



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DOS
ALIMENTOS**

**ROTULAGEM, QUALIDADE E SEGURANÇA BIOLÓGICA DE
ALIMENTOS PARA ANIMAIS DE COMPANHIA E SEU
IMPACTO NA SAÚDE**

KARINA KOERICH DE SOUZA

**FLORIANÓPOLIS
2013**

KARINA KOERICH DE SOUZA

**ROTULAGEM, QUALIDADE E SEGURANÇA BIOLÓGICA DE
ALIMENTOS PARA ANIMAIS DE COMPANHIA E SEU
IMPACTO NA SAÚDE**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência dos Alimentos do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito final à obtenção do grau de Doutor em Ciência dos Alimentos.

Orientadora: Prof^a Vildes Maria Scussel, PhD

**Florianópolis
2013**

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

de Souza Koerich, Karina
Rotulagem, qualidade e segurança biológica de alimentos
para animais de companhia e seu impacto na saúde / Karina
de Souza Koerich ; orientador, Vildes Maria Scussel -
Florianópolis, SC, 2013.
232 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-
Graduação em Ciência dos Alimentos.

Inclui referências

1. Ciência dos Alimentos. 2. Alimentos. 3. Qualidade.
4. Segurança. 5. Animais de companhia. I. Scussel, Vildes
Maria. II. Universidade Federal de Santa Catarina.
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos. III.
Título.

KARINA KOERICH DE SOUZA

**ROTULAGEM, QUALIDADE E SEGURANÇA BIOLÓGICA DE
ALIMENTOS PARA ANIMAIS DE COMPANHIA E SEU
IMPACTO NA SAÚDE**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência dos Alimentos do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito final à obtenção do grau de Doutor em Ciência dos Alimentos.

Florianópolis, 31 de outubro de 2013.

Coordenador do Curso

Orientadora

Banca Examinadora:

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, por todo o incentivo dado para a conclusão dessa etapa.

Aos meus irmãos, Alessandra e Fernando, pelo carinho e apoio.

A minha orientadora pela oportunidade, confiança, atenção, auxílio e dedicação durante todo o período de realização do doutorado.

À professora Maria Beatriz M. Glória, pela colaboração e realização de etapas importantes do trabalho.

À Elisa Moecke, por todos os ensinamentos e dicas importantes para a realização do trabalho. Obrigada por abrir um espaço em seu laboratório para a realização das etapas de microscopia.

À Thamara, obrigada pela amizade e auxílio no processamento das amostras, fundamental para a conclusão desse trabalho.

À equipe Nutrifarma, Marcelina e Rafael, pelo apoio e realização das análises.

Às amigas Karina Tonon, Geovana e Marcelina, pelo incentivo e apoio em todos os momentos.

À minha grande amiga Vanessa Simão, que me recebeu muito bem desde o primeiro dia no laboratório. É uma pessoa maravilhosa, sempre muito amiga e solícita.

Às minhas amigas – Ioná, Renata e Keline – pela compreensão durante esses anos de doutorado, já que não pude estar presente em todas as reuniões e encontros realizados.

A todos que direta ou indiretamente colaboraram com minha formação.

de Souza Koerich, K. **Rotulagem, qualidade e segurança biológica de alimentos para animais de companhia e seu impacto na saúde**. 2013. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) – Programa de Pós-graduação em Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

RESUMO

Nas últimas décadas houve um aumento considerável na comercialização de alimentos para animais de companhia. Com foco na garantia desses alimentos, o presente trabalho obteve dados sobre o perfil qualitativo e de segurança de produtos comercializados em diferentes continentes, relacionando a influência de contaminantes biológicos presentes nos alimentos com possíveis danos a saúde animal. As etapas iniciais de desenvolvimento e obtenção de dados foram baseadas na certificação de concordância das informações descritas na rotulagem com a legislação vigente, além da verificação da veracidade das informações nutricionais do produto final embalado. Com relação à adequação de *layouts* de alimentos secos para cães comercializados no Brasil, 100% das amostras estavam em discordância com as exigências estabelecidas em lei. Já na verificação da veracidade dos níveis de garantia nutricional declarados na rotulagem de alimentos destinados a cães e gatos, 44% não correlacionaram os níveis nutricionais presente no alimento com os níveis de garantia estabelecidos e 36% das amostras estavam em desacordo com níveis nutricionais mínimos preconizados para a manutenção e desenvolvimento animal. Indicadores de qualidade e segurança alimentar também foram avaliados com o intuito de investigar a presença de contaminantes biológicos, incluindo seus metabólitos tóxicos até então não discutidos em alimentação destinada a animais de companhia (como sujidades leves e formação de amins bioativas). No estudo de indicadores de condições higiênico-sanitárias de amostras de alimentos secos para cães e gatos, as contagens totais (cargas bacterianas e fúngicas) estavam dentro de valores considerados aceitáveis para consumo. No entanto, fungos micotoxigênicos foram isolados: gênero *Aspergillus* (*A. parasiticus*, *A. niger* e *A. ochraceus*) e *Penicillium* (*P. expansum*). A presença de agentes bacterianos em alimentos para cães e gatos (ricos em proteínas) pode favorecer a produção de amins bioativas (biogênicas e poliaminas), importantes indicadores das condições higiênico-sanitárias aplicadas durante as etapas de produção do alimento final, assim como podem ser tóxicas à saúde animal. A principal amina biogênica detectada foi a histamina

(96%), seguida pelas putrescina e cadaverina (92%). À partir do conhecimento do perfil qualitativo biológico dos alimentos secos, esses dados foram correlacionados com diferentes formas de exposição do produto nos pontos de venda (embalagens abertas e/ou lacradas) e riscos associados a segurança alimentar. Em avaliação realizada para verificar as condições de comercialização em embalagens abertas (à granel) de alimentos completos para cães e pássaros, essa forma de exposição proporcionou aumento nos teores de umidade e atividade de água, favorecendo o crescimento de fungos toxigênicos e micotoxinas. A presença de insetos, ácaros e pêlos de roedores no produto final também devem ser considerados como importantes veiculadores desses agentes biológicos (bactérias, fungos e micotoxinas). Na avaliação de alimentos para cães comercializados em embalagens lacradas, 87% das amostras continham algum tipo de sujidade biológica leve (fragmentos de insetos e ácaros). Com relação aos ensaios micológicos, foi observado contaminação em todas as amostras, com presença dos gêneros *Aspergillus* (80,6%) e *Penicillium* (54,8%), e contaminação por fumonisinas em 32,2% das amostras. A partir dos diversos dados, foi possível obter subsídios para futuras discussões e revisões sobre os padrões legais vigentes e limites de tolerância estabelecidos, garantindo a saúde dos animais consumidores. Lembrando que a dieta de animais de companhia é baseada em somente um tipo de alimento, o qual consumido diariamente, amplifica a exposição a possíveis contaminantes biológicos presente na dieta.

Palavras-chave: alimentos, rotulagem, qualidade, segurança, animais de companhia

de Souza Koerich, K. **Labeling, quality and biologic safety of pet food and impact on animal health**. 2013. Thesis (Doctorate in Food Science) – Program of Post Graduation in Food Science, Federal University of Santa Catarina, Florianopolis.

ABSTRACT

A considerable increase in the marketing of pet foods has been observed in recent decades. With a focus on ensuring these foods, this study obtained data on the qualitative and safety of products marketed in different continents, relating the influence of biological contaminants in foods with possible damage to animal health. The initial stages of development and obtaining data were based on the labeling information and certification of regulation compliance, beyond to check the accuracy of the nutritional information of the final packaged product. Regarding the adequacy of layouts dry dog food sold in Brazil, 100 % of the samples were not in accordance with the requirements established by regulation. Respect the check the accuracy of the guarantee levels declared in nutrition labeling of dogs and cats foods, 44 % did not correlate the levels present in food with nutritional levels established warranty and 36 % of the samples were in disagreement with minimum nutritional levels recommended for the maintenance and animal development. The food quality and safety indicators were also evaluated in order to investigate the presence of biological contaminants, including toxic metabolites not previously discussed on pet food (such as light filth and bioactive amines formation). In the study of indicators of hygienic-sanitary conditions of dogs and cats dry food samples, the total counts (bacterial and fungal loads) values were considered acceptable for animal consumption. However, mycotoxigenic fungi were isolated: *Aspergillus* (*A. parasiticus*, *A. niger* and *A. ochraceus*) and *Penicillium* (*P. expansum*). The presence of bacterial agents in dogs and cats food (in which are rich in proteins) may favor the bioactive amines formation (biogenic and polyamines), important indicators of the sanitary conditions applied during the final food production, as can be toxic to animal health. The main biogenic amine detected was histamine (96 %), followed by putrescine and cadaverine (92 %). From the knowledge of biological qualitative profile of dry foods, these data were correlated with different forms of product presentation at point of sale (opened packages and/or sealed) and risks associated with food safety. In evaluation performed to check the marketing conditions in opened packages (open bulk bags) of dogs and birds food, this form of exposure

increased the moisture content and water activity, favoring the toxigenic fungi growth and mycotoxins production. The presence of insects, mites and rodents hair in the final product must also be considered important biological agents carrier (bacteria, fungi and mycotoxins). In the evaluation of dog food sold in sealed packages, 87 % of samples contained some sort of biological light filth (as fragments of insects and mites). Respect to the mycological tests, contamination was observed in all samples, with the presence of genera *Aspergillus* (80.6 %) and *Penicillium* (54.8 %), and fumonisin contamination in 32.2 % of samples. From the various data, it was possible to obtain a basis for future discussions and reviews on current standards regulation and tolerance limits established, ensuring animal health consumers. Important to mention that the pet animals diet is based on monotype food, which consumed daily, amplifies the potential exposure to biological contaminants present in the diet.

Keywords: food, labeling, quality, safety, pets

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

- Figura 1** – Quadro clínico de dermatite atópica canina: (a) pododermatite e (b) infecção bacteriana secundária.....38
- Figura 2** – Fungos de armazenagem: (a) *Aspergillus* e (b) *Penicillium* isolados de alimentos para animais de companhia.....46
- Figura 3** – (a) Fígado pálido e amarelado de um cão - decorrência da retenção biliar e da transformação gordurosa na aflatoxicose crônica; (b) cirrose hepática em cão.....50
- Figura 4** – Alterações em (a) pulmão e (b) baço de suínos contaminados com fumonisinas.....52
- Figura 5** – Intoxicação por zearalenona: (a) vulvovaginite em leitoas e (b) *splay leg* em leitão.....53
- Figura 6** – Rim de suíno contaminado com ocratoxina A.....54
- Figura 7** – Estruturas químicas das aminas bioativas.....55
- Figura 8** – Condições de armazenamento e comercialização de alimentos para animais de companhia: (a) embalagens originais abertas e (b) recipientes tampados.....59

CAPÍTULO 7

- Figura 1.** Porcentagem de sujidades biológicas leves encontradas nas amostras de alimentos secos para cães comercializados no Brasil.....215
- Figura 2.** Tipos de sujidades biológicas leves encontradas nas amostras de alimentos secos para cães comercializados no Brasil: a) fragmentos de insetos da Classe Coleoptera e b) ácaro de armazenamento (63X).215

CAPÍTULO 8

- Figure 1.** Percentage of affected systems and neoplasias diagnosed in dogs and cats in the Great Florianopolis Region, Southern Brazil.....222
- Figure 2.** Percentage of grain-based ingredients (cereals and pulses) described in the labels to dogs and cats dry food commercialized in Brazil.....225

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1 – Atividade de água mínima para crescimento de bactérias, fungos e produção de toxinas.....	61
Tabela 2 – Limite de pH para crescimento de micro-organismos presentes em alimentos.....	62
Tabela 3 - Contaminações de alimentos para animais de companhia por bactérias patogênicas, fungos e micotoxinas reportadas na literatura....	66
Tabela 4 - Limites para contaminantes microbiológicos segundo normas microbiológicas do MAPA e manual ABINPET.....	72
Tabela 5 - Limites máximos de micotoxinas em alimentos para animais de companhia.....	73
Tabela 6 - Limites máximos permitidos de micotoxinas em alguns países de acordo com o produto utilizado na alimentação animal.....	74

CAPÍTULO 2

Table 1 - Labels rating of dogs and cats complete dry food packaging sold in Brazil and their description of non-compliances based on the current Regulation for pet food labeling.....	102
--	-----

CAPÍTULO 3

Table 1. Tolerances allowed for guaranteed levels in pet food by the Canadian and EU regulatio.....	111
Table 2. Guaranteed levels from laboratory data versus described on the pet food labels and their non-conformities.....	113
Table 3. Statistics variation of guaranteed levels obtained with laboratory data of dogs and cats dry foods versus minimum recommended levels established by international standards.....	117

CAPÍTULO 4

Table 1. Bacteria and fungi indicators and moisture data obtained from dogs and cats dry food and comparison withreference standards recommended.....	145
Table 2. Fungi genera and species isolated from dogs and cats dry food commercialized in different countries.....	147

CAPÍTULO 5

Table 1. Animal and vegetal proteins included in dogs and cats food with possibilities of biogenic amines formation.....	164
Table 2. Levels of bioactive amines contamination, their correlation to protein content and bacteria load in dogs and cats food samples from different countries and food characteristics (type, animal species and life stage).....	165

CAPÍTULO 6

Table 1. Dry foods for dogs and birds ingredient composition, packaging and samples characteristics data collected from their label / inner content and their relation to fungi and FBs / other toxins contamination.....	175
Table 2. Dry food for dogs and birds levels of fumonisins, moisture content and water activity in samples of different brands sold in Southern Brazil.....	180
Table 3. Coefficient of correlation between fumonisins, moisture content and water activity in dog and bird food commercialized in Santa Catarina State, Southern Brazil.....	183

CAPÍTULO 7

Tabela 1. Sujidades, fungos e fumonisinas em alimentos secos completos para cães comercializados no Brasil.....	213
--	-----

CAPÍTULO 8

Table 1 – Characteristics and food habits of dogs and cats obtained from veterinary clinics in the Great Florianopolis Region.....	224
Table 2 - The main pet food vegetable ingredients, their susceptibility to mycotoxin production and toxic effects in animals.....	226

LISTA DE QUADROS

CAPÍTULO 1

Quadro 1 - Classificações propostas para os alimentos para animais de companhia.....	28
Quadro 2 - Legislações brasileiras que regulamentam as informações e aspectos de rotulagem de alimentos para animais de companhia.....	32
Quadro 3 - Características das sujidades biológicas leves comumente encontradas nos alimentos para animais de companhia e humanos.....	37
Quadro 4 - Principais micotoxinas de potencial toxicológico, estruturas químicas, órgãos alvo, fungos produtores e presença no alimento animal.....	48
Quadro 5 – Aminas biogênicas comumente encontradas em alimentos e seus efeitos tóxicos e sinais clínicos causados pela sua ingestão.....	57

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	23
CAPÍTULO 1.....	25
1 REVISÃO BIBLIOGRAFICA.....	27
1.1 Alimentos para animais de companhia.....	27
1.1.1 Classificação dos alimentos.....	28
1.1.2 Composição, tipos de nutrientes e ingredientes.....	31
1.1.3 Rotulagem de alimentos e níveis de garantia nutricional.....	31
1.1.4 Qualidade e segurança dos ingredientes e produto final.....	33
1.2 Contaminantes biológicos e metabólitos em alimentos para animais de companhia e seus efeitos patológicos.....	34
1.2.1 Sujidades biológicas leves.....	35
1.2.2 Micro-organismos.....	38
1.2.3 Metabólitos dos contaminantes biológicos.....	46
1.3 Fatores interferentes no desenvolvimento de contaminantes biológicos e seus metabólitos em alimentos para animais de companhia.....	58
1.3.1 Fatores extrínsecos.....	58
1.3.2 Fatores intrínsecos.....	60
1.4 Contaminantes biológicos e metabólitos em alimentos para animais de companhia reportados na literatura.....	63
1.4.1. Sujidades biológicas leves.....	63
1.4.2 Bactérias, fungos e micotoxinas.....	64
1.4.3 Aminas bioativas.....	70
1.5 Legislações para contaminantes biológicos e metabólitos em alimentos para animais de companhia.....	70
1.5.1 Sujidades biológicas leves.....	71
1.5.2 Contaminantes microbiológicos.....	71
1.5.3 Micotoxinas.....	73
1.5.4 Aminas bioativas.....	77
REFERÊNCIAS.....	78
CAPÍTULO 2.....	93
LABELS LAYOUT OF CATS AND DOGS FOOD SOLD IN BRAZIL AND THEIR NATIONAL REGULATION ADEQUACY.....	93
Abstract.....	95
Resumo.....	95

Introduction.....	96
Material and Methods.....	97
Results and Discussion.....	98
Conclusion.....	100
References.....	100
CAPÍTULO 3.....	105
LABELS NUTRITIONAL OF DOGS AND CATS DRY FOOD VERSUS LABORATORY DATA AND REGULATION.....	105
Abstract.....	107
1 Introduction.....	107
2 Materials and Methods.....	109
2.1 <i>Materials</i>	109
2.2 <i>Methods</i>	110
3 Results and Discussion.....	110
4 Conclusion.....	119
5 References.....	119
CAPÍTULO 4.....	123
BACTERIA AND FUNGI QUALITY AND SAFETY INDICATORS OF PET FOOD COMMERCIALIZED IN DIFFERENT COUNTRIES.....	123
Abstract.....	125
1 Introduction.....	125
2 Materials and methods.....	127
2.1 <i>Materials</i>	127
2.2 <i>Methods</i>	128
3 Results and Discussion.....	130
3.1 <i>Bacteria - hygiene and safety indicators</i>	130
3.2 <i>Fungi - hygiene and safety indicators</i>	133
3.3 <i>Moisture conditions and risks to food quality and safety alterations</i>	137
4 Conclusion.....	138
5 References.....	139
CAPÍTULO 5.....	149
BIOACTIVE AMINES PROFILE AND THEIR CORRELATION TO PROTEIN CONTENT AND BACTERIA LOAD IN DOGS AND CATS FOOD.....	149
Abstract.....	151
1 Introduction.....	152

2 Materials and methods.....	154
2.1 <i>Materials</i>	154
2.2 <i>Methods</i>	155
3 Results and discussion.....	156
3.1 <i>BAs profile and levels</i>	156
3.2 <i>PAs profile and levels</i>	159
4 Conclusion.....	160
References.....	161

CAPÍTULO 6.....167

DOGS AND BIRDS DRY FOOD FUMONISIN FB1 AND FB2 CONTAMINATION AND THEIR RELATION TO INGREDIENTS AND PACKAGING CHARACTERISTICS.....167

Abstract.....	169
1 Introduction.....	169
2 Materials and methods.....	172
2.1 <i>Materials</i>	172
2.2 <i>Methods</i>	172
3 Results and discussion.....	174
4 Conclusion.....	184
5 References.....	184

CAPÍTULO 7.....191

BIOLOGICAL CONTAMINANTS IN DRY DOG FOODS AND THEIR RELATION TO SANITARY-HYGIENIC PROCESS.....191

Resumo.....	193
Abstract.....	194
Introdução.....	194
Material e Métodos.....	197
<i>Material</i>	197
<i>Métodos</i>	198
Resultados e discussão.....	200
Conclusão.....	207
Referências.....	208

CAPÍTULO 8.....217

OCCURRENCE OF DOGS AND CATS DISEASES RECORDS IN THE VETERINARY CLINICS ROUTINE IN SOUTHERN BRAZIL AND ITS RELATIONSHIP TO MYCOTOXINS.....217

Abstract.....	219
1 Introduction.....	219

2	Materials and methods.....	221
2.1	<i>Dogs and cats diseases and clinical signs.....</i>	221
2.2	<i>Evaluation of ingredients reported in pet food.....</i>	221
3	Results and discussion.....	221
3.1	<i>Dogs and cats diseases and clinical signs.....</i>	221
3.2	<i>Characteristics of the animal breeding and eating habits.....</i>	223
3.3	<i>Ingredients used in commercial dog and cat foods.....</i>	225
3.4	<i>Diseases and clinical signs versus mycotoxins.....</i>	226
4	Conclusion.....	228
5	References.....	228
	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	231

1 INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas tem sido observado um aumento considerável na comercialização de alimentos para animais de companhia impulsionada pela (a) elevada população desses animais e a conscientização dos benefícios que eles trazem ao homem; (b) necessidade de agregar valor à produção mundial de grãos; (c) apelo comercial e atrativo das empresas produtoras internacionais e a (d) sofisticação dos padrões de consumo dos proprietários, com a maior procura de alimentos saudáveis, equilibrados e práticos para seus animais.

Muitos dos ingredientes adicionados na formulação de alimentos destinados a animais de companhia também são utilizados para a alimentação humana, com destaque estão os produtos de origem vegetal. Com a grande safra de grãos no Brasil, Estados Unidos e China, liderados principalmente por *comodities* como o milho, soja e arroz (detendo 91,3% de toda a produção de cereais, leguminosas e oleaginosas), há um aumento direto na produção de alimentos para animais, tanto de produção quanto de companhia.

O Brasil atualmente, segundo informações da Associação Brasileira da Indústria de Produtos para Animais de Estimação (ABINPET), corresponde a 8% do faturamento mundial do mercado de produtos para animais de companhia, competindo com o Japão e atrás apenas dos Estados Unidos. O segmento de alimentos para animais de companhia detém a liderança do faturamento, com 69% de participação. Esse volume cresce entre 3 e 7% ao ano (ABINPET, 2013). No entanto, a preocupação com a manutenção da qualidade desses alimentos tem aumentado, principalmente por parte dos proprietários, já que o mercado está em franco aquecimento econômico. Com a instalação de diversas indústrias do ramo, tanto nacionais quanto internacionais, surge então a questão: como estão sendo controladas a qualidade e a segurança desses produtos?

Em se tratando da qualidade de ingredientes, o mercado de alimentos para animais de companhia necessita de maior atenção, já que não existe regulamentação específica tanto para as embalagens e para todos os outros segmentos da produção, como destaque na fidelidade da manutenção da composição e à segurança alimentar. A qualidade e segurança biológica de alimentos para animais de companhia envolvem o controle de vários segmentos da cadeia produtiva, desde as técnicas aplicadas na agricultura para desenvolvimento de plantas saudáveis até a produção industrial, o transporte do produto final, incluindo seu

armazenamento nas agropecuárias/*pet shops*, e o tratamento a nível doméstico.

É importante ressaltar a importância dessas duas últimas etapas da cadeia produtiva, já que o produto final pode ter sido produzido sob controle total de qualidade, porém perdendo essas características por falta de conhecimento dos distribuidores. Além disso, com a diversidade de composição desses produtos, contendo ingredientes de origem animal e vegetal, a probabilidade de contaminação é maior. Nem sempre o processamento do alimento garante a eliminação de agentes contaminantes veiculados pelos ingredientes, assim como durante a manipulação do alimento animal. Existem poucos estudos sobre a qualidade e segurança biológica desses alimentos comercializados, os riscos de contaminação e danos à saúde aos animais de companhia. Quando esses estudos existem, ficam restritos aos próprios fabricantes que, por sua vez, não apresentam interesse na divulgação.

Com foco na garantia desses alimentos oferecidos diariamente a cães, gatos e pássaros, o presente trabalho visou obter dados importantes sobre a qualidade e segurança biológica desses alimentos, relacionando a influência dos diferentes contaminantes presentes nos alimentos, sempre focando na saúde animal. As etapas de desenvolvimento e obtenção de dados iniciaram com a correlação das informações descritas na rotulagem e a legislação internacional vigente bem como a veracidade e fidelidade das informações nutricionais do produto final. Também foi avaliada a segurança relacionada a contaminantes biológicos (bactérias, fungos, insetos, ácaros e roedores) e seus metabólitos, até então não discutidos em alimentação animal (como as aminas bioativas e toxinas), sempre relacionando com forma de exposição do produto (embalagens abertas e/ou lacradas). A partir destes dados, foram obtidos subsídios para futuras discussões, revisões e atualizações dos padrões legais e limites de tolerância permitidos para aprimorar a saúde dos animais consumidores através de uma boa e segura alimentação.

CAPÍTULO 1
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 Alimentos para animais de companhia

O comércio de alimentos para animais de companhia tem se tornado um mercado extenso e promissor no agronegócio. Isto é resultado do aumento do número de animais de companhia no Brasil. Em 2013, estima-se que a população desses animais é de 101,1 milhões, sendo 37 e 21 milhões de cães e gatos no país, respectivamente, o que significa que 1 em cada 4 brasileiros possui um animal de companhia (ABINPET, 2013). Nesse mesmo ritmo de crescimento, veio também a evolução na medicina veterinária, dando condições para aumento da expectativa de vida dos animais de companhia (DE NARDI et al., 2002). Este aumento é atribuído às melhorias na profilaxia, diagnóstico e tratamento de doenças, imunização, nutrição e no estreitamento das relações proprietário-animal, oferecendo os melhores cuidados aos seus animais. Os fabricantes de alimento animal também têm dedicado recursos consideráveis para garantir a qualidade e segurança do produto final, além das exigências previstas em legislações vigentes na regulamentação do setor (ABINPET, 2013).

A qualidade higiênico-sanitária do alimento animal é uma medida de controle da veiculação de patógenos e outros contaminantes que possam estar presentes. Muitos desses contaminantes são responsáveis pelo aparecimento de patologias em animais de companhia, a curto e/ou longo prazo, já que são veiculados pelos alimentos fornecidos aos animais. Essa situação é agravada pela falta de variação na alimentação animal, normalmente baseada em alimentos industriais que são fornecidos diariamente, que expõe o animal ao contaminante presente de forma contínua e intermitente (DE SOUZA KOERICH; SCUSSEL, 2013).

As patologias mais frequentes observadas em animais de companhia na rotina clínica veterinária estão relacionadas com sistema hepático, renal, nervoso, reprodutor e neoplasias (BRUNELLI et al., 1998; DE SOUZA KOERICH; SCUSSEL., 2012). Nos últimos anos, a prevalência das neoplasias e o diagnóstico desta doença nos animais de companhia vêm apresentando um notório aumento (WITHROW, 2007), relacionados principalmente com a maior longevidade destes animais e a consolidação da oncologia veterinária (MARTINS et al., 2000).

Vários fatores são responsáveis pelo aparecimento destas patologias e o aumento na incidência de neoplasias, como predisposição genética, fatores físicos (radiação), químicos (intoxicação por

metais pesados, pesticidas, medicamentos), ambientais (forma de criação, estresse, poluição) e alimentares, como presença de micro-organismos (bactérias, fungos) e seus metabólitos (aminas bioativas, toxinas bacterianas e micotoxinas) (DE NARDI et al., 2002; WITHROW, 2007).

Os alimentos comerciais para animais de companhia são encontrados em diversas formas para agradar seus proprietários, no entanto, devem seguir padrões de qualidade, como de palatabilidade, digestibilidade e consistência de fezes, e segurança, sempre priorizando a saúde do animal (CARCIOFI, 2008), além das legislações vigentes para o setor.

1.1.1 Classificação dos alimentos

Existem classificações propostas no sentido de agrupar os alimentos para animais de companhia e facilitar o entendimento dos proprietários e profissionais da área por critérios que envolvam (a) teor de umidade, (b) critérios de registro e (c) qualidade (Quadro 1).

Quadro 1 - Classificações propostas para os alimentos para animais de companhia

Critério para classificação	Órgão classificador	Classificação
Teor de umidade	NRC ¹ , 2006	Seco (6-10%) Seco expandido (11-12%) Semi-úmido (15-30%) Úmido (enlatado) (75%)
Indicação de registro e rotulagem	MAPA ² , 2009	Completo Específico Coadjuvante
Qualidade e preço	ABINPET ³ , 2008	Econômico <i>Premium</i> <i>Superpremium</i>

¹ *National Research Council*; ² Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento;

³ Associação Brasileira da Indústria de Produtos para Animais de Estimação.

Há três formas básicas de alimentos comerciais para animais de companhia baseadas no teor de umidade: seco, semi-úmido e úmido (enlatados ou sachês). Alimentos secos contêm geralmente menos de 11 %

de umidade, alimentos semi-úmido com 15 à 30 % e úmido, com aproximadamente 60-87 % de água (NRC, 2006).

Alimento seco: principal produto da indústria de alimentos para animais de companhia, devido sua conveniência no acondicionamento e fornecimento ao animal. Geralmente são formados por extrusão, que utiliza temperatura e pressão em seu processamento para formação do produto final. Os alimentos secos normalmente são mais protegidos contra a deterioração devido à baixa teor de água (umidade final de 6 a 12 %). Também são adicionados antioxidantes para prevenir dano oxidativo, podendo ser tanto de fontes naturais, como a vitamina E, ou sintéticos, como butilhidroxianisol (BHA) e butilhidroxitolueno (BHT) (CRANE et al., 2000).

Alimento seco expandido: contém umidade final entre 11 a 12 % e são formulados com grãos de cereais e derivados, subprodutos animais e derivados, gordura e óleos, vitaminas e minerais (CARCIOFI, 2008).

Alimento semi-úmido: parcela menor, mas significativa, da indústria de alimentos para animais de companhia. Requerem o uso de umectantes e acidificantes para controlar o conteúdo de água e inibir o crescimento de fungos. Apresentam um baixo conteúdo de fibras mas teor de açúcar relativamente alto, o que torna o alimento altamente palatável. O teor de umidade final varia de 15 a 30 %, sendo mais propenso a contaminação fúngica e deterioração, que é atenuado pela adição de inibidores bacterianos e fúngicos (ZICKER, 2008).

Alimento úmido: apresenta um grande teor de umidade, geralmente com umidade aproximada de 75 % e exige a presença de agentes geleificantes, como o amido ou gomas, para alcançar sua consistência final. São produtos esterilizados, semelhante aos produtos enlatados para consumo humano. Os ingredientes são triturados, misturados e seguidamente cozidos em latas lacradas e esterilizadas com temperaturas de 121°C por três minutos para eliminar as bactérias patogênicas, como *Clostridium botulinum* (ZICKER, 2008).

Além da umidade, outras variações diferenciam os produtos. Segundo o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA (BRASIL, 2009b), órgão responsável pela regulamentação do setor, os alimentos para animais de companhia podem ser classificados em três categorias: completo, coadjuvante e específico.

Alimento completo: composto por ingredientes ou matérias-primas e aditivos destinado exclusivamente à alimentação de animais de companhia, capaz de atender integralmente suas exigências nutricionais, podendo possuir propriedades específicas ou funcionais.

Alimento específico: finalidade de agrado, prêmio ou recompensa e que não se caracteriza como alimento completo, podendo possuir propriedades específicas.

Alimento coadjuvante: destinado exclusivamente à alimentação de animais de companhia com distúrbios fisiológicos ou metabólicos, cuja formulação é incondicionalmente privada de qualquer agente farmacológico ativo.

Os alimentos industrializados para animais de companhia são classificados de acordo com a qualidade e tipo de matéria-prima, concentração de nutrientes, absorção e quantidade de resíduos, características do rótulo e preço, sendo normalmente aceito pelos consumidores como um critério qualitativo na decisão da compra do produto (ABINPET, 2008; CARCIOFI, 2008; CASE et al., 2011).

Alimento econômico: apresentam formulação variável e utilizam ingredientes de baixo custo, em geral de baixa digestibilidade e palatabilidade. As concentrações nutricionais aproximam dos limites mínimos permitidos, visando minimizar os custos. As fontes protéicas são de origem animal e vegetal, sendo empregados farelos vegetais como fontes de carboidrato. Os teores de extrato etéreo são reduzidos e os teores de fibra bruta e matéria mineral são elevados. Utilizam matérias-primas de qualidade inferior, como subprodutos animais (ossos, vísceras, pés, cabeça, penas, entre outros) que diminui a qualidade da proteína, uma vez que muitos destes não são digeridos pelos animais.

Alimento Premium: tem foco na digestibilidade e palatabilidade dos produtos. As formulações são fixas, sem eventuais substitutos. O produto visa atender as necessidades nutricionais e controlar excessos e desbalanços com maior digestibilidade e energia metabolizável.

Alimento Superpremium: produtos de alta qualidade, com formulação fixa e ingredientes de elevado valor nutricional. Seu processamento é otimizado com moagem mais fina. As concentrações nutricionais empregadas visam a saúde, com estrito controle de desbalanços e interações (ABINPET, 2008). São utilizadas matérias-primas de qualidade superior, com ótimo aproveitamento pelo animal (CASE et al., 2011). São utilizadas proteínas de origem animal, tais como bovina, suína, de frango ou de peixe, e no caso dos vegetais são empregados os de melhor absorção pelos animais, como o arroz.

1.1.2 Composição e ingredientes

Os alimentos comerciais para animais de companhia são formulados para atender às necessidades específicas de nutrientes para suprir os diferentes estados fisiológicos desses animais. Composições diversificadas são encontradas, mas basicamente são utilizadas: proteínas de origem animal e vegetal, além de gorduras, carboidratos, fibras, vitaminas e minerais. Devido à elevada necessidade de proteína, ingredientes protéicos são importantes nas formulações (CARCIOFI, 2008). As fontes protéicas de origem animal mais utilizadas são: carne e subprodutos da indústria (frango, bovino, ovino, suíno, peixes, farinha de carne e osso) e fontes de origem vegetal: grãos, cereais, farelos (gérmen de milho, soja) e farinhas (trigo, arroz) (BRITO et al., 2010). A farinha de vísceras de frango, dentre as proteínas de origem animal secas, tem demonstrado melhor digestibilidade e energia metabolizável. Convém enfatizar que grande parte dos alimentos para animais de companhia é formulada à base de cereais, constituindo a matéria primaprincipal desses alimentos completos, já que o amido é a mais abundante fonte de energia para a maioria dos animais de companhia. O arroz e milho têm sido considerados as melhores fontes de amido (CARCIOFI, 2008).

Como fontes de gordura podem ser citadas os de origem animal (óleo de aves, óleo de peixes, gordura bovina e suína), na qual são mais palatáveis, e os de origem vegetal (óleo de linhaça, palma, girassol, soja e lecitina de soja). Eles fornecem energia, ácidos graxos essenciais e *flavor*, este último diretamente relacionado ao aroma e paladar do alimento (FRANÇA et al., 2011).

1.1.3 Rotulagem de alimentos e níveis de garantia nutricional

A rotulagem nutricional de alimentos para animais de companhia é um direito do consumidor. O rótulo deve ter informações sobre a composição nutricional, considerando o tamanho da porção diária fornecida e a composição dos alimentos quanto aos nutrientes, visando à orientação e a manutenção da saúde animal. A declaração da composição nutricional dos produtos embalados deve atender aos requisitos estabelecidos para sua comercialização de acordo com os órgãos reguladores (MAPA, 2009).

No Brasil, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) é responsável pela regulamentação da inspeção e fiscalização dos produtos destinados à alimentação animal, além de

padronizar as informações de rotulagem e obrigações das empresas fabricantes de alimentos destinados aos animais de companhia (BRASIL, 2003; 2007; 2009). Considerando a diversidade de tipos, composição e informações atrativas presentes nas embalagens de alimentos completos existentes no mercado, é importante monitorar a veracidade das informações contidas na rotulagem de alimentos completos para animais de companhia, verificando se estão de acordo com a legislação brasileira. O Quadro 2 estabelece as legislações quanto a regulamentação do setor de alimentos para animais de companhia.

Quadro 2 - Legislações brasileiras que regulamentam as informações e aspectos de rotulagem de alimentos para animais de companhia e humanos

Tipo	Legislação		Área de aplicação	Atendimento
	n°	Data		
Instrução Normativa	15	26/05/2009	Alimentação animal	Procedimentos para registro de estabelecimentos e dos produtos destinados à alimentação animal
Instrução Normativa	30	05/08/2009	Animais de companhia	Critérios e procedimentos para o registro de produtos, para a rotulagem e a propaganda e isenção de registro de produtos destinados à alimentação de animais de companhia
Decreto	4.680	24/04/2003	Alimentação humana e animal	Informação quanto aos alimentos e ingredientes alimentares destinados ao consumo humano ou animal que

				contenham, ou seja, produzidos a partir de organismos geneticamente modificados
Portaria	2.658	22/12/2003	Alimentação humana e animal	Regulamenta o emprego do símbolo transgênico

MAPA (2003, 2009)

As legislações acima descritas (Quadro 2) determinam os critérios a serem adotados para a informação da rotulagem e níveis de garantia nutricional de alimentos para animais de companhia, regulamentando itens importantes como: impressão, localização e disposição das informações obrigatórias, classificação do produto, descrição da composição básica, símbolos de inspeção federal e transgênicos, níveis de garantia, indicações de uso, cuidados e restrições, apelos comerciais, dizeres equivocados e outros aspectos previstos na legislação acima citada (BRASIL, 2003; 2009).

A declaração estipulada na embalagem deve condizer com a real formulação do produto final embalado pelo fabricante. Antes da inclusão dos ingredientes na formulação de alimentos para animais de companhia, é importante considerar a avaliação dos seguintes fatores: níveis de nutrientes; funcionalidade; palatabilidade e digestibilidade. A formulação final deve apresentar nutrição adequada para cada fase de crescimento do animal, ser palatável e de fácil digestão.

1.1.4 Qualidade e segurança dos ingredientes e produto final

A qualidade das matérias-primas utilizadas para a fabricação de alimentos destinados a animais de companhia é tão importante quanto à eficiência de ingredientes e/ou nutrientes relacionados à saúde animal. Isso nos leva a considerar os principais contaminantes de ingredientes utilizados na formulação de alimentos finais: contaminantes biológicos (insetos, ácaros, bactérias, fungos), seus metabólitos (aminas bioativas, toxinas bacterianas e fúngicas) e contaminantes sintéticos (pesticidas, aditivos, metais pesados) (DE SOUZA KOERICH et al, 2010). Convém ressaltar que os animais que consomem alimento industrializado têm contato diário e contínuo, sem variação da alimentação, podendo

comprometer a saúde à longo prazo. É importante esclarecer que nem sempre o processamento do alimento industrializado garante a eliminação de agentes contaminantes, como as toxinas produzidas e veiculadas durante a manipulação do alimento animal. Muitas vezes a contaminação é causada pela manipulação inadequada do alimento ou pela utilização de matéria prima de baixa qualidade (DE SOUZA KOERICH; SCUSSEL, 2013).

Os alimentos secos passam por processo de extrusão. A extrusora utiliza uma combinação de vapor, pressão, atrito mecânico e temperatura para cozinhar os alimentos rapidamente, submetendo os ingredientes à uma temperatura entre 100-200°C e 34-37 atm (atmosfera) de pressão, que é alto o suficiente para alcançar efetivamente um processo de esterilização de alimentos que atenda os padrões da indústria, no entanto, caso a matéria prima utilizada já esteja contaminada com toxinas, como as micotoxinas, não há destruição delas em temperaturas abaixo de 260°C (SCUSSEL, 2002). O correto armazenamento do produto acabado também é importante, pois a contaminação pode ocorrer após o processo de extrusão.

O mesmo ocorre com os alimentos úmidos, que passam por um processo de esterilização, com temperaturas que chegam a 121°C. As toxinas bacterianas e fúngicas (micotoxinas) presentes não são destruídas por essas temperaturas. O mesmo se aplica na questão da presença de bactérias esporuladas, cujos esporos são termo-resistentes ao tratamento térmico, onde somente as formas vegetativas de micro-organismos são eliminadas (ANDRADE; NASCIMENTO, 2005).

A utilização de ferramentas como Boas Práticas de Produção (BPF) e Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC) na produção de alimentos para animais de companhia desde o processamento, transporte, armazenamento e distribuição, garantem produtos finais com qualidade e segurança alimentar, garantindo também, a saúde humana nos casos de zoonoses (GMP, 2005; SIMAO; SCUSSEL, 2008).

1.2 Contaminantes biológicos e metabólitos em alimentos para animais de companhia e seus efeitos patológicos

A pesquisa de contaminantes biológicos presentes nos alimentos para animais de companhia é de fundamental importância para manutenção da qualidade física, sanitária e nutricional do produto final. A presença desses contaminantes nos alimentos é um indicativo de descuido no controle higiênico-sanitário durante as fases que envolvem

desde a obtenção e seleção da matéria prima, industrialização (manipulação, processamento e embalagem) até armazenamento, transporte e comércio do produto acabado (BOESE; CHICOWICZ, 1995).

Dentre os contaminantes biológicos comumente encontrados em alimentos, podem ser citados os insetos, ácaros, pêlos de roedores (considerados sujidades biológicas leves) – importantes veiculadores de micro-organismos e seus metabólitos (toxinas) (SCUSSEL, 2002; VIEIRA, 2010). São exemplos de sujidades biológicas leves os ácaros (artrópodes do filo Arachnida), larvas, insetos (seus ovos e fragmentos), além de pêlos de roedores (LORINI, 2002; BRASIL, 2003). São responsáveis pela perda de qualidade sensorial (deterioração da matéria prima) e consideradas importantes veiculadoras de contaminantes microbiológicos (vírus, bactérias e fungos patogênicos e/ou toxigênicos) (BRASIL, 2003). Os riscos de contaminação biológica e consequentemente produção de toxinas em alimentos para animais podem causar quadros graves de toxinfecção. Por outro lado, podem ser utilizados como parâmetros para análise da qualidade higiênico-sanitária durante o processamento do alimento industrializado (GLORIA, 2005).

1.2.1 Sujidades biológicas leves

A presença de sujidades leves nos alimentos para animais de companhia é considerada um indicativo de descuido com o controle higiênico-sanitário durante a colheita e armazenamento da matéria prima, bem como no processamento, incluindo, a eficiência no acondicionamento do produto final e sua comercialização. As condições de armazenamento, tanto da matéria prima quanto do produto final, favorecem diretamente no aparecimento das sujidades leves, estando relacionadas com o grau de limpeza dos depósitos, umidade relativa e temperatura ideal para seu desenvolvimento (LORINI, 1998; 2002).

As sujidades leves mais comumente encontrada em alimentos são insetos e seus fragmentos (VARGAS; ALMEIDA, 1996). Os insetos são importantes agentes responsáveis pela deterioração dos grãos e alimentos, pois estão implicados nas perdas de matéria seca, devido à utilização das reservas de amido (fonte de carboidratos), proteínas e óleo (fonte de lipídios) (VARGAS; ALMEIDA, 1996; LORINI, 1998). É considerável também o potencial desses insetos na veiculação de micro-organismos (BRASIL, 2003), tanto deteriorantes quanto patogênicos (SINGHI; SETHI; SHARMA, 1980), além de propiciar a proliferação e aparecimento de fungos e produção de micotoxinas, que permanecem




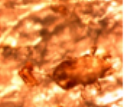
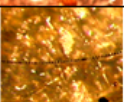
nos alimentos finais (VARGAS; ALMEIDA, 1996; LORINI, 1998, 2002).

Os ácaros detectados em alimentos são considerados ácaros de armazenamento. Os alimentos secos destinados a animais de companhia possuem características que os tornam muito propícios ao desenvolvimento desses ácaros, principalmente por apresentar alto teor de cereais, composição rica em gorduras e proteínas (substratos importantes para seu crescimento). Além disso, por conter um teor de umidade intermediário, favorece o crescimento de fungos - fonte de alimento para os ácaros de armazenamento (BRAZIS, 2011). Os principais ácaros que constituem esse grupo são os *Tyrophagusputrescentiae*, *Acarus siro* e *Lepidoglyphus destructor* (FLECHTMANN; ZEM, 2002; BRAZIS, 2011).

A presença de pêlos de roedores nos alimentos é um indicativo do contato desse animal em alguma etapa de obtenção e/ou produção do alimento. Os roedores constituem sério problema em todas as fases de processamento, produção e armazenamento de gêneros alimentícios. Além da perda de alimento devido ao consumo por estes animais, normalmente ocorre a contaminação pela presença de seus pêlos, fezes e/ou urina. Os roedores podem ser transmissores de doenças bacterianas, virais e fúngicas (FERREIRA, 2011).

O Quadro 3 indica as características das sujidades biológicas leves comumente encontradas nos alimentos para animais de companhia.

Quadro 3 - Características das sujidades biológicas leves comumente encontradas nos alimentos para animais de companhia

Contaminante biológico		Possível origem de contaminação						Veiculador mecânico	Possíveis danos	
Tipo	Imagem ^a	Cultivo (Matéria prima)			Produção	Embalamento	Armazenamento e comercialização		Ao alimento	Ao animal
		Campo	Colheita	Armazenagem						
Insetos (fragmento)		A	A	A	A	NA	NA	Bactérias Fungos Vírus	Redução do valor nutricional; Redução das características sensoriais	Doenças por proliferação de microorganismos; contato com fungo micose/alergias
Insetos (inteiro)		NA	NA	NA	NA	NA	NA	Bactérias Fungos Vírus	Redução do valor nutricional; Redução das características sensoriais	Doenças por proliferação de microorganismos; contato com fungo micose/alergias
Larvas (inteira)		NA	NA	NA	NA	NA	NA	Bactérias Fungos Vírus	Perda de matéria seca; Redução das características sensoriais; Deterioração do produto	Alergias
Acaros		NA	NA	A	NA	A	A	Bactérias Fungos Vírus	Perda de matéria seca; Redução das características sensoriais; Deterioração do produto	Alergias (dermatite atópica canina)
Pêlos de roedor		NA	A	A	A	A	A	Bactérias Fungos Vírus	Contaminação biológica do alimento; Descarte do produto	Leptospirose Hantavirose

^a60x; A: aplicado; NA: não aplicado

Fonte: autor (2013)

A análise de matérias microscópicas presentes nos alimentos e o conhecimento da presença de sujidades biológicas leves (insetos, ácaros e pêlos de roedores) devem ser baseadas em aspectos relacionados ao risco à saúde (BRASIL, 2003). Com relação a patologias desenvolvidas pela presença dessas sujidades, é importante ressaltar os casos frequentes de alergia atópica em animais de companhia, normalmente causadas pelo contato, ingestão ou inalação de ácaros. Esse agente é considerado a causa mais freqüente do quadro de dermatite atópica canina, causando sinais patogênicos não sazonais como prurido, pododermatite, eritema e otites de repetição em cães e gatos (BRAZIS, 2011) (Figura 1).

Figura 1 – Quadro clínico de dermatite atópica canina: (a) pododermatite e (b) infecção bacteriana secundária.



Fonte: BRAZIS (2011)

O controle desses ácaros geralmente é dificultado pelo fato de eles passarem despercebidos, devido ao seu tamanho reduzido. Porém quando detectados podem ser controlados através da alteração das condições ambientais nas estruturas de armazenamento (LORINI, 1998; FLECHTMANN; ZEM, 2002; BRAZIS, 2011).

1.2.2 Micro-organismos

Os alimentos para animais de companhia servem como substratos para uma ampla variedade de micro-organismos (bactérias, fungos e vírus). As contaminações por bactérias e fungos podem ser originárias pela adição de matérias primas e subprodutos de origem animal (carne, ossos e vísceras) e vegetal (grãos de cereais) de má qualidade utilizada na produção de alimentos para animais de companhia. Também podem ser provenientes de condições inadequadas de armazenamento (alta temperatura e umidade), bem como pela falta de

higiene aplicada durante a manipulação e embalagem do produto final (Andrade e Nascimento, 2005).

A contaminação microbiológica pode ser um indicador de condições sanitárias inadequadas durante o processamento, o armazenamento ou de produção (Franco, 2005). A segurança e qualidade higiênico-sanitária do alimento animal são medidas importantes no controle da veiculação de patógenos, já que o alimento se constitui parte integrante da cadeia alimentar, desde a produção animal até o consumidor (CARCIOFI, 2008). Dentre os micro-organismos, as bactérias, pela sua diversidade e patogenia, constituem o grupo microbiano mais associado às doenças transmitidas pelos alimentos (SCUSSEL et al., 2011).

(a) Bactérias

A presença de bactérias nos alimentos, além de favorecer a deterioração e/ou redução da vida útil desses produtos (consideradas bactérias indicadoras da qualidade higiênico-sanitária), também podem acarretar riscos à saúde do consumidor (consideradas bactérias indicadoras de segurança alimentar). Como bactérias deteriorantes podem ser citadas as bactérias mesófilas e coliformes, considerados bons indicadores de qualidade dos alimentos, enquanto que presença de *Escherichia coli* (enteropatogênica e enterotoxigênica), *Salmonella* spp. e *Clostridium sulfito-redutor* são boas indicadoras de segurança alimentar.

(a.1) Bactérias indicadoras de qualidade higiênico-sanitária

A qualidade higiênico-sanitária dos alimentos é avaliada pela determinação de organismos indicadores, com destaque para o grupo de coliformes totais e contagem total de micro-organismos mesófilos (SANTOS et al., 2000). São agentes que, quando ingeridos não oferecem riscos diretos ou indiretos à saúde animal. Além da contagem de organismos indicadores de qualidade, a exposição do alimento ao ambiente também pode comprometer a sua qualidade sanitária (HINTON; MEAD, 1992). Para Bennet e Lancette (2001), a presença desses indicadores e/ou enterotoxinas em alimentos processados normalmente é um indicativo da insuficiente sanitização dos equipamentos e/ou manipulação incorreta da matéria prima, ingredientes e produto final. A presença de coliformes totais e bactérias mesófilas nos alimentos e nos ingredientes estão associadas à falta de higiene geral na manipulação, tratamento térmico insuficiente e/ou falha no

armazenamento do produto final.

Coliformes totais

Esse grupo compreende as bactérias da família *Enterobacteriaceae*. Nos alimentos tratados termicamente durante a produção, a presença de elevados níveis de coliformes indica tratamento inadequado e/ou contaminação posterior ao tratamento (JAY, 2005).

Bactérias mesófilas

As bactérias mesófilas têm uma temperatura ótima de crescimento entre 20 e 45°C. Essa contagem detecta o número de bactérias aeróbias e/ou facultativas presentes, tanto na forma vegetativa, quanto esporulada. Elevadas contagens de bactérias mesófilas em alimentos, indicam inadequados processos de limpeza, desinfecção e controle de temperatura durante os processos de tratamento industrial, transporte e armazenamento (JAY, 2005). A presença dessas bactérias em alimentos industrializados em contagens aceitáveis em unidades formadoras de colônias ($< 10^6$ UFC/g) não representa risco para a saúde animal (SANTOS, 2000).

(a.2) Bactérias indicadoras de segurança alimentar

Normalmente são bactérias que, quando consumidas com o alimento contaminado, causam danos a saúde humana e animal. Como indicadores de segurança são frequentemente usados a *Salmonella spp.*, *E. coli* e *Clostridium spp.*

Salmonella spp.

A *Salmonella* é uma bactéria entérica, frequentemente associada a enfermidades transmitidas por alimentos. Tem importância zoonótica, podendo infectar tanto humanos quanto animais (RABSCH et al., 2001). Diferentes sorotipos do micro-organismo têm sido identificados em animais com salmonelose, como a *Salmonella* Enteritidis em cães, no entanto, tem se observado o predomínio do sorovar Typhimurium nessas infecções (RIBEIRO et al., 2010).

A infecção dos animais ocorre predominantemente pelo consumo de alimentos e água contaminados, sendo que as formas mais comuns de transmissão são através de carnes e seus subprodutos contaminados (HUMPHREY, 2004). Como os alimentos para cães e gatos têm em sua constituição insumos de origem animal, como as farinhas de carne, ossos, peixe, penas, vísceras, quando não tratadas corretamente, podem ser uma fonte importante na introdução das

salmonelas. É importante enfatizar que a contaminação por *Salmonella* acontece também em ingredientes vegetais.

Em cães, os casos de salmonelose normalmente desenvolvem infecções assintomáticas, onde o número de animais infectados é muito mais elevado que a incidência da doença clínica. O risco do animal portador assintomático é a possível contaminação dos proprietários, já que muitas vezes vivem em contato próximo com seus animais (SCHUTZE et al., 1999). Surtos de salmonelose em cães com sinais de diarreia têm sido relatados em infecções com *S. Typhimurium* e *S. Travis*. Infecções por *Salmonella* com apresentação de sinais clínicos são mais frequentes em filhotes de cães e gatos. Em estudo realizado por Ribeiro et al. (2010) para determinação de sorotipos de *Salmonella* isolados de diferentes afecções em animais domésticos, verificaram predominância da infecção em cães entre um a quatro meses de idade ($29/32=90,6\%$), onde houve predominância de sinais clínicos de enterite. Essa susceptibilidade dos animais jovens à salmonelose provavelmente está relacionada com: (a) imaturidade do sistema imune nesta faixa etária; (b) ao declínio da imunidade passiva adquirida pelo colostro; (c) bem como a co-infecção com outros enteropatógenos (RADOSTITS et al., 2007), que podem maximizar os efeitos entéricos do gênero *Salmonella* em animais jovens.

O risco de contaminação por *Salmonella* em cães e humanos é semelhante, já que os alimentos contaminados são os principais veiculadores do agente. Um estudo realizado por Schotte et al. (2007) confirmou que a fonte de infecção por *Salmonella* em cães estudados foi o alimento comercial seco fornecido, sendo o primeiro relato de contaminação proveniente de alimento seco contaminado, supostamente considerado seguro, já que apresentam baixa atividade de água e são submetidos a altas temperaturas durante seu processamento (SCUSSEL et al., 2011).

Devido ao fato de grande parte dos animais infectados com *Salmonella* não apresentarem sinais clínicos da doença, é possível que vários surtos tenham acontecido sem ter diagnóstico final de salmonelose. Esse fato é de interesse da saúde pública, já que os cães podem ser responsáveis pela contaminação de humanos (SATO et al., 2000).

Um ponto que deve ser cuidado é com relação à recontaminação por *Salmonella* spp. e outras bactérias em farinhas e subprodutos utilizados como matéria-prima na alimentação animal. As temperaturas de processamento de farinhas eliminam grande parte da contaminação bacteriana dos subprodutos, mas a recontaminação é algo

que tem grande chance de acontecer devido ao manuseio, transporte e outros fatores do ambiente (SCUSSEL et al., 2011).

E. coli (patogênica intestinal)

Escherichia coli tem sido isolada a partir de amostras de solo, água e também do trato gastrointestinal de animais domésticos. As cepas de *E. coli* patogênicas apresentam sofisticados mecanismos de virulência, sendo responsáveis por significativas afecções clínicas em homens e animais e, em algumas condições, podem assumir caráter zoonótico. A constatação da semelhança entre isolados clínicos desta bactéria dos tratos intestinal e urinário de homens, cães e gatos tem sugerido que estes animais podem estar implicados na transmissão de cepas patogênicas intestinais e extra-intestinais para humanos (COSTA et al., 2008). As cepas da *E. coli* relacionadas à contaminação alimentar são chamadas patogênicas intestinais ou diarreio gênicas. As cepas enterotoxigênicas, enteropatogênicas e shigatoxigênicas já foram encontradas em animais de companhia. Normalmente estão ligadas com quadros de diarreia, devido sua capacidade de colonização do epitélio intestinal de animais e formação de toxinas. Os quadros de diarreia que podem se manifestar tanto de forma branda, autolimitante, quanto caracterizar quadros muito graves, como a colite hemorrágica, dependendo da cepa presente.

A cepa shigatoxigênica está associada à formação de toxinas - verotoxinas, estando geralmente veiculada à ingestão de alimentos contaminados, como carne, leite, queijos não pasteurizados, água, contato pessoal ou pode ser transmitida por animais (TRABULSI et al, 2002), podendo ocasionar diarreias inicialmente leves e aquosas, evoluindo para severas e hemorrágicas. Cepas já foram isoladas em bovinos, ovelhas e cabras – reservatórios naturais, como também em suínos, cães e gatos (KRAUSE et al., 2005). Paula (2007) relata a ocorrência dessa cepa em 23 % de cepas de *E. coli* isoladas de cães diarreicos.

Grande parte da contaminação que acomete animais de companhia está relacionada com a ingestão de alimentos que em sua formulação contenham farinha de carne. Estimativas revelam que cerca de 50% das farinhas encontram-se contaminadas com *E. coli*. Em estudo realizado por Weese et al. (2005) na avaliação bacteriológica de alimentos comerciais crus destinados a cães e gatos, a bactéria foi isolada em 15/25 (64 %) das dietas avaliadas. Devido a suas características microbiológicas, esse patógeno é utilizado como indicador de qualidade higiênico-sanitária de produtos industrializados,

assim como indicador da segurança alimentar. A importância deste achado está associada à transmissão do agente entre animais de companhia e humanos suscetíveis (crianças, idosos e portadores de doenças crônicas), aumentando sua importância para a saúde pública, em particular, pela possibilidade de causar infecção hospitalar e zoonoses (GAMA, 2005).

Clostridium spp

O *Clostridium* é um bacilo anaeróbio, disseminado no ambiente, habitando o solo, a matéria orgânica em decomposição e o intestino de humanos e animais. Por estar localizado no solo e formar esporos, pode contaminar alimentos, água e outros objetos, sendo uma fonte de contaminação para os animais e humanos. Comumente encontrado na microbiota intestinal dos humanos e de animais saudáveis, o aparecimento de patologias provocadas por esse micro-organismo depende de circunstâncias que favoreçam o crescimento e a produção em doses elevadas das toxinas clostridiais (GOMES et al., 2008).

Dentre as espécies do gênero *Clostridium*, o *C. perfringens* e *C. botulinum* são considerados importantes agentes patogênicos presentes em alimentos para animais (LINDSTROM et al., 2006; MACIOROWSKI et al., 2007). Estas bactérias são capazes de formar esporos que podem sobreviver a condições de processamento a altas temperaturas (como extrusão), assim como durante o armazenamento do alimento final, desde que haja condições favoráveis para a germinação desses esporos, ocorrendo a produção de toxina. O *C. perfringens* é responsável por graves doenças entéricas, com quadro de diarreias, enterotoxemia, gangrena gasosa e enterite hemorrágica em animais (GAMA, 2005). Weese et al. (2005), em avaliação microbiológica de dietas comerciais cruas para cães e gatos, isolaram a bactéria em 5/25 (20 %) das dietas analisadas. As altas frequências e contagens de *C. perfringens* verificadas nos alimentos e na água podem estar associadas à falta de higiene geral na manipulação e armazenamento dos mesmos. O *C. perfringens* tipo A é o mais disseminado no ambiente, sendo encontrado no intestino de animais de sangue quente. A variedade enterotoxigênica produz toxina α e enterotoxina, sendo responsável por enterite e intoxicação alimentar em humanos e gastroenterite hemorrágica em cães. O *C. perfringens* tipo C produz toxinas α e β , sendo responsáveis por casos de enterite necrótica em humanos, aves domésticas, bovinos, cães, equinos, ovinos e suínos. Os animais recém-nascidos e jovens são os mais suscetíveis, apresentando casos agudos da toxinfecção. A enterotoxemia não é transmissível, mas

surtos esporádicos podem ocorrer quando o equilíbrio da microbiota intestinal é afetado, seja pelo tratamento dos animais com antibióticos, seja por mudanças bruscas na dieta. Uma mudança súbita da dieta também favorece o aparecimento desse agente (SONGER, 1996).

Diferentemente da intoxicação citada acima, na qual um grande número de células viáveis precisa ser ingerido, os sinais de botulismo são causados pela ingestão de uma exotoxina solúvel, altamente tóxica, produzida pelo *C.botulinum* durante a multiplicação nos alimentos. A etiologia usual de botulismo é a partir da ingestão de toxina produzida na alimentação animal. As cepas botulínicas podem produzir diferentes toxinas imunologicamente distintas (A-F), três dos quais (B-D) estão associadas ao quadro de botulismo em animais (SCHOENBAUM et al., 2000). Há preocupação especial com o crescimento dessa bactéria e a produção de toxinas em alimentos processados e embalados no sistema de fechamento à vácuo, também aplicado em alimentos completos destinados a cães e gatos. Os sinais de botulismo consistem em vômitos, tonturas, paralisia muscular, parada respiratória e morte (JAY, 2005).

(b) Fungos

Os fungos são divididos em (a) *de campo* e (b) *de armazenagem*. Muitas contaminações fúngicas são provenientes das etapas de pré-colheita e colheita, com a origem ainda no campo. Dependendo da região, alimento e das variações climáticas, podem predominar os fungos dos gêneros *Alternaria*, *Cladosporium*, *Fusarium* e *Helminthosporium* (LI et al., 2000). Existe pouco ou nenhum controle sobre as condições que favorecem o desenvolvimento de *fungos de campo*, pois eles invadem a cultura durante os estádios finais de maturação. Esses fungos necessitam de um teor de umidade mais elevado e $a_w > 0.85$ para sua proliferação. Os *fungos de armazenagem* proliferam nos alimentos pós-colheita, sendo menos exigentes quanto à umidade. São capazes de crescer em a_w entre 0,65 - 0,90 e em diferentes condições de temperatura. Exemplos desse grupo: *Aspergillus* e *Penicilium* (LAZZARI, 1997; SCUSSEL, 2000, 2002).

Os cereais utilizados para produção de alimento animal são ótimos substratos para o crescimento de fungos, tanto os deteriorantes quanto os toxigênicos. Além de serem responsáveis pela produção de micotoxinas (fungos toxigênicos), são os principais responsáveis por perdas nutricionais do alimento animal (fungos deteriorantes) (SCUSSEL, 2002). Segundo um estudo realizado por Scudamore et al.

(1997), os alimentos completos para cães são mais propensos a contaminação por fungos quando comparados com as matérias primas utilizadas em sua elaboração.

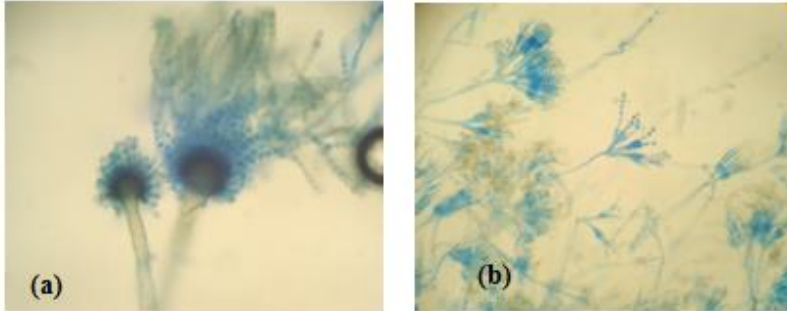
(b.1) Fungos deteriorantes

Os fungos são os mais importantes agentes responsáveis pela deterioração dos grãos e produtos acabados e responsáveis pela produção de micotoxinas. Os danos causados pelos fungos deteriorantes estão relacionados às perdas nutricionais de matérias-primas e produto final. Em geral, tem sido demonstrado que os propágulos fúngicos constituem um indicador da condição higiênica sanitária dos alimentos comerciais para animais de companhia, sendo que as contagens não são recomendadas acima de $1,0 \times 10^4$ UFC/g (MAPA, 2000; ABINPET, 2008). Os gêneros fúngicos mais comumente classificados como fungos deteriorantes são: *Aspergillus*, *Penicillium* e *Cladosporium*. Têm sido isolado a partir de uma ampla variedade de alimentos, incluindo arroz, milho e cereais (trigo e cevada), comumente utilizados em alimentos para animais de companhia.

(b.2) Fungos micotoxigênicos

São fungos capazes de produzir micotoxinas (metabólitos secundários). Os fungos toxigênicos podem contaminar os alimentos nas diferentes fases de produção e beneficiamento, desde o cultivo até o transporte e armazenagem. Os fungos micotoxigênicos envolvidos na cadeia alimentar de humanos e animais pertencem principalmente a três principais gêneros: *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*. Os dois primeiros gêneros são normalmente encontrados como contaminantes presentes em matéria prima e alimentos durante a secagem e estocagem (fungo de armazenagem), e os mais importantes produtores de micotoxinas (Figura 2), enquanto que o último é comumente encontrado durante as etapas de produção e colheita, invadindo grãos e sementes (fungo de campo) (SCUSSEL, 2002).

Figura 2 - Fungos de armazenagem: (a) *Aspergillus* e (b) *Penicillium* isolados de alimentos para animais de companhia.



Fonte: autor (2012)

O isolamento de fungos toxigênicos a partir de alimentos, principalmente em grãos, não significa obrigatoriamente risco imediato para consumo, pois nem sempre há formação de micotoxinas e vice-versa (PITT; HOCKING, 2009). Os fungos que produzem micotoxinas crescem em uma ampla variedade de substratos, incluindo grãos e subprodutos, principalmente milho, trigo, soja e arroz, geralmente utilizados na formulação de alimentos para cães e gatos (SIMAO; SCUSSEL, 2008). Dependendo das condições em que os fungos se desenvolvem, podem produzir toxinas e contaminar ingredientes (grãos) e alimentos prontos, além de deteriorar o produto levando muitas vezes a sua rejeição pelo animal. No entanto, não necessariamente a alteração do produto indica presença da toxina e vice-versa.

1.2.3 Metabólitos dos contaminantes biológicos

(a) Micotoxinas

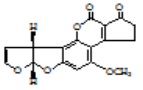
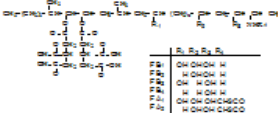
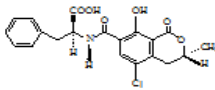
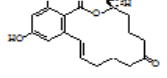
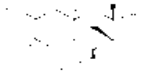
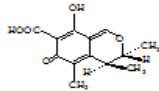
As micotoxinas são metabólitos secundários produzidos por uma variedade de fungos. São compostos orgânicos, biologicamente ativos, que podem causar uma ampla variedade de efeitos tóxicos em animais e humanos (COULOMBE, 1993). Podem entrar na cadeia alimentar humana e animal pela contaminação de alimentos *in natura* ou processados por fungos toxigênicos. Na posição dos países líderes na produção de alimentos agrícolas, o Brasil possui condições ambientais excelentes para o crescimento de todos esses fungos toxigênicos. Além disso, não há utilização adequada de boas práticas agrícolas de plantio, colheita, secagem, transporte e armazenagem de cereais e grãos,

favorecendo a contaminação por fungos e micotoxinas. Mesmo após remoção desses fungos por processos usuais de industrialização, as micotoxinas apresentam uma grande estabilidade química (termorresistente), o que permite a sua persistência no alimento (CHU, 1991; SOARES; FURLANI, 1996).

As enfermidades causadas pelas micotoxinas são denominadas micotoxicoses, as quais atingem determinados órgãos, como fígado, rins, tecido epitelial e sistema nervoso, dependendo da toxina produzida. São observados problemas de intoxicações agudas, subagudas ou crônicas, com efeitos carcinogênicos, teratogênicos e mutagênicos. Existe a possibilidade de sinergismo em ocorrências simultâneas de duas ou mais micotoxinas, o que pode conduzir à potencialização dos efeitos tóxicos (POZZI, 2000).

As micotoxinas que são consideradas as mais prevalentes no Brasil são as aflatoxinas - AFLs (*Aspergillus*), fumonisinas - FBs (*Fusarium*), zearalenona - ZON (*Fusarium*) e ocratoxina A - OTA (*Penicillium e Aspergillus*) (RUMBEIHA, 2000). No Quadro 4 estão descritas as principais micotoxinas, estrutura química, fungo produtor, alimentos encontrados, órgão alvo e efeitos nos animais.

Quadro 4 - Principais micotoxinas de potencial toxicológico, estruturas químicas, órgãos alvo, fungos produtores e presença no alimento animal

Micotoxinas	Estruturas químicas	Fungo produtor	Ingrediente (substrato)	Órgão alvo	Possíveis efeitos nos animais
Aflatoxinas (B₁, B₂, G₁, G₂)		<i>A. flavus</i> <i>A. parasiticus</i>	Milho Arroz Amendoim Nozes	Fígado Rins Neoplasias	Hepatotóxico, carcinogênico, reduzida taxa de crescimento, enterite hemorrágica, redução da imunidade e <u>produtividade</u>
Fumonisinás		<i>F. verticillioides</i> <i>F. proliferatum</i>	Milho	S. nervoso Neoplasias	Hepatotóxico, nefrotóxico, edema pulmonar, carcinogênico, leucoencefalomalácia e <u>equinos</u>
Ocratoxina A		<i>P. verrucosum</i> <i>A. ochraceus</i>	Milho Aveia Tngo Centeio Cevada	Rins Fígado S. nervoso Neoplasias	Hepatotóxico, nefrotóxico, carcinogênico, teratogênico, neurotóxico, imunotóxico, aborto, baixa conversão alimentar, reduzida taxa de <u>crescimento</u>
Zearalenona		<i>F. graminearum</i> <i>F. culmorum</i>	Milho Trigo Aveia	S. reprodutor	Hiperestrogenismo, infertilidade, prolapso uterino, redução de produção de leite e <u>morte</u>
Deoxivalenol		<i>F. graminearum</i> <i>F. culmorum</i>	Milho Trigo Cevada Centeio	Fígado (vomitotoxina) S. nervoso	<u>Recusa de alimentos</u> em suínos, cães e gatos, vômitos, neurotóxico e redução do ganho de peso
Citrinina		<i>P. citrinum</i> <i>P. verrucosum</i> <i>A. ochraceus</i>	Milho Aveia Arroz Cevada Trigo	Renal Hepático	Lesão renal, nefropatia, toxemia e <u>neoplasia</u>

Fonte: adaptado de Scussel (2002), de Souza Koerich e Scussel. (2012), Boermans e Leung (2007)

As micotoxicoses já relatadas em cães envolvem AFLs, DON, OTA, citrinina, ZON, roquefortina e penitrem A (RUMBEIHA, 2000). A presença de micotoxinas em alimentos para animais pode ser observada pela análise do alimento suspeito, realizando a identificação e quantificação das mesmas.

Efeitos patogênicos das micotoxinas em cães e gatos

São reconhecidos os efeitos deletérios das micotoxinas sobre a saúde animal, sendo capazes de induzir efeitos carcinogênicos, hepatotóxicos, mutagênicos e imunossupressão (MOSS, 1998). São poucos os dados da toxicidade desses compostos em animais de companhia e os quadros tóxicos variam de acordo com a micotoxina, efeito dose dependente e espécie animal (HUSSEIN; BRASEL, 2001).

Alimentos com níveis baixos de toxinas não resultam em quadro clínico característico de micotoxicose, mas aparecimento de quadro de susceptibilidade a infecções intercorrentes pela imunossupressão causada ao animal (OSBORNE, 1982). A micotoxicose é ainda pouco discutida e considerada entre os clínicos veterinários, pois é conhecida a patogenia das micotoxinas, mas poucos dados sobre a incidência da intoxicação em cães e gatos.

Quando uma micotoxina é encontrada, deve-se considerar que outras micotoxinas de grupos diferentes também podem estar presentes na dieta. Convém ressaltar que múltiplas micotoxinas são co-produzidas e interagem para agravar o quadro clínico das micotoxicoses (RUMBEIHA, 2000). Essa interação acontece quando muitos ingredientes são misturados para um produto final ou quando fungos produzem múltiplas micotoxinas simultaneamente (por exemplo, fungos do gênero *Fusarium* e *Penicillium*).

(a.1) Aflatoxinas (AFLs)

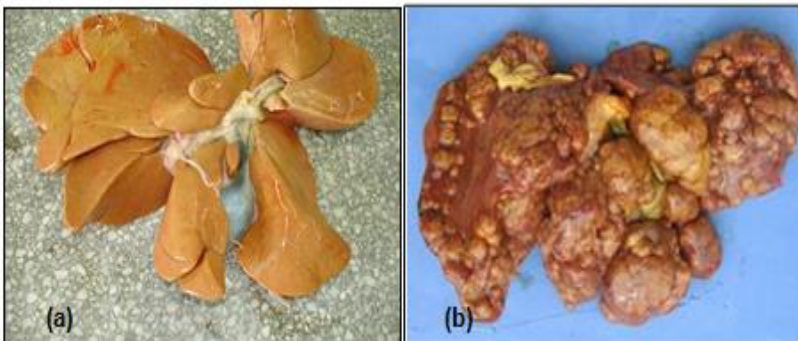
As AFLs são produzidas por fungos do gênero *Aspergillus* spp., como *A. flavus*, *A. parasiticus* e *A. nominus* (MOSS, 1998). As principais AFLs são denominadas de AFB₁, AFB₂, AFG₁ e AFG₂, baseadas na fluorescência delas sob luz ultravioleta. As AFB₁ e AFB₂ apresentam fluorescência azul (B= *blue*) e AFG₁ e AFG₂ apresentam fluorescência verde (G= *green*) (HUSSEIN; BRASEL, 2001). São toxinas hepatotóxicas e carcinogênicas que tem causado vários surtos de envenenamento por meio de alimentos contaminados. Os sinais de intoxicação dependem do grau de contaminação do alimento, do tipo de

AFL e do tempo e quantidade de alimento contaminado ingerido pelo animal e seu estado nutricional. Animais jovens são mais afetados pela aflatoxicose. É conhecida como a mais potente micotoxina produzida e um dos mais tóxicos carcinógenos conhecidos, podendo ser encontrada em concentrações significativas nas rações animais, sendo considerada de grande importância para a saúde animal (MUZOLON, 2008). Os cães e gatos são extremamente sensíveis às AFLs. Nos animais de companhia, o fígado é o principal órgão alvo. A aflatoxicose clínica em cães pode ser classificada como aguda, subaguda, ou crônica.

A aflatoxicose aguda ocorre quando os animais são alimentados com grandes quantidades de AFB₁ (>1mg/kg na dieta). Nos casos agudos e subagudos de aflatoxicose, os animais de companhia apresentam quadro de vômito, letargia, anorexia, poliúria, elevação das enzimas hepáticas e icterícia, podendo ocorrer morte (MUZOLON, 2008).

Na aflatoxicose crônica são observados imunossupressão, não raramente cirrose hepática à necropsia (NEWMAN et al., 2007). Muzolon (2008) descreveu os achados da necropsia em aflatoxicose crônica presentes em um cão de seis meses de idade, sabidamente intoxicado por aflatoxina na concentração de 78,6 µg/kg na ração fornecida diariamente durante 79 dias. Foi observado fígado com coloração pálida e amarelada, bordas dos lobos ligeiramente arredondadas pelo leve aumento de tamanho, consistência firme, vesícula biliar repleta e com paredes levemente espessadas (Figura 3).

Figura 3 – (a) Fígado pálido e amarelado de um cão - decorrência da retenção biliar e da transformação gordurosa na aflatoxicose crônica; (b) cirrose hepática em cão.



Fonte: MUZOLON (2008); VIOTT (2011)

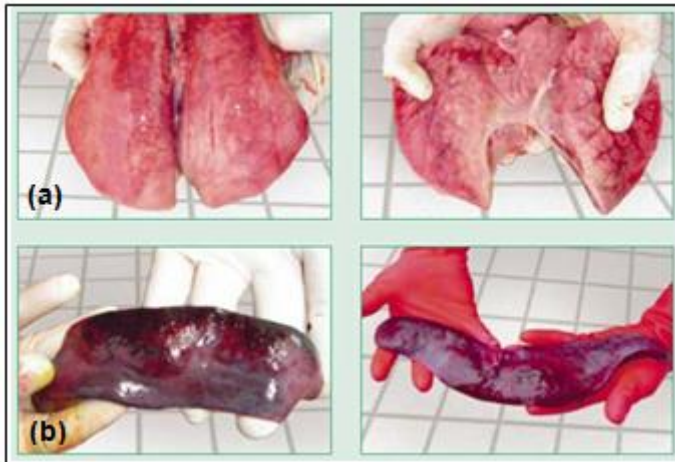
Outro efeito em longo prazo é o câncer. A AFB₁ é considerada como a mais tóxica e com maior poder carcinogênico, além de ser a mais frequentemente encontrada em alimentos para animais. A exposição a uma grande quantidade de AFLs tem o potencial de levar ao câncer hepático (neoplasia) nos animais de companhia que se recuperaram dos efeitos da exposição aguda, subaguda ou crônica. Consequentemente, a exposição às AFLs pode ter implicações em médio ou longo prazo na saúde desses animais (RUMBEIHA, 2000).

Diversos autores informaram que as AFLs têm sido detectadas em alimentos comerciais na América do Norte e do Sul, devido à incorporação de milho e de oleaginosas como ingredientes significativos de elaboração. Os alimentos comerciais para cães e gatos geralmente têm baixos níveis de AFLs, entretanto, os percentuais de amostras positivas variam segundo a qualidade da amostra. Atualmente, 100 países possuem legislação para presença de AFLs em alimentos e rações para animais de produção (poucas para animais de companhia), inclusive o Brasil (FAO, 2006).

(a.2) *Fumonisin* (FBs)

O conhecimento científico sobre as FBs é relativamente menor quando comparado às AFLs, embora tenha ocorrência frequente. As FBs são produzidas por diversas espécies do gênero *Fusarium*, especialmente por *Fusarium verticillioides*, *Fusarium proliferatum* e *Fusarium nygamai*, além da *Alternaria alternata*. Esse fungo tem distribuição mundial, sendo considerados importantes patógenos de cereais em todas as fases de desenvolvimento, principalmente no milho, incluindo período após colheita, durante armazenamento (DIAZ; BOERMANS, 1994). Constituem um grupo o qual engloba 25 substâncias denominadas de B1 (FB₁, FB₂, FB₃ e FB₄), A₁, A₂, A₃, AK₁, C₁, C₃, C₄, P₁, P₂, P₃, PH_{1a} e PH_{1b} (AH-SEO; WON LEE, 1999). A FB₁ é a mais abundante e tóxica, representando 70% da contaminação total dos alimentos naturalmente contaminados (MALLMANN et al., 2001). As FBs são responsáveis pela leucoencefalomácia em equinos e coelhos, edema pulmonar e hidrotórax em suínos e efeitos hepatotóxicos, carcinogênicos e apoptose (morte celular) em fígado de ratos (POZZI et al., 2000). A Figura 4 apresenta um quadro de intoxicação por FBs e alterações em pulmão e baço.

Figura 4 – Alterações em (a) pulmão e (b) baço de suínos contaminados com fumonisinas



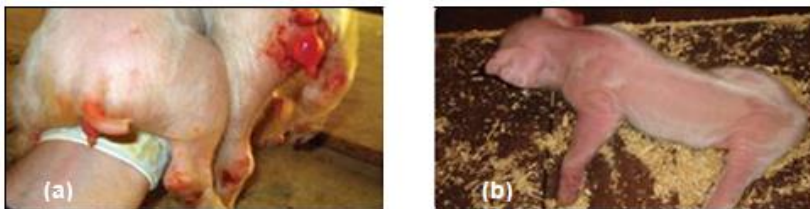
Fonte: <http://www.engormix.com.br>

Dados epidemiológicos também correlacionaram a ingestão de milho contaminado com *F. verticillioides* à neoplasia de esôfago em seres humanos. Frangos e perus também são sensíveis e apresentam redução no ganho de peso, diarreia e hepatotoxicidade (SMITH, 2007). As FBs apresentam considerável potencial para causar intoxicação, já que geralmente são encontradas em ingredientes que fazem parte da formulação de rações para pequenos animais. No Brasil, essas micotoxinas já foram detectadas em vários substratos, especialmente no milho (SCUSSEL, 2002).

(a.3) Zearalenona (ZON)

É um metabólito fúngico de espécies do gênero *Fusarium*, produzida principalmente por *F. graminearum*, sua produção é favorecida por elevada umidade e baixas temperaturas. Trata-se de uma micotoxina com atividade estrogênica. No Brasil, essa toxina já foi encontrada em cereais e em aveia em flocos para consumo humano (OLIVEIRA et al., 2002). Em porcas, essa micotoxina causa vulvovaginite e outras respostas estrôgenicas. Também é observado quadro de *splay leg* na intoxicação por ZON em suínos, ou seja, impossibilidade do leitão ficar em pé, como observado na Figura 5.

Figura 5 – Intoxicação por zearalenona: (a) vulvovaginite em leitões e (b) *splay leg* em leitão.



Fonte: VOORSLUYS (2010)

Os suínos são especialmente sensíveis a essa micotoxina e sua ingestão, além do hiperestrogenismo, podem causar graves problemas reprodutivos (distúrbios na concepção e aborto). Os efeitos observados em cães foram redução da fertilidade, aumento de absorção de embriões, redução do tamanho da ninhada, alterações dos níveis séricos de progesterona e estradiol e alterações no peso da adrenal, tireóide e hipófise (GOLINSKI; NOVAK, 2004).

(a.4) *Ocratoxina A (OTA)*

As OTA são produzidas pelos fungos *Penicillium* e *Aspergillus*, principalmente por *P. verrucosum* e *A. ochraceus*. Essas são espécies de fungos de armazenamento, mas que também podem crescer no campo. Conseqüentemente, esses fungos têm potencial de produzir toxinas em casa, após a compra do alimento industrializado, se ela não for armazenada adequadamente (DE SOUZA KOERICH et al., 2010). Pesquisas revelaram alta frequência na presença de OTA nos alimentos para cães e gatos (RAZZAZI-FAZELI et al., 2001). A OTA foi isolada de ingredientes utilizados em ração de animal de companhia, como os cereais (milho, centeio, aveia, trigo e cevada) e também pode ser encontrada em produtos de origem animal, devido a sua estreita ligação com proteínas plasmáticas e longa permanência em tecidos animais (LEUNG et al., 2006). O principal alvo da atividade tóxica da OTA é o sistema renal. Também é considerada hepatóxica, imunossupressora, teratogênica e cancerígena (BOERMANS; LEUNG, 2007). A Figura 5 mostra um rim de suíno contaminado por OTA.

Figura 6 - Rim de suíno contaminado com ocratoxina A.



Fonte: VIOTT (2011)

O mecanismo de ação da OTA está relacionado ao seu acúmulo nos rins, pelo alto fluxo sanguíneo e pela reabsorção tubular. Os sinais observados foram perda de apetite, vômito, tenesmo, hipertermia, tonsilite, diarreia hemorrágica, polidipsia, poliúria, desidratação, paralisia e morte. Há efeito sinérgico entre OTA e citrinina, com lesões renais graves em animais contaminados (SCUSSEL, 2000; 2002).

(a.5) *Deoxivalenol (DON)*

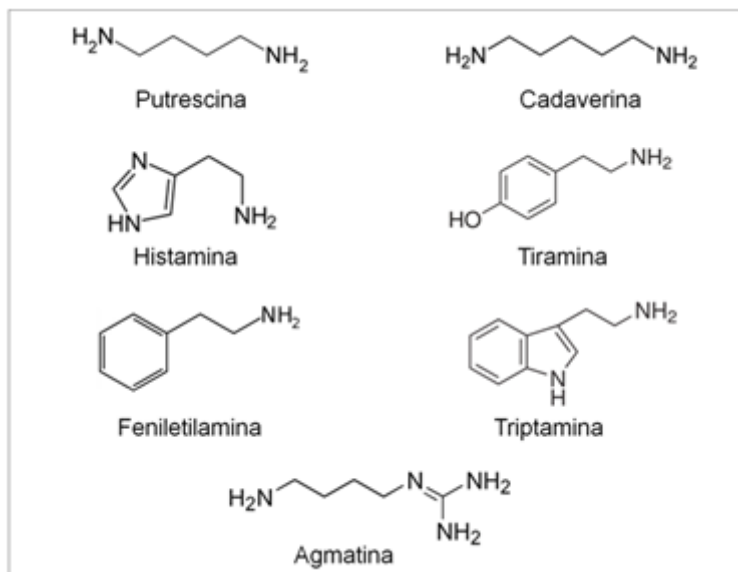
O DON pertence ao grupo dos tricotecenos, micotoxinas produzidas por fungos do gênero *Fusarium* spp. (RUMBEIHA, 2000). O DON é comumente encontrado em grãos. Quando ingerido em doses elevadas por animais, ela causa náuseas, vômitos e diarreia. Por induzir esses sinais o DON é conhecido como vomitotoxina ou fator de recusa de alimento. Quando ingerida por porcos e por outros animais, em pequenas doses, pode provocar perda de peso e recusa alimentar, em altas doses, causa vômitos e diarreia. Os sinais clínicos em animais de companhia incluem anorexia, regurgitação, vômito, irritação cutânea, diarreia, hemorragias, aborto (mamíferos) e até a morte (BOERMANS; LEUNG, 2007).

(b) Aminas bioativas

As aminas bioativas são bases orgânicas de baixo peso molecular formadas durante processos metabólicos e/ou através da

atividade microbiana que possui atividade biológica, desempenhando importantes funções nos organismos vivos. Estas podem ser classificadas em poliaminas e amins biogênicas. Podem ser formadas através da descarboxilação de aminoácidos livres por enzimas da microbiota ou pela aminação de aldeídos e decomposição de fosfolipídios. As amins bioativas são classificadas de acordo com sua estrutura em: *heterocíclicas* (histamina e triptamina), *aromáticas* (tiramina e feniletilamina) e *alifáticas* (putrescina, cadaverina, espermina e espermidina) (SALAZAR et al., 2000). A Figura 7 mostra a estrutura química de algumas amins bioativas.

Figura 7 - Estruturas químicas das amins bioativas.



Fonte: LIMA; GLÓRIA (1999)

As amins bioativas são encontradas naturalmente em baixas concentrações em tecidos animais e vegetais (carne, peixe, frutas, grãos e cereais), ingredientes comumente utilizados para produção de alimentos para animais de companhia (HALÁSZ et al., 1994; SALAZAR et al., 2000). No entanto, níveis mais elevados de amins bioativas durante o armazenamento de alimentos pode indicar perda de qualidade, especialmente aqueles alimentos que têm elevado teor de proteínas (SILVA; GLORIA, 2002). A presença de amins biogênicas

pode ser um bom indicador da qualidade do alimento, visto que a deterioração do alimento está associada ao aumento dos teores de algumas destas substâncias (LIMA; GLÓRIA, 1999). Pode-se citar o uso de aminas como índice de qualidade de pescados (VECIANA-NOGUÉS et al., 1997), de carne de frango e produtos derivados (SILVA; GLÓRIA, 2002), dentre outros. Convém enfatizar que teores elevados de aminas biogênicas em alimentos podem causar intoxicação alimentar (HALÁSZ et al., 1994). Os pré-requisitos para a formação de aminas em alimentos são a disponibilidade de aminoácidos livres, presença de micro-organismos descarboxilase positiva (BRINK et al., 1990). Muitas enterobactérias e alguns lactobacilos e enterococos são particularmente ativos na formação de aminas biogênicas. A formação de aminas por bactérias é influenciada pela temperatura de armazenamento do alimento, sendo muito variável entre as aminas (HALÁSZ et al., 1994).

Toxicidade

As poliaminas, como a espermidina e espermina, são importantes na regulação da função de ácidos nucléicos e síntese protéica, além da estabilização de membranas. As aminas biogênicas são neuroativas ou vasoativas, sendo a feniletilamina e a tiramina responsáveis pelo aumento na pressão sanguínea por vasoconstrição e aumento dos batimentos e da força de contração cardíaca. Putrescina e cadaverina causam hipotensão, bradicardia e potencializam a toxicidade de outras aminas. A histamina pode estimular diretamente o coração como resultado do seu efeito na liberação de adrenalina e noradrenalina pela glândula supra-renal, excitar a musculatura lisa uterina, o intestino e o trato respiratório, estimular tanto neurônios sensoriais quanto motores e controlar a secreção gástrica (SHALABY, 1996). O Quadro 5 apresenta as aminas biogênicas comumente encontradas em alimentos e seus efeitos tóxicos e sinais clínicos causados pela sua ingestão.

Quadro 5 - Aminas biogênicas comumente encontradas em alimentos e seus efeitos tóxicos e sinais clínicos causados pela sua ingestão

Aminas biogênicas	Efeitos tóxicos	Sinais clínicos
Histamina	Vasodilatação Libera adrenalina e noradrenalina Excita a musculatura uterina, intestinal e respiratória Estimula neurônios sensores e motores Controla a secreção de ácido gástrico Mediador primário da resposta alérgica	<i>Pele:</i> erupção cutânea, urticária e inflamação <i>TGI:</i> náusea/diarréia/contração abdominal <i>Pressão sanguínea:</i> hipotensão <i>Outros:</i> dores de cabeça, palpitações <i>Casos graves:</i> sensação de queimadura, broncoespasmo e dificuldade respiratória
Triptamina	Vasoconstrição	<i>Pressão sanguínea:</i> hipertensão
Tiramina	Vasoconstrição periférica Aumento do fluxo cardíaco Aumenta taxa respiratória Aumenta o nível de glicose sanguínea Libera noradrenalina do sistema nervoso	<i>Pressão sanguínea:</i> hipertensão <i>Geral:</i> aumento de salivação e lacrimejamento; dor de cabeça e enxaqueca
Feniletilamina	Vasoconstrição. Libera noradrenalina do Sistema Nervoso Simpático	<i>Pressão sanguínea:</i> hipertensão <i>Geral:</i> dor de cabeça e enxaqueca
Putrescina e Cadaverina	Vasodilatação Bradycardia Potencializa o efeito das aminas	<i>Geral:</i> parestesia das extremidades <i>Pressão sanguínea:</i> hipotensão Espasmos mandibulares

TGI: trato gastrointestinal; fonte Shalaby (1996); Önal (2007)

Os teores das aminas bioativas, principalmente cadaverina, putrescina e histamina, podem aumentar durante o armazenamento do alimento, já que estão relacionadas com a deterioração. A presença de aminas bioativas em alimentos para animais de companhia pode ser um

indicativo da qualidade e das condições higiênico-sanitárias, nas quais os mesmos são processados e/ou armazenados. Pela sua toxicidade é importante o seu controle para evitar intoxicações alimentares.

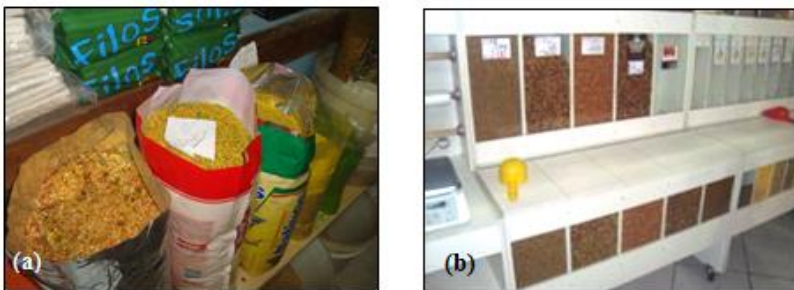
1.3 Fatores interferentes no desenvolvimento de contaminantes biológicos e seus metabólitos em alimentos para animais de companhia

A presença de contaminantes biológicos e a produção de toxinas (micotoxinas e aminas bioativas) em ingredientes e produto final são determinadas por vários fatores extrínsecos (externos ao alimento) e intrínsecos (inerente ao alimento) que afetam significativamente a qualidade e composição dos alimentos. De particular importância podem ser citados: temperatura, umidade relativa do ar (UR), propriedades dos substratos incluindo a umidade e a atividade de água (a_w), potencial hidrogeniônico (pH), bem como fatores bióticos (insetos, vertebrados e outros micro-organismos) e formas de exposição do produto (LORINI, 1998; 2002).

1.3.1 Fatores extrínsecos

As condições de armazenamento podem favorecer o desenvolvimento de ácaros, insetos e micro-organismos, estando diretamente relacionada, entre outros fatores, com o grau de limpeza dos depósitos, UR, temperatura do ambiente (LORINI, 1998; 2002) e formas de exposição do produto final. A venda de alimentos para animais de companhia em embalagens abertas em *petshops* e agropecuárias (sistema a granel) favorece a presença de insetos e conseqüentemente, perda qualitativa do produto, além da disseminação de bactérias, fungos e ácaros que provocam modificações sensoriais no produto e formação de toxinas, comprometendo a qualidade e segurança do alimento na etapa final da cadeia de produção do produto (LAZZARI, 1997). Essa forma de comercialização é permitida no Brasil, no entanto, deve ser adotadas programas de controle da qualidade do alimento exposto, como a implementação de boas práticas de comercialização, protegendo o produto das condições climáticas e fatores bióticos. A Figura 8 mostra duas formas diferentes de armazenamento e comercialização de alimentos para animais de companhia em agropecuárias, podendo comprometer sua qualidade e segurança.

Figura 8 – Condições de armazenamento e comercialização de alimentos para animais de companhia: (a) embalagens originais abertas e (b) recipientes tampados.



Fonte: autor (2011)

A exposição do alimento ao ambiente compromete a sua qualidade sanitária (HINTON; MEAD, 1992) e seu tempo útil de conservação e validade, proporcionando contaminação de micro-organismos.

A UR é relacionada com o equilíbrio entre o alimento e o ambiente. Os grãos e produtos finais que possuem a_w e teor de umidade relativamente baixos quando expostos a um alta UR tendem a absorver umidade (higroscópicos), favorecendo o crescimento de micro-organismos; quando um alimento com alta a_w e teor de umidade é submetido à UR menores, eles desidratam para entrar em equilíbrio com o meio. Por este fato a secagem de grãos e a manutenção do ambiente de armazenagem do produto final em condições de UR controlada são critérios que podem controlar a contaminação por fungos e bactérias (SCUSSEL, 2002). Com relação à produção de micotoxinas, essas são formadas quando certas condições ambientais (UR e temperatura), além das características bioquímicas dos produtos que servem como substrato, são propícias para a sua produção. O crescimento de fungos aflatoxigênicos (*Aspergillus*) é favorecido por temperaturas entre 23-26°C e UR acima de 75 %, enquanto que para produção de AFLs, a temperatura e UR ideal são acima de 27°C e 85 %, respectivamente. O gênero *Fusarium* produz micotoxinas em temperaturas entre 20 a 26°C (ORSI et al., 2000). Esses fatores ambientais também favorecem a formação de amins bioativas nos alimentos para humanos e animais. Os fatores predominantes são o *tempo* e a *temperatura* em que o produto é exposto no preparo, processamento e/ou durante seu armazenamento (KOMPRDA et al., 2004).

1.3.2 Fatores intrínsecos

(a) Teor de umidade

A umidade do alimento animal e/ou da matéria prima utilizada tem relação direta com a presença de contaminantes microbiológicos (fungos e bactérias) e desenvolvimento de toxinas, especialmente as micotoxinas (SCUSSEL, 2000; 2002). Quanto mais alto o teor de umidade, maior o aparecimento de fungos tanto nos grãos, ainda no campo ou mal armazenados, quanto nos alimentos já processados. Após o processo de extrusão do alimento animal, há redução da umidade de 25 % (antes da secagem) para teor de umidade final de 8 a 10 % no produto acabado. Neste nível de umidade, o crescimento de micro-organismos é dificultada, porém fungos xerofílicos são selecionados (CRANE et al., 2000). Faixas extremas de teor de umidade impedem a proliferação de fungos, porém apenas teores críticos são seguros (1 a 2 %) uma vez que fungos germinam em ambientes com baixa umidade, gerando calor e liberação de água, esta por sua vez pode ser utilizada por outras espécies para seu crescimento (SCUSSEL, 2002).

(b) Atividade de água (a_w)

A melhor medida da concentração de água no produto final refere-se à medição de sua a_w , ou seja, medição do teor de água livre no produto. É a principal responsável pela deterioração do produto, pois favorece o crescimento microbiológico. Em geral, o crescimento de bactérias patogênicas de interesse em alimentos ocorre numa faixa de a_w de 0,90 a 0,86 e o crescimento fúngico ocorre numa faixa mais ampla, variando de 0.68 a > 0.90 (JOUANY, 2007; PITT; HOCKING, 2009). Na Tabela 1 estão sumarizadas a a_w mínima de crescimento de diferentes micro-organismos e produção de toxinas.

Tabela 1 – Atividade de água mínima para crescimento de bactérias, fungos e produção de toxinas

Contaminante biológico	Atividade de água (a_w)	
	Crescimento	Produção de toxinas
Bactérias patogênicas		
<i>Salmonella</i>	0,92 - 0,95	NI
<i>Clostridium botulinum</i> A	0,93 - 0,95	0,94 - 0,95
<i>Clostridium perfringens</i>	0,93 - 0,95	NI
<i>Bacillus cereus</i>	0,86	NI
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,86	0,87 - 0,90 (enterotoxina A)
Fungos toxigênicos		
<i>A. flavus</i>	0,78 - 0,80	0,83 - 0,99 (aflatoxina)
<i>A. parasiticus</i>	0,80 - 0,83	0,87 - 0,95 (aflatoxina)
<i>A. niger</i>	0,77 - 0,83	0,85 - 0,90 (ocratoxina A)
<i>A. ochraceus</i>	0,76 - 0,83	0,83 - 0,99 (ocratoxina A)
<i>A. carbonarius</i>	0,85 - 0,98	0,90 - 0,92 (ocratoxina A)
<i>P. cyclopium</i>	0,81- 0,85	0,87 - 0,90 (ocratoxina A)
<i>P. veridicatum</i>	0,83	0,83-0,86 (ocratoxina A)
<i>P. expansum</i>	0,82 - 0,83	0,95 (patulina e citrinina)
<i>P. citrinum</i>	0,80 - 0,84	0,90-0,95 (citrinina)
<i>P. verrucosum</i>	0,80 - 0,82	0,86-0,87 (ocratoxina A)
<i>P. crustosum</i>	0,83-0,85	0,92-0,95 (penitrem A)
<i>F. graminearum</i>	0,88 - 0,90	0,95-0,99 (deoxinivalenol, zearalenona)
<i>F. culmorum</i>	0,87- 0,90	0,96-0,97 (deoxinivalenol, zearalenona)
<i>F. verticillioides</i>	0,87	0,92 - 0,93 (fumonisinas B ₁ e B ₂)

NI: não indicado; Fonte: Pitt e Hocking (2009)

Dos micro-organismos capazes de colonizar os grãos e produto final, os fungos são os mais tolerantes a baixa a_w quando comparados com bactérias.

(c) Composição do substrato

As características físicas e químicas do substrato são importantes na determinação da variabilidade de contaminantes prováveis de serem encontrados. Os parâmetros físicos incluem disponibilidade de oxigênio e de ar residual no produto, e a condutividade térmica, que influi sobre a temperatura nos grãos. Entre as características químicas, destacam-se os conteúdos de proteínas, gorduras, aminoácidos e minerais. Muitas contaminações ocorrem mais em alimentos completos para animais de companhia quando comparados com as matérias primas utilizadas em sua elaboração (SCUDAMORE et al., 1997), provavelmente em decorrência da composição química completa do substrato. A gordura e carboidratos são fontes de energia, sendo fundamental para o crescimento microbiano, principalmente os fungos, assim como alimentos para animais com alto conteúdo de proteína favorecem a produção de aminas bioativas (GLORIA, 2005).

(d) Potencial hidrogeniônico (pH)

A maioria dos micro-organismos cresce melhor em condições de pH em torno de 7,0 (6,5 -7,5). As bactérias tendem a ser mais exigentes se comparadas a fungos e leveduras, que podem crescer em alimentos com $\text{pH} \leq 4,5$ (JAY, 2005). A Tabela 2 mostra os limites máximos e mínimos para crescimento de micro-organismos presentes em alimentos.

Tabela 2 – Limite de pH para crescimento de micro-organismos presentes em alimentos

Microrganismo	pH		
	Ótimo	Mínimo	Máximo
Bactérias	6,5-7,5	4,5	9,0
Fungos	4,5-7,0	1,5 – 3,5	8,0-11,0
Leveduras	4,0-6,5	1,5 – 3,5	8,0-9,0

Fonte: Jay (2005)

Tanto bactérias, fungos e leveduras podem crescer em

alimentos para animais de companhia, já que esses apresentam pH variável, determinados principalmente pela adição de ácidos orgânicos. A presença de substâncias antimicrobianas naturais (eugenol, alicina) e adição de aditivos (propilenoglicol, glicerol, sorbitol) na formulação do alimento final são importantes fatores influenciadores no crescimento microbiológico e nos mecanismos da formação de toxinas biológicas (aminas bioativas e micotoxinas) (KOMPRDA et al., 2004; EEROLA; MAIJALA, 2004).

1.4 Contaminantes biológicos e metabólitos em alimentos para animais de companhia reportados na literatura

Trabalhos referentes à contaminação biológica em alimentos para animais de companhia têm sido desenvolvidos em todo o mundo, principalmente pela representatividade econômica que esse mercado tem apresentado, além do estreitamento das relações afetivas entre humanos e animais de companhia.

1.4.1. Sujidades biológicas leves

Na avaliação da presença de sujidades biológicas leves como insetos, ácaros e pêlo de roedor em alimentos secos para cães comercializados à granel (embalagens abertas), foram identificadas sujidades leves em 94% (29/30) das amostras, porcentagem maior devido a forma de exposição desses produtos, estando mais susceptíveis a contaminantes biológicos. Fragmentos de insetos foram encontrados em 87,5 % das amostras, no entanto ácaros não foram encontrados (DE SOUZA KOERICH et al., 2010). Brazis et al. (2008), avaliando a contaminação por ácaros em 10 alimentos secos para cães armazenados durante seis semanas em embalagem aberta em ambiente domiciliar (expostas diretamente ao ambiente), observou a presença de ácaros em 90% (9/10) das amostras, sendo mais prevalente o gênero *Tyrophagus* spp. Em um estudo de avaliação da presença desse tipo de ácaros (de armazenamento) realizado em 283 centrais de distribuição de cereais para produção de alimento animal, os mesmos foram encontrados em 81% dos estabelecimentos. Em outro estudo envolvendo 178 fábricas de rações para animais de produção, ácaros de armazenamento foram encontrados em 89% das instalações (PRICKETT, 1992, 1994). Na Inglaterra, também foram encontrados ácaros, nesse caso, em 100% (36) das amostras de ração para bovinos e ovinos (CHAMBERS et al., 1999).

1.4.2 Bactérias, fungos e micotoxinas

A contaminação microbiológica presente nos alimentos para animais de companhia pode ser um indicador de condições sanitárias inadequadas durante o processamento, o armazenamento ou de produção (FRANCO, 2005). O desenvolvimento de dietas alternativas para os animais de companhia, como dietas naturais (alimentos crus) e orgânicas, utilizando ingredientes e matérias-primas constituintes da alimentação humana, podem promover doenças e inclusive aumentar os riscos de zoonoses e comprometer a segurança alimentar do produto fornecido, podendo favorecer o aparecimento de infecções bacterianas. Em estudo realizado por Weese et al. (2005) na avaliação microbiológica de alimentos comerciais crus para cães e gatos, as bactérias *E. coli*, *Clostridium perfringens* e *S. aureus* foram isoladas em 15/25 (64 %), 5/25 (20 %) e 1/25 (4 %) das dietas avaliadas, respectivamente. Finley (2007) e Strohmeyer et al. (2004) também analisaram alimentos comerciais crus, onde isolaram *Salmonella* spp. em 20 e 48 % das amostras. Santos et al. (2000), avaliando 10 tipos diferentes do ingrediente farinha de carne e ossos, verificaram que 90% (9/10) das amostras apresentaram contaminação por *Salmonella*. Os alimentos completos extrusados avaliados por Miotto et al. (2010) comercializados no Brasil apresentavam contaminação por *B. cereus*, *E.coli* e *Clostridium* spp., demonstrando também a presença de bactérias patogênicas em alimentos extrusados (tratados termicamente).

Diversos trabalhos sobre a contaminação de alimentos e rações por fungos toxígenos foram publicados. Na avaliação da micobiota presente em alimentos para animais de companhia realizada por Scudamore et al. (1997), foi isolado *Aspergillus*, *Eurotium* e *Penicillium* como gêneros predominantes. Em estudos similares conduzidos por Bueno et al. (2001), encontrou-se os três gêneros mais prevalentes *Aspergillus*, *Rhizopus* e *Mucor*. *Aspergillus flavus* foi isolado em 86,6 % de 90 amostras de milho provenientes de diversas regiões do Brasil (ASEVEDO et al., 1994). Rosa (2002) estudou a micobiota toxigênica de produtos vegetais e rações destinadas à alimentação de frangos de corte em quatro fábricas de ração do estado do Rio de Janeiro e observou que o gênero *Aspergillus* sp. foi prevalente (40,6 %), seguido de *Penicilium* sp. (39,8 %) e *Fusarium* spp. (14,7 %), dentre outros. Copetti (2005) isolou *Aspergillus* em 55,6 % dos alimentos comerciais para cães e gatos, seguido do *Eurotium* spp. (51,8 %), *Penicillium* spp. (44,4 %) e *Fusarium* spp. (33 %).

Estudos realizados em 130 amostras de milho recém-colhido e milho armazenado em São Paulo provenientes da colheita do ano de 1991 demonstraram que *Fusarium* sp. foi o gênero fúngico dominante (84 %), seguido de *Penicilium* sp. (55 %) e *Aspergillus* sp. (41 %) (POZZI et al., 1995). A contaminação com fungos toxigênicos e micotoxinas foi avaliada em Portugal por Martins et al. (2003). Neste estudo os autores isolaram espécies toxigênicas do gênero *Aspergillus* e *Fusarium*, e se detectaram as micotoxinas FBs, DON e OTA. O *Aspergillus flavus* foi prevalente em 14 a 16 % de amostras em Portugal.

Maia e Siqueira (2002) estudaram 100 amostras de ração para animais de companhia, sendo 45 para cães, 25 para gatos e 30 para pássaros. Estes autores detectaram AFLs em 12 % das amostras utilizando a metodologia de cromatografia em camada delgada. A concentração total de AFLs foi de 15 a 374 ng/g, com média de 131 ng/g. Todas as amostras de ração que continham amendoim ou derivados foram positivas para aflatoxinas. Sharma e Márquez (2001) estudaram os níveis de contaminação por AFLs em 35 rações para cães no México, relatando que AFB₁ foi detectada em 79 % das amostras; AFB₂ em 26 %; AFG₁ em 63 %; AFG₂ em 21 %; AFM₁ em 63 %; AFM₂ em 89 % das amostras. Os níveis mais elevados de aflatoxina B₁ foram de 39,7 ng/g de ração. Estudo realizado na Universidade da Carolina do Norte em 2002 revelou os seguintes números para milho em grãos utilizados para ração animal: 70% das amostras positivas para DON, 37% para as FBs, ZON em 11%, 9% para a AFLs e 6% para toxina T₂, um total de 231 amostras analisadas (WHITLOW; HAGLER, 2002). No intuito de avaliar os níveis de AFLs e FBs em ingredientes utilizados na fabricação de rações para animais de companhia, Cruz (2010) analisou 24 amostras de milho em grão na etapa da recepção utilizado para fabricação de ração para animais de companhia. Nesse experimento foram detectadas AFLs e FBs em 41,66 e 83,33% das amostras, respectivamente.

Diversos autores, Scudamore et al. (1997), Henke et al. (2001) e Maia e Siqueira (2002), verificaram que as AFLs têm sido detectadas em alimentos comerciais na América do Norte e do Sul, devido à incorporação de milho e de oleaginosas como ingredientes significativos de elaboração. Os alimentos comerciais para cães e gatos geralmente têm baixos níveis de AFLs, entretanto, os percentuais de amostras positivas variaram segundo a qualidade da amostra. A Tabela 3 apresenta algumas contaminações por bactérias patogênicas, fungos e micotoxinas reportadas na literatura.

Tabela 3 - Contaminações de alimentos para animais de companhia por bactérias patogênicas, fungos e micotoxinas reportadas na literatura

País de coleta	Tipo de alimento	Nº de amostra	Animal	Contaminantes		Referência
				Agente e/ou toxina	Positivos (%)	
Bactérias						
Reino Unido	Alimento seco	-	Cães	<i>Salmonella</i> spp.	(100)	SCHOTTE et al. (2007)
Canadá	Alimento cru	25	Cães	<i>Clostridium perfringens</i> <i>S. aureus</i> <i>E. coli</i>	5/25 (20) 1/25 (4) 15/25 (64)	WEESE et al. (2005)
Canadá	Carne crua para ração	112	Cães	<i>Salmonella</i> spp.	50/112 (44,6)	CHENGAPPA et al. (1993)
Canadá	Dieta crua comercial	25	Cães	<i>Salmonella</i> spp.	5/25 (20)	FINLEY (2007)
Estados Unidos	Dieta crua comercial	21	Cães	<i>Salmonella</i> spp.	10/21 (48)	STROHMEYER et al. (2004)
Brasil	Alimento seco para cães	10	Cães	<i>B. cereus</i> , <i>E.coli</i> <i>Clostridium</i> spp.	1/10 (10)	MIOTTO et al. (2010)
Brasil	Farinha de ossos e carne Ração final	23	Cães	<i>Salmonella</i> spp.	21/23 (90) (farinhas) 9/23 (37) (ração)	SANTOS et al. (2000)
Brasil	Farinha de ossos	-	Cães	<i>Salmonella</i> spp.	(96,67)	VELDMAN et al. (1995)

	Ração farelada	-	Aves	<i>Salmonella</i> spp.	(21)	BOSQUIROLI (1996)
<i>Fungos</i>						
Brasil	Milho para ração	90	Produção	<i>Aspergillus flavus</i>	78/90 (87 %)	ASEVEDO et al. (1994)
Brasil	Produtos vegetais e rações	-	Frangos de corte	<i>Aspergillus</i> spp. <i>Penicillium</i> spp. <i>Fusarium</i> spp.	(41) (39) (14,7)	ROSA (2002)
Brasil	Milho	130	Produção e companhia	<i>Fusarium</i> spp. <i>Penicillium</i> spp. <i>Aspergillus</i> spp.	(84) (55) (41)	POZZI et al. (1995)
Brasil	Alimento completo	54	Cães (34) Gatos (20)	<i>Aspergillus</i> spp. <i>Eurotium</i> spp. <i>Penicillium</i> spp. <i>Fusarium</i> spp.	30/54 (55,6) 28/54 (51,8) 24/54 (44,4) 18/54 (33,3)	COPETTI (2005)
Brasil	Alimento completo	36	Pássaros	<i>Aspergillus</i> spp. <i>Cladosporium</i> spp. <i>Mucor</i> spp. <i>Penicillium</i> spp. <i>Rhizopus</i> spp. <i>Fusarium</i> spp.	17/36 (47,2) 14/36 (38,9) 10/36 (27,8) 8/36 (22,2) 5/36 (13,9) 2/36 (5,6)	SIMÃO et al. (2010)
Reino Unido	Alimento completo	10	Cães (5) Gatos (5)	<i>Penicillium</i> <i>Eurotium</i> <i>Aspergillus</i>	10/10 (100)	SCUDAMORE et al. (1997)
Argentina	Alimento completo	21	Cães (12) Gatos (9)	<i>Aspergillus</i> spp. <i>Rhizopus</i> spp. <i>Mucor</i> spp.	13/21(62) 10/21(48) 8/21 (38)	BUENO et al. (2001)

País de coleta	Tipo de alimento	N° de amostra	Animal	Contaminantes		Referência
				Agente e/ou toxina	Positivos (%)	
<i>Fungos</i>						
Portugal	Alimento completo	60	Cães (20) Gatos (20)	<i>Aspergillus</i> spp. <i>Penicillium</i> spp.	35/60 (58,3) 23/60 (38,3)	MARTINS et al. (2003)
Brasil	Alimento completo	-	Pássaros (20) Cães	<i>Mucor</i> spp. <i>Aspergillus</i> , <i>Penicillium</i> e <i>Fusarium</i>	22/60 (38) (65-89)	CAMPOS et al. (2008)
<i>Micotoxinas</i>						
Reino Unido	Alimento completo	100	Cães (35), gatos (35) Pássaros (30)	OTA (1-7 µg/kg) AFB1 (2.1-370 µg/kg)	10/100 (10) 30/100 (30)	SCUDAMORE et al. (1997)
Brasil	Alimento completo	100	Cães (45) Gatos (25) Pássaros (30)	AFLs (19, 16 e 110 µg/kg)	12/100 (12)	MAIA; SIQUEIRA (2002)
Brasil	Alimento completo	123	Cães (46), Cavalos (26), Gatos (19), Hamster (6), Pássaro (19), Peixes (3), coelho (3), tartaruga (1)	AFLs (50 µg/kg) ZON	6/123 (4.9) 19/123 (15.5)	SCUSSEL et al. (2006)
Brasil	Alimento completo	36	Pássaros	AFLs (1.2 A 45.6 µg/kg) ZON (7.0-299.2 µg/kg)	30/36 (83,3)	SIMÃO et al., (2010)
Brasil	Alimento completo	611	Cães	AFLs (1.500 µg/kg) FBs (1.150 µg/kg)	1123/611 (20) 415/611 (68)	MALLMANN et al. (2010)

				ZEA (116.000 µg/kg)	294/611 (48)	
				DON (42.000 µg/kg)	92/611 (15)	
Brasil	Alimento completo	182	Cães, gatos, coelhos	FBs	15/182 (8,2)	MANFIO et al. (2010)
				(1.010-41.100 µg/kg)		
Portugal	Alimento completo	60	Cães (20)	OTA (2.0–3.6 µg/kg)	5/60 (9)	MARTINS et al. (2003)
			Gatos (20)	FB1 (12–24 µg/kg)	3/60 (5)	
			Pássaros (20)	DON (100–130 µg/kg)	3/60 (5)	
México	Alimento completo	35	Cães (19)	AFB ₁ (Gatos: 46,1, 30,8 e 22,2 µg/kg; Cães: 39,7 e 27,0 µg/kg)	30/35 (86)	SHARMA; MÁRQUEZ (2001)
			Gatos (16)			
Estados Unidos	Sementes	142	Pássaros silvestres	AFLs (100 µg/kg)	25/142 (17)	HENKE et al. (2001)
Estados Unidos	Milho em grãos	231	Produção e companhia	DON	40/231 (17)	WHITLOW; HAGLER (2002)
				FBs	86/231 (37)	
				ZON	26/231 (11)	
				AFLs	14/231 (9)	
				T2	13/231 (6)	
Brasil	Milho em grãos	24	Animais de companhia	AFLs (5,34-41,74 µg/kg)	10/24 (41,66)	CRUZ (2010)
				FBs (156-2.489 µg/kg)	20/24 (83,33)	

Fonte: adaptado Scussel et al. (2011) e Boermans e Leung (2007).

1.4.3 Aminas bioativas

As aminas bioativas têm sido descritas como naturalmente presentes nos alimentos *in natura*. Em alimentos processados para humanos via fermentação/maturação, tais como queijos, vinhos, cerveja e embutidos cárneos, a presença destes compostos tem sido descrita principalmente como resultado de ação das enzimas de micro-organismos sobre aminoácidos específicos (LATORRE-MORATALLA et al., 2007; ÖNAL, 2007). Sobre presença de aminas bioativas em alimentos para animais de companhia ainda não há muitos relatos na literatura. O único trabalho com análise de aminas bioativas em alimentos para animais foi relatado por Glória e colaboradores (2010), na qual analisaram 10 amostras de alimentos industrializados completos para cães adultos e filhotes. O nível total de aminas foi significativamente alto em alimentos para adultos se comparado com filhotes (182,0 e 105,0 mg/kg respectivamente). A cadaverina foi a amina mais encontrada em ambos os alimentos (26,3 e 24,3% respectivamente). Em adultos, a cadaverina foi seguida pela tiramina (24,9%), putrescina (19,7%) e espermidina (12,3%), enquanto em alimentos para filhotes, foi seguida pela espermidina (22,6%), tiramina (16,8%) e putrescina (16,5%).

Altas concentrações de aminas bioativas em alimentos podem ser atribuídas ao crescimento de micro-organismos ou, ao estabelecimento de processo de deterioração (LIMA; GLORIA, 1999). As condições de processamento e adoção de boas práticas de fabricação podem influenciar consideravelmente nos valores destes compostos reduzindo sua formação (GIROTO et al., 2010).

Os problemas coma contaminação por aminas bioativas em alimentos para animais de companhia deve ser considerado, aumentando a triagem de ingredientes e matéria prima utilizados na produção de alimento animal, como também maiores controles de qualidade durante o processamento e armazenamento dos alimentos (SCUSSEL et al., 2011).

1.5 Legislações para contaminantes biológicos e metabólitos em alimentos para animais de companhia

A regulamentação básica para a inspeção e a fiscalização obrigatórias dos produtos destinados à alimentação animal está prevista no Decreto n° 6.296 de 11/12/2007 (BRASIL, 2007b). O Decreto é regulamentado por meio de Instruções Normativas que vêm sendo

atualizadas periodicamente. A ausência de critérios e normas técnicas para contaminantes biológicos de alimentos industrializados para cães e gatos, compromete a segurança desses alimentos, sem exigência de padronização da qualidade entre as indústrias produtoras. Na maioria dos países, o alimento para animais de companhia não apresenta regulamentação específica para este tipo de produto.

1.5.1 Sujidades biológicas leves

Não há legislação específica para o cumprimento dos parâmetros microscópicos e presença de sujidades biológicas leves em alimentos destinados a animais de companhia. As sujidades biológicas leves identificadas em alimentos para cães (como fragmentos de insetos e ácaros) são consideradas prejudiciais à saúde humana (e indiretamente, risco à saúde animal) pelo fato de serem considerados importantes vetores mecânicos de contaminantes alimentares (fungos, vírus, bactérias). A omissão no controle sanitário do processamento e armazenamento desses alimentos reforça a preocupação dos cuidados que devem ser realizados quanto à aquisição da matéria prima, produção e armazenagem desses alimentos industrializados. Para que se previnam essas contaminações, é necessário manter o controle higiênico-sanitário em todas as etapas de produção, armazenamento e distribuição do alimento, conforme estabelecido na Instrução Normativa nº 4, de 23/02/2007 (BRASIL, 2007a), que estabelece as condições higiênico-sanitárias e de boas práticas de fabricação para estabelecimentos fabricantes de produtos destinados à alimentação animal.

1.5.2 Contaminantes microbiológicos

A ausência de padrões microbiológicos para alimentos para cães e gatos dificulta a análise sobre o possível risco que os contaminantes biológicos possam representar à saúde dos animais de companhia e humanos, já que muitos patógenos são considerados agentes zoonóticos. São seguidos alguns manuais e normas que limitam a quantidade de contaminantes que podem estar presentes. Na Tabela 4 estão os limites toleráveis, para alguns micro-organismos, estabelecidos para animais de produção previstos no manual de normas e padrões de nutrição e alimentação animal (MAPA, 2000), assim como limites para alimentos destinados a animais de companhia, de acordo com o Manual PIQPET (ABINPET, 2008).

Tabela 4 - Limites para contaminantes microbiológicos segundo normas microbiológicas do MAPA e manual ABINPET

Micro-organismo	Animais de produção (MAPA, 2000) ^a			Animais de companhia (ABINPET, 2008) ^b		
	Adequado	Aceitável	Inaceitável	Adequado	Aceitável	Inaceitável
Contagem total de mesófilos/g	< 10 ⁵	10 ⁵ - 10 ⁷	> 10 ⁸	NI	NI	NI
Enterobactérias/g	< 10	10 - 10 ⁴	> 10 ⁵	< 10	10 - 10 ³	> 10 ⁴
<i>E. coli</i> em 25g	Ausente	Presente	Presente	Ausente	Ausente	Presente
Coliformes fecais	NI	NI	NI	< 10	10 - 10 ³	> 10 ⁴
<i>Salmonella</i> em 25g	Ausente	Ausente	Presente	Ausente	Ausente	Presente
<i>Campylobacter jejuni</i> em 25g	NI	NI	NI	Ausente	Ausente	Presente
<i>Bacillus cereus</i>	NI	NI	NI	< 10	10 - 10 ⁴	> 10 ⁵
<i>Staphylococcus aureus</i>	NI	NI	NI	< 10	10 - 10 ³	> 10 ⁴
Fungos e leveduras/g	< 10	10 ³ - 10 ⁴	> 10 ⁵	< 10	10 - 10 ³	> 10 ⁴
<i>Clostridium</i> sulfito redutor	NI	NI	NI	< 10	10 - 10 ⁴	> 10 ⁵

Fonte: adaptado ^aMAPA (2000) e ^bABINPET (2008)

NI: não informado

Cabe ressaltar que na ausência de padrões estabelecidos por órgãos reguladores, o fabricante é responsável por implementar, validar, verificar e rever periodicamente o seu programa de auto controle, garantindo a segurança do alimento animal.

1.5.3 Micotoxinas

A legislação brasileira estipula concentração máxima permitida somente para AFLs, tanto na matéria prima utilizada na produção de alimento animal quanto no produto final. Para alimentos de consumo animal, ingredientes e rações, o MAPA aprovou a Portaria n° 07 do MAPA (BRASIL, 1988) que define como limite máximo permitido de AFLs em 50 µg/kg. Não há regulamentação para limites máximos permitidos para micotoxinas em alimentos para animais de companhia, somente para animais de produção. No entanto, em muitos casos, o controle de qualidade das empresas pode ultrapassar o requisito mínimo regulamentar para garantir a segurança e eficácia de produtos para cães e gatos. Na Tabela 5, estão descritos os limites máximos permitidos de micotoxinas em alimentos para animais de companhia segundo o Manual do Programa Integrado de Qualidade Pet (ABINPET, 2008).

Tabela 5 - Limites máximos de micotoxinas em alimentos para animais de companhia

Micotoxinas	Limite máximo permitido (µg/kg)^a
Aflatoxinas (AFB ₁ +AFB ₂ +AFG ₁ +AFG ₂)	20
Aflatoxina B ₁	10
Ocratoxina A	50
Fumonissina (B ₁ +B ₂)	5000
Zearalenona	200
DON (Vomitoxina)	1000
Citrinina	500
Nivalenol	100
T ₂	100

^a produto acabado; Fonte: ABINPET (2008)

A Tabela 6 apresenta limites permitidos de micotoxinas em produtos para alimentação animal baseados em legislações de vários países e grupos econômicos (Mercosul e União Européia).

Tabela 6 - Limites máximos permitidos de micotoxinas em alguns países de acordo com o produto utilizado na alimentação animal

País	Produto	Micotoxina	Limite (µg/Kg)
Brasil	Matérias primas e rações	AFB ₁ +AFB ₂ +AFG ₁ +AFG ₂	50
Canadá	Rações	AFB ₁ +AFB ₂ +AFG ₁ +AFG ₂	20
	Rações para gado e aves	Deoxinivalenol	5000
		Toxina T-2	100
	Rações para porcos, novilhas e animais e lactação	Deoxinivalenol	1000
		Toxina T-2	25
Chile	Rações	AFB ₁	20
		AFB ₁ +AFB ₂ +AFG ₁ +AFG ₂	50
México	Cereais para bovinos e rações de engorda para suínos	AFB ₁ +AFB ₂ +AFG ₁ +AFG ₂	200
E.U.A	Ração final - suínos	AFB ₁ +AFB ₂ +AFG ₁ +AFG ₂	200
	Rações de crescimento - aves e suínos	AFB ₁ +AFB ₂ +AFG ₁ +AFG ₂	20
		ZON	2
Áustria	Rações para porcos	DON	500
	Rações para gado de corte, poedeiras e matrizes	DON	1000
	Aves para corte	ZON	1500
	Rações para porcas matrizes	ZON	50
Suécia	Ingredientes para ração	AFB ₁	50
	Ingredientes para ração para gado leiteiro	AFM ₁	10
	Grãos de cereais e forragens como ingrediente para ração de gado leiteiro	AFB ₁	1
	Rações misturadas (exceto forragens) para gado	AFB ₁	3

	leiteiro		
	Rações completas	AFB ₁	10
	Rações completas para gado de engorda, ovinos, caprinos, exceto gado leiteiro e animais jovens	AFB ₁	50
	Rações completas para porcos e aves, exceto animais jovens	AFB ₁	20
	Rações completas para gado leiteiro, incluindo forragens	AFB ₁	1,5
	Rações completas para aves	OTA	200
	Rações completas para porcos	OTA	100
União	Matéria prima para rações	AFB ₁	50
Européia	Ração pronta	AFB ₁	10
	Rações completas para suínos e aves	AFB ₁	20
	Rações completas para gado de engorda, ovinos, caprinos, exceto animais jovens	AFB ₁	50
	Rações completas para novilhos e cordeiros	AFB ₁	10
China	Ração para frangos	AFB ₁	10
	Ração para poedeiras e suínos de engorda	AFB ₁	20
	Milho, farelo de amendoim e outros resíduos de amendoim	AFB ₁	50

Fonte: adaptado FAO (2006)

A legislação brasileira vigente não abrange um número significativo de micotoxinas e produtos regulamentados. Além disso, o Brasil como grande produtor de grãos, cereais e derivados, deveria ser mais rigoroso quanto aos limites tolerados de contaminação para AFLs e poderia estabelecer limites residuais para outras micotoxinas, com a finalidade de garantir maior qualidade aos produtos e maior segurança para os consumidores. Programas de monitoramento dos níveis de contaminação de alimentos por micotoxinas são essenciais para estabelecer prioridades em ações de órgãos reguladores (SCUSSEL, 2002).

1.5.4 Aminas bioativas

Não há regulamentação de aminas bioativas em alimentos para animais. Alguns países têm regulamentado a quantidade máxima de histamina em produtos alimentícios para humanos. Nos EUA foi estabelecido nível de tolerância de 100 mg/kg em algumas espécies de peixes (FDA, 1996). O nível de histamina também é restrito na União Européia - UE (100 mg/Kg), África do Sul (100 mg/Kg), e Austrália (200 mg/Kg) (CE, 2005; ÁFRICA DO SUL, 2001; AUSTRÁLIA, 2001). No Brasil, o Ministério da Agricultura, através da Portaria nº185, 13/05/1997 (BRASIL, 1997), também estabelece o limite de 100 mg/Kg de histamina no músculo de peixes das espécies pertencentes as famílias *Scombridae*, *Scomberesocidae*, *Clupeidae*, *Coryphaenidae* e *Pomatomidae* para alimentação humana. Na Europa, os níveis aceitáveis para o consumo humano de tiramina e feniletilamina em alimentos fermentados são 100-800 e 30 mg/kg, respectivamente (CE, 2005). Em relação à ingestão de produtos contendo estes compostos, diversos autores relatam que o consumo de alimentos contendo níveis de 1.000 mg/Kg destas aminas biogênicas pode provocar efeitos psicoativos e vasoativos em função do tipo de amina presente (LIMA; GLÓRIA, 1999; KOMPRDA et al., 2004).

REFERÊNCIAS

AH-SEO, J.; WON LEE, Y. Natural occurrence of the C series of fumonisins in moldy corn. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 65, p. 1331-1334, 1999.

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

ABINPET. Associação Brasileira da Indústria de Produtos para Animais de Estimação. **Manual do programa integrado de qualidade pet - PIQPET**. 2.ed. São Paulo, 2008. 238p.

ABINPET. Associação Brasileira da Indústria de Produtos para Animais de Estimação. São Paulo, SP, 2013. Disponível em: <<http://www.ABINPET.org.br>> Acesso em: 15 ago. 2013.

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

BENNET, R.W.; LANCETTE, G.A. *Staphylococcus aureus*. In: **Bacteriological Analytical Manual Online**, 2001. Disponível em:<<http://www.cfsan.fda.gov>>. Acesso em fevereiro 2011.

BOERMANS, H.J.; LEUNG, M.C.K. Mycotoxins and the petfoodindustry: toxicologicalevidence and riskassessment. **International Journal of Food Microbiology**, v.119, p.95-102, 2007.

BOESE, J.L.; CHICOWICZ, S.M. Extraneous materials: Isolation. In: Association of Official Analytical Chemists. **Official methods of analysis**. 16ed. Arlington, V.A. AOAC, v. 1, Chapter 16, p:1-47, 1995.

BOSQUIROLI, S. L. **Estudo epidemiológico sobre a ocorrência de salmonelas em uma empresa de integração de frangos de corte**. 1996.58f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – UNICAMP– FEA, Campinas, 1996.

BRASIL. MAPA. **Portaria MA/SNAD/SFA nº7 de 9 de Nov. de 1988.** D.O.U., Brasília, 9 novembro de 1988. Disponível em: <<http://sistemasweb.agricultura.gov.br>>. Acesso em: 10 jul. 2011.

BRASIL. MAPA. **Portaria nº 185 de 13 de maio de 1997.** Regulamento técnico de identidade e qualidade de peixe fresco (inteiro e eviscerado); considerando a necessidade de padronizar os processos de elaboração dos produtos de origem animal. Ministério da Agricultura. Brasília, DF. MA, 1997. Disponível em: <<http://sistemasweb.agricultura.gov.br>>. Acesso em: 10 jul. 2011.

BRASIL. MAPA. **Normas e padrões de nutrição e alimentação animal.** Brasília: MA/SARC/DFPA. p. 12, 2000. Disponível em: <<http://sistemasweb.agricultura.gov.br>>. Acesso em: 09 jul. 2011.

BRASIL. MAPA. **Decreto nº4.680de 24 de abril de 2003.**D.O.U., Brasília, 28 de abril de 2003a. Disponível em: <http://sistemasweb.agricultura.gov.br>. Acesso em: 10 jul. 2011.

BRASIL. Ministério da Justiça.**Portaria nº2.658de 22 de dezembro de 2003.** D.O.U., Brasília, 26 de dezembro de 2003b. Disponível em: <http://sistemasweb.agricultura.gov.br>. Acesso em: 10 jul. 2011.

BRASIL. MAPA. **Instrução Normativa nº 62, de 26 de agosto de 2003.** D.O.U., Brasília, 26 de agosto de 2003c. Disponível em: <http://sistemasweb.agricultura.gov.br>. Acesso em: 10 jul. 2011.

BRASIL. MAPA. **Instrução Normativa nº 4, de 23 de fevereiro de 2007a.**D.O.U., Brasília, 24 de fevereiro de 2007. Disponível em: <http://sistemasweb.agricultura.gov.br>. Acesso em: 10 jul. 2011.

BRASIL. MAPA. **Decreto nº 6296, de 11 de dezembro de 2007b.** D.O.U., Brasília, 12 de dezembro de 2007. Disponível em: <http://sistemasweb.agricultura.gov.br>. Acesso em: 10 jul. 2011.

BRASIL. MAPA. **Instrução Normativa nº 15, de 26 de maio de 2009a.** D.O.U., Brasília, 28 de maio de 2009. Disponível em: <<http://sistemasweb.agricultura.gov.br>>. Acesso em: 10 jul. 2011.

BRASIL. MAPA. **Instrução Normativa nº 30, de 05 de agosto de 2009b.** D.O.U., Brasília, 07 de agosto de 2009. Disponível em: <<http://sistemasweb.agricultura.gov.br>>. Acesso em: 10 jul. 2011.

BRAZIS, P.; SERRA, M.; SELLÉS, A.; DETHIOUX, F.; BIOUSGE, V.; PUIGDEMONT, A. Evaluation of storage mite contamination of commercial dry dog food. **Vet Dermatol.**, v.19, n.4, 209-214, 2008.

BRAZIS, P. The role of storage mites in canine atopic dermatitis. **Veterinary Focus**, v. 21, n.3, p.42-46, 2011.

BRINK, B.T. et al. Occurrence and formation of biologically active amines in foods. **International Journal of Food Microbiology**, v. 11, p. 73-84, 1990.

BRITO, C. et al. Digestibility and palatability of dog foods containing different moisture levels, and the inclusion of a mould inhibitor. **Animal Feed Science and Technology**, v.159, p.150–155, 2010.

BRUNELLI, S.R.A.; PINTO, L.F.; RIBEIRO, M.C. Casuística Ambulatorial do Serviço de Homeopatia Veterinária do Instituto Municipal de Medicina Veterinária Jorge Vaitsman. **Homeopatia Brasileira**, v.4, n.1, p.507-513, 1998.

BUENO, D.J.; SILVA, J.O.; OLIVER, G. Mycoflora in commercial pet foods. **Journal of food protection**. v. 64, n. 5, p. 741-743, 2001.

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

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

CASE, L.P., DARISTOTLE, L., HAYEK, M.G., RAASCH, M.F. **Canine and Feline Nutrition**. 3th ed., St. Louis, MO, 542 pp, 2011.

CHAMBERS, J., THIND, B.B., DUNN, J.A., PEARSON, D.J. The importance of storage mite allergens in occupational and domestic environments. **In...** Proceedings of the 3rd International Conference on Urban Pest. Robinson, W.H., Rettich, F. and Rambo, G.W. (editors),

1999.

CHENGAPPA, M.M., et al. Prevalence of *Salmonella* in raw meat used in diets of racing greyhounds. **J Vet Diagn Invest**, v.5, 372–377, 1993.

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

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

COSTA, D.; POETA, P.; SAENZ, Y. Prevalence of antimicrobial resistance and resistance genes in faecal *Escherichia coli* isolates recovered from healthy pets. **Vet. Microbiol.**, v.127, p.97-105, 2008.

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

CRANE, S.W.; GRIFFIN, R.W.; MESSENT, P.R. Introduction to commercial pet foods, in Hand, M.S.; Thatcher, C.D.; Remillard, R.L., et al (eds): **Small Animal Clinical Nutrition** (ed 4). Marceline, MO, Walsworth Publishing Company, p. 111-126, 2000.

CRUZ, J.V.S. **Ocorrência de aflatoxinas e fumonisinas em produtos à base de milho e milho utilizado como ingrediente de ração para animais de companhia, comercializados na região de Pirassununga, Estado de São Paulo.** 74f. 2010. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, Pirassununga.

DE NARDI, A.B. et al. Prevalência de neoplasias e modalidades de tratamentos em cães, atendidos no hospital veterinário da Universidade Federal do Paraná. **Archives of Veterinary Science**, v.7, n.2, p.1526, 2002.

DE SOUZA KOERICH, K.; SIMAO, V.; SCUSSEL, V.M. Evaluation of dogs and cats pathologies and their relation to mycotoxins. In: ANNUAL WORLD SMALL ANIMAL VETERINARY

ASSOCIATION CONGRESS, 35, 2010, Geneve. **Proceedings...**
Geneve: WSAVA, 2010. p.100.

DE SOUZA KOERICH, K., SCUSSEL, V.M., 2012. Occurrence of dogs and cats diseases records in the veterinary clinics routine in South Brazil and its relationship to mycotoxins. **International Journal of Applied Science and Technology**, v.2, p.129-134, 2012.

DE SOUZA KOERICH, K., SCUSSEL, V.M. 2013. Dogs and birds dryfood fumonisin FB₁ and FB₂ contamination and their relation to ingredients and packaging characteristics. **Research Journal of Biological Sciences**, n.8, 22-29, 2013.

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

EEROLA, S.; MAIJALA, R. Biogenic amines: overview of food safety. In: MORGAN, D. M. L.; HIRVI, T.; DANDRIFOSSE, G.; DELOYER, P.; WHITE, A. (Eds.). **Health implications of dietary amines: review of current status**. Belgium: s.n., 2004.

ERGOMIX. Comunidade de negócios internacionais relacionados com a produção animal. Micotoxicoses. Disponível em: <
<http://www.engormix.com.br>>. Acesso em: 15 outubro 2011.

FAO. **Relatório Final**. Conferencia Regional FAO/OMS sobre inocuidade dos alimentos em África. 3-6 de out. de 2005. Harare, Zimbabwe. ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS PARA AGRICULTURA E ALIMENTAÇÃO. Roma, FAO, 2006.

FERREIRA, W.L.B. Controle integrado de roedores no armazenamento de grãos e alimentos. In: Manejo integrado de pragas pós-colheita. Maringá: **Grãos Brasil**, v.1, p. 97-132, 2011.

FINLEY, R.L. The risk of salmonellae shedding by dogs fed *Salmonella*-contaminated commercial raw food diets. **Can Vet J.**, v.48, n.1, p. 69-75, 2007.

FLECHTMANN, C.H.W; ZEM, A.C. **Ácaros de produtos armazenados**. In: Lorini, Miike, Scussel, Armazenagem de Grãos. Cap.

7, Ed. Biogeneziz, Campinas SP, p.807-856, 2002.

FRANCO, B.D.G.M, LANDGRAF, M., DESTRO, M.T. (Eds.).
Microbiologia dos Alimentos. Atheneu, São Paulo, p. 27-171, 2005.

FRANÇA, J., SAAD, F.M.O.B., SAAD, C.E.P., SILVA, R.C., DOS REIS, J.S. Avaliação de ingredientes convencionais e alternativos em rações de cães e gatos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.40, p.222-231, 2011.

GAMA, N.M.S.Q. **Qualidade química e bacteriológica da água utilizada em granjas produtoras de ovos**. 2005.87f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2005.

GIROTO, J. M. et al. Aminas biogênicas em embutidos cárneos e em outros alimentos. **Braz. J. Food Technol.**, Campinas, v. 13, n. 1, p. 1-10, 2010.

GLORIA, E.M.A.; GOES, F.C.S.; SILVA, T.M. Profile and levels of bioactive amines in adult and puppy dog food. In: Scussel, V.M.; Nones, J.; De Souza Koerich, K.; Santana, F.C. de O.; Beber, M.; Neves, L.S.D'e.; Manfio, D. INTERNATIONAL CONFERENCE ON PET FOOD QUALITY & SAFETY & 14TH NATIONAL MYCOTOXIN MEETING, 14, 2010, Florianópolis. **Abstract Book...** Florianópolis: PET FOOD SAFE, 2010. p.52.

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

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

GOMES, A.M. et al. Genotipificação de *Clostridium perfringens* isolados de frangos de corte através da PCR múltipla. **Ciência Rural**, p.1943-1947, v.38, n.7, 2008.

GREDILHA, R.; LIMA, A.F. First record of *Necrobia rufipes* associated with pet food in Brazil (De Geer, 1775) (Coleoptera; Cleridae). **Brazilian Journal of Biology**, v. 67, p. 187, 2007.

HALÁSZ, A. et al. Biogenic amines and their production by microorganisms in food. **Trends in Food Science and Technology**, v. 5, p. 42-49, 1994.

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

HINTON, M.; MEAD, G.C. Bacterial pathogens in animal feed and their control. **World's Poultry Science Journal**, London, v. 48, n. 1, p. 72-73, 1992.

HUMPHREY, T. *Salmonella*, stress responses and food safety. **Nat. Rev. Microbiol.**, v.2, p.504-509, 2004.

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

JAY, J.M. **Microbiologia de alimentos**. Porto Alegre, Ed. Artmed, 2005, 712p.

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

KOMPRDA, T. et al. Effect of starter culture, spice mix and storage time and temperature on biogenic amine content of dry fermented sausages. **Meat Science**, Amsterdam, v. 67, n. 4, p. 607-616, 2004.

KRAUSE, G.; ZIMMERMANN, S.; BEUTIN, L. Investigation of domestic animals and pets as a reservoir for intimin-(eae) gene positive *Escherichia coli* types. **Vet. Microbiol.**, v.106, p.87-95, 2005.

LATORRE-MORATALLA, M. L.; BOVER-CID, S.; AYMERICH, T.; MARCOS, B.; VIDAL-CAROU, M. C.; GARRIGA, M. Aminogenesis control in fermented sausages manufactured with pressurized meat batter and starter culture. **Meat Science**, Amsterdam, v. 75, n. 3, p. 460-469, 2007.

LAZZARI, F.A. **Umidade, fungos e micotoxinas na qualidade de**

sementes, grãos, rações.Ed. do Autor. 2^a ed., Curitiba-PR. 134 p, 1997.

LEUNG, M. C. K.; DIAZ-LLANO, G.; SMITH, T. K. Mycotoxins in pet food: a review on worldwide prevalence and preventative strategies. **J. Agric. Food Chem.**, v.54, p.9.623-9.635, 2006.

LI, Y.C. et al. The individual and combined effects of fumonisin B₁ and monilliformin on performance and selected immune parameters in turkey poult. **Poult. Science**, v. 79, p. 871-878, 2000.

LIMA, A.S.; GLÓRIA, M.B.A. Aminas bioativas em alimentos. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 33, n. 1, p. 70-79, 1999.

LINDSTROM, M., KIVINIEMI, K., KORKEALA, H. Hazard and control of group II (nonproteolytic) *Clostridium botulinum* in modern food processing. **International Journal of Food Microbiology** 108: 92-104, 2006.

LORINI, I. **Controle integrado de pragas de grãos armazenados.** Passo Fundo, EMBRAPA-CNPT, 52p (EMBRAPA-CNPT. Documentos, 48), 1998.

LORINI, I. **Descrição, biologia e danos das principais pragas de grãos armazenados.** In: Lorini, Miike, Scussel, Armazenagem de Grãos. Cap. 7, Ed. Biogeneziz, Campinas SP, p.381-397, 2002.

MACIOROWSKI, K.G., HERRERA, P., JONES, F.T., PILLAI, S.D., RICKE, S.C. Effects on poultry and livestock of feed contamination with bacteria and fungi. **Animal Feed Science and Technology**, 133,109–136, 2007.

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

MALLMANN, A.O. et al. Mycotoxin occurrence and co-occurrence in dog feed. In: Scussel, V.M.; Nones, J.; De Souza Koerich, K.; Santana, F.C. de O.; Beber, M.; Neves, L.S.D'e.; Manfio, D INTERNATIONAL CONFERENCE ON PET FOOD QUALITY & SAFETY & 14TH NATIONAL MYCOTOXIN MEETING, 14, 2010, Florianópolis. **Abstract Book...** Florianópolis: PET FOOD SAFE, 2010. p.68.

MALLMANN, C.A. et al. Fumonisin B₁ levels in cereals and feeds from Southern Brazil. **Arq. Inst. Biol.**, v. 68, p. 41-45, 2001.

MANFIO, D. et al. Evaluation of mycotoxins in food for dogs, cats, rabbits and fish: 2007- 2010. In: Scussel, V.M.; Nones, J.; De Souza Koerich, K.; Santana, F.C. de O.; Beber, M.; Neves, L.S.D'e.; Manfio, D. INTERNATIONAL CONFERENCE ON PET FOOD QUALITY & SAFETY & 14TH NATIONAL MYCOTOXIN MEETING, 14, 2010, Florianópolis. **Abstract Book...** Florianópolis: PET FOOD SAFE, 2010. p.52.

MARTINS, C. et al. Mixoma de vulva em cão. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v. 50, n.1, p. 13, 2000.

MARTINS, M.L.; MARTINS, H.M.; BERNARDO, F. Fungal flora and mycotoxins detection in commercial pet food. **Rev. Port. Ciênc. Vet.** v.98, p.179-183,2003.

MELLO, R.P.; GREDILHA, R.; GUIMARÃES-NETO, E.G. Dados preliminares sobre sinantropia de califorídeos (Diptera: Calliphoridae) no município de Paracambi-RJ. **Revista Universidade Rural**. Série Ciências da Vida, UFRRJ Seropédica-RJ, v. 24, n. 2, p. 97-101, 2004.

MIOTTO, M. et al. Preliminary evaluation of microbiological quality of food for dogs. In: Scussel, V.M.; Nones, J.; De Souza Koerich, K.; Santana, F.C. de O.; Beber, M.; Neves, L.S.D'e.; Manfio, D. INTERNATIONAL CONFERENCE ON PET FOOD QUALITY & SAFETY & 14TH NATIONAL MYCOTOXIN MEETING, 14, 2010, Florianópolis. **Abstract Book...** Florianópolis: PET FOOD SAFE, 2010. p.52.

MOSS, M.O. Recent studies of mycotoxins. **J. Applied Microbiol.**, v. 84, p. 62-76, 1998.

MUZOLON, P. **Micotoxicoses em cães**. 2008. 93 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

NEWMAN, S.J. et al. Aflatoxicosis in 9 dogs after exposure to contaminated commercial dog food. **J. Vet. Diag. Invest.**, v.19, p.168-

175, 2007.

NRC. NACIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrient requirements of dogs and cats.** Washington; National Academies, 2006. 398 p.

OLIVEIRA, M.S. et al. Incidência de aflatoxinas, desoxinivalenol e zearalenona em produtos comercializados em cidades de Minas Gerais no período de 1998-2000. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, v.61, n.1, p. 1-6, 2002.

ÖNAL, A. A review: current analytical methods for the determination of biogenic amines in foods. **Food Chemistry**, v.103, p.1475-1486, 2007.

ORSI, R.B. et al. Mycoflora and occurrence of fumonisin in freshly harvested and stored hybrid. **J. Stored Prod. Res.**, v. 36, p. 75-87, 2000.

OSBORNE, B.G. Mycotoxins and the cereal industry – a review. **Journal of Food Technology**, v.17, p.1-9, 1982.

PAULA, C.J.S. **Análise de cepas de *Escherichia coli* Shiga toxigênica (STEC) e *E. coli* patogênica extraintestinal (ExPEC) isoladas de caes diarreicos atendidos em clínica do Município de Ituverava, SP.** 2007, 96f. Tese(Mestrado em Microbiologia Agropecuária) – UNESP, Jaboticabal, 2007.

PITT, J. I., HOCKING, A. D. (Eds.), 2009. **Fungi and food spoilage.** New York, Springer, 524 pp.

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

POZZI, C.R., et al. Effects of prolonged oral administration of fumonisin B1 and aflatoxin B1 in rats. **Mycopathologia**, v.151, p.21-27, 2000.

PRICKETT, A. J. Recent surveys of post-harvest pest problems in farm and commercial grain stores in the UK. **Brighton Crop Protection Conference - Pests and Diseases**, n. 4, p. 271-280, 1992.

PRICKETT, A. J. Animal feed mills 1992, England and Wales Pest

Management. **MAFF Central Science Laboratory Report**, n. 54, 73-74, 1994.

RABSCH, W., TSCHÄPE, H., BÄUMLER, A.J. Non-typhoidal salmonellosis: emerging problems. **Microbes Infect.** v.3, p.237-247, 2001.

RADOSTITS O.M. et al. Diseases associated with *Salmonella* species, p.896-921. In: Ibid. (Eds), **Veterinary Medicine: A textbook of the Diseases of Cattle, Horses, Sheep, Pigs and Goats**. 10th ed. W.B. Saunders, Philadelphia, 2007.

RAZZAZI-FAZELI, E.; BÖHM, J.; GRAJEWSKI, J.; SZCZPANIAK, K.; KÜBBERHEISS, A.; IBEN, I. Residues of ochratoxin A in pet foods, canine and feline kidneys. **J. Animal Physiol. Nutr.**, v.85, p.212-216, 2001.

RIBEIRO M.G.; FERNANDES M.C.; PAES A.C.; SIQUEIRA A.K.; PINTO J.P.A.N.; BORGES A.S. Caracterização de sorotipos em linhagens do gênero *Salmonella* isoladas de diferentes afecções em animais domésticos. **Pesq.Vet. Bras.**, v.30 p.155-160, 2010.

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

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

SALAZAR, M.T.; SMITH, T.K.; HARRIS, A. High-performance liquid chromatographic method for determination of biogenic amines in feedstuffs, complete feeds, and animal tissues. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 1708-1712, 2000.

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 Agropecuária**, Lavras, v. 24, n. 2, p. 425-433, 2000.

SATO, Y. et al. *Salmonella* Virchow infection in an infant transmitted

by household dogs. **J. Vet. Med. Sci.**, v.62, p.767-769, 2000.

SCHOENBAUM, M.A., HALL, S.M., GLOCK, R.D., GRANT, K., JENNY, A.L., SCHIEFER, T.J., SCIGLIBAGLIO, P., WHITLOCK, R.H., 2000. An outbreak of type C botulism in 12 horses and a mule. **JAVMA** 217, 365–368.

SCHOTTE, U. et al. Salmonella Montevideo outbreak in military kennel dogs caused by contaminated commercial feed, which was only recognised through monitoring. **Vet Micro** v.119, p. 316-323, 2007.

SCHUTZE, G.E. et al. The home environment and salmonellosis in children. **Pediatrics**, v.103, E1, 1999.

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 Addit. Contam.** v.14, p.175–186, 1997.

SCUSSEL, V.M. **Atualidades em Micotoxinas e Armazenagem Qualitativa de Grãos I**, Ed VMS, Florianópolis, SC 382pp, 2000.

SCUSSEL, V.M. Fungos em Grãos Armazenados. In: LORINI I.; MIIKE, L; SCUSSEL, VM. **Armazenagem de Grãos**. Ed. Biogeneziz, Cap. 9, Campinas SP 938pp, 2002.

SCUSSEL, V.M; GIORDANO, B.; SIMAO,V.; XAVIER, J.J.M.; dos REIS, L.C. Mycotoxins em pet food analysed by LC-MS/MS. **World Mycotoxin Forum**, Cincinnati, USA. 2006.

SCUSSEL, V.M.; DE SOUZA KOERICH, K.; NONES, J. Segurança dos alimentos: principais contaminantes microbiológicos presentes em *pet food*. In: III CONGRESSO INTERNACIONAL E X SIMPÓSIO SOBRE NUTRIÇÃO DE ANIMAIS DE ESTIMAÇÃO, Campinas – SP, 2011. **Anais...CBNA**, Campinas, p. 43-58, 2011.

SHALABY, A.R. Significance of biogenic amines to food safety and human health. **Food Research International**, v. 29, n. 7, p. 675-690, 1996.

SHARMA, M.; MÁRQUEZ, C. Determination of aflatoxins in domestic pet foods (dog and cat) using immunoaffinity column and HPLC.

Animal Feed Science and Technology, v.93, p.109-114, 2001.

SILVA, C.M.G.; GLÓRIA, M.B.A. Bioactive amines in chicken breast and thigh after slaughter and during storage at 4 ± 1 °C and in chicken-based meat products. **Food Chemistry**, v. 78, p. 214-248, 2002.

SIMAO V.; SCUSSEL VM. Qualidade na produção de rações e ingredientes para pets. In: SCUSSEL V.M., DA ROCHA, M.W., LORINI, I., SABINO, M., ROSA C.A DE R., CARVAJAL, M.M. **Atualidades em Micotoxinas e Armazenagem Qualitativa de Grãos II**. Florianópolis: ABMAG; 2008.

SINGHI, S.P., SETHI, M.S., SHARMA, V.D. The occurrence of salmonellae in rodent, shrew, cockroach and ant. **International Journal of Zoonoses**, v.7, n.1, p.58-61, 1980.

SMITH, G.W. Fumonisin. In: GUPTA, R.C. **Vet. Toxicol. – Basic & Clinical Principles**. San Diego: Academic Press, p. 983-998, 2007.

SOARES, L.M.V.; FURLANI, R.P.Z. Survey of mycotoxins in wheat and wheat products sold in health food store of the city Campinas, state of Sao Paulo. **Rev. Microbiol.**, v. 27, n. 1, p. 41-44, 1996.

SONGER, J.G.; *Clostridium* enteric diseases of domestic animals. **Clin. Microbiol. Rev.**, v.9, n.2, p.216-234, 1996.

STROHMEYER, R.A., et al. Microbiological risk of feeding raw meat diets to canines. In: CONFERENCE OF RESEARCH WORKERS IN ANIMAL DISEASES, 2004, Chicago. **Program and abstracts...** Chicago: Blackwell Publishing, 2004.

TRABULSI, L.R.; KELLER, R.; GOMES, T.A.T. Typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. **Emerg. Infect. Dis.**, v.8, n.5, p.508-513, 2002.

VARGAS, C.H.; ALMEIDA, A.A. Identificação dos insetos infestantes de alimentos através da micromorfologia de seus fragmentos. **Rev. Bras. Zool.**, v. 13, n. 3, p. 737-746, 1996.

VECIANA-NOGUÉS, M.C.; MARINÉ-FONT, A.; VIDAL-CAROU, M.C. Biogenic amines as hygienic quality indicators of tuna.

Relationship with microbial counts, ATP related compounds volatile amines and organoleptic changes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, p. 2036-2041, 1997.

VELDMAN, A. et al. A survey of incidence of *Salmonella* species and enterobacteriaceae in poultry feeds and feed components. **Veterinary Record**, London, v.136, n.7, p. 169-172; 1995.

VIEIRA, C.R.W. Bacterial proliferation in foods for pets: causes and control. In: Scussel, V.M., Nones, J., de Souza Koerich, K., Santana, F.C. de O., Beber, M., Neves, L.S.D'e., Manfio, D. International Conference on pet food quality and safety & 14th National Mycotoxin Meeting, 14, 2010, Florianópolis. **Abstract Book...** Florianópolis: Pet Food Safe, 2010. p.20.

VIOTT, A. de M. Fotos patologias hepáticas e renais [mensagem pessoal]. Mensagem recebida por <alinedemarco@yahoo.com.br em 24 outubro 2011.

VOORSLUYS, T. Estratégias no combate das micotoxinas. Disponível em: < <http://www.nftalliance.com.br/estrat-gias-no-combate-das-micotoxinas>>. Acesso em: 15 outubro 2011.

WEESE, J.S.; ROUSSEAU, J.; ARROYO, L. Bacteriological evaluation of commercial canine and feline raw diets. **Can. Vet. J.**, v.46 n.6 p.513–516, 2005.

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

WITHROW, S.J. Why worry about cancer in pets? p.15 - 17. In: WITHROW S.J.; MACEWEN, E. G. (ed.), **Small Animal Clinical Oncology**. 4th ed. Saunders, Philadelphia, 2007.

ZICKER, S.C. Evaluating Pet Foods: How confident are you when you recommend a commercial pet food? **Topics in Companion Animal Medicine**, v.23, Issue 3, p.121-126, 2008.

CAPÍTULO 2

LABELS LAYOUT OF CATS AND DOGS FOOD SOLD IN BRAZIL AND THEIR NATIONAL REGULATION ADEQUACY

Trabalho publicado:

Ciência Rural (ISSN 0103-8478)

Vol.43, n.2, p.366-369, fevereiro 2013

LABELS LAYOUT OF CATS AND DOGS FOOD SOLD IN BRAZIL AND THEIR NATIONAL REGULATION ADEQUACY

ADEQUAÇÃO DOS *LAYOUTS* DE ROTULAGEM DE ALIMENTOS COMPLETOS PARA CÃES E GATOS COMERCIALIZADOS NO BRASIL QUANTO À LEGISLAÇÃO NACIONAL

Karina Koerich de Souza¹ Karina Merini Tonon¹ Vildes Maria Scussel¹

Laboratory of Mycotoxicology and Food Contaminants – LABMICO, Food Science and Technology Department, Center of Agricultural Sciences, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brazil

Abstract

Due to the increasing of the pet foods marketing and the need to establish standards for quality and registration purposes, a study was conducted to evaluate the information on the package labels of 64 dogs and cats complete dry foods commercialized in Brazil and compare them to current regulation of the sector. From the total labels analyzed, all of them (100%) presented unconformity for at least one of the items evaluated. The highest rate of non-conformity was observed in the presentation of illustrations and phrases that induced the use of the product based on the false concept of advantage or animal health security (47%), leading to the misunderstanding of the owners. The results demonstrate a deficiency of the manufacturing companies regarding the labeling adequacy to the pet food regulation, as well as indicate a lack of rigorous enforcement by the agencies.

Key words: pet food, dogs, cats, labels, regulation.

Resumo

Considerando a diversidade de tipos, composição e informações atrativas presentes nas embalagens de alimentos para cães e gatos existentes no mercado, foi realizado um estudo para avaliar as informações contidas na rotulagem de 64 alimentos completos secos para esses animais comercializados em diferentes regiões do Brasil e sua conformação com as informações obrigatórias exigidas pela legislação brasileira. Do total de 64 rótulos analisados, 100% tiveram discordância para pelo menos um dos itens avaliados. A maior frequência de não conformidades observada foi a apresentação de ilustrações e frases inadequadas que dão ideia de vantagem ou segurança (47%), induzindo

ao entendimento equivocado dos proprietários. Os resultados demonstraram deficiência das empresas fabricantes quanto ao cumprimento e em ações para adequação da rotulagem de seus produtos às normas vigentes, além de falta de fiscalização rigorosa por partes das agências.

Palavras-chave: alimentos para animais, cão, gato, rotulagem, legislação.

Introduction

A considerable increase in the marketing of pet foods has been observed in recent decades. The market-oriented products for pets, has become a very promising investment, since this niche corresponds to 80% of all products in order to meet the demands of the consumers. The great development of this market is mainly due to the large population of dogs and cats living in confinement and it is estimated that in Brazil there are 29 and 14 million dogs and cats, respectively (SIMAO & SCUSSEL, 2008; ABINPET, 2011). The Brazilian Ministry of Agriculture, Livestock and Supply (MAPA) is responsible for regulating the inspection and supervision of products intended for animal feed, standardizing the labeling information and obligations of the manufacturers of these foods (BRAZIL, 2003, 2009). While recent federal regulation may change some aspects over the next few years, an understanding of who regulates pet foods and the basic rules governing the manufacture, labeling, and distribution of pet foods as they exist today is necessary to appreciate the extensive controls that are placed on the industry.

In 2009, two Normative Instructions (NI) established by the MAPA (BRAZIL, 2009) regulated the procedures for registration of establishments and products for animal feed, its labeling and advertising, in addition to the exemption from registration of products for feeding pets. On the other hand, the Ordinance n.2658 of the Ministry of Justice and Decree n. 4680, established the right to information on food and ingredients for human and animal consumption, related to the presence of genetically modified organisms (GMO) (BRAZIL, 2003).

There is a lack of information regarding the adequacy of pet food labeling in Brazil. Only a work carried out by the same group in 2011 reported non-conformities in Brazilian foods for dogs (de SOUZA KOERICH et al., 2011). Considering the diversity of types, composition and information present in attractive packaging of pet food in the market, a study was conducted to evaluate the information in the labeling of

complete dry food for dogs and cats sold in different regions of Brazil and its adherence to regulation required by Brazilian law.

Material and Methods

Samples: collected by free access, intentional sampling in supermarkets, agricultural households, veterinary clinics and pet stores, 64 samples of complete dry food for dogs and cats packages of different brands commercialized in Brazil, from three Regions: (a) Southern: 41; (b) North: 19 and (c) Southeast: 4. Out of the total, 31, 30 and 3 packages were produced in Southeast, South and Midwest Region, respectively. In total, 48 (75%) were for dogs and 16 samples (25%) for cats, and about age, 13 (20%) intended for puppies, 44 (69%) for adult animals and 7 (11%) for seniors.

The dogs and cats dry food packages were evaluated in several aspects related to compliance with Brazilian law by the manufacturers as to their suitability. The regulation were: (a) NI n.15 of 26/05/2009 –provides the procedures for registration of establishments and products intended for animal feed, (b) NI n. 30 of 05/08/2009 - establishes criteria and procedures for the registration of products for the labeling, advertising and the exemption from registration of products intended for pet animals, (c) Decree n. 4680 of 24/04/2003- regulates the right to information about food and food ingredients intended for human consumption or feed containing, or produced from GMO, subject to compliance with other applicable standards and (d) Ordinance n. 2658 of 22/12/2003 - regulates the use of transgenic symbol mentioned in Art 2 of Decree n.4680. The consumer should be informed about the kind donor of the gene in the place reserved for the identification of ingredients. The symbol should appear in the main panel, high light and color contrast to ensure the correct visibility.

The individual analysis of each package included the items (BRAZIL, 2009a and b): correct classification of the product according to the MAPA regulation (complete and specific food); clear indication of use, species, stage and type of animal and instructions for supply or use of the product; determination of basic composition and levels of security and guarantees minimum declared the product adequately described; ingredient necessarily inscribed in the field emphasized basic composition and reported their level of inclusion and featured nutrient levels stated in the warranty; additives declaration in the basic composition of the product at the end of the list of ingredients; storage conditions and time of consumption; date of manufacture and expiry

date, being the day, month and year in Arabic numerals; batch product identification legibly, indelibly marked and visible; vitamins and trace levels declared enrichment in the field to a minimum; information of basic composition, level of assurance, statement of use, animal species and category to which they relate, how to use and care grouped together; manufacturer's information; manufacturing establishment with different plants according to the criteria for registration and identification of units with letters; official stamp of inspection; expressions "Brazilian Industry" and "Use prohibited in ruminant feed"; contain vocabulary, terminology, statements, signs, names, slogans, logos, seals, emblems, illustrations, photos, drawings or other graphical representations that can make the information untrue, inaccurate, insufficient, or that might lead consumers to mistake, error, confusion, deception or false understanding, also suggest treatment, prevention, diagnosis, alleviation, cure, pharmacological, immunological action, therapeutic activity or relationship with poisoning, infections, disorders, diseases, signs, symptoms, syndromes or anatomical data. Labels also were evaluated if the mandatory information was printed in a contrasting color to the background and font size legible and cannot be located in the folds of packaging seams or difficult to see anywhere.

Results and Discussion

Out of the 64 labels evaluated, 100% showed some non-conformity to the Regulation items accessed (Brazil, 2003a and b; Brazil 2009a and b). They were related to the product rating, the food use guarantees, composition and guarantees, also regarding to the manufacturer's information, as model of the official inspection and enforcement stamp, the binding expressions, GMO symbol and misunderstanding and/or confusion (Table 1).

Product rating: according to the MAPA regulation, labeling of 8 (12.5%) incorrectly classified the type of food, as specific food rather than complete food for dogs. For the purposes of NI n.30, a specific food product is composed of ingredients or raw materials or additives intended exclusively for feeding pets with the purpose of pleasure or reward and that is not characterized as whole food and can have properties specific.

Use guarantees: clear indication of use, species, stage and type of animal and instructions for supply or use of the product only one sample did not clearly indicate the stage to which the food was intended. Storage conditions and period of consumption – 100% of the labels

indicated storage conditions. Date of manufacture and expiry date, being the day, month and year in 11 (17%) samples did not indicate expiry date in Arabic numerals, but as period of consumption. Even, a sample indicated woforms of validity, and that they did not show the same expiration date of the product. About batch product identification, 12 (18.7%) samples didn't indicate this information.

Composition and guarantees: determination of basic composition and levels of security and guarantees minimum declared the product adequately described only 2 (3%) of the labels showed no minimum guarantees described in mg kg^{-1} or g kg^{-1} , only a percentage (%), in disagree with regulation. About the ingredient necessarily described in the field emphasized basic composition and reported their level of inclusion and featured nutrient levels stated in the warranty, 14 (21.8%) labels in scribed nutrients, but did not report the levels of security. All additives should be declared in the basic composition of the product at the end of the list of ingredients, but in 4 (6.25%) of the labels were incorrectly described in the field of enrichment. With respect to levels of assurance, 9 (14%) did not report levels of assurance in the field enrichment, even with the addition of vitamins and mineral premix base composition (product formulation) and 19 (15.6%) indicated but not quantified adding the minimum values of inclusion. In 9.4% labels, vitamins A, D and E were not guaranteed in IU kg^{-1} and vitamin B12 in $\mu\text{g kg}^{-1}$. About information care grouped together, 9 (14%) labels were non-conformities.

Manufacturer's information: 13 (20%) labels did not comply with the criteria for registration and identification of units with letters in manufacturing establishment with different plants, 7 (11%) had no identification letter spelled after the date of manufacture for identifying the location of the factory where the product was manufactured and 8 (12.5%) not had included the phrase: "the manufacturing establishment is identified by the letter corresponding with the date of manufacture."

Model of inspection and enforcement official stamp: 19 (15.6%) of the labels were incorrect with the requirements of the regulation (NI No.30).

Binding expressions: 8 (12.5%) of the labels did not have the expression "Brazilian Industry" and 100% indicated the expression "use prohibited in ruminant feed".

GMO symbol: 10 (15.6%) of the labels did not contain the GMO symbol foods intended for animal consumption that are produced from genetically modified organisms, but also the obligation to inform

the consumer about the kind of gene donor in the place reserved for the identification ingredients (BRAZIL, 2003a). It is to assess if all products that do not have these symbols on the labels really do not use GMO products in their composition, which can only be obtained through analysis.

Misunderstanding and or confusion: regarding the display of expressions that can induce consumers to mistake, error, confusion, deception or false understanding, 30 (46.8%) of the labels had illustrations that induced the use of the product based on the false concept of advantage or animal health security and 10 (15.6%) contained dubious phrases that made the misinformation and lead the owner to false understanding.

In the general arrangement of the required information, there was a lack of standardization in the distribution of the information required, not following the grouped of information as required by regulations. Information labels of 8 (12.5%) were available at different locations of the package and not as visible, and prioritize calls and business figures and 24 (37.5%) of the labels did not facilitate the visualization of information requirements (small letters, located in folds and seams of the package).

Conclusion

The non-conformities on the labels of complete dry foods for dogs and cats regarding regulations demonstrated deficiency of manufacturers in take actions to fit the labeling of their products to current standards, and lack of enforcement agencies into meet these standards. It is necessary that the pet food producers suit to the new regulations in order to avoid consumers (owners) to misinformation and/or ambiguity of understanding.

References

ABINPET (Associação Nacional dos Fabricantes de Alimentos para Animais de Estimação). São Paulo, SP, 2011. Available from: <<http://www.ABINPET.org.br>>. Accessed: Aug. 15, 2011.

BRAZIL. Decreto nº 4.680 de 24 de abril de 2003a. **D.O.U.**, Brasília, 28 de abril de 2003. Available from: <http://sistemasweb.agricultura.gov.br>. Accessed: Jul. 10, 2011

BRAZIL. Ministério da Justiça. Portaria nº2.658de 22 de dezembro de 2003b. **D.O.U.**, Brasília, 26 de dezembro de 2003. Available from:<http://sistemasweb.agricultura.gov.br>. Accessed: Jul. 10, 2011.

BRAZIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº15 de 26 de maio de 2009. **D.O.U.**, Brasília, 28 de maio de 2009a. Available from:<http://sistemasweb.agricultura.gov.br>. Accessed: Jul. 10, 2011.

BRAZIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº30 de 05 de agosto de 2009. **D.O.U.**, Brasília, 07 de agosto de 2009b. Available from:<http://sistemasweb.agricultura.gov.br>. Accessed: Jul. 10,2011.

de SOUZA KOERICH, K. et al. Avaliação do layout de rotulagem de alimentos completos destinados a cães comercializados no Brasil.In: Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária, 38., 2011, Florianópolis, SC. **Anais...** Florianópolis: CONBRAVET, 2011.

SIMAO, V.; SCUSSEL,V.M.Qualidade na produção de rações e ingredientes para pets. In: SCUSSEL, V.M. et al. **Atualidades em Micotoxinas e Armazenagem Qualitativa de Grãos II**.Florianópolis:ABMAG, 2008. Cap.3, p.101-105.

Table 1 - Labels rating of dogs and cats complete dry food packaging sold in Brazil and their description of non-compliances based on the current Regulation for pet food labeling

Brazilian Regulation ^a	Labeling does not comply	
	Description of non-conformities	Number of labels (%)
NI 30 art.43	Contain expressions and illustrations that can induced consumers to mistake, error, confusion, deception or false understanding of the owner	30 (47)
NI 30 art.25	Do not facilitate the visualization of information requirements (small letters, located in folds and seams of the package)	17 (37.5)
NI 30 art.32	Labels inscribed nutrients, but did not report the levels of security	14 (21.8)
NI 30 art.51	Do not comply with the criteria for registration and identification of units with letters in manufacturing establishment with different plants	12 (19)
NI 30 art.9/38	Do not identify the batch of product	12 (19)
NI 30 art.37	Do not indicate expiry date in Arabic numerals	11 (17)
Ordinance n. 2658 art. 1 Decree n. 4680 art.1, 2	Do not contain the symbol on the labeling of GMO in complete foods produced from genetically modified organisms listed in the identification of ingredients (the gene donor species mentioned)	10 (16)
NI 30 art.9	Wrong specification of the model the official stamp of the inspection and supervision	10 (15.6)
NI 30 art.43	Label indicates the addition of vitamin and mineral premix formulation, but does not state the level of assurance in the field enrichment	9 (14)

NI 30 art.25	Do not contain information grouped basic composition assurance levels, an indication of use, animal species and category to which they relate, and how to care and use restrictions	9 (14)
NI 30 art.9	Incorrectly classified the type of food according to the MAPA regulation	8 (12.5)
NI 30 art.51	Do not include the phrase: "the manufacturing establishment is identified by the letter corresponding to the date of manufacture of each branch" in the manufacturing establishment shaving different branches	8 (12.5)
NI 30 art.9	Do not have the expression "Brazilian Industry"	8 (12.5)
NI 15 art.20; NI 30 art.14	Do not indicate vitamin E in IU kg ⁻¹ and vitamin B12 in µg kg ⁻¹	6 (9.4)
NI 30 art.15/30	Declaring additives in the field of enrichment	4 (6.25)
NI 15 art.20 NI 30 art.14	Do not present level of assurance expressed in mg kg ⁻¹ or g kg ⁻¹	2 (3)

^aRegulation n. 4.680, 24/04/2003

Ordinance n. 2658, 22/12/2003

NI n. 15, 26/05/2009

NI n. 30, 05/08/2009

CAPÍTULO 3

LABELS NUTRITIONAL OF DOGS AND CATS DRY FOOD VERSUS LABORATORY DATA AND REGULATION

Trabalho publicado:

Research Journal of Biological Sciences (ISSN 1815-8846)

8 (4): 112-118, 2013

LABELS NUTRITIONAL OF DOGS AND CATS DRY FOOD VERSUS LABORATORY DATA AND REGULATION

Karina Koerich de Souza, Rafael Luchtenberg, Vildes Maria Scussel

Mycotoxigenology and Food Contaminants Laboratory - LABMICO, Food Science and Technology Department, Center of Agricultural Sciences, Federal University of Santa Catarina (UFSC), R. Admar Gonzaga, 1346, Itacorubi, Florianópolis, SC, CEP 88034-001, Brazil. E-mail: kakoerich@yahoo.com.br

Abstract

Quality of pet foods must be primary concern for manufacturers worldwide and their guaranteed levels must be stated on foods labels and be followed. This work reports an investigation regarding the guaranteed levels stated on 52 of dogs and cats samples pack labels *versus* laboratorial data and country regulation. The laboratory data of 44% dogs and cats food samples did not correlate to the levels described on the labels. The data was compared to the international levels of inclusion regulated by the AAFCO for Pet Food Regulation and NRC, and regarding nutritional requirements, 50% of Europe and North America samples did not meet the level recommended. Most of the moisture content samples were in the safe range with exception of 4% of North America samples. More attention should be taken by the manufacturers, regarding nutritional values reported on pet food labels and the real content present in the packs food content.

Keywords: dog, cat, food, labels, nutrients, safety.

1 Introduction

Dry pet food represents the main product of the food industry for pets. This complete food is composed of several ingredients providing nutrients mainly protein, fat and ash which are stated as *nutritional guaranteed levels* (NGLs) (AFCCO 2008). Those food groups must supply the nutrients required to meet a balanced metabolism and provide the proper nutrition for the intended use (each pet's life stage). Pet's development, health and longevity depend upon receiving the correct amounts and proportions of those NGLs (Thompson 2008; FEDIAF 2011). Therefore, the variety of ingredients and the maintenance of the NGLs standards officially established should be prioritized, as alterations can affect animal's performance (Carciofi,

2008; Zicker, 2008).

Regarding the importance of fat in the diet of dogs and cats, it is responsible for providing the essential fatty acids and energy as well as to enhance the diet palatability. A minimum amount of dietary fat is also needed as a carrier for the fat-soluble vitamins (Bauer, 2006; Peachey et al., 1999). Both, animals are able to keep healthy when consuming food that contain a wide range of different fat content, provided that other nutrients are adjusted to account for the changes in energy density. Most of adult's pets today live relatively sedentary lifestyles and do not need high fat concentrations (Case et al., 2011). On the other hand, protein in the diets (as crude protein – CP) is necessary for the replacement of protein losses in the skin, hair, digestive, enzymes and mucosal cells, as well as amino acid losses from normal cellular protein catabolism (Carciofi, 2008).

Minerals matter (MM) is represented in the NGLs as ash content. It represents the amount of two groups of mineral nutrients required by pets - the macro minerals (Ca, P, K, Na, Cl and Mg) and trace minerals (Fe, Cu, Zn, Mn, Se, I) that are necessary for enzyme functioning and other reactions to keep the metabolism balanced. However most of them do not have established and/or label stated limit of inclusion on pet foods of different countries regulation. The minerals that are of most practical significance in the nutrition and feeding management of dogs and cats today are Ca and P and quantities have been established for pet food daily consumption (Case et al., 2011). Despite this, mineral nutrition problems in dogs and cats are often a result of excesses or imbalances from interactions with other nutrients (FEDIAF, 2011).

Another important guaranteed level in pet food quality is the *moisture content* (mc) which, when altered, may interfere to pet food safety regarding microorganism growth and deterioration. It is included on the labels as the *safety guaranteed level* (SGL). Inadequate moisture conditions may influence microbiological contamination, such as fungi, yeasts and bacteria growth in pet food. If it is higher than 12 % indicates possible food deterioration and/or further food sanitary problem. Dry pet foods contain between 6 and 12 % of mc (Zicker, 2008). The extrusion process reduces the total mc of the product thus inhibiting the growth of most organisms. The importance of drying and the mc control during processes and final product storage is crucial to guarantee safe pet food and prevent contaminations (Carciofi, 2008).

In order to check if the quality GLs stated on the pack labels of dry pet food samples correspond to their inside real content, a work

was carried out to evaluate the NGL and SGL indicators of dogs and cats samples from different countries by a) laboratory analysis; b) their accomplishment to the labels' declared; c) if both are in conformity to the standards established by each country's regulation and d) correct requirement for dogs and cats established by the internationally recognized AAFCO and NRC.

2 Materials and Methods

2.1 Materials

Samples: dry food (52) for dogs (37) and cats (15) in different life stages (puppy and adult) from several brands, in their original sealed packs.

Chemicals:(b.1) reagents - chloride acid, sodium hypochloride, perchloric acid, sulfuric acid, sodium chloride, sodium salicylate, sodium nitroprusside, sodium hydroxide, disodium hydrogen phosphate, all analytical grades (Vetec, Rio de Janeiro, Brazil), Triton X-100 (Sigma Chemical, St. Louis, USA); *(b.2) solvents* - methanol, ethyl and petroleum ether analytical grade (J.T.Baker, Texas, USA) and ultrapure water (Millipore, Massachusetts, United States).

Equipment: drying oven (Fanem, Sao Paulo, Brazil), analytical scale (Shimadzu, Kioto, Japan), vacuum pump (Tecnal, São Paulo, Brazil), block digester (Tecnal), water bath (Quimis, Sao Paulo, Brazil), muffle (Quimis, Sao Paulo, Brazil) and protein analyzer (Leco, Saint Joseph, USA).

Other materials: non-vacuum desiccators Ø 200 mm and membrane filter with 0.45 µm and 0.45 mm for porosity and diameter, respectively (Millipore, Massachusetts, United States).

Pet food regulations: (e.1) *Canada:* Feed Regulations by Minister of Justice (Canada, 1983); Guide for Labeling and Advertising of Pet Foods by the Canadian Government's Competition Bureau of 21/09/2001 (Canada, 2001); (e.2) *Mexico:* *Secretary of Agriculture, Livestock, Rural Development, Fisheries and Food-* SAGARPA (Mexico 2000, 2004, 2011) and *National Service of Health, Food Safety and Quality-* SENASICA (Mexico, 2000; 2011); (e.3) *European Union (EU):* European Commission 767, 13/07/2009 (EC, 2009); European Commission 939, 20/10/2010 (EC, 2010); European Pet Food Industry Federation, 08/2011 (FEDIAF, 2011) and (e.4) *Brazil:* Ministry of Justice, Law n.8078, 11/09/90 (Brazil, 1990); Ministry of Agriculture, Livestock and Supply - MAPA, Decree n. 6296, 11/12/2007 (Brazil, 2007); NI 30, 05/08/2009 and NI 66, 16/12/2009 (Brazil, 2009a; 2009b).

Other associations based on international regulation: *Association of American Feed Control Officials for Pet Food Regulation* (AAFCO, 2005) and *National Research Council* (NRC, 2006).

2.2 Methods

Sample collection and preparation: sealed packs of dogs and cats dry food were purchased randomly from supermarkets and pet stores in North America (Canada and Mexico), South America (Brazil) and Europe Union (Austria, Finland, France, Germany, Italy and Switzerland). From each sample, the inner content and empty packs were separated. For (a.1) *inner content:* each of them was homogenized by quartering and separated into small portions of 60 g for analysis (CP, fat, ash and mc); (a.2) *empty packs:* proceed the evaluation of information described on labels regarding the GL and packaging characteristics. This information was used to compare with the values obtained from the laboratory analysis.

GL laboratory analysis: the NGL (CP, fat and ash) and SGL (mc) analysis were performed in triplicate in order to investigate the real GLs based on the AOAC official methods (2005) - arts. 990.03, 954.02, 900.02 and 930.15, for CP, fat, ash and mc, respectively.

Labels information about guaranteed levels: the dogs and cats pet food labels information regarding the GLs for each sample pack was collected and registered for further comparison to the laboratory data obtained.

Pet food regulations versus labels and laboratory data: data obtained from the GLs laboratory and labels stated of the pet food samples were correlated to the established standards of the country origin (Canada, 2001; Mexico, 2000, 2004, 2011; EU, 2006; 2011 and Brazil, 2009, respectively) and checked for non-conformities (N_C). In addition, to compare the dog and cats dry food GL laboratory data obtained in this study, we utilized the recognized international association of the AAFCO and NRC organization for nutrition quality assurance program, based on nutritional standards and regulations pertaining to the production, labeling and distribution of pet food.

3 Results and Discussion

The GLs laboratory data obtained from the dogs and cats dry food samples of different countries varied slightly from those stated on their own labels and regulatory standards. Tables 2 and 3 show the

differences between labels and laboratory analysis data, their comparison to countries established standards and the statistics variation obtained between same origin samples.

GLs laboratory data versus analytical values of labels

The real inner pack needs to accomplish to the label GLs stated. Despite that, in the Canada and EU regulation some tolerance between GLs laboratory data and GLs labeled are allowed (Canada, 1983; EC, 2010; FEDIAF, 2011)(Table 1).

Table 1. Tolerances allowed for guaranteed levels in pet food by the Canadian and EU regulation

Country	GLs		Content (%)	Tolerance allowed (%)
	NGLs	SGL		
CANADA				
Canada (1983)	CP	NA	≤ 24	1% absolute
			> 24	1.5% absolute
	Fat	NA	All amounts	$\pm 0.5\%$ absolute
EUROPEAN UNION				
Europe (2010)	CP/fat	NA	≥ 24	3% absolute
			$16 \leq x < 24$	12.5% of the declared value
			< 16	2% absolute
	Ash	NA	≥ 24	3% absolute
			$8 \leq x < 24$	12.5% of the declared value
			< 8	1% absolute
	NA	mc	≥ 12.5	8% of the declared value
			$5 \leq x < 12.5$	1% absolute
			$2 \leq x < 5$	20% of the declared value
		< 2	0.4% absolute	

GLs: guaranteed levels; NGLs: nutritional guaranteed levels; SGL: safety guaranteed levels; CP: crude protein; NA: not applied; mc: moisture content (CA, 1983; EC, 2010)

Some variations were detected for both GLs indicators described on the labels by the laboratory analysis as follows (Table 2).

a. NGL: from the total samples data obtained on either CP, fat or ash,

42% (22) of samples were not in accordance to the NGLs described on each dogs and cats food label with 51 (20), 34 (13) and 15 (6)% of them produced and commercialized in EU, South and North America, respectively. The variations were mainly on the fat and ash levels, followed by CP, in less extent though. The fat content was reduced from the labels stated in 25% (13) of the samples (77 and 23% of dogs and cats foods, respectively) being 54% (7) from EU and 46% (6) in South and North America. Regarding *ash*, 19.2% (10) had N_C to the label stated, exceeding the maximum allowed for such food types (maximum of 15.04%). On the other hand, the CPN_C levels detected corresponded to 11.5 (6) % of the dogs (3) and cats (3) food samples. They did not correlate to those labels stated with N_{Cs} in 67 and 33 % of dogs and cats food, respectively. Important to emphasize that although those N_{Cs} were detected per individual samples, some of them were simultaneously inadequate in 13.4% (7) of dog's samples for two levels of NGLs (CP, fat and/or ash). Those difference (N_{Cs}) on the laboratory x labels detected in the samples of the current study may be related to either, the lack of quality standards settings by each country's supervisory bodies and/or laboratory control.

b.SGL (mc): most of the laboratory data obtained showed to be rather similar to those stated, both on the dogs or cats labels and their regulation established standard (Table 3). Only 11.5% (6) of the samples did not correlate to the label mc, thus exceeding the maximum allowed (security mc established). There is no limit of mc for pet food, estimation between 6 and 12% can be often considered as safe (Zicker 2008; Case et al., 2011). Only two samples (EU and South America) were detected presenting high mc (15.8 and 16.2%, respectively). Despite this, the higher mc levels can compromise the safety and stability of those pet food providing moisture conditions for fungi and bacteria growth, as well as chemical deterioration.

The laboratory data obtained showed that some samples (44%) did not match (N_{Cs}) to the labels information, thus contradicting the regulations of dogs and cats dry food.

Table 2. Guaranteed levels from laboratory data versus described on the pet food labels and their non-conformities

Pet food samples			Laboratory data GL (%)				Packs labels GL ± tolerance allowed (%)*				Laboratory data x pack label N _c			
Country	Pet species	Total	NGLs			SGL	NGLs			SGL	NGLs			SGL
			CP (min)	Fat (min)	Ash (max)	mc (max)	CP (min)	Fat (min)	Ash (max)	mc (max)	CP (min)	Fat (min)	Ash (max)	mc (max)
NORTH AMERICA														
Canada														
	<i>Dogs</i>	3	41.60	16.53	8.00	7.90	40.00-1.5	18.00±0.5	NS	10.00	C	N _c **	C	C
			33.76	14.08	6.72	7.60	34.00-1.5	14.00±0.5	NS	10.00	C	C	C	C
			30.45	16.23	6.57	8.40	29.00-1.5	16.00±0.5	NS	10.00	C	C	C	C
	<i>Cats</i>	4	36.89	18.35	9.11	8.60	33.00-1.5	20.50±0.5	8.80	NS	C	N _c **	C	NA
			31.46	12.45	4.75	7.90	31.00-1.5	11.00±0.5	NS	12.00	C	C	C	C
			36.49	12.22	6.82	8.00	34.00-1.5	13.00±0.5	NS	12.00	C	N _c **	C	C
			41.94	20.50	8.18	7.40	42.00-1.5	20.00±0.5	NS	10.00	C	C	C	C
Mexico														
	<i>Dogs</i>	3	28.21	11.19	7.33	9.10	27.00	11.00	NS	12.00	C	C	C	C
			27.68	11.61	8.05	5.90	27.00	10.00	10.00	11.00	C	C	C	C
			28.68	15.36	7.60	7.80	29.00	13.00	8.00	12.00	N _c **	C	C	C
EUROPEAN UNION														
Austria/Finland/France/Italy/Switzerland														
	<i>Dogs</i>	10	27.15	13.53	6.71	8.70	25.00±3	16.00±2	6.00±1	8.00±1	C	N _c **	N _c ***	N _c ***
			24.68	12.82	6.36	8.70	25.00±3	16.00±2	6.00±1	8.00±1	C	N _c **	N _c ***	N _c ***
			30.05	15.80	7.40	7.50	29.00±3	19.00±2.4	6.50±1	8.00±1	C	N _c **	N _c ***	C
			17.33	16.17	5.49	15.80	17.00±2.2	14.50±2	7.00±1	20.00±1.6	C	C	C	C
			23.81	11.47	6.89	8.90	23.00±2.9	13.00±2	7.00±1	NS	C	N _c **	C	NA
			9.77	5.60	2.82	9.30	10.00±2	7.60±2	2.95±1	10.00±1	N _c **	N _c **	C	C
			9.34	5.70	2.65	9.70	10.00±2	5.00±2	2.50±1	9.50±1	N _c **	C	N _c ***	N _c ***
			12.31	6.93	4.14	9.80	12.00±2	6.50±2	6.00±1	NS	C	C	C	NA
			14.41	7.24	11.25	10.00	14.00±2	6.00±2	14.50±1.8	NS	C	C	C	NA
			15.58	7.56	4.07	10.30	15.00±2	8.00±2	8.00±1	NS	C	N _c **	C	NA
	<i>Cats</i>	6	27.70	11.27	8.42	9.30	29.00±3	9.00±2	8.50±1.1	11.00±1	C	C	C	C
			27.74	9.72	9.00	9.50	29.00±3	9.00±2	8.50±1.1	11.00±1	C	C	N _c ***	C
			32.62	12.19	6.37	8.00	32.50±3	13.00±2	6.80±1	10.00±1	C	N _c **	C	C
			32.89	11.59	7.28	9.00	32.00±3	11.00±2	8.00±1	NS	C	C	C	NA
			28.69	9.98	9.08	9.40	28.00±3	8.50±2	9.00±1.2	NS	C	C	C	C
			29.45	9.64	6.92	9.50	30.00±3	10.00±2	8.00±1	NS	C	N _c **	C	C
SOUTH AMERICA														
Brazil														
	<i>Dogs</i>	21	24.46	12.66	6.67	7.80	23.00	12.00	8.00	12.00	C	C	C	C
			26.80	13.52	10.06	11.90	25.00	10.00	10.00	10.00	C	C	N _c ***	N _c ***
			21.35	9.93	8.76	8.80	20.00	7.00	10.00	12.00	C	C	C	C
			29.59	10.42	5.27	7.70	25.00	10.00	8.00	14.00	C	C	C	C

		32.85	13.64	6.24	8.60	29.00	13.00	8.00	12.00	C	C	C	C
		25.10	11.31	7.09	7.00	21.00	7.00	10.00	10.00	C	C	C	C
		19.76	8.79	7.26	9.30	19.00	7.50	9.00	12.00	C	C	C	C
		28.51	12.24	10.61	8.70	27.00	7.00	10.00	10.00	C	C	N _C ***	C
		23.27	9.62	11.29	8.40	22.00	8.00	12.00	12.00	C	C	C	C
		29.78	11.14	8.42	16.20	30.00	10.00	13.20	12.00	N _C **	C	C	N _C ***
		27.83	10.74	7.70	8.90	27.00	9.00	10.00	12.00	C	C	C	C
		20.07	7.07	6.74	8.70	19.00	5.50	9.00	22.00	C	C	C	C
		21.47	9.59	10.60	9.50	21.00	8.00	12.00	12.00	C	C	C	C
		19.71	7.81	7.15	9.20	19.00	7.50	9.00	12.00	C	C	C	C
		24.22	10.42	10.35	8.30	23.00	13.00	10.00	12.00	C	N _C **	N _C ***	C
		24.38	12.39	7.61	8.40	23.00	12.00	8.50	10.00	C	C	C	C
		24.37	12.72	5.88	8.70	23.00	12.00	8.50	10.00	C	C	C	C
		27.30	13.52	7.99	9.20	26.00	14.00	8.50	10.00	C	N _C **	C	C
		30.56	12.5	5.62	8.80	28.00	13.00	8.50	10.00	C	N _C **	C	C
		20.36	9.20	9.40	7.90	20.00	7.00	10.00	12.00	C	C	C	C
		36.89	12.48	6.23	11.9	24.00	12.00	8.00	10.00	C	C	NA	N _C ***
<i>Cats</i>	5	27.31	10.54	15.04	7.10	31.00	10.00	12.00	12.00	N _C **	C	N _C ***	C
		30.34	9.03	8.30	8.20	30.00	8.00	11.00	12.00	C	C	C	C
		18.72	7.37	7.20	10.00	19.00	6.50	12.00	12.00	N _C **	C	C	C
		24.31	9.52	9.51	7.90	21.00	7.00	10.00	10.00	C	C	C	C
		26.34	8.18	5.80	8.70	24.00	8.00	4.00	12.00	C	C	N _C ***	C
	Average	25.60	10.62	8.18	9.00	23.80	9.38	9.58	11.75	NA	NA	NA	NA
	Minimum	18.72	7.07	5.27	7.00	19.00	5.50	4.00	10.00	NA	NA	NA	NA
	Maximum	36.89	13.64	15.04	16.20	31.00	14.00	13.2	22.00	NA	NA	NA	NA
	Standard deviation	4.49	1.96	2.21	1.85	3.75	2.49	1.86	2.35	NA	NA	NA	NA
	Relative standard deviation%	0.17	0.18	0.27	0.20	0.15	0.26	0.19	0.20	NA	NA	NA	NA

GL: guaranteed level; N_C: non conformity; NGLs: nutritional guaranteed levels; SGL: safety guaranteed level; CP: crude protein; mc: moisture content; NS: not stated; C: conform; NA: not applied; * Tolerance allowed by Canadian and EU regulation (FEDIAF, 2011; EC, 2010); ** lower than the label statement ; *** higher than the label statement

Countries regulation for pet food GLs standards

Regarding the pet food GLs standards set by regulation of each country, most of the GLs stated on the labels of different countries were in conformity (C) to their own GL regulation standards (Tables 2 and 3).

a. Canada: the *Advertising and Labeling of Pet Food* is an accepted standard in the Canadian pet food industry. Regarding the compulsory GL labeling of pet foods, it states as NGL information of CP, fat, fiber and mc (Canada, 2001). The ash statement is not required. All samples evaluated in the current study declared, on the label, those GLs (CP and fat, including fiber). The Canada regulations do not govern the production of pet food at the manufacturing level, on what is contained in them and recommendation for daily intake (RDI).

b. Mexico: the GL standards of that country for pet food are based in the SAGARPA and SENASICA regulations (Mexico, 2000, 2004 and 2011) and the International Association and Organization AAFCO and NRC. It is compulsory the declaration of CP, fat, ash, including fiber and mc (Mexico, 2000). Just one sample did not declare ash in the label in the current study.

c. European Union: for the EU official GL standards, it is compulsory the declaration of CP, fat, ash, including fiber, however the indication of mc is optional. EU samples labels were in accordance to the regulation (EC, 2009).

d. Brazil: the pet food regulation consider as compulsory declaration of CP, fat, ash and fiber (Brazil, 2009). The standards settings area way to reduce the variation among manufacturers on the commercial pet food available and to get balanced diet that meets animal's nutritional needs. Moreover, the Code of Consumer Protection (art.31) requires that the consumer should be informed clearly about the features and quality of the product (Brazil, 1990, 2009b). The current Brazilian GL label evaluation showed that all sample packs had information of NGLs and SGL (Brazil 2009).

Laboratory data versus GLs requirement for dogs and cats

Laboratory data should accomplish to the reference nutrient profile standards established by the internationally recognized AAFCO and NRC. These agencies provide a mechanism for developing and implementing uniform and equitable laws, regulations, standards and enforcement policies and establish nutrient recommendations for dog

and cat foods. Table 3 shows the statistic variation observed in the laboratory data *versus* the international levels of inclusion regulated by the AAFCO e NRC.

The NGLs vary among the animal species (dogs and cats) and life stages. The pets nutritional recommendations by those International institutions were compared to the data obtained from the laboratory samples evaluated.

Table 3. Statistics variation of guaranteed levels obtained with laboratory data of dogs and cats dry foods versus minimum recommended levels established by international standards

Pet food samples		NGLs (%)										SGL (%)										
Species	Life stage	Number of samples/total	Crude Protein		IS		Fat		IS		Ash		IS*		mc		IS**					
			Average	SD	Range	AAFCO	NRC	Average	SD	Range	AAFCO	NRC	Average	SD	Range	AAFCO	NRC					
NORTH AMERICA																						
Dogs	Adult	6/10	31.73	5.31	27.68-41.60	>18.0	>20.0	14.16	2.31	11.19-16.5	>5.0	>5.0	7.37	0.62	6.57-8.0	NE	NE	7.78	1.06	5.90-9.10	NE	NE
Cats	Adult	4/10	36.69	4.28	31.46-41.94	>26.0	>17.5	15.88	4.18	12.22-20.5	>9.0	>8.0	7.21	1.89	4.75-9.1	NE	NE	7.97	0.49	7.40-8.60	NE	NE
EUROPEAN UNION																						
Dogs	Puppy	2/10	9.55	0.03	9.34-9.77	>22.0	>21.0	5.65	0.07	5.6-5.7	>8.0	>13.0	2.73	0.12	2.65-2.82	NE	NE	9.50	0.28	9.30-9.70	NE	NE
	Adult	8/10	20.66	6.56	12.31-30.05	>18.0	>20.0	11.44	3.79	6.3-16.17	>5.0	>5.0	6.53	2.27	4.07-11.1	NE	NE	9.96	2.52	7.50-15.80	NE	NE
Cats	Adult	6/6	29.84	2.34	27.7-32.89	>26.0	>17.5	10.73	1.08	9.64-12.19	>9.0	>8.0	7.84	1.14	6.37-9.08	NE	NE	9.11	0.57	8.00-9.50	NE	NE
SOUTH AMERICA																						
Dogs	Puppy	5/21	29.90	1.96	27.83-32.8	>22.0	>21.0	12.05	1.15	10.74-13.6	>8.0	>13.0	7.71	1.96	5.62-10.61	NE	NE	10.24	3.33	8.60-16.2	NE	NE
	Adult	16/21	24.31	4.43	19.76-36.89	>18.0	>20.0	10.71	2.00	7.07-13.52	>5.0	>5.0	8.02	1.83	5.88-11.29	NE	NE	8.92	1.33	7.00-11.09	NE	NE
Cats	Adult	5/5	25.40	4.32	18.72-30.34	>26.0	>17.5	8.93	1.22	7.37-10.54	>9.0	>8.0	9.17	3.55	5.80-15.04	NE	NE	8.38	1.07	7.10-10.0	NE	NE

NLs: nutritional guarantee levels; SGL: safety guarantee levels; IS: international standard; mc: moisture content; SD :standard deviation; AAFCO: Association of American Feed Control Officials; NRC:National Research Council; NE: not established; *there is no limit of inclusion established (estimative of 5.0 to 8.0%); ** there is no limit established (estimative of 6.0 to 12.0%)

a. CP (a.1) for dogs: the AAFCO's *Nutrient Profiles* for dogs (2008) recommends that for adult maintenance should contain at least of 18%. Similarly, the NRC recommends a minimum CP requirement of 20% for adult maintenance dog (Schaeffer et al., 1989; NRC, 2006). The CP requirement of growing puppies needs to be significantly higher than for adult dogs, where minimum protein requirements should be up to 22 % for growing dogs (Gessert and Phillips, 1956). The AAFCO and NRC recommend minimum levels of 22 and 21% for puppies, respectively (NRC, 2006; AAFCO, 2008). In the current data obtained, the minimum CP requirement for adults was respected in all samples of South and North America, with averages 24.31 and 31.73%, respectively. Only four samples of EU did not meet the minimum CP requirement for adult dogs (N_C : 17.33, 12.31, 14.41 and 15.58 %). For puppies, 100% of EU samples were N_C with the minimum protein requirement (9.34 and 9.77%) while samples from South America were conform to the recommendations (range of 27.83 to 32.85%).

(a.2) for cats: the cats' nutrient requirement regarding protein is substantially higher than dog (Dickinson and Scott, 1956). The AAFCO (2008) for cat foods suggest a higher level of CP for inclusion in commercially prepared foods. For adult maintenance, level of 26% of the diet is indicated, whereas the NRC minimum requirement is 17.5%. All samples (100%) were conforming to recommendation.

b. Fat (b.1) for dogs: The AAFCO (2008) recommendation is a fat minimum of 5 % for adult maintenance and 8 % for growth. For NRC (2006), most dry dog foods that are in the market for adult maintenance and puppies contain between 5 and 13% of fat content, respectively. The minimum requirement for adults was followed by all samples analyzed, ranging between 6.3 to 16.53% with average of 10.71, 11.44 and 14.16% in South America, EU and North America, respectively. In 100% of the EU puppy samples, the addition of 5.6 and 5.7% of fat was in N_C with recommended requirement, whereas the South America samples were conforms to requirement for this life stage. The 1.5 % difference in fat content can make a significant difference in a product's caloric density and palatability (Case et al. 2011). Puppies that are not fed adequate amounts of fat can have developmental problems and growth deformities.

(b.2) for cats: in general, cat foods contain slightly higher amounts of dietary fat than do most dog foods. The current AAFCO (2008) minimum fat recommendation for cats during all life stages is 9%. For NRC (2006), dry maintenance cat foods contain between 8 and 13% fat. Regarding the data obtained, the average of different countries was in conformity of minimum requirement and just

two samples of North America was N_C , with amounts of 18.35 and 20.5%, values above the NRC recommended. The consumption of dietary fat in excess in commercial dry food can lead to increased body fat and obesity (Case et al. 2011).

c. Ash: there is no limit of inclusion established in regulation of pet foods either for dogs and cats. An estimate of ash in high-quality dry pet food generally is between 5 and 8% (Case et al., 2011). In the results obtained, they ranged from 2.65 to 15.04% for dog puppy and cat adult, respectively. Two samples of adult dog from EU (4.14 and 4.07%) and one sample of adult cat from North America had less ash (4.75%) than the estimative of inclusion recommended. The excess of ash was observed in 12 samples of dog and cats food (1, 3 and 8 samples of North America, EU and South America, respectively), with amounts ranging between 9.08 to 15.04%.

Nutritional diseases are rarely seen in dogs and cats when they are fed good quality commercial food or nutritionally balanced diets. For regulation, manufacturers of pet food have rules and self-control programs to ensure safe and healthy food production. If certain nutrient levels are outside the values stated in this guide, manufacturers should be able to prove that the product provides adequate and safe intakes of all required nutrients (FEDIAF, 2011).

4 Conclusion

Data of this study showed that the nutritional guaranteed levels labeled in dog and cat food available in the international market followed the standards of each country's legislation and the recommendation requirements established by the recognized institutions, AAFCO and NRC, ensuring the pet's health. Dogs and cats owners have the right to know the food products quality veracity they are buying. Data obtained should be considered as an indication of the products quality evaluated for further pet food investigations by authorities monitoring.

5 References

AAFCO. 2008. Association of American Feed Control Officials. Pet Food Regulations. In AAFCO Official Publication, Atlanta.

AOAC. 2005. Association Official Method of Analysis of Chemistry. Thiex, N.J.W. (Editors), Animal feed. 18 ed. Maryland: AOAC international.

Bauer, J.E., 2006. Facilitative and functional fats in diets of cats and dogs, *J. Animal Veterinary Medicine Association* 229, 680-684.

Brazil. 1990. Code of Consumer Protection. Law No. 8078/1990. Official Daily of the Federative Republic of Brazil, Brasilia.

Brazil. 2007. Ministry of Agriculture, Livestock and Supply. Decree No. 6296/2007. Inspection and supervision required for products intended for animal feed. Official Daily of the Federative Republic of Brazil, Brasilia.

Brazil. 2009a. Ministry of Agriculture, Livestock and Supply. Normative Instruction No. 30/2009, establishing criteria and procedures for products registration for labeling and advertising and exemption from products compulsory registration for feeding to companion animals. Official Daily of the Federative Republic of Brazil, Brasilia.

Brazil. 2009b. Ministry of Agriculture, Livestock and Supply. Normative Instruction No. 66/2009, changes the Normative Instruction No. 22, 2009. Official Daily of the Federative Republic of Brazil, Brasilia.

Canada. 2001. Canadian Government's Competition Bureau. Guide for the Labeling and Advertising of Pet Foods.

Canada. 1983. Ministry of Justice. Feeds Regulations. SOR/83-593. Available from: <http://laws-lois.justice.gc.ca>

Carciofi, A.C., 2008. Sources of protein and carbohydrates for dogs and cats. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 37, 28-41.

Case, L.P., Daristotle, L., Hayek, M.G., Raasch, M.F., 2011. *Canine and Feline Nutrition*. 3th ed., St. Louis, MO, 542 pp.

Dickinson, C.D., Scott, P.P., 1956. Nutrition of the cat. II. Protein requirements for growth of weanling kittens and young cats maintained on a mixed diet. *British Journal of Nutrition* 10, p.311-316.

EC. 2009. European Commission. European Parliament and of the Council. Regulation No 767/2009 on the placing on the market and use of feed. Official Journal of the European Communities. Available from:

<http://eurlex.europa.eu>

EC. 2010. European Commission. European Parliament and of the Council. Commission Regulation (EU) No 939/2010 amending Annex IV to Regulation (EC) No 767/2009 on permitted tolerances for the compositional labelling of feed materials or compound feed. Official Journal of the European Communities. Available from: <http://eurlex.europa.eu>

FEDIAF. 2011. European Pet Food Industry Federation. Nutritional guidelines for complete and complementary pet food for cats and dogs, 75pp.

Gessert, C.G., Phillips, P.H., 1956. Protein in the nutrition of the growing dog. *Journal of Nutrition* 58, p.415–421.

Mexico. 2000. SAGARPA. Secretary of Agriculture, Livestock, Rural Development, Fisheries and Food. Norma Oficial Mexicana NOM-061-ZOO-1999. Especificaciones zoosanitarias de los productos alimenticios para consumo animal. Available from: <http://www.economia-noms.gob.mx/noms/inicio.do>

Mexico. 2004. SAGARPA. Secretary of Agriculture, Livestock, Rural Development, Fisheries and Food. Modificación a la Norma Oficial Mexicana NOM-012-ZOO-1993, especificaciones para la regulación de productos químicos, farmacéuticos, biológicos y alimenticios para uso en animales o consumo por éstos. Available from: <http://www.senasica.gob.mx/?doc=509>

Mexico. SAGARPA. Secretary of Agriculture, Livestock, Rural Development, Fisheries and Food. Introducción, antecedentes, misión, visión y objetivos, 2011. Available from: <http://www.sagarpa.gob.mx/quienesomos/introduccion>

Mexico. 2000. SENASICA. National Service of Health, Food Safety and Quality. Formato de etiqueta para alimentos, aditivos y alimentos medicados. Available from: <http://www.cofemertramites.gob.mx>

Mexico. 2011a. SENASICA. National Service of Health, Food Safety and Quality. Registro de productos químicos, farmacéuticos, biológicos y alimenticios para uso en animales o consumo por éstos. Available

from: <http://www.senasica.gob.mx/?id=2725>

Mexico. 2011b. SENASICA. National Service of Health, Food Safety and Quality. Misión, visión, principios y valores. Available from: <http://www.senasica.gob.mx/?id=1170>

NRC. 2006. National Research Council: nutrient requirements of dogs and cats. Washington, DC: National Academy Press, 2th ed., 424 pp.

Peachey, S.E., Dawson, J.M., Harper, E.J. 1999. The effect of ageing on nutrient digestibility by cats fed beef tallow, sunflower oil, or olive oil-enriched diets. *Growth, Development and Aging* 63, p.49–58.

Schaeffer, M.C., Rogers, Q.R., Morris, J.G. 1989. Protein in the nutrition of dogs and cats. In Burger, I.H., Rivers, J.P.W. (Editors), *Nutrition of the dog and cat*, New York, Cambridge University Press.

Thompson, A., 2008. Ingredients: where pet food starts. *Topics in Companion Animal Medicine* 23, p.127-132.

Zicker, S.C., 2008. Evaluating Pet Foods: How confident are you when you recommend a commercial pet food? *Topics in Companion Animal Medicine*, 23, 121-126.

CAPÍTULO 4

BACTERIA AND FUNGI QUALITY AND SAFETY INDICATORS OF PET FOOD COMMERCIALIZED IN DIFFERENT COUNTRIES

Trabalho submetido:

Research in Veterinary Science (ISSN 0034-5288)

RVSC-13-923

BACTERIA AND FUNGI QUALITY AND SAFETY INDICATORS OF PET FOOD COMMERCIALIZED IN DIFFERENT COUNTRIES

**Karina Koerich de Souza; Marcelina Bottoni Horn; Vildes Maria
Scussel**

*Laboratory of Mycotoxicology and Food Contaminants, Food Science
and Technology Department, Center of Agricultural Sciences, Federal
University of Santa Catarina, R. Admar Gonzaga, 1346, Itacorubi,
Florianopolis, SC, CEP 88034-001, Brazil.e-mail:
kakoerich@yahoo.com.br*

Abstract

Dogs and cats dry foods were tested to microbiology quality and safety indicators. Data from bacteria, as manipulation hygiene indicators, mesophilic and coliforms total count ranged from $<1.0 \times 10^1$ to 2.4×10^2 and $<1.0 \times 10^1$ to 4.0×10^1 CFU/g, respectively. Related to safety indicators, the *E.coli* and *Salmonella* were absence in 100% of samples. The *sulfite-reducing Clostridium* levels ranged from 1.0×10^1 to 1.5×10^1 CFU/g. For fungi tests, the total count ranged from $<1.0 \times 10^2$ to 1.9×10^3 CFU/g. The most often genera isolated was *Aspergillus* spp. (40%) followed by *Penicillium* spp. (35%). Regarding their species, the most isolated were: *A. parasiticus* (42%), *P. expansum* (28.6%), followed by *A. niger* / *A. penicillioides* (12%) and *P. ochraceus* (4.2%). No *Fusarium* was isolated. The extruded dry food samples showed low and safe levels of moisture content and water activity, which guarantee the control of microbial growth.

Key-words: pet food, microbiology, safety, fungi, bacteria

1 Introduction

More than 90% of dogs and cats worldwide are fed daily with processed food (Michel et al., 2008; de Souza Koerich and Scussel, 2012). Therefore, their quality and safety are of primary interest by the manufacturers and pet owners, whereas they are highly susceptible to microbiological development ((Zicker, 2008, Li et al., 2012; de Souza and Scussel, 2013). The bacteria and fungi contamination can come from animal (meat, viscera and bones) and vegetable (grains and cereals) raw materials and by-products of bad quality utilized in the pet food production. Also they may come from their storage under inadequate

conditions (high temperature and humidity) as well as by lack of hygiene during handling and packaging of final products (Andrade and Nascimento, 2005). Thus, microbiological contamination can be an indicator of inadequate sanitary conditions during the whole processing, storage and/or commercialization (Franco, 2005).

The presence of bacteria in food can be responsible for deterioration (spoilage), reduction of shelf life and/or be of potential risks to consumer health (pathogenic and toxigenic bacteria). As spoilage bacteria can be mentioned the mesophilic and coliforms, considered good indicators of food quality. These enumerations are used to assess the hygienic conditions of the product. When in high count, they indicated contamination resulting from failure during processing, improper cleaning or inadequate heat treatment. Regarding pathogenic and toxigenic bacteria, they can cause food borne diseases in animal and humans (Miotto et al., 2010; de Souza Koerich and Scussel, 2012). Among them, it must be mentioned the *Escherichia coli* and *Salmonella* spp, considered indicators of food safety. This bacterium is found in intestinal tract of animals and humans and causes enteritis which can lead to the development of a serious pathologic process (Vieira, 2010). The *sulfite-reducing Clostridium* can be considered as pathogenic indicators in food and indicates the potential presence of *Clostridium perfringens* and *C. botulinum* (two species able to cause food borne diseases).

Regarding fungi and their association to pet food, tests are important in order to assess deterioration levels of final product and possible risk of mycotoxin contamination. Dogs and cats food are prepared with vegetables (mainly maize and rice, - about 70 to 80 % of total dry pet food) which can carry both fungi spores (heating resistant) and toxins. After processing, food can also be re-contaminated with fungi spores, especially when final product is pelleted and sold in open bags (Suárez, 1999; de Souza Koerich et al., 2013). The fungi genera most commonly found in stored products are *Aspergillus* and *Penicillium*, while *Fusarium* is the main found in the ingredients coming from the field. The *Aspergillus* species (*A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. nomius*, *A. fumigatus*, *A. versicolor* and *A. ochraceus*) are toxigenic and most detected in pet food (Scudamore et al., 1997; Bueno et al., 2004; Scussel et al., 2010). Also several *Penicillium* species are commonly involved in food spoilage, and some of them can produce more than 10 different toxic metabolites (cyclopiazonic acid, patulin, citrinin, penicillic acid, ochratoxin A) (Frisvad and Filtenborg, 1989; Martins et al., 2003). Although many *Fusarium* species exist in nature,

only a small number infect cereal crops in the field and produce mycotoxins (fumonisins, zearalenone and trichothecenes) (Marasas, 2001; Pitt and Hocking, 2009).

There are several ways that microorganisms can reach and affect the pet food quality. However, the microbial diversity to be found in different pet foods is dependent on the moisture content (mc), water activity (a_w), oxygen tension, pH and the nutrient composition of the raw material included; and so the process applied and final product handling (Maciorowski et al., 2007). Dry pet foods are typically extruded, thus with final low mc and a_w varying between 6 to 12% and 0.60 to 0.85, respectively. That process is ought to eliminate microbial contamination and reduce humidity to an extent to prevent microbiological recontamination and increase shelf life. In that type of food, the contamination of the final product is possible though, as long as conditions allow, and it may occur from cross-contamination or recontamination from environmental niches. Depending on the ingredients composition, pet food quality control tests such as nutrient content, mc, a_w , mycotoxins and bacteria, should be prioritized, as they can pose risks to animal health (Carciofi, 2008; de Souza and Scussel, 2012).

Considering the increasing population of dogs and cats worldwide and the lack of information regarding quality and safety of pet food supplied to pet animals, this work reports a study of dogs and cats food - focusing on providing data on the quality and safety indicators (bacteria and fungi contamination) - and their relation the final product humidity factors for microorganisms growth.

2 Materials and methods

2.1 Materials

a) Samples: dry foods (60) for dogs (40) and cats (20), adults (48) and puppies (12), from several brands, in their original sealed packs (sizes: 0.5 to 2 kg), with 10 samples stored in vacuum conditions. They were commercialized in three continents: North America (Canada and Mexico), European Union (countries-EU: Austria, Finland, France, Germany, Italy and Switzerland) and South America (Argentina, Brazil, Chile and Uruguay).

b) Culture medium: bacteriological peptone, dichloran rose bengal chlortetracycline agar (DRBC), dichloran glycerol agar (DG18), malt

extract agar (MEA), plate count agar (PCA) trypto sesulfite cycloserine agar (TSC), brilliant greenphenol red lactose sucrose (BPLS) (HIMEDIA, Mumbai, India), broth Rappaport Vassiliadis (Difco, New Jersey, USA) and filtration plate Petrifilm™ (3M, Minnesota, USA).

c) Equipments: drying oven (Fanem, Sao Paulo, Brazil), a_w reader (Aqualab, Sao Paulo, Brazil), laminar flow cabinet (Veco, Campinas, Sao Paulo, Brazil), light microscope (Olympus, Tokyo, Japan), stereoscopic microscope (Carl Zeiss, Jena, Germany), incubator (Quimis, Sao Paulo, Brazil), analytical and semi-analytical scales (Shimadzu, Kioto, Japan), colonies counter (Phoenix, Sao Paulo, Brazil), stomacher (Interscience, St. Nom, France) and water bath (Cientec, Sao Paulo, Brazil).

d) Pet food regulations:(d.1) Canada and Mexico: there is no government regulation for pet food microbiologic standards; *(d.2) European Union:* European Commission (EC) Regulation no.1774, 03/10/2002 (EC, 2002); EC No.183, 12/01/2005 on Feed Hygiene sets out the operating standards with which pet food establishments must comply (EC, 2005) and EC No. 767, 13/07/2009 (EC, 2009); *(d.3)Brazil:* Ministry ofAgriculture, Livestock and Supply – MAPA, norms and standards of nutrition and feed (Brazil, 2000); Decree n. 6296, 11/12/2007 (Brazil, 2007); NI no.30, 05/08/2009 (Brazil, 2009). Other member based on international regulation: National Research Council (NRC, 2006), European Pet Food Industry Federation, 03/2010 (FEDIAF, 2010) and National Association of Manufacturers of Products for Pets (ABINPET, 2008). Important to emphasize that in those countries, the pet food manufacturer is responsible to validate, verify and review periodically its own pre requisite program and Hazard Analysis and Critical Control Points system (HACCP).

2.2 Methods

a) Sample collection and preparation: the sealed packs of dogs and cats dry food were purchased randomly from supermarkets and pet stores in each surveyed country. They were homogenized by versed and reversed shaking and opened aseptically. Each content was purred into sterilized blender jars, then ground and divided into portions of 25, 25, 6 and 10 g for microbiological analysis (bacteriological and fungi tests) and humidity conditions (mc and a_w - n=3), respectively. The bacteria and

fungi tests were performed from an initial solution prepared with 25 g each sample and 225 mL peptone water. A series of dilutions (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} and 10^{-4}) were performed from it, followed by stomacher homogenization.

b) Bacteriological tests: the tests performed were *(b.1) aerobic mesophilic total count – MTC* (APHA, 2001): from the homogenized solutions (Section 2.2.a)(dilutions from 10^{-1} to 10^{-4} , 1 mL) of each dilution was plated on sterile Petri dish and added the PCA media, (20mL) at a temperature of $46 \pm 2^{\circ}\text{C}$. The agar and the inoculums were homogenized, solidified and incubated at $36 \pm 1^{\circ}\text{C}$ during 48 h. The results were expressed in colony-forming unit (CFU)/g; *(b.2) coliforms total count (CTC) and EC* (AOAC, 2005): by method 991.14 based on the Petrifilm™ technique, which 1 mL of sample was placed onto the center of Petrifilm plate and applied pressure on spreader to distribute over circular area. For CTC, the plate was incubated at $35 \pm 1^{\circ}\text{C}$ during 24 ± 2 h and for EC the plate was incubated at $35 \pm 1^{\circ}\text{C}$ during 48 ± 2 h. The results were expressed in CFU/g; *(b.3) SRC* (APHA, 2001): from the homogenized solution (10^{-1} to 10^{-4} , 1 mL) of each dilution was plated on sterile Petri dish (as in Section 2.2.b) and added the TSC media, (15mL) at $46 \pm 2^{\circ}\text{C}$. The agar and the inoculums were homogenized, solidified and incubated in anaerobic conditions at $36 \pm 1^{\circ}\text{C}$ during 18 at 24 h. The results were expressed in CFU/g and *(b.4) Salmonella spp.* (APHA, 2001): samples were submitted to a pre-enrichment step with peptone water (0.1%) and incubated at $36 \pm 1^{\circ}\text{C}$ for 16 hours. Subsequently, aliquots of 0.1mL were pipetted to tube containing Rappaport Vassiliadis broth (10mL) and incubated in a water bath at $41 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ for 24h. From the selective enrichment broths, samples were sub-cultured in selective medium BPLS and incubated at $36 \pm 1^{\circ}\text{C}$ (18 h) and confirmed by biochemical tests. The results expressed as presence or absence/25g.

c) Mycological tests: *(c.1) fungi total count – FTC* (APHA, 2001) - each sample peptone water dilution was spread ($n=2$) onto the surface of DRBC media, incubated at $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$, for 5 days, colonies count and expressed as CFU/g; *(c.2) fungi genera identification* - for the *morphological characterization* the strains were isolated by sub-culture on Petri-dishes containing MEA and DG18 media and observed under light microscope (Samson et al., 2004; Pitt and Hocking, 2009). *(b.3) fungi species identification* – it was performed through microcultiive in MEA as described by Weber and Pitt (2000), followed the Samson et al. (2004) and Pitt and Hocking (2009) keys. The species

micro morphological observation was carried out with the isolates being examined also under light microscope (100 and 400x magnification) checking for species characteristics according to the taxonomic keys and guides available (Nelson et al., 1983; Pitt and Hocking, 1997; Samson et al., 2006; Pitt and Hocking, 2009).

d) Moisture conditions: (d.1) mc - was determined by gravimetric method art. 930.15 of AOAC (2005) and *(d.2) a_w* - by measuring samples in a_w meter at 25°C (n=3).

3 Results and Discussion

The quality and safety indicators data of the dogs and cats complete dry food (for adults and puppies) showed that both, bacteria and fungi load varied among them. Also the humidity conditions showed that they were enough to allow mainly fungi growth (spoilage or toxigenic species). Data on bacteria, fungi and their growth conditions are described in Tables 1 and 2, respectively.

3.1 Bacteria - hygiene and safety indicators

Bacteria are important indicators of the degree of hygiene conditions adopted during pet foods production and their ingredients quality selection. However, the main variations are results of contamination that may occur during the final stages of processing, packaging and distribution. The bacteria load in pet food can be related to (a) *quality/deterioration and hygiene*: their proliferation can modify the sensory properties or (b) *safety*: cause damage to pets' health (pathogenic and toxigenic bacteria).

(a) Related to pet food quality (mesophilic and coliforms total count): the hygienic quality of pet food is evaluated by bacteria's indicator tests, especially the MTC, CTC and the detection of EC, utilized are as an index of sanitation. These bacteria are associated to lack of general hygiene in the handling and storage of products, being favored by the product exposure to micro and macro environmental moisture conditions (Jay, 2005).

The MTC has been one of the microbiological quality foods indicators most commonly used. It indicates whether the cleaning, disinfection and temperature control during the processes, apart from the transportation and storage were performed correctly/adequately. It also

indicates information regarding the most probable product shelf life time (Jay, 2005). Analyzing the data obtained in the 60 dry dogs and cats' food samples, the MTC showed levels ranging from $<1.0 \times 10^1$ to 2.4×10^2 CFU/g, among them, 43 (72%) samples were below 1.0×10^1 CFU/g. As far as the different animal species and country of origin, MTC, for *dogs' food* the highest total count was observed in the North American samples with mean of 6.1×10^1 CFU/g (ranging from $<1.0 \times 10^1$ to 2.4×10^2 - SD 91.52; RSD% 148.42), followed by South America with 2.7×10^1 CFU/g (ranging from $<1.0 \times 10^1$ to 2.2×10^2 - SD 42.86; RSD% 158.74) and European Union with 1.1×10^1 CFU/g (ranging from $<1.0 \times 10^1$ to 2.0×10^1 - SD 3.16; RSD% 28.72). On the other hand, regarding *cat' food*, the highest MTC was observed in the European samples with mean 4.8×10^1 CFU/g (ranging from $<1.0 \times 10^1$ to 2.3×10^2), followed by a slight difference of MTC in the South and North America samples (mean 1.3×10^1 and 1.2×10^1 CFU/g, respectively). The highest MTC of 2.4×10^2 CFU/g was observed in a dog food sample for puppy (more prone to bacterial infections) from North America which was packaged in a polyethylene bag (just one material layer).

Miotto et al. (2010) investigating dog's food samples commercialized in open bags, reported MTC: ranging from 1.8×10^2 to $> 1.0 \times 10^5$ CFU/g (mean of 1.7×10^4 CFU/g). As expected, those data were higher than the obtained in the current study – which samples were sold in sealed packages. Important to emphasize that pet food sold in open bags is more exposed to biologic contaminants (bacteria), inclusive fungi, if compared to pet food commercialized in sealed packs (Suárez, 1999; de Souza Koerich et al., 2013). The data obtained in the current study showed that the MTC detected in all pet foods samples evaluated were at adequate levels ($<10^5$ CFU/g), thus representing low risk to animal health. That low count confirmed the adoption of safety manipulation conditions during the final steps of the pet food production, probably due to good manufacturing practices (GMP) application and implementation.

Regarding CTC data, also all samples showed low levels of coliforms contamination: for dogs food - data was higher in the North American samples though (mean 2.0×10^1 CFU/g; ranging from $<1.0 \times 10^1$ to 4.2×10^1 CFU/g; SD 12.65; RSD% 63.21), followed by the South American and European's with similar level of contamination (1.2×10^1 CFU/g; ranged from $<1.0 \times 10^1$ to 2.0×10^1 CFU/g). Regarding cat food, the highest count was also observed in North American samples (mean 1.5×10^1 CFU/g; ranging from $<1.0 \times 10^1$ to 2.0×10^1 CFU/g; SD 5.77; RSD% 38.46), followed by a slight difference in the

South American (mean 1.3×10^1 CFU/g; ranging from $<1.0 \times 10^1$ to 2.0×10^1 CFU/g; SD 4.88; RSD% 37.54) and European's (mean 1.1×10^1 CFU/g; ranging from $<1.0 \times 10^1$ to 1.5×10^1 CFU/g; SD 2.04; RSD% 18.21). The coliforms presence in processed foods is considered a useful indication of bacterial contamination post process/post sanitization (da Silva, 1997; Forsythe, 2002).

Regarding the data obtained and the reference standards recommended (NRC, 2006; ABINPET, 2008), all different countries samples, despite of animal life stages, were in accordance to MTC and CTC - considered adequate levels for pet food. Those low counts can be explained by the high temperatures (120°C) applied during the extrusion process of pet food and also the safe low m_c and a_w of final product (Table 1). Reduction of a_w , at levels below 0.65, the microbiological deterioration is controlled (Abellana et al. 1999; Bueno et al., 2001; Scussel, 2002).

(b) Related to pet food safety (*E. coli*, *Salmonella* and sulphite-reducing clostridium count): the presence of EC and *Salmonella* in food can be considered as indicator of hygiene, but they can be also classified as pathogenic bacteria. In the current evaluation, the EC was absent in 100% of the dogs and cats food samples surveyed. In a study by Weese et al. (2005) on dogs and cats commercial raw diets bacteriological load, the EC was identified in 15/25 (64%) of those diets. Different of that study (utilizing raw food), dry complete dogs and cat's food (processed food) is submitted to an extrusion process, which raises the temperature above 100°C , which should eliminate viable microorganisms. The EC constitutes a serious public health problem since their spores are resistant to heat and live long in the soil and surfaces. The intense manipulations without precaution and the poor packaging are major factors in the contamination. The EC is commonly found in the intestinal tract of animals and humans and can also be implicated in animal infectious diseases (Threlfall et al., 1998). That bacteria can invade the intestinal mucosa, produce an enterotoxin, and/or also an exotoxin that directly destroy the mucosa and causes diarrhea. Once ingested in large quantities spores hatch causing necrotizing diarrhea, pseudo membranous colitis, which is often fatal for animals and humans (Lindstrom et al., 2006). The presence of EC and *Salmonella* results on food unacceptability to animal consumption.

As far as *Salmonella* is concerned, it was absent in 100% of the dog and cat food despite of life stage and country of origin. Several ingredients utilized in pet food (e.g. animal and vegetal by-products)

have been reported to contain salmonellae. In a work carried out by Li et al. (2012) in raw material used in pet food and feed, *Salmonella* was isolated in 41.3 and 10.6% of animal and plant origin ingredients, respectively. Comparing those data with earlier ones obtained (from 2002 to 2006), authors observed that the *Salmonella* prevalence reduced (30.9 to 19.4%), mainly as a result of the reduction in animal -origin ingredients, and consequently, in the final pet foods products (10.6 to 6.1%). The extrusion process can eliminate bacteria, however if the processing plant is contaminated (machine, utensils, floor, walls), the final product can be re-exposed. Contamination of the final product can occur from cross-contamination or recontamination from those environmental niches. Therefore, *Salmonella* can be spread directly to humans by handling contaminated pet foods and/or pet treats. The association between human outbreaks of salmonellosis and contact with pet foods *Salmonella*-contaminated and pet treats has been well discussed (Li et al., 2012) and need more data.

Regarding the SRC, which was evaluated in this study due to the fact that some samples (10) were packaged under vacuum (oxygen absence conditions), that may predispose contamination by anaerobic bacteria. The SRC levels ranged from 1.0 to 1.5×10^1 CFU/g and were present in all food samples, independent of samples type (vacuum, species or origin). These bacteria are able to form spores, which are resistant to heating process conditions and so during storage, provided that other intrinsic conditions that allow these spores germination to occur and vegetative multiplication of cells take place (with toxin production).

3.2 Fungi - hygiene and safety indicators

The contamination of pet food with fungi, depending on the genera and species, can represent serious risks to dogs and cats health. The FTC and fungi species identified by microcultiive technique are described in Table 2.

(a) Fungi load and its characteristics: the main microorganism contamination observed in the current dogs and cat's dry food analyzed was fungi. That was probably due to the fact that cereals in pet food are good substrate for fungi growth and represent around 80% of the total carbohydrates included in dry that type of food (de Souza Koerich and Scussel, 2013). All samples showed some levels of contamination, ranging from $<1.0 \times 10^2$ to 1.9×10^3 CFU/g. In general, the dog food

samples had higher FTC (2.4×10^2 ; ranging from $<1.0 \times 10^2$ to 1.9×10^3 CFU/g) than cat's (1.1×10^2 ; ranging from $<1.0 \times 10^2$ to 2.0×10^2 CFU/g). The FTC in the *dogs' food* varied among the different countries samples, with the highest count in the South America's samples (mean 2.8×10^2 CFU/g; min. $<1.0 \times 10^2$; max. 1.9×10^3), followed by Europe (2.2×10^2 CFU/g; min. $<1.0 \times 10^2$; max. 1.3×10^3) and North America (1.2×10^2 CFU/g; min. $<1.0 \times 10^2$; max. 2.0×10^2). Regarding the *cats' food*, the higher FTC was observed in the North America samples (mean 1.25×10^2 CFU/g; min. $<1.0 \times 10^2$; max. 2.0×10^2), followed by the same FTC mean in both samples of Europe and South America (mean 1.0×10^2 CFU/g). The highest fungi load (1.9×10^3 UFC/g) was observed in a dog food sample for adult from South America, conditioned in polyethylene sealed pack, however with oxygen. Even packed in suitable conditions to ensure the microbiological safety of the product, its detection indicates that fungal spores were present in these samples and that, when exposed to high humidity and temperature conditions, have developed. Special attention should be given to the type of material used in these packages (low oxygen permeability). Another point that should also be discussed is the exposure of the product at the final stage of exposure (point of sale). The practice of piercing the packaging for best available sales area compromises the safety and product quality, favoring bacterial and/or fungal contamination. In a study carried out by Miotto et al. (2010) with samples of dog's food commercialized in open bags in Southern Brazil, the FTC ranged from 1.0×10^1 to 5.8×10^6 CFU/g with mean of 5.8×10^5 CFU/g. This data confirmed that pet food sold in open bags can be re-contaminated with fungi spores, especially when food is pelleted and sold in bags widely open. In addition, these conditions also increase the humidity levels (mc and a_w) of final product leading to spore growth / germination (Suárez, 1999; de Souza Koerich et al., 2013).

The FTC low levels in the positive samples of the current study, were probably due to the reduced a_w and mc that the dogs and cats extruded foods reached. They pass through the extrusion process which reduces the mc from 25% (before drying) to a final mc of 9% (8 to 10%) in the product and indirectly reduce the viable spores of fungi and bacteria to germinate. Fungi are microorganisms more resistant to environmental stress conditions, such as low levels of a_w and mc if compared to bacteria. In general, fungal growth occurs in a_w varying from 0.68 to 0.89 (Jouany, 2007; Pitt and Hocking, 2009), thus lower than bacteria's. This information coincides with earlier studies that reported a significant decrease of fungi counts when the food

pelleting process was performed (Dalcero et al., 2002; Martins et al., 2003) where all positive samples exhibited low levels of contamination (1×10^1 to 1×10^2 CFU/g).

(b) Related to pet food quality - spoilage fungi: the damage caused by spoilage fungi is related to nutritional losses of raw materials and final product. In general, it has been shown that fungal propagules are an indicator of hygienic sanitary condition of commercial pet foods. Among fungal spoilage, species of *Aspergillus*, the *A. wentii* and *A. penicillioides* were isolated in 25 and 12.5% samples survived, respectively. Indeed, these species have been isolated from a wide variety of food, including flour, dried fish, rice, maize and cereals (wheat, barley), generally utilized as ingredients in pet food. These fungi have not been reported to produce mycotoxins.

Regarding the *Penicillium* spoilage fungi, the species *P. implicatum* was isolated in 28.6% of pet food samples, followed by *P. restrictum* (24%). The *P. implicatum* is one of the most xerophilic fungi, being able to germinate at a_w of 0.78 (Pitt and Hocking, 2009), whereas the other species (*P. restrictum*) grow at a_w of 0.82-0.83, condition observed in this study. They have been isolated mainly from cereals (maize, rice, wheat, barley) and their flour (Aziz et al., 2006). The *P. rugulosum* and *P. nalgiovense*, were isolated in 9.5% of samples. *P. rugulosum* has been reported quite frequently from dried and processed meat, cereals (rice, maize, barley, wheat), pulses (soybeans, peanut) (Pitt and Hocking, 2009; Aziz et al., 2006). These species do not produce mycotoxins, neither they are pathogenic to animals; however their proliferation increases temperature and moisture in the product (thus allowing conditions for toxigenic ones to grow) which is not welcome.

In addition, for the species *Cladosporium*, the *C. cladosporioides* was isolated in 12% of samples. That field fungus invades grains during ripening and the damages that are caused prior harvest; it does not develop during storage, except occasionally in stored high moisture conditions cereals. (Lazzari, 1997). In less frequency, other fungal species were isolated such as: *A. candidus* (4.2%), *Syncephalastrum racemosum* (8%), *Paecilomyces variotii* (3.4%) and *Trichoderma harzianum* / *Eurotium rubrum* / *Mucor hiemalis* / *Verticillium lecanii* (1.7%). The *Eurotium* genus requires lower a_w (0.70) to growth, which may initiate food deterioration with reduced a_w as that obtained in the extruded dry complete ones.

(c) **Related to pet food safety - toxigenic fungi:** the most often fungi genera isolated from the dry dogs and cats food in the current study were the storage ones: *Aspergillus* spp. (40%) and *Penicillium* spp. (35%), which are considered the most important storage fungi toxins producers. Those fungi are xerophilics, grow in conditions of low a_w (0.68 to 0.80), as those found in extruded pet food - *food classified as of intermediate moisture* (a_w from 0.60 to 0.89). On the other hand, the field fungi species isolated were *C. cladosporioides* in 11.7% (7/60) of samples, *T. harzianum* and *Verticillium lecanii* (in just one sample of Europe and South America each, respectively). Important to emphasize that no *Fusarium* genera was detected thus no harm of field toxins, fortunately.

Martins et al. (2003) evaluating fungi contamination in samples (60) of dry food for pets (dogs, cats and birds) of different brands collected from pet shops, the *Aspergillus* spp. was identified in 58.3% of samples, followed by *Penicillium* spp. and *Mucor* spp., which occurred in 38.3%. Campos et al. (2008), during a study carried out to isolate and identify the fungal microbiota in raw and dry pet foods, observed that *Aspergillus* was the predominant genera (65-89%), followed by *Penicillium* and *Fusarium*. On the other hand, Bueno et al. (2001) isolated *Aspergillus*, *Rhizopus* and *Mucor* in 62.48 and 38%, respectively in samples of pet food (21). Scudamore et al. (1997) also isolated *Penicillium* spp. and *Eurotium* spp. in pets' food. Regarding fungi contamination in feeds (farm animals: cattle, pigs and poultry), Abarca et al. (1994) identified *Penicillium*, *Aspergillus* and *Fusarium* genera in mixed feed. Dalcero et al. (1998), got also similar results in only poultry feed, though.

Among the toxigenic genera of *Aspergillus*, the species *A. parasiticus* (aflatoxin-producing fungus) was isolated in 42% of the current pet food samples, being more often observed in samples of South America (80% of fungi isolated). *A. parasiticus* is a tropical and subtropical species, less prevalent in warm temperate zones and rare in the cool temperate regions of the world (Pitt and Hocking, 2009). Regarding prevalence of *A. niger*, it was detected in 12.5% of samples. The *A. ochraceus*, which is a storage fungus, was isolated in 4.2% of the European samples. These fungi species, even as *A. niger* (isolated in 12.5% of samples), are important ochratoxins producers in warmer and tropical parts of the world. Ochratoxin A (OTA) can occur naturally in cereal and cereal-based foods and is a potent nephrotoxic and nephrocarcinogenic mycotoxin. This fungus grows in a_w of 0.77 and 0.83, condition that can be observed in pet food (Dalcero et al., 2002;

Pitt and Hocking, 2009).

Regarding the genera *Penicillium*, the species *P. expansum* (patulin, citrinin-producing fungus) was isolated in 28.6% of pet food samples, in which grow at 0.82-0.83 a_w , - condition observed in this study. They have been isolated mainly from cereals (maize, rice, wheat, barley) and their flour (Aziz et al., 2006). Patulin is reported to affect renal cells (Heussner et al., 2006), causing damaged to the DNA of mammalian cells and also oxidative stress response in those cells, which can lead to changes during transformation and differentiation (Liu et al., 2007) and citrinin is nephrotoxic (Scussel, 2002).

Important to emphasize that the presence of toxigenic fungi does not indicate mycotoxin production. In contrary, toxins may persist long after vegetative growth has occurred even after fungi death. However, the presence of certain fungi implicates a potential risk for animal health if under adequate/optimum growth conditions (Bueno et al., 2001).

3.3 Moisture conditions and risks to food quality and safety alterations

Considering the characteristics of pet food composition, some ingredients are quite prone to absorb humidity (grain/dry fruits) in high relative humidity conditions which allow bacteria and fungi to grow. In the current study, the dogs and cats food mc ranged from 7.02 to 16.28% and a_w of 0.485 to 0.893. The mc and a_w had the similar profile in samples from different countries surveyed, showing safer humidity levels in the North, South America's and Europe ones.

(a) mc: the dogs and cats' food mc levels showed to be low, with a mean of 8.89% (min 7.02; max. 16.28%) and 8.65% (min. 7.10; max. 11.9%), respectively. The mc levels of *dogs' food* showed little variation between Europe (mean 9.80%; min. 7.56; max.15.87%) and South American samples (mean 9.05%, min. 7.02; max. 16.28%). The North America samples had lower mc levels than the other countries in study, with mean of 7.83% (min. 7.65; max. 9.08%). The high mc (>12%) observed in two *adult* dog food samples of South America and Europe (16.28 and 15.87%, respectively) packaged in polyethylene pack sealed can compromise the safety and stability of those pet food providing moisture conditions for fungi and bacteria growth. Regarding *cats' food*, the mc level had the same profile as dogs'. The mean of mc in the European samples was 9.12% (min. 9.01; max. 9.52%), followed by South America (mean 8.82%, min. 7.10; max. 11.9%) and North

America samples, with a slightly lower mc (mean 8.03; min. 7.42; max. 8.65%). The mc lower than < 12% (observed in all samples of cat food) is considered safe to control biological contaminants development such as insects, mites, bacteria and fungi (Crane et al., 2000; Scussel, 2002), however, xerophilic fungi (*Aspergillus* and *Penicillium*) may be tolerant and remain viable for long periods of time, and when under adequate temperature and mc conditions for growth, they develop.

(b) a_w : dry complete pet food is considered intermediate moisture foods (a_w :0.60 and 0.89). The values obtained in the study ranged from 0.48 to 0.89 (mean 0.63) and 0.54 to 0.73 (mean of 0.64) for dogs and cats food, respectively. The *dogs' food* varied slightly between European (mean 0.69; min. 0.58; max. 0.89), South America (mean 0.61, min. 0.48; max. 0.82) and North America samples (mean 0.58; min. 0.56; max. 0.60). The highest a_w was observed in a sample for *adult* dog from Europe, packaged in polyethylene pack and well sealed. Regarding *cats' food*, the mean a_w of Europe samples was 0.70 (min. 0.68; max. 0.73), followed by South America with 0.65 (min. 0.60; max. 0.69) and North America samples with 0.57 (min. 0.54; max. 0.59). One of the major controlling factors for the microorganisms development such a pet food is the reduction of a_w , since bacteriological deterioration is rare at levels below 0.65 (Abellana et al. 1999, Scussel, 2002). Whereas, fungi is more tolerant to low a_w than bacteria, most xerophilic fungi of genera *Aspergillus* and *Penicillium* (main genera isolated in the current study) may grow in an a_w of 0.68 to 0.85 food and may cause spoilage (Jouany, 2007; Pitt and Hocking, 2009). The reduction of a_w , during and after the extrusion process, is achieved by the addition of anti-humectants, some of which have antimicrobial activity (e.g. propane, butane, sorbitol), maintaining food security in relation to microbial contamination.

4 Conclusion

The evaluation of pet food quality and safety is essential to ensure the pets health. The lack of microbiological standards set for dogs and cats foods make difficult the potential risk analysis that microbiological contaminants may cause to these animals. All parameters analyzed in this study entering in auto control programs, being considered danger points, as microbiological contaminants (bacteria and fungi) and humidity conditions. Regarding the bacteria or fungi levels detected, most of the samples data showed adequate and accepted levels, indicating that the handling conditions and process applied were enough to control/guaranty their microorganism

growth. Despite that, the humidity conditions (m_c and a_w), in some samples, were enough to allow fungi mycotoxins producers to grow. Packaging also is an important stage of the pet food production for microorganisms' control, and the material type choices, as well as the package sealing efficiency, are crucial to complete the whole safe inner content environment process. Regulatory standards are required for this segment, as has shown continuous economical progress, thus resulting in confidence by the consumers and the vet's clinical indication for the commercial safer pet food.

5 References

- Abarca, M.L., Bragulat, M.R., Castellá, G., Cabañes, F.J., 1994. Mycoflora and aflatoxin producing strains in animal mixed feeds. *Journal of Food Protection* 57, 256–258.
- Abellana, M., Benedí, J., Sanchis, V., Ramos, A.J., 1999. Water activity and temperature effects on germination and growth of *Eurotium amstelodami*, *E. chevalieri* and *E. herbariorum* isolates from bakery products. *Journal of Applied Microbiology* 87, 371-380.
- ABINPET. Associação Nacional dos Fabricantes de Produtos para Animais de Estimação, 2008. Manual do Programa Integrado de Qualidade Pet, São Paulo, 238 pp.
- Andrade, R.M., Nascimento, J.S., 2005. Presença de fungos filamentosos em ração para cães comercializadas na cidade de Pelotas – RS. *Arquivo do Instituto Biológico de São Paulo* 72, 2, 10-12.
- AOAC. Association Official Method of Analysis of AOAC Internacional, 2005. Thiex, NJW (Ed.). Animal feed. AOAC international, Gaithersburg, Maryland.
- APHA. American Public Health Association, 2001. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. Frances Pouch Downes & Keith Ito (Eds.), Washington DC. pp. 676, 2001.
- Aziz, N.H., Mattar, Z.A., Mahrous, S.R., 2006. Contamination of grains by mycotoxin-producing molds and mycotoxins and control by gamma irradiation. *Journal of Food Safety*, 26, 184–201.

Brazil. Ministry of Agriculture, Livestock and Supply, 2000. Norms and standards of nutrition and feed. MA/SARC/DFPA, Brasilia.

Brazil. Ministry of Agriculture, Livestock and Supply, 2007. Decree No. 6296/2007. Inspection and supervision required for products intended for animal feed. Official Daily of the Federative Republic of Brazil, Brasilia.

Brazil. Ministry of Agriculture, Livestock and Supply, 2009. Normative Instruction No. 30/2009, establishing criteria and procedures for products registration for labeling and advertising and exemption from products compulsory registration for feeding to companion animals. Official Daily of the Federative Republic of Brazil, Brasilia.

Bueno, D.J., Silva, J.O., Oliver, G., 2004. Mycoflora in commercial pet foods. *Journal of Food Protection* 64, 741–743.

Campos, S.G., Cavaglieri, L.R., Fernandez Juri, M.G., Dalcerro, 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. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 92, 377-383.

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

Crane, S. W., 2000. Griffin, R.W., Messent, P.R. Introduction to commercial pet foods. In: Hand, M. S., Thatcher, C. D., Remillard, R. L. (Eds), *Small animal clinical nutrition*. Topeka, Mark Morris Institute, pp. 111-126.

da Silva, N. (Ed.), 1997. *Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos*. Varela, São Paulo, 31 pp.

Dalcerro, A., Magnoli, C., Hallak, C., Chiacchiera, S. M., Palacio, G., Rosa, C.A.R., 2002. Detection of ochratoxin A in animal feeds and capacity to produce this mycotoxin by *Aspergillus* section Nigri in Argentina. *Food Additives and Contaminants* 19, 1065–1072.

de Souza Koerich, K., Scussel, V.M., 2012. Occurrence of dogs and cats diseases records in the veterinary clinics routine in South Brazil and its relationship to mycotoxins. *International Journal of Applied Science and*

Technology 2,129-134.

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

E.C. European Commission, 2002. Regulation of the European Parliament and of the Council. Regulation No 1774/2002 laying down health rules concerning animal by-products not intended for human consumption. *Official Journal of the European Communities*.

E.C. European Commission., 2005. Regulation of the European Parliament and of the Council. Regulation No 183/2005 laying down requirements for feed hygiene. *Official Journal of the European Communities*.

E.C. European Commission., 2009. Regulation of the European Parliament and of the Council. Regulation No 767/2009 on the placing on the market and use of feed. *Official Journal of the European Communities*.

FEDIAF. European Pet Food Industry Federation., 2010. Guide to good practice for the manufacture of safe pet foods, 66 pp.

Forsythe, S.J.(Ed.), 2002. *Microbiologia da segurança alimentar*. Artmed, Porto Alegre, pp. 216-211.

Franco, B.D.G.M, Landgraf, M., Destro, M.T. (Eds.), 2005. *Microbiologia dos Alimentos*. Atheneu, São Paulo, pp. 27-171.

Frisvad, J.C., Filtenborg, O., 1989. *Tervertricillate Penicillia*: Chemotaxonomy and mycotoxin production. *Mycologia* 6, 837-861.

Heussner, A.H., Dietrich, D.R. and O'Brien, E., 2006. In vitro investigation of individual and combined cytotoxic effects of ochratoxin A and other selected mycotoxins on renal cells. *Toxicology in Vitro* 20, 332-341.

Jay, J.M. (Ed.), 2005. *Microbiologia de alimentos*. Artmed, Porto Alegre, 712 pp.

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

Lazzari, F.A. (Ed.), 1997. Umidade, fungos e micotoxinas na qualidade de sementes, grãos e rações. Curitiba, 148 pp.

Li, X., Bethune, L.A., Jia, Y., Lovell, R.A., Proescholdt, T.A., Benz, S.A., Schell, T.C., Kaplan, G. and McChesney, D.G., 2012. Surveillance of Salmonella Prevalence in Animal Feeds and Characterization of the Salmonella Isolates by Serotyping and Antimicrobial Susceptibility. *Foodborne pathogens and disease* 8, 1-7.

Lindstrom, M., Kiviniemi, K., Korkeala, H., 2006. Hazard and control of group II (nonproteolytic) *Clostridium botulinum* in modern food processing. *International Journal of Food Microbiology* 108, 92-104.

Liu, B.H., Wu, T.S., Yu, F.Y., Su, C.C., 2007. Induction of oxidative stress response by the mycotoxin patulin in mammalian cells. *Toxicology Sciences* 95, 340–347.

Maciorowski, K.G., Herrera, P., Jones, F.T., Pillai, S.D., Ricke, S.C., 2007. Effects on poultry and livestock of feed contamination with bacteria and fungi. *Animal Feed Science and Technology* 133,109–136.

Marasas, W.F.O., 2001. Discovery and Occurrence of the Fumonisin: A Historical Perspective. *Environmental Health Perspectives*, 109, 239-243.

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

Michel, K.E., Willoughby, K.N., Abood, S.K., et al., 2008. Attitudes of pet owners toward pet foods and feeding management of cats and dogs. *JAVMA* 233, 1699–1703.

Miotto, M., Ramos, R.J., Cirolini, A., Cattani, C., Baseggio, A.M., Simas, C., Vieira, C.R.W., 2010. Preliminar evaluation of microbiological quality of food for dogs. In: Scussel, V.M., Nones, J., de

Souza Koerich, K., Santana, F.C. de O., Beber, M., Neves, L.S.D'e., Manfio, D. (Eds.), International Conference on pet food quality and safety & 14th National Mycotoxin Meeting, 14, 2010, Florianópolis. Abstract Book... Florianópolis: Pet Food Safe, p.57.

NRC. National Research Council, 2006. Nutrient requirements of dogs and cats. National Academy Press, Washington DC, 424 pp.

Pitt, J. I., Hocking, A. D. (Eds.), 2009. Fungi and food spoilage. New York, Springer, 524 pp.

Samson, R.A., Hoerckstra, E.S., Frisvad, J.C. (Eds.), 2004. Introduction to Food - and Airborne Fungi. Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS), Utrecht, Netherlands, 389 pp.

Scudamore, K.A., Hetmanski, M.T., Nawaz, S., Nylor, J., Rainbird, S., 1997. Determination of mycotoxins in pet foods solds for domestic pets and wild bird using linked-column immunoassay clean-up and HPLC. Food Additives and Contaminants 14, 175–186.

Scussel, V.M., 2002. Fungos em Grãos Armazenados. In: Lorini I., Mike, L; Scussel, V.M. (Eds), Armazenagem de Grãos. Ed. Biogeneziz, Campinas, Brazil, cap. 9, 938 pp.

Suárez, O., 1999. Manejo de los granos en las fábricas de alimentos. *Industria Avícola* 10, 18-21.

Threlfall E.J., Cheasty, T., Graham, A., Rowe, B., 1998. Antibiotic resistance in *Escherichia coli* isolated from blood and cerebrospinal fluid: a 6-year study of isolates from patients in England and Wales. *International Journal of Antimicrobial Agent* 9, 201–205.

Vieira, C.R.W., 2010. Bacterialproliferation in foods for pets: causes and control. In: Scussel, V.M., Nones, J., de Souza Koerich, K., Santana, F.C. de O., Beber, M., Neves, L.S.D'e., Manfio, D. (Eds.), International Conference on pet food quality and safety & 14th National Mycotoxin Meeting, 14, 2010, Florianópolis. Abstract Book... Florianópolis: Pet Food Safe, p.20.

Weber, R. W. S., Pitt, D., 2000. Teaching Techniques for Mycology. *Riddell's Slide Cultures. Mycologist* 3, 118-120.

Weese, J.S., Rousseau, J., Arroyo, L., 2005. Bacteriological evaluation of commercial canine and feline raw diets. *The Canadian Veterinary Journal* 6513–6516.

Zicker, S.C., 2008. Evaluating Pet Foods: How confident are you when you recommend a commercial pet food? *Topics in Companion Animal Medicine* 3, 121-126.

Table 1. Bacteria and fungi indicators and moisture data obtained from dogs and cats dry food and comparison with reference standards recommended

Pet food		Microbiological tests (CFU/g) ^a						Moisture conditions		
Country	Animal species	Parameters	MTCb	CTC ^c	EC ^d	SRC ^e	Salmonella	ETC ^f	mc ^g (%)	a _w ^h
NORTH AMERICA										
(n=10)	Dog	Minimum	<1.0x10 ¹	<1.0x10 ¹	ND	<1.0x10 ¹	ND	<1.0x10 ²	7.65	0.56
		Maximum	2.4x10 ²	4.0x10 ¹	ND	1.2x10 ¹	ND	2.0x10 ²	9.08	0.60
		Mean	6.1 x10 ¹	2.0x10 ¹	NA	1.0x10 ¹	NA	1.2x10 ²	7.83	0.58
		SD	91.52	12.65	NA	0.81	NA	40.82	1.04	0.02
		RSD%	148.42	63.21	NA	8.10	NA	34.98	13.28	3.44
	Cat	Minimum	<1.0x10 ¹	<1.0x10 ¹	ND	<1.0x10 ¹	ND	<1.0x10 ²	7.42	0.54
		Maximum	2.0x10 ¹	2.0x10 ¹	ND	1.2x10 ¹	ND	2.0x10 ²	8.65	0.59
		Mean	1.2x10 ¹	1.5x10 ¹	NA	1.1x10 ¹	NA	1.25 x10 ²	8.03	0.57
		SD	5.00	5.77	NA	1.15	NA	50.0	0.50	0.02
		RSD%	40.00	38.46	NA	10.45	NA	40.0	6.22	3.51
EUROPE										
(n=16)	Dog	Minimum	<1.0x10 ¹	<1.0x10 ¹	ND	<1.0x10 ¹	ND	<1.0x10 ²	7.56	0.58
		Maximum	2.0x10 ¹	2.0x10 ¹	ND	1.5x10 ¹	ND	1.3x10 ³	15.87	0.89
		Mean	1.1x10 ¹	1.2x10 ¹	NA	1.1x10 ¹	NA	2.2x10 ²	9.80	0.69
		SD	3.16	3.49	NA	1.63	NA	379.47	2.27	0.07
		RSD%	28.72	29.08	NA	14.81	NA	172.45	23.16	11.15
	Cat	Minimum	<1.0x10 ¹	<1.0x10 ¹	ND	<1.0x10 ¹	ND	<1.0x10 ²	9.01	0.68
		Maximum	2.3x10 ²	1.5x10 ¹	ND	1.1x10 ¹	ND	1.0x10 ²	9.52	0.73
		Mean	4.8x10 ¹	1.1x10 ¹	NA	1.0x10 ¹	NA	1.0x10 ²	9.12	0.70
		SD	89.0	2.04	NA	0.41	NA	4.08	0.56	0.01
		RSD%	185.4	18.21	NA	4.10	NA	4.01	6.14	1.42
SOUTH AMERICA										
(n=34)	Dog	Minimum	<1.0x10 ¹	<1.0x10 ¹	ND	<1.0x10 ¹	ND	<1.0x10 ²	7.02	0.485
		Maximum	2.2x10 ²	2.0x10 ¹	ND	1.3x10 ¹	ND	1.9x10 ³	16.28	0.82
		Mean	2.7x10 ¹	1.2x10 ¹	NA	1.0x10 ¹	NA	2.8x10 ²	9.05	0.61
		SD	42.86	3.20	NA	0.89	NA	388.37	1.76	0.06
		RSD%	158.74	28.57	NA	89.00	NA	138.70	19.44	9.82

Cat	Minimum	<1.0x10 ¹	<1.0x10 ¹	ND	<1.0x10 ¹	ND	<1.0x10 ²	7.10	0.60
	Maximum	3.0x10 ¹	2.0x10 ¹	ND	1.2x10 ¹	ND	1.2x10 ²	11.90	0.69
	Mean	1.3 x10 ¹	1.3x10 ¹	NA	1.0x10 ¹	NA	1.0x10 ²	8.82	0.65
	SD	7.56	4.88	NA	0.97	NA	7.56	1.51	0.03
	RSD%	58.15	37.54	NA	97.00	NA	7.41	17.12	4.61
Reference standards*									
NRC (2006)	Adequate	< 10 ⁵	<10 ¹	Absence	NE	Absence	<1.0x10 ¹	NA	<0.60
ABINPET (2008)	Acceptable	10 ⁵ - 10 ⁷	10 ¹ -10 ⁴	Absence	NE	Absence	10 ³ -10 ⁴	6.0-12.0	0.60-0.89
	Unacceptable	> 10 ⁸	>10 ⁵	Presence	NE	Presence	>10 ⁵	>14	>0.89

^acolony-forming unit/g; ^bmesophilic total count; ^ccoliforms total count; ^d*Escherichia coli*; ^esulfite-reducing clostridium; ^ffungi total count; ^gmoisture content; ^hwater activity; *level recommended (not regulation set); SD: standard deviation; RSD: relative standard deviation; ND: not detected; NA: not applied; NE: not established

Table 2. Fungi genera and species isolated from dogs and cats dry food commercialized in different countries

Fungi isolated		Mycobiota				Fungi characteristics				
Class	Species	Frequency n (%)				Origin		Safety (toxin)		Pet food ingredients
		General	North America	South America	Europe	Field	Storage	Producer	Type	
Toxigenic										
<i>Aspergillus</i>										
	<i>A. parasiticus</i>	10/60 (17)	2/10 (20)	8/34 (23.5)	NI	AP	AP	TP	AFL	Nuts, peanuts, maize, rice, meat
	<i>A. wentii</i>	6/60 (10)	1/10 (10)	5/34 (14.7)	NI	AP	AP	TP	EM	Peanuts, maize, soybeans, rice, cereal, wheat and barley
	<i>A. niger</i>	3/60 (5)	2/10 (20)	1/34 (3.0)	NI	AP	AP	TP	OTA	Cereal and based foods, nuts, meat
	<i>A. ochraceus</i>	1/60 (1.7)	NI	NI	1/16 (6.25)	AP	AP	TP	OTA	Dried and stored foods, soybeans
<i>Penicillium</i>										
	<i>P. expansum</i>	6/60 (10)	NI	6/34 (17.6)	NI	AP	AP	TP	PTL/CTR	Apple, fruits, maize, wheat, rice, barley, meat and products
	<i>P. rugulosum</i>	2/60 (3.4)	NI	NI	2/16 (12.5)	AP	AP	TP	RGL	Meat, rice, maize, barley, wheat, soybeans, peanuts
Spoilage										
<i>Aspergillus</i>										
	<i>A. penicillioides</i>	3/60 (5)	1/10 (10)	2/34 (6.0)	NI	AP	AP	NP	NA	Dried fruit and fish, rice, meats, peanuts
	<i>A. candidus</i>	1/60 (1.7)	NI	1/34 (3.0)	NI	NA	AP	NP	NA	Cereal, wheat, maize, rice, barley
<i>Penicillium</i>										
	<i>P. implicatum</i>	6/60 (10)	4/10 (40)	1/34 (3.0)	1/16 (6.25)	NA	AP	NP	NA	Maize and dried foods
	<i>P. restrictum</i>	1/60 (1.7)	NI	4/34 (11.7)	1/16 (6.25)	NA	AP	NP	NA	Wheat, meat, soybean and feed
	<i>P. nalgiovense</i>	1/60 (1.7)	NI	2/34 (6.0)	NI	NA	AP	NP	NA	Meat, nuts and cheese
Others genus										
	<i>C. cladosporioides</i>	7/60	1/10 (10)	4/34 (11.7)	2/16 (12.5)	AP	NA	NP	NA	Wheat, barley, rice, sorghum, meat and vegetables
	<i>S. racemosum</i>	5/60 (8.3)	NI	5/34 (14.7)	NI	NA	AP	NP	NA	Nuts, meat, maize and rice
	<i>Trichoderma harzianum</i>	1/60 (1.7)	NI	NI	1/16 (6.25)	AP	NA	NP	NA	Salmon, peas, maize
	<i>Paecilomyces variotii</i>	1/60 (1.7)	NI	2/34 (6.0)	NI	NA	AP	NP	NA	Raw materials containing oil, cereal, peanut and meat

<i>Eurotium rubrum</i>	1/60 (1.7)	NI	NI	1/16 (6.25)	NA	AP	NP	NA	Cereal, wheat, maize, rice, nut and meal
<i>Verticillium lecanii</i>	1/60 (1.7)	NI	1/34 (3.0)	NI	AP	NA	NP	NA	Cereal and maize
<i>Mucor hiemalis</i>	1/60 (1.7)	NI	1/34 (3.0)	NI	NA	AP	NP	NA	Fresh vegetables, maize and rice

AFL: aflatoxin; EM: emodin; OTA: ochratoxin A; PTL: patulin; CTR: citrinin; RGL: rugulosin; NI: not isolated; TP: toxin producer; NP: not toxin producer; AP: applied

CAPÍTULO 5

BIOACTIVE AMINES PROFILE AND THEIR CORRELATION TO PROTEIN CONTENT AND BACTERIA LOAD IN DOGS AND CATS FOOD

Trabalho submetido:

Journal of Agricultural and Food Chemistry (ISSN 0021-8561)
jf-2013-03686d

BIOACTIVE AMINES PROFILE AND THEIR CORRELATION TO PROTEIN CONTENT AND BACTERIA LOAD IN DOGS AND CATS FOOD

Karina Koerich de Souza^{a*}, Maria Beatriz Abreu Gloria^b, Vildes Maria Scussel^a

*^aLaboratory of Mycotoxicology and Food Contaminants, Food Science and Technology Department, Center of Agricultural Sciences, Federal University of Santa Catarina, 88034-001, Brazil. *Corresponding author. Tel/fax: +55 48 3721-5386. E-mail address: kakoerich@yahoo.com.br*

^bLaboratory of Food Chemistry, Food Department, Faculty of Pharmacy, Federal University of Minas Gerais, Av. Antônio Carlos, 6627, Pampulha, Belo Horizonte, MG, CEP 31270-901, Brazil

Abstract

This work reports an evaluation of bioactive amines (biogenic amines and polyamines) profile and levels in dry and wet food (102) for dogs (67) and cats (35) commercialized in different countries (America and Europe) and their relation to protein content and bacteria load. The predominant biogenic amines was histamine (96%) followed by putrescine, cadaverine (92%) and tyramine (90%). The agmatine, phenylethylamine and tryptamine were detected in lower frequencies (56, 49 and 36%, respectively). The levels varied from 0.60 to 388.2 mg/Kg (mean of: 49.1 mg/Kg). Despite that, in 96% of samples had lower levels when compared to those set as potentially toxic for humans (total maximum tolerance level: 100-200 mg/Kg). Regarding the polyamines, spermidine and spermine were detected in all samples in varied levels (ranged from 6.10 to 65.4 mg/Kg) and serotonin was not detected in any sample. It was observed a correlation between amines levels and protein content present in the pet food samples (4.5 to 42.0%), whereas no correlation was registered with bacteria load data ($<1.0 \times 10^1$ to 2.4×10^2 UFC/g). Important to emphasize, that there is no bioactive amines regulation for pet food. Despite this, their presence in pet foods is considered quality and safety indicators.

Key words: dog, cat, pet food, bioactive amines, protein, bacteria

1 Introduction

The bioactive amines are organic bases of low molecular weight which participate in normal metabolic processes in living tissues. They can be formed and degraded as a result of normal metabolic activity in animals, plants and microorganisms. Thus, they are found naturally in low concentrations in animal and plant tissues (Halász et al., 1994; Salazar et al., 2000). However, higher levels of bioactive amines during food storage may indicate loss of quality, especially those foods that have high protein content (Silva and Gloria, 2002). They can be classified into biogenic amines (BAs) and polyamines (PAs). The most important BAs are histamine (HIM), putrescine (PUT), cadaverine (CAD), tyramine (TYM), tryptamine (TRM), phenylethylamine (PHE) and agmatine (AGM) and PAs are serotonin (SRT), spermidine (SPD) and spermine (SPM).

The BAs and PAs are commonly present in vegetables and animal raw materials (meat, fish, fruits, grains and other vegetables) that can be added to pet food, in particular to those where high levels of protein need to be present (Askar and Treptow, 1989). The amounts of BAs and PAs formed are strongly influenced by the food composition, specially the amino acid availability and the microbial flora. Other parameters are food additives inclusion, temperature and moisture content variation, ripening stage and packaging type (Carelli et al., 2007; Gloria and Vieira, 2007).

The high amounts of BAs and PAs produced by microorganisms are due to the enzymatic activity of amino acid decarboxylases (Ruiz-Capillas and Jiménez-Colmenero, 2004). Therefore, they can be considered indicators of food quality (Tasić et al., 2012), as the original levels can highly change during food processing and storage, especially affected by the bad hygienic conditions. High concentrations (> 50mg/Kg) can be attributed to poor maintenance and/or early deterioration process. Some of the major applications of bioactive amines analyses are quality control of raw materials, intermediates and end products (Salazar et al., 2000; Tasić et al., 2012).

The BAs are toxic substances when present in high amount in food (> 50mg/Kg), which can cause disease in animals and human. Their excessive presence interferes on the metabolism balance with different degrees of diseases (on the nervous, gastric and vascular systems, increasing blood pressure). The BAs pharmacological effects vary with their type and quantity: TRM, TYM and PHE increase the blood pressure; CAD and PUT are responsible for reduction blood

pressure (hypotension) and HIM is responsible for primary mediator of the allergic response immediate (Shalaby, 1996; Önal, 2007). A low BAs level in food is not considered a serious health risk; however pets eat same type of food in a daily basis, thus more exposed to any contaminant that may be present in it, compromising animal's health (de Souza and Scussel, 2013).

The PAs have no adverse health effect, but they may react with nitrite to form carcinogenic nitrosamines and also can be proposed as indicators of spoilage, as the BAs, PUT and CAD (Eerola et al., 1997). In view of the potential relevance of bioactive amines for animal health and food safety, it is a critical importance to monitor their levels in pet food and the animal exposure assessment.

Good hygiene standards on handling food with relevant storage temperature (Balamatsia et al., 2007) play the key roles on prevention of bioactive amines formation. Since they are formed by the bacteria flora of food material, bacterial growth prevention and/or BAs production inhibition should be very important for food safety. In addition, it has been reported that BAs are not significantly reduced by high temperature treatments (Shalaby, 1996).

For human consumption, the US Food and Drug Administration (FDA, 1996) established tolerance level of HIM (100 mg/kg) in some fish species. The same has been set in Brazil by the Ministry of Agriculture, Livestock and Supply for HIM in fish, in a lower level though (100 mg/Kg) (Brazil, 1997). The levels of HIM in food are also restricted by the European Union - EU (100 mg/kg), South African (100 mg/kg), and Australian (200 mg/kg) (EC, 2005; South Africa, 2001; Australia, 2001). In the EU, the acceptable levels for human consumption of HIM, TYM, and PHE in fermented foods are 50-100, 100-800 and 30 mg/kg, respectively (EC, 2005). Despite the absence of BAs specific rules and regulations regarding their occurrence in pet food, there is an increasing interest on their monitoring, since they may be toxic to sensitive animals and can be an indicator of good manufacturing practices (Gloria et al., 2010), whereas their presence in some raw material (fresh fish, meat and vegetables) may serve as an indicator of undesired microbial activity (Ruiz-Capillas and Jimenez-Colmenero, 2004).

Considering that (a) human contamination from ingestion of food with bioactive amines have been reported worldwide, (b) lack of available information regarding BAs and PAs in pet foods and (c) the possible toxic effects in pets' health, this work reports an investigation on BAs and PAs profile and levels in dry and wet food for dogs and cats

commercialized in different countries, as well as their correlation to protein contents and bacteria load.

2 Materials and methods

2.1 Materials

2.1.1 Samples: a total of 102 pet food, dry (44) and wet (58) for dogs (67) and cats (35) at two life stages (81 and 21 samples for adult and puppy, respectively) from different brands, in their original sealed packs/cans/sachets (size: 0.2 to 2 kg), commercialized in North America (15), South America (59) and European Union (28).

2.1.2 Chemicals:(b.1) reagents - potassium hydroxide (KOH), sodium acetate, acetic acid, octanesulfonic acid sodium salt, boric acid, *o*-phthalaldehyde (OPA), Brij 35 and mercaptoethanol, all analytical grade (Vetec, Rio de Janeiro, Brazil). Triton X-100 (Sigma Chemical, St. Louis, USA); *(b.2) solvents* - 5% trichloroacetic acid (TCA), acetonitrile and methanol, all HPLC grade (J.T.Baker, Texas, USA), saline peptone water 0.1% and ultrapure water (Millipore, Massachusetts, United States).

*2.1.3 Bioactive amines standards:*putrescinedihydrochloride (PUT), cadaverinedihydrochloride (CAD), tyraminehydrochloride (TYM), HIMtamine dihydrochloride (HIM), 5-hydroxytryptamine hydrochloride (serotonine – SRT), creatininesulfate complexagmatine (AGM), spermidinetrihydrochloride (SPD), sperminetetrahydrochloride (SPM), 2-phenylethylamine hydrochloride (PHE) and tryptamine (TRM) (Sigma Chemical, St. Louis, USA).

2.1.4 Culture medium: Plate Count Agar (PCA) for bacteria total count.

2.1.5 Equipment: drying oven (Fanem, Sao Paulo, Brazil), analytical scale (Shimadzu, Kioto, Japan), vacuum pump (Tecnal, São Paulo, Brazil), water bath (Quimis, Sao Paulo, Brazil), muffle (Quimis, Sao Paulo, Brazil) and Liquidchromatography (LC) withfluorescence detector - FLD (Shimadzu, Kyoto, Japan), auto-sampler model SIL-10 ADvp andC₁₈reverse phasecolumn (3,9 x 300 mm, 10 µm) (Waters, Milford, MA, EUA).

2.1.6 Other materials: non-vacuum desiccators Ø 200 mm and membrane filter with 0.47 µm and 0.45 mm for porosity and diameter, respectively (Millipore Corporation, Massachusetts, USA).

2.2 Methods

2.2.1 Sample collection and preparation: the sealed packs of dogs and cats food were purchased randomly from supermarkets and pet stores in North America (Canada and Mexico), European Union (Austria, Finland, France, Germany, Italy and Switzerland) and South America (Argentina, Brazil, Chile and Uruguay). Each of them was homogenized and divided into portions for the following analyses:

2.2.2 Bioactive amines determination: amines were extracted from samples (5 g) with 7 ml 5% TCA). After agitation for 5 min in a vortex mixer, the supernatant was collected. The solid residue was extracted twice more with volumes of 7 and 6 ml of TCA. Supernatants were combined and filtered through 0.45 mm membranes. The amines were separated by ion-pair reverse phase HPLC (C_{18} reverse phase column) and quantified fluorimetrically (350 nm excitation and 450 nm emission) after post-column derivatization with OPA, as described by Vale and Gloria (1997). The mobile phases were: A, solution of 0.2 M sodium acetate and 15 mM 1-octanesulfonic acid sodium salt, adjusted to pH 4.9 with acetic acid, and B, acetonitrile. The flow rate was set at 0.6 ml/min and the gradient was: 13 min at 11% B, 19 min at 29% B, 24 min at 11% B, and 55 min at 11% B. The post-column derivatization reagent was delivered at 0.4 ml/min. It consisted of 1.5 ml Brij-35, 1.5 ml mercaptoethanol and 0.2 g OPA dissolved in a 500 ml solution of 25 g boric acid and 22 g KOH (pH adjusted to 10.5 with 3% KOH). The identification of amines was performed by comparison of retention time in samples to standard solutions. *BAs standard solution preparation:* they were prepared in the buffer solution at a concentration of 1 mg/ml acid hydrochloric 0.1 mol/L. From 1 mL aliquots of each solution individuals, there was obtained 10 ml of standard solution containing ten amines. The limits of detection were 0.4 mg/Kg.

2.2.3 Protein content: the data on protein content was obtained from each dogs and cats nutritional guaranteed levels described in the pet food packs, cans and/or sachets (de Souza Koerich, et al., 2013).

2.2.4 Bacteria total count: the methodology applied for bacteria total count was that described by APHA (2001) and the results expressed in colony forming unit (CFU/g).

2.2.5 Statistical methods: the Shapiro-Wilk test was applied to check the normality of the quantitative data for each treatment. To compare the levels of BAs and PAs within each group, paired tests were used: Student's t test for paired samples test (parametric) and Wilcoxon test (nonparametric). To compare the levels of BAs and PAs into group's

independent tests were used unpaired t test for independent samples test (parametric) and Mann-Whitney (nonparametric). The Spearman correlations (linear correlation coefficient -R) were applied to identify possible associations between BAs/PAs with protein content and bacteria total count (bivariate analysis). Interpretation of values was performed according to Spearman's R (inexistent: $0\% \leq R \leq 20\%$; weak: $20\% < R \leq 50\%$; moderate: $50\% < R \leq 80\%$; strong: $80\% < R \leq 100\%$). In all tests, the result was considered significant if the P value < 0.05 . The analyses were carried out with software Statistics version 7.

3 Results and discussion

The levels of bioactive amines (BAs and PAs) and their correlation to the protein content and bacteria load of the dry and wet food for dogs and cats from different countries varied. Data on the type of animal and/or vegetal protein included in the samples and the studied parameters are described in Tables 1 and 2, respectively.

3.1 BAs profile and levels

General data: the presence of BAs in foods and feeds is a typical indicator of spoilage. The predominant amine in the pet food evaluated was HIM (96%) followed by PUT/CAD (92%) and TYM (90%). The AGM, PHE and TRM were detected in lower frequencies (56, 49 and 36%, respectively). The levels of BAs varied widely among samples, as indicated by the coefficients of variation in Table 2. An increasing value of HIM, PUT and CAD is usual observed in products with microbial contamination (Ruiz-Capillas and Jiménez-Colmenero, 2004). The higher values of HIM were detected in pet food based in fish (salmon and cod) with amounts that ranged up to 102.3 mg/kg. This HIM level, which is higher than the toxic level 100mg/Kg for human health (Gloria, 2005), can cause damage for the pet's health if consumed (there is no regulation for pet food). Important to emphasize that once HIM formed, any heat treatment applied to food will be able to destroy it (Huss, 1997). The others BAs were detected in lower level than the toxic level established for human health. Considering the TYM (100 mg/Kg), HIM (100 mg/Kg), PHE (30 mg/Kg) or a BAs total (100-200 mg/Kg) as toxic level established for human health (Gloria, 2005), a comparison of these toxic levels was made with the levels obtained in the pet food of the current study. A percentage of 96% of samples had levels lower than those parameters described in the literature for

toxicological effects in human, whereas one sample of dry food for adult dogs produced in South America had HIM level above that toxic limit (102.3 mg/Kg) and three samples had BAs total higher than the toxic level (detected in dry food for adult dogs produced in North America: 388.2 mg/Kg and dry food for adult cats and kitten produced in Europe: 234.0 and 341.5 mg/Kg, respectively).

Different countries: HIM was the BA most detected in South America and Europe Union samples (with 100 and 89% of frequency, respectively), whereas PUT/CAD (86%) and TYM (82%) were in less frequency. In the North America samples, CAD and TYM were detected in 100% of them, followed by HIM and PUT (94 and 87% of samples, respectively). On the other hand, data of AGM and PHE showed that they are detected in more frequency in North (67% of both), followed by South America (57.6 and 52.5%) and lower in the European samples (46 and 39%). Correlating the BAs levels with protein content and bacteria load, the data indicated that in the North America samples, it was observed higher levels of BAs (88.8 mg/Kg) when compared to South America and Europe (42.5 and 39.7 mg/Kg, respectively). The data corroborated to the high results of protein content (mean of 24.4%) and bacteria load (mean of 3.0×10^1 UFC/g). Lower levels were observed in samples from Europe (39.7 mg/Kg of BAs, 17% of protein content and 1.8×10^1 CFU/g). The Linear correlation Spearman indicated significant positive correlation of BAs levels in North and South America samples with the amount protein added in the pet food samples ($P < 0.05$).

Types of food: in dry food the PUT, CAD and TYM were detected in 100% of samples, followed by HIM (98%). With respected to wet food, HIM was the most observed in that type samples (93%), followed by CAD (83%) and PUT/TYM in the same frequency (79.5%). The data of AGM, PHE and TRM showed to be different between the dry and wet food: the AGM and PHE were detected in 91.4% and TRM in 64% of dry samples. Regarding wet food, the AGM was detected only in 4.5% of samples and PHE/TRM was not detected at all. Thus, the BAs levels obtained in the dry pet food were higher than in the wet's (78.5 and 19.8 mg/Kg, respectively), which can be explained by the different protein content added into the dry if compare to wet food (25.6 and 8.64%, respectively). The amounts of BAs formed are strongly influenced by the food composition, specially the amino acid (protein) availability, apart from bacterial contamination present. The animal and vegetal proteins included in dogs and cats' food with possibilities of Bas formation is described in Table 1. Important to emphasize that dry food has more vegetal protein added than wet. Regarding the bacteria load, the

high contamination was observed in dry food if compare to the wet food (mean of 2.8×10^1 and 0.5×10^1 CFU/g, respectively). It is important to emphasize that the material type used to pack may influence in the environment conditions and contaminations (moisture absorption leading to development of bacteria, fungi, mites and insect). Three samples of dry pet food had cardboard as pack, which is not indicated to guarantee the safety of the product. The type of pack material utilized to wet food (cans and sachets) is more secure than other materials, being hermetically closed after the products sterilization process. However, the presence of BAs in food does not necessarily directly correlate with the growth level of spoilage organisms, because they may not all be decarboxylase-positive – BAs producers (Ruiz-Capillas and Jiménez-Colmenero, 2004).

Animal species: in dogs' food, PUT was the BAs most detected (98.5%), followed by HIM (97%), CAD and TYM (95.5%). In lower extent, the AGM, PHE and TRM were detected in 59.7, 52 and 32.8% of the samples, respectively. Data of cats' food showed that HIM was the BAs prevalent, followed by CAD (85.7%), PUT and TYM (82.8%). The AGM and PHE/TRM were detected in 51.4 and 42.8% samples. Regarding BAs levels, they were significantly higher than those of PAs. It was observed that cat food had higher levels of BAs (mean of 58.0 mg/Kg) if compare to dogs (43.7 mg/Kg) ($P < 0.05$). The same was observed to protein content, which cat's food had more protein than dog's food (18.6 and 17.5%, respectively), since cats' nutrient requirement regarding protein is higher than dogs' (Dickinson and Scott, 1956). In those cats' samples it was observed a weak correlation between BAs levels and protein content (mean of 58.0 mg/Kg and 18.6%, respectively) ($R = 14.0\%$; $P > 0.05$). Regarding the bacteria total count, there was not a significant difference between cats and dogs food (mean of 1.7×10^1 and 2.1×10^1 CFU/g, respectively) ($R = 35.5\%$; $P < 0.05$). The maximum level of BAs detected for CAD was 157.0 and 123.0 mg/Kg, followed by HIM with 102.3 mg/Kg in dogs' food and TYM of 87.3 mg/Kg in puppy food.

Life stage: in adult pets food the prevalent BAs were also HIM (98.7%) followed by CAD/PUT (92.4%) and TYM (88.6%). On the other hand, a lower percentage of the samples had AGM, PHE and TRM (58.2, 50.6 and 35.4%). Data of puppy food showed that TYM was the BAs prevalent (100%), followed by CAD (91.3%), PUT and HIM (86.9%). The AGM and PHE/TRM were detected in 56.5 and 43.5% samples, respectively. In the samples of adult food, was observed moderate correlation between BAs with the protein content present in

the samples ($R=77.0\%$; $P<0.05$). The BAs levels obtained in adult and puppy food were 49.4 and 45.7 mg/Kg, respectively, however, without significant difference ($P>0.05$). The maximum level of BAs detected was CAD, with 157.0 and 123.0 mg/Kg, followed by TYM (83.7 and 87.3 mg/Kg in adult and puppy food, respectively).

3.2 PAs profile and levels

General data: the SPD and SPM were detected in all samples (100%) analyzed in a wide variation levels, as expected, since they are widely distributed in plants and animals and play important roles in cellular division and growth (Bardócz, 1995; Halász et al., 1994). They ranged from 6.10 to 65.4 mg/Kg, independent of the pet food characteristics. The SPM contents are commonly higher in foods of animal origin than SPD, which is an inverse relation to that observed in materials of vegetable origin (Kalač, 2009), both used for the production of pet food. Red meat and meat products are included among the main dietary sources of SPM (Bardócz, 1995), however, inner organs were characterized by approximately three times higher PAs concentrations than fresh meat and regularly processed into pet food. These data can be useful to determine the PAs exposure assessment of humans or pets. These compounds have been identified as promoters of cell growth and immune system regulations, being considered a fundamental part of living tissue (Larqué et al., 2007). The SRT was the only bioactive amine that was not detected in the samples analyzed, despite of type or animal species.

Different countries: regarding the PAs levels, the data followed the same behavior as the BAs, with higher levels in the North America samples (mean of 32.5 mg/kg; ranged from 10.4 to 49.6 mg/kg; RSD% 44.1) when compared to South American (mean of 31.6 mg/Kg; ranged from 11.7 to 65.4 mg/Kg; RSD% 37.9) and European (mean of 22.7 mg/kg; ranged from 6.10 to 52.6 mg/Kg RSD% 54.6). In North America pet food, the levels of SPD and SPM (mean of: 19.0 and 13.4 mg/Kg) were higher than Europe (mean of 11.6 and 16.2 mg/Kg) and South America (11.1 and 15.5 mg/kg) respectively. The Linear correlation Spearman indicated significant positive correlation of PAs levels in North and South America samples with the amount protein added in the pet food samples ($P<0.05$).

Types of food: in dry pet food, the PAs levels were significantly lower than the BAs. In contrary, in the wet food, the PAs levels were significantly higher than the BAs content. Despite that, the

PA levels in dry food were higher than wet food (35.3 and 23.6 mg/Kg). It was observed a weak correlation between PAs and protein content ($R=23.2\%$; $P<0.05$). The dry pet food had more protein content (mean of 25.6%; ranged from 12.0 to 42.0%; RSD% 22.9) than wet food (mean of 8.64%; ranged from 4.5 to 16.0%; RSD% 20.0), due to the type and quantity of raw material used (vegetal/animal protein and sub products), since it is designated as complete food. The wet food has more inclusion of animal protein and a lower inclusion of vegetal protein in the formulation. Regarding SPD levels, it was detected higher levels in dry food than wet (21.0 and 7.80 mg/Kg, respectively), whereas the levels of SPM were similar, independent of food characteristics (14.8 and 12.9 mg/Kg, respectively).

Animal species: the PAs levels follow the same conduct of BAs. It was observed that the cat food had higher levels of PAs (31.2 mg/Kg; ranged from 6.10 to 60.9 mg/Kg RSD% 23.4) if compare to dog food (28.3 mg/Kg, ranged from 10.3 to 65.4 mg/Kg RSD% 46.8). This profile can be explained by the protein content included in the pet food, which cat's food had more protein than dog's food (18.6 and 17.5%, respectively). The levels of SPD and SPM were similar in dogs (mean of 14.9 and 13.5 mg/Kg) and cats food (mean of 16.2 and 15.0 mg/Kg), respectively, without significant difference.

Life stage: in the samples of adult food, was observed moderate correlation between PAs with the protein content present in the samples ($P<0.05$). The PAs levels obtained in adult and puppy food were 29.6 and 28.3 mg/kg, respectively, however, without statistic significant difference ($P>0.05$). The independent levels of SPD and SPM had the same conduct of general levels of PAs, were similar in adult (mean of 15.6 and 14.0 mg/Kg) and puppy food (mean of 14.3 and 13.9 mg/Kg), respectively.

4 Conclusion

This work showed the first preliminary data of bioactive amines content in wet and dry pet food. The predominant BAs were HIM followed by PUT, CAD and TYM; regarding PAs, SPD and SPM were detected in all samples. The SRT was the only bioactive amine that was not detected in the samples analyzed. The Bas and PAs levels detected were lower in 96% of samples when compared to those set as potentially toxic for humans and the LMT for consumption. The levels of bioactive amines showed correlation with their protein content, however no significant correlation was observed with the bacteria load.

The data could not compare to pet animal regulation as there is none set to data. However, we must consider that pets eat the same type of food on a daily basis (industrialized food), thus they are more exposed to any contaminant that may be present in it, compromising their health. In view of the potential relevance of biogenic amines for human and pets' health, it is important to monitor their levels in dogs and cats food, ensuring the safety to consume. Thus, further studies are necessary to establish safety limits for bioactive amines in pet food.

References

APHA. American Public Health Association, 2001. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, fourth ed. Washington DC.

Askar, A., Treptow, H., 1989. Biogene amine in fleisch-produkten. Ernährung Nutrition. 13, 425.

Australia. Australian Food Standards Code, 2001. Part D: Fish and fish products. Standards D1 and D2.

Balamatsia, C.C., Patsias, A., Kontominas, M.G., Savaidis, I.N., 2007. Possible role of volatile amines as quality-indicating metabolites in modified atmosphere-packaged chicken fillets: Correlation with bacteriological and sensory attributes. Food Chem. 104, 1622-1628.

Bardócz, S., 1995. Polyamines in food and their consequences for food quality and human health. Trends in Food Science and Technology, 6: 341-346.

BRASIL, Ministry of Agriculture, Livestock and Supply, 1997. Ordinance No. 185, 13/05/1997. Technical regulation of identity and quality of fresh fish (whole or gutted). Official Daily of the Federative Republic of Brazil, Brasilia.

Carelli, G., Decaro, N., Lorusso, A., Elia, G.; Lorusso, E., Mari, V., Ceci, L., Buonavoglia, C., 2007. Detection and quantification of *Anaplasma marginale* DNA in blood samples of cattle by real-time PCR. Veterinary Microbiology, 124, 107-114.

de Souza, K. K., Scussel, V.M., 2013. Dogs and birds dry food Fumonisin FB₁ and FB₂ contamination and their relation to ingredients

and packaging characteristics. *Research Journal of Biological Sciences* 8, 22-29.

de Souza, K. K., Luchtenberg, R., Scussel, V.M., 2013. Labels nutrition of dogs and cats dry food versus laboratory data and regulation. *Research Journal of Biological Sciences*, in press.

Dickinson, C.D., Scott, P.P., 1956. Nutrition of the cat. II. Protein requirements for growth of weanling kittens and young cats maintained on a mixed diet. *Br. J. Nutr.* 10, 311–316.

EC. Europe Comission. Comission recommendation of 10 January 2003 concerning a coordinated programme for the official control of foodstuffs for 2003 (2003/10/EC). *Official Journal of the European Commission*, 7, 76–81.

Eerola, S., Sagues, A. X.R., Lilleberg, L., Aalto, H., 1997. Biogenic amines in dry sausages during shelf-life storage. *Zeitung Lebensmittel fur Untersuchung und Forschung A*, 205, 351-355.

FDA. Food and Drug Administration, 1996. *Fish and Fisheries Products Hazards and Controls Guide*. Washington, D.C: Office of seafood, 244 p.

Gloria, M.B.A., Goes, F.C.S., Silva, T.M., 2010. Profile and levels of bioactive amines in adult and puppy dog food. In: Scussel, V.M.; Nones, J.; De Souza Koerich, K.; Santana, F.C. de O.; Beber, M.; Neves, L.S.D'e.; Manfio, D. *International Conference on Pet Food Quality and Safety & 14th National Mycotoxin Meeting Abstract Book*, 180pp, Florianopolis, SC, Brazil.

Gloria, M.B.A. Bioactive amines, 2005. In H. Hui; L.L. Nollet. *Handbook of Food Science, Technology and Engineering*. Ed. Marcel Dekker.

Gloria, M.B.A.; Vieira, S.M., 2007. Technological and toxicological significance of bioactive amines in grapes and wines. *Food*, 1, 258-270.

Halász, A., Baráth, A., Simon-Sarkadi, L., Holzapfel, W., 1994. Biogenic amines and their production by microorganisms in food. *Trends in Food Science and Technology*, 5, 42-49.

- Huss, H.H. Assurance of seafood quality, 1993. FAO Fisheries Technical Paper. No. 334. Rome, FAO, 169p.
- Kalač, P., 2009. Recent advances in the research on biological roles of dietary polyamines in man. *J Appl. Biomed.* 7, 65–74.
- Larqué, E., Sabater-Molina, M., Zamora, S., 2007. Biological significance of dietary polyamines. *Nutrit.* 23, 87-95.
- Önal, A., 2007. A review: current analytical methods for the determination of biogenic amines in foods. *Food Chem.* 103, 1475-1486.
- Park, J.B.K., Craggs, R.J., 2010. Wastewater treatment and algal production in high rate algal ponds with carbon dioxide addition. *Water Science and Technology*, 61, 633-639.
- Ruiz-Capillas, C., Jimenez-Colmenero, F. 2004. Biogenic amine content in Spanish retail market meat products treated with protective atmosphere and high pressure. *European Food Research and Technology*, 218: 237-241.
- Salazar, M.T., Smith, T.K., Harris, A., 2000. High-performance liquid chromatographic method for determination of biogenic amines in feedstuffs, complete feeds, and animal tissues. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 1708-1712.
- Shalaby, A. L., 1996. Significance of biogenic amines to food safety and human health. *Food Research International*, 29, 675-690.
- Silla-Santos, M.H., 1996. Biogenic amines: their importance in foods. *International Journal of Food Microbiology*, 29, 213-231.
- Silva, C.M.G., Glória, M.B.A., 2002. Bioactive amines in chicken breast and thigh after slaughter and during storage at $4\pm 1^{\circ}\text{C}$ and in chicken-based meat products. *Food Chem.*, 78, 241-248.
- South Africa. South African Bureau of Standards, 2001. Regulations governing microbiological standards for foodstuffs and related matters. Government Notice No. R 490.

Tasić, T., Ikonić, P., Mandić, A., Jakanović, M., Tomović, V., Savatić, S., et al, 2012. Biogenic amines content in traditional dry fermented sausage Petrovskáklobásaas possible indicator of good manufacturing practice. *Food Control*, 23, 107–112.

Vale, S.R., Gloria, M.B.A., 1997. Methodology for the determination of biogenic amines in cheese. *Journal of the Association of Official Analytical Chemistry International*, 80, 1006-1012.

Table 1. Animal and vegetal proteins included in dogs and cats food with possibilities of biogenic amines formation

Dogs and cats protein inclusion				
Origin	Type	Ingredients source		
<i>ANIMAL</i>				
	Fresh meat	Beef Pork Poultry Fish		
	Meat meal*	Beef/pork/poultry Fish		
	By-product**	Chicken Bovine Pork Poultry		
	Eggs	Whole (fresh) Whole (dehydrated)		
	Milk	Whole (powder) Dairy products		
<i>VEGETAL</i>				
	Grain	Cereals and their by-products***		
	Meal	Soybean		
	Gluten extract	Wheat Oat		
* meat/bone;	**skin/bones/inner	organs/meat	residues	***
wheat/oat/sorghum/others				

Table 2. Levels of bioactive amines contamination, their correlation to protein content and bacteria load in dogs and cats food samples from different countries and food characteristics (type, animal species and life stage)

Pet food (total number)	Statistics	Bioactive amines (mg/Kg)*													Protein content (%)**	Bacteria total count (CFU/g)	
		General data (Σ)			BAs									PAs			
		BAs	PAs	Bas+PAs	PUT	CA D	HIM	TYM	PHE	AG M	TRM	SRT	SPM	SPD			
COUNTRY																	
<i>North America</i> (n=15)	Minimum	4.0	10.4	14.4	0.00	0.70	0.00	2.70	0.00	0.00	0.00	ND	5.00	5.40	4.5	<1.0x10 ¹	
	Maximum	388.2	49.6	426.3	47.6	157.0	62.3	87.3	6.70	54.3	9.30	ND	22.4	32.0	42.0	2.4x10 ²	
	Mean	88.8	32.5	121.3	11.2	29.7	9.40	25.2	1.70	9.70	2.10	NA	13.4	19.0	24.4	3.0x10 ¹	
	SD	118.8	14.3	126.7	14.6	46.3	15.7	27.9	1.90	16.6	2.60	NA	5.40	9.90	12.8	NA	
	RSD%	133.8	44.1	104.4	130.3	155.9	167.0	110.3	111.7	171.1	109.5	NA	40.3	52.1	52.4	NA	
<i>Europe</i> (n=28)	Minimum	0.60	6.10	10.0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	ND	2.90	0.40	8.0	<1.0x10 ¹	
	Maximum	234.0	52.6	268.1	40.5	70.3	19.4	83.7	5.70	14.0	8.40	ND	25.5	34.8	32.5	2.3x10 ²	
	Mean	39.7	22.7	62.5	5.60	11.7	4.10	13.8	0.60	2.60	1.30	NA	11.1	11.6	17.0	1.8x10 ¹	
	SD	54.6	12.4	62.3	8.90	16.7	4.30	21.7	1.20	3.50	2.10	NA	5.60	8.40	9.1	NA	
	RSD%	137.5	54.6	99.6	158.9	142.7	104.8	157.2	200.0	134.6	161.5	NA	50.4	72.4	53.3	NA	
<i>South America</i> (n=59)	Minimum	1.50	11.7	19.6	0.00	0.00	1.30	0.00	0.00	0.00	0.00	ND	5.30	3.10	8.00	<1.0x10 ¹	
	Maximum	184.2	65.4	231.4	81.5	33.1	102.3	57.1	4.00	9.30	4.10	ND	28.8	39.4	31.0	2.2x10 ²	
	Mean	42.5	31.6	74.2	7.80	8.40	8.50	13.8	0.70	2.90	0.40	NA	15.5	16.2	17.3	2.0x10 ¹	
	SD	38.86	12.0	47.28	11.3	7.10	16.6	13.6	0.90	2.90	0.80	NA	4.80	9.50	8.39	NA	
	RSD%	91.4	37.9	63.7	144.9	84.5	195.3	98.5	128.6	100.0	200.0	NA	30.9	58.6	48.5	NA	
TYPE FOOD																	
<i>Dry</i> (n=58)	Minimum	3.90	10.3	14.5	0.80	0.40	0.00	1.70	0.00	0.00	0.00	ND	5.30	0.40	12.0	<1.0x10 ¹	
	Maximum	388.2	65.4	426.3	81.5	157.0	102.3	87.3	6.70	54.3	9.30	ND	28.8	39.4	42.0	2.4x10 ²	
	Mean	76.4	35.9	112.2	12.2	19.4	11.0	24.2	1.50	6.40	1.60	NA	14.8	21.0	25.6	2.8x10 ¹	
	SD	71.1	12.6	76.1	13.3	26.1	18.1	20.8	1.30	8.70	2.00	NA	4.70	9.10	5.86	NA	
	RSD%	93.0	35.0	67.7	108.5	134.6	163.8	85.89	135.5	89.76	128.8	NA	31.76	43.13	22.9	NA	
<i>Wet</i> (n=44)	Minimum	0.60	6.10	10.0	0.00	0.00	0.00	0.00	ND	0.00	ND	ND	2.90	3.20	4.5	<1.0x10 ¹	
	Maximum	38.9	36.6	62.6	5.50	19.4	11.6	19.7	ND	6.60	ND	ND	28.5	14.0	16.0	1.0x10 ¹	
	Mean	11.9	20.7	32.6	1.70	3.30	2.60	3.90	NA	0.50	NA	NA	12.9	7.80	8.64	0.5x10 ¹	
	SD	8.20	7.40	12.5	1.70	3.80	2.10	4.90	NA	1.50	NA	NA	6.20	2.30	1.73	NA	
	RSD%	68.9	35.7	38.3	100.0	115.1	80.7	125.6	NA	300.0	NA	NA	48.0	29.5	20.0	NA	
ANIMAL SPECIES																	

<i>Dog</i> (n=67)	Minimum	1.70	10.3	14.3	0.0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	ND	3.80	3.10	4.5	<1.0x10 ¹
	Maximum	388.2	65.4	426.3	81.5	157.0	102.3	73.2	4.30	45.2	8.40	ND	28.8	36.6	40.0	2.4x10 ²
	Mean	43.7	28.3	72.0	7.20	10.8	7.40	11.7	0.70	3.30	0.70	NA	13.5	14.9	17.5	2.1x10 ¹
	SD	55.7	12.1	62.0	6.20	4.70	0.10	3.90	0.80	0.70	0.80	NA	2.80	0.50	8.6	NA
	RSD%	127.6	42.7	86.1	86.1	43.5	1.35	33.3	114.3	22.2	114.3	NA	20.7	3.35	49.2	NA
<i>Cat</i> (35)	Minimum	1.50	6.10	10.0	0.0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	ND	2.90	0.40	8.0	<1.0x10 ¹
	Maximum	341.5	60.9	390.6	47.6	123.0	62.2	87.3	6.70	54.3	9.30	ND	28.5	34.8	42.0	2.3x10 ²
	Mean	58.0	31.2	89.1	8.50	15.7	7.40	19.1	1.10	4.80	1.40	NA	15.0	16.2	18.6	1.7x10 ¹
	SD	73.7	14.6	83.0	11.4	24.1	10.9	24.8	1.70	9.50	2.30	NA	5.50	11.4	10.8	NA
	RSD%	127.0	46.8	93.1	134.1	153.5	147.3	129.8	154.5	197.9	164.3	NA	36.7	70.4	58.4	NA
LIFE STAGE																
<i>Adult</i> (n=81)	Minimum	1.50	6.10	10.0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	ND	2.90	0.40	6.5	<1.0x10 ¹
	Maximum	388.2	60.9	426.3	81.5	157.0	102.3	83.7	5.70	45.2	9.30	ND	28.5	39.4	34.0	2.3x10 ²
	Mean	49.4	29.6	79.0	7.90	12.3	8.4	15.5	0.80	3.60	0.90	NA	14.0	15.6	17.46	1.6x10 ¹
	SD	60.6	12.5	67.7	11.7	20.3	15.9	18.8	1.14	5.70	1.83	NA	5.22	9.45	8.52	NA
	RSD%	122.7	42.2	85.7	148.1	165.0	189.3	121.3	137.5	158.3	200.0	NA	37.1	60.2	48.9	NA
<i>Puppy</i> (n=21)	Minimum	4.0	10.4	12.7	0.00	0.00	0.00	1.00	0.00	0.00	0.00	ND	3.80	3.10	8.0	<1.0x10 ¹
	Maximum	341.5	65.4	390.6	47.6	123.0	17.0	87.3	6.70	54.3	5.40	ND	28.8	36.6	42.0	2.4x10 ²
	Mean	45.77	28.3	74.0	6.83	13.0	4.06	15.3	0.88	0.47	0.86	NA	13.9	14.3	18.84	3.2x10 ¹
	SD	69.9	14.8	78.8	9.97	25.03	4.35	19.6	1.48	11.1	1.34	NA	6.27	10.1	11.9	NA
	RSD%	152.9	52.3	106.5	154.6	192.3	107.5	127.3	166.7	236.2	162.5	NA	44.2	70.6	63.3	NA

BAs: biogenic amines; PAs: polyamines; * LOD>0.4mg/Kg; **protein guaranteed level described in pet food pack label; CFU: colony forming unit; AGM: agmatine; CAD: cadaverine; SPD: spermidine; SPM: spermine; NA: not applied; ND: not detect; HIM: Histamine; PHE: phenylethylamine; PUT: putrescine; SRT: serotonin; TRM: tryptamine; TYM: tyramine; SD: standard deviation

CAPÍTULO 6

DOGS AND BIRDS DRY FOOD FUMONISIN FB₁ AND FB₂ CONTAMINATION AND THEIR RELATION TO INGREDIENTS AND PACKAGING CHARACTERISTICS

Trabalho publicado:

Research Journal of Biological Sciences (ISSN: 1815-8846)

8 (1):22-29, 2013

DOGS AND BIRDS DRY FOOD FUMONISIN FB₁ AND FB₂ CONTAMINATION AND THEIR RELATION TO INGREDIENTS AND PACKAGING CHARACTERISTICS

Karina Koerich de Souza, Vildes Maria Scussel

Mycotoxicology and Food Contaminants Laboratory - LABMICO, Food Science and Technology Department, Center of Agricultural Sciences, Federal University of Santa Catarina (UFSC), R. Admar Gonzaga, 1346, Itacorubi, Florianopolis, SC, CEP 88034-001, Brazil. E-mail: kakoerich@yahoo.com.br

Abstract

Fumonisin (FB₁ and FB₂) contamination and their relation to the ingredients composition and packaging characteristics were evaluated in dry foods for dogs and birds sold in Southern Brazil. Out of 50 dogs and birds food samples analyzed, 80 and 60% had FB levels detected above the applied method (LC/FLD) limit of quantification, thus (0.04, 0.05 and 0.09 mg/Kg for FB₁, FB₂ and FB_{total}, respectively). Pet food levels ranged for FB₁ from 0.04-1.60/0.07-0.64 and FB₂: 0.04-0.27/0.12-0.45 mg/Kg for dogs/birds samples, respectively. Those levels were lower than the international regulation (FDA, EU) for FB_{total} (5 mg/Kg). Regarding ingredient composition, both food types (100%) had maize as the main carbohydrate energy source followed by rice (82%) and wheat (91%). The other grains toxin contamination related were in decreasing order of inclusion: soybean, linseed and sorghum/oats mix (55/50, 37/50 and 9/50% for dogs/birds, respectively). Regarding fungi growth pet food humidity conditions, while mc were high in the birds (10.0 to 14.0 %; RSD 9.9 %) food samples they were rather low in the dogs (6.8 to 10.4 %; RSD 9 %), with rather similar a_w for both food (dogs: 0.48 to 0.65; RSD: 6.3 % and birds: 0.53 to 0.78; RSD 11.0 %). Although the birds samples mc and a_w were below *Fusarium* growth conditions, some of them could be enough for further toxigenic storage fungi growth as the pet selling food stores room temperature in Southern Brazil.

Keywords: pet food, fumonisins, moisture content, water activity.

1 Introduction

In recent decades there has been a considerable increase on the pet food market worldwide, which is due especially to the increase of

grain production. Most of the dry pet food is made on a cereals basis as source of energy and the main raw material utilized is maize, followed by other grains such as rice, wheat, barley and oats, in smaller quantities though (Diaz and Boermans, 1994; Scussel, 2002; Brera *et al.*, 2006). The main problem with the quality of those grains is the mycotoxins which can be produced by fungi proliferation either in the field or during storage. Apart from cereals, mycotoxins producing fungi can grow also on/in other pet food ingredients such as *pulses* (soybean, peanut, peas), *nuts* (walnuts, cashew nuts, Brazil nuts, pistachio), *dry fruits* (raisins, apples) and other *vegetables* (tomato, carrots) (Thompson *et al.*, 2011, Akande *et al.*, 2006; Pacheco and Scussel, 2007). They can cause a wide variety of damages to pet's health due to their different target organs and the intensity of toxic effects - acute and chronic mycotoxicosis (Coulombe, 1993; Silva *et al.*, 2009; de Souza and Scussel, 2012). Despite of toxins being present in the pet food via inclusion of contaminated raw ingredients, they can get there through final products exposed to low quality storage and selling conditions.

Field toxigenic fungi can produce mycotoxins such as fumonisins (FBs), deoxinivalenol (DON) and zearalenone (ZON) in *cereals* and alternariol (AOH), alternariol methyl ether (AME) and patulin (PAT) in *other vegetables* such as *fruits* and *roots* (tomato, apple and carrots) all pet food ingredients. On the other hand, the storage toxigenic fungi can produce aflatoxins (AFLs), ochratoxin A (OTA) and citrinin (CTR) in cereals (Pozzi, 2000; Rumbelha, 2000, Pacheco and Scussel, 2007). Therefore, it is worth emphasizing that when a mycotoxin is found in food, one must consider that other mycotoxins may also be present, in which their interaction may worsen the clinical status of mycotoxicosis (Rumbelha, 2000).

Regarding FBs (FB₁ and FB₂), despite the known field production, they may also be produced by *Fusarium* genera during storage, if grain and/or food reaches optimum growth conditions such as high mc (18 to 29 %) and temperature (15-30°C) (Alberts *et al.*, 1990; Jouany, 2007; Pitt e Hocking, 2009; Marin *et al.*, 2010). Once pet food is FBs contaminated, it is difficult to be decontaminated as the food processing applied cannot guarantee these toxins elimination. As for other mycotoxins, FBs are temperature resistant (up to 260°C) which none of the processes applied such as extrusion for dry food (150 to 200°C) and sterilization for wet canned food (121°C) in the pet food industry can reach (Brera *et al.*, 2006).

Important to emphasize that pets eat same type of food in a daily basis (industrialized food), thus more exposed to any contaminant

that may be present in it, compromising animal's health. Foods with low levels of FBs do not result in characteristic clinical signs of mycotoxicosis, but increase the susceptibility of under current infections caused by the animal's immune system suppression and the increase of neoplasias incidence (Osborne, 1982). FBs have been detected, mainly in maize, however they have been reported also in other different cereals in countries worldwide (Voss *et al.*, 2007; Scaff and Scussel, 2004; Soriano and Dragacci, 2007). Their levels reported vary from as low as 0.01 to as high as 41.1 mg/kg in pet food for different animal species such as birds, dogs, cats, rabbits and fish (Hopmans and Murphy, 1993; Scudamore *et al.*, 1997; Mallmann *et al.*, 2010; Martins *et al.*, 2003; Scussel *et al.*, 2006).

As far as mycotoxicosis and small animals pet veterinarians treatment are concerned, there are still little discussed and considered among them regarding the toxicity signs, and only few data on the incidence of pets poisoning (CAST, 2003), as well as their level of contamination in raw materials and final products have been reported, especially on FBs contamination.

In addition, regulation for mycotoxin in animal feed worldwide is focused on farm animals with less attention given to pets. In most of the countries were regulation include pet food, the maximum tolerance level (MTL) is set in a general way, rather than pet species-specific (Leung *et al.*, 2006). In Brazil there are only official limit set for AFLs (50µg/kg) just for farm animals (Brazil, 1988). The only FBs limits recommended for pets are those set by the Food and Drug Administration (FDA, 2001) and the European Commission (EC, 2006). The FDA and EC MTL of FBs ($FB_{total}: FB_1 + FB_2 + FB_3$) for pets are 10 mg/kg for maize and 5 mg/kg for final products, respectively. Despite the lack of pet food official MTL set in Brazil, the Association of Brazilian Food Industries (ABINPET) has developed an Integrated Program for Pet Food Quality (PIQPET). This guide established high quality standards for pet food different parameters, inclusive those for several mycotoxins, which can help the industries to keep their food products quality and safety on the safe side. PIQPET recommends an MTL of FB_1+FB_2 of 5 mg/Kg for finished small animal products (ABINPET, 2008).

Therefore considering the high inclusion of maize in pet foods, the known FBs contamination of farm animals feed and the lack of information regarding FB_1 and FB_2 in dogs and birds food, this work reports an evaluation of (a) FBs contamination of dry food for dogs and birds sold in Southern Brazil; (b) their ingredients composition

regarding grain as well as other sources of energy toxin related and the (c) packaging characteristics that can favor fungi proliferation leading to possible FBs production during commercialization.

2 Materials and methods

2.1 Materials

Samples: dry food (total: 50) for dogs (30) and birds (20) from different brands sold in polyethylene bags (bags size: 25 and 5 kg, respectively).

Chemicals: (a) *reagents* - phosphoric acid (H_2PO_4), acetic acid, potassium chloride, sodium dihydrogen phosphate ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), sodium hydroxide, 2-mercaptoethanol and *o*-phthalaldehyde (OPA) all analytical grade (Vetec, Rio de Janeiro, Brazil); (b) *solvents* - acetonitrile (ACN) and methanol (MeOH), HPLC grade (J.T. Baker, Texas, USA) and ultrapure water (H_2O) (Millipore, Sao Paulo, Brazil); (c) *standards* - FB₁ and FB₂, 1 mg (Sigma Chemical, St. Louis, USA).

Equipment: mill (Romer, Miami, USA), vacuum pump (Tecnal, Sao Paulo, Brazil), blender (Metvisa, Santa Catarina, Brazil), SPE manifold (Phenomenex, California, USA), heating block (Tecnal, Sao Paulo, Brazil), oven (Fanem, Sao Paulo, Brazil), analytic scale (Shimadzu, Kyoto, Japan), a_w reader (Aqualab, Sao Paulo, Brazil), solvent filtration system (Millipore, Sao Paulo, Brazil). High performance liquid chromatography (LC) with fluorescence detector - FLD (Gilson, Vivier le Bel, France), injector of 20 μl loop (Rheodyne, California, USA) and reverse phase column C₁₈ with length, inner diameter, particle size of 250, 4.6, 5 mm, respectively (Phenomenex, California, USA).

Other materials: quaternary amino solid phase extraction (SPE) cartridges 500 mg packaging size and 6 mL volume (Applied Separations, United States); nitrogen gas, analytical grade (White Martins, Rio de Janeiro, Brazil), filter paper Whatman No. 4 (Whatman, Maidstone, England), desiccators (\varnothing 200 mm), micro syringe (50 μL) with lock needle (Hamilton, Nevada, USA) and membrane filter 0.45 μm and 0.45 mm porosity and diameter, respectively (Millipore, Sao Paulo, Brazil).

2.2 Methods

Sample collection and preparation: dogs and birds food were

purchased randomly from six pet stores in Santa Catarina State, Southern Brazil. Each sample was grounded in a mill, homogenized and divided into portions for further analysis. Packaging was kept for labels ingredients and characteristics data gathering.

Packaging and sample characteristics: data on dogs and birds (a) *food packaging* regarding (a.1) vegetable ingredients, either cereals/seeds/nuts (energy mycotoxin related) and others were obtained as described on the label composition list, in decreasing order of inclusion and presentation format of whole or ground (meal/grits), apart from dry fruits (raisins, apple, carrots, tomatoes) and presence of dye; (a.2) bags light protection and material type (opaque or translucent), (a.2) inner atmosphere (vacuum), (a.3) packaging selling integrity and (b) *sample characteristics* which were obtained from samples visual analysis and labels displays.

FBs LC determination: (a) *standard solutions* –individual FB_1 and FB_2 stock solutions (100 $\mu\text{g/ml}$) were prepared in 10 ml of ACN: H_2O (1:1) according to Viscontiet *al.* (1994). A series of working FB_1 and FB_2 solutions at increasing concentration and a mix of toxins were prepared for calibration curves. All were stored in sealed amber vials at -18°C . (b) *LC determination* - the method applied was of AOAC (2005), art. 995.15. Briefly, portions of ground samples (50 g) were FBs extracted with $MeOH:H_2O$ (3:1) followed by filtration. After pH adjustment to 5.8-6.5 (with $NaOH$) extract, was cleaned-up through SPE (C_{18}) cartridge [*conditioning* - $MeOH$, *washing* - $MeOH:H_2O$ (3:1), *extract addition/washing*- $MeOH:H_2O$ (3:1) & $MeOH$, then *FBs elution* - $MeOH$:acetic acid (9.9:0.1)]. The FBs elution extracts were concentrated in a heating block (40°C , under nitrogen flow) and quantified after OPA derivatization (25 μL extract, 225 μL OPA, 2 min) by LC-FLD (ex.335nm, em.440 nm) with mobile phase $MeOH:NaH_2PO_4$ (77:23) adjusted to pH 3.3 (with H_2PO_4) at 0.8 ml/min flow rate. Method validation procedure was carried out through calibration curve (linearity, LOD and LOQ), recovery and evaluation of repeatability/reproducibility. The method LOQ for $FB_1/FB_2/FB_{total}$ was 0.04/0.05/0.09 mg/Kg, respectively and recovery was $87 \pm 11.5\%$.

Mc and a_w : mc was determined by gravimetric method art. 930.15 of AOAC (2005)(average of 3 data). The a_w was obtained by measuring samples an a_w meter at 25°C .

Statistical analysis: Pearson coefficient of correlation test (PCCt) was applied to evaluate the correlation between data of the non parametric variables of FBs with mc and a_w and the test Student, for comparison of FBs detection in dogs and birds food data obtained, with

significance level of 1 %.

3 Results and discussion

From the dogs and birds dry food data obtained, it was possible to observe that, apart from maize, rice followed by wheat were the main carbohydrates energy sources which could be FBs related; FB₁ and FB₂ were present in different levels depending upon the animal food type and composition; the packaging material and inner atmosphere were light protective and food inner atmosphere were air, except for one vacuum bird food sample. The ingredients characteristics mycotoxin related (cereal/pulses/nuts/seeds), FBs (FB₁ and FB₂) contamination data; humidity conditions (mc/a_w) and inner packaging environment, are shown in Figure 1 and Tables 1 to 3.

Packaging and samples characteristics

The *packaging material* utilized for the dogs and birds samples varied regarding light incidence: in the dog's food bags the materials utilized were opaque which can lead to food ingredients light protection. In contrary, the birds were made with transparent material which allows light transfer into the food (Table 1).

Table 1. Dry foods for dogs and birds ingredient composition, packaging and samples characteristics data collected from their label / inner content and their relation to fungi and FBs / other toxins contamination

PET FOOD	PET FOOD BRANDS												BIRDS				
	A	B	C	D	E	DOGS		F	G	H	I	J	K	A	B	C	D
COMPOSITION RELATED TO FUNGI AND MYCOTOXINS CONTAMINATION																	
<i>Cereals / nuts / seeds</i>																	
Maize (ground)	1**	4	1	1	2	2	2	2	2	1	2	1	NA	NA	1	1	
Maize (gluten meal)	3	1	NA	2	6	4	NA	3	3	1	3	5	3	NA	13		
Rice (coarse)	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	1	NA	NA	NA	NA	NA	1	4	2	
Rice (broken)	2	NA	4	NA	1	1	NA	1	2	4	2	NA	NA	NA	NA	NA	
Wheat (whole grain)	NA	NA	NA	NA	5	NA	NA	NA	NA	NA	4	NA	NA	NA	NA	NA	
Wheat (meal)	4	5	2	4	4	3	6	4	NA	3	NA	NA	NA	NA	NA	8	
Oats (pressed)	NA	NA	NA	NA	NA	9	NA	NA	NA	NA	NA	NA	15	NA	NA	3	
Millet	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	3	NA	2	14		
Sorghum	NA	6	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	6	NA	10		
Soybean (meal)	5	NA	3	3	3	NA	NA	6	NA	5	NA	6	NA	3	NA		
Beans (meal)	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	5	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	
Pea	NA	NA	NA	5	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	7	NA	NA		
Peanuts	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	9	2	NA	6		
Peanuts skin	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	10	NA	NA	NA		
Birdseed (whole)	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	2	NA	NA	NA		
Linseed (whole)	6	7	NA	NA	7	NA	NA	NA	NA	6	NA	14	NA	NA	7		
Pumpkinseed	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	11	NA	NA	NA		
Sunflowerseed	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	8	4	NA	5		
<i>Dry fruits/roots/other vegetables/by-products</i>																	
Dry fruits	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	7	NA	NA	NA	11	
Raisins	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	12	
Carrot	7	3	NA	6	9	7	3	NA	NA	NA	6	12	NA	7	NA		
Tomato	NA	NA	NA	NA	NA	NA	4	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA		
Apple	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	4	NA	6	9		
Vegetable oil	8	8	NA	NA	NA	5	NA	NA	6	NA	5	1	5	5	4		
PACKAGE AND SAMPLE CHARACTERISTICS																	
Pack size (kg)	20	25	25	20	20-25	15-20	20	25	25	25	25	5	5	5	5		
<i>material type</i>																	
Packagin	Pe ^a	Pe	Pee	Pe	Pe	Pe	Pe	Pe	Pe	Pe	Pe	Pe	Pe	Bo	Pe		

§:

	<i>protection to light</i>	Op ^d	Op	Op	Op	Op	Op	Op	Op	Op	Op	Op	Tr ^e	Tr	Tr	Tr
	<i>inner atmosphere</i>	air	air	air	air	air	air	air	air	air	air	air	vacuum	air	air	air
	<i>format</i>	R,S,&B	R,S&H	R&S	R&B	R&T	R&T	R,H&B	R,S&B	R	R&S	R,S,H,B &T	R&S	S	R&S	S
Particle s:	\varnothing (mm)	10	10-20	5-12	10-15	7-12	6-10	12	15-20	8	8	10	5-10	8	3-10	2-10
	<i>dye added*</i>	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
	Age recommended	A ^b	A	A	A	P ^c	A	A	A	P	A	A	Aa	Aa	Aa	Aa
	Sample number per brand	2	5	2	2	5	3	2	4	1	2	2	7	2	3	8
	<i>total general</i>	30											20			

^a polyethylene; ^b adult; ^c puppy; ^d opaque packaging; ^e transparent packaging; NA: not added; R:round; S:square; H: heart; T: triangle; B: bone; BO: bottle; AA: all ages; * food with artificial dyes added: green, red, yellow and orange

** number means the decreasing order of quantities included on the package ingredients list ➡ the higher the number, the lower the quantity added / the lower the number the higher the quantity added into the pet food final product

Apart from food lipid oxidation, light can stimulate FBs production due to temperature enhancement on the substrate (Fanelli *et al.*, 2012). Regarding the packaging inner atmosphere, all pet food, except for one bird sample (vacuum treated), had air inside. Despite the nature of substrate/ a_w /temperature, the bag gas composition (air/ CO_2 / N_2 /vacuum) is the most important parameter that can affect fungal growth and mycotoxin production post-harvest (Magan, *et al.*, 2003; Magan and Aldred, 2007). Pet food packaging with air inside can allow lipid ingredients (fatty acid) oxidation and, if enough mc and a_w , fungi growth. Packaging is an important part of pet food safety and choice of material, the pack inner atmosphere and the sealing process can add to it.

As far as *sample characteristics*, both pets are concerned, as expected birds had higher size variation due to whole grains and seeds included than dogs which had all ingredients ground, extrusion cooked and shaped into similar size pellets. All dogs food had dyed pellets i.e., different colorants (artificial dyes) added which, although make pet food more attractive for animal owners, no effect causes to the animal preference, except for activating some skin, throat and lungs allergies/intolerance (example: tartrazine - orange/yellow color).

Regarding carbohydrate *energy ingredients*, cereals were the most prevalent with 100 % of maize inclusion in dogs/birds food, followed by 82/75 % of rice and 91/25 of wheat distributed in the different brands and samples evaluated. The other grains were in decreasing order of inclusion: 55/50, 37/50 and 9/50 % of soybean, linseed - sorghum and oats for dogs/birds, respectively. Figure 1 shows the percentage of grain-based ingredients apart from other vegetables added to dogs and birds dry food.

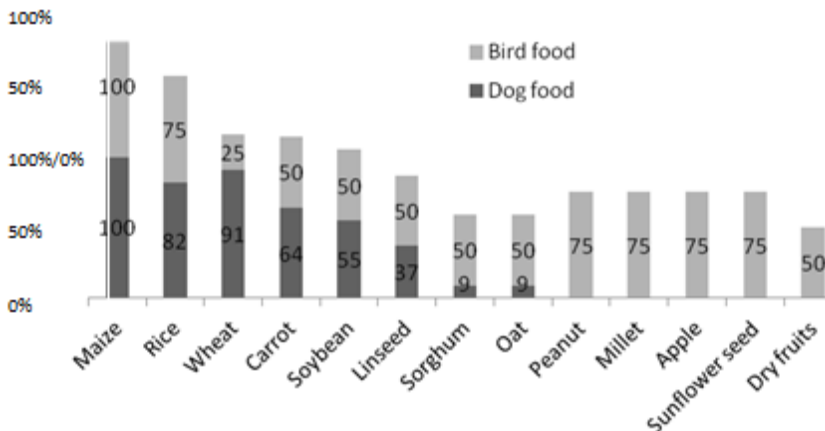


Figure 1. Percentage of some ingredients mycotoxin related (grains, cereals, seeds, nuts and dry fruits) added to dogs and birds complete dry foods.

Whole nuts, seeds and dry fruits were present only in the birds food samples which can be mainly storage mycotoxin related (AFLs, OTA and CIT).

FB₁ and FB₂ contamination versus pet food regulation

Regarding the pet food samples FB₁ and FB₂ contamination, 80 % (24) for dogs and more than a half of the food for birds, 60 % (12) had levels detected above the method LOQ (0.04/0.05/0.09 mg/kg for FB₁/FB₂/FB_{total}, respectively). Levels varied for FB₁ and FB₂ being the first higher than the second, ranging for FB₁: from 0.04-1.60/0.07-0.64 and for FB₂: from 0.04-0.27/0.12-0.45mg/Kg in dogs/birds food, respectively. In the dogs dry food the percentage of FB₁ positive samples was higher (76.7 %) than FB₂ (43.3 %). On the other hand, in bird's food, FB₁ was present in less than a half (45 %) of the samples, the same for FB₂ (30 %) (Table 2).

In a study carried out by Martins *et al.* (2003) evaluating mycotoxins in 60 dogs dry foods, FB₁ was detected in 5 % with levels ranging from 0.012 to 0.024 mg/kg. On the other hand, Cruz (2010), evaluating FBs in 24 samples of maize (grain) for the animal feed manufacturing company, these mycotoxins were detected in 83.3 % of the samples with an average concentration of 3.27 and 1.30 mg/kg for FB₁ and FB₂, respectively, levels rather high compared to the previous authors and the current study in dogs and birds food. Indeed, the

addition of carbohydrate energy source ingredients shows that maize and rice were the main source, followed by wheat. Except for rice, those grains have been reported being field mycotoxin contaminated (Rumbeiha, 2000; Scussel et al, 2011). Among other sources of digestible carbohydrates added to dogs and birds food in the current study, there were also other cereals (sorghum, oats) and pulses (soy) meals. Also fiber sources ingredients were added such as bran (wheat / rice) and hulls (soybean). It is important to emphasize that bran and hull are the first part of the grain that fungi spores can get in contact and the most contaminated part of the grain, apart from germen (Scussel *et al.*, 2011). Despite this, the possibility of the FBs presence and the contamination levels are dependent on the food *type* (whether or not grains, brans and hulls are included), the *proportion* of an added grain and its *safety*.

Regulation: comparing the FBs results obtained in the current study to the MTL levels recommended by FDA (2001), EC (2006) and the PIQPET (2008) for pet food, no sample had levels higher than those recommended, although 80 and 60 % were detected higher than the method LOQ. One of the reasons may be the increase of rice inclusion as the carbohydrate energy source to the pet food produced in Brazil which, apart from being cheaper than maize and easier to get in the country due to its high production for human consumption as staple food, it has been reported being less FBs contaminated (Brera *et al.*, 2006). Indeed, rice is not a good substrate for *Fusarium* and those toxins have not been reported in detectable levels, different of maize worldwide.

Pet exposure and toxic effects: as far as pet's health and low levels of FBs are concerned, it is important to emphasize, that the pets intake of industrialized food is continuous; therefore the presence of FBs, even in small amounts in the food, can lead the animal to a continuous exposure to that contaminant. Long-term exposure is known to produce cumulative damages over the years. Exposure to 1.75 mg of FB₁/kg/day is lethal for rabbits, resulting in liver and kidney toxicity. For equine FBs can cause leukoencephalomalacia and cerebral hemorrhage with a minimum dose of 5mg/kg of FB₁ and may lead to development of neural tubes defects in rats (Riley *et al.*, 1994; Haschek *et al.*, 2002; Voss *et al.*, 2007).

Table 2. Dry food for dogs and birds levels of fumonisins, moisture content and water activity in samples of different brands sold in Southern Brazil

DRY PET FOOD		FB ^a (mg/Kg)									mc ^b (%)			a _w ^c		
Animal	Brand	FB ₁			FB ₂			ΣFBs			Average	Min/ max	SD+/-	Average	Min/ max	SD +/-
		Average	Min/ max	SD +/-	Average	Min/ max	SD +/-	Average	Min/ max	SD +/-						
DOGS																
	A	ND ^d	NA ^e	NA	ND	NA	NA	ND	NA	NA	8.5	8.1/9.0	0.63	0.58	1.57/0.59	0.14
	B	0.18	0.04/0.61	0.24	0.132	0.04/0.29	0.10	0.31	0.06/0.91	0.34	9.0	8.5/9.9	0.55	0.58	1.55/0.61	0.02
	C	0.53	0.43/0.64	0.14	0.315	0.04/0.55	0.38	0.83	0.64/1.02	0.56	8.9	8.5/9.3	0.56	0.63	1.60/0.65	0.03
	D	0.10	0.08/0.12	0.02	ND	NA	NA	0.10	0.08/0.12	0.02	9.4	9.3/9.6	0.21	0.61	1.61/0.61	NA
	E	0.29	0.04/0.86	0.34	0.168	0.04/0.64	0.26	0.29	0.08/0.86	0.37	9.5	8.4/10.3	0.75	0.59	1.56/0.64	0.03
	F	1.60	0.34/0.83	0.63	ND	NA	NA	1.60	0.64/1.61	0.51	8.7	8.6/8.9	0.15	0.62	1.59/0.65	0.03
	G	0.14	0.05/0.23	0.12	0.095	0.04/0.15	0.07	0.22	0.05/0.39	0.24	9.0	6.2	1.97	0.65	1.48/0.65	0.12
	H	0.75	0.12/1.60	0.66	0.16	0.04/0.16	0.16	0.89	0.12/2.00	0.84	8.4	8.4/8.5	0.05	0.60	1.55/0.65	0.04
	I	ND	NA	NA	0.22	NA	NA	0.22	NA	NA	9.9	NA	NA	0.58	NA	NA
	J	0.28	0.03/0.54	0.35	ND	NA	NA	0.29	0.04/0.54	0.31	7.4	7.4/7.4	NA	0.55	1.55/0.56	1.00
	K	0.70	0.03/1.36	0.93	ND	NA	NA	0.70	0.04/1.36	0.89	9.9	9.4/10.4	0.71	0.61	1.60/0.62	0.01
Total samples		30														
Positive (%)		23 (76.7)			13 (43.3)			24 (80)			NA (NA)			NA (NA)		
MTL ^f		0			0			0			NA			NA		
Average (min/max)		0.50 (0.04/1.60)			0.29 (0.04/0.64)			0.64 (0.05/2.00)			8.96 (6.2/10.4)			0.59 (0.48/0.65)		
SD ^g (RSD % ^h)		0.49 (98)			0.20 (69)			0.55 (86)			0.86 (9.9)			0.03 (6.3)		
BIRDS																

B	0.03	0.03/0.03	3 NA	0.04	0.04/0.0	NA	0.08	0.08/0.08	3 NA	10.9	2.9 10.2/1.7	1.06	0.65	7 0.59/0.7	6 0.0	
C	0.03	0.03/0.05	0.0 1	0.17	0.04/0.45	0.23	0.22	0.08/0.05	0.2 3	11.1	10.2/1.3	1.66	0.60	1 0.53/0.7	6 0.5	
D	0.07	0.03/0.2	0.0 7 8	0.14	0.04/0.44	0.15	0.19	0.08/0.04	0.1 4	11.9	10.7/1.4	0.94	0.70	8 0.56/0.7	6 0.0	
Total samples	20															
Positive (%)	9(45)			6 (30)			12 (60)			NA (NA)			NA (NA)			
> MTL ^f	0			0			0			NA			NA			
Average (min/ max)	0.09 (0.04/0.27)			0.32 (0.12/0.45)			0.22 (0.04/0.50)			11.7 (10./14.0)			0.67 (0.53/0.78)			
SD ^g (RSD% ^h)	0.07 (78)			0.13 (40)			0.16 (73)			1.05 (9)			0.07 (11.0)			

^a fumonisins (FB₁, FB₂ & FB_{total})
LOQ: 0.04, 0.05 & 0.09 mg/Kg)

^b moisture content

^c wateractivity

^d not detect

^e not applicable

^f Maximum Tolerable Level [USA max. recommended level for maize pets: 10mg/kg (FDA, 2001)

EU max. recommended level for pet foods 5 mg/kg (EU, 2006)]

^g standard deviation

^h relative standard deviation

Mc/a_w and the risk of FBs / other toxins contamination in dogs and birds dry food

Mc ranged from as low as 7 to as high as 14% and 0.5 to 0.8 for a_w in both pet foods. Birds food samples had higher mc (10 to 14%) than dogs (7 to 10.5%) which may be explained by the different packaging material utilized (birds: transparent and O₂ permeability; dogs: 2 layers of polyethylene and flexible aluminum foil. Also their samples characteristics: for birds there were whole seeds and grains, also nuts without extrusion, on the other hand for dogs the dry food had ground grains and ingredients that were extruded - high temperature processing (150 to 200°C) and pressure (34 to 37 atm), which also reduces moisture. Values lower than < 12% for mc are considerable safe to control biological contaminants development such as insects, mites, bacteria and fungi (Crane *et al.*, 2000; Gallo *et al.*, 2002; Scussel, 2002). Therefore, regarding mc in the present study, out of the total of dogs food evaluated, all of them (100 %) had mc < 12 % (RSD: 9.9 %). In contrary, the birds food had about half (51 %) of them ≥ 12 % (RSD: 9 %), reaching a maximum of 14 % which should be of concern as toxigenic storage fungi could grow producing AFLs, OTA and CTR in substrates such as cereal, pulses, nuts and dry fruits (all ingredients present in birds food). Regarding a_w, the values ranged from 0.48 to 0.65 and 0.53 to 0.78 for dog and bird food, respectively. This measure is the main factor responsible for final products deterioration and favors microbial growth. Fungi are more tolerant to low a_w than bacteria and yeast. In general, fungal growth occurs in a_w varying from 0.65 to 1.0 and for mycotoxins production, from 0.79 to 0.90 (Jouany, 2007; Pitt and Hocking, 2009). In the current study 75% of the bird samples had aw > 0.65 which allow fungi growth. Under these birds food humidity conditions (mc and a_w), it is possible to find microbial growth and mycotoxins.

Considering the characteristics of pet food composition, some ingredients are quite prone to absorb humidity (grain/dry fruits) in rainy or high relative humidity days. That condition allows fungi growth if together with high temperature. The PCC test performed to investigate any correlation between the FB₁, FB₂, mc and a_w variables obtained in the dogs and birds food are in Table 3.

Table 3. Coefficient of correlation between fumonisins, moisture content and water activity in dog and bird food commercialized in Santa Catarina State, Southern Brazil

Parameters	PCCt ^a	Pet food					
		Dogs			Birds		
		Σ FBS ^b	Mc ^c	a _w ^d	Σ FBS ^b	mc	a _w
Σ FBS	CC ^e	1	-0.027	0.290	1	0.013	0.495
	P value ^f		0.888	0.120		0.957	0.026
	N ^g	30	30	30	20	20	20
mc	CC	-0.027	1	0.620	0.013	1	0.254
	P value	0.888		0.000	0.957		0.281
	N	30	30	30	20	20	20
a _w	CC	0.290	0.620	1	0.495	0.254	1
	P value	0.120	0.000		0.026	0.281	
	N	30	30	30	20	20	20

^a Pearson correlation coefficient test^b Σ FBS = FB₁+FB₂^c moisture content^d water activity^e correlation coefficient^f P < 0.05^g number of samples

There was a strong positive correlation between FBs and mc in foods for dogs ($P=0.888$) and *birds* ($P=0.957$). This correlation is important as FBs can be produced in pet food stored at inadequate moisture conditions (high mc) allowing development of *Fusarium* spp. and possible mycotoxin production (Rumbeiha, 2000; Orsi *et al.* 2000).

4 Conclusion

The FBs levels in the dogs and birds food positive samples were lower than the MTL reported in literature. One of the reasons of low FBs may be the increase of rice inclusion as the carbohydrate source which is cheaper than maize and easy to get in Brazil. Indeed, for *Fusarium* growth, rice is not a good substrate and those toxins have not been reported in detectable levels in that grain.

In addition, the mc and a_w detected in the samples, were not high enough for *Fusarium* growth. The extrusion process which is applied in the pet food production highly reduces the moisture increasing feed stability for fungi to take place.

FBs, even in small quantities, continuous exposure of pets to these toxins, due to their monotype diet, can lead to development of chronic diseases, including neoplasias. Pet food monitoring to keep below levels the MTL is important to ensure the safety to minimize fumonisin-related diseases and problems with pet's health.

5 References

Akande, K.E., Abubakar, M.M., Adegbola, T.A. and Bogoro, S.E., 2006. Nutritional and Health Implications of Mycotoxins in Animal Feeds: A Review. *Pakistan Journal of Nutrition* 5:398-403. DOI:10.3923/pjn.2006.398.403

Alberts, J.F., Gelderblom, W.C.A., Thiel, P.G., Marasas, W.F.O., Van Schalkwyk D.J. and Behrend Y., 1990. Effects of temperature and incubation period on production of fumonisin B1 by *Fusarium moniliforme*. *Applied Environmental Microbiology*, 56:1729-33. DOI: 0099-2240/90/061729-05\$02.00/0

ABINPET (Associação Nacional dos Fabricantes de Alimentos para Animais de Estimação), 2008. Manual do programa integrado de

qualidade pet - PIQPET. 2.ed. Sao Paulo. 238 pp.

AOAC (Association Official Method of Analysis of Chemistry), 2005. Thiex, NJW (E.d.) Animal feed.18 ed. Maryland: AOAC international.

BRAZIL, 1988. Portaria MA/SNAD/SFA n.7 de 9 de novembro de 1988. D.O.U., Brasília, 09 de novembro 1988. Available at: <http://sistemasweb.agricultura.gov.br> Accessed 10 July 2012.

Brera, C., Catano, C., Santis, B., Debegnach, F., de Giacomo, M., Pannunzi E. and Miraglia M., 2006. Effect of industrial processing on the distribution of aflatoxins and zearalenone in corn-milling fractions. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 54: 5014-5019. DOI: 10.1021/jf060370s

CAST (Council for Agricultural Science and Technology), 2003. *Mycotoxins:Risk in Plant, Animal and Human Systems*.Ames: Task Force Report, n.139, 199pp.

Coulombe, R.A., 1993. Biological action of mycotoxins. *Journal of Dairy Science*,76: 880-891.

Crane, S.W., Griffin R.W. and Messent, P.R., 2000. Introduction to commercial pet foods. In: Hand, M.S., Thatcher, C.D., Remillard, R.L., Roudebush, P. (eds.) *Small Animal Clinical Nutrition*. Walsworth Publishing Company, Kansas, USA, pp: 111-126.

Cruz, J.V.S., 2010. Ocorrência de aflatoxinas e fumonisinas em produtos a base de milho e milho utilizado como ingrediente de ração para animal de companhia, comercializados na região de Pirassununga, Estado de São Paulo. Tese (Doutorado em Zootecnia e Engenharia de Alimentos) - Universidade de São Paulo, Brasil.

de Souza K, K. and V.M. Scussel, 2012. Occurrence of dogs and cats diseases records in the veterinary clinics routine in South Brazil and its relationship to mycotoxins. *International Journal of Applied Science and Technology*, in press.

Diaz, G.J. and Boermans, H.J., 1994. Fumonisin toxicosis in domestic animals: a review. *Veterinary and Human Toxicology*, 36:548-555.

EC (European Commission), 2006. Commission Regulation (EC) No.2006/576/ EC of 17 August 2006 on the presence of deoxynivalenol, zearalenone, ochratoxin A, T-2 and HT-2 and fumonisins in products intended for animal feeding. Off. J. Eur. Communities, 229, 7-9.

Fanelli, F., Schmidt-Heydt, M., Haidukowski, M., Susca, A., Geisen, R., Logrieco, A. and Mule, G., 2011. Influence of light on growth, conidiation and fumonisin production by *Fusarium verticillioides*. Fungal Biology, 116:241-248. DOI: 10.1016/j.funbio.2011.11.007

FDA (Food and Drug Administration), 2001. Guidance for Industry: Fumonisin Levels in Human Foods and Animal Feeds, Washington, USA.

Gallo, D., Nakano, O., Silveira Neto, S., Carvalho, R.P.L., Baptista, G.C., Berti Filho, E., Parra, J.R.P., Zucchi, R.A., Alves, S.B., Vendramin, J.D., Marchini, L.C., Lopes, J.R.S. and Omoto C., 2002. Entomologia agrícola. FEALQ, Piracicaba, 920 pp.

Haschek, W.M., Voss, K.A. and Beasley, V.R., 2002. Selected mycotoxins affecting animal and human health. In: Haschek, W.M., Roussex, C.G., Wallig, M.A. (eds.). Handbook of Toxicologic Pathology. Academic Press, New York, USA, pp. 645-698.

Hopmans, E. D. and Murphy, P. A., 1993. Detection of fumonisins B₁, B₂, and B₃ and hydrolyzed fumonisin B₁ in corn-containing foods. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 41: 1655-1658. DOI: 10.1021/jf00034a026

Jouany, J. P., 2007. Methods for preventing, decontaminating and minimizing the toxicity of mycotoxins in feeds. Animal Feed Science and Technology, 137:342-362. DOI: 10.1016/j.anifeedsci.2007.06.009

Magan, N., Hope, R., Cairns, V. and Aldred, D.C.N., 2003. Post-harvest fungal ecology: impact of fungal growth and mycotoxin accumulation in stored grain. European Journal of Plant Pathology, 109:723-730.

Magan, N. and Aldred, D.C.N., 2007. Post-harvest control strategies: minimizing mycotoxins in the food chain. International Journal of Food Microbiology, 119: 131-139. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2007.07.034

Mallmann, A.O., Marchioro, A., Fontoura, F.P., Almeida, C.A.A., Dilkin, P. Mallmann, C.A., 2010. Mycotoxin occurrence and co-occurrence in dog feed. In: Scussel, V.M.; Nones, J.; de Souza Koerich, K.; Santana, F.C. de O.; Beber, M.; Neves, L.S.D'e.; Manfio, D. Proceedings of International Conference on Pet Food Quality & Safety & 14th National Mycotoxin Meeting. October 25-28, 2010, Florianopolis, SC, Brazil, p.68.

Marin, P., Magan, N., Vazquez, C. and Gonzalez-Jaen, M.T., 2010. Differential effect of environmental conditions on the growth and regulation of the fumonisin biosynthetic gene FUM1 in the maize pathogens and fumonisin producers *Fusarium verticillioides* and *Fusarium proliferatum*. FEMS Microbiology Ecology, 73: 303-311. DOI: 10.1111/j.1574-6941.2010.00894.x

Martins, M.L., Martins H.M. and F. Bernardo, 2003. Fungal flora and mycotoxins detection in commercial pet food. Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias, 98: 179-183. Available at: http://www.fmv.utl.pt/spcv/PDF/pdf12_2003/548_179_183.pdf. Accessed 10 July 2012.

Orsi, R.B. Correa, B., Pozzi, C.R., Schammas, A. E., Nogueira, J.R., Dias, S.M.C. and Malozzi, M.A.B., 2000. Mycoflora and occurrence of fumonisin in freshly harvested and stored hybrid. Journal of Stored Products Research, 36:75-87.

Osborne, B.G., 1982. Mycotoxins and the cereal industry – a review. Journal of Food Technology, 17:1-9.

Pacheco, A.M and Scussel, V.M., 2007. Selenium and aflatoxins levels in raw Brazil nuts from the Amazon basin. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 55:11087-11092. DOI: 10.1021/jf072434k

Pitt, J. I. and Hocking A. D., 2009. Fungi and food spoilage. Springer, the Netherlands, 520 pp.

Pozzi, C.R., Corrêa, B., Xavier, J.G., Direito, G.M., Orsi, R.B., Matarazzo, S.V., 2001. Effects of prolonged oral administration of fumonisin B1 and aflatoxin B1 in rats. Mycopathologia, 151:21-7. DOI: 10.1023/A:1010954119980

Riley, R.T., Wang E. and Merrill Jr, A.H., 1994. Liquid chromatography of sphinganine and sphingosine: Use of the sphinganine to sphingosine ratio as a biomarker for consumption of fumonisins. *Journal Association Official Method of Analysis of Chemistry International*. 77:533-540.

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

Scaff, R.M.C. and Scussel, V.M., 2004. Fumonisin B₁ and B₂ in corn-based products commercialized in Santa Catarina State - Southern Brazil Brazilian. *Archives of Biology and Technology*, 47:911-919. <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-89132004000600011>

Scudamore, K.A., Hetmanski, M.T., Nawaz, 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 Additives and Contaminants*, 14:175–186.

Scussel, V.M., 2002. Fungos em Grãos Armazenados. In: Lorini I., Mike, L; Scussel, V.M. (eds). *Armazenagem de Grãos*. Biogeneziz, Campinas, Brazil, pp. 938.

Scussel, V.M., Giordano, B.N., Simao, V., Rocha, M.W., dos Reis L.F.C. and J.J.M. Xavier, 2006. Mycotoxin evaluation in pet food by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. In: *The World Mycotoxin Forum. Proceedings of the World Mycotoxin Forum*. November 6-8, 2006. Cincinnati, Ohio, USA, pp. 11.

Scussel, V. M., M. Beber, K. M. Tonon, 2011. Efeito da doença *Gibberellazeae* na qualidade de grãos de inverno. In: *Gibberella Zeae em Cereais de Inverno*, Erlei Melo Reis (Eds). pp: 131-175

Silva, L., Fernández-Franzón, M., Font, G., Pena, A., Silveira, I., Lino C. and Mañes, J., 2009. Analysis of fumonisins in corn-based food by liquid chromatography with fluorescence and mass spectrometry detectors. *Food Chemistry*, 112:1031-1037. DOI: 10.1016/j.foodchem.2008.06.080

Soriano, J.M. and Dragacci, S., 2007. Fumonisin. In: Soriano, J. M. (ed.). *Micotoxinas en alimentos*. Díaz de Santos, Madrid, Spain, pp.223.

Thompson, A.H., Narayanin, C.D. Smith, M.F. and Slabbert, M.M., 2011. A disease survey of *Fusarium* wilt and *Alternaria* blight on sweet potato in South Africa. *Crop Protection* 30:1409-1413. DOI: 10.1016/j.cropro.2011.07.017. ISSN: 0261-2194

Visconti, A., Doko, M.B., Bottalico, C., Schurer, B. & Boenke, A., 1994. Stability of fumonisins (FB1 and FB2) in solution. *Food Additives Contaminants*, 11: 427–431.

Voss, K., Smith G. and W. Haschek, 2007. Fumonisin: Toxicokinetics, mechanism of action and toxicity. *Animal Feed Science and Technology*, 137:299-325. DOI: 10.1016/j.anifeedsci.2007.06.007

CAPÍTULO 7

CONTAMINANTES BIOLÓGICOS EM ALIMENTOS SECOS PARA CÃES E SUA RELAÇÃO HIGIÊNICO-SANITÁRIA COM ETAPAS DO PROCESSAMENTO

Trabalho aceito:
Semina (ISSN 1676-546X)
ID 16435

CONTAMINANTES BIOLÓGICOS EM ALIMENTOS SECOS PARA CÃES E SUA RELAÇÃO HIGIÊNICO-SANTITÁRIA COM ETAPAS DO PROCESSAMENTO

BIOLOGICAL CONTAMINANTS IN DRY DOG FOODS AND THEIR RELATION TO SANITARY-HYGIENIC PROCESS

Karina Koerich de Souza¹, Thamara Wisintainer da Silva², Elisa Helena Siegel Moecke², Vildes M. Scussel¹

¹Laboratório de Micotoxicologia e outros Contaminantes, Departamento Ciência dos Alimentos, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina. R. Admar Gonzaga, 1346, 88.034-001, Itacorubi, Florianópolis, SC, Brasil. e-mail: kakoerich@yahoo.com.br

²Núcleo de Microscopia de Alimentos, Departamento Ciência dos Alimentos, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina. R. Admar Gonzaga, 1346, 88.034-001, Itacorubi, Florianópolis, SC, Brasil

Resumo

O presente trabalho reporta a qualidade e segurança de alimentos completos secos destinados a cães produzidos no Brasil e comercializados em embalagens seladas, quanto à presença de contaminantes biológicos: (a) insetos, ácaros e pêlos de roedores (sujidades leves); (b) fungos e seus principais gêneros (deteriorantes e toxigênicos), bem como (c) níveis de contaminação por fumonisinas (FBs=FB₁+FB₂). Do total de amostras analisadas, 87,1% apresentaram sujidades leves. Fragmentos de insetos foram observados em 80,6% das amostras, indicando exposição da matéria prima a insetos antes do processamento. Os ácaros estavam presentes em 51,6% das amostras, podendo desencadear reações alérgicas aos animais expostos ao alimento contaminado. Pêlos de roedores não foram encontrados. Importante salientar que essas sujidades biológicas são veiculadoras de micro-organismos, favorecendo a disseminação e crescimento bacteriano e fúngico. Com relação aos ensaios micológicos foi observado contaminação por fungos em 100% das amostras, porém com carga fúngica (1,0x10² a 1,1x10³ UFC/g) em níveis aceitáveis ao preconizado no Brasil (<10⁴). Foram isolados os gêneros *Aspergillus* (80,6%) e *Penicillium* (54,8%), considerados fungos de armazenagem e importantes produtores de micotoxinas. Os níveis de FB₁ variaram de

0,074 a 0,597 mg/Kg (média: 0,052 mg/Kg; DP: 0,115; DPR% 230), apresentando frequência em amostras para filhotes (33,4%) e adultos (32%), com valores médios de 0,035 e 0,056 mg/Kg, respectivamente. Para o controle desses contaminantes biológicos e seus metabólitos é necessário aplicação de boas práticas em todas as etapas de produção, armazenagem e principalmente na seleção das matérias primas antes do processamento.

Palavras-chave: insetos, ácaros, alimentos secos, cães, fungos, micotoxinas

Abstract

This work reports the quality and safety of complete dry dog food produced in Brazil and sold in sealed packages for the presence of biological contaminants: (a) insects, mites and rodent hair (light filth), (b) fungi and its main genera (spoilage and toxigenic) and (c) levels of fumonisins contamination (FBs = FB1 + FB2). Of total samples analyzed, 87.1% had some light filth. Insect fragments were observed in 80.6% of samples, indicating raw material exposure to insect before processing. Mites were present in 51.6% of samples, which can cause allergic reactions in animals exposed to contaminated food. Rodent hair was not found. Important to emphasize that the biological light filths are carriers of microorganisms, favoring the bacteria and fungi growth. With respect to mycological tests, fungal contamination was observed in 100% of the samples, whereas with the fungal load ($1.0 \times 10_2$ to $1.1 \times 10_3$ CFU/g) at acceptable levels that recommended in Brazil ($<10^4$). Regarding fungi genera, the most isolated were *Aspergillus* (80.6%) and *Penicillium* (54.8%), considered storage fungi and important mycotoxins producers. FB₁ levels ranged from .074 to .597 mg/kg (mean: 0.052 mg/kg, SD = 0.115; RSD 230%), with frequency in puppy samples (33.4%) and adults (32%), with values average 0.035 and 0.056 mg/kg, respectively. To control these biological contaminants and metabolites is necessary implementation of good practices at all stages of production, storage and especially in the selection of the raw materials before processing.

Key words: insects, mites, dry food, dogs, fungi, mycotoxins

Introdução

A presença de contaminantes biológicos nos alimentos é um indicativo de descuido no controle higiênico-sanitário durante as fases que envolvem desde a obtenção e seleção da matéria prima,

industrialização (manipulação, processamento e embalagem) até armazenamento, transporte e comércio do produto acabado (BOESE; CHICOWICZ, 1995). Dentre os contaminantes biológicos comumente encontrados em alimentos, podem ser citados os insetos, ácaros, pêlos de roedores (considerados sujidades leves) – importantes veiculadores de micro-organismos e seus metabólitos (toxinas).

A pesquisa de sujidades biológicas presentes nos alimentos é importante indicadora da qualidade física, sanitária e nutricional do produto (GREDILHA et al., 2005). Esses agentes são responsáveis pela perda de qualidade sensorial (deterioração da matéria prima) e são considerados importantes veiculadores de contaminantes microbiológicos (bactérias e fungos patogênicos e/ou toxigênicos) (BRASIL, 2003). Por esta razão a microscopia vem sendo adotada como prática corrente na avaliação de qualidade e segurança dos alimentos (DOS SANTOS et al., 2000; GREDILHA et al., 2005). São exemplos de sujidades biológicas leves os ácaros (artrópodes do filo Arachnida), larvas, insetos (seus ovos e fragmentos), além de pêlos de roedores (LORINI, 2002; BRASIL, 2003).

A sujidade leve mais comumente encontrada em alimentos são insetos e seus fragmentos. A presença dessas sujidades em alimento para animais de companhia pode ser um indicativo de falhas no processo de fabricação, desde a seleção da matéria prima (proliferação de insetos no campo e/ou seu armazenamento inadequado na fábrica), até falhas no processamento e armazenamento do produto final (VARGAS; ALMEIDA, 1996). Os insetos são importantes agentes responsáveis pela deterioração dos grãos e alimentos, pois estão implicados nas perdas de matéria seca, devido à utilização das reservas de amido (fonte de carboidratos), proteínas e óleo (fonte de lipídios) (VARGAS; ALMEIDA, 1996; LORINI, 1998). É considerável também o potencial desses insetos na veiculação de micro-organismos (BRASIL, 2003), tanto deteriorantes quanto patogênicos (SINGHI; SETHI; SHARMA, 1980), além de propiciar a proliferação e aparecimento de fungos e produção de micotoxinas, que permanecem nos alimentos finais (VARGAS; ALMEIDA, 1996; LORINI, 1998, 2002).

Os ácaros detectados em alimentos são considerados ácaros de armazenamento. Os alimentos secos destinados a animais de companhia possuem características que os tornam muito propícios ao desenvolvimento desses ácaros, principalmente por apresentar alto teor de cereais, composição rica em gorduras e proteínas (substratos importantes para seu crescimento). Além disso, por conter um teor de umidade intermediário, favorece o crescimento de fungos - fonte de

alimento para os ácaros de armazenamento (BRAZIS, 2011). Esses agentes podem desencadear reações alérgicas nos animais tanto por contato, ingestão de alimento contaminado ou inalação. É considerada a causa mais freqüente do quadro de dermatite atópica canina. Os principais ácaros que constituem esse grupo são os *Tyrophagusputrescentiae*, *Acarus siro* e *Lepidoglyphus destructor*. O seu controle geralmente é dificultado pelo fato de eles passarem despercebidos, devido ao seu tamanho reduzido (LORINI, 1998; FLECHTMANN; ZEM, 2002; BRAZIS, 2011).

A presença de pêlos de roedores nos alimentos é um indicativo do contato desse animal em alguma etapa de obtenção e/ou produção do alimento. Os roedores constituem sério problema em todas as fases de processamento, produção e armazenamento de gêneros alimentícios. Além da perda de alimento devido ao consumo por estes animais, normalmente ocorre a contaminação pela presença de seus pêlos, fezes e/ou urina. Os roedores podem ser transmissores em potencial de uma série de doenças bacterianas, virais e fúngicas (FERREIRA, 2011).

Com relação aos fungos presentes em alimentos, podem predominar nas matérias-primas os fungos de campo dos gêneros *Alternaria*, *Cladosporium*, *Fusarium* e *Helminthosporium* (LI et al., 2000; SCUSSEL, 2002; SCUSSEL et al., 2011). Existe pouco ou nenhuma possibilidade de controle sobre as condições que favorecem o desenvolvimento destes fungos, pois eles invadem a cultura durante os estádios finais de maturação (DE SOUZA KOERICH; SCUSSEL, 2013). As toxinas produzidas por fungos dos gêneros *Alternaria* e *Fusarium* são o alternariol e alternariol metílico; fumonisinas (FBs), zearalenona, desoxinivalenol, respectivamente. Por outro lado, os fungos de armazenagem (*Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus* e *Mucor*) são encontrados em grande número em armazéns, moinhos, silos, moegas, elevadores e equipamentos (SCUSSEL, 2002; LORINI, 2002), contaminando as matérias primas utilizadas na produção de alimentos. Causam também danos aos produtos finais se as condições de armazenagem forem impróprias à manutenção da qualidade dos mesmos.

Com relação às sujidades e favorecimento na produção de micotoxinas em alimentos para animais de companhia, importância deve ser dada as micotoxinas produzidas no campo (principalmente as FBs), onde a presença de insetos e outros vetores propiciam a proliferação fúngica e produção desses metabólitos. As FBs são produzidas principalmente por *Fusarium verticillioides* e *F. proliferatum* (JECFA,

2001; SCUSSEL, 1998, 2002). Os grãos oferecem boas condições para sua presença, principalmente o milho, sorgo e trigo (CRUZ, 2010). Apresenta elevado potencial de risco de intoxicação aos animais de companhia, já que a formulação de seus alimentos é principalmente à base de milho (DE SOUZA KOERICH; LUCHTENBERG; SCUSSEL, 2013; DE SOUZA KOERICH; SCUSSEL, 2013), além da dificuldade de degradação das toxinas após contaminação do alimento. Os LMTs recomendados de FBs para animais de companhia estabelecidos pela agência americana *Food and Drug Administration* (FDA, 2001) e pela *European Commission* (EC, 2006) para FB_{total} ($FB_1 + FB_2 + FB_3$) é de 10 mg/kg para o milho e 5 mg/kg para produtos finais, respectivamente.

A análise de matérias microscópicas presentes nos alimentos e o conhecimento da presença de sujidades biológicas leves (insetos, ácaros e pêlos de roedores) devem ser baseadas em aspectos relacionados ao risco à saúde (BRASIL, 2003). A biodiversidade fúngica e os padrões de formação de micotoxinas de campo também são importantes para o desenvolvimento de procedimentos de controle e prevenção de sua contaminação - desde a produção da matéria prima no campo até as condições de armazenamento do produto final, evitando danos diretos ou indiretos à saúde dos animais (DE SOUZA KOERICH; SCUSSEL, 2013).

Considerando que não existe legislação específica em alimentos para animais de companhia no país, o presente trabalho objetivou avaliar a qualidade e segurança de alimentos completos secos para cães adultos e filhotes produzidos e comercializados no Brasil quanto a insetos, ácaros e pêlos de roedores - carreadores de contaminantes biológicos; fungos e seus principais gêneros - responsáveis por deterioração e toxinas e sua relação higiênico-sanitário com as etapas de processamento.

Material e Métodos

Material

Amostras: alimentos secos (31) para cães adultos (25) e filhotes (06) de diferentes marcas, fabricadas e comercializadas no Brasil em embalagens seladas de polietileno, com quantidade aproximada de 300 a 400g.

Químicos: (a) reagentes: ácido clorídrico (HCl), ácido fosfórico, cloreto de potássio, ácido acético, fosfato de sódio monobásico, hidróxido de sódio, 2-mercaptoetanol, *o*-ftalaldeído (OPA),

todos grau analítico (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil); (b) *solventes*: isopropanol 40%, acetonitrila (ACN) e metanol (MeOH) grau HPLC (J.T. Baker, Texas, EUA) e água ultrapura (Millipore, São Paulo, Brasil); (c) padrões: FB₁ e FB₂ 1 mg (Sigma Chemical, St. Louis, EUA).

Meios de cultura: peptona bacteriológica e agar extrato de malte (MEA) (HIMEDIA, Mumbai, Índia).

Equipamentos: balanças analítica e semi-analítica (Shimadzu, Kioto, Japão), moinho (Romer, Miami, USA), estufa bacteriológica (Fanem, São Paulo, Brasil), agitador magnético com aquecimento (Marconi, São Paulo, Brasil), bomba a vácuo (Tecnal, São Paulo, Brasil), capela de fluxo laminar (Veco, Campinas, Brasil), microscópios óptico e estereoscópico (Carl Zeiss, Jena, Alemanha), liquidificadores de aço inoxidável (Metvisa, Santa Catarina, Brasil), agitador magnético com aquecedor (Tecnal, São Paulo, Brasil), homogeneizador de amostras *stomacher* (Interscience, St. Nom, França), contador de colônias manual (Phoenix, São Paulo, Brasil), sistema de filtração de solvente (Millipore, São Paulo, Brasil) e sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) composto de injetor com *loop* de 20 µl (Rheodyne, California, EUA), bomba isocrática, detector de fluorescência - FD (excitação 335 nm; emissão 440 nm) (Gilson, Vivier le Bel, França) e coluna cromatográfica de fase reversa C₁₈ com comprimento, diâmetro interno de 250 x 4,6 mm, respectivamente, e tamanho de partícula de 5 µm (Phenomenex, California, EUA).

Outros materiais: frasco armadilha de Wildman, frascos de vidro com tampa de polietileno, peneiras granulométricas (mesh 0,250 mm) (Bertel, São Paulo, Brasil), cartuchos de extração em fase sólida (SPE) 500mg/6mL (Applied Separations, Pensilvânia, EUA), gás nitrogênio grau analítico (White Martins, Rio de Janeiro, Brasil), filtro de papel Whatman n^o4 (Whatman, Maidstone, Inglaterra) e membrana de filtro de 0,45 e 0,45 mm de diâmetro e porosidade, respectivamente (Millipore, São Paulo, Brasil).

Métodos

Coleta e preparo das amostras: foram coletadas randomicamente, triturados e homogeneizados. De cada amostra coletada foram separadas porções de 50, 25, 50 g para análises de sujidades biológicas leves, ensaios micológicos (contagem total de fungos e identificação de gênero fúngico) e pesquisa de FBs, respectivamente.

Identificação e contagem total de sujidades biológicas leves:

foi aplicado o método de flutuação 970.71 (16.14.12) (AOAC, 2005). O método consiste na extração de ácaros e sujidades leves (pêlos de ratos/insetos/larvas) pela hidrólise ácida do alimento (com HCl). A amostra (50g) foi adicionada em béquer com água destilada e HCl e submetida à agitação magnética com aquecedor para realização da digestão ácida. Após, foi realizada filtração da amostra com peneira granulométrica (mesh 0,250 mm) e material transferido para o frasco armadilha com isopropanol 40% e HCl. A separação foi baseada na propriedade oleofílica-hidrofóbica dessas estruturas após adição 50 mL de óleo mineral. O frasco armadilha foi completado com isopropanol 40%, realizado filtração e análise em microscópio estereoscópico do material retido.

Ensaio micológico: (a) contagem total de fungos (APHA, 2001): porção de 25g da amostra foi separada e acondicionada em saco para homogeneização estéril, diluída com água peptonada (1%) e homogeneizada em equipamento *stomacher*. Em seguida foi realizado o plaqueamento de superfície em meio MEA em capela fluxo laminar (em duplicata). Ao final do plaqueamento, as placas foram incubadas em estufa à $25\pm 1^\circ\text{C}$ por um período de 5 dias. Após o crescimento foi realizada a contagem total de colônias e resultado expresso em UFC/g. *(b) identificação dos gêneros fúngicos*: foi realizada pela técnica de cultura direta das amostras também em meio MEA para o isolamento dos gêneros fúngicos. As colônias isoladas foram repicadas e incubadas à 25°C por 3 dias para observação da micromorfologia pela técnica de microcultivo (WEBER; PITT, 2000) sob microscópio óptico, visando a identificação de gênero pelos critérios de taxonomia de Raper e Fennell (1965) e Pitt e Hocking (2009).

Pesquisa de FBs: a amostra (50g) foi submetida às etapas de extração, limpeza, concentração e quantificação por fluorescência - FD conforme art. 995.15 descrita no AOAC (2005). *(a) soluções padrão*: soluções de FB₁ e FB₂ (100 µg/mL) foram preparadas em 10 mL de ACN:H₂O (1:1) de acordo com Visconti et al. (1994) e armazenadas em frascos âmbar a -18°C ; *(b) etapa de extração*: foi realizada pela adição de MeOH/água (3:1) e homogeneização em liquidificador. Após filtração, foi realizada a *(c) limpeza do extrato* utilizando coluna SPE, com condicionamento da coluna com sucessivas passagens de MeOH e MeOH:água (3:1), aplicação da amostra, retirada dos interferentes com adição de MeOH:água (3:1) para posterior eluição das FBs com MeOH/ácido acético (99:1) sob gravidade; *(d) etapa de concentração*: o extrato foi concentrado em bloco aquecedor com fluxo de nitrogênio gasoso à 40°C ; *(e) etapa de derivatização*: amostra foi suspensa com

MeOH e derivatizado, com solução de OPA (25 μ L de extrato, 225 μ L OPA, 2 min) e (f) *etapa de detecção e quantificação*: o extrato foi injetado no CLAE equipado com FD (λ = exc. 335 nm e em. 440 nm) e coluna C₁₈. A fase móvel utilizada foi MeOH:fosfato monobásico de sódio (77:23) com fluxo 0,8 ml/min. O limite de detecção (LOD) para o método foi de 0,006/0,014/0,024 mg/kg e limite de quantificação (LOQ) de LOQ: 0,021/0,044/0,065 mg/Kg para FB₁/FB₂/FB_{total}, respectivamente, e a recuperação foi de 87 \pm 11,5%.

Resultados e discussão

Dos dados obtidos quanto a presença de sujidades biológicas leves, carga fúngica e níveis de FBs, foi possível observar variações na qualidade higiênico-sanitária e segurança das amostras de alimentos para cães avaliadas. A Tabela 1 e Figura 1 apresentam os dados qualitativos e quantitativos dos diferentes parâmetros avaliados, enquanto que a Figura 2 ilustra dois tipos de contaminantes biológicos mais encontrados nos alimentos completos analisados.

Sujidades biológicas leves - indicadores de alterações higiênico-sanitárias

A presença de sujidades leves nos alimentos secos para cães é considerada um indicativo de descuido com o controle higiênico-sanitário durante a colheita e armazenamento da matéria prima, bem como no processamento, incluindo, a eficiência no acondicionamento do produto final e sua comercialização. Na avaliação realizada no presente estudo, 87,1% (27) das amostras continha alguma sujidade biológica, sendo que somente quatro amostras para cães adultos não apresentaram contaminação. Quanto aos tipos de sujidades, 42% (13) apresentaram presença de sujidades individuais e 45% (14) das amostras continham dois tipos de sujidades concomitantemente (fragmentos de insetos e ácaros) (Figura 1). Por outro lado, pêlos de roedor e não foram encontrados nesse estudo, indicando que tanto a matéria prima como o produto final não tiveram contato com a urina e/ou fezes do roedor (importantes veiculadores de leptospirose).

(a) *Insetos*: fragmentos de insetos foram observados em 80,6% das amostras, indicando exposição da matéria prima a insetos antes do processamento. A identificação desses fragmentos possibilitou classificar os insetos como pertencentes a ordem Coleoptera, normalmente

encontrados nos grãos (*Rhyzoperthadominica*, *Sitophilus zeamais* e *Sitophilus oryzae*: gorgulho dos cereais, milho e arroz, respectivamente). São consideradas espécies daninhas à agricultura (pragas relevantes em plantaçoão desses cultivos), infestando grãos no campo e durante o armazenamento, contribuindo para a disseminaçoão de microorganismos (bactérias e fungos deteriorantes, patogênicos e toxigênicos) (LORINI, 2002). Em estudos realizados por de Souza Koerich et al. (2010), pesquisando sujidades leves em alimentos secos para cães, contudo comercializados à granel, foi identificado um porcentagem maior de sujidades (em 94% das amostras) se comparada com o presente estudo (amostras embaladas e seladas). Os autores registraram fragmentos de insetos em 87,5% das amostras (na faixa de 1-10 e 11-30 fragmentos em 85,8 e 14,2% das amostras, respectivamente). Durante a moagem, mistura e/ou processamento de matérias primas, os insetos são, geralmente, quebrados em pequenos fragmentos, o que auxilia na localizaçoão e identificaçoão da etapa em que eles estiveram em contato com o alimento (VARGAS; ALMEIDA, 1996). Pelos dados obtidos, é provável que essa contaminaçoão por insetos já estivesse presente na etapa de obtençoão da matéria prima (proveniente do campo). Esses insetos podem favorecer o crescimento fúngico pelos danos causados aos grãos e consequentemente, produçoão de micotoxinas (FBs), se em condiçoões adequadas de temperatura (15-30°C) e umidade (entre 18 a 29%) (PITT; HOCKING, 2009; MARIN et al., 2010). Entre os danos causados pela presença de insetos na alimentaçoão animal estão também os riscos de contaminaçoão bacteriana pela sua disseminaçoão e a perda de qualidade nutricional do produto, ambas prejudicando a saúdedos animais (GREDILHA et al., 2005). Essa preocupaçoão se estende aos alimentos para filhotes analisadas no estudo, já que todas as amostras continham algum tipo de sujidades (incluindo insetos). Lembrando que animais em fase de crescimento não possuem o sistema imunológico completamente desenvolvido.

Pelo fato de não ter sido encontrado insetos inteiros nas amostras, esses dados indicam que não houve contaminaçoão por insetos nas etapas finais de armazenamento e transporte, e sim antes ou durante o processamento de amostras. Também indica um bom armazenamento dos produtos finais no comércio varejista, já que a embalagem e selagem utilizadas foram resistentes e inviabilizaram acesso de insetos ao interior do produto.

(b) *Ácaros*: com relaçoão à presença de ácaros, estes foram detectados em 51,6% (16) das amostras, conforme indicado na Tabela 1 e Figuras 1 e

2. Os ácaros de armazenamento (*Tyrophagus putrescentiae*, *Acarus siro* e *Lepidoglyphus destructor*) são os mais comumente encontrados em cereais, matérias primas utilizadas para a produção de alimentos para animais de companhia (LORINI, 2002; DE SOUZA KOERICH; SCUSSEL, 2013). Esses alimentos secos contêm um conteúdo de umidade intermediária (em torno de 10%) e são ricos em teores de gordura e proteína, o que os torna suscetíveis a crescimento de fungos, proporcionando condições ideais para o aparecimento de ácaros - já que os fungos servem de alimento para ácaros de armazenamento (BRAZIS, 2011). Em um estudo de avaliação da presença desse tipo de ácaro realizado em 283 centrais de distribuição de cereais, os mesmos foram encontrados em 81% dos estabelecimentos. Em outro estudo envolvendo 178 fábricas de rações para animais de produção, ácaros de armazenamento foram encontrados em 89% das instalações (PRICKETT, 1992; 1994). Na Inglaterra, também foram encontrados ácaros, nesse caso, em 100% (36) das amostras de ração para animais de produção - bovinos e ovinos (CHAMBERS et al., 1999). As principais causas do seu aparecimento são as condições de armazenagem, relacionadas com o grau de limpeza dos depósitos, umidade relativa do ambiente, temperatura e infestação de insetos nas matérias primas (LORINI, 1998; 2002, FLECHTMANN; ZEM, 2002). Convém enfatizar que a proliferação de ácaros também pode ocorrer em condições domiciliares, desde que os alimentos para o animal de companhia sejam armazenados em condições inadequadas (embalagens abertas, expostas a condições ambientais adversas - umidade relativa do ar de 75 a 87% e temperatura de 25 a 30°C). Num estudo realizado por Brazis et al. (2008) para avaliação dessa contaminação em alimentos com embalagens abertas e expostas ao ambiente, alimentos secos comerciais de diferentes marcas foram armazenados durante seis semanas com suas embalagens abertas em ambiente domiciliar. Como resultado, foi observado presença de ácaros em 90% das amostras, sendo mais prevalente o gênero *Tyrophagus* spp. Importante enfatizar que cães e gatos podem ser expostos aos ácaros tanto pelo contato, ingestão ou inalação, podendo desencadear reações alérgicas. Essa exposição é considerada a causa mais freqüente do quadro de dermatite atópica canina, podendo causar sinais patogênicos não sazonais, incluindo prurido, eritema e otites de repetição em cães e gatos. Em estudo realizado nos Estados Unidos, Arlian, Schumann e Morgan (2003) relataram que 94% de um grupo de cães atópicos exibiram IgE específica contra estes ácaros, principalmente *Tyrophagus*, enquanto que, em outro estudo na França (BENSIGNOR; CARLOTTI, 2002)

mostrou que 46% de um grupo de cães atópicos, testados intradermicamente, apresentou reações positivas aos ácaros de armazenamento, sozinhos ou em combinação com os ácaros.

Legislação: é importante ressaltar que no Brasil não há legislação específica para o cumprimento dos parâmetros microscópicos e presença de sujidades biológicas leves em alimentos destinados a animais de companhia. Na ausência de parâmetros específicos para animais, os resultados observados no estudo foram comparados a Resolução RDC nº 175 de 08/08/2003 (BRASIL, 2003) que estabelece as disposições gerais para avaliação de matérias macroscópicas e microscópicas prejudiciais à saúde humana em alimentos embalados. As sujidades biológicas leves identificadas em alimentos para cães (como fragmentos de insetos e ácaros) são consideradas prejudiciais à saúde humana (e indiretamente, risco à saúde animal) pelo fato de serem considerados importantes vetores mecânicos de contaminantes alimentares (fungos, vírus, bactérias). A omissão no controle sanitário do processamento e armazenamento desses alimentos reforça a preocupação dos cuidados que devem ser realizados quanto à aquisição da matéria prima, produção e armazenagem desses alimentos industrializados. Para que se previnam essas contaminações, é necessário manter o controle higiênico-sanitário em todas as etapas de produção, armazenamento e distribuição do alimento, conforme estabelecido na Instrução Normativa nº 4, de 23/02/2007 (BRASIL, 2007), que estabelece as condições higiênico-sanitárias e de boas práticas de fabricação para estabelecimentos fabricantes de produtos destinados à alimentação animal.

Fungos - indicadores de deterioração e toxinas

Foi observado crescimento de fungos em todas as amostras analisadas, assim como foram identificados com maior frequência, os gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* (Tabela 1).

(a) *Contagem total de fungos:* a avaliação da carga fúngica tem sido um bom indicador de condição de higiene sanitária de alimentos comerciais para animais de companhia. Os danos causados por fungos normalmente estão relacionados com perdas nutricionais de matérias-primas e deterioração de produtos acabados. Na determinação da contagem total de fungos presentes nas amostras de alimentos para cães foi observado que todas apresentaram contaminação, provavelmente devido ao fato dos cereais utilizados para a produção do alimento de animais de

companhia ser bons substratos para seu crescimento (González, FRANÇOIS; RENAUD, 1997). Os níveis de contaminação variaram entre $1,0 \times 10^2$ e $1,1 \times 10^3$ UFC/g (DP 247,1; DPR% 111,71). A mais elevada contaminação fúngica foi observada em uma amostra, para cães adultos ($1,1 \times 10^3$ UFC/g), que estava acondicionada em embalagem devidamente selada de polietileno - indicando utilização de matéria prima contaminada. Isso indica que pode haver crescimento fúngico em condições mínimas de temperatura e umidade, mesmo com o produto final devidamente acondicionado em embalagens seladas. Contudo, essas amostras positivas apresentaram contagens baixas (CFU) de contaminação, provavelmente devido à também baixa atividade de água (a_w) e mc desses alimentos extrusados para cães. O processo de extrusão reduz a mc de 25% (antes da secagem) para um teor de 8 a 10% (no produto acabado), reduzindo indiretamente os esporos fúngicos viáveis. Esta informação coincide com estudos anteriores que relataram uma diminuição significativa das contagens de fungos quando o processo de extrusão foi aplicado (DALCERO et al., 2002; MARTINS; MARTINS; BERNARDO, 2003), onde todas as amostras positivas apresentaram níveis baixos de contaminação (variando de $>1,0$ a $1,0 \times 10^2$ UFC/g). Os resultados obtidos por de Souza Koerich, Horn e Scussel (2013) também foram semelhantes, onde relataram contagem total variando de $<1,0 \times 10^2$ a $1,9 \times 10^3$ CFU/g em alimentos secos destinados a cães e gatos adultos e filhotes.

Legislação: no Brasil, é preconizado que as contagens de fungos em alimentos comerciais de animais de produção (bovinos, suínos e aves) não ultrapassem a $1,0 \times 10^5$ UFC/g (BRASIL, 2000). Já para animais de companhia, não existe limite estabelecido oficialmente. A ABINPET (2008), associação que orienta os produtores de alimentos para esses animais, recomenda que a contagem não deva ultrapassar à $1,0 \times 10^4$ UFC/g. Todas as amostras analisadas estavam com níveis abaixo do limite acima recomendado pela ABINPET.

(b) *Gêneros fúngicos isolados:* os resultados obtidos demonstraram que fungos dos gêneros *Aspergillus* spp. (80,6%) e *Penicillium* spp. (54,8%) foram os mais isolados das amostras analisadas. O gênero *Aspergillus*, encontrado em maior porcentagem, é considerado indicador de deterioração em grãos e produtos acabados (RUMBEIHA, 2000; SCUSSEL, 2002). São fungos de armazenagem os mais importantes produtores de micotoxinas. Esses fungos são considerados xerofílicos, crescendo em condições de baixa a_w (0,68-0,80), condição observada em alimentos secos para animais de companhia. Em estudo realizado por de

Souza Koerich, Horn e Scussel (2013) na avaliação de contaminantes microbiológicos de alimentos secos para cães e gatos comercializados em diferentes países, os gêneros mais frequentemente observados foram *Aspergillus* spp. (40%) e *Penicillium* spp. (35%). Martins, Martins e Bernardo (2003), avaliando a contaminação fúngica em 60 amostras de alimentos secos para animais de companhia (cães, gatos e pássaros) de diferentes marcas comercializados no varejo, isolaram diferentes gêneros fúngicos, sendo o *Aspergillus* spp. o identificado em 58,3% de amostras, seguido por *Penicillium* spp., que ocorreu em 38,3%. Campos et al.(2008), em estudo realizado para isolar e identificar a microbiota fúngica em alimentos secos para cães, observaram que o gênero *Aspergillus* foi predominante (65-89%), seguido por *Penicillium* e *Fusarium*. Por outro lado, Bueno, Silva e Oliver (2001) em 21 amostras de alimentos para cães e gatos, encontraram o gênero *Aspergillus* (62%) predominando, seguido de *Rhizopus* (48%) e *Mucor* (38%). Já Scudamore et al. (1997) isolaram principalmente *Penicillium* spp.e *Eurotium* spp. em 10 amostras de alimentos para animais de companhia. Quanto a contaminação fúngica em ração para animais de produção (bovinos, suínos e aves), Abarca et al. (1994) encontraram fungos do gênero *Penicillium*, *Aspergillus* e *Fusarium*. Dalcerro et al. (1998) observaram resultados semelhantes em rações para aves e em menor frequência foram observados os gêneros *Syncephalastrum*, *Cladosporium* e *Paecilomyces* (1%). Esses gêneros fúngicos são importantes na deterioração de alimentos com a_w reduzida (PITT; HOCKING, 2009). O gênero *Cladosporium* é considerado fungo de campo que invade as sementes e grãos durante o amadurecimento, causando danos antes da colheita. não se desenvolvem durante a armazenagem, exceto nos cereais armazenados em condições inadequadas de umidade e temperatura. Em estudo realizado por de Souza Koerich, Horn e Scussel (2013), na avaliação de contaminantes bacterianos e micológicos de alimentos para animais de companhia comercializados em diferentes países, os gêneros *Syncephalastrum* sp. e *Paecilomyces* sp. foram isolados em somente 8.3% (5/60) e 3.4% (2/60) das amostras.

De acordo com os resultados obtidos no presente trabalho, foi possível concluir que todos os alimentos secos para animais de companhia estavam contaminados por algum gênero fúngico. A detecção fúngica indica que seus esporos estavam presentes nessas amostras, e que, quando expostos às condições de umidade e temperatura ótimas, podem se desenvolver. Lembrando que a presença de sujidades biológicas leves (insetos e ácaros), detectados em 87,1%

das amostras, favorecem a disseminação e crescimento fúngico (tanto do campo como de armazenagem). A presença de fungos deteriorantes ou toxigênicos pode causar sérios riscos à saúde de cães, já que a alimentação dos animais de companhia é diária e baseada em alimento comercial completo, sem variação no tipo de alimentação oferecida (DE SOUZA KOERICH; SCUSSEL, 2013).

(c) *Contaminação por FBs*: as FBs apresentam considerável potencial para causar intoxicação, já que são encontradas em ingredientes que fazem parte da formulação de alimentos para pequenos animais. Em relação à nível de contaminação por FB_1 e FB_2 nas amostras de alimentos para cães avaliadas nesse estudo, 32,2% (10) apresentaram níveis acima do LOQ do método (0,021 e 0,065 mg/kg para FB_1 e FB_{total} , respectivamente). Não foram detectados níveis acima do LOQ para FB_2 (0,044 mg/kg). Os níveis de FB_1 variaram de 0,074 a 0,597 mg/kg (média: 0,052 mg/kg; DP: 0,115; DPR% 230,0). A contaminação por FB_1 foi observada em amostras para filhotes (33,4%) e adultos (32%), com valores médios de 0,035 e 0,056 mg/kg, respectivamente. No Brasil, as FBs já foram detectadas em vários substratos, especialmente no milho utilizado para a produção do alimento animal (SCUSSEL, 2002; SCUSSEL; SCAFF, 2004). A possibilidade da presença desse metabólito e os níveis de contaminação dependem do tipo de alimento (inclusão ou não de grãos: milho, sorgo, trigo, arroz), da proporção desses grãos e sua qualidade. Observando os resultados encontrados por Souza Koerich e Scussel (2013) em estudo para avaliação da contaminação por FBs em amostras de alimentos para animais de companhia comercializados à granel, a frequência de contaminação foi de 80% (24) em alimentos para cães. A percentagem de amostras positivas para FB_1 foi mais elevada (76,7%) quando comparada a FB_2 (43,3%). Níveis de contaminação variaram entre 0,04-1,60 e 0,04-0,27 mg/kg para FB_1 e FB_2 , respectivamente. Em um estudo realizado por Martins, Martins e Bernardo (2003) avaliando as micotoxinas em 60 alimentos secos para cães, FB_1 foi detectada em 5%, com níveis variando entre 0,012-0,024mg/kg. Por outro lado, Cruz (2010), avaliando FBs em 24 amostras de milho (grão) destinado a fabricação de alimentos para animais, foram detectadas em 83,3% das amostras com uma concentração média de 3,27 e 1,30 mg/kg para FB_1 e FB_2 , respectivamente, níveis muito mais elevados se comparados com resultados obtidos nesse estudo e outros relatados na literatura, contudo todos abaixo do recomendado internacionalmente.

Legislação: não há limites brasileiros estabelecidos para

contaminação de FBs em alimentos completos destinados a animais de companhia (DE SOUZA KOERICH; SCUSSEL, 2013). Levando em consideração legislações internacionais, o LMT para FBs (FB_{total}: FB₁ + FB₂ + FB₃) recomendado pelo FDA (2001) e CE (2006) para animais de companhia é de 10 mg/kg para o milho e 5 mg/kg de produtos finais, respectivamente. Apesar da falta desse limite oficialmente estabelecido pelo governo Brasileiro, a ABINPET recomenda um LMT de FB₁+FB₂ de 5 mg/kg para produtos acabados destinados a animais de companhia (ABINPET, 2008).

Sujidades biológicas leves versus toxinas

Com relação à presença de sujidades biológicas leves e o favorecimento na produção de micotoxinas produzidas no campo (principalmente as FBs), a presença de insetos e ácaros propiciam a proliferação fúngica e produção desses metabólitos. Nem sempre a presença da micotoxina de campo indica a presença concomitante do fungo produtor (*Fusarium*) no alimento acabado. O processo de extrusão a temperatura de 100-120°C, na qual o alimento completo é submetido, pode eliminar o fungo, contudo não elimina as toxinas (resistente a essa temperatura até 260°C), e nem as sujidades presentes. Há necessidade de maiores estudos para regulamentar a qualidade da matéria-prima e produto final para animais de companhia quanto à contaminação por FBs. A ingestão de alimento contaminado, mesmo em quantidades pequenas, expõe o animal continuamente a esse contaminante, considerado cancerígeno e com efeitos acumulativos (SCUSSEL, 2002; CRUZ, 2010).

Conclusão

Embora seja difícil a produção de alimentos totalmente livres de contaminação de diversas origens, é necessário um constante aperfeiçoamento das ações de controle sanitário na área de produção de alimentos. Também é necessário considerar que as matérias-primas destinadas à produção desses alimentos devem atender às condições higiênico-sanitárias de forma a garantir que o produto final não ofereça riscos à saúde animal. Essa preocupação se estende aos alimentos para filhotes analisadas no estudo, já que todas as amostras continham algum tipo de sujidade biológica, assim como presença de fungos e micotoxinas. Assim, o monitoramento do nível higiênico torna-se importante para que pontos críticos de contaminação por sujidades

biológicas possam ser identificados e controlados. Obter subsídios para uma revisão do atual padrão legal, com o estabelecimento de limite de tolerância dessas sujidades, como medida preventiva para garantir a saúde dos animais de companhia, se faz necessário.

Referências

Abarca, M.L.; Bragulat, M.R.; Castella, G.; Cabañes, F.J. Mycoflora and aflatoxin-producing strains in animal mixed feeds. *Journal of Food Protection*, v.57, n.3, p.256-258, 1994.

ABINPET. 2008. Associação Brasileira da Indústria de Produtos Fabricantes de Animais de Estimação. São Paulo, SP.

AOAC. Association Official Method of Analysis of AOAC Internacional. Thiex, NJW (E.d.), 18 ed. Maryland: AOAC international, 2005.

APHA. American Public Health Association. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, 4. ed. Washington DC. Frances Pouch Downes & Keith Ito (Eds.), pp. 676, 2001.

Arlian, L.G.; Schumann, J.R.; Morgan, M.S.; Glass, R.L. Serum immunoglobulin E against storage mite allergens in dogs with atopic dermatitis. *American Journal of Veterinary Research*, v.64, p.32-36, 2003.

Bensignor, E.; Carlotti, D. Sensitivity patterns to house dust mites and forage mites in atopic dogs: 150 cases. *Veterinary Dermatology* 2002, v.13, p.39-44.

Boese, J.L.; Chicowicz, S.M. Extraneous materials: Isolation. In: Association of Official Analytical Chemists. Official methods of analysis. 16ed. Arlington, V.A. AOAC, v. 1, Chapter 16, p:1-47, 1995.

BRASIL. MAPA. Normas e padrões de nutrição e alimentação animal. Brasília: MA/SARC/DFPA. p. 12, 2000.

BRASIL. ANVISA. Resolução RDC nº 175, de 08 de julho de 2003. Aprova o regulamento técnico de avaliação de matérias macroscópicas e microscópicas prejudiciais a saúde humana em alimentos embalados.

Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 2003.

BRASIL. MAPA. Instrução Normativa nº 4, de 23 de fevereiro de 2007. Regulamento técnico sobre as condições higiênico-sanitárias e de boas práticas de fabricação para estabelecimentos fabricantes de produtos destinados à alimentação animal. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 2007.

Brazis, P. The role of storage mites in canine atopic dermatitis. *Veterinary Focus*, v. 21, n.3, p. 42-46, 2011.

Brazis, P.; Serra, M.; Sellés, A.; Dethioux, F.; Biourge, V.; Puigdemont, A. Evaluation of storage mite contamination of commercial dry dog food. *Veterinary Dermatology*, v.19, n.4, 209-214, 2008.

Bueno, D. J.; Silva, J. O.; Oliver, G. Mycoflora in comercial pet foods. *Journal of Food Protection*, v. 64, p.741– 743, 2004.

Campos, S.G., Cavaglieri, L.R., Fernandez Juri, M.G., Dalcerro, 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.

Chambers, J.; Thind, B.B.; Dunn, J.A.; Pearson, D.J. The importance of storage mite allergens in occupational and domestic environments. In: *Proceedings of the 3rd International Conference on Urban Pest*. Robinson, W.H., Rettich, F. and Rambo, G.W. (editors), 1999.

Cruz, J.V.S. Ocorrência de aflatoxinas e fumonisinas em produtos a base de milho e milho utilizado como ingrediente de ração para animal de companhia, comercializados na região de Pirassununga, Estado de São Paulo. Tese (Doutorado em Zootecnia e Engenharia de Alimentos) - Universidade de São Paulo, Brasil, 2010.

Dalcerro, A.; Magnoli, C.; Hallak, C.; Chiacchiera, S. M.; Palacio, G.; Rosa, C. A. R. Detection of ochratoxin A in animal feeds and capacity to produce this mycotoxin by *Aspergillus* section Nigri in Argentina. *Food Additives and Contaminants*, v.19, p. 1065–1072, 2002.

de Souza Koerich, K.; Nones, J.; Teixeira, M.S.; da Silva, T.W.;

Moecke, E.H.S.; Scussel, V. M. Identification of light filth in dogs food commercialized in open bulky bags In: Scussel, V.M., Nones, J., de Souza Koerich, K., Santana, F.C. de O., Beber, M., Neves, L.S.D'e., Manfio, D. International Conference on pet food quality and safety & 14th National Mycotoxin Meeting, 14, 2010, Florianópolis. Abstract Book... Florianópolis: PET FOOD SAFE, 2010. p.53, 2010.

de Souza Koerich, K.; Scussel, V. M. Dogs and birds dryfood fumonisin FB₁ and FB₂ contamination and their relation to ingredients and packaging characteristics. Research Journal of Biological Sciences, n.8, p.22-29, 2013.

de Souza Koerich, K.; Marcelina, B.H.; Scussel, V. M. Bacteria and fungi quality and safety indicators of pet food commercialized in different countries. Research in Veterinary Science, *in press*, 2013.

dos Santos, E.J.; Carvalho, E. P. de; Sanches, R. L.; Barrios, B. E. B. Qualidade microbiológica de farinhas de carne e ossos produzidas no Estado de Minas Gerais para produção de ração animal. Ciência Agropecuária, Lavras, v.24, n.2, p. 425-433, 2000.

EC. European Commission. Commission Regulation (EC) No.2006/576/EC of 17 August 2006 on the presence of deoxynivalenol, zearalenone, ochratoxin A, T-2 and HT-2 and fumonisins in products intended for animal feeding. Off. J. Eur. Communities, 229, 7-9, 2006.

FDA. Food and Drug Administration. Guidance for Industry: Fumonisin levels in human foods and animal feeds, Washington, USA, 2001.

Flechtmann, C.H.W.; Zem, A.C. Ácaros de produtos armazenados. In: Lorini, Miike, Scussel, Armazenagem de Grãos. Cap. 7, Ed. Biogeneziz, Campinas SP, p.807-856, 2002.

Ferreira, W.L.B. Controle integrado de roedores no armazenamento de grãos e alimentos. In: Manejo integrado de pragas pós-colheita. Maringá: Grãos Brasil, v.1, p. 97-132, 2011.

González, B.; François, J.; Renaud, M. A rapid and reliable method for metabolite extraction in yeast using boiling buffered ethanol. Yeast, v.13, n.14, p.1347-55, 1997.

Gredilha, R.; Saavedra, P.R.; Guerim, L.; Lima, A.F.; Serra-Freire, N.M. Ocorrência de *Oryzaephilus surinamensis* Linnaeus, 1758 (Coleoptera: Cucujidae) e *Necrobia rufipes* De Geer, 1775 (Coleoptera: Cleridae) infestando rações de animais domésticos. Entomologia e Vetores, v.12, n.1, p. 95-103, 2005.

JECFA. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Safety evaluation of certain food additives and contaminants. Geneva: World Health Organization, 2001.

Li, Y.C.; Ledoux, D.R.; Bermudez, A.J.; Fritsche, K.L.; Rottinghaus, G.E. The individual and combined effects of fumonisin B₁ and monilliformin on performance and selected immune parameters in turkey poultry's. Poultry Science, v.79, p.871-878, 2000.

Lorini, I. Controle integrado de pragas de grãos armazenados. Passo Fundo, EMBRAPA-CNPT, 52p (EMBRAPA-CNPT). Documentos, 48, 1998.

Lorini, I. Descrição, biologia e danos das principais pragas de grãos armazenados. In: Lorini, Miike, Scussel, Armazenagem de Grãos. Cap. 7, Ed. Biogeneziz, Campinas SP, p.381-397, 2002.

Marin, P.; Magan, N.; Vazquez, C.; Gonzalez-Jaen, M.T. Differential effect of environmental conditions on the growth and regulation of the fumonisin biosynthetic gene FUM1 in the maize pathogens and fumonisin producers *Fusarium verticillioides* and *Fusarium proliferatum*. FEMS Microbiology Ecology, v.73, p.303-311, 2010.

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

Pitt, J. I.; Hocking A. D. Fungi and food spoilage. Springer, the Netherlands, 520 pp., 2009.

Prickett, A. J. 1992. Recent surveys of post-harvest pest problems in farm and commercial grain stores in the UK. Brighton Crop Protection Conference - Pests and Diseases. 1992 4: 271-280.

Prickett, A.J. Animal feed mills 1992, England and Wales Pest

Management. MAFF Central Science Laboratory Report, n. 54, 73-74, 1994.

Raper, K. B.; Fennell, D.I. The genus *Aspergillus*. Baltimore: The Williams & Wilkins Company, 686p., 1965.

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

Scussel, V.M. Fungos em grãos armazenados In Lorini, Miike, Scussel, Armazenagem de Grãos. Cap. 9.1 Ed. Biogeneziz, Cap. 9, Campinas SP 676-691p, 2002.

Scussel, V. M.; Scaff, R. Fumonisin B₁ and B₂ in corn-based products commercialized in the state of Santa Catarina - Southern Brazil. Brazilian Archives of Biology and Technology, v. 47, n.6, p. 911-919, 2004.

Scudamore, K.A.; Hetmanski, M.T.; Nawaz, S.; Naylor, J.; Rainbird, S. Determination of mycotoxins in pet foods sold for domestic pets and wild birds using linked-column immunoassay clean-up and HPLC. Food Additives and Contaminants, v.14, p.175-186, 1997.

Singhi, S.P.; Sethi, M.S.; Sharma, V.D. The occurrence of salmonellae in rodent, shrew, cockroach and ant. International Journal of Zoonoses, v.7, n.1, p.58-61, 1980.

Vargas, C.H.B.; de Almeida, A.A. Comparação de métodos para a pesquisa de sujidades leves e verificação das condições higiênicas de farinha de trigo especial. Boletim Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos, v.14, n.1, 65-76, 1996.

Visconti, A.; Doko, M.B.; Bottalico, C.; Schurer, B.; Boenke, A. Stability of fumonisins (FB1 and FB2) in solution. Food Additives Contaminants, v.11, p.427-431, 1994.

Weber, R. W. S.; Pitt, D. Teaching Techniques for Mycology: 11. Riddell's Slide Cultures. Mycologist, v.14, n.3, p.118-120, 2000.

Tabela 1. Sujidades, fungos e fumonisinas em alimentos secos completos para cães comercializados no Brasil

Alimentos para cães		Sujidades leves					CTF (UFC/g)		Micobiota	FB (mg/Kg)		
Idade	Amostra	Insetos		Ácaros	Pêlos de roedor	Total		Gênero	FB ₁	FB ₂	ΣFBs	
		Fragmentos	Inteiros									
Adultos												
	1	05	ND*	03	ND	08	1,0x10 ⁴	<i>Aspergillus/Penicillium</i>	0,074	<LOQ	0,074	
	2	04	ND	ND	ND	04	4,0x10 ⁴	<i>Aspergillus/Penicillium</i>	<LOQ	<LOQ	<LOQ	
	3	03	ND	01	ND	04	3,0x10 ⁴	<i>Aspergillus/Penicillium</i>	<LOQ	<LOQ	<LOQ	
	4	03	ND	ND	ND	03	2,0x10 ⁴	<i>Aspergillus</i>	<LOQ	<LOQ	<LOQ	
	5	08	ND	03	ND	11	1,0 x10 ⁴	<i>Aspergillus</i>	0,597	<LOQ	0,597	
	6	07	ND	01	ND	08	2,0x10 ⁴	<i>Aspergillus</i>	<LOQ	<LOQ	<LOQ	
	7	20	ND	ND	ND	20	1,0x10 ⁴	<i>Aspergillus/Penicillium</i>	0,075	<LOQ	0,075	
	8	ND	ND	ND	ND	ND	1,1x10 ⁴	<i>Penicillium</i>	<LOQ	<LOQ	<LOQ	
	9	06	ND	01	ND	07	3,5x10 ⁴	<i>Aspergillus/Syncephalastrum</i>	0,179	<LOQ	0,179	
	10	ND	ND	ND	ND	ND	2,0x10 ⁴	<i>Aspergillus/Penicillium</i>	<LOQ	<LOQ	<LOQ	
	11	12	ND	04	ND	16	4,0x10 ⁴	<i>Aspergillus/Penicillium</i>	<LOQ	<LOQ	<LOQ	
	12	06	ND	01	ND	07	1,0x10 ⁴	<i>Aspergillus</i>	<LOQ	<LOQ	<LOQ	
	13	10	ND	03	ND	13	1,0x10 ⁴	<i>Aspergillus</i>	<LOQ	<LOQ	<LOQ	
	14	06	ND	ND	ND	06	1,0x10 ⁴	<i>Aspergillus</i>	<LOQ	<LOQ	<LOQ	
	15	09	ND	01	ND	10	1,0x10 ⁴	<i>Aspergillus/Penicillium</i>	<LOQ	<LOQ	<LOQ	
	16	ND	ND	02	ND	02	1,0x10 ⁴	<i>Penicillium/Cladosporium</i>	0,101	<LOQ	0,101	
	17	10	ND	03	ND	13	1,0x10 ⁴	<i>Aspergillus</i>	<LOQ	<LOQ	<LOQ	
	18	04	ND	05	ND	09	1,0x10 ⁴	<i>Aspergillus/Penicillium</i>	0,082	<LOQ	0,082	
	19	ND	ND	ND	ND	ND	1,5 x10 ⁴	<i>Aspergillus</i>	<LOQ	<LOQ	<LOQ	
	20	ND	ND	ND	ND	ND	1,0x10 ⁴	<i>Aspergillus/Penicillium/Syncephalastrum</i>	<LOQ	<LOQ	<LOQ	
	21	08	ND	ND	ND	08	1,0x10 ⁴	<i>Aspergillus</i>	<LOQ	<LOQ	<LOQ	
	22	09	ND	ND	ND	09	1,2 x10 ⁴	<i>Aspergillus/Penicillium</i>	0,161	<LOQ	0,161	
	23	11	ND	ND	ND	11	1,0x10 ⁴	<i>Syncephalastrum</i>	0,139	<LOQ	0,139	
	24	05	ND	ND	ND	05	1,0x10 ⁴	<i>Penicillium/Syncephalastrum</i>	<LOQ	<LOQ	<LOQ	
	25	13	ND	ND	ND	13	1,0x10 ⁴	<i>Penicillium/Cladosporium</i>	<LOQ	<LOQ	<LOQ	
Filhotes												
	01	06	ND	ND	ND	06	5,0x10 ⁴	<i>Aspergillus</i>	<LOQ	<LOQ	<LOQ	
	02	08	ND	04	ND	12	1,0x10 ⁴	<i>Aspergillus/Penicillium</i>	<LOQ	<LOQ	<LOQ	
	03	09	ND	03	ND	12	1,0x10 ⁴	<i>Aspergillus/Penicillium</i>	0,140	<LOQ	0,145	
	04	ND	ND	02	ND	02	1,0x10 ⁴	<i>Aspergillus/Pascelomyces</i>	0,074	<LOQ	0,074	

	05	07	ND	03	ND	10	1,37 $\times 10^2$	<i>Penicillium</i>	<LOQ	<LOQ	<LOQ
	06	08	ND	ND	ND	08	$1,0 \times 10^2$	<i>Aspergillus/Cladosporium</i>	<LOQ	<LOQ	<LOQ
Estatística											
<i>Total positivas (%)</i>	25 (80,6)	0 (0)	16 (51,6)	0 (0)	27 (87,1)	31 (100)		NA	10 (32,2)	0 (0)	10 (32,2)
<i>>LMT</i>	NA	NA	NA	NA	NA	ND ^a	NA	NA	ND ^a	NA	ND
<i>Mínimo</i>	ND	NA	ND	NA	ND	$1,0 \times 10^2$	NA	NA	<LOQ	NA	<LOQ
<i>Máximo</i>	20	NA	05	NA	20	$1,1 \times 10^3$	NA	NA	0,597	NA	0,597
<i>Média</i>	6,3	NA	1,3	NA	7,6	$2,21 \times 10^2$	NA	NA	0,052	NA	0,052
<i>DP</i>	4,5	NA	1,5	NA	4,9	247,1	NA	NA	0,115	NA	0,115
<i>DPR%</i>	71,65	NA	120,15	NA	65,05	111,71	NA	NA	230,00	NA	230,00

Fumonisinás: (FB₁, FB₂ e total LOQ: 0,021, 0,044 e 0,065 mg/Kg); CTF: contagem total de fungos; ND:não detectado; NA: não aplicado; DP: desvio padrão; DPR%: desvio padrão relativo; LMT: Limite máximo tolerável: ^a 10 a 10^3 UFC/g (ABINPET, 2008); ^b 5 mg/Kg (FDA, 2001; CE, 2006)

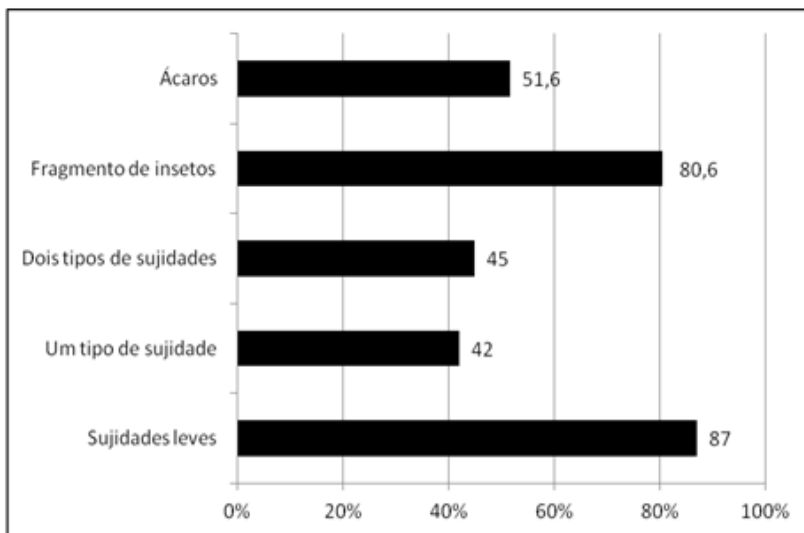


Figura 1. Porcentagem de sujidades biológicas leves encontradas nas amostras de alimentos secos para cães comercializados no Brasil.

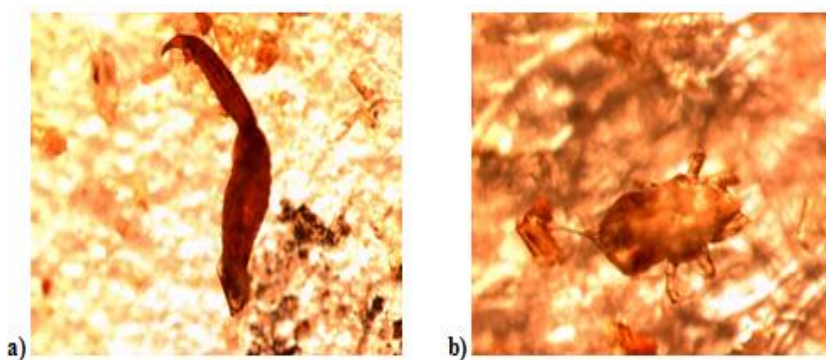


Figura 2. Tipos de sujidades biológicas leves encontradas nas amostras de alimentos secos para cães comercializados no Brasil: a) fragmentos de insetos da Classe Coleoptera e b) ácaro de armazenamento (63X).

CAPÍTULO 8

OCCURRENCE OF DOGS AND CATS DISEASES RECORDS IN THE VETERINARY CLINICS ROUTINE IN SOUTHERN BRAZIL AND ITS RELATIONSHIP TO MYCOTOXINS

Trabalho publicado:
International Journal of Applied Science and Technology
(ISSN 2221-0997)
Vol.2, No.8; October 2012

OCCURRENCE OF DOGS AND CATS DISEASES RECORDS IN THE VETERINARY CLINICS ROUTINE IN SOUTHERN BRAZIL AND ITS RELATIONSHIP TO MYCOTOXINS

Karina Koerich de Souza PhD student Laboratory of Mycotoxicology and Food Contaminants – LABMICO, Food Science and Technology Department Center of Agricultural Sciences, Federal University of Santa Catarina, Florianopolis

Vildes Maria Scussel Laboratory of Mycotoxicology and Food Contaminants – LABMICO, Food Science and Technology Department Center of Agricultural Sciences, Federal University of Santa Catarina, Florianopolis, SC, Brazil

Abstract

An evaluation of diseases affecting dogs and cats and their relationship to pet food mycotoxin contamination was reported in Southern Brazil. Veterinary Clinics registries were surveyed for diseases, type of feeding, breeding environment, among other adverse conditions that the animals were exposed. Also the ingredients reported on the labels of pet food packages mycotoxin related were surveyed. From the diseases and clinical signs recorded and related to possible mycotoxicosis, the major casuistic, were those affecting the hepatic portal system (32.0 %) followed by the renal (30.0 %) and nervous systems (27.0 %). About ingredients of pet food, the main vegetable ingredients related were rice and maize with 57.0 and 55.0 %, that were susceptible to aflatoxin, ochratoxin A, citrinin, deoxinivalenol, among others mycotoxins. The data obtained in this study can help the clinics to consider the frames of mycotoxicosis as a final diagnosis in veterinary clinical routine.

Keywords: dog, cat, pet food, disease, mycotoxins, veterinary.

1 Introduction

Several diseases have been reported in veterinary clinics, as well as an increased observation and diagnosis of cancer in pets. Many factors may be responsible for the onset of these diseases, such as genetic predisposition (different races), pathogens (bacteria, fungi, viruses), biological (bioactive amines, bacterial and fungal toxins), physical (pieces of metal, glass, rubber), chemical (antibiotics, heavy metals, pesticides) and environmental contamination (breeding forms, stress, pollution) (Zicker, 2008; de Souza Koerich, Simao and Scussel, 2010). Many diseases can be linked directly or indirectly to the diet of

these animals as many owners are opting to offer processed foods to their pets (Simao and Scussel, 2008). Industrialization is not always synonymous of food security, as the diverse composition may enable a variety of contaminants to be present (Boermans and Leung, 2007). Besides, being a same food supplied daily, it means to expose the animals to continuous and uninterrupted contact with possible contaminants of different natures.

The main composition of foods for dogs and cats is based on ingredients from *plant* (maize, wheat, soy, rice) and *animal* (meat, bone, fat) (Zicker, 2008; Brito et al., 2010). Regarding the contaminants that can reach these raw materials, mycotoxins can play an important role, especially if the raw materials for commercial pet foods contain grains or their derivatives of low quality (Richard, 2007; Brito et al., 2010). Mycotoxin contamination can get into processed pet food either (a) by using bad or with lack of selection raw materials at factory reception, (b) during food processing or (c) packaging and especially at the (d) storage of the final products, which can compromise the animal health. Depending on the toxins that can contaminate pet food, different target organs and organic systems can be affected, with acute or chronic clinical signs, such as *liver* (aflatoxins -AFLs - primary target organ; ochratoxin A - OTA and citrinin - CTR - secondary target organ), *reproductive* (zearalenone - ZON), *nervous* (fumonisin - FBs) *kidney* (OTA, CTR), *vascular* (trichothecenes - DON and T2 toxin) and the development of *cancer* (chronic mycotoxicosis) (Puschner, 2002; Richard, 2007). In fact, several mycotoxicosis have been reported in dogs and cats caused by AFLs, OTA, ZON, CTR, DON, roquefortine and penitren A, found contaminating processed foods (Puschner, 2002; Boermans and Leung, 2007).

Considering that there are (a) only a few data on pet food contamination and diseases mycotoxins related, (b) the increase of pet foods production and (c) pets constant exposure to daily food intake, the objective of this study was to evaluate the occurrence of dogs and cats diseases and clinical signs that are related to possible mycotoxicosis (affecting the hepatic portal, renal, reproductive, nervous organic systems and neoplasias formation) in the veterinary clinics and, in parallel, an evaluation of ingredients reported on the labels of commercial pet food packages and the possibility of raw material to vehicular toxigenic fungi and mycotoxins, thus exposing the animals to the frameworks of mycotoxicosis.

2 Materials and methods

2.1 Dogs and cats diseases and clinical signs

Between June 2010 and December 2010, a study was carried out to evaluate the occurrence of dogs and cats diseases and clinical signs that are related to possible mycotoxicosis (affecting the hepatic portal, renal, reproductive, nervous organic systems and neoplasias formation) in the veterinary clinics. A total of 86 veterinary clinical records of dogs and cats, with confirmed by clinical and laboratory diagnostic regarding the diseases mentioned above, were collected in the veterinary clinics located in the region of Great Florianopolis, Santa Catarina State in Southern Brazil. An application form was designed to collect data such as the date of sampling, animal data (age, sex, breed), type of feeding, breeding environment, among other adverse conditions that the animals were exposed and that may promote the occurrence of diseases (stress etc).

2.2 Evaluation of ingredients reported in pet food

An evaluation of ingredients reported on the labels of commercial pet food packages was made to verify the possibility of raw material to vehicular toxigenic fungi and mycotoxins and exposed animal to mycotoxicosis. Forty-six packages of dogs (23) and cats (23) foods available commercially were evaluated regarding the ingredients of plant origin (grains and cereals) described on the label, in the list of composition.

After obtaining all the information mentioned above, correlation was recorded between the disease and mycotoxins, as well as the basic composition used for commercial food production. A correlation was made with these ingredients mentioning possible transmission of mycotoxins, appearance of disease and the clinical signs in animals.

3 Results and discussion

3.1 Dogs and cats diseases and clinical signs

The most common diseases and clinical signs related to mycotoxicosis affecting dogs and cats recorded in the veterinary clinics during the period of six months were those of the following organic

systems: hepatic, renal, nervous and reproductive, including also neoplasias formation (Figure 1).

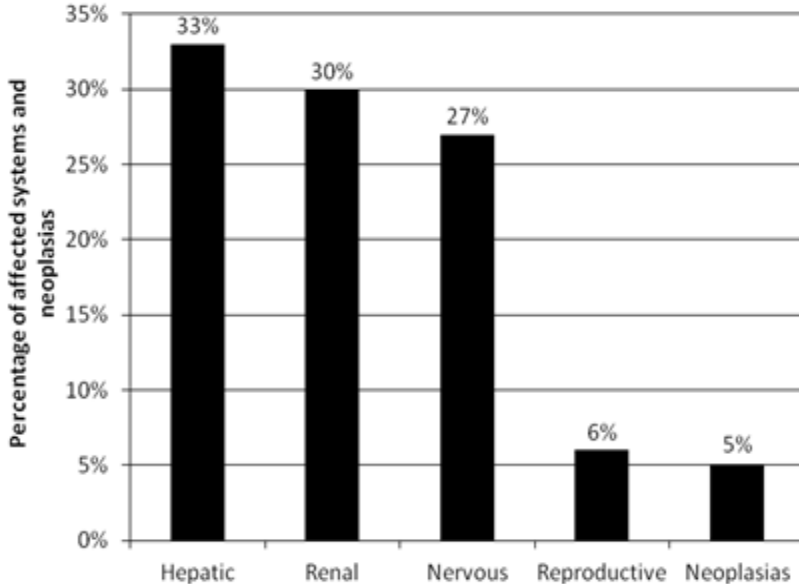


Figure 1. Percentage of affected systems and neoplasias diagnosed in dogs and cats in the Great Florianopolis Region, Southern Brazil.

Among the conditions evaluated and correlated with mycotoxicosis, the highest occurrence was those involving the *hepatic system* with a total of 33.0 %, in which 71.0 % of cases were diagnosed as liver failure and 29.0 % of hepatitis, followed by *kidney* with 30.0 % diagnosed as chronic renal disease. The *nervous system* had a total of 27.0 % cases registered with 39.0 % of seizures, 30.5 % of tremorgenia (muscle tremors and incoordination) and loss of proprioception and 30.5% of epilepsy. In the *reproductive system*, there were reported only 6.0 % of cases, which 40.0 % from pyometra (uterine infection) and 60.0 % of fetal mortality. Neoplasias accounted for 5.0 % of diseases, each case in a different target organ: liver, kidney, spleen and adrenal gland. Animals diagnosed with signs of malignancy were all dogs, three females and one male aged between 8 and 10 years, poodle (2), Daschund and German shepherd, one each. All diets were based on processed foods and raised *in* (2) and *outside* (2) apartment/house. Important to emphasize that 18 (21.0 %) cases were found simultaneous description of conditions, usually involving two or more *systems*

(kidney/liver; tumor/liver; liver/renal/among others).

3.2 Characteristics of the animal breeding and eating habits

Details on data obtained in the present study regarding the animals' characteristics, diseases and breeding conditions are described in Table 1.

Table 1 – Characteristics and food habits of dogs and cats obtained from veterinary clinics in the Great Florianopolis Region.

Affected systems, clinic signs and diseases	Animal		Gender		Age ¹			Food		Environment		
	Dog	Cat	Female	Male	Puppy	Adult	Senior	Industrial	Mixed ²	Indoors	Outdoors	
Hepatic												
Failure	14	1	11	9	2	7	10	17	1	17	3	
Hepatitis	6	2	4	4	1	3	3	8	NR	7	1	
Renal												
Chronic disease	18	9	13	13	2	4	14	21	5	19	7	
Nervous												
Convulsion	9	NR	4	5	2	5	2	9	NR	8	1	
Epilepsy	7	NR	4	3	NR	3	3	7	NR	5	2	
Tremogonia / incoordination	7	NR	4	3	2	2	2	7	NR	5	2	
Reproductive												
Piometra	2	NR	2	NR	NR	2	NR	2	NR	2	NR	
Fetal death	2	1	3	NR	NR	3	NR	3	NR	1	2	
Neoplasia												
Neoplasia ³	4	NR	3	1	NR	1	4	4	NR	2	2	

¹Puppy: up to 1 year; adult:1-7years; senior:over7 yearsof age; ²Mixed: industrial and homemade food; ³Neoplasia in liver, kidney, spleen and adrenal gland; NR: not registered

Observing the way of raising the animals of the present study, with respect to the (a) *eating habits*, 90.0 % of the animals were fed with industrialized and 10.0 % of the animals with mix feeding food (industrialized and homemade food), a habit commonly observed in diets of cats. Regarding (b) *environment*: 76.0 %, more than a half of the animals, were created inside the home owners, and only 24.0 % were created in areas outside of houses, with food exposure to moisture and environmental conditions that favor fungal growth and mycotoxin production; and (c) *stress conditions*: more than 50.0 % of the animals took weekly baths in petshops, increasing signs of disease. The absence of the owners is also considered a cause of stress in animals.

3.3 Ingredients used in commercial dog and cat foods

With respect to the study of ingredients (raw material) utilized to produce food for dogs and cats and listed in 46 packages of complete dry foods, as expected, maize (whole and ground) and rice (grits, whole or broken) were present in the composition of 96.0 and 94.0 % of the products. Wheat was present in half (52.0 %) of the products, followed by soybean meal, barley, oats and sorghum accounting for 44.0, 37.0, 13.0 and 6.5 % respectively. Figures 2 show the percentages obtained in this study regarding ingredients of plant origin in food for dogs and cats, respectively.

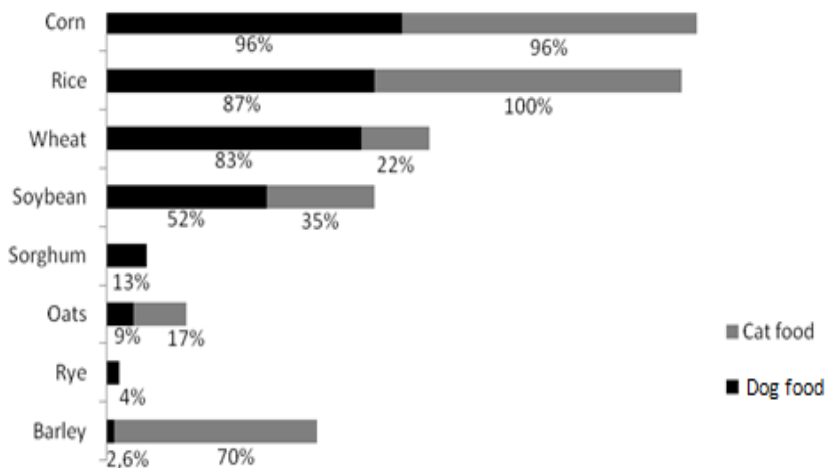


Figure 2. Percentage of grain-based ingredients (cereals and pulses) described in the labels to dogs and cats dry food commercialized in Brazil.

A major concern with the addition of grains, seeds and subproducts in animal feed is their susceptibility to toxigenic fungi and mycotoxin production. Ingredients such as maize, rice, wheat, oats, barley, peas, and groundnuts, sunflower, among others are good substrates for fungi growth, including toxigenic strains (Scussel, 2002; Bullerman and Bianchini, 2007). The main mycotoxins that are found in most cereal grains are AFLs, FBs, OTA, DON and ZON (Lazzari, 1997; Scussel, 2002, Simao and Scussel, 2008). The ingredients reported in the evaluation of pet food labeling and the correlation with most commonly mycotoxins carried by them are presented in Table 2.

3.4 Diseases and clinical signs versus mycotoxins

In animals, mycotoxins have no characteristic clinical signs of chronic intoxication, thus allowing the misdiagnosis of the disease. For example, refusal of food can have many causes, but when the diet is based on food containing maize or other cereal grains, they may be indicative of *Fusarium* and / or *Aspergillus* toxins. Tremogenic toxins cause tremors and convulsion, and may be confused with other causes such as epilepsy and seizures. Some mycotoxins, including trichothecenes, ZON and FBs can bring reduction of productivity and growth. Low resistance to infection/reduced immunity can result from ingestion of mycotoxins (Boermans; Leung, 2007). Table 2 describes the main mycotoxins found in the raw material used to produce feed and possible harmful effects and target organs.

Table 2 - The main pet food vegetable ingredients, their susceptibility to mycotoxin production and toxic effects in animals

Ingredients of pet food	Mycotoxins	Toxic effects in animals
Maize, rice, oats, wheat, soybean, sorghum, rye and barley	Aflatoxins (AFB ₁ , AFB ₂ , AFG ₁ , AFG ₂)	Hepatotoxic, carcinogenic, growth rate reduction, hemorrhagic enteritis, lowered immunity and productivity
s, wheat, soybean, sorghum, rye and barley	Fumonisin (FB ₁ , FB ₂ , FB ₃)	Leukoencephalomalacia in horses Lungs edema, neural tubes defects
Maize, oats, wheat and rye	Ocratoxin A	Hepatotoxic, nephrotoxic, abortion, poor feed conversion, growth rate reduction and immunity reduction to infection

Maize, rice, wheat and oats	Citrinin	Toxemia and câncer (carcinogenicity)
Cereals, soybean	Tremorgenic toxins	Tremors and convulsions
Cereals	Patulin	Lung bleeding, brain edema and kidneys toxicity
Maize, wheat and soybean	Zearalenone	Hyperestrogenism, infertility, death
Maize, wheat, oats and soybean	Deoxynivalenol	Refusal of food for pigs, dogs and cats, weight gain reduction
Maize and winter cereals	Trichothecenes (ZON DON, NIV, 2Ac DON, 15Ac DON, T ₂ , HT ₂)	Severe inflammation of the gastrointestinal tract, hemorrhageae, edema, vomiting and diarrhea. Infertility, degeneration of the bone marrow, slow growth and sterility
Rye	Ergot toxins	Vase-constriction, gangrene, midriasis, abortand lossof extremities

Important to emphasize that the extrusion process (temperature 100-200 °C and 34-37 atm pressure) may reduce the mycotoxins concentrations in feed, but is not sufficient to eliminated them. They are stable in most food processing systems and tolerate temperatures up to 260°C (Scussel, 1998, 2002). In such cases, these toxins can become residues in food animals, such as the hepatotoxic AFLs and hepato and nephrotoxic OTA and CTR (Bullerman and Bianchini, 2007). Looking at the data on types of diseases diagnosed during the study period, we observed that animals with a diet based on processed foods (90.0 %) had a higher occurrence of diseases of different organs, as well as neoplasias. These data can be related to diet and the quality of the supplied products. Monitoring the quality of pet foods should be performed frequently to ensure product safety and, consequently, the health of animals. In this study, it should be clarified that the pet foods of the sick animals were not analyze because the study was based on veterinary clinical records, besides the mycotoxicosis can show the clinical signs in long term (chronic diseases).

Owners of pets should be counseled about storage of food before and after being opened, to avoid possible contamination at the household level. "No treatment is effective if the cause of the disease is still present" (de Souza Koerich et al., 2010).

4 Conclusion

The mycotoxicosis are still little discussed and considered among veterinary practitioners. Although the pathogens are known, yet there is little data reported in the literature on the occurrence of mycotoxin poisoning in pet animals. The clinical signs of mycotoxicosis are nonspecific and can confuse the veterinarian's final diagnosis. The data obtained in this study can be a tool to clarify the relationship between the conditions seen in pets in Southern Brazil and possible mycotoxicosis frames, which are generally not considered as a final diagnosis. Education on the choice of food and proper storage, ensuring the quality of feed provided the pets owners is an important tool to guarantee health animals.

5 References

- Boermans, H.J. and Leung, M.C.K. (2007). Mycotoxins and the petfoodindustry: toxicologicalevidence and riskassessment. *International Journal of Food Microbiology*, 119, 95-102. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.07.063>
- Brito, C.B.M., Félix, A.P., Jesus, R.M., França, M.I., Oliveira, S.G., Krabbe, E.L. Maiorka, A. (2010). Digestibility and palatability of dog foods containing different moisture levels, and the inclusion of a mould inhibitor. *Animal Feed Science and Technology*, 159, 150–155. <http://dx.doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2010.06.001>
- Bullerman, L.B. and Bianchini, A. (2007). Stability of mycotoxins during food processing. *International Journal of Food Microbiology*, 119, 140-156. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.07.035>
- de Souza Koerich, K.; Simao, V. and Scussel, V.M. (2010). Evaluation of dogs and cats diseases and their relation to mycotoxins. Proceedings of the 35th Annual World Small Animal Veterinary Association Congress, Geneve, 100.
- Lazzari, F.A. (1997). *Moisture,fungiand mycotoxinsin the qualityof seeds, grains, feed*(1st.ed.).Curitiba: Author Edition.

Puschner, B. (2002). Mycotoxins. *In Veterinary Clinics Small Animals*, 32, 409–419. [http://dx.doi.org/10.1016/S0195-5616\(01\)00011-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0195-5616(01)00011-0)

Richard, J. L. (2007). Some major mycotoxins and their mycotoxicoses—An overview. *International Journal of Food Microbiology*, 119, 3–10. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.07.019>

Scussel, V. M. (1998). *Mycotoxins in food* (1st.ed.). Florianopolis, SC: Ed. Insular.

Scussel, V.M. (2002). Fungi in stored grains. *Grain Storage* (1st.ed.). Campinas, SP: Biogeneziz, (Chap. 9).

Simao V. and Scussel, V.M. (2008). Quality in the production of feed and ingredients for pets. *In Current Issues in Qualitative Mycotoxin and Grain Storage II*. (2nd.ed.). Florianopolis, SC: ABMAG.

Zicker, S. C. (2008). Evaluating Pet Foods: How confident are you when you recommend a commercial pet food? *Topics in Companion Animal Medicine*, 23(3), 121-126. <http://dx.doi.org/10.1053/j.tcam.2008.04.003>

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O trabalho apresentou dados e informações sobre a qualidade e segurança biológica de formas básicas de alimentos comerciais (secos, semi-úmidos e úmidos) destinados a animais de companhia (cães, gatos e aves) comercializados em países de três continentes (Europa, América do Norte e Sul). É importante conhecer os aspectos qualitativos dos alimentos fornecidos, já que dieta desses animais é baseada em um tipo de alimento, o qual consumido diariamente amplifica a exposição a possíveis contaminantes biológicos presentes na dieta.

Os dados foram correlacionados com legislações nacionais e internacionais quanto a aspectos de rotulagem e composição, assim como garantias para a segurança dos alimentos quanto à presença de contaminantes biológicos e seus metabólitos (micro-organismos patogênicos e toxigênicos; toxinas de fungos; ácaros e insetos; amins bioativas). Ficou evidenciada a ausência de critérios e limites estabelecidos pelos órgãos fiscalizadores e normas técnicas para esses contaminantes, comprometendo a segurança desses alimentos. Na maioria dos países, os alimentos para animais de companhia não apresentam regulamentação específica, e quando apresentam, não está sendo cumprida com rigor pelos fabricantes, tornando clara a necessidade de fiscalização efetiva destes produtos pelas agências reguladoras.

Durante as avaliações dos alimentos, os contaminantes foram relacionados com o aparecimento de implicações na saúde animal, como aumento da incidência de doenças proeminentes e mais recentemente desenvolvidas (quadros de alergia, atopia, nefropatias, hepatopatias, diversos tipos de câncer, alterações comportamentais), sempre enfatizando a problemática dos casos de zoonoses (salmonelose, leptospirose). Lembrando que, atualmente, os animais de companhia fazem parte da família dos brasileiros, não como um animal, e sim como um membro dela.

Após avaliar os principais contaminantes biológicos (insetos, ácaros, bactérias, fungos) e seus metabólitos (aminas bioativas, toxinas bacterianas e fúngicas) em alimentos para animais de companhia, há a necessidade de avaliar quanto a presença de contaminantes sintéticos (pesticidas, aditivos, metais pesados, melanina etc). Normalmente são adicionados com o intuito de modificar a percepção da cor/sabor, maximizar a conservação do produto e/ou aumento de vida de prateleira (aditivos: corantes artificiais, antioxidantes, conservantes, estabilizantes), detoxificar compostos tóxicos (adsorventes de

micotoxinas), ou são resultantes de resíduos de produção (pesticidas, antibióticos, metais pesados) ou adulteração alimentar com adição intencional (melamina). Considerando o crescente desenvolvimento do agronegócio no Brasil, o agregar valor - através da produção de alimentos para animais de companhia focando na exportação utilizando essas matérias primas - é estratégia nacional e necessita de qualidade para obter credibilidade no comércio internacional. Portanto, esse trabalho também auxilia e norteia as empresas quanto aos pontos a serem reavaliados.