



Ministério da Educação
Universidade Federal de Lavras
Departamento de Zootecnia

Sávio Tadeu Almeida Júnior

AFLATOXINAS E FUMONISINAS EM ALIMENTOS COMERCIAIS PARA CÃES E GATOS

Lavras - MG

2018

Sávio Tadeu Almeida Júnior

**AFLATOXINAS E FUMONISINAS EM ALIMENTOS COMERCIAIS PARA CÃES E
GATOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Zootecnia – Nutrição e Produção de Não
Ruminantes- da Universidade Federal de Lavras, como
requisito para obtenção do título de Mestre em Zootecnia

Orientador: Profº Dr. Paulo Borges Rodrigues

Co-orientadora: Profª Dra. Flávia Maria O. B. Saad

Lavras - MG

2018

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Júnior, Sávio Tadeu Almeida.

Aflatoxinas e Fumonisinas em Alimentos Comerciais para Cães
e Gatos: : Aflatoxinas e Fumonisinas em Alimentos Comerciais
para Cães e Gatos / Sávio Tadeu Almeida Júnior. - 2018.

47 p. : il.

Orientador(a): Paulo Borges Rodrigues.

Coorientador(a): Flávia Maria Oliveira Borges Saad.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de
Lavras, 2018.

Bibliografia.

1. Micotoxinas. 2. Alimentação animal. 3. Cromatografia. I.
Rodrigues, Paulo Borges. II. Borges Saad, Flávia Maria Oliveira.
III. Título.

Sávio Tadeu Almeida Júnior

**AFLATOXINAS E FUMONISINAS EM ALIMENTOS COMERCIAIS PARA CÃES E
GATOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Zootecnia – Nutrição e Produção de Não
Ruminantes- da Universidade Federal de Lavras, como
requisito para obtenção do título de Mestre em Zootecnia

APROVADA em 23 de fevereiro de 2018.

Dra. Flávia Maria Oliveira Borges Saad – UFLA

Dr. Matheus Hernandes Leira – Centro Universitário Moura Lacerda

Dr. Rodrigo Bernardes Nogueira – UFLA

Prof. Dr. Paulo Borges Rodrigues

Orientador

Lavras - MG

2018

DEDICO

Ao Pai Celestial,

Que é tão simples!... tão simples que muitas vezes demoramos a encontrá-lo em sua maneira humilde de se apresentar.

“O poder infinito de Deus não está na tempestade, mas na brisa.”

(Rabindranath Tagore)

Aos meus pais,

Sávio Tadeu Almeida e Fabíola Carvalho de Paula Almeida,

Que nunca mediram esforços para que eu pudesse caminhar em volta aos livros, buscando a realização.

“É na educação que os filhos revelam as virtudes dos pais.”

(Coelho Neto)

Ao meu irmão,

Jórdan Lucas de Paula Almeida,

Os irmãos compartilham as travessuras, os sonhos, os cochichos e as brincadeiras, as brigas e os joelhos esfolados... o amor e a lealdade significam mais do que as palavras podem expressar.

Aos meus amigos,

Que estiveram ao meu lado durante as alegrias e dificuldades do dia a dia.

“Não preciso de heróis, não preciso de modelos, eu tenho meus amigos.”

(Renato Russo)

AGRADECIMENTOS

Ao professor orientador Paulo Borges Rodrigues e professores co-orientadores Flávia Maria Oliveira Borges Saad e Antônio Gilberto Bertechini, pela orientação, oportunidade, compreensão, atenção e dedicação.

Meus sinceros agradecimentos pela oportunidade de desenvolver esse trabalho de pesquisa junto à universidade.

Aos professores Carlos Eduardo do Prado Saad, Matheus Hernandez Leira e Rodrigo Bernardes Nogueira, membros da banca examinadora, pela disponibilidade e atenção.

Ao professor Vinícius de Souza Cantarelli, coordenador adjunto e docente do programa de pós graduação em zootecnia, pelo incentivo e atenção.

Aos professores Alexandre Torino Mendonça e Márcio Gilberto Zangerônimo, membros da banca de qualificação, pelos valiosos comentários e sugestões.

Ao professor Luiz Roberto Batista e sua orientada Natasha de Azevedo Lira, Departamento de Ciência de Alimentos da UFLA, pelo apoio e acompanhamento nos ensaios laboratoriais.

Aos pesquisadores da Embrapa Milho e Sorgo, Rafael de Araújo Miguel e Renata Regina Pereira da Conceição, pela disponibilidade em me receber e ajuda para com as análises.

Ao Sr. João Carlos Furlan, empresário da Solcampo – distribuidora VICAM no Brasil, pelo apoio e credibilidade.

Meus sinceros agradecimentos a vocês que, com olhares, gestos e atitudes, ajudaram-me a construir esta parte tão significativa da minha história.

“As pessoas entram em nossa vida por acaso, mas não é por acaso que eles permanecem.”

(Lilian Tonet)

RESUMO

A qualidade e a segurança biológica das rações para cães e gatos abrangem o controle de diferentes segmentos da cadeia produtiva, desde os procedimentos empregados na agricultura para desenvolvimento de plantas saudáveis, a produção industrial, o transporte do produto final até o armazenamento nos pontos de venda e consumo em residências. Além da possibilidade da contaminação microbiana, o crescimento fúngico e as micotoxinas são substâncias que podem acarretar danos aos animais. Ensaios experimentais em animais têm demonstrado os mais variados efeitos destas substâncias tóxicas que vão desde a imunossupressão, alterações metabólicas até carcinogênese (SANTIN, 2005). O trabalho teve por finalidade pesquisar, quantitativamente, a ocorrência de aflatoxinas total (B_1 , B_2 , G_1 e G_2) e fumonisinas (B_1 e B_2) em alimentos comerciais para cães e gatos de linhas standard, premium e super premium de maior comercialização no Brasil. As amostras foram coletadas em estabelecimentos comerciais no Sul de Minas Gerais, nas cidades de Alfenas, Lavras, Três Corações e Varginha, sendo 5 amostras de alimentos standard para cães, 10 amostras de alimentos premium para gatos, 10 amostras de alimentos premium para cães, 5 amostras de alimentos super premium para gatos e 5 amostras de alimentos super premium para cães, totalizando 35 amostras. A determinação da presença e quantificação das aflatoxinas e fumonisinas foram realizadas através do método de cromatografia de afinidade com leitura em fluorímetro digital, no laboratório de Micologia e Micotoxinas do Departamento de Ciência de Alimentos da Universidade Federal de Lavras – MG e laboratório de Micotoxinas da Embrapa Milho e Sorgo, em Sete lagoas – MG. Das 35 amostras analisadas em duplicata para presença e quantificação de aflatoxinas total, todas apresentaram presença em níveis aceitáveis de acordo com recomendação da legislação vigente, sendo o menor valor médio o de 1,089 ppb/kg para alimentos comerciais de linha premium para cães e maior valor médio de 4,266 ppb/kg para alimentos comerciais de linha super premium para gatos. Para as análises de presença e quantificação de fumonisinas, das 35 amostras, todas apresentaram presença, sendo que 68,57% das amostras apresentaram concentração acima de 4.000 ppb/kg, índice recomendado pela legislação vigente. Verificou-se menor valor médio de 4.790 ppb/kg para alimentos comerciais de linha premium para cães e maior valor médio de 7.260 ppb/kg para alimentos de linha super premium para gatos. Os resultados indicam possível falha no processo de certificação de matérias-primas adquiridas pelas indústrias do mercado pet food.

Palavras-chave: micotoxinas, alimentação animal, cromatografia.

ABSTRACT

The quality and biological safety of dog and cat feeds encompass the control of different segments of the production chain, from the procedures used in agriculture to the development of healthy plants, industrial production, transportation of the final product to storage at points of sale consumption in households. In addition to the possibility of microbial contamination, fungal growth and mycotoxins are substances that can lead to animal damage. Experimental animal tests have shown the most varied effects of these toxic substances ranging from immunosuppression, metabolic alterations to carcinogenesis (SANTIN, 2005). The aim of this work was to quantitatively investigate the occurrence of total aflatoxins (B1, B2, G1 and G2) and fumonisins (B1 and B2) in commercial dog and cat food from standard, premium and super premium lines of higher commercialization in Brazil . Samples were collected in commercial establishments in the southern region of Minas Gerais, in the cities of Alfenas, Lavras, Três Corações and Varginha, with 5 standard food samples for dogs, 10 premium cat food samples, 10 premium dog food samples, 5 samples of super premium food for cats and 5 samples of super premium dog foods totaling 35 samples. The determination of the presence and quantification of aflatoxins and fumonisins were carried out using the method of affinity chromatography with reading in digital fluorimeter, in the laboratory of Mycology and Mycotoxins of the Department of Food Science of the Federal University of Lavras - MG and laboratory of Mycotoxins of Embrapa Maize and Sorghum, in Sete lagoas - MG. Of the 35 samples analyzed in duplicate for the presence and quantification of total aflatoxins, all were present at acceptable levels according to the current legislation, with the lowest average value being 1.089 ppb / kg for commercial premium dog food and higher value average of 4,266 ppb / kg for commercial super premium cat food. For fumonisin presence and quantification analyzes, of the 35 samples, all were present, with 68.57% of the samples having a concentration above 4,000 ppb / kg, an index recommended by the current legislation. There was a lower mean value of 4,790 ppb / kg for commercial premium dog food and a higher average value of 7,260 ppb / kg for super premium line food for cats. The results indicate possible failure in the certification process of raw materials purchased by the pet food industry.

Key words: mycotoxins, animal feed, chromatography

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Estrutura química das principais aflatoxinas.....	24
Figura 2	Estrutura química das principais fumonisinas.....	26
Figura 3	Pesagem de amostra em balança de precisão.....	37
Figura 4	Processamento da amostra com NaCl e solução metanol : água.....	37
Figura 5	Primeira etapa de filtração em filtro de papel plissado com uso de bomba de pressão negativa.....	37
Figura 6	Segunda etapa de filtração em filtro de microfibra com uso de bomba de pressão negativa.....	37
Figura 7	Cromatografia de afinidade para aflatoxinas.....	38
Figura 8	Cromatografia de afinidade para fumonisinas.....	38
Figura 9	Calibração do fluorímetro digital.....	38
Figura 10	Preparação das amostras e pipetagem em cubetas.....	38
Figura 11	Inoculação de reveladores.....	39
Figura 12	Teste de calibração do fluorímetro digital.....	39
Figura 13	Encaixe de cubeta de vidro com amostra para leitura em fluorímetro.....	39
Figura 14	Leitura e resultados em bobina para análises de aflatoxinas e fumonisinas.....	39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Contaminantes microbiológicos	19
Tabela 2	Limites de níveis de micotoxinas por produto acabado	21
Tabela 3	Principais micotoxinas, tipos de fungos, alimentos suscetíveis à contaminação, efeitos à saúde e limites máximos permitidos vide legislação.....	22
Tabela 4	Quantidade de alimentos comerciais para cães e gatos de linhas standard, premium e super premium coletados nos municípios de Alfenas, Lavras, Três Corações e Varginha.....	28
Tabela 5	Valores médios de duplicatas para contaminação por aflatoxinas e fumonisinas em alimentos comerciais para cães de linha standard.....	31
Tabela 6	Valores médios de duplicatas para contaminação por aflatoxinas e fumonisinas em alimentos comerciais para cães de linha premium.....	32
Tabela 7	Valores médios de duplicatas para contaminação por aflatoxinas e fumonisinas em alimentos comerciais para gatos de linha premium.....	32
Tabela 8	Valores médios de duplicatas para contaminação por aflatoxinas e fumonisinas em alimentos comerciais para cães de linha super premium.....	32
Tabela 9	Valores médios de duplicatas para contaminação por aflatoxinas e fumonisinas em alimentos comerciais para gatos de linha super premium.....	33
Tabela 10	Determinação de Aflatoxina Total (B1+B2+G1+G2) nos alimentos comerciais para cães e gatos de linhas standard, premium e super premium.....	33

Tabela11	Determinação de Fumonisina (B1+B2) nos alimentos comerciais para cães e gatos de linhas standard, premium e super premium.....	35
----------	--	----

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

APPCC	Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle
BPF	Boas Práticas de Fabricação
DCA	Departamento de Ciência dos Alimentos
DZO	Departamento de Zootecnia
ED	Energia Digestível
EE	Extrato Etéreo
EM	Energia Metabolizável
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
FB	Fibra Bruta
GMP	Good Manufacturing Practice
HACCP	Hazard Analysis and Critical Control Points
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
Máx.	Nível máximo
Mín.	Nível mínimo
MM	Matéria Mineral
NMP	Número mais provável
PB	Proteína Bruta
U	Umidade
UFC	Unidades de formação de colônias
UFPA	Universidade Federal de Lavras

Sumário

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	15
2 OBJETIVOS.....	16
3 METAS.....	16
4 REVISÃO DE LITERATURA	16
4.1 Controle de Qualidade	16
4.1.1 Boas Práticas de Fabricação.....	17
4.1.2 Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle.....	17
4.2 Contaminação microbiológica	17
4.3 Micotoxinas	19
4.4 Aflatoxinas.....	23
4.4.1 Mecanismo de ação das aflatoxinas e patogenia.....	24
4.4.2 Presença de aflatoxinas em alimentos.....	25
4.5 Fumonisinas.....	25
4.5.1 Mecanismo de ação das fumonisinas e patogenia.....	26
4.5.2 Presença de fumonisinas em alimentos.....	27
5 MATERIAL E MÉTODOS.....	28
5.1 Local e Período Experimental	28
5.2 Testes para aflatoxinas e fumonisinas	28
5.3 Ensaio e delineamento experimental	29
5.4 Preparo das amostras	29
5.5 Preparo das soluções de diluição e lavagem.....	29
5.6 Filtração das amostras	30
5.7 Cromatografia de afinidade	30
5.8 Análises estatísticas	31
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
6.1 Contaminação por aflatoxinas	33
6.2 Contaminação por fumonisinas	34
7 CONCLUSÕES	36

8 ANEXOS	37
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A história que envolve a relação do homem e os animais de companhia, principalmente os cães e gatos, vem sendo escrita ao longo dos anos (SAAD et al., 2007). Segundo a Associação Brasileira da Indústria de Produtos para Animais de Estimação, existem no Brasil cerca de 52,2 milhões de cães e 22,1 milhões de gatos, tornando o Brasil o segundo maior país do mundo em população pet (ABINPET, 2017).

A necessidade em buscar facilitações para a boa nutrição dos cães e gatos tornou as dietas comerciais secas a primeira opção de alimentação para os proprietários, sendo que atualmente pelo menos 34% da população de cães e gatos são alimentados através de dietas industrializadas (PRIOR, 2003). Existem atualmente no país mais de 300 marcas registradas, produzidas por mais de 70 fabricantes, com preço e qualidade variáveis (CARCIOFI et al., 2006).

No Brasil, a responsabilidade da regulamentação das rações para cães e gatos é do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, prevista no Decreto nº 76.986 de 6 de janeiro de 1976, que regulamentou a Lei nº 6.198, de 26 de dezembro de 1974, que dispõe sobre a inspeção e a fiscalização dos produtos à alimentação animal.

Os alimentos comerciais para cães e gatos são divididos de acordo com a segmentação comercial instituída pela própria indústria, e baseia-se na qualidade e no tipo de matéria-prima, concentração de nutrientes, características do rótulo e preço, sendo normalmente aceita pelos consumidores como um critério qualitativo que norteia decisões de compra (CARCIOFI, 2003).

Os alimentos secos para cães e gatos, no geral, são produzidos através do processo de extrusão. O processo de extrusão envolve a mistura conjunta de todos os ingredientes, em conjunto, até formar uma massa que posteriormente é cozida em um extrusor e passada por um processo de cocção, com pressão e temperatura elevadas (CASE et al., 1998).

Embora o processo de cozimento sob pressão e alta temperatura colabore para manter a esterilidade do produto, durante a etapa final de fabricação, que compreende a secagem, armazenamento e empacotamento, a ração fica suscetível a uma série de microrganismos contaminantes, que podem vir a se proliferar, tornando o produto uma verdadeira colônia de fungos e bactérias (SILVA & DOMARESKI, 2011).

A contaminação de ração por fungos é um dos principais fatores de danos aos animais, podendo ocorrer após o processamento e armazenamento, ou mesmo com a manipulação da matéria-prima. Os contaminantes mais comuns são do gênero *Penicillium* e *Aspergillus*

presentes no ar e agem quando as condições de umidade e temperatura são inadequadas (MARTINS et al., 2003).

As micotoxinas são metabólitos secundários, produzidos por fungos que se desenvolvem naturalmente em produtos alimentícios, capazes de originar uma ampla variedade de efeitos tóxicos em animais vertebrados, incluindo o homem (COULOMBE, 1991). O fato das micotoxinas apresentarem, de modo geral, grande estabilidade química, o que permite a sua persistência no alimento mesmo após a remoção dos fungos pelos processos usuais de industrialização e embalagem (CHU, 1991). As micotoxinas de maior ocorrência no Brasil devido condições climáticas incluem as aflatoxinas e as fumonisinas.

2 OBJETIVOS

Determinar as concentrações de aflatoxinas totais (B1, B2, G1 e G2) e fumonisinas (B1 e B2) dos alimentos comerciais para cães e gatos de maior representatividade no mercado, verificando assim sua qualidade.

3 METAS

Divulgação dos dados levantados a partir da pesquisa através de publicação em periódico, bem como a apresentação dos mesmos no Congresso do Colégio Brasileiro de Nutrição Animal – CBNA.

4 REVISÃO DE LITERATURA

4.1 Controle de qualidade

Elementos para a gestão da qualidade já orientam a produção em diversas cadeias produtivas há algum tempo. Seguindo a esta tendência, tais preceitos começam a inspirar os profissionais e organizações voltadas à produção de alimentos para a nutrição de animais de companhia, como rações, enlatados, biscoitos, “ossinhos”, dentre uma grande variedade de produtos que não param de ser desenvolvidos (BOARI, 2007).

As adequações aos processos de produção de rações permitem a detecção de pontos críticos de controle durante as fases de fabricação ou até mesmo na aquisição de matérias-primas para o processo industrial, onde análises microbiológicas são de grande importância, pois levam à adoção de medidas corretivas ou mesmo de recolhimento (recall) dos produtos,

quando se constata níveis de contaminação acima dos determinados pela legislação (CHALFOUN et al., 2008).

As fábricas devem estar atentas ao controle microbiológico das matérias-primas utilizadas, como as farinhas de carne e ossos destinadas à nutrição animal, já que a ingestão de ração contendo esta matéria-prima contaminada por bactérias e fungos pode trazer uma série de prejuízos à saúde do animal que a consumir (ANDRIGUETTO et al, 1990).

Dentre os programas de gestão da segurança dos produtos para alimentação animal, são aplicadas as Boas Práticas de Fabricação – BPF (Good Manufacturing Practice – GMP) e o sistema de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle – APPCC (Hazard Analysis and Critical Control Points – HACCP), cujas certificações são legalmente exigidas pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA.

4.1.1 Boas Práticas de Fabricação

As Boas Práticas de Fabricação preconizam os requisitos mínimos a serem atendidos na produção de alimentos, com vistas à garantia da qualidade e segurança alimentar, bem como um adequado ajuste do ambiente de produção, favorecendo a otimização de seu uso, higienização (limpeza e desinfecção), motivação profissional e segurança do trabalho, o que conta a favor da imagem da empresa (BOARI, 2007).

4.1.2 Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle

O sistema Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC) ou HACCP, tradução do inglês Hazard Analysis and Critical Control Points, é um sistema de garantia da qualidade constituído por algumas etapas e pré-requisitos, que tem como principal objetivo assegurar a inocuidade de alimentos, como pet food. Todas as etapas associadas à produção de alimentos são estudadas, seguindo um fluxo linear desde a obtenção de matérias-primas, passando pelo processamento, transporte, distribuição e comercialização do produto elaborado, buscando identificar os pontos críticos nos quais os perigos, sejam eles físico, químicos ou biológicos possam ser reduzidos a níveis aceitáveis ou, até mesmo, eliminados (BOARI, 2007).

4.2 Contaminação microbiológica

Um dos principais fatores ligados ao risco para a saúde animal é referente à contaminação dos alimentos por microrganismos diversos. Essa contaminação pode ocorrer

desde a produção e o armazenamento da matéria-prima de origem animal e de grãos, que são amplamente utilizados na fabricação de rações para várias espécies animais, até o processo final de industrialização e embalagem do produto (ANDRADE & NASCIMENTO, 2005).

Os animais e os produtos de origem animal são os maiores reservatórios de *Salmonella spp.* A presença de salmonelas nos ingredientes de rações para os cães constitui um problema, embora esses microrganismos não causem comumente doença em animais adultos, provocam gastroenterites/toxinfecções em filhotes (SCARCELLI & PIATTI, 2002). Embora o processo de cozimento, possa eliminar as bactérias na ração, o produto final pode perder sua esterilidade durante os processos subsequentes de secagem, pulverização de gordura e empacotamento.

O controle microbiológico das farinhas de carne e ossos destinadas à nutrição animal é de suma importância, visto que a ingestão da ração contendo essa matéria-prima contaminada por bactérias pode ser a causa de sérios problemas para os animais que as ingerem (ANDRIGUETTO et al., 1990).

As próprias características das farinhas de carne e de ossos fazem-nas susceptíveis a alterações físico-químicas que proporcionam a deterioração por diversas estirpes microbianas patogênicas, por isso que a qualidade microbiológica dessas farinhas depende basicamente de fatores como a extensão da contaminação da matéria-prima, da contaminação do produto final e das condições de armazenamento (SANTOS et al, 2000).

Os microrganismos apresentam características próprias que determinam suas exigências para o crescimento e multiplicação, e um dos fatores que influenciam na quantidade de bactérias que são encontradas em alimentos de forma geral é a temperatura. A maioria das bactérias de interesse médico, veterinário e agrônomo e que são facilmente encontradas concentram-se em um grupo que as caracteriza como mesófilas, pois apresentam um requerimento térmico para o crescimento dentro da faixa de temperatura compreendida entre 28 a 37° C (TRABULSI et al, 1999).

Com relação aos grãos, FRAZIER & WESTHOFF (1993) comentam que a sua superfície externa conserva alguns microrganismos adquiridos durante seu desenvolvimento, e estes contaminantes procedem do solo, de insetos, pó, água, 5 plantas, dejetos animais e outras fontes. Os grãos de cereais recém-colhidos contêm várias bactérias, inclusive do grupo dos coliformes fecais, e/ou esporos fúngicos por grama analisada.

A matéria prima das rações pode sofrer inúmeras contaminações, desde a colheita no campo até seu processamento e comércio como produto final. Os grãos em geral apresentam grande susceptibilidade a serem acometidos por fungos, e quando encontram ambiente favorável para se desenvolver toda a matéria prima pode ficar comprometida, podendo

acarretar em inúmeros prejuízos na saúde do animal e transtornos para seus donos (LÁZZARI, 1993).

A contaminação de ração por fungos é um dos principais fatores de danos aos animais, podendo ocorrer após o processamento e armazenamento, ou mesmo com a manipulação da matéria-prima. Os biocontaminantes mais comuns são do gênero *Penicillium* e *Aspergillus* presentes no ar e agem quando as condições de umidade e temperatura do ambiente são inadequadas (Martins et al., 2003).

Tabela 1. Contaminantes microbiológicos – Dados segundo regulamentação do manual do Programa Integrado de Qualidade Pet

RISCOS	LIMITES			
	Satisfatório	Limite de Aceitabilidade	Não-satisfatório	Inaceitável (perigo)
<i>Salmonella spp</i>	Ausente em 25g	---	---	Presente em 25g
<i>Escherichia coli</i>	Ausente em 25g	---	---	Presente em 25g
<i>Bacillus cereus</i>	< 10	$10 - 10^4$	$10^4 - 10^5$	$> 10^5$
<i>Staphylococcus áureos</i>	< 10	$10 - 10^3$	$10^3 - 10^4$	$> 10^4$
<i>Bolores e Leveduras</i>	< 10	$10 - 10^3$	$10^3 - 10^4$	$> 10^4$
<i>Coliformes fecais</i>	< 10	$10 - 10^3$	$10^3 - 10^4$	$> 10^4$
<i>Enterobactérias</i>	< 10	$10 - 10^3$	$10^3 - 10^4$	$> 10^4$

ANAFAL PET (2016)

4.3 Micotoxinas

Os alimentos para animais de companhia têm predisposição para presença de alguns tipos de micotoxinas, tais como: Aflatoxina, Ocratoxina A, Fumonisina, Zearalenona e Don (Vomitoxina) segundo o Manual do Programa Integrado de Qualidade Pet (2017).

A contaminação da ração com fungos pode ser por meio do ambiente, e seu desenvolvimento pode ser favorecido por umidade, temperatura e substrato com a multiplicação do microrganismo e a produção de metabólitos tóxicos, a exemplo das micotoxinas (BERNARDI & NASCIMENTO, 2005).

As micotoxinas podem causar nos cães e em seres humanos sinais clínicos com manifestação de diminuição do apetite, diarreia, vômitos e hemorragias, assim como

hepatotoxicidade e nefrotoxicidade, além de possuírem um efeito carcinogênico (MALLMAN et al., 2002).

Aflatoxinas, ocratoxinas, tricotecenos, zearalenona, fumonisinas e ácido fusarico foram encontrados nos ingredientes e rações acabadas para pets, resultando em toxicidade aguda e problemas de saúde crônicos em animais de estimação (BOERMANS & LEUNG, 2007).

As micotoxinas podem entrar na cadeia alimentar humana e animal através da contaminação direta ou indireta de alimentos ou rações. A forma indireta ocorre quando um ingrediente qualquer foi previamente contaminado por um fungo toxicogênico, e mesmo que este tenha sido eliminado durante o processamento, as micotoxinas ainda permanecerão no produto final. A contaminação direta, por outro lado, ocorre quando o produto, o alimento ou ração se torna contaminada por um fungo toxicogênico com posterior formação de micotoxinas (FRISVAD; SAMSON, 1992).

Micotoxicose é o termo utilizado para definir qualquer enfermidade causada aos homens e animais pela exposição às micotoxinas. Os quadros tóxicos variam de acordo com a micotoxina, seu efeito dose-dependente, espécie animal e até mesmo entre indivíduos de uma mesma espécie, é caracterizada por estar relacionada à alimentação, não é contagiosa, não é infecciosa e é sempre causada pelas toxinas produzidas por fungos (HUSSEIN; BRASEL, 2001). As micotoxinas estão associadas a síndromes crônicas, como imunossupressão e carcinogênese (MOSS, 1998).

Tabela 2. Limites de níveis de micotoxinas para produto acabado – Dados segundo regulamentação do manual do Programa Integrado de Qualidade Pet

MICOTOXINAS	LIMITES PARA PRODUTO ACABADO
Aflatoxina Total (B1 + B2 + G1 + G2)	20 ppb
Aflatoxina B1	10 ppb
Ocratoxina A	50 ppb
Fumonisina (B1 + B2)	4000 ppb
Zearalenona	100 ppb
Don (Vomitoxina)	1250 ppb
Citrinina	500 ppb
Nivalenol	100 ppb
T2	100 ppb

ANFAL PET (2016)

Tabela 3. Principais micotoxinas, tipos de fungos, alimentos suscetíveis à contaminação, efeitos à saúde e limites máximos permitidos vide legislações.

MICOTOXINAS	AFLATOXINAS	CITRININ	DEOXYNIVALENOL	FUMONISINAS	OCRATOXINA A	T-2 / HT-2	ZEARELENONA
	B1 B2 G1 G2 M1			B1 B2 B3			
Tipos de Fungos que produzem Toxinas:	<i>Aspergillus flavus</i> <i>Aspergillus parasiticus</i>	Algumas cepas de: <i>Aspergillus</i> e <i>Penicillium</i>	<i>Fusarium graminearum</i>	<i>Fusarium verticillioides</i>	<i>Aspergillus ochraceus</i> , <i>Penicillium verrucosum</i>	<i>Fusarium</i> e outras espécies de fungos	<i>Fusarium graminearum</i>
Alimentos Suscetíveis à Contaminação:	Milho, amendoim, noze Arroz, trigo, farinha, cevada, milho, centeio, cevada maltada e aveia semente de algodão, aveia, amendoim e temperos, leite, trigo, aveia, algumas frutas	Milho, trigo, cevada, milho, centeio, cevada maltada e aveia	Milho e outros cereais	Milho e outros cereais	Milho, trigo, cevada, aveia, sorgo, passas, vinho, café e cacau	Milho, trigo, cevada e aveia, arroz, sorgo e outros cereais	Milho, trigo, cevada e sorgo
Efeitos à Saúde:	. Danos e câncer no fígado . Imunodeficiência . Diminuição da produção de leite e ovos	. Causa danos nos rins . Danos ao trato digestivo, medula óssea . Suspeita de causar danos nos rins e no fígado de humanos	. Danos aos rins e câncer . Câncer em ratos . Degeneração cerebral . Imunodeficiência	. Danos aos rins e câncer . Câncer em ratos . Degeneração cerebral . Imunodeficiência	. Danos aos rins e câncer . Câncer em ratos . Degeneração cerebral . Imunodeficiência	. Lesões na pele e nos olhos em gado e humanos . Alergia alimentar tóxi resistência de recém nascidos . Causa feminilidade em animais a 1 ppm	. Impactos negativos na reprodução, má formação fetal, diminuição da resistência de recém nascidos . Causa feminilidade em animais a 1 ppm
Limites Máximos Permitidos / Recomendados:	Brasil Aflatoxinas Total: 20 ppb (amendoim, milho e derivados) Aflatoxinas Total: 50 ppb (alimentação animal) União Européia Aflatoxinas Total: 4 ppb Alimentação animal: 20 ppb	União Européia 100 ppb (recomendado) Japão 200 ppb (recomendado)	União Européia 1.75 ppm (trigo duro e cru e aveia) 0.20 ppm (alimentos infantis e para bebês, baseados em cereais processados)	União Européia 400 ppb (alimentos para consumo humano direto, derivados de milho) 200 ppb (alimentos infantis e derivados de cereais e para bebês, derivados de milho)	União Européia 5 ppb (café torrado) 10 ppb (café solúvel) 3 ppb (cereais processados)	União Européia 50 ppb (ães e pastéis) 75 ppb (cereais e farinhas de trigo) 20 ppb (alimentos infantis e derivados de cereais)	União Européia 50 ppb (ães e pastéis) 75 ppb (cereais e farinhas de trigo) 20 ppb (alimentos infantis e derivados de cereais)

Adaptado do Guia de Micotoxinas da Sol Campo / VICAM 2017.

4.4 Aflatoxinas

As aflatoxinas são metabólitos secundários que podem ser produzidos por fungos como *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus*, *A. nominus* (YU et al., 2005). Podem ser encontradas em inúmeros produtos alimentícios, como milho, trigo, farinha de trigo, cevada, nozes, pistache, arroz, amêndoa, feijão, semente de algodão, coco, gengibre, pimenta e pimenta malagueta, frutas, pimentão-doce, frutas secas e cerveja, além de estar presente em rações e produtos de origem animal contaminados por rações (HOLLINGER & EKPERIGIN, 1999; JAIMEZ et al., 2000; STROKA et al., 2000; CHIAVARO et al., 2001; YONG & COUSIN, 2001; PAPP et al., 2002; BLESA et al., 2003; VENTURA et al., 2004; LIU et al., 2006).

Os sinais da intoxicação por aflatoxinas depende principalmente de sua concentração no alimento, do tipo de aflatoxina e do tempo de ingestão. São toxinas potentes ao fígado e a maioria das espécies animais expostas a estas micotoxinas mostram sinais da doença que variam de agudo (letais ou não) e subagudos. O efeito agudo é de manifestação e percepção rápidas, podendo levar o animal à morte causando reações irreversíveis, resultante da ingestão de doses geralmente elevadas. O efeito subagudo é resultado da ingestão de doses não elevadas que provoca distúrbios e alterações nos órgãos do homem e dos animais, especialmente no fígado. Ambos os casos dependem da espécie animal, idade, do estado nutricional e também do sexo (TEIXEIRA, 2008).

As aflatoxinas compõem-se de quatro substâncias principais: B1, B2, G1 e G2. As aflatoxinas M1 e M2 constituem-se como metabólitos hidroxilados de AFB1 e AFB2, respectivamente, que são encontrados no leite e derivados, carne e excretados na urina (DINIZ, 2002; CHIAVARO et al., 2001) (Figura 1). O metabólito mais importante é a aflatoxina B1 (AFB1), devido sua elevada hepatotoxicidade e maiores concentrações nos substratos, seguida de G1, B2 e G2. As aflatoxinas são comumente encontradas em diversos alimentos utilizados como ração de animais, principalmente em grãos (MALLMANN et al., 1994). São toxinas de baixo peso molecular, e de reduzida hidrossolubilidade, porém, são bastante solúveis em solventes de polaridade intermediária (MERCK, 1996).

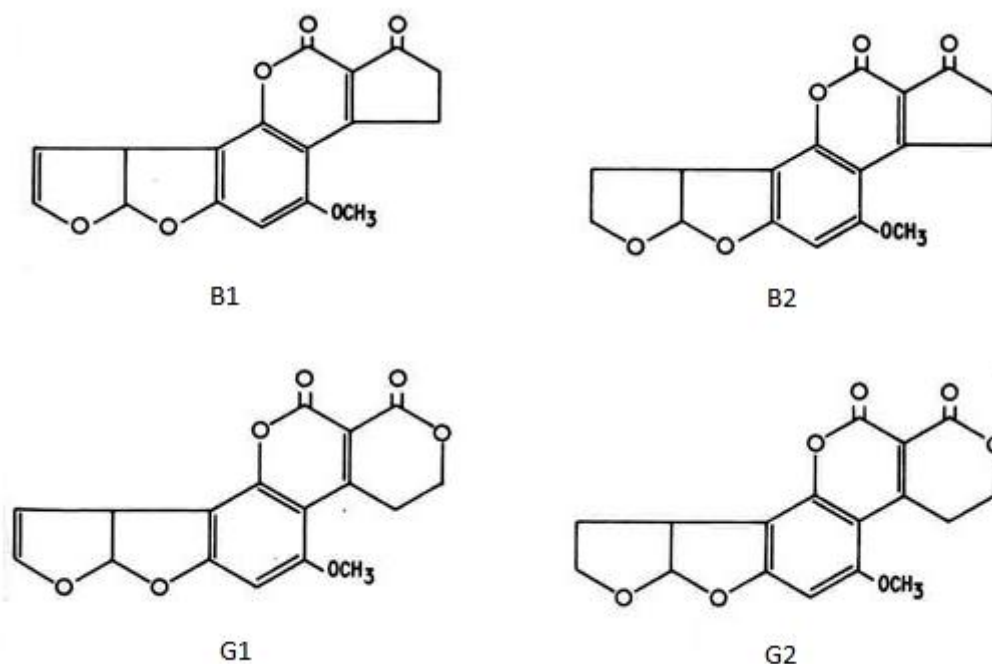


Figura 1. Estrutura química das principais aflatoxinas, adaptado de WILSON, 2005.

4.4.1 Mecanismo de ação das aflatoxinas e patogenia

A absorção das aflatoxinas ocorre no trato gastrointestinal e sua biotransformação ocorre primariamente no fígado, por enzimas microsossomais do sistema de funções oxidases mistas, associadas ao citocromo P-450 (FORRESTER et al., 1990). A AFB1 é considerada uma das substâncias mais tóxicas para o fígado, sendo este o principal órgão atingido.

Os efeitos mutagênicos se processam em duas fases distintas denominadas iniciação e promoção de neoplasia (REDDY et al., 2006). As mutações ocorridas a nível celular determinam a fase de iniciação, e a promoção neoplásica se dá com expressão fenotípica das modificações primárias (GEYIKOGLU & TÜRKEZ, 2005). As lesões bioquímicas geradas em RNA e proteínas caracterizam mecanismos de toxicidade aguda da AFB1 por conduzir à morte celular (CHOY, 1993).

Os efeitos citotóxicos de AFB1 ocorrem devido a formação de radicais livres dentro dos hepatócitos resultando na peroxidação dos fosfolipídeos e consequente aumento na permeabilidade das membranas plasmática, mitocondrial, do retículo endoplasmático e dos lisossomos, reduzindo a fluidez, inativação completa das proteínas de membrana e despolarização da membrana mitocondrial (BISCHOFF & RAMAIAH, 2007).

4.4.2 Presença de aflatoxinas em alimentos

Verifica-se maior ocorrência de aflatoxinas em produto de origem vegetal oriundo de debulha manual, ensacado e armazenado com uma umidade elevada e quando se reumedece o produto depois de seco (SABINO, 2002).

O número de trabalhos que avalia a contaminação fúngica e por micotoxinas em grãos no Brasil principalmente no estado de São Paulo, em alimentos destinados ao consumo humano e animal, como amendoim e derivados, milho, feijão e rações (RODRIGUES-AMAYA; SABINO, 2002).

A falta de Boas Práticas Agrícolas, bem como as condições tropicais de temperatura e umidades elevadas, propicia o desenvolvimento fúngico, principalmente no milho, que constitui um ótimo substrato, rico em carboidratos. Durante o armazenamento, essa atividade fúngica, pode levar a rápida deterioração na qualidade nutricional dos grãos e à contaminação por micotoxinas (MAGAN; ALDRED, 2007).

Considerando a toxicidade das aflatoxinas, o Brasil através do Ministério da Saúde e do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, estabeleceu através da resolução RDC nº 274, o limite máximo de 20 ppb/kg, dado pela somatória de B1+B2+G1+G2, sendo válido para amendoim (com casca, descascado, cru ou tostado), pasta de amendoim (ou manteiga de amendoim) e milho em grão (inteiro, partido, amassado, moído, farinhas e sêmolos) e 50 ppb/kg para ração animal (BRASIL, 2002), sendo este limite diminuído para 20 ppb/kg para alimentos destinados ao consumo de cães e gatos vide o Manual de Qualidade da ANFAL PET de 2016.

4.5 Fumonisinias

As fumonisinias são metabólitos secundários do gênero *Fusarium* o qual se destaca como um dos mais importantes em termos de perdas globais devido às micotoxicoses (SMITH; SEDDON, 1998). Isso se deve ao fato desse gênero ter a capacidade de produzir uma variedade de micotoxinas, sendo as mais importantes os tricotecenos (vomitoxina e T-2 entre outras), as fumonisinias, a zearalenona, a moniliformina e o ácido fusárico.

Espécies de *Fusarium*, produtoras de fumonisinias, são citadas por MILLS (1989) como as principais invasoras de grãos de milho no campo, podendo causar várias doenças, como a podridão de sementes e colmo. O pesquisador alerta que os níveis de fumonisinias podem aumentar quando as condições de armazenamento forem favoráveis ao crescimento do fungo e à produção de fumonisinias.

Inicialmente descritas e caracterizadas em 1988 (BEZUIDENHOUT et al. 1988, GELDERBLOM et al. 1988), essas substâncias são produzidas por diversas espécies do gênero *Fusarium*, especialmente por *Fusarium verticillioides* (anteriormente classificado como *Fusarium moniliforme*), *Fusarium proliferatum* e *Fusarium nygamai*, além da *Alternaria alternata* f. sp. *lycopersici* (BENNETT e KLICH, 2003). Outras espécies, tais como *Fusarium anthophilum*, *Fusarium dlamini*, *Fusarium napiforme*, *Fusarium subglutinans*, *Fusarium polyphialidicum* e *Fusarium oxysporum* têm sido incluídos no grupo de produtores dessas micotoxinas (POZZI et al., 2002).

As fumonisinas foram isoladas pela primeira vez por BEZUIDENHOUT et al. (1988) e são constituídas de moléculas estruturalmente relacionadas. Pertencentes ao grupo de micotoxinas produzidas por *Fusarium verticillioides*, *F. proliferatum*, *F. nygamai* e *Alternaria alternata* (LAZZARI, 1997), são conhecidas as fumonisinas B1, B2, B3, B4, A1 e A2 onde as principais são as B1, B2 e B3 (PINTO, 2007). Embora 28 análogos tenham sido identificados (RHEEDER et al., 2002), a fumonisina B1 representa aproximadamente 70% da contaminação total das fumonisinas detectadas e é considerada a mais tóxica (CRUZ, 2010).

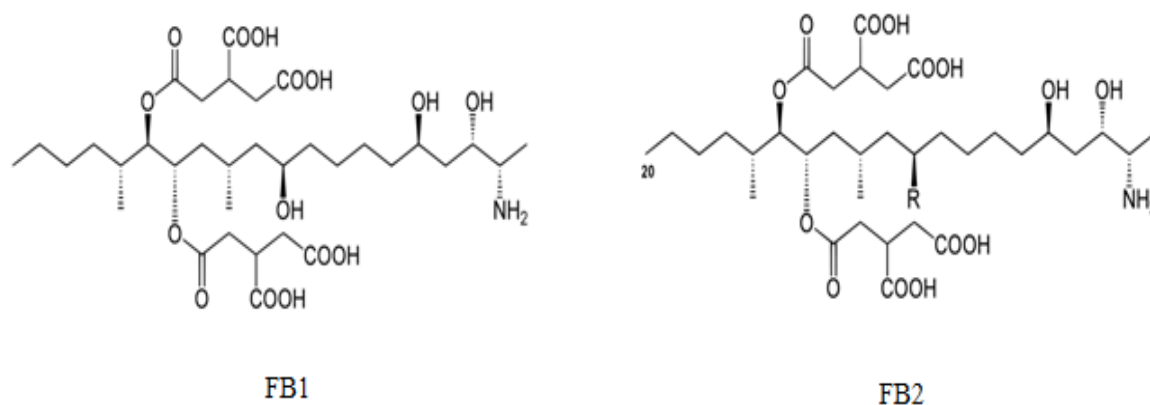


Figura 2. Estrutura química das principais fumonisinas, adaptado de WILSON, 2005.

4.5.1 Mecanismo de ação das fumonisinas e patogênia

A contaminação de alimentos com fumonisinas tem sido associada a várias doenças que podem afetar a saúde em animais, entre elas a leucoencefalomácia em cavalos, edema pulmonar em suínos e toxicidade renal e hepatotoxicidade em ovelhas, ratos e coelhos (OTTONI, 2008).

O efeito tóxico das fumonisinas está relacionado principalmente com os níveis de contaminação e com o tempo de consumo do alimento contaminado. As fumonisinas são consideradas possivelmente carcinogênicas e termoestáveis, apresentando grandes riscos para pessoas e animais domésticos que consomem milho ou subprodutos contaminados, podendo provocar náuseas, alucinações, dermatites e até mesmo a morte (LAZZARI, 1997).

A Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC) classificou as fumonisinas como possivelmente cancerígenas a seres humanos. Segundo MARASAS et. al. (2004), os níveis desta micotoxina em milho estão epidemiologicamente correlacionados com alta ocorrência de câncer esofágico em seres humanos.

4.5.2 Presença de fumonisinas em alimentos

A ocorrência de fumonisinas em milho e em produtos derivados tem sido relatada em vários estudos realizados no Brasil. Para o milho BITTENCOURT, et al. (2005) encontraram resultados de até 15.300 µg/kg em amostras coletadas na região de São Paulo, ao passo que HIROOKA et al. (1996) relataram níveis de fumonisina B1 de 10.590 µg/kg e FB2 de 10.310 µg/kg em amostras da região do Paraná.

MACHINSK e SOARES (2000) analisaram fumonisinas totais em produtos a base de milho (farinha, canjica, farinha pré-cozida, pipoca e milho em grão) em Campinas, com níveis de até 2890 µg/kg, enquanto que KAWASHIMA (2004) encontrou até 8.600 µg/kg de fumonisina B1 em amostras de derivados de milho (farinha, canjica, flocos pré-cozidos, fubá, pipoca e quirera) coletadas em Pernambuco. A farinha de milho proveniente dos estados de MS, PR, SC e RS apresentou uma média de 5.737 µg/kg de fumonisinas totais (SCAFF; SCUSSEL, 2004).

Ao longo dos últimos 10 anos, outros trabalhos continuam relatando a ocorrência de fumonisinas em derivados de milho. Como exemplo citam-se a contaminação de fubá de milho comercializado em Sete Lagoas-MG com níveis de fumonisinas totais de até 985 µg/kg (FERREIRA et al., 2013), amostras de farinha, flocos, canjica e pipoca comercializados em Pirassununga – SP contendo até 1.208,6 µg/kg de fumonisina B1 (BORDIN et al., 2014) e amostras de farinha de milho atingindo níveis máximos de 2.040 µg/kg de fumonisinas totais (B1 e B2) no Distrito Federal (CALDAS; SILVA, 2007). No Paraná, MARTINS et al. (2012), relataram valores máximos de 3.462 µg/kg e 886 µg/kg de fumonisina B1 e fumonisina B2, respectivamente, em farinha e grits de milho. Neste sentido, os níveis de contaminação encontrados em milho e derivados apontam para a necessidade de estudos frequentes

relacionados com a ocorrência desta micotoxina em derivados de milho (SCAFF; SCUSSEL, 2004).

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Local e Período Experimental

O experimento foi conduzido no Laboratório de Micologia e Micotoxinas do Departamento de Ciência de Alimentos da Universidade Federal de Lavras – UFLA e no Laboratório de Micotoxinas da Embrapa Milho e Sorgo, na cidade de Sete Lagoas – MG.

As rações comerciais para cães e gatos foram adquiridas em estabelecimentos na região do Sul de Minas Gerais, nas cidades de Alfenas, Lavras, Três Corações e Varginha, em embalagens lacradas, dentro do prazo de validade indicado pelo fabricante e armazenadas dentro das recomendações até o início das análises laboratoriais.

O período experimental foi de 30 dias.

Tabela 4. Quantidade de alimentos comerciais para cães e gatos de linhas standard, premium e super premium coletados nos municípios de Alfenas, Lavras, Três Corações e Varginha

Produtos	Quantidade de marcas Coletadas	Período da coleta
Standard para Cães	5	ago/17
Premium para Cães	10	set/17
Premium para Gatos	10	set/17
Super Premium para Cães	5	out/17
Super Premium para Gatos	5	out/17

5.2 Testes para Aflatoxinas e Fumonisinias

A análise para Aflatoxinas foi realizada utilizando o Aflatest (VICAN), através do método de cromatografia de afinidade com anticorpos monoclonais. O teste apresenta resultado para Aflatoxinas Totais (B1 + B2 + G1 + G2). A leitura foi realizada com o uso de fluorímetro digital, no Laboratório de Micotoxinas da Embrapa Milho e Sorgo em Sete Lagoas – MG.

Para a análise de Fumonisinias se utilizou o Fumonitest (VICAN), através do método de cromatografia de afinidade com anticorpos monoclonais. O teste apresenta resultado para Fumonisinias (B1 + B2). A leitura foi realizada com o uso de fluorímetro digital, no Laboratório de Micotoxinas da Embrapa Milho e Sorgo em Sete Lagoas – MG.

Os testes apresentam resultados confiáveis e quantitativos, através de métodos aprovados e utilizados pelas empresas do ramo pet food, sendo que estes resultados encontrados foram analisados de forma comparativa com os níveis de tolerância indicados pela ANFAL PET, 2016.

5.3 Ensaio e Delineamento Experimental

Foram selecionadas 35 rações comerciais para cães e gatos, levando em consideração os produtos de maior destaque no mercado nacional e suas representatividades em vendas, sendo 15 amostras de rações para gatos e 20 amostras de rações para cães.

As rações foram coletadas dentro do prazo de validade em embalagens íntegras, sendo 10 rações de linha Premium para gatos, 5 rações de linha Super Premium para gatos, 5 rações de linha Econômica para cães, 10 rações de linha Premium para cães e 5 rações de linha Super Premium para cães. O critério estabelecido para a classificação das rações em linhas foram descritos por CASE et al., 2011.

As amostras receberam numerações aleatoriamente para sua identificação, a fim de se manter a discrição dos fabricantes dos produtos e a representatividade do experimento. As amostras foram submetidas então as análises de contaminantes microbiológicos, quantitativamente, para a presença de aflatoxinas e fumonisinas. Os resultados da microbiologia foram analisados de acordo com os índices de segurança alimentar apresentados pela ANFAL PET, 2016.

5.4 Preparo das amostras

Para extração das amostras foram pesadas em balança de precisão 50g de cada um dos produtos, em duplicata, para cada uma das análises de aflatoxinas e fumonisinas. As amostras então foram processadas em liquidificador juntamente com 5g de sal (NaCl) e 100 ml de solução de metanol : água (80:20) por tempo cronometrado de 1 minuto.

5.5 Preparo das soluções de diluição e lavagem

Foram preparadas soluções de metanol : água (80:20), com uso de concentrações de 20 ml de metanol grau HPLC com a adição de água purificada, sendo esta solução utilizada para preparação das amostras.

A solução do tampão PBS (salina tampão fosfato) foi preparada com 8 g de NaCl, 1,2 g de Na₂HPO₄, 0,2 g de KH₂PO₄ e 0,2 g de KCl dissolvidos em aproximadamente 990 ml de água purificada, sendo o ajuste do pH da solução a 7.0 com uso de HCl concentrado.

Para preparo da solução de lavagem PBS / 0,1% Tween 20, foi adicionado 1 ml de Tween-20 a 1000 ml de PBS, que foram misturados.

5.6 Filtração das amostras

O produto da amostra devidamente processada juntamente com o sal (NaCl) e solução de metanol : água (80:20) foi passado por um primeiro processo de filtração com uso de bomba de pressão negativa através de filtro de papel plissado. O filtro de papel plissado foi completamente aberto e colocado dentro de funil de vidro, para aumentar a superfície de filtração.

Foram pipetados então 10 ml do filtrado em uma proveta limpa, que foram diluídos com 40 ml de água purificada para as análises quantitativas de aflatoxinas e com 40 ml de tampão PBS/0,1% Tween 20 para as análises quantitativas de fumonisinas.

Deu-se início então ao segundo processo de filtração, com uso de filtro de microfibra e uso de bomba de pressão negativa. O filtro de microfibra foi encaixado dentro de um funil de vidro. Foram utilizados filtros distintos para cada um dos processos de filtração, que foram descartados após uso.

5.7 Cromatografia de afinidade

Para a análise quantitativa de aflatoxinas, foi passado 2 ml do extrato filtrado (2 ml = 0,2 g da amostra) completamente através da coluna de afinidade Aflatest a um fluxo de cerca de 1-2 gotas / segundo até que o ar passasse pela coluna, com auxílio de seringa de vidro. Após, foi realizada a lavagem da coluna para a retirada de impurezas, por duas vezes conforme procedimento Aflatest, com uso de 5 ml de água purificada, em fluxo médio de 2 gotas por segundo, até que o ar passasse pela coluna. As aflatoxinas então foram eluídas da coluna de afinidade pela passagem de 1 ml de metanol grau HPLC, a um fluxo de 1-2 gotas / segundo e coletada totalmente em uma cubeta de vidro.

Para a análise quantitativa de fumonisinas, foi passado 10 ml do extrato filtrado completamente através de uma coluna de afinidade Fumonitest a um fluxo de cerca de 1-2 gotas / segundo até que o ar passasse pela coluna, com auxílio de seringa de vidro. Foi passado então 10 ml do tampão PBS com 0,1% Tween 20 através da coluna a um fluxo de cerca de 2 gotas / segundo. Foi realizado então processo de lavagem da coluna para a retirada de impurezas com uso de tampão PBS puro sem a adição de 0,1% de Tween 20, conforme recomendação do procedimento Fumonitest. As fumonisinas então foram eluídas da coluna de

afinidade pela passagem de 1 ml de metanol grau HPLC, a um fluxo de 1 gota por segundo e coletada totalmente em uma cubeta de vidro.

Após estas etapas, as cubetas foram colocadas em refrigerador em temperatura aproximada de 2° C, para após serem levadas para a Embrapa Milho e Sorgo, na cidade de Sete Lagoas – MG para a leitura em fluorímetro.

5.8 Análises estatísticas

Para as análises estatísticas foi aplicada a estatística descritiva para todas as linhas de produtos, demonstrando as contaminações por aflatoxinas e fumonisinas. Foram realizadas as médias e desvio padrão para cada uma das linhas de produtos (standard para cães, premium para gatos, premium para cães, super premium para gatos e super premium para cães. A estatística aplicada foi descrita por CRUZ, 2010.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram encontrados resultados positivos para presença de aflatoxinas e fumonisinas em todas as linhas de produtos analisados, conforme se pode observar nas tabelas com os dados de médias das duplicatas para cada amostra analisado (tabelas 5, 6, 7, 8 e 9).

Tabela 5. Valores médios de duplicatas para contaminação por aflatoxinas e fumonisinas em alimentos comerciais para cães de linha standard

CLASSIFICAÇÃO	PRODUTO	AFLATOXINAS (µg/kg)	FUMONISINAS (µg/kg)
Standard Cães	1	5,8	14.000
	2	0,71	3.500
	3	0,18	4.600
	4	0,74	12.000
	5	1,2	1.800

Tabela 6. Valores médios de duplicatas para contaminação por aflatoxinas e fumonisinas em alimentos comerciais para cães de linha premium

CLASSIFICAÇÃO	PRODUTO	AFLATOXINAS (µg/kg)	FUMONISINAS (µg/kg)
Premium Cães	1	0,43	1.000
	2	1,2	2.000
	3	0,52	7.200
	4	3,8	9.100
	5	0,8	4.200
	6	0,15	5.600
	7	0,35	4.400
	8	1,7	4.100
	9	1,3	6.600
	10	0,64	3.700

Tabela 7. Valores médios de duplicatas para contaminação por aflatoxinas e fumonisinas em alimentos comerciais para gatos de linha premium

CLASSIFICAÇÃO	PRODUTO	AFLATOXINAS (µg/kg)	FUMONISINAS (µg/kg)
Premium Gatos	1	1,4	3.700
	2	1,8	7.500
	3	1,3	6.000
	4	0,22	8.100
	5	0,63	5.300
	6	11	7.400
	7	0,34	5.500
	8	4,2	3.200
	9	3,8	2.700
	10	1	1.700

Tabela 8. Valores médios de duplicatas para contaminação por aflatoxinas e fumonisinas em alimentos comerciais para cães de linha super premium

CLASSIFICAÇÃO	PRODUTO	AFLATOXINAS (µg/kg)	FUMONISINAS (µg/kg)
Super Premium Cães	1	1,1	6.400
	2	2,5	4.900
	3	1,8	8.800
	4	1,6	6.000
	5	1,5	5.000

Tabela 9. Valores médios de duplicatas para contaminação por aflatoxinas e fumonisinas em alimentos comerciais para gatos de linha super premium

CLASSIFICAÇÃO	PRODUTO	AFLATOXINAS (µg/kg)	FUMONISINAS (µg/kg)
Super Premium Gatos	1	2	8.000
	2	4,2	3.200
	3	1,2	9.700
	4	0,93	14.000
	5	13	1.400

6.1 Contaminação por aflatoxinas

Foram realizadas as análises para presença e quantificação de aflatoxinas para um total de 35 amostras, em duplicata, que foram divididos em linhas de segmentação de mercado conforme descrito por CASE et al. 2006. Os resultados podem ser observados na tabela 10.

Tabela 10. Determinação de Aflatoxina Total (B1 + B2 + G1 + G2) nos alimentos comerciais para cães e gatos de linhas standard, premium e super Premium

Produto	Amostras Positivas ^a	Acima do limite ^b	Aflatoxina Total (µg/kg) ^c	Variação (µg/kg)
Standard Cães	5/5	0/5	1,726 ± 2,062	0,18 - 5,8
Premium Cães	10/10	0/10	1,089 ± 1,012	0,15 - 3,8
Premium Gatos	10/10	0/10	2,569 ± 3,090	0,22 - 11
Super Premium Cães	5/5	0/5	1,7 ± 0,460	1,1 - 2,5
Super Premium Gatos	5/5	0/5	4,266 ± 4,515	0,93 - 13

^a Positivas para presença de Aflatoxina Total (B1 + B2 + G1 + G2)

^b Acima do limite permitido pela legislação (20 µg/kg)

^c Médias ± Desvio padrão de amostras analisadas em duplicata

Pode-se observar que há a presença de aflatoxinas em todos os produtos avaliados, dentro de níveis aceitáveis pela legislação do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA e também em conformidade com as recomendações do Manual do Programa Integrado de Qualidade Pet da ANFAL PET, 2016, que é Máximo de 20 ppb/kg. Mesmo dentro de valores aceitáveis existe grande variação de quantidades de aflatoxinas

dentre as amostras analisadas, sendo a menor quantidade encontrada a de 0,15 ppb/kg em produto de linha premium para cães e a maior quantidade a de 13 ppb/kg para produto de linha super premium para gatos. Verifica-se também o menor valor médio de quantidade de aflatoxinas de 1,089 ppb/kg na linha de alimentos premium para cães, enquanto a maior concentração foi de 4,226 ppb/kg na linha de alimentos super premium para gatos.

Conforme descrito por IAMANKA, 2010, os fungos do gênero *Aspergillus* são favorecidos por clima tropical, onde a umidade na estocagem pode interferir diretamente na produção de aflatoxinas. Podemos observar que a estocagem tanto nas indústrias como em estabelecimentos comerciais está sendo realizada de forma adequada, mantendo os níveis de aflatoxinas dentro de um padrão exigido e recomendado por legislação. SIQUEIRA, 2007 cita as aflatoxinas como um problema pós-colheita, mas que não pode ser descartado também na compra da matéria-prima.

Os alimentos destinados ao consumo de cães possuem maior índice de saída no mercado, devido à população de cães ser de 52,2 milhões de cães no Brasil, enquanto a população de gatos é de cerca de 22,1 milhões, segundo a ABINPET, 2017. Isso remete a informação de que os alimentos comerciais para gatos permanecem por mais tempo estocados tanto nas indústrias como nos estabelecimentos, podendo ser um fator que contribui para os maiores níveis de aflatoxinas nesses produtos, sendo os valores de 2,569 ppb/kg para linha premium gatos e de 4,266 ppb/kg para linha super premium gatos.

Recentes casos inclusive com óbito de cães no Brasil devido à contaminação por aflatoxinas alarmaram a indústria pet food. É provável que as empresas tenham desenvolvido metodologias efetivas em seus programas de garantia de qualidade, que se refletem nos dados dentro dos parâmetros exigidos em legislação.

6.2 Contaminação por fumonisinas

Foram realizadas as análises para presença e quantificação de fumonisinas para um total de 35 amostras, em duplicata, que foram divididos em linhas de segmentação de mercado conforme descrito por CASE et al. 2006. Os resultados podem ser observados na tabela 11.

Tabela 11. Determinação de Fumonisina (B1 + B2) nos alimentos comerciais para cães e gatos de linhas standard, premium e super premium

Produto	Amostras Positivas ^a	Acima do limite ^b	Fumonisina Total (µg/kg) ^c	Variação (µg/kg)
Standard Cães	5/5	3/5	7.180 ± 4.876,228	1.200 - 14.000
Premium Cães	10/10	7/10	4.790 ± 2.294,101	1.000 - 9.100
Premium Gatos	10/10	6/10	5.110 ± 2.096,401	1.700 - 8.100
Super Premium Cães	5/5	5/5	6.220 ± 1.411,949	4.900 - 8.800
Super Premium Gatos	5/5	3/5	7.260 ± 4.533,254	1.400 - 14.000

^a Positivas para presença de Fumonisina (B1 + B2)

^b Acima do limite permitido pela legislação (4.000 µg/kg)

^c Médias ± Desvio padrão de amostras analisadas em duplicata

Observa-se que o índice de presença de fumonisinas foi positivo para todas as amostras analisadas, sendo que na quantificação 68,57% do total de amostras se encontram acima dos limites de tolerância e recomendação pela legislação do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA e pelo Manual do Programa Integrado de Qualidade Pet – ANAFAL PET 2016, que é nível máximo de 4.000 ppb/kg. Há grande variação também entre os valores analisados, sendo o menor de 1.000 ppb/kg para alimento de linha premium para cães e o mais elevado de 14.000 ppb/kg para produtos de linha standard para cães e super premium para gatos.

Os fungos do gênero *Fusarium* são associados principalmente a produção de micotoxinas nas lavouras, conforme descrito por IMANKA, 2010, podendo indicar que a indústria pet food possui dificuldades quanto a certificação e integridade de matérias-primas. Deve-se ressaltar a necessidade de uma maior controle produtivo para evitar a contaminação por fumonisinas.

Dos alimentos standard para cães, 60% apresentaram índice de contaminação por fumonisinas acima do aceitável, sendo o valor médio de fumonisinas de 7.180 ppb/kg. Na linha premium para cães foi encontrado o menor valor médio de fumonisinas, de 4.790 ppb/kg, ainda assim, acima do recomendado, sendo que 70% das amostras apresentaram contaminação acima de nível máximo. Nos produtos de linha premium para gatos houve índice de contaminação acima do recomendado em 60% das amostras, sendo o valor médio da

presença de fumonisinas de 5.110 ppb/kg. Na linha super premium para cães 100% dos produtos se encontravam com níveis de fumonisina acima da recomendação, sendo o valor médio de 6.220 ppb/kg. Por fim, na linha super premium para gatos, houve índice de contaminação acima do tolerado para fumonisinas de 60%, com valor médio de 7.260 ppb/kg, o maior valor médio encontrado.

O alto valor de desvio padrão encontrado para todas as linhas de produtos para as análises de fumonisinas indicam que os dados se encontram espalhados por uma ampla gama de valores, onde podemos afirmar que há grande divergência de qualidade quanto a contaminação por fumonisinas.

7 CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo mostram que embora haja presença de aflatoxinas em todos os produtos destinados a alimentação de cães e gatos analisados, seus valores estão dentro de índices tolerados pela legislação vigente, indicando controle efetivo das indústrias do ramo com a qualidade de estocagem dos produtos, bem como no transporte e distribuição do mesmo até o consumidor final.

A alta ocorrência de fumonisinas nos alimentos comerciais para cães e gatos é preocupante, aumentando a exposição dos animais a estas micotoxinas, onde 68,57% do total de produtos analisados apresentaram níveis de contaminação acima de 4.000 ppb/kg, nível de tolerância recomendado pela legislação vigente. É um fator indicativo de que a contaminação por micotoxinas pode ter início na lavoura, onde grãos que serão inclusos nas formulações dos alimentos, necessitariam de maior controle de qualidade e melhor seleção de matérias-primas, onde os fornecedores conseguissem certificar seus produtos em níveis adequados para as fumonisinas.

A exposição do animal a essas micotoxinas de forma freqüente, também pode ser fator para que se desencadeie uma série de problemas de saúde, independente dos níveis de concentração das toxinas.

8 ANEXOS



Figura 3. Pesagem da amostra em balança de precisão



Figura 4. Processamento da amostra com NaCl e solução metanol : água (80 : 20)



Figura 5. Primeira etapa de filtração em filtro de papel plissado com uso de bomba de pressão negativa

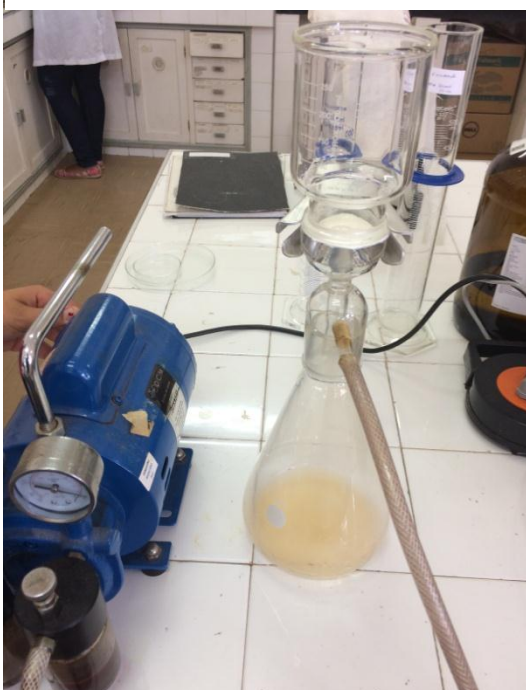


Figura 6. Segunda etapa de filtração em filtro de microfibra com uso de bomba de pressão negativa



Figura 7. Cromatografia de afinidade para aflatoxinas – coluna de imunoafinidade Aflatest VICAM



Figura 8. Cromatografia de afinidade para fumonisinas – coluna de imunoafinidade Fumonitest VICAM



Figura 9. Calibração do fluorímetro digital série-4 VICAM – Embrapa Milho e Sorgo



Figura 10. Preparação das amostras e pipetagem em cubetas



Figura 11. Inoculação de reveladores VICAM para realização de leitura em fluorímetro



Figura 12. Teste de calibração do fluorímetro digital série-4 VICAM

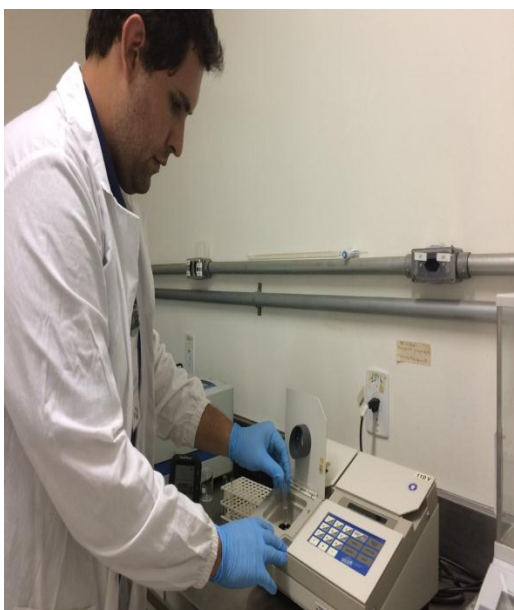


Figura 13. Encaixe de cubeta de vidro com amostra para leitura em fluorímetro

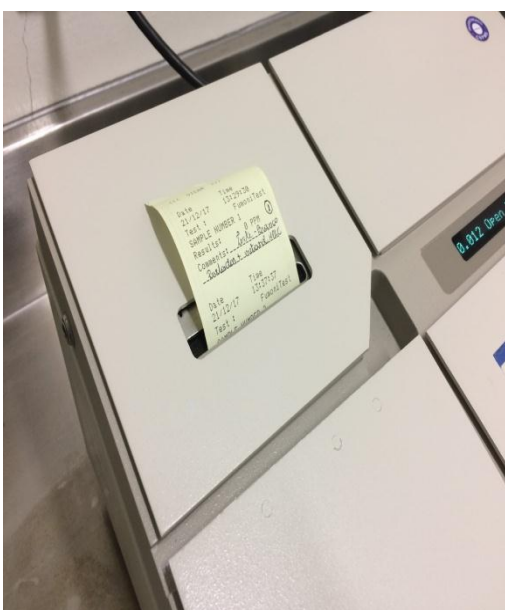


Figura 14. Leitura e resultados em bobina para análises de aflatoxinas e fumonisinas

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABINPET, Associação Brasileira da Indústria de Produtos para Animais de Estimação. Em: www.abinpet.org.br/site, acesso em setembro de 2017.

ANDRADE, R. M.; NASCIMENTO, J. S. Presença de fungos filamentosos em ração para cães comercializadas na cidade Pelotas – RS. **Arquivo do Instituto Biológico de São Paulo**, São Paulo, v. 72, n. 2, p. 10 – 12, 2005.

ANDRIGUETTO, J. M. et al. **As bases e os fundamentos da nutrição animal**. 4 ed. São Paulo: Nobel, 1990.

APHA. American Public Health Association. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4ed. 676 p. 2001.

ASSOCIAÇÃO NACIONAL DOS FABRICANTES DE ALIMENTOS PARA ANIMAIS DE ESTIMAÇÃO - ANFALPET. **Manual do programa integrado de qualidade pet**. 2.ed. 238p. São Paulo: 2008.

Association of the official analytical chemistry - AOAC. **Official methods of analysis**. 16 ed. Arlington: AOAC International. 1025p., 1995.

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

BITTENCOURT, A. B. F., et al. Mycotoxin occurrence in corn meal and flour traded in São Paulo, Brazil. **Food Control**. v.16, p.117-120, 2005

BERNARDI, E. & NASCIMENTO, J.S. Fungos anemófilos na praia do Laranjal, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil. **Arquivo do Instituto Biológico de São Paulo**, São Paulo, v. 72, n. 1, p. 93-97, 2005.

BERTECHINI, A. G. **Nutrição de monogástricos**. Lavras: Editora UFLA. 2ª edição revisada,p. 69 – 126. 2012.

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

BLESA, J.; SORIANO, J.M.; MOLTÓ, J.C.; MARÍN, R.; MAÑES, J. Determination of aflatoxins in peanut by matrix solid-phase dispersion and liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, New York, v.1011, p.49-54, 2003.

BOARI, C. A. Gestão da qualidade no processo produtivo de alimentos para cães e gatos. Em: **Anais III Simpósio de Nutrição e Alimentação de Cães e Gatos**, Lavras – MG, p. 67 – 80, Lavras, 2007.

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

BORDIN, K., et al. Assesment of dietary intake of fumonisin B1 in São Paulo, Brazil. **Food Chemistry**. v.155, p.174-178, 2014.

BRANDÃO, P. A. et. al. Avaliação da qualidade bromatológica e microbiológica de rações para cães. **Revista Científica de Produção Animal**, v. 13, p. 71 – 74, 2011.

CALDAS, E. D.; SILVA, A. C. S. Mycotoxin in Corn-Based Food Products Consumed in Brazil: An Exposure Assesment for Fumonisins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.55, p.7974-7980, 2007.

CARCIOFI, A.C. Proposta de normas e padrões nutricionais para a alimentação de cães e gatos. In: **Simpósio sobre nutrição de animais de estimação**, 3., 2003, Campinas. *Anais...* Campinas, 2003. p.71-84.

CARCIOFI, A. C. et al. Composição nutricional e avaliação de rótulo de rações secas para cães comercializadas em Jaboticabal – SP. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, n. 3, p. 421 – 426, 2006.

CASE, L. P.; CAREY, D. P.; HIRAKAWA, D. A. Nutrição Canina e Felina. **Manual para Profissionais**, Madrid – Espanha: Harcourt Brace deEspana S. A., 424 p., 1998.

CHALFOUN, Y. et al. Análises microbiológicas e de aflatoxinas no controle de qualidade de rações para cães. **Revista Ciência e Vida**. Seropédica – RJ, v. 28, suplemento, p. 25 – 27, 2008.

CHIAVARO, E.; DALL’ASTA, C.; GALAVERNA, G.; BIANCARDI, A.; GAMBARELLI, E.; DOSSENA, A.; MARCHELLI, R. New reversed-phase liquid chromatography method to detect aflatoxins in food and feed with cyclodextrins as fluorescence enhancers added to the eluent. **Journal of Chromatography A**, New York, v.937, p.31-40, 2001.

CHOY, W.N. A review of the dose-response induction of DNA adducts by aflatoxin B1 and its implications to quantitative cancer-risk assessment. **Mutation Research**, Amsterdam, v.296, p.181- 198, 1993.

CHU, F. S. Mycotoxins: food contamination, mechanism, carcinogenic potencial and preventive measures. **Mutat. Res.**, v. 259, p. 291 – 306, 1991.

COULOMBE, R. A. Aflatoxins. In: SHARMA, R. P. & SALUNKHE, D. K. Eds. **Mycotoxins and phytoalexins**. Boca Raton, CRC Press, 1991, p. 103 – 143.

CRUZ, J. V. S. Ocorrência de aflatoxinas e fumonisinas em produtos à base de milho e milho utilizado como ingrediente de rações para animais de companhia, comercializadas na região de Pirassununga, São Paulo. Pirassununga, 2010. Tese de doutorado em zootecnia, Universidade de São Paulo.

DINIZ, S.P.S.S. **Micotoxinas**. 1 ed. Campinas: Editora Rural, 2002. 181p.

FERREIRA, P., et al. Incidência de Aflatoxinas e Fumonisinas em Produtos de Milho consumidos no estado de Minas Gerais. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v.12, n.1, p.54-60, 2013.

FORRESTER, L.M.; NEAL, G.E.; JUDAH, D.J.; GLANCEY, M.J.; WOLF, C.R. Evidence for involvement of multiple forms of cytochrome P-450 in aflatoxin B1 metabolism in human liver. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v.87, p.8306-8310, 1990.

FRAZIER, W.C. & WESTHOFF, P.C. **Microbiologia de los alimentos**. 4 ed. Zaragoza: Acribia, 1993. 229p.

FRISVAD, J. C.; SAMSON, R. A. Filamentous fungi in food and feeds: ecology, spoilage and micotoxin production. In. ARORA, D. K.; MUKERJII, K. G.; MARTH, E. H. (Eds.). **Handbook of applied mycology**. Food and feeds. New York, Marcel Dekker Inc., v. 3, p. 31 – 68, 1992.

GEYIKOGLU, F.E.; TÜRKEZ, H. Protective Effect of Sodium Selenite on Genotoxicity to Human Whole Blood Cultures Induced by Aflatoxin B1. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v.48, n.6, p.905-910, 2005.

GIRIO, T. M. S. Qualidade microbiológica de rações para cães comercializadas no varejo em embalagem fechada e a granel. Jaboticabal, São Paulo, 2007. Dissertação de mestrado em medicina veterinária, Universidade Estadual Paulista.

HIROOKA, E. Y., et al. The natural occurrence of fumonisins in Brazilian corn kernels. **Food Additives and Contaminants**. London, v.13, n.2, p.173-183, 1996

HOLLINGER, K.; EKPERIGIN, H.E. Mycotoxicosis in food producing animals. **Chemical Food Borne Hazards and their Control**, Philadelphia, v.15, n.1, p.133- 165, 1999.

HUSSEIN, S. H.; BRASEL, J. M. Toxicity, metabolism and impact of mycotoxins on human and animals. **Toxicology**, v. 167, n. 2, p. 101 – 134, 2001.

INSTRULAB. **A Técnica NIR Aplicada a Alimentos**. E-book. Instrulab Instrumentos para Laboratórios, 2017.

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

JONES, F. T. A review of practical Salmonella control measures in animal feed. **Poultry Science Association**, v. 20, p. 102 – 113, 2011.

KAWASHIMA, L. M. Micotoxinas em alimentos e bebidas nacionais produzidos e comercializados em diferentes regiões do Brasil. 2004. 95 f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.

LAZARRI, F. A. Simpósio de Proteção de Grãos Armazenados. **Anais**. Embrapa – CNPT, p. 62- 68, 1993.

LAZZARI, F. A. **Umidade, fungos e micotoxinas na qualidade de sementes, grãos e Rações**. 2. ed. Curitiba: Ed. do Autor, 1997.

LIU, Z.; GAO, J.; YU, J. Aflatoxins in stored maize and rice grains in Liaoning Province, China. **Journal of Stored Products Research**, Oxford, v.42, p.468-479, 2006.

MACHINSKI JR., M.; VALENTE SOARES, L. M. Fumonisin B1 and B2 in Brazilian corn-based food products. **Food Additives and Contaminants**, v. 17, n. 10, p. 875- 879, 2000.

MAGAN, N; ALDRED, D. Post-harvest control strategies: Minimizing mycotoxins in the food chain. **International Journal of Food Microbiology**, v. 119, p. 131-139, 2007.

MALLMAN, C.A., MÜRMANN, L., KOWALSKI, C.H., SILVEIRA, V.G. Níveis de contaminação por aflatoxinas em rações animais. **Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária**, XXIV, Gramado-RS, 2002. Anais. Gramado-RS.

MAPA, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Legislação alimentação animal**. Em: www.agricultura.gov.br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-pecuarios/alimentacao-animal/legislacao-alimentacao-animal, acesso em setembro de 2017.

MARTINS, Fernanda A. et al. Daily intake estimates of fumonisins in corn-based food products in the population of Parana, Brazil. **Food control**, vol. 26, p.614-618, 2012.

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

MERCK. **The Merck Index**. 12 ed. New Jersey: Merck & Co, Inc, 1996.

MILLS, J. T. Ecology of mycotoxigenic *Fusarium* species on cereal seeds. **Journal of Food Protection**, v.52, p.737-742, 1989.

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

National Research Council. **Nutrient Requirements of Dogs and Cats**. Washington, DC: Natl. Acad. Press. 2006.

OTTONI, J. R. Análise da incidência de *Fusarium* spp. Toxicogênico e de níveis de fumonisinas em grãos ardidos de milho híbrido. 2008. 54 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Escola Superior Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2008.

PAPP, E.; OTTA, K.; ZÁRAY, G.; MINCSOVICS, E. Liquid chromatography determination of aflatoxins. **Microchemical Journal**, New York, v.73, p.39-46, 2002.

PINTO, N. F. J. A., et al. Qualidade sanitária e produção de fumonisina B1 em grãos de milho na fase pré-colheita. **Summa Phytopathol**, Botucatu, v. 33, n. 3, p.304- 306, 2007.

POZZI, C. R.; ARCARO, J. R. P.; ARCARO JUNIOR, I. A.; FAGUNDES, H.; CORRÊA, B. Aspectos relacionados à ocorrência e mecanismo de ação de fumonisinas. **Ciência Rural**, v. 32, n. 5, p. 901-907, 2002.

REDDY, L.; ODHAV, B.; BHOOLA, K. Aflatoxin B1-induced toxicity in HepG2 cells inhibited by carotenoids: morphology, apoptosis and DNA damage. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v.387, n.1, p.87-93, 2006.

RHEEDER, John A., et al. Production of Fumonisin Analogs by Fusarium Species. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.68, n. 5, p.2101-2105, 2002.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B; SABINO, M. Micotoxin research in Brazil: the last decade in review. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 33, p. 1-11, 2002.

SABINO, M. Micotoxinas em Alimentos. In: OGA, S. (Ed.) **Fundamentos de Toxicologia**. São Paulo: Atheneu Editora, 2002. p.461-472.

SAAD, F. M. O. B. et al. Padrões nutricionais e de qualidade. Anais III **Simpósio de Nutrição e Alimentação de Cães e Gatos**, Lavras, 2007.

SANTOS, E. J. et al. Qualidade microbiológica de farinhas de carne e ossos produzidas no estado de Minas Gerais para produção de ração animal. **Ciência Agrotécnica**, Minas Gerais, v. 24, n. 2, p. 425 – 433, 2000.

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

SCARCELLI, E.; PIATTI, R.M. Patógenos emergentes relacionados à contaminação de alimentos de origem animal. **Biológico**, v.64, n.2, p.123-127, 2002.

SILVA, A.K.; DOMARESKI, J.L. **Avaliação da qualidade microbiológica de rações para cães comercializadas no varejo de Foz do Iguaçu / PR**. Pleiade, Foz do Iguaçu, v. 9, n. 9, p. 7 – 32, jan/jun. 2011.

SILVA, N. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. São Paulo: Livraria Varela, p. 667, 1997.

SMITH, T. K; SEDDON, I. R. Synergism demonstrated between Fusarium mycotoxins. **Feedstuffs**, jun., p. 12-17, 1998.

STEEL, R.G.D. & TORRIE, J.H. **Principles and procedures of statistics**. New York: Mc Graw, 1960. 481 p.

STROKA, J.; van OTTERDIJK, R.; ANKLAM, E. Immunoaffinity column clean-up prior to thin-layer chromatography for the determination of aflatoxins in various food matrices. **Journal of Chromatography A**, New York, v.904, p.251-256, 2000.

TRABULSI, L. R. et al. **Microbiologia**. 3. ed. São Paulo: Atheneu, 1999.

VENTURA, M.; GÓMEZ, A.; ANAYA, I.; DIAZ, J.; BROTO, F.; AGUT, M.; COMELLAS, L. Determination of aflatoxins B1, G1, B2, and G2 in medicinal herbs by liquid chromatography-tandem massa spectrometry. **Journal of Chromatography A**, New York, v.1048, p.25-29, 2004.

WILSON, D.M. Aflatoxin analytical methods for groundnuts. In: SEMPLE, R.L.; FRIO, A.S.; HICKS, P.A.; LOZARE, J.V. **Mycotoxin Prevention and Control in Food Grains**. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2005. Disponível em: <http://www.fao.org/docrep/x5036e/x5036E0m.htm>. Acesso em: 5 de janeiro de 2018.

YONG, R.K.; COUSIN, M.A. Detection of moulds producing aflatoxins in maize and peanuts by an immunoassay. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.65, p.27-28, 2001.