132–145.
- EFSA., 2004. European Food Safety Authority. Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in Food Chain on a request from the Commission related to Aflatoxin B1 as undesirable substances in animal feed. *The EFSA Journal.* 39, 1-27.

- EFSA., 2005. 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*. 235, 1 – 32.
- EFSA., 2011. European Food Safety Authority Scientific Opinion on the risks for public health related to the presence of zearalenone in food. *The EFSA Journal*. 9:6, 2197.
- Gajecka, M., Rybarczyk, L., Zwierzchowski, W., Jakmiuk, A., Zielonka, L., Obremski, K., Gajecki, M., 2011. The effect of experimental, long-term exposure to low-dose zearalenone mycotoxicosis on the histological condition of ovaries in sexually immature gilts. *Theriogenology*. 75, 1085–1094.
- Garland, T., Reagor, J., 2000. Chronic canine aflatoxin and management of an epidemic. In: X International IUPAC Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins. Guarujá. Official Program and Abstract Book.
- Gelderblom, W.C.A., Kriek, N.P.J., Marasas, W.F.O., Thiel, P.G., 1991. Toxicity and carcinogenicity of the *Fusarium moniliforme* metabolite, fumonisin B1 in rats. *Carcinogenesis*. 12:1-2, 1247-1251.
- Gelderblom, W.C.A., Marasas, W.F.O., Lebepe-Mazur, S., Swanevelder, S., Vessey, C.J., Hall, P., 2002. Interaction of FBs B1 and aflatoxin B1 in a short term carcinogenesis model in rat liver. *Toxicology*. 171, 161–173.
- Jiménez, M., Mánez, M., Hernández, E., 1996. Influence of water activity and temperature on the production of zearalenone in corn by three *Fusarium* species. *Food Microbiol.* 29, 417-421.
- Harrison, L. R., Colvin, B. M., Green, J. T., Newman, L. E., Cole, J. R., 1990. Pulmonary edema and hydrothorax in swine produced by fumonisin B1, a toxic metabolite of *Fusarium moniliforme*. *J Vet Diagn Invest*. 2:3, 217–221.

- IARC – INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER., 2002. Some mycotoxins – Aflatoxins. In: IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Some Traditional Herbal Medicines, Some Mycotoxins, Naphthalene and Styrene. 82, 171-300.
- IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA., 2010. Censo Demográfico 2010. Available: <  
<http://www.ibge.gov.br/cidadesat/xtras/perfil.php?r=2&codmun=411370#>>. Acess:  
18.06.2012
- IPCS/GEMS – INTERNACIONAL PROGRAMME ON CHEMICAL SAFETY, 1995. Food Euro workshop on reliable evaluation of low level contamination of food. Appendix 5, Germany, May.
- Leung, M.C.K., Az-Allano, G., Smith, T.K., 2006. Mycotoxins in Pet Food: A Review on Worldwide Prevalence and Preventative Strategies. *J Agric Food Chem.* 54, 9623–9635.
- Luongo, D., De Luna, R.D., Russo, R., Severino, L., 2008. Effects of four Fusarium toxins (FBs B<sub>1</sub>,  $\alpha$ -zearalenol, nivalenol and DON) on porcine whole-blood cellular proliferation. *Toxicon.* 52, 156–162.
- Marasas, W.F.O., Kellerman, T.S., Gelderblom, W.C.A., Coetzer, J.A.W., Thiel, P.G., Vanderlugt, J.J., 1988. Leukoencephalomalacia in a horse induced by fumonisin B1 isolated from *Fusarium moniliforme*. *Onderstepoort J Vet Res.* 55:4, 197-203.
- Marasas, W.F.O., 2001. Discovery and Occurrence of the Fumonisins: A Historical Perspective. *Environ Health Perspect.* 109:2, 239-243.
- Martins, M.L., Martins, H.M., Bernardo, F., 2003. Flora fúngica e pesquisa de micotoxinas em alimentos para animais de companhia. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias.* 98:548, 179-183.

- Minervini, F., Dell'Aquila, M.E., 2008. Zearalenone and Reproductive Function in Farm Animals. *Int J Mol Sci.* 9, 2570-2584.
- Miyamoto, K., Hamada, A., 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, Kagawa University.* 60:113, 75-81.
- Montani, M.L., Vaamonde, G., Resnik, S.L., Buera, P., 1988. Influence of water activity and temperature on the accumulation of zearalenone in corn. *Int J Food Microbiol.* 6, 1-8.
- Mousa, W., Ghazali, F.M., Jinap, S., Ghazali, H.M., 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. *J Appl Microbiol.* 111, 1262–1274.
- Newman, S.J., Smith, J.R., Stenske, K.A., Newman, L.B., Dunlap, J.R., Imerman, P.T., Kirk, C.A., 2007. Aflatoxicosis in nine dogs after exposure to contaminated commercial dog food. *J Vet Diagn Invest.* 19, 168-175.
- Peraica, M., Radic, B., Lucic, A., Pavlovic, M., 1999. Toxic effects of mycotoxins in humans. *Bulletin of the World Health Organization.* 77:9.
- Rheeder, J.P., Marasas, W.F.O., Vismer, H.F., 2002. Production of Fumonisin Analogs by *Fusarium* Species. *Appl Environ Microbiol.* 68:5, 2101–2105.
- Sabater-Vilar, M., Malekinejad, H., Selman, M.H.J., Van der Doelen, M.A.M., Fink-Gremmels, J., 2007. In vitro assessment of adsorbents aiming to prevent deoxynivalenol and zearalenone mycotoxicoses. *Mycopathologia.* 163, 81-90.
- Scudamore, K.A., Hetmanski, M.T., Nawas, S., Naylor, J., Rainbird, S., 1997. Determination of mycotoxins in pet foods sold for domestic pets and wild birds using linked-column immunoassay clean-up and HPLC. *Food Addit Contam.* 14, 175–186.

- Scussel, V.M., Giordano, B.N.E. Simão, V., Rocha, M.W., Reis, L.F.C., Xavier, J.J.M., 2006. Mycotoxin evaluation in feed for pets using tandem liquid chromatography mass/mass. 9th International Working Conference on Stored Product Protection. 182-188.
- Sharma, M., Márquez, C., 2001. Determination of Aflatoxins in domestic pet food (dog and cat) using immunoaffinity column and HPLC. *Anim Feed Sci Tech.* 93, 109-114.
- Shephard, G.S., Sydenham, E.W., Thiel, P.G., 1990. Quantitative determination of fumonisins B1 and B2 by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J Liq Chromatogr.* 13:10, 2077-2087.
- Shier, W.T., 1998. Estrogenic mycotoxins. *Rev Med Vet.* 149:6, 599-604.
- Smith, G.W., Constable, P.D., Bacon, C.W., Meredith, F.I., Haschek, W.M., 1996. Cardiovascular Effects of Fumonisins in Swine. *Fundam Appl Toxicol.* 31, 169-172.
- Speijers, G.J.A., Speijers, M.H.M., 2004. Combined toxic effects of mycotoxins. *Toxicol Lett.* 153, 91-98.
- Stenske, K.A., Smith, J.R, Newman, S.J., Newman, L.B., Kirk, C., 2006. A. Aflatoxicosis in dogs and dealing with suspected contaminated commercial foods. *J Am Vet Med Assoc.* 228:11, 1686-1691.
- Sundlof, S.F., Strickland, C., 1986. Zearalenone and zearanol: potential residue problems in livestock. *Vet Hum Toxicol.* 28, 242–250.
- Thompson, A. Ingredients: Where Pet Food Starts. *Top Companion Anim Med.* 23:3.
- Ueno, Y., Aoyama, S., Sugiura, Y., 1993. A limited survey of fumonisins in corn and corn-based products in Asian countries. *Mycotoxin Res.* 9, 27-34.
- Wogan, G. N., 1969. Metabolism and biochemical effects of aflatoxins. In *Aflatoxin*. London: Academic Press. 152–186.

Table 1  
Water activity, fumonisin, zearalenone and aflatoxin levels in 100 feed samples intended for dogs

	Water activity (aw)	Fumonisin ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )			Zearalenone ( $\text{ng g}^{-1}$ )	Aflatoxins ( $\text{ng g}^{-1}$ )
		FB <sub>1</sub>	FB <sub>2</sub>	FB <sub>1</sub> + FB <sub>2</sub>		
<b>Positive samples (%)</b>	-	68	35	-	95	68
<b>Mean</b>	0.61	0.09	0.07	0.12	49.20	1.54
<b>Median</b>	0.64	0.08	0.07	0.10	29.61	1.44
<b>Range</b>	0.38 – 0.82	0.02 – 0.22	0.04 – 0.16	0.03 – 0.38	5.45 – 442.24	0.34 – 3.88

Detection limit (D.L) fumonisins: FB<sub>1</sub> = 0.0275  $\mu\text{g.g}^{-1}$ ; FB<sub>2</sub> = 0.0353  $\mu\text{g.g}^{-1}$

D.L zearalenone: 3.95  $\text{ng.g}^{-1}$

D.L aflatoxins: AFB<sub>1</sub>=0.128  $\text{ng.g}^{-1}$ ; AFG<sub>1</sub>=0.027  $\text{ng.g}^{-1}$ ; AFB<sub>2</sub>=0.593  $\text{ng.g}^{-1}$ ; AFG<sub>2</sub>=0.222  $\text{ng.g}^{-1}$  .

Figure 1  
Distribution of fumonisins levels (FB<sub>1</sub> + FB<sub>2</sub>) in 100 feed samples intended for dogs

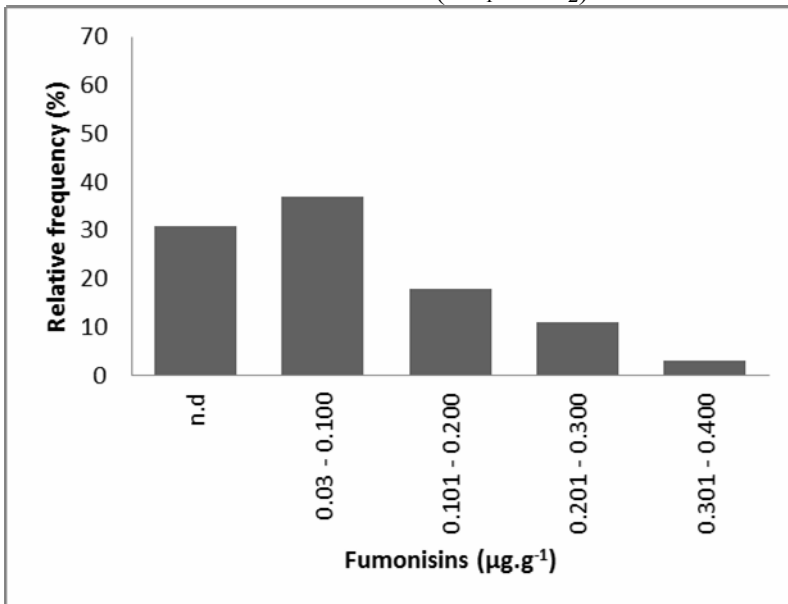


Figure 2  
Distribution of zearalenone levels in 100 feed samples intended for dogs

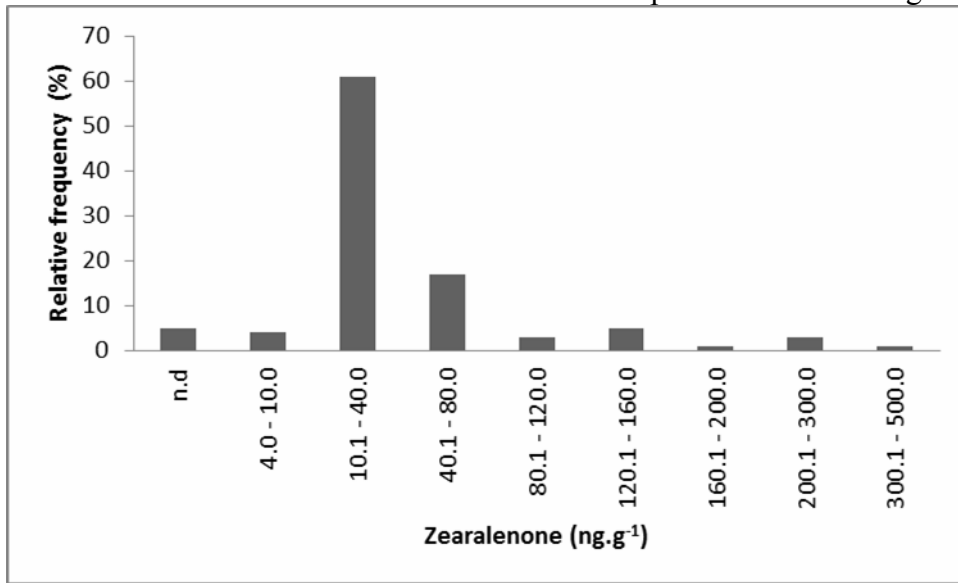


Figure 3  
Distribution of aflatoxin levels in 100 feed samples intended for dogs

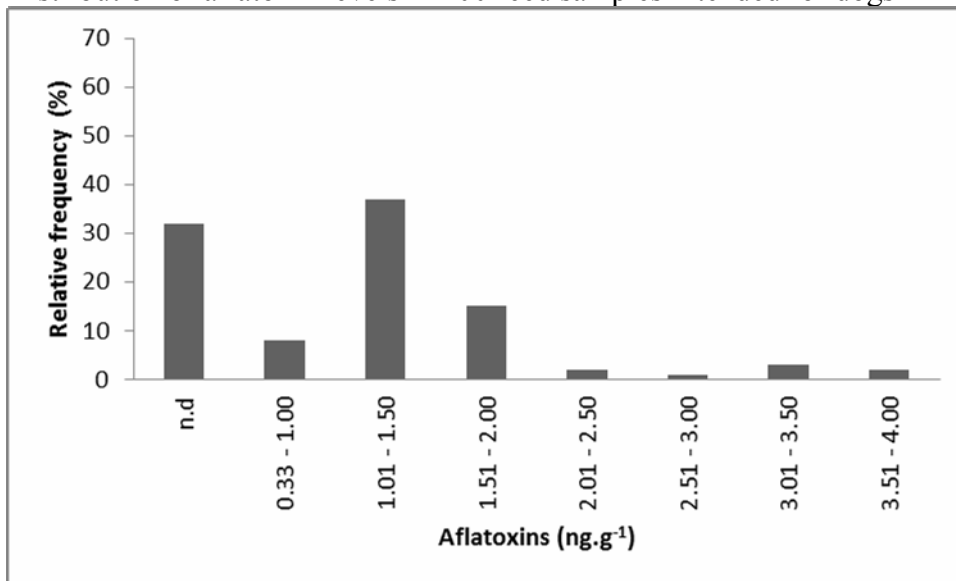


Table 2

Fumonisin, zearalenone and aflatoxin co-occurrence in 100 feed samples intended for dogs from Northern Paraná State, Brazil, 2011.

<b>Co-occurrence</b>	<b>N</b>	<b>Positive samples (%)</b>
Fumonisin + zearalenone	100	68
Zearalenone + aflatoxins	100	66
Fumonisin + aflatoxins	100	51
Fumonisin + Zearalenone + aflatoxins	100	50

Table 3

Probable daily intake of mycotoxins in dog feed, acceptable daily intake (ADI) and safe pet dietary level (SPDL), Northern Parana State, Brazil, 2011.

	<b>Mean level detected (<math>\mu\text{g}\cdot\text{Kg}^{-1}</math>)<sup>a</sup></b>	<b>Probable daily intake (<math>\mu\text{g} /</math> <math>\text{Kg}/ \text{day}</math>)<sup>b</sup></b>	<b>ADI (<math>\mu\text{g} /</math> <math>\text{Kg bw}</math>)<sup>b</sup></b>	<b>SPDL (<math>\mu\text{g} / \text{Kg}</math> pet food)<sup>b</sup></b>
Fumonisin	91.68	1.823	20.00	2000
Zearalenone	46.84	0.936	10.00	-
Aflatoxins	1.20	0.024	0.048	6

a. Mean level detected by HPLC.

b. Considering an adult beagle dog (12 kg) consuming an average of 240 grams of feed per day, calculated by the formula: Amount of food (g/day) = the animal's energy requirement (kcal/day) / metabolizable energy of food (kcal/g).

## **6 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

As amostras de ração destinada a cães apresentaram uma alta frequência de contaminação por fumonisinas, zeralenona e aflatoxinas.

A maioria das amostras apresentou contaminação por mais de uma micotoxina evidenciando a necessidade de medidas de prevenção e monitoramento da contaminação natural no processo de fabricação de ração destinada a cães, uma vez que a ocorrência de micotoxinas pode produzir efeitos aditivos e sinérgicos que podem prejudicar a saúde animal e causar prejuízos financeiros.

A avaliação do grau de exposição mostrou que as rações analisadas são seguras para o consumo de cães, no entanto, devido a importância econômica é necessário buscar parâmetros de segurança que possibilitem o estabelecimento de uma legislação específica para micotoxinas neste tipo de alimento.

## REFERÊNCIAS

- ANFALPET. **Perfil Pet 2011**. 2011. Disponível em:<[http://www.anfalpet.org.br/portal/pdf/mercado\\_pet/mercado%20pet%202011%20-%20folder.pdf](http://www.anfalpet.org.br/portal/pdf/mercado_pet/mercado%20pet%202011%20-%20folder.pdf)>. Acesso em: 01 dez. 2011.
- ANKLAM, E.; STROKA, J.; BOENKE, A. Acceptance of analytical methods for implementation of EU legislation with a focus on mycotoxins. **Food Control**, v. 13, p. 173-183, 2002.
- ASAO, T.; BUCHI, G.; ABDEL-KADER, M.M.; CHANG, S.B. WICK, E.L.; WOGAN, G.N. Aflatoxins B and G. **Journal of American Chemical Society**, v. 85, p. 1706–1707, 1963.
- BAILLY, J.D. et al. Canine aflatoxicosis: reported case and review of the literature. **Revue de Médecine Veterinaire**, v.148, n.11, p.907-914, 1997.
- BASALAN, M. et al. Fungi and aflatoxin B1 in horse and dog feeds in Western Turkey. **Revue de Médecine Vétérinaire**, v. 156, n. 5, p. 248-252, 2004.
- BATATINHA, M. J. M. et al. Fumonisin in brewers grain (barley) used as dairy cattle feed in the State of Bahia, Brazil. **Food Control**. v. 18, p. 608–612, 2007.
- BAUER, J. Mycotoxins in feedstuffs for ruminants: biochemical effects and clinical relevance. In: **Recent developments and perspectives in bovine medicine**: Keynote lectures of the XXII World Buiatrics Congress. Germany: Klinik fur RinderKrankheiten; 2002.
- BENNET, J. W.; KLICH, M. Mycotoxins. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 16, n. 3, p. 497-516, 2003.
- BERTHILLER, F. et al. Chromatographic methods for the simultaneous determination of mycotoxins and their conjugates in cereals. No prélogo. **International Journal of Food Microbiology**, 2007.
- BEZUIDENHOUT., S.C. et al. Structure elucidation of the fumonisins, mycotoxins from *Fusarium moniliforme*. **Journal of the Chemical Society, Chemical Communications**, 1988.
- BETINA, V. Mycotoxins Production, Isolation, Separation and Purification. **Developments in Food Science**, v. 8, p. 528, 1984.
- BETINA, V. Structure-activite relationships among mycotoxins. **Chem. Biol. Interactions**, v. 71, p. 105-146, 1989.
- BINDER, E. M. et al. Worldwide occurrence of mycotoxins in commodities, feeds and feed ingredients. **Animal feed science and technology**, v. 137, p. 265-282, 2007.
- BLOUNT. W.P. Turkey "X" disease. **Turkeys**. v. 9, p. 52, 1961.

BÖHN, J. et al. Survey and risk assessment of the mycotoxins deoxynivalenol, zearalenone, fumonisins, ochratoxin A, and aflatoxins in commercial dry dog food. **Mycotox Res**, v. 26, p. 147-153, 2010.

BRASIL. Ministério da Agricultura nº 7, de 09 de novembro de 1988. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, 1988. seção 1, p. 21.968.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 8, de 11 de outubro de 2002. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, 2002. seção 2, p.1-6.

BRASIL. Resolução nº899, de 29 de novembro de 2003. Determina a publicação do "Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos". **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, 2003.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 30, de 05 de agosto de 2009. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, 2009. seção 1, p.13.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária nº 37, de 22 de fevereiro de 2011. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, 2011. seção 1, p.72-73.

BROGGI, L. E. et al. Natural occurrence of aflatoxins, deoxynivalenol, fumonisins and zearalenone in maize from Entre Rios Province, Argentina. **Mycotoxin Research**, v. 23, n. 2, p. 59-64, 2007.

BRUCHIM, Y. et al. Accidental fatal aflatoxicosis due to contaminated commercial diet 50 dogs. **Research in Veterinary Science**, 2011. Disponível em:<<http://www.elsevier.com/10.1016/j.rvsc.2011.07.024>>. Acesso em: 02 dez. 2011.

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

CAHAGNLER, B.; MELCLON, D.; RICHARD-MOLARD, D. Growth of *Fusarium moniliforme* and its biosynthesis of fumonisin B1 on maize grain as a function of different water activities. **Letters in Applied Microbiology**, v. 20, p. 247-251, 1995.

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; 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.

CARCIOFI, A. C. IV Curso Teórico-Prático sobre Nutrição de Cães e Gatos: uma visão industrial. Jaboticabal:FUNEP, 2008. 80 p.

CARPIM, W. G; OLIVEIRA, M. C. Qualidade nutricional de rações secas para cães adultos comercializadas em Rio Verde-GO. **Revista Biotemas**, v. 22, n. 2, p.181-186, 2009.

CARVALHO, Rodrigo Alcântara de. **Avaliação do biomarcador (Esfingosina/Esfinganina) como fator de exposição às fumonisinas em frangos de corte**. 2006. 102 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Veterinária) – Curso de Pós-graduação em Microbiologia Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2006.

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

CAST - COUNCIL FOR AGRICULTURAL SCIENCE AND TECHNOLOGY. Mycotoxins: Risks in Plant, Animal and Human Systems. **Task Force Report**. v. 139, Iowa, 2003.

CHAFFEE, V.W.; EDDS, G.T.; HIMES, J.A. Aflatoxicosis in dogs. *American Journal of Veterinary Research*, v. 30, p. 1737–1749, 1969.

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

CHU, F.S.; LI, G.Y. Simultaneous Occurrence of Fumonisin B1 and Other Mycotoxins in Moldy Corn Collected from the People's Republic of China in Regions with High Incidences of Esophageal Cancer. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, n. 3, p. 847-852, 1994.

COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES. Commission Regulation (EC) N°. 401/2006 of 23 February 2006 laying down the methods of sampling and analysis for the official control of the levels of mycotoxins in foodstuffs. **Official Journal of the European Union**, v. 70, p. 12-34, 2006.

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

COPETTI, M. V. **Avaliação microbiológica de rações comerciais para cães e gatos e potencial micotoxinogênico de espécies selecionadas**. 2005. 68 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

COPETTI, M. V. et al. Aflatoxigenic fungi and aflatoxin in cocoa. **International Journal of Food Microbiology**, v. 148, p. 141-144, 2011.

CORTEZ-ROCHA, M. O. et al. Fumonisin and Fungal Species in Corn from Sonora, Mexico. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 70, p. 668–673, 2003.

CRUZ, J. V. S. **Ocorrência de aflatoxinas e fumonisinas em produtos à base de milho e milho utilizado como ingrediente em ração para animais de companhia, comercializados na região de Pirassununga, Estado de São Paulo**. 2010. 88 f. Dissertação (Doutorado em Zootecnia) – Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2010.

CUCCIOLONI, M. et al. Aflatoxin B1 misregulates the activity of serine proteases: Possible implications in the toxicity of some mycotoxins. **Toxicology in Vitro**, v. 23, p. 393-399, 2009.

DECASTELLI, L. et al. Aflatoxins occurrence in milk and feed in Northern Italy during 2004–2005. **Food Control**, v. 18, p. 1263–1266, 2007.

DE SAEGER, S.; SIBANDA, L.; VAN PETEGHEMA, C. Analysis of zearalenone and  $\alpha$ -zearalenol in animal feed using high-performance liquid chromatography. **Analytica Chimica Acta**, v. 487, p. 137–143, 2003.

DILKIN, P. et al. Intoxicação experimental de suínos por fumonisinas. **Ciência Rural**, v.34, n.1, p.175-181, 2004.

DOERR, J.A. et al. Effects of low level chronic aflatoxicosis in broiler chickens. **Poultry Science**, v. 62, p. 1971-1977, 1983.

DOLL, S.; DANICKE, S. The *Fusarium* toxins deoxynivalenol (DON) and zearalenone (ZON) in animal feeding. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 102, p. 132–145, 2011.

DOMIJAN, A. M.; ZELJEZI, D.; MILI, M.; PERAICA, M. Fumonisin B<sub>1</sub>: Oxidative status and DNA damage in rats. **Toxicology**, v. 232, p. 163–169, 2007.

ELGIER, A. M. et al. Communication between domestic dogs (*Canis familiaris*) and humans: Dogs are good learners. **Behavioural Processes**. v. 81, p. 402–408, 2009.

GAJECKA, M. et al. Histopathological and immunohistochemical examinations, and changes in proliferation activity of the uterus in bitches following zearalenone micotoxycosis. **Polish Journal of Veterinary Sciences**, v.10, n. 3, p. 143-151, 2007.

GAJECKA, M. et al. Histopathological examination of ovaries in bitches after experimental zearalenone mycotoxycosis. **Polish Journal of Veterinary Sciences**, v. 11, n. 4, p. 363-366, 2008a.

GAJECKA, M. et al. Ultrastructural changes of ovarian follicle and corpus luteum after experimental zearalenone mycotoxycosis in bitch. **Polish Journal of Veterinary Sciences**, v. 11, n. 4, p. 327-337, 2008b.

GARLAND, T.; REAGOR, J. Chronic canine aflatoxin and management of an epidemic. In: X International IUPAC Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins, 2000, Guarujá. **Official Program and Abstract Book**, Maio 2000, p.110.

GELDERBLOM, W.C.A.; KRIEK, N.P.J.; MARASAS, W.F.O.; THIEL, P.G. Toxicity and carcinogenicity of the *Fusarium moniliforme* metabolite, fumonisin B<sub>1</sub> in rats. **Carcinogenesis**, v.12, n.1-2, p.1247-1251, 1991.

GERMONPRE, M. et al. Fossil dogs and wolves from Palaeolithic sites in Belgium, the Ukraine and Russia: osteometry, ancient DNA and stable isotopes. **Journal of Archaeological Science**. v. 36, p. 473–490, 2009.

GOLDBLATT, L.A. Control and removal of aflatoxin. **Journal of the American Oil Chemists’ Society**. v. 48, p. 605-610, 1971.

GUMPRECHT, L. A. et al. Effects of Intravenous Fumonisin B<sub>1</sub> in Rabbits: Nephrotoxicity and Sphingolipid Alterations. **Natural Toxins**, v. 3, p. 395-403, 1995.

- HE, Q.; RILEY, R.T.; SHARMA, R.P. Fumonisin-Induced Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  Expression in a Porcine Kidney Cell Line Is Independent of Sphingoid Base Accumulation Induced by Ceramide Synthase Inhibition. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 174, p. 69–77, 2001.
- HERZALLAH, S. M. Determination of aflatoxins in eggs, milk, meat and meat products using HPLC fluorescent and UV detectors. **Food Chemistry**, v. 114, p. 1141-1146, 2009.
- HUFFMAN, J; GERBER, R; DU, L. Recent Advancements in the Biosynthetic Mechanisms for Polyketide-Derived Mycotoxins. Biopolymers, **National Institute of Health**, v. 93, n. 9, p. 764-776, 2010.
- HUMPF, H. U.; VOSS, K. Effects of thermal food processing on the chemical structure and toxicity of fumonisin mycotoxins. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 48, p. 255 – 269, 2004.
- HUSSEIN, H.S.; BRASEL, J.M. Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. **Toxicology**, v. 167, p. 101–134, 2001.
- IARC – INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. Some mycotoxins – Aflatoxins, p. 171-300. In: **IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Some Traditional Herbal Medicines, Some Mycotoxins, Naphthalene and Styrene**, v. 82, 2002.
- IARC – INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. Zearalenone, Deoxynivalenol, Nivalenol And Fusarenone X, p. 397-444. In: **IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Some Traditional Herbal Medicines, Some Mycotoxins, Naphthalene and Styrene**, v. 56, 1997.
- IBÁÑEZ-VEA, M. et al. Validation of a UHPLC-FLD method for the simultaneous quantification of aflatoxins, ochratoxin A and zearalenone in barley. **Food Chemistry**, v. 127, p. 351-358, 2011.
- IBGE. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Censo Demográfico 2010. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/cidadesat/xtras/perfil.php?r=2&codmun=411370#>>. Acesso em: 18.06.2012.
- JAIMEZ, J. et al. Application of the assay of aflatoxins by liquid chromatography with fluorescence detection in food analysis. **Journal of chromatography**, v. 882, p. 1-10, 2000.
- JECFA. **Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives**. Fifty-third Meeting. Summary and Conclusions. World Health Organization, Geneva. 2000. Disponível em: <<http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v44jec14.htm>>. Acesso: 02 dez. 2011.
- JIMÉNEZ, M.; MÁNEZ, M.; HERNÁNDEZ, E. Influence of water activity and temperature on the production of zearalenone in corn by three *Fusarium* species. **Food Microbiology**, v. 29, p. 417-421, 1996.
- JÚNIOR, S. N.; NOGUEIRA, E. A. Rações: o robusto segmento pet food. **Análises e Indicadores do Agronegócio**. v. 6, n. 5, mai, 2011. Disponível em: <<http://www.iea.sp.gov.br/out/LerTexto.php?codTexto=12131>>. Acesso em: 01 dez. 2011.

- KAWAMURA, O. et al. A monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay of aflatoxin B<sub>1</sub> in peanut products. **Mycotoxin Research**, v.4, p.75-87, 1988.
- KETTERER, P.J. et al. Canine aflatoxicosis. *Australian Veterinary Journal*, v. 51, p. 355–357, 1975.
- KHAYOON, W, S. et al. Determination of aflatoxins in animal feeds by HPLC with multifunctional column clean-up. **Food Chemistry**, v. 118, p. 882-886, 2010.
- KLICH, M.A. et al. Molecular and physiological aspects of aflatoxin and sterigmatocystin biosynthesis by *A. tamarii* and *A. ochraceoroseus*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.53, p.605–609, 2000.
- KORMAN, T.P. et al. Structure and function of an iterative polyketide synthase thioesterase domain catalyzing Claisen cyclization in aflatoxin biosynthesis. **Proceedings of the National Academy of Science**, v. 107, n. 14, p. 6246–6251, 2010.
- KRSKA, R.; WELZIG, E.; BOUDRA, H. Analysis of Fusarium toxins in feed. **Animal Feed Science and Technology**, v. 137, p. 241–264, 2007.
- KRSKA, R. et al. Mycotoxin analysis: An update. **Food Additives and Contaminants**, v. 25, n. 2, p. 152-163, 2008.
- LEESON, S.; DIAZ, G.J.; SUMMERS, J.D. **Poultry metabolic disorders and mycotoxins**. Guelph, University Books, 1995, 352p.
- LEUNG, M. C. K.; AZ-LLANO, G.; SMITH, T. K. Mycotoxins in Pet Food: A Review on Worldwide Prevalence and Preventative Strategies. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 9623–9635, 2006.
- LINO, C. M.; SILVA, L. J. G.; PENA, A. S. Fumonisin: presença em alimentos, implicações na saúde e aspectos legislativos. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinária**, v. 99, n. 552, p. 181-192, 2004.
- LINO, C.M.; SILVA, L.J.G.; PENA, A.S. Avaliação da exposição às fumonisin: biomarcadores. **Revista Português de Ciências Veterinárias**. v. 102, p. 5-15, 2007.
- LUTFULLAH, G; HUSSAIN, A. Studies on contamination level of aflatoxins in some cereals and beans of Pakistan. **Food Control**, v. 23, p. 32-36, 2011
- MANOVA, R; MLADENOVA, R. Incidence of zearalenone and fumonisins in Bulgarian cereal production. **Food Control**, v. 20, p. 362-365, 2009.
- MARASAS, W.F.O. et al. 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.
- MARASAS, W.F.O. Discovery and Occurrence of the Fumonisin: A Historical Perspective. **Environmental Health Perspectives**, v. 109, n. 2, p. 239-243, 2001.
- MCLEAN, M; DUTTON, M, F. Cellular interactions and metabolism of aflatoxin: An update. **Pharmac. Ther**, v. 65, p. 163-192, 1995.

- MARTINS, José Márcio Pimentel. **Avaliação do biomarcador (esfinganina/esfingosina) na intoxicação por fumonisinas em suínos**. 2005. 36 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Veterinária). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. 2005.
- MARTINS, M, L; MARTINS, H, M; BERNARDO, F. Flora fúngica e pesquisa de micotoxinas em alimentos para animais de companhia. **Revista portuguesa de ciências veterinárias**, v. 98, n. 548, p. 179-183, 2003.
- MAZZANI, C. et al. Occurrence of *Fusarium moniliforme* and fumonisins in kernels of maize hybrids in Venezuela. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 32, p. 345-349, 2001.
- MERRILL, A. H., Jr. et al. Fumonisin and other inhibitors of de novo sphingolipid biosynthesis. **Advances Lipid Research**, v.26, p.215–234, 1993.
- MERRILL, A.H. et al. Sphingolipid metabolism: roles in signal transduction and disruption. **Environmental Health Perspectives**. v. 109, n. 2, 2001.
- MINERVINI, F.; DELL'AQUILA, M.E. Zearalenone and Reproductive Function in Farm Animals. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 9, p. 2570-2584, 2008.
- MIYAMOTO, K.; HAMADA, A.; KAWAMURA, O. 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 University, v.60, n. 113, p. 75-81, 2008.
- MONTANI, M.L. et al. Influence of water activity and temperature on the accumulation of zearalenone in corn. **International Journal of Food Microbiology**, v. 6, p. 1-8, 1988.
- MORENO, E. C. et al. 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. Economic Importance of Mycotoxins- Recent Incidence. **International Biodeterioration**, v. 27, p. 195-204, 1991.
- MOSS, M. Risk assessment for aflatoxins in foodstuffs. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 50, p. 137–142, 2002.
- MOUSA, W. et al. 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**, v. 111, p. 1262–1274, 2011.
- NELSON, P. E.; DESJARDINS, A. E.; PLATTNER, R. D. Fumonisin, mycotoxins produced by *Fusarium* species: biology, chemistry, and significance. *Annual Review of Phytopathology*, v. 31, p. 233-252, 1993.
- NEWMAN, S. J. et al. 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. et al. Time- and Dose-Response Effects of the Mycotoxin, Fumonisin B1 on Sphingoid Base Elevations in Precision-cut Rat Liver and Kidney Slices. **Toxicology in Vitro**, v. 10, p. 349-358, 1996.

- NURYONO, N. et al. 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.
- OLIVEIRA, G. R. et al. Mycobiota in poultry feeds and natural occurrence of aflatoxins, fumonisins and zearalenone in the Rio de Janeiro State, Brazil. **Mycopathologia**, v. 162, p. 355–362, 2006.
- ONO, E.Y.S. et al. Fumonisin in corn: correlation with *Fusarium* sp. count, damaged kernels, protein and lipid content. **Brazilian Archives of Biology and Technology - An International Journal**, v.49, n.1, p. 63-71, 2006.
- ONO, E. Y. et al. Effect of climatic conditions on natural microflora in fumonisins freshly harvested corn of the state of Paraná, Brazil. **Mycopathologia**, v.147, p.139–148, 1999.
- ONO, E. Y. S. et al. Micotoxinas em alimentos: Progressos na imunodectecção. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v. 32, p. 69-80, 2004.
- ONO, E.Y.S. et al. Implication of pre-drying steps with natural fumonisin contamination levels in freshly harvested corn. **World Mycotoxin Journal**, v.1, n.3, p.341-347, 2008.
- OTHMEN, Z.O. et al. Cytotoxicity effects induced by Zearalenone metabolites,  $\alpha$  Zearalenol and  $\beta$  Zearalenol, on cultured Vero cells. **Toxicology**, v. 252, p. 72–77, 2008.
- PAVÃO, A.C; SOARES NETO, L.A; FERREIRA NETO, J; LEÃO, M. B. C. Structure and activity of aflatoxins B and G. **Journal of Molecular Structure (Theochem)**, v. 337, p. 57-60, 1995.
- PERAICA, M. et al. Toxic effects of mycotoxins in humans. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 77, n. 9, 1999.
- PETERSON, S.W. et al. *Aspergillus bombycis*, a new aflatoxigenic species and genetic variation in its sibling species, *A. nomius*. **Mycologia**, v.93, p.689–703, 2001.
- PET FOOD BRASIL. São Paulo: Editora Stilo. n. 9, jul-ago, 2010.
- PET FOOD BRASIL. São Paulo: Editora Stilo. n. 14, maio-jun, 2011.
- PRANDINI, A. et al. On the occurrence of aflatoxin M1 in milk and dairy products. **Food and Chemical Toxicology**, v. 47, p. 984-991, 2009.
- RAWAL, S; KIM, J. E; COULOMBE JR, R; Aflatoxin B1 in poultry: Toxicology, metabolism and prevention. **Research in Veterinary Science**, v. 89, p. 325–331, 2010.
- RENTZ, S.S. et al. Inhibition of sphingolipid biosynthesis decreases phosphorylated ERK2 in LLC-PK1 cells. **Food and Chemical Toxicology**, v. 43, p. 123–131, 2005.
- RHEEDER, J. P. et al. Production of Fumonisin Analogs by *Fusarium* Species. **Applied And Environmental Microbiology**, v. 68, n. 5, p. 2101–2105, 2002.
- RILEY, R.T. et al. Evidence for disruption of sphingolipid metabolism as a contributing factor in the toxicity and carcinogenicity of fumonisins. **Natural toxins**. v. 4, p. 3-15, 1996.

- RILEY, R.T. et al. Alteration of tissue and serum sphinganine to sphingosine ratio: an early biomarker of exposure to fumonisin-containing feeds in pigs. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 118, p. 105-112, 1993.
- ROSS, P.F. et al. 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**, v.56, p. 3225-3226, 1990.
- RUMORA, L. et al. Mycotoxin fumonisin B1 alters cellular redox balance and signalling pathways in rat liver and kidney. **Toxicology**, v. 242, p. 31–38, 2007.
- SABATER-VILAR, M. et al. In vitro assessment of adsorbents aiming to prevent deoxynivalenol and zearalenone mycotoxicoses. **Mycopathologia**, v. 163, p. 81–90, 2007.
- SALAY, E.; MERCADANTE, A. Z. Mycotoxins in Brazilian corn for animal feed: occurrence and incentives for the private sector to control the level of contamination. **Food Control**, v. 13, p. 87-92, 2002.
- SCHUH, M. Clinical and subclinical events related to the presence of mycotoxins in cattle feed. **Israel Journal of Veterinary Medicine**, v. 52, n. 2-3, p. 93-97, 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. **9th International Working Conference on Stored Product Protection**. p. 182-188, 2006.
- SCUDAMORE, K. A. et al. 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, p. 175–186, 1997.
- SHARMA, M; MÁRQUEZ, C. Determination of Aflatoxins in domestic pet food (dog and cat) using immunoaffinity column and HPLC. **Animal Feed Science and Technology**, v. 93, p. 109-114, 2001.
- SHEPHARD, G.S. et al. Quantitative determination of fumonisins B1 and B2 by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. **Journal of Liquid Chromatography**, v. 13, n. 10, p. 2077-2087, 1990.
- SHEPHARD, G.S. et al. Developments in mycotoxin analysis: an update for 2007-2008. **World Mycotoxin Journal**, v. 2, n. 1, p. 3-21, 2009.
- SHIER, W.T. Estrogenic mycotoxins. **Revue Médecin Vétérinaire**, v. 149, n. 6, p. 599-604, 1998.
- SILVA, L.J.G.; LINO, C.M.; PENA, A. Sphinganine–sphingosine ratio in urine from two Portuguese populations as biomarker to fumonisins exposure. **Toxicon**, v. 54, p. 390–398, 2009.
- SILVEIRA, L. Membros da família, cães aquecem mercado de rações. **O Brasil Econômico**. São Paulo, 27 jul. 2010. Disponível em: <[http://www.brasileconomico.com.br/noticias/membros-da-familia-caes-aquecem-mercado-de-racoes\\_87723.html](http://www.brasileconomico.com.br/noticias/membros-da-familia-caes-aquecem-mercado-de-racoes_87723.html)>. Acesso em: 01 dez. 2011.

- SMELA, M. E. et al. The aflatoxin B1 formamidopyrimidine adduct plays major role in causing the types of mutations observed in human hepatocellular carcinoma. **Proceedings of the National Academy of Science of The United States of America**, v. 99, p. 6655-6660, 2002.
- SMITH, G.W. et al. Cardiovascular Effects of Fumonisin in Swine. **Fundamental and Applied Toxicology**, v. 31, p. 169-172, 1996.
- SMITH, J.E.; MOSS, M.O. **Mycotoxins Formation, Analysis and Significance**. 1. ed. Great Britain: John Wiley & Sons Ltd., 1985, 148p.
- SOLEIMANY, F.; JINAP, S.; ABAS, F. Determination of mycotoxins in cereals by liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 130, p. 1055-1060, 2012.
- SPEIJERS, G. J. A; SPEIJERS, M. H. M. Combined toxic effects of mycotoxins. **Toxicology Letters**, v. 153, p. 91-98, 2004.
- SQUIRE, R.A. Ranking animal carcinogens: a proposed regulatory approach. **Science**, v.214, p.877-880, 1981.
- STENSKE, K. A. et al. Aflatoxicosis in dogs and dealing with suspected contaminated commercial foods. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 228, n, 11, p. 1686-1691, 2006.
- STOB, M. et al. **Nature**, v. 196, p. 1318, 1962.
- SUNDLOF, S.F.; STRICKLAND, C. Zearalenone and zearanol: potential residue problems in livestock. **Veterinary and Human Toxicology**, v. 28, p. 242-250, 1986.
- SYDENHAM, E.W. et al. Natural occurrence of some *Fusarium* mycotoxins in corn from low and high esophageal cancer prevalence areas of the Transkei, Southern Africa. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.38, n.10, 1990.
- SWEENEY, M.J.; DOBSON, A.D.W. Molecular biology of mycotoxin biosynthesis. **Microbiology Letters**, v. 175, p. 149-163, 1999.
- THEUMER, M.G. et al. Subchronic mycotoxicoses in Wistar rats: Assessment of the in vivo and in vitro genotoxicity induced by fumonisins and aflatoxin B1, and oxidative stress biomarkers status. **Toxicology**, v. 268, p. 104-110, 2010.
- THIEL, P.G.; MARASAS, W.F.O. Isolation of the fumonisin mycotoxins: a quantitative approach. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.39, p.1958-1962, 1991.
- THOMPSON, A. Ingredients: Where Pet Food Starts. **Topics in Companion Animal Medicine**. v. 23, n. 3, 2008.
- TURNER, N; SUBRAHMANYAM, S; PILETSKY, S.A. Analytical methods for determination of mycotoxins: A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 632, p. 168-180, 2009.
- UENO, Y.; AOYAMA, S.; SUGIURA, Y. et al. A limited survey of fumonisins in corn and corn-based products in Asian countries. **Mycotoxin Research**, v. 9, p. 27-34, 1993.

- URRACA, J. L. et al. Analysis for zearalenone and  $\alpha$ -zearalenol in cereals and swine feed using accelerated solvent extraction and liquid chromatography with fluorescence detection. **Analytica Chimica Acta**, v. 524; p.175–183, 2004.
- URRY, W.H.; WEHRMEISTER, H.L.; HODGE, E.B.; HIDY, P.H. The Structure of Zearalenone. **Tetrahedron Letters**, n. 27, p. 3109-3114, 1966.
- VAN DER WESTHUIZEN, L.; SHEPHARD, G.S.; VAN SCHALKWYK, D.J. The effect of repeated gavage doses of fumonisin B1, on the sphinganine and sphingosine levels in vervet monkeys. **Toxicon**, v. 39, p. 969-972, 2001.
- VAN DER WESTHUIZEN, L.; SHEPHARD, G.S. SCHALKWYK, D.J. The effect of a single gavage dose of fumonisin B1 on the sphinganine and sphingosine levels in vervet monkeys. **Toxicon**, v. 39, p. 273-281, 2001.
- VAN DER ZJIDEN, A.S.M. et al. **Nature**, v. 195, p. 1060, 1972.
- VAN SOEST, T.C.; PEEDERMAN, A.F. **Acta Crystallography Section B**, v. 26, p. 1947, 1970.
- VOSS, K.A. et al. Subchronic feeding study of the mycotoxin fumonisin B in B6C3F mice and Fischer 344 rats. **Fundamental and Applied Toxicology**, v. 24, p. 102–110, 1995.
- VOSS, K.A. et al. An overview of rodent toxicities: liver and kidney effects of fumonisins and *Fusarium moniliforme*. **Environmental Health Perspectives**. v. 109, n. 2, p. 259–266, 2001.
- VOSS, K.A.; SMITH, G.W.; HASCHEK, W.M. Fumonisin: Toxicokinetics, mechanism of action and toxicity. **Animal Feed Science and Technology**, v. 137, p. 299–325, 2007.
- YU, J.; CLEVELAND, T.E.; NIERMAN, W.C.; BENNETT, J.W. *Aspergillus flavus* genomics: gateway to human and animal health, food safety, and crop resistance to diseases. **Revista Iberoamericana de Micología**, v.22, p.194-202, 2005.
- WANG, E. et al. Inhibition of sphingolipid biosynthesis by fumonisins. **Journal of Biology Chemistry**. v. 266, p. 11486-11490, 1991.
- WANG, E. et al. Increases in serum sphingosine and sphinganine and decreases in complex sphingolipids in ponies given feed containing fumonisins, mycotoxins produced by *Fusarium moniliforme*. **American Institute of Nutrition**. p. 0022-3166, 1992.
- World Health Organization (WHO). 1991. Mycotoxins. Fact Sheet No. 5. Basic Food Safety for Health Workers.
- WU, F. Measuring the economic impacts of *Fusarium* toxins in animal feeds. **Animal Feed Science and Technology**, v.137; p.363–374, 2007.
- ZAIN, M. E. Impact of mycotoxins on humans and animals. **Journal of Saudi Chemical Society**, v.15; p.129–144, 2011.
- ZANNI, A. Indústria de ração cresceu mais de 5 % em 2010. **Boletim Informativo do Setor de Alimentação Animal**. São Paulo. mar. 2011. Disponível em: <

[http://www.agricultura.gov.br/arq\\_editor/file/camaras\\_setoriais/Aves\\_e\\_suinis/16RO/Boletim\\_Sindira%C3%A7%C3%B5es.pdf](http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/camaras_setoriais/Aves_e_suinis/16RO/Boletim_Sindira%C3%A7%C3%B5es.pdf)>. Acesso em: 01 dez. 2011.

ZINEDINE, A. et al. 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.

## **ANEXOS**

## ANEXO A

### Termo de Consentimento Livre Esclarecido

#### **Estudo de caso-controle em cadelas com neoplasia mamária e detecção de micotoxinas em ração, plasma e tecido mamário**

#### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu, \_\_\_\_\_,  
 RG. \_\_\_\_\_, após devidamente esclarecido, estou consciente da minha participação no projeto de pesquisa intitulado “**Estudo de caso-controle em cadelas com neoplasia mamária e detecção de micotoxinas em ração, plasma e tecido mamário**” que será realizado no Laboratório de Zoonoses e Saúde Pública (DMVP/UEL), sob a responsabilidade da **Profa. Dra. Roberta Lemos Freire** e a aluna de doutorado **Michele Salmon Frehse**. Este projeto tem por objetivo principal avaliar os fatores associados à neoplasia mamária em cadelas e detectar micotoxinas em tumores de mama, no soro e na ração consumida, por meio de um estudo de caso-controle.

Sei também que tenho a liberdade de me recusar a participar da pesquisa, ou de retirar o meu consentimento, em qualquer fase da pesquisa, sem nenhuma implicação moral à minha pessoa ou meus familiares. Estou ciente que, juntamente com a coleta das amostras, será realizado um questionário epidemiológico com o objetivo de auxiliar na pesquisa. Entendo que as informações geradas nesta pesquisa serão divulgadas exclusivamente em publicações científicas e que o anonimato será garantido. Minha participação é voluntária e não remunerada e estou informado que não haverá nenhuma despesa de minha parte e serei informado sobre os resultados dos exames.

Por estar de pleno acordo com os termos mencionados assino o presente documento.

AUTORIZAÇÃO: \_\_\_\_\_  
 LONDRINA, \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Pesquisadores Responsáveis:  
 Profa. Dra. Roberta Lemos Freire  
 MSc. Michele Salmon Frehse

Universidade Estadual de Londrina  
 Departamento de Medicina Veterinária Preventiva  
 Rodovia Celso Garcia Cid  
 CEP: 86051-990 Fones: 3371-5871; 3371-4709  
 e-mail: [rlfreire@uel.br](mailto:rlfreire@uel.br)

Paciente:  
 Grupo Caso ( )  
 Grupo Controle ( )

**ANEXO B**

## Questionário Epidemiológico

RG/HV: \_\_\_\_\_  
 Entrevistador: \_\_\_\_\_ Data \_\_\_\_\_  
 Nome do proprietário \_\_\_\_\_  
 Fone: ( ) \_\_\_\_\_  
 Endereço: \_\_\_\_\_  
 Bairro: \_\_\_\_\_  
 Município: \_\_\_\_\_ Estado: \_\_\_\_\_

- 1 Nome do paciente \_\_\_\_\_  
 2 Idade (1) ≤1ano (2) > 1 a ≤ 8 anos (3) > 8 anos  
 3 Raça: (1) SRD (2) Com Raça 3.1 Qual? \_\_\_\_\_  
 4 Peso: \_\_\_\_\_  
 5 Tumor de mama: (1) sim (2) não

**I. AMBIENTE:**

6. Quantas pessoas moram na casa? \_\_\_\_\_  
 7. Há algum fumante na casa? (1) sim (2) não  
 8. Tem mais algum animal em casa? (1) sim (2) não Qual? \_\_\_\_\_  
 9. Qual a área que habita? (1) Urbana (2) Rural  
 10. Vive em área agrícola? (1) sim (2) não  
 11. Vive em local próximo a fábrica ou indústria? (1) sim (2) não  
 Qual a distancia? \_\_\_\_\_  
 12. O animal fica solto na rua sem a presença do dono? (1) sim (2) não  
 13. O animal sai para a rua com o dono? (1) sim (2) não  
 13.1 Qual a frequência? \_\_\_\_\_  
 14. Qual o destino do lixo na residência? (1) Coleta publica (2) Enterra (3) queima (4) Outro \_\_\_\_\_  
 15. Faz separação dos recicláveis? (1) sim (2) não  
 16. Já teve algum caso de tumor de mama na família? (1) sim (2) não

**II. CLÍNICA**

17. Teve alguma doença anteriormente? (1) sim (2) não  
 Qual? \_\_\_\_\_  
 18. Toma algum medicamento de uso contínuo? (1) sim (2) não  
 Qual? \_\_\_\_\_

**III. ALIMENTAÇÃO**

19. Qual a alimentação de seu cão?  
 (1) Comida caseira (2) Ração (3) Comida caseira + ração  
 19.1 Há quanto tempo o animal se alimenta de ração?  
 19.2 Qual a marca da ração? \_\_\_\_\_  
 19.3 Onde compra a ração?  
 (1) Supermercado (2) Casa Agropecuária (3) Pet Shop (4) Outro \_\_\_\_\_  
 19.4 Compra de pacote aberto? (1) sim (2) não (3) De vez em quando  
 19.5 Qual a frequência da compra da ração?  
 (1) Semanal (2) Quinzenal (3) Mensal (4) Outro \_\_\_\_\_

- 19.6 Onde armazena a ração?  
 (1) em balde fechado (2) em prateleira (3) no chão (4) Outro \_\_\_\_\_
- 19.7 O saco de ração fica aberto? (1) sim (2) não
- 19.8 O local de armazenagem é coberto? (1) sim (2) não
- 19.9 O local é úmido? (1) sim (2) não

#### IV. REPRODUTIVO

20. Quando foi o 1º cio do animal? \_\_\_\_\_
21. Seu animal é castrado? (1) sim (2) não
- 21.1 Quando castrou?  
 (1) antes do 1º cio (2) entre o 1º e o 2º cio (3) após o 3º cio (4) não lembra
22. Seu animal já teve cria?  
 (1) sim (2) não Quantas vezes? (1)  $\leq 3$  (2)  $\geq 4$
- 22.1 Com que idade teve a 1ª cria? \_\_\_\_\_
23. Foi parto normal? (1) sim (2) não
24. Já aplicou contraceptivos em seu animal? (1) sim (2) não
- 24.1 Com que frequência? (1) 1 vez (2) 2 vezes (3)  $\geq 3$  vezes
25. Há quanto tempo apareceu o aumento de volume em mama?  
 \_\_\_\_\_ meses ou \_\_\_\_\_ anos

#### V. COLETA DE MATERIAL PARA LABORATÓRIO

26. O que foi coletado?
- ( ) ração - data \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ ;
- ( ) sg.hemograma - data \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ ;
- ( ) soro/ bioquímico - data \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ ;
- ( ) citologia - data \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ ;
- ( ) raio x de tórax - data \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ ;
- ( ) Congelado/HPLC - data \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ ;

## ANEXO C

Normas de publicação da revista *Animal Science Food and Technology*

### GUIDE FOR AUTHORS

#### **Article Structure**

Manuscripts should have numbered lines, with wide margins and double spacing throughout, i.e. also for abstracts, footnotes and references. Every page of the manuscript, including the title page, references, tables, etc., should be numbered continuously. However, in the text no reference should be made to page numbers; if necessary, one may refer to sections. Avoid excessive usage of italics to emphasize part of the text.

#### **Introduction**

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

#### **Material and methods**

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

If reference is made to AOAC, ISO or similar analytical procedure(s), the specific procedure identification number(s) must be cited. A number of references for neutral and acid detergent fibre (NDF, ADF) assays exist, and an alternative reference to the now out-of-print USDA Agriculture Handbook 379 must be used. There are many options for NDF and ADF assays (e.g. sodium sulfite, alpha amylase, residual ash), which must be specified in the text. For more details see the editorial in Vol. 118/3-4.

The following definitions should be used, as appropriate:

- a. aNDFom-NDF assayed with a heat stable amylase and expressed exclusive of residual ash.
- b. NDFom-NDF not assayed with a heat stable amylase and expressed exclusive of residual ash.
- c. aNDF-NDF assayed with a heat stable amylase and expressed inclusive of residual ash.
- d. NDF-NDF assayed without a heat stable amylase and expressed inclusive of residual ash.
- e. ADFom-ADF expressed exclusive of residual ash.
- f. ADF-ADF expressed inclusive of residual ash.
- g. Lignin (sa)-Lignin determined by solubilization of cellulose with sulphuric acid.
- h. Lignin (pm)-Lignin determined by oxidation of lignin with permanganate.

While expressions of NDF and ADF inclusive of residual ash will continue to be acceptable (i.e., the terms aNDF, NDF and ADF above), the Editors-in-Chief highly recommend reporting all fibre values, including digestibilities, on an OM basis. Silica is partially soluble in ND, is quantitatively recovered in AD, and so may contribute to the 'fibre' values and to subsequent digestibility coefficients.

Reporting 'hemicellulose' values as the difference between NDF and ADF is generally only acceptable if the analyses have been sequential on the same sample. Crude fibre (CF), nitrogen-free extract (NFE) and total digestible nutrients (TDN) are not acceptable terms for describing feeds and should only be referred to in a historical context.

**Results**

Results should be clear and concise.

**Discussion**

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. Avoid extensive citations and discussion of published literature. Combined 'Results and Discussion' sections are only acceptable for 'Short Communications', except under compelling circumstances.

**Conclusions**

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

**Essential title page information**

- Title. Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- Author names and affiliations. Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- Corresponding author. Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. Ensure that telephone and fax numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address. Contact details must be kept up to date by the corresponding author.
- Present/permanent address. If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

**Abstract**

The abstract should be clear, descriptive and not longer than 400 words. It should contain the following specific information: purpose of study; experimental treatments used; results obtained, preferably with quantitative data; significance of findings; conclusions; implications of results if appropriate.

**Keywords**

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

**Abbreviations**

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

**Acknowledgements**

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

### **Nomenclature and units**

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other quantities are mentioned, give their equivalent in SI. You are urged to consult IUB: Biochemical Nomenclature and Related Documents: <http://www.chem.qmw.ac.uk/iubmb/> for further information.

Authors and Editors are, by general agreement, obliged to accept the rules governing biological nomenclature, as laid down in the International Code of Botanical Nomenclature, the International Code of Nomenclature of Bacteria, and the International Code of Zoological Nomenclature. All biotica (crops, plants, insects, birds, mammals, etc.) should be identified by their scientific names when the English term is first used, with the exception of common domestic animals. All biocides and other organic compounds must be identified by their Geneva names when first used in the text. Active ingredients of all formulations should be likewise identified.

SI or SI-derived units should be used throughout (e.g. MJ and not Kcal for energy concentrations). Concentrations should be expressed on a 'per kg' basis (w/w); however, w/v, v/v, mol/mol or M may be accepted depending on the circumstances. In addition, 'units' and 'equivalents' are acceptable. Normality should be avoided, as it may be ambiguous for certain acids. If analytical standards have been used, they should be specified by name (e.g. yeast RNA) and form (e.g. lactose monohydrate). Percents should only be used when describing a relative increase or decrease in a response. Proportions should be maximum 1.0 or  $\leq 1.0$ . For more details see the editorial in Vol. 118/3-4.

Percent is only used to indicate relative changes. For composition, both w/w (often solids composition g/kg) and w/v (e.g. g/L), v/v (e.g. mL), mol/mol or M can be accepted depending on the circumstances. Specify units (e.g. g/L) and never as percent.

Digestibility/metabolisability and degradability should always be expressed as a coefficient (not %), and the content of, for example, the digestible component should be expressed as g/kg: thus, the coefficient of digestibility of dry matter is 0.8, while the content of digestible dry matter is 800g/kg. A distinction between true and apparent digestibility should be made, as well as between faecal and ileal (e.g. coefficient of total tract apparent digestibility - CTTAD). The terms 'availability' and 'bioavailability' should be avoided without definition in context.

In chemical formulae, valence of ions should be given as, e.g. Ca<sup>2+</sup>, not as Ca<sup>++</sup>. Isotope numbers should precede the symbols e.g. <sup>18</sup>O. The repeated use of chemical formulae in the text is to be avoided where reasonably possible; instead, the name of the compound should be given in full. Exceptions may be made in the case of a very long name occurring very frequently or in the case of a compound being described as the end product of a gravimetric determination (e.g. phosphate as P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>).

### **Math formulae**

Present simple formulae in the line of normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

If differences between treatments are statistically significant, this should be indicated by adding the actual 'P' value obtained. If  $0.10 > P > 0.05$ , then differences can be considered to suggest a trend, or tendency, to a difference, but the actual 'P' value should be stated. Further information on this issue can be found in *Animal Feed Science and Technology* Vol. 129/1-2.

Spaces should be used between all values and units, except for the following: Between the value and degrees or percent. In equations around \* and /. In probability expressions ( $P < 0.05$ ). When probability values are given, the 'P' should be a capital letter

### **Artwork**

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Save text in illustrations as 'graphics' or enclose the font.
- Only use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times, Symbol.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Produce images near to the desired size of the printed version.
- Submit each figure as a separate file.

A detailed guide on electronic artwork is available on our website:

<http://www.elsevier.com/artworkinstructions>

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats Regardless of the application used, when your electronic artwork is finalised, please 'save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS: Vector drawings. Embed the font or save the text as 'graphics'.

TIFF: Color or grayscale photographs (halftones): always use a minimum of 300 dpi.

TIFF: Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi.

TIFF: Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale): a minimum of 500 dpi is required. If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is'.

Please do not:

- Supply files that are optimised for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); the resolution is too low;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

All data in figures should have a measure of variation either on the plot (e.g., error bars), in the figure legend itself, or by reference to a table with measures of variation in the figure legend.

Explanations should be given in the figure legend(s). Drawn text in the figures should be kept to a minimum.

If a scale is given, use bar scales (instead of numerical scales) that must be changed with reduction.

### **Color artwork**

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF, EPS or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color on the Web (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article. Please indicate your preference for color: in print or on the Web only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Please note: Because of technical complications which can arise by converting color figures to 'gray scale' (for the printed version should you not opt for color in print) please submit in addition usable black and white versions of all the color illustrations.

### **Tables**

Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text. Place footnotes to tables below the table body and indicate them with superscript lowercase letters. Avoid vertical rules. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in tables do not duplicate results described elsewhere in the article.

### **References**

All publications cited in the text should be presented in a list of references following the text of the manuscript. The manuscript should be carefully checked to ensure that the spelling of authors' names and dates are exactly the same in the text as in the reference list. The accuracy of the references is the responsibility of the author(s).

References published in other than the English language should be avoided, but are acceptable if they include an English language 'Abstract' and the number of non-English language references cited are reasonable (in the view of the handling Editor) relative to the total number of references cited.

In the text refer to the author's name (without initial) and year of publication, followed - if necessary - by a short reference to appropriate pages. Examples: "Since Peterson (1988) has shown that...". "This is in agreement with results obtained later (Kramer, 1989, pp. 12-16)".

If reference is made in the text to a publication written by more than two authors, the name of the first author should be used followed by "et al.". This indication, however, should never be used in the list of references. In this list names of first author and co-authors should be mentioned.

References cited together in the text should be arranged chronologically. The list of references should be arranged alphabetically on authors' names, and chronologically per author. If an author's name in the list is also mentioned with co-authors the following order should be used: publications of the single author, arranged according to publication dates - publications of the

same author with one co-author - publications of the author with more than one co-author. Publications by the same author(s) in the same year should be listed as 2001a, 2001b, etc.

### **Web references**

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

### **Reference style**

Text: All citations in the text should refer to:

1. Single author: the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication;
2. Two authors: both authors' names and the year of publication;
3. Three or more authors: first author's name followed by 'et al.' and the year of publication.

Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references should be listed first alphabetically, then chronologically.

Examples: 'as demonstrated (Allan, 2000a, 2000b, 1999; Allan and Jones, 1999). Kramer et al. (2010) have recently shown ....'

List: References should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters 'a', 'b', 'c', etc., placed after the year of publication.

Examples:

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2010. The art of writing a scientific article. *J. Sci. Commun.* 163, 51–59.

Reference to a book:

Strunk Jr., W., White, E.B., 2000. *The Elements of Style*, fourth ed. Longman, New York.

Reference to a chapter in an edited book:

Mettam, G.R., Adams, L.B., 2009. How to prepare an electronic version of your article, in: Jones, B.S., Smith, R.Z. (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*. E-Publishing Inc., New York, pp. 281–304.

References concerning unpublished data and "personal communications" should not be cited in the reference list but may be mentioned in the text.

### **Video data**

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the files in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 50 MB. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our video instruction pages at

<http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

### **Supplementary data**

Elsevier accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please provide the data in one of our recommended file formats. Authors should submit the material in electronic format together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

### **Submission checklist**

The following list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal for review. Please consult this Guide for Authors for further details of any item.

Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address
- Telephone and fax numbers

All necessary files have been uploaded, and contain:

- Keywords
- All figure captions
- All tables (including title, description, footnotes)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell-checked' and 'grammar-checked'
- References are in the correct format for this journal
- All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Web)
- Color figures are clearly marked as being intended for color reproduction on the Web (free of charge) and in print, or to be reproduced in color on the Web (free of charge) and in black-and-white in print
- If only color on the Web is required, black-and-white versions of the figures are also supplied for printing purposes

For any further information please visit our customer support site at <http://support.elsevier.com>.

### **Additional Information**

Authors should use the 'Track Changes' option when revising their manuscripts, so that any changes made to the original submission are easily visible to the Editors. Those revised manuscripts upon which the changes are not clear may be returned to the author.

Specific comments made in the Author Comments in response to referees' comments must be organised clearly. For example, use the same numbering system as the referee, or use 2 columns of which one states the comment and the other the response.