

Vanessa Simão

**AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DE ALIMENTOS PARA AVES DE COMPANHIA
QUANTO INGREDIENTES, CORANTES ARTIFICIAIS, FUNGOS E
MICOTOXINAS**

**Florianópolis
2010.**

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

Vanessa Simão

**AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DE ALIMENTOS PARA AVES DE COMPANHIA
QUANTO INGREDIENTES, CORANTES ARTIFICIAIS, FUNGOS E
MICOTOXINAS**

Dissertação 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 Mestre em Ciência dos Alimentos.

Orientadora: Ph.D. Vildes Maria Scussel

**Florianópolis
2010.**

FOLHA DE APROVAÇÃO

Dedico este trabalho à minha família, o bem mais precioso da minha vida, e em especial a minha avó Leonora Lângaro Nondilo (*in memoriam*) pelo exemplo de mulher, força e persistência.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a todos aqueles que desempenharam papel importante para a conclusão deste trabalho.

Primeiramente agradeço a Deus pela força e fé que me foram concedidas para que eu completasse essa jornada.

De forma muito especial, agradeço a minha família pelo amor incondicional, pela compreensão nas horas difíceis, vocês foram e sempre serão, o alicerce da minha vida.

À Universidade Federal de Santa Catarina, ao Centro de Ciências Agrárias e ao Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, obrigada pelo espaço e recursos disponibilizados.

À Capes pelo auxílio financeiro.

À professora Ph.D Vildes Maria Scussel, pela oportunidade de aprendizado, orientação e incentivo.

Aos meus “anjos” Estela de Oliveira Nunes e José Junior Mendonça Xavier, obrigado pelo ombro amigo e por todo o conhecimento que me foi passado.

Aos professores Marilde Bordignon, Cleide Batista, Elisa H. S. Moecke, Alicia Francisco, Cesar Damin, que cederam equipamentos e materiais fundamentais para o desenvolvimento deste estudo.

Aos colegas e amigos do departamento Bárbara N. Giordano, Vivian Burigo, Roberta Ramos, Ana Tanello, Gisele Olivo, Renata, Patrícia, Luciano, Rafael, Tati Oro, Valéria, Sabrina, Marina, Franciele.

Aos funcionários e amigos Sérgio, Inêz, Vanessa, Juciele, Janaína, Bento, Sônia e Carlão.

Aos colegas e amigos do laboratório de LABMICO Bárbara, Mariana, Luis, Gabriele, Daniel, Karina, Simone, Celeide, Carolina, Morgana, Letícia e Juliana, obrigada pelo mbro amigo.

Agradeço a todos que contribuíram de alguma forma para a finalização deste trabalho, tenha sido com algo material ou algo espiritual.

Sou brasileira e não desisto nunca! (dito popular)

SIMÃO, Vanessa. **Avaliação da qualidade de alimentos completos para aves de companhia quanto ingredientes, corantes artificiais, fungos e micotoxinas.** 2010. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC.

RESUMO

O Brasil possui grande potencial para o mercado de alimentos completos para animais de companhia. Por esse motivo sua qualidade deve ser constantemente avaliada como forma de garantir a segurança destes alimentos aos seus consumidores. Desta forma, foram realizados dois estudos relacionados à qualidade de alimentos completos: (1) **Determinação do perfil de ingredientes e de corantes artificiais em alimentos e sua relação com micotoxinas;** (2) **Avaliação da microbiota e de micotoxinas em alimentos para aves de companhia comercializadas no sudeste e sul do Brasil.** Em (1) foi determinado o perfil de ingredientes e corantes artificiais adicionados em alimentos completos destinados para aves de companhia, correlacionando com os dados descritos nos rótulos pelos fabricantes. Foram coletadas 36 amostras, sendo 26 comercializadas em embalagens lacradas e 10 à granel, para diferentes espécies de aves (sabiá, curió, trinca-ferro, papagaio, pássaro-preto, calopsitas, entre outros). Foram determinadas as proporções de cada ingrediente dos alimentos completos através de separação macroscópica (visual) e microscópica (estereoscópio) e calculada as respectivas proporções para 100 g (%). Os principais ingredientes contidos nos alimentos completos foram: (a) ração extrusada ou em pelets, biscoito e frutas (cristalizada e/ou desidratadas), (b) amendoim (com e sem casca), (c) grãos (milho, arroz, soja, trigo, triticale, trigoilho, ervilha e aveia), (d) outros (farelo de soja e trigo, quirera de milho e arroz, alpiste, painço). Os ingredientes presentes em maior quantidade foram: ração extrusada e/ou peletizada, sementes de girassol, milho e amendoim. A composição dos ingredientes dos alimentos completos variou de acordo com as diferentes espécies de aves. Quanto à determinação de corantes artificiais 33,3 % amostras não apresentavam adição de corantes e 66,7 % apresentaram alguns dos corantes (tartrazina, amarelo crepúsculo, azul brilhante, indigotina, azorrubina, ponceau 4R, amaranth ou bordeaux S, vermelho 40, azul patente V e verde rápido). Dentre as amostras com corantes, quatro fabricantes relataram a presença no rótulo, o que foi confirmado através das análises realizadas. Das 24 amostras com corante, 58 diferentes cores e suas tonalidades foram extraídas. Destas 12 apresentaram alguma incoerência quanto à presença de corantes. Foi observado que amendoim, milho, frutas desidratadas e cristalizadas estavam presentes na composição dos alimentos em grande proporção, e que muitos dos ingredientes se encontravam danificados e infestados por insetos, o que pode favorecer também a proliferação de fungos e formação de micotoxinas. Dessa forma, é importante ressaltar que a qualidade de alimentos completos deve ser frequentemente avaliada, quanto os parâmetros toxicológicos, uma vez que esses produtos apresentam uma composição complexa de ingredientes e aditivos, fato este que permitiria possíveis contaminações. Em (2) foi verificada a contaminação de alimentos completos para aves de companhia quanto à presença de bolores, leveduras e micotoxinas. Foram coletadas 36 amostras de alimentos completos para aves, adquiridos em supermercados, agropecuárias, e lojas especializadas neste tipo de alimento, nas cidades de Belo Horizonte, Florianópolis e Passo Fundo, nos estados de Minas Gerais, Santa Catarina e Rio Grande do Sul, respectivamente. A metodologia para contagem total de bolores e leveduras foi o plaqueamento de superfície em meio ágar batata dextrose, e para determinação da microbiota toxigênica em meio diferencial ágar *Aspergillus flavus* e *A. parasiticus*. Para a análise das micotoxinas foi utilizado o método para multitoxinas [aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂, (AFB₁, AFB₂, AFG₁ e AFG₂), ocratoxina A (OTA), zearalenona

(ZON) e fumonisina B₁ (FB₁)] por cromatografia líquida com detectores massa/massa (LC-MS/MS), com fontes de ionização: por: *electrospray* e química sob pressão atmosférica. Os limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) foram: 34 e 100, 34 e 100, 67 e 200, 83 e 250, 1,7 e 5, 34 e 100, 27 e 80 ng.kg⁻¹ para AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂, FB₁, OTA e ZON, respectivamente. Neste estudo foi verificado que a contagem média de bolores e leveduras foi 1,1 x 10⁵ UFC/g, sendo que o mínimo foi de 4,5 x 10² e o máximo de 6,6 x 10⁵. Foi observado que 75 % (27) das amostras estavam com índices acima do valor preconizado nos manuais de boas práticas de manufatura (1 x 10⁴ UFC/g). Foi observado também que as amostras comercializadas à granel foram as que apresentaram maior contagem. Foi verificada uma correlação entre os conteúdos de umidades e a contagem de bolores e leveduras, sendo que as amostras com menores conteúdos de umidades foram as que apresentaram menor contagem de total de bolores e leveduras. Os gêneros mais frequentes foram *Aspergillus* e *Cladosporium* ambos com 47,2 %, seguido de *Mucor* e *Penicillium* com 38,9 % e 27,8 %, respectivamente. Do total de amostras analisadas, 22,2 % apresentaram crescimento de estirpes toxigênicas de *Aspergillus*. As espécies identificadas foram: *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus ochraceus*. Nenhuma amostra apresentou contaminação acima dos valores quantificáveis por AFLs, OTA, FBs ou ZON. Foi verificado que composição complexa das amostras pode ser fator determinante para a presença de fungos toxigênicos e micotoxinas, embora nenhuma toxina tenha sido quantificada. Algumas amostras apresentaram níveis de bolores e leveduras acima do valor considerado higienicamente seguro, o que permite concluir que em alguma etapa da cadeia produtiva, as boas práticas de fabricação não foram satisfatórias.

Palavras-chave: alimentos completos, aves de companhia, ingredientes, corantes, fungos, micotoxinas.

SIMÃO, Vanessa. **Evaluation of the quality of feeds for pet birds - ingredients, food dyes, moulds and mycotoxins.** 2010. Dissertação (Mestrado em Science of Foods) – Program of After-Graduation in Science of Foods, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, SC.

ABSTRACT

Brazil's potential to pet food is great. For this reason, its quality must be evaluated as a way to guarantee the safety of these foods to its consumers. Therefore, two studies related to the quality of feed were carried out: (1) **Profile determination of artificial food dyes and correlation of ingredients to mycotoxins contamination in feeds for pet birds;** (2) **Evaluation of mycoflora and mycotoxins in feed for pet birds commercialized in the Southeast and South of Brazil.** In (1) it was determined the profile of ingredients and artificial dyes added to pet birds feed, correlating them to data on the manufacturers' labels. 36 samples of pet birds' feed had been collected: 26 commercialized in sealed packages and 10 in bulk. The proportion of each ingredient in the feed separation was determined by macroscopic selection (visual) and microscopical selection (stereoscopic) and the respective proportions calculated for 100 g (%). The main ingredients in the feeds were: (a) extruded feed or in pellets, biscuit and fruit (crystallized and/or dehydrated), (b) peanut (peeled and not peeled), (c) grains (corn, rice, soy, wheat, triticale, wheat middling, birdseed and oat), (d) others (bran of soy and wheat, corn and rice grits, birdseed, millet). The ingredients in greater amount were: extruded feed and/or pellets, seeds of sunflower, corn and peanut. The composition of the ingredients in the feeds varied according to the different specie of birds. As to the determination of artificial dyes, 33% of the samples did not present addition of dyes and 66,7 % presented some dyes (tartrazine, sunset yellow, brilliant blue, indigotine, azorubine, ponceau 4R, amaranth or bordeaux S and red 40). Amongst the samples with dyes, four manufacturers reported their presence on the label, what was confirmed by the analyses. Out of the 24 samples with dye, 57 different colors were extracted, of these 12 presented some incoherence about the presence of dyes. In (2) the contamination of companion animal food by yeasts, mold and mycotoxins was verified. 36 samples of bird feed were acquired in supermarkets, farming stores and specialized stores in Belo Horizonte, Minas Gerais, Florianópolis and Passo Fundo. The methodology for moulds and yeasts counting was the surface plating in media agar potato dextrose (PDA), and to determine the toxigenic mycobiota in *Aspergillus* agar flavus and. parasiticus environment (AFPA). For the analysis of the mycotoxinas it was used as multitoxin method (AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂, OTA, ZON and FB₁) using liquid chromatography with mass/mass detectors with ionization sources: by electrospray under atmospheric pressure. The detection limits (LOD) and the quantification (LOQ) were: 34 and 100, 67 and 200, 83 and 250, 34 and 100, 27 and 80, 1700 and 5000, ng.kg⁻¹ to AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂, OTA, ZON and FB₁, respectively. In this study it was verified that the average counting of mould and yeasts was 1.1 x 10⁵ UFC/g, being the minimum 4.5 x 10² and the maximum 6.6 x 10⁵. It was observed that 75 % (27) of the samples indicated indexes above the amount recommended in the manuals of good manufacturing practices (1 x 10⁴ UFC/g). It was also observed that the samples sold in bulks were the ones that showed the most counting. It was observed a correlation between the moisture content and the amount of yeast and moulds, and the samples with the least moisture contents were the ones that showed the smallest counting of yeast and mold. The most common species were *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus ochraceus*. None of the samples showed contamination above the quantifiable values by AFLs, OTA, FBs or ZON. It was verified that complex composition of the samples

could be a determinant factor to the toxigenic fungi and mycotoxins, although no mycotoxin was quantified. Some samples showed mould and yeasts level above to what is considered hygienic, which shows that some stage of production was not satisfactory.

Key Word: pet food, companion birds, ingredients, food dyes, fungi, moulds, mycotoxins.

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DE LITERATURA

Figura 1. Estrutura genérica das antocianinas e formas encontradas nos alimentos	34
Figura 2. Possíveis mudanças estruturais das antocianinas decorrentes das mudanças de pH em meio aquoso	35
Figura 3. Estruturas químicas de alguns carotenóides	37
Figura 4. Estrutura genérica para as clorofilas	41
Figura 5. Principais vias de degradação das clorofilas, compostos formados e respectivas colorações	44
Figura 6. Estrutura geral da betalaína: (A) molécula de ácido betalâmico, (B) estrutura que R1 e R2	45
Figura 7. Principais estruturas químicas das betacianinas e betaxantinas encontradas na beterraba vermelha	46
Figura 8. Estrutura química dos principais corantes utilizados em alimentos	51
Figura 9. Cadeia produtiva para controle na indústria de alimentos completos	61
Figura 10. Estruturas químicas das micotoxinas (a) AFLs, (b) FBs, (c) OTA e (d) ZON	67
Figura 11. Tipos de divisores de amostras: (a) divisor de Boerner e cargo; (b) divisor de precisão elétrico e (c) divisor de Gamet	86

ARTIGO 1

Figura 1. Amostras de alimentos para aves de companhia (a) comercializadas embaladas e (b) acondicionadas à vácuo para estocagem	124
Figura 2. Fluxograma do estudo do perfil de ingredientes e corantes em alimentos para aves de companhia e sua relação com micotoxinas	128
Figura 3. Exemplos dos Grupos (Ração, Grãos, Frutas, Semente e Nozes) e Tipos de ingredientes (grãos de milho, frutas cristalizadas, sementes de girassol, ração extrusada, amendoim com e sem casca) presentes nos alimentos destinados á aves de companhia	130

ARTIGO 2

Figura 1. Fluxograma do estudo da contaminação de alimentos para aves de companhia por fungos e micotoxinas	156
--	-----

LISTA DE QUADROS

REVISÃO DE LITERATURA

Quadro 1. Principais nutrientes necessários em uma dieta balanceada para animais	25
Quadro 2. Exemplos de ingredientes utilizados para produção de rações e alimentos completos para animais	26
Quadro 3. Classificação dos corantes permitidos para uso na alimentação humana conforme legislação brasileira	32
Quadro 4. Antocianinas e respectivas fontes alimentares	34
Quadro 5. Gêneros de fungos isolados de diversos tipos de grãos e produtos derivados	64

ARTIGO 1

Quadro 1. Local de fabricação, coleta e descrição das amostras de alimentos para aves de companhia avaliadas - embalagens fechadas e à granel	123
Quadro 2. Ingredientes corados presentes nos alimentos para aves de companhia e seus respectivos códigos – identificação visual	135
Quadro 3. Diversidade e número de cores dos ingredientes corados presentes nos alimentos para aves de companhia - identificação visual	136

ARTIGO 2

Quadro 1. Local de fabricação, coleta e descrição das amostras de ração para aves de companhia avaliadas - embalagens fechadas e à granel	155
--	-----

LISTA DE TABELAS

REVISÃO DE LITERATURA

Tabela 1. Exigência de nutrientes para suínos e frangos de corte conforme fases de crescimento	27
Tabela 2. Propriedades dos corantes artificiais permitidos para uso em alimentos e rações no Brasil	56
Tabela 3. Relação dos corantes artificiais permitidos no Brasil, e respectivos INS, IDA, LMP e riscos a saúde	57
Tabela 4. Espécies fúngicas e parâmetros de desenvolvimento	72
Tabela 5. Limites máximos permitidos na legislação para alimentos destinados para animais de produção	75
Tabela 6. Níveis máximos de micotoxinas permitidos em produtos acabados utilizados na nutrição de animais de companhia	78

ARTIGO 1

Nenhuma entrada de índice de ilustrações foi encontrada.

Tabela 1. Absorbâncias máximas de padrões de corantes artificiais da literatura utilizados no presente estudo	126
Tabela 2. Gradiente de fase móvel (metanol:água) com acetato de amônio 5 mM para análise de micotoxinas em amostras de alimentos para aves de companhia	127
Tabela 3. Determinação das porcentagens dos diferentes Grupos e Tipos de ingredientes utilizados nos alimentos para aves de companhia - <i>amostras fechadas</i>	132
Tabela 4. Determinação das porcentagens dos diferentes Grupos e Tipos de ingredientes utilizados nos alimentos para aves de companhia - <i>amostras à granel</i>	133
Tabela 5. Corantes artificiais permitidos no Brasil e respectivos IDA, LMR e toxicidade	137
Tabela 6. Identificação espectrofotométrica dos corantes artificiais e naturais extraídos de ingredientes presentes em alimentos para aves de companhia	138
Tabela 7. Conteúdo de umidade das amostras de alimentos para pássaros comercializados embalados e à granel	143

ARTIGO 2

Tabela 1. Gradiente de fase móvel (metanol:água) para análise de micotoxinas em amostras de alimentos para aves de companhia	158
Tabela 2. Contagem total de bolores e leveduras, micobiota, espécies toxigênicas de <i>Aspergillus</i> , conteúdo de umidade e níveis de micotoxinas em amostras para aves de companhia	166

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µg	Micrograma
AAFCO	<i>Association of American Feed Control Officials</i>
AFB1	Aflatoxina B ₁
AFB2	Aflatoxina B ₂
AFG1	Aflatoxina G ₁
AFG2	Aflatoxina G ₂
AFLs	Aflatoxinas
AFM1	Aflatoxina M ₁
AFM2	Aflatoxina M ₂
AFPA	Ágar Diferencial para <i>Aspergillus flavus</i> e <i>A. parasiticus</i>
ANFAL-Pet	Associação Nacional de Fabricantes de Alimentos para Animais de Estimação
AOAC	<i>Association of Official Agricultural Chemists</i>
atm	atmosfera
Aw	Atividade de água ou water activity
BPF	Boas práticas de manufatura
CCD	Cromatografia de camada delgada
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
cm	<i>Moisture content</i>
CM	Conteúdo de Umidade
EC	<i>European Communities</i>
EU	<i>European Union</i>
EUA	Estados unidos da América
FAO	<i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i>
FB1	Fumonisina B ₁
FB2	Fumonisina B ₂
FB3	Fumonisina B ₃
FBs	Fumonisinas
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
g	Grama
GMP	<i>Good Manufacturing Practices</i>
h	hora
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
IARC	<i>International Agency Research of Cancer</i>
IDA	Ingestão diária aceitável
INS	<i>International Numbering System</i>
JECFA	<i>Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives</i>
kg	Kilograma
LC	<i>Liquid Chromatography</i>
LC-MS/MS	<i>Liquid Chromatography with tandem mass spectrometry</i>
LMP	Limite máximo permitido
LOD	<i>Limit of detection</i>
LOQ	<i>Limit of quantification</i>
MAPA	Ministério da Agricultura e Pecuária e Abastecimento
Máx.	Máximo
mg	Miligrama
MG	Minas Gerais

Mín	Mínimo
min	minuto
MRL	<i>Maximum residue level</i>
MS	<i>Massa detector</i>
ng	Nanograma
nm	Nanômetro
° C	Graus Celsius
OMS	Organização Mundial de Saúde
OT	Ocratoxina
OTA	Ocratoxina A
PCHRG	<i>Public Citizen Health Research Group</i>
PDA	Ágar Batata Dextrose
pH	Potencial hidrogeniônico
ppb	Partes por bilhão
ppm	Partes por milhão
ppt	Partes por trilhão
PR	Paraná
RS	Rio Grande do Sul
SC	Santa Catarina
seg	segundo
SP	São Paulo
U.S. FDA	<i>United State Food and Drug Administration</i>
UR	Umidade Relativa do Ar
UV	Ultravioleta
WHO	<i>World Health Organization</i>
ZON	Zearalenona

LISTA DE DEFINIÇÕES

(a) Alimentação para animais

- **Ingrediente:** qualquer matéria-prima simples e livre de mistura, utilizada na alimentação animal;
- **Ração:** é a mistura composta por ingredientes e aditivos, *destinada à alimentação de animais de produção*, que constitua um produto de pronto fornecimento e capaz de atender às exigências nutricionais necessárias;
- **Aditivo:** é a substância intencionalmente adicionada ao alimento com a finalidade de conservar, intensificar ou modificar suas propriedades, desde que não prejudique seu valor nutritivo, como os corantes, conservadores, antioxidantes e outros
- **Alimento completo:** é um produto composto por ingredientes e aditivos *destinado exclusivamente à alimentação de animais de companhia*, capaz de atender integralmente suas exigências nutricionais, podendo possuir propriedades específicas ou funcionais;
- **Alimento coadjuvante:** é um produto composto por ingredientes e aditivos *destinado exclusivamente à alimentação de animais de companhia com distúrbios fisiológicos ou metabólicos*, cuja formulação é privada de qualquer agente farmacológico ativo;
- **Alimento específico:** é um produto composto por ingredientes e aditivos *destinado exclusivamente à alimentação de animais de companhia com finalidade de agrado, prêmio ou recompensa* e que não se caracteriza como alimento completo, podendo possuir propriedades específicas
- **Ração: (a) extrusada:** alimento que passou pelo processo de extrusão que consiste no cozimento à alta pressão (50-80 atm), umidade (23-33 %) e temperatura (120-140 °C), em curto espaço de tempo (10-30 seg.). **(b) peletizada:** alimento que passou pelo processo de peletização, ou seja, aglomeração de pequenas partículas em maiores, (*pelets*), elaboradas por um processo mecânico que combina umidade (15-18 %), calor (85-95 °C) e pressão (10 atm), sendo que as partículas são menores, mais compactas, mais densas e estáveis que as extrusadas.

(b) Rotulagem para alimentação animal

- **Níveis de garantia:** quantidades máximas ou mínimas de um componente ou substâncias que garantam a segurança e qualidade do produto para o consumidor;
- **Composição básica:** lista de ingredientes que deve ser relatada nos rótulos ou etiquetas pelos fabricantes do produto comercial ou pelo fracionador. Esta nomenclatura foi definida para alimentos destinados a animais de companhia.

(c) Animais

- **Animais da fauna doméstica:** animais que através de processos de manejo e/ou melhoramento zootécnico tornaram-se domésticas, apresentando características biológicas e comportamentais em estreita dependência do homem, podendo apresentar fenótipo variável, diferente da espécie silvestre que os originou, como por exemplo, o cachorro, a galinha e o cavalo
- **Animais da fauna silvestre brasileira (nativos):** animais pertencentes às espécies nativas, migratórias e quaisquer outras, aquáticas ou terrestres que tenham seu ciclo de vida ocorrendo dentro dos limites do Território Brasileiro ou águas jurisdicionais brasileiras, (papagaios, araras, macacos, onças, capivaras, tatus)
- **Animais da fauna silvestre exótica:** são espécies ou subespécies de animais (1) cuja distribuição geográfica não inclui o Território Brasileiro; (2) introduzidas pelo homem, (inclusive domésticas em estado asselvajado ou alçado); (3) que tenham sido introduzidas fora das fronteiras brasileiras e suas águas jurisdicionais e que tenham entrado em Território Brasileiro, (leão, elefante, zebra, calopsita, agapornis);
- **Animais de açougue:** são os mamíferos (bovídeos, eqüídeos, suínos, ovinos, caprinos e coelhos) e aves domésticas, bem como os animais silvestres criados em cativeiro, sacrificados em estabelecimentos sob inspeção veterinária;
- **Animais de companhia:** os animais pertencentes às espécies criadas e mantidas pelo homem para seu entretenimento, *sem propósito de fornecimento de produtos ou subprodutos de interesse econômico;*
- **Animais de estimação:** são aqueles provenientes de espécies da fauna silvestre, nascidos em criadouro comercial legalmente estabelecido, *mantidos em cativeiro domiciliar, sem finalidade de abate, de reprodução ou de uso científico e laboratorial;*
- **Animais de interesse econômico:** todo aquele considerado animal de produção ou aqueles cuja finalidade seja: esportiva e que gere divisas, renda e empregos, mesmo que sejam também considerados como animais de produção;
- **Animais de produção:** todo aquele cuja *finalidade da criação seja a obtenção de carne, leite, ovos, lã, pele, couro e mel ou qualquer outro produto com finalidade comercial,* podendo ser animais silvestres que se destinam à manutenção ou reprodução em cativeiro para a produção de matrizes, reprodutores, animais de estimação, partes, produtos ou subprodutos;
- **Animais domésticos:** são considerados animais domésticos, aqueles das seguintes espécies: asinina, bovina, bubalina, eqüina, suína, ovina, caprina, canina, leporina e outras de interesse zootécnico e econômico;
- **Animal silvestre:** animal pertencente à fauna silvestre nativa ou exótica;
- **Espécies consideradas de interesse zootécnico e econômico** para efeito de *registro genealógico* de **animais domésticos:** eqüinas, asininas, bovinas, chinchilas, ovinas, caprinas, suínas, e bubalinas. **Pequenos animais domésticos** (cães, gatos e roedores);
- **Zootecnia:** manejo de animais de produção e nativos, melhoramento genético, manejo da reprodução, nutrição, pastagens e forragens, alimentos, instalações e equipamentos zootécnicos;

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	20
2 REVISÃO DE LITERATURA	24
2.1 Alimentos Completos para Animais de Companhia	24
2.1.1 Composição, tipos de nutrientes e ingredientes	25
2.1.2 Tipos de ração e alimento completo	27
2.2 Aditivos Alimentares	30
2.2.1 Corantes	31
2.3 Legislação Nacional e Internacional para Corantes em Alimentos para Animais	58
2.4 Qualidade dos Ingredientes, Aditivos Alimentares e Alimentos Completos	60
2.5 Contaminação de Alimentos Completos	63
2.5.1 Fungos toxigênicos	63
2.5.2 Micotoxinas	65
2.6 Fatores que Afetam o Desenvolvimento de Fungos e Produção de Micotoxinas	72
2.6.1 Atividade de água e conteúdo de umidade	73
2.6.2 Umidade relativa	73
2.6.3 Temperatura	74
2.6.4 Microclima, composição do substrato e outros	74
2.7 Legislação Nacional e Internacional para Micotoxinas em Alimentos para Animais	74
2.7.1 Animais de produção	74
2.7.2 Animais de companhia	77
2.8 Metodologias analíticas para determinação de aditivos alimentares	78
2.8.1 Corantes	78
2.9 Metodologias Analíticas para Determinação da Micobiota e Micotoxinas	81
2.9.1 Micobiota: contagem total de bolores e leveduras e verificação do potencial toxigênico	81
2.9.2 Micotoxinas	82
2.10 Contaminação de Alimentos Completos por Fungos, Micotoxinas e Outros Contaminantes	91
2.10.1 Fungos e Micotoxinas	91
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	97
3 ARTIGO	117

DETERMINAÇÃO DO PERFIL DE INGREDIENTES E CORANTES ARTIFICIAIS EM ALIMENTOS PARA AVES DE COMPANHIA E SUA RELAÇÃO COM MICOTOXINAS	117
3.1 Resumo	118
3.2 Introdução	119
3.3 Material e Métodos	122
3.4 Resultados e Discussão	129
3.5 Conclusão	144
3.6 Referências Bibliográficas	145
4 ARTIGO	149
AVALIAÇÃO DA MICROBIOTA E DE MICOTOXINAS EM ALIMENTOS PARA AVES DE COMPANHIA COMERCIALIZADAS NO SUDESTE E SUL DO BRASIL	149
4.1 Resumo	150
4.2 Introdução	151
4.3 Material e Métodos	153
4.4 Resultados e Discussão	158
4.5 Conclusão	167
4.6 Referências Bibliográficas	167
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	172
APÊNDICE A – Trabalho apresentado no XII International Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins, Istambul, Turquia, 2007	173
APÊNDICE B – Resumo do trabalho “Avaliação da contaminação por micotoxinas em amendoim, milho, e soja no período de 2002 a 2007” apresentado no XV Congresso Brasileiro de Toxicologia, Búzios (RJ), 2007	176
APÊNDICE C – Certificado da apresentação do trabalho “Avaliação da contaminação por micotoxinas em amendoim, milho, e soja no período de 2002 a 2007” apresentado no XV Congresso Brasileiro de Toxicologia, Búzios (RJ), 2007	178
APÊNDICE D - Certificado de participação no XV Congresso Brasileiro de Toxicologia, Búzios (RJ), 2007	179
APÊNDICE E - Certificado de participação como palestrante do Workshop em qualidade e segurança de rações para animais de estimação – PETFOOD SAFE’2007, Florianópolis (SC), 2007	180
APÊNDICE F - Certificado de participação como membro do comitê administrativo e de apoio do Workshop em qualidade e segurança de rações para animais de estimação – PETFOOD SAFE’2007, Florianópolis (SC), 2007	181

APÊNDICE G - Certificado de participação como membro do comitê científico do Workshop em qualidade e segurança de rações para animais de estimação – PETFOOD SAFE’2007, Florianópolis (SC), 2007	182
APÊNDICE H – Artigo “Effect of ozone gás on Brazil Nut (<i>Bertholletia excelsa</i> H. B. K.): mycoflora and aflatoxin reduction” apresentado no CAF 2008, Controlled Atmosphere and Fumigation – Green, Safe, Harmony and Development, Chengdu, China, 2008	183
APÊNDICE I – Resumo expandido do trabalho “Determinação do perfil de corantes e ingredientes em rações para pássaros de estimação” apresentado no XVII Encontro Nacional e II Congresso Latinoamericano de Analistas de Alimentos, Belo Horizonte (MG) 2009	185
APÊNDICE J – Certificado da apresentação do trabalho “Determinação do perfil de corantes e ingredientes em rações para pássaros de estimação” apresentado no XVII Encontro Nacional e II Congresso Latinoamericano de Analistas de Alimentos, Belo Horizonte (MG) 2009	186
APÊNDICE K - Certificado da apresentação do trabalho “Estudo do efeito do ozônio sobre a qualidade de castanha-do-Brasil sem casca embalada à vácuo” apresentado no XVII Encontro Nacional e II Congresso Latinoamericano de Analistas de Alimentos, Belo Horizonte (MG) 2009	187
APÊNDICE L - Certificado de participação no XVII Encontro Nacional e II Congresso Latinoamericano de Analistas de Alimentos, Belo Horizonte (MG) 2009	188
APÊNDICE M - Resumo expandido do trabalho “Estudo do efeito do ozônio sobre a qualidade de castanha-do-Brasil sem casca embalada à vácuo” apresentado no XVII Encontro Nacional e II Congresso Latinoamericano de Analistas de Alimentos, Belo Horizonte (MG) 2009	189
APÊNDICE N - Resumo do trabalho “Evaluation of ozone treatment and vaccum for in-shell Brazil nuts shipment and aflatoxin reduction” apresentado no ISM Conference 2009, Tulln. Worldwide Mycotoxin Reduction In Food and Feed Chains.	190
APÊNDICE O - Resumo expandido do trabalho “Dogs and cats pathologies mycotoxin related: a survey” apresentado no congresso Myco & Phycotoxins 2010, Mérida, México, 2010	191
APÊNDICE P - Resumo expandido do trabalho “Determination of the profile of ingredients in feed for pet birds versus mycotoxins contamination” apresentado no congresso Myco & Phycotoxins 2010, Mérida, México, 2010	192
APÊNDICE Q - Resumo expandido do trabalho “Toxigenic fungal and mycotoxins in petfood for wild birds” apresentado no congresso Myco & Phycotoxins 2010, Mérida, México, 2010	193

1 INTRODUÇÃO

O comércio de alimentos completos para animais de companhia tem se tornado um mercado extenso e promissor no agronegócio. De acordo com dados divulgados pela Associação Nacional dos Fabricantes de Alimentos para Animais de Estimação (ANFAL-PET), a produção de alimentos completos para esses animais corresponde a aproximadamente 80 % de todos os produtos com o intuito de atender a demanda deste consumidor. No Brasil é estimado que existam cerca de 78 milhões de animais de companhia que vivem em confinamento, sendo 33 milhões de cães, 17,5 milhões de aves, 17 milhões de gatos e 8,5 milhões de peixes.

O Brasil, como grande produtor e exportador de cereais e carne, é o país com maior potencial do mundo nas exportações de alimentos industrializados para animais de companhia. Apesar disso, sua participação é irrisória; menos de 1,0 % de um mercado que movimentou 4,3 milhões toneladas em 2003 e US\$ 3,9 bilhões. Isso se deve ao fato de que alimentos industrializados são oferecidos a apenas 40 % dos animais de companhia, sendo os outros 60 % alimentados com sobras de mesa. Cerca de 2,05 milhões de toneladas de arroz, carnes, leite e outros alimentos são utilizados para alimentar animais de companhia, conseqüentemente desviados da alimentação humana. O mercado não cresce mais devido a alta carga tributária, que encarece e dificulta o acesso da população ao produto. No total, os alimentos para os animais de companhia são taxados com 49,9 % de impostos, enquanto que os insumos agropecuários com 15,25 % e a cesta básica, 7 %. Essa diferença existe, porque os alimentos para cães e gatos são taxados como supérfluos, apesar desta nutrição substituir os alimentos de consumo humano. Em países como Estados Unidos, a alíquota para alimentos completos é idêntica àquela determinada à cesta básica, ou seja, 7,5 %. Em conseqüência da alta carga tributária sobre os alimentos industrializados para cães e gatos também diminui a competitividade do Brasil no mercado externo.

A crise econômica mundial, presenciada no ano de 2009, afetou também o mercado de alimentos completos para animais de companhia, sendo que o volume faturado apresentou uma ligeira queda (-1,8 %), porém o faturamento em reais apresentou 6,0 % de crescimento em relação ao ano de 2008. Este fato revela que mesmo com a crise este mercado continua em expansão uma vez que se tornou uma necessidade para os donos de animais de companhia.

O mercado voltado para animais de companhia é dividido em 4 segmentos: alimentos, medicamentos veterinários, serviços, equipamentos e acessórios. De acordo com a ANFAL-PET (2010), o segmento de alimentos para animais de companhia, é o maior,

movimentando cerca de 6,2 bilhões de reais em 2009, o que corresponde a 64 % dos 9,7 bilhões de reais movimentados por este mercado no Brasil em 2009. Além disso, é projetado um crescimento de 3 a 4 % para o mercado de alimentos completos no Brasil em 2010.

Cabe ressaltar a importância da garantia de qualidade do produto final, ingredientes e aditivos alimentares envolvidos na formulação de um alimento como forma de garantir a qualidade e segurança dos produtos e da saúde dos animais. Quando um alimento completo é desenvolvido devem ser observadas as necessidades de cada espécie de animal, respeitando tamanho, idade, raça, particularidades pertinentes (doenças). Além disso, a presença de inúmeros ingredientes e aditivos podem apresentar risco toxicológico quando estes não apresentam boa qualidade ou quando estão em quantidades acima das necessidades (ingestão) diárias aceitáveis. Logo, a investigação das características dos ingredientes e dos produtos acabados é de grande importância

Os ingredientes são os componentes que fornecerão os nutrientes necessários aos animais. No caso das aves de companhia, é importante salientar que, apesar das várias semelhanças entre elas, cada espécie tem uma exigência nutricional, o que requer uma observação cuidadosa no que se refere ao tipo de alimento fornecido. Normalmente, são encontrados como oferta de alimento misturas de sementes ou, em alguns casos, apenas um tipo (como exemplo, a semente de girassol). Esse fato pode acarretar distúrbios nutricionais, já que aves que consomem sementes selecionarão apenas as mais palatáveis, deixando nutrientes essenciais para sua dieta nas sementes desprezadas. A prática distorcida de utilizar sementes como alimento único para passeriformes e psitacídeos em cativeiro, na tentativa de reproduzir o que eles comem na natureza, pode ocasionar muitas doenças e até a morte prematura desses pássaros. Desta forma, modificar os hábitos de fornecimento de sementes e, ou, alimentos inespecíficos, substituindo-os por alimentos na forma de ração balanceada são atividades que contribuem com a promoção da saúde desses animais.

Em se tratando da qualidade de ingredientes e aditivos alimentares, tem sido verificado que o mercado de alimentos para animais de companhia necessita de atenção, uma vez que não existe regulamentação específica, como é o caso para os aditivos sensoriais da classe dos corantes artificiais.

Os corantes artificiais têm por objetivo tornar o alimento mais atrativo para o animal sem, porém acarretar danos ou risco à saúde dos mesmos. Adição indiscriminada de corantes orgânicos artificiais tem sido observada, principalmente no que diz respeito a alimentos completos e alimentos compostos para aves. Este fato pode gerar uma gama de problemas associados às reações tóxicas descritas na literatura quando se trata da alimentação humana.

Dentre os principais riscos da adição de corantes na alimentação de aves merece destaque o desenvolvimento de: angioedema, prurido, urticária, rinite, alergias, dermatites, bronco constrição, tumores (rim e tireóide), linfomas, reação anafilática, entre outros. Estudos epidemiológicos e relatos de caso, referentes à toxicologia dos corantes artificiais, bem como a avaliação dos tipos e quantidades de corantes adicionados em alimentos para humanos estão bem reportados na literatura. Porém este fato não é observado em se tratando da alimentação de animais de companhia, uma vez que não foram encontrados estudos relacionados com a presença de corantes artificiais em alimentos para animais, bem como da padronização dos ingredientes nesses produtos.

Desta forma, a presença de agentes químicos (resíduos de agrotóxicos, metais pesados, e corantes artificiais à níveis elevados); toxinas (produzidas por bactérias - enteroroxinas e fungos - micotoxinas), além de microrganismos (bactérias e fungos - patogênicos e/ou toxigênicos), podem alterar a qualidade dos alimentos para animais de companhia.

A contaminação com fungos e micotoxinas de alimentos completos é outro problema de grande impacto podendo afetar setores do agronegócio. Poucos trabalhos têm sido publicados para a verificação da qualidade destes produtos quanto sua microbiota e micotoxinas nas matérias-primas bem como nos alimentos processados. No caso de alimentos para aves o número é ainda menor, uma vez que este grupo de animais tem sido subestimado pelos órgãos reguladores. Muitos dos produtos para esse segmento são da própria matéria-prima (grãos) ou mistura desses pós-processamento (alimentos completos), sendo passíveis da contaminação tanto por fungos quanto por micotoxinas. É importante salientar que a qualidade dessas matérias-primas comercializadas, muitas vezes é precária, já que serão destinadas à alimentação animal.

As micotoxinas são metabólitos tóxicos secundários produzidos por fungos que podem causar uma série de efeitos adversos em humanos e animais, gerando perdas econômicas e prejuízo à saúde. Dentre as principais micotoxinas com importância agroeconômica citam-se: aflatoxinas (AFLs = AFB₁; AFB₂; AFG₁; AFG₂), ocratoxina A (OTA), zearalenona (ZON) e fumonisinas (FBs = FB₁; FB₂). Muitos fatores podem contribuir e influenciar no desenvolvimento de fungos e produção de micotoxinas. Dentre eles, as condições de armazenamento, composição do substrato, condições de processamento, além do clima. Os efeitos das micotoxinas em animais, bem como nas aves, podem ser severos e levar a morte. Alguns sintomas que já foram relatados na literatura em animais acometidos por micotoxicoses envolvem desde depressão severa, anorexia, vômito, polidipsia, poliúria,

hepatite imunossupressão, degeneração renal até a morte. Embora exista na literatura, um grande número de estudos que avaliam a contaminação por micotoxinas em alimentos e seus efeitos toxicológicos em animais de produção, este fato não é observado para os animais de companhia. Foi observada a existência de poucos estudos relacionados à avaliação da contaminação de alimentos completos para animais de companhia quanto à presença de fungos toxigênicos e micotoxinas. Porém esses estudos reportam a presenças desses microorganismos e dessas toxinas, as quais apresentam risco à saúde dos animais. Desta forma, o monitoramento dos alimentos completos deve ser realizado constantemente.

Considerando a falta de estudos, este trabalho tem como objetivos avaliar a qualidade de alimentos completos para aves de companhia, quanto aos tipos de ingredientes, presença de corantes artificiais, além da contaminação por bolores (toxigênicos), leveduras e micotoxinas (AFLs, OTA, ZON, FBs).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Alimentos Completos para Animais de Companhia

Os animais de companhia possuem privação de nutrientes, uma vez que seus alimentos não são obtidos da maneira natural, ou seja, pela caça. Logo quando esses animais ficam confinados longe de seus ambientes naturais, existe a necessidade de uma alimentação balanceada e este produto é denominado de alimento completo (SIMÃO 2009; PETBR, 2010).

Alimento completo é um produto composto por ingredientes e aditivos destinado exclusivamente à alimentação de animais de companhia, capaz de atender integralmente suas exigências nutricionais, podendo possuir propriedades específicas ou funcionais (BRASIL, 2009).

O objetivo de formular alimentos para animais é combinar os ingredientes de forma a fornecer as quantidades corretas de nutrientes que o animal necessita para crescer, manter-se saudável, produzir tecido ou reproduzir-se, sendo que cada espécie de animal requer uma dieta específica para a manutenção de sua saúde priorizando um maior desempenho em suas funções. Portanto a fonte desses nutrientes será os ingredientes ou alimentos que farão parte da composição do produto acabado. Logo, é imprescindível levar em conta, no momento de desenvolver um alimento, as características fisiológicas de cada espécie, conhecendo a quantidade de nutrientes necessários para cada fase de vida do animal, (inicial, crescimento, abate, filhotes, adultos, entre outros) e a partir daí, calcular a quantidade de ingredientes necessários para suprir os nutrientes nos níveis adequados (ROSTAGNO et al., 2000).

Neste contexto, é importante a definição de termos como ingrediente e nutriente. Logo, entende-se que o ingrediente é o próprio alimento que fornece os vários nutrientes. São alguns exemplos de ingredientes: milho, soja, farelo de soja, trigo, fosfato bicálcio e sal. Já os nutrientes são os componentes ativos dos ingredientes, e participam no processo bioquímico de formação dos tecidos animais. São exemplos de nutriente: energia, proteína, aminoácidos, vitaminas, minerais e compostos bioativos (ROSTAGNO et al., 2000).

Portanto conclui-se que para satisfazer todas as necessidades do animal, o alimento completo deve oferecer uma dieta balanceada, a qual será composta por nutrientes oriundos da composição dos ingredientes contidos na formulação. Neste contexto a seguir abordar-se-ão os principais tipos de nutrientes e ingredientes utilizados no desenvolvimento de alimentos

completos e rações.

2.1.1 Composição, tipos de nutrientes e ingredientes

A composição dos alimentos completos e rações é muito complexa, pois visa atender a todas as necessidades bioquímicas e fisiológicas do animal a que se destina. Para isso, a formulação é composta de macro e micronutrientes os quais estão descritos no Quadro 1.

Quadro 1. Principais nutrientes necessários em uma dieta balanceada para animais

Macronutrientes	Aminoácidos	Vitaminas	Minerais
Proteína bruta	Alanina	A	Cálcio
Extrato etéreo	Arginina	D	Fósforo
Carboidratos	Asparagina	E	Potássio
Água	Acido aspártico	K	Cloro
	Cistina	Tiamina B1	Magnésio
	Glutamina	Riboflavina B2	Ferro
	Acido glutâmico	Piridoxina B6	Cobre
	Glicina	Cianocobalamina B12	Zinco
	Histidina	Ac Nicotínico	Manganês
	Isoleucina	Ac. Pantatênico	Cobalto
	Leucina	Ac fólico	Iodo
	Lisina	Ac lipóico	Selênio
	Metionina	Ac Ascórbico C	Flúor
	Fenilalanina	Biotina	Molibdênio
	Prolina	Mioinositol	Cromo
	Serina	Colina	
	Treonina		
	Triptofano		
	Tirosina		
	Valina		

Fonte: Bunge (2008).

Dentre os principais macronutrientes destacam-se as proteínas, lipídeos, carboidratos. As proteínas são macromoléculas cujos constituintes são os aminoácidos. Durante a digestão das proteínas, os aminoácidos são liberados podendo atravessar a barreira intestinal, sendo utilizados, prioritariamente, no anabolismo: síntese de proteínas e outras moléculas nitrogenadas. Os aminoácidos circulam no sangue e são utilizados pelas células, os excedentes são convertidos em outros componentes ou transformados em uréia pelo fígado, que é excretada pelo rim. Cabe ressaltar que as proteínas são importantes para o crescimento e reparo dos tecidos. Os lipídeos alimentares são ésteres de ácidos graxos e de glicerol, sua maior característica nos alimentos é a contribuição para a palatabilidade da ração, sendo que no organismo sua função é fornecer energia e transportar vitaminas. Os carboidratos são constituídos de açúcares simples, dentre os quais a glicose se destaca. Esses compostos são utilizados como principal fonte de energia (SWENSON; REECE, 1996). Além destes, os oligossacarídeos (não digestíveis) provenientes de vegetais também estão presentes nestes

produtos, sendo fermentados no intestino grosso e originando assim as flatulências. Cabe ressaltar que as fibras têm um grande papel na qualidade de rações, e que os produtos formulados com grandes quantidades de matérias-primas de origem vegetal, ricas em fibras e fitatos, podem levar à carência de elementos essenciais, uma vez que existem as interações com alguns minerais, logo equilíbrio entre esses componentes é necessário para evitar deficiências (ANDRIGUETTO et al., 1985).

Quanto aos micronutrientes, devem-se observar as interações entre os mesmos, como, o excesso de cálcio pode diminuir a biodisponibilidade de micro-elementos como zinco, fósforo e iodo, logo o desequilíbrio na formulação pode causar menor aproveitamento dos minerais e conseqüentemente deficiências (CARCIOFI, 2005; FRASER, 1991; LEWIS; MORRIS JR.; HAND, 1994; KANEKO; HARVEY; BRUSS, 1997).

Como abordado anteriormente, os ingredientes são os alimentos que fornecerão os nutrientes à ração. Grande parte dos ingredientes fornece todos os nutrientes necessários aos animais, com algumas exceções. É preciso lembrar que os animais apresentam exigências de níveis determinados para cada nutriente, e desta forma é preciso avaliar quais fontes tem a melhor qualidade de nutrientes, pois um único alimento geralmente não é capaz de atender todas as exigências do animal ao mesmo tempo. Logo, para atender as necessidades dos animais é necessário combinar vários alimentos para que o resultado final seja um composto mais balanceado e eficiente do ponto de vista nutricional (ROSTAGNO et al., 2000).

Em função da maior concentração de determinado nutriente, o ingrediente pode ser classificado da seguinte maneira: (a) ingredientes protéicos: maior concentração de aminoácidos; (b) ingredientes energéticos: maior concentração de carboidratos ou lipídeos; (c) ingredientes fibrosos: grande quantidade de fibras; (d) vitaminas industriais; (d) minerais industriais.

O quadro 2 apresenta exemplos dos tipos de ingredientes conforme a classificação supracitada.

Quadro 2. Exemplos de ingredientes utilizados para produção de rações e alimentos completos para animais

Protéicos	Energéticos	Fibrosos
Farelo de soja	Milho	Pasto
Farelo de algodão	Sorgo	Fenos
Farelo de girassol	Trigo	Silagens
Soja extrusada	Triticale	Farelo de trigo
Farinha de carne	Cevada	Casca de soja
Farinha de pena	Centeio	Casca de arroz
Farinha de peixe	Arroz	Polpa de citrus
Aminoácidos sintéticos	Gordura animal	
Sucedâneos do leite e sangüíneos	Óleo vegetal	

Fonte: Bunge (2008).

Assim, para atender as necessidades dos animais para os diversos nutrientes, é necessário combinar os diferentes ingredientes de cada grupo de forma que energia, aminoácidos, fibra, vitaminas e minerais estejam equilibrados na dieta.

2.1.2 Tipos de ração e alimento completo

Ao desenvolver uma ração, a mesma deve ser específica para atender as necessidades de cada espécie, ou seja, ela deve obedecer às exigências nutricionais para cada animal de forma a proporcionar que o seu desenvolvimento seja o mais eficiente possível. Essas exigências são determinadas em experimentos que indicam indiretamente o nível ótimo para cada nutriente.

É importante a observar que as exigências nutricionais variam de acordo com a espécie, idade, fase de crescimento, estado fisiológico, clima e sexo. Assim, uma vaca produzindo leite tem exigência muito diferente do bezerro ou do touro. Em suínos e frangos de corte com crescimento acelerado, o ideal seria modificar a ração para cada dia de vida, pois à medida que cresce, a exigência dos nutrientes muda (ROSTAGNO et al., 2000). Na Tabela 1 apresentam-se as exigências nutricionais para suínos e frangos de corte.

Tabela 1. Exigência de nutrientes para suínos e frangos de corte conforme fases de crescimento

Nutrientes (%)	Suínos			Frangos		
	Inicial	Cresc. ^a	Abate	Inicial	Cresc. ^a	Abate
Proteína	19	17,5	16,5	21,40	19,30	18,00
Cálcio	0,83	0,76	0,65	0,96	0,87	0,80
Fósforo disponível	0,43	0,36	0,32	0,45	0,41	0,37
Sódio	0,18	0,17	0,16	0,22	0,19	0,19
Lisina (dig.^b)	0,93	0,83	0,74	1,14	1,05	0,94
Metionina+Cist (dig.)	0,56	0,54	0,49	0,81	0,74	0,67
Triptofano (dig.)	0,17	0,16	0,15	0,18	0,18	0,16
Treonina (dig.)	0,60	0,55	0,52	0,68	0,60	0,54
Arginina (dig.)	0,39	0,29	0,22	1,20	1,13	1,02
Valina (dig.)	0,64	0,56	0,50	0,88	0,84	0,75
Energia (dig.) kcal/kg	3400	3400	3400	3000	3100	3200

a- crescimento b-digestível

Fonte: Rostagno et al. (2000 apud BUNGE, 2008).

Em se tratando de animais de companhia as exigências nutricionais diferem para cada espécie de animal, fase de crescimento e estado fisiológico (ANFAL-PET, 2007).

Para essa classe de animais, os alimentos classificam-se em: alimentos completos e alimentos para objetivos específicos. Os alimentos completos devem suprir todas as

necessidades nutricionais do animal enquanto que os alimentos com objetivos específicos são destinados a atender necessidades fisiológicas particulares como: aleitamento e lactação, obesidade e insuficiência renal (BRASIL, 2009a; 2009b; 2009c).

Desta forma, animais de companhia como cães e gatos, possuem exigências nutricionais muito diferentes dos humanos, portanto fornecer sobras de alimentos pode provocar o desequilíbrio nutricional nesses animais (PETBR, 2010).

Rêgo (2009) concorda com os autores supracitados e salienta ainda que apesar das várias semelhanças entre as aves (psitacídeo), cada espécie tem uma exigência nutricional, o que requer uma observação cuidadosa no que se refere ao tipo de alimento fornecido. De acordo com o autor, normalmente o alimento ofertado é composto por misturas de sementes ou, em alguns casos, apenas um tipo (semente de girassol). Esse fato pode acarretar distúrbios nutricionais, uma vez que aves selecionarão apenas as sementes mais palatáveis, deixando nutrientes essenciais para sua dieta nas sementes desprezadas. Atualmente, já existem no mercado alimentos completos específicos para cada tipo de psitacídeo.

Utilizar sementes como única fonte de alimento para passeriformes e psitacídeos em cativeiro pode ocasionar muitas doenças e até a morte prematura dessas aves. As aves criadas em cativeiros desenvolvem mudanças em suas necessidades nutricionais, desta forma, não devem ser ignoradas as mudanças nos hábitos alimentares. Em cativeiro, elas não realizam atividades físicas exaustivas e não necessitam buscar alimentos em lugares distantes, portanto, um problema crescente que pode ser verificado em aves de companhia é a obesidade, desencadeada por uma dieta hipercalórica e desequilibrada. Em decorrência da obesidade outras conseqüências podem ser verificadas como doenças hepáticas e cardiovasculares, comprometendo assim, a longevidade e a qualidade de vida desses animais (KILL et al., 2008).

Dentre os novos tipos de alimentos destinados à animais de companhia comercializados, as formas extrusadas e peletizadas aparecem como novidade na alimentação para aves ornamentais e silvestres. Essas formas proporcionam vantagens em relação aos alimentos compostos por sementes, pois elimina eventuais presenças de fungos (mofos) e bactérias, comumente encontrados em sementes vendidas à granel, aumenta a digestibilidade dos nutrientes e o prazo de validade do alimento. Além disso, os grânulos das rações extrusadas, reúnem todos os nutrientes necessários para a boa saúde das aves, impedindo que as mesmas selecionem apenas parte do alimento, o que evita o desbalanceamento nutricional (KILL et al., 2008).

Um dos entraves na criação de aves ornamentais ainda é a disponibilidade de

alimentos completos comerciais. Grande parte desses alimentos é importada, criando uma série de dificuldades para o criador nacional. Dessa forma, faz-se necessário o desenvolvimento de bons alimentos completos nacionais, que atendam economicamente ao criador e que, primariamente, atendam as necessidades nutricionais e as preferências de palatabilidade das aves que as consumirão (MACHADO; SAAD, 2000). O criador tem disponível no mercado basicamente três tipos de alimentos completos para aves silvestres: as fareladas, peletizados e extrusadas. As rações fareladas apresentam uma série de desvantagens: permitem a seleção de partículas, acarretam grande desperdício por perdas no comedouro e, por serem pulverulentas, favorecem o aparecimento de doenças respiratórias (NUNES, 1998). De acordo com Dale (1996), as rações peletizadas são melhores que as anteriores, porém é limitada no que diz respeito à inclusão de alguns princípios nutritivos, como óleos. Já a extrusada é a forma com maior potencial para o mercado de alimentos para aves ornamentais e silvestres, pois permitem uma alta inclusão de lipídios sem danificar as propriedades físicas do produto.

Além disso, um parâmetro importante na diferenciação das rações peletizadas e extrusadas é a digestibilidade, pois este determina a quantidade de nutrientes que estarão disponíveis para o metabolismo do animal. No caso das rações extrusadas a digestibilidade de substâncias como amido e proteínas é maior se comparado com as peletizadas (CARCIOFI, 1996).

Portanto, um aspecto importante para o sucesso de um programa alimentar em aves de companhia é o fornecimento energético, uma vez que o consumo voluntário de alimentos é regulado em função da quantidade de energia da dieta. Entretanto, pouco se sabe sobre o valor energético dos alimentos usualmente utilizados em dietas para papagaios (SAAD et al., 2007).

Uma das principais doenças nutricionais que acomete psitacíformes adultos é a deficiência de vitamina A. Esta hipovitaminose acarreta ainda doenças secundárias como alterações nas glândulas salivares, típico da deficiência desta vitamina e aspergilose relacionada à metaplasia escamosa das glândulas salivares. Essas doenças são diagnosticadas freqüentemente nas aves que se alimentam de sementes ou possuem a maior parte da dieta baseada em sementes. Logo, as misturas caseiras são dietas nutricionalmente heterogêneas e desbalanceadas, pois não há controle eficaz da ingestão dos nutrientes, uma vez que esta dieta possibilita a seleção pela palatabilidade particular de cada animal, ou seja, dominância dos alimentos mais palatáveis, supervalorização das frutas e verduras, consumo excessivo de sementes e insuficiente de suplementos (SILVA, 2008).

Desta forma verifica-se que para desenvolver um alimento completo equilibrado é

necessário, selecionar ingredientes de qualidade, respeitando as necessidades nutricionais de cada espécie de animal. Além disso, é importante que o alimento seja atrativo para o animal, tenha uma vida de prateleira aceitável e ofereça outras vantagens para o público consumidor. Logo, algumas substâncias são adicionadas aos alimentos a fim de conferir-lhes as características exigidas pelo mercado voltado para animais de companhia, são elas, os aditivos alimentares.

2.2 Aditivos Alimentares

Os hábitos alimentares da população brasileira e mundial sofreram alterações significativas decorrentes das mudanças de estilo de vida e revolução tecnológica na produção de alimentos. Dessa forma, órgãos reguladores e a comunidade científica demonstram preocupação quanto à substituição massiva de alimentos naturais por alimentos processados, e conseqüentemente empobrecimento da dieta (PINHEIRO, 2005).

Atualmente, população em geral tem apresentado altos índices de doenças crônicas não transmissíveis, como a obesidade, doenças circulatórias, cardiovasculares, entre outras. Esse fato tem gerado questionamentos quanto à segurança do emprego de aditivos alimentares, inclusive quando se trata de corantes artificiais (POLÔNIO; PERES, 2009).

A avaliação dos aditivos alimentares no âmbito mundial é baseada no controle da IDA (Ingestão Diária Aceitável), desenvolvida pelo *Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives* (JECFA). Esse comitê define *aditivo alimentar* como qualquer substância que **não se consome normalmente como alimento, nem tampouco se utiliza como ingrediente básico em alimentos**, tendo ou não valor nutritivo, e cuja adição intencional ao alimento com fins tecnológicos (incluindo os organolépticos) em suas fases de fabricação, elaboração, preparação, tratamento, envasamento, empacotamento, transporte ou armazenamento, resulte ou possa preservar razoavelmente por si, ou seus subprodutos, em um componente do alimento ou um elemento que afete suas características (WHO/FAO, 1995).

Para o Ministério da Agricultura, os aditivos alimentares são as substâncias que, incorporadas nos alimentos para animais, são susceptíveis de influenciar as suas características ou a produção animal, sendo esses classificados nas seguintes categorias: tecnológicos, sensoriais, nutricionais, zootécnicos e anticoccidianos. Neste trabalho abordar-se-ão somente os aditivos sensoriais, mais especificamente os corantes orgânicos naturais e artificiais (BRASIL, 2004).

A preocupação com o uso indiscriminado de aditivos na alimentação humana e

animal é originada pela divulgação de estudos que apontam reações adversas aos aditivos, quer seja aguda ou crônica, tais como reações tóxicas no metabolismo desencadeantes de alergias, de alterações no comportamento, em geral, e carcinogenicidade, esta última observada em longo prazo (POLÔNIO; PERES, 2009).

No caso dos animais, principalmente de companhia, o uso dessas substâncias e seus efeitos deletérios perante a saúde, não tem sido estudados. Cabe ressaltar, que a estrutura, composição corporal e o metabolismo de animais e humanos são muito diferentes, e devem ser levados em conta na análise toxicológica dos aditivos. Além disso, a frequência com que os animais estariam expostos aos aditivos também deve ser considerada, uma vez que os alimentos destinados à animais de companhia são administrados diariamente como única fonte de nutrientes (FERNANDES, 2005). Dentre os aditivos que merecem destaque quanto os efeitos adversos encontrados estão os corantes, assunto esse abordado no item a seguir

2.2.1 Corantes

As cores são resultado da absorção de radiação eletromagnética na faixa da luz visível e estão relacionadas com comprimentos de onda particulares. O vermelho, por exemplo, corresponde à faixa entre 480 a 530 nm, e o azul, de 600 a 700 nm. Os compostos orgânicos podem absorver radiação eletromagnética. Porém, a absorção de radiação na faixa da luz visível se deve à presença de grupos cromóforos, ou seja, ligações duplas conjugadas, na estrutura dos compostos. Estruturalmente, um dos únicos aspectos comuns a praticamente todos os corantes é a presença de um ou mais anéis benzênicos (LIMA; PEREIRA; PINTO, 2007).

As cores estão intimamente ligadas a vários aspectos da vida e são capazes de influenciar as decisões do cotidiano, principalmente, as que envolvem os alimentos. A aparência, segurança, características sensoriais e aceitabilidade dos alimentos são todas afetadas pela cor, sendo que existe uma relação entre certas cores com os alimentos, e isto está relacionado com o desenvolvimento cognitivo, que depende de memória e de experiências vivenciadas (PRADO; GODOY, 2003).

A adição de corantes nos alimentos surgiu da necessidade de fazer com que os produtos se tonassem mais atrativos aos seus consumidores, pois o primeiro critério de avaliação do consumidor sobre um produto, a aceitabilidade e preferência pelo mesmo, está relacionado à cor e aparência, logo se justifica o emprego dos corantes (CLYDESDALE, 1993). Além disso, Tricard, Cazabeil e Medina (1998) ressaltam que a manutenção da cor e

aspecto natural do alimento é um fator importante para o marketing do produto.

Além disso, o uso de corantes tem sido utilizado para restabelecer o aspecto inicial dos gêneros alimentícios cuja cor foi alterada pelos processos de transformação, estocagem, embalagem e/ou distribuição e cujo aspecto visual encontra-se prejudicado; dar aparência mais atrativa aos alimentos; manter e reforçar a cor dos alimentos durante armazenamento e padronizar a cor dos alimentos, evitando a sua variação (TEIXEIRA, 1969).

De acordo com o Ministério da Agricultura pecuária e Abastecimento, corante ou pigmentante é aquela substância adicionada ao alimento para conferir ou intensificar a cor dos mesmos (BRASIL 2004).

Até 1850 todos os corantes alimentícios provinham de três fontes: vegetais comestíveis (cenoura, beterraba, casca de uva escura); extratos de origem animal ou vegetal normalmente não consumidos como tais (ácido carmínico, estigma de açafrão); e resultados da transformação de substâncias naturais (caramelo). Atualmente, são comercializados mais de oito mil compostos corantes, dos quais 90% são sintéticos. O corante índigo, um dos mais utilizados, foi obtido sinteticamente em 1880, por Karl Heumann (LIMA; PEREIRA; PINTO, 2007).

Os corantes utilizados pela indústria de alimentos e bebidas são diferenciados em naturais, artificiais e o caramelo. Porém a legislação os classifica em grupos mais complexos como: corante orgânico natural; corante orgânico artificial; corante sintético idêntico natural e corante inorgânico ou pigmento (BRASIL 2004). No quadro 3 são apresentados os corantes permitidos pela legislação brasileira e suas respectivas classes.

Quadro 3. Classificação dos corantes permitidos para uso na alimentação humana conforme legislação brasileira

Corantes naturais	Sintéticos idênticos aos naturais	Sintéticos artificiais
Açafrão		Amaranto ou Bordeaux S
Ácido carmínico		Amarelo crepúsculo
Antocianinas		Azul Brillante FCF
Cacau		Azul Patente
Carmin		Azorrubina
Carotenóides ($\alpha\beta\gamma$ –caroteno, bixina, norbixina, capsantina, capsorubina e licopeno)	β –caroteno, β -apo8' –carotenal, éster etílico do ácido β -apo8' –carotenóico	Eritrosina
Carvão vegetal		Indigotina
Clorofila, Clorofila e clorofilinas cúpricas e seus sais		Ponceau 4R
Cochonilha		Tartrazina
Cúrcuma e Curcumina		Verde Rápido
Hemoglobina		Vermelho 40
Índigo		
Páprica		Corantes inorgânicos
		Alumínio
		Carbonato de cálcio
		Dióxido de titânio
		Ouro

(conclusão)

Riboflavina	Riboflavina e Riboflavina 5- fosfato de sódio	Óxido e hidróxidos de ferro
Urucum		Prata
Urzela		
Vermelho de beterraba		
Xantofilas :	Xantofilas:	Corantes caramelo
cantaxantina,	criptoxantina,	
falvoxantina,	luteína,	
rodoxantina,	rubixantina,	
violaxantina	violaxantina	

Fonte: Carvalho (2004).

(a) Corante natural ou orgânico natural

Os corantes naturais ou orgânicos naturais são aqueles obtidos a partir de vegetais ou, eventualmente, de animais, cujo princípio do corante tenha sido isolado com emprego de processos tecnológicos adequados, apresentando grau de pureza compatível com o seu emprego para fins alimentares (BRASIL, 2004).

Os corantes naturais permitidos pela legislação brasileira são: açafrão, ácido carmínico ou cochonilha, antocianinas, carotenóides, betalaínas, clorofilas, curcuminas, hemoglobina, páprica, urucum, cacau, carvão, riboflavina. Porém a seguir serão abordadas apenas as classes das antocianinas, carotenóides, clorofilas e betalaínas.

(a.1) Antocianinas

As antocianinas são pigmentos derivados das antocianidinas, da classe dos flavonóides, cuja estrutura genérica é o cátion flavílico. Quando extraídas do meio natural, apresentam-se na forma de sais de flavílio, normalmente glicosiladas, ou seja, uma ou mais hidroxilas das posições 3, 5 e 7 estão ligadas a açúcares, aos quais podem estar ligados ácidos fenólicos. Os diferentes grupos R e R' e açúcares ligados nas posições 3, 5 e 7, assim como os ácidos a eles ligados, caracterizam os diferentes tipos de antocianinas (TIMBERLAKE; BRIDLE, 1975). Essas substâncias são os principais cromóforos encontrados nas flores e frutas vermelhas, azuis e púrpuras (COUTO, RAMOS; CAVALHEIRO, 1998; LIMA et al., 2003). A estrutura genérica das antocianinas, bem como seus diferentes tipos, estão apresentados na Figura 1

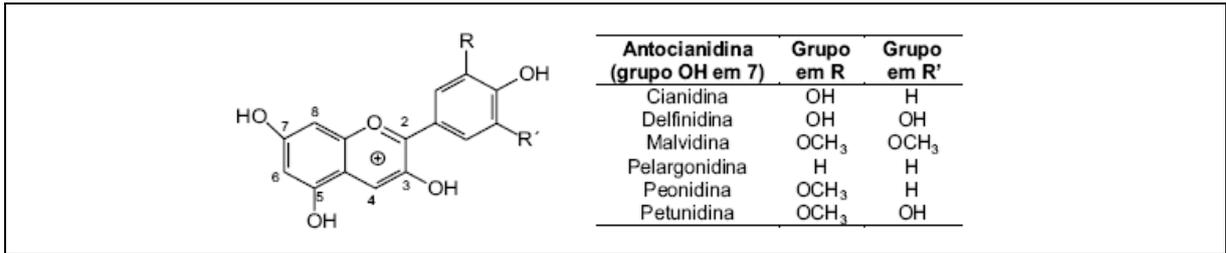


Figura 1. Estrutura genérica das antocianinas e formas encontradas nos alimentos
Fonte: Terci e Rossi (2002).

Na natureza, 17 antocianidinas têm sido encontradas, mas apenas 6 estão presentes em alimentos são elas: Cianidina (vermelho), Delfinidina (azul), Malvidina (púrpura), Pelargonidina (marrom avermelhado), Peonidina e Petunidina (vermelho escuro) (MULTON, 1988). No Quadro 4 são descritos os principais alimentos que são fontes de antocianinas.

Quadro 4. Antocianinas e respectivas fontes alimentares

Antocianinas	Fonte
Cianidina-3-glicosídeo	Uva, vinho, cereja, jambolão, morango, amora, ameixa, maçã, azeitona
Cianidina-3,5-diglicosídeo	Uva, vinho, cereja, figo, marmelo
Peonidina-3-glicosídeo	Uva, vinho, cereja, jabuticaba, ameixa
Malvidina-3-glicosídeo	Uva, vinho
Malvidina-3,5-diglicosídeo	Uva, vinho, feijão, inhame
Cianidina-3-galactosídeo	Maçã, cacau
Cianidina-3- <i>p</i> -cumarilsoforosídeo-5-glicosídeo	Repolho roxo
Pelargonidina-3-soforosídeo-5-glicosídeo	Rabanete
Pelargonidina-3-glicosídeo	Morango, tamarindo
Delfinidina-3,5-diglicosídeo	Berinjela, feijão, uva, romã
Delfinidina-3-cafeoilglicosídeo-5-glicosídeo	Berinjela
Petunidina-3-glicosídeo	Uva, vinho, feijão, mirtilo, laranja
Petunidina - arabinosídeo	Cebola roxa

Fonte: Malacrida e Motta (2006) e Terci e Rossi (2002).

As diferentes cores exibidas pelos vegetais que contêm antocianinas dependem da influência de diversos fatores, como a presença de outros pigmentos, a presença de quelatos com cátions metálicos e o pH do fluido da célula vegetal (ALKEMA; SEAGER, 1982; FOSTER, 1978 apud TERCÍ; LOPES, 2002). Foster (1978) preparou uma escala de cores para soluções de antocianinas em função do pH, propondo a utilização desta escala para ensino de equilíbrio ácido-base e sobre comportamento de pigmentos. Mais tarde, Mebane e Rybolt (1985) discutiram as variações de cor observadas na titulação de extratos obtidos de diferentes vegetais comestíveis (frutas e folhas).

O pH exerce profunda influência na cor das antocianinas, assim como na sua estabilidade. As antocianinas são mais estáveis em soluções ácidas do que em neutras e alcalinas (MARKAKIS, 1982). Em solução aquosa, podem existir quatro formas estruturais

de antocianinas em equilíbrio: o cátion flavílio, a base quinoidal (anidrobases), a pseudobase carbinol e a pseudobase chalcona (BROUILLARD; DUBOIS, 1977). Em condições ácidas (pH inferior a 2), a antocianina existe primariamente na forma de cátio flavílio (AH⁺) de cor vermelha. Elevando-se o pH, uma primeira reação ocorre rapidamente com a perda do próton para produzir as formas quinoidais, azuis ou violetas., Em paralelo ocorre a hidratação do cátion flavílio (AH⁺), gerando uma pseudobase carbinol que atinge o equilíbrio lentamente com a chalcona (IACOBUCCI; SWEENY, 1983). Finalmente estabelece-se lentamente um equilíbrio tautomérico, com formação de uma pseudobase chalcona (BROUILLARD; IACOBUCCI; SWEENY, 1982).

As mudanças estruturais que ocorrem com a variação do pH, são responsáveis pelo aparecimento das colorações diferentes, incluindo o amarelo em meio fortemente alcalino (TERCI; ROSSI, 2002). As reações de acordo com a mudança do pH podem ser visualizadas na Figura 2.

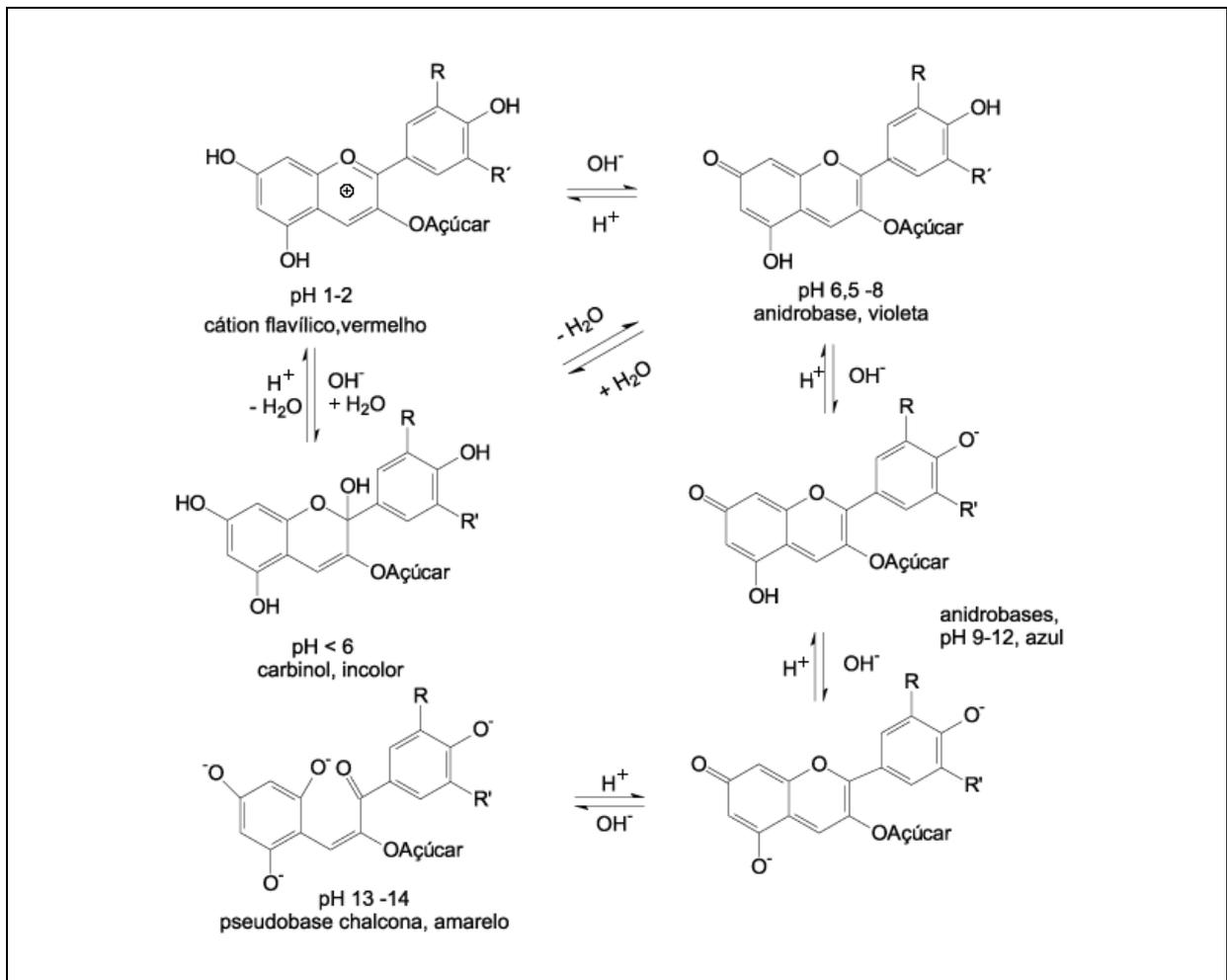


Figura 2. Possíveis mudanças estruturais das antocianinas decorrentes das mudanças de pH em meio aquoso

Fonte: Terci e Rossi (2002).

As antocianinas são pigmentos muito instáveis e podem ser degradadas, sob ação da vitamina C, oxigênio, temperatura, pH do meio, entre outros, no próprio tecido ou destruídas durante o processamento e estocagem dos alimentos. A presença de metais modifica a estabilização das antocianinas, por exemplo, os sais de estanho estabilizam a cor das conservas de aspargos (MULTON, 1988).

As antocianinas são rapidamente destruídas pelo aquecimento durante o processamento e estocagem de alimentos. Muitos estudos demonstraram relação logarítmica entre a destruição das antocianinas e o aumento aritmético da temperatura. Processos utilizando baixo tempo em alta temperatura têm sido recomendados para melhor retenção dos pigmentos. No caso de sucos de frutas vermelhas, perdas de antocianinas mostraram-se insignificantes para tratamentos térmicos com duração inferior a 12 minutos a 100°C (MARKAKIS, 1982). Meschter (1954) verificou a destruição de 50% das antocianinas durante o processamento de compota de morango a 100°C. Ao longo da estocagem a 38 e 20°C, o tempo de meia-vida das antocianinas foi de 10 e 54 dias, respectivamente. Por extrapolação, obteve tempo de meia-vida de 11 meses a 0°C.

Na indústria de alimentos, as antocianinas têm sido utilizadas como corantes naturais em produtos como: cereais, aperitivos, confeitos, coberturas, sobremesas, lácteos aromatizados, massas, molhos, queijos, recheios, refrescos e refrigerantes, sucos de frutas e xaropes para refrescos (LIMA et al., 2003).

(a.2) Carotenóides

Os carotenóides são terpenóides, (tetraterpenóides) de 40 carbonos unidos por unidades opostas no centro da molécula, geralmente constituídos de 8 unidades de isoprenos formando uma longa cadeia de polienos que podem conter de 3-15 ligações duplas conjugadas (FRASER; BRAMLEY, 2004; RODRIGUES-AMAYA, 1999). As diferentes configurações destas estruturas permitem a diversidade dos carotenóides, sendo que as principais reações para formação das novas configurações são: ciclização, hidrogenação, desidrogenação, migração de duplas ligações, encurtamento ou alongamento da cadeia, rearranjo, isomerização, introdução de funções com oxigênio (RODRIGUES-AMAYA, 1999). Na Figura 3 são apresentadas algumas estruturas de carotenóides.

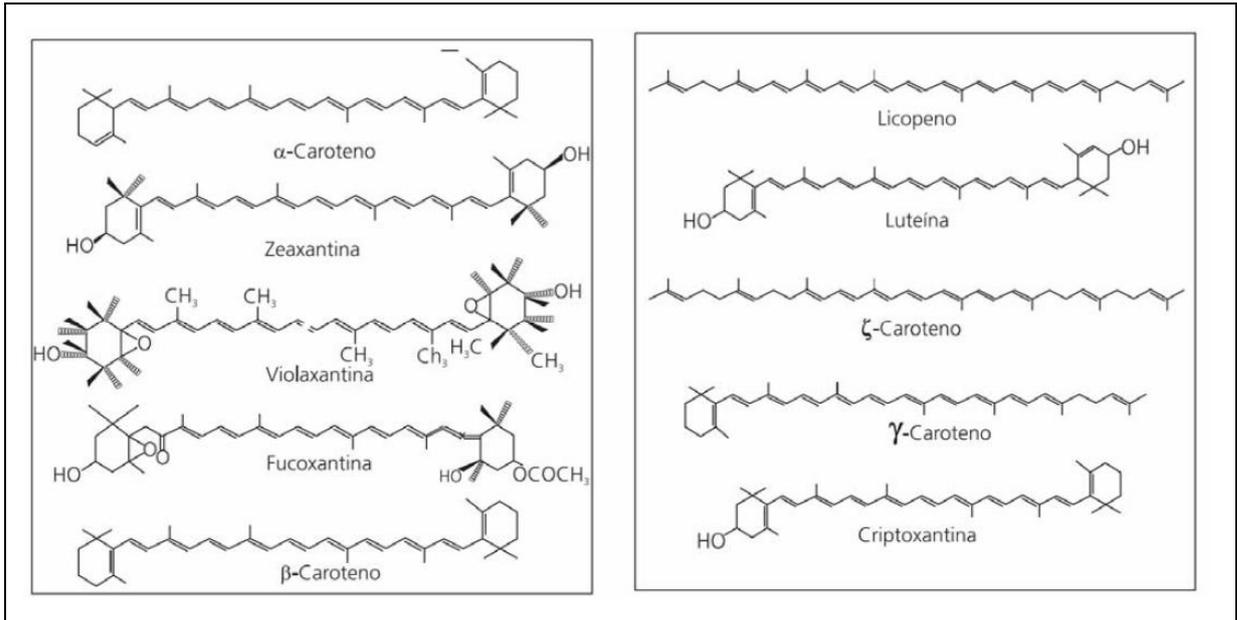


Figura 3. Estruturas químicas de alguns carotenóides

Fonte: Ambrósio, Campos e Faro (2006).

Os carotenóides são divididos em 2 classes principais; carotenos propriamente ditos, compostos por hidrocarbonetos, que são moléculas altamente apolares (licopeno e $\alpha\beta\gamma\zeta$ -carotenos) e as xantofilas, moléculas polares devido a presença de grupamentos oxigenados como hidroxilas, epóxi ou cetonas (luteína, astaxantina, cantaxantina, zeaxantina). Carotenóides compostos somente de carbono e hidrogênio são chamados de carotenos e os carotenóides oxidados, de xantofilas (FRASER; BRAMLEY, 2004; OLIVIER; PALOU, 2000; RODRIGUES-AMAYA, 1999).

Seus principais representantes são os carotenos, precursores da vitamina A e o licopeno (GAZZONI, 2003). As xantofilas são sintetizadas a partir dos carotenos, por meio de reações de hidroxilação e epoxidação. O β -caroteno e o licopeno são exemplos de carotenos, enquanto a luteína e a zeaxantina são xantofilas (AMBRÓSIO; CAMPOS; FARO, 2006). Segundo Stahl e Sies (2003) os carotenóides fazem parte do sistema de defesa antioxidante em humanos e animais. Devido à sua estrutura atuam protegendo as estruturas lipídicas da oxidação ou por seqüestro de radicais livres gerados no processo foto-oxidativo.

Os carotenóides compõem um dos grupos de pigmentos naturais mais extensamente encontrados na natureza, estão presentes em alimentos com pigmentação amarela, laranja ou vermelha (tomate, abóbora, pimentão, laranja, goiaba, melancia, cenoura, gema de ovo, lagosta e outros crustáceos, peixes, pássaros) (BRITTON, 1992; PINHEIRO-SANT'ANA et al., 1998). Entretanto, na acerola, a coloração amarela conferida pelos carotenóides é mascarada pela presença de antocianinas vermelhas (AGOSTINI-COSTA; ABREU;

ROSSETTI, 2003).

Com relação aos carotenóides, estes são em sua grande maioria termolábeis, e uma das maiores causas da perda da cor durante a estocagem é a oxidação dos mesmos, que é acelerada pela luz, temperatura e presença de catalisadores metálicos (SARANTÓPOULOS; OLIVEIRA; CANAVESI, 2001). Sua natureza insaturada os torna susceptíveis à isomerização e oxidação resultando em perda de cor, que é mais pronunciada, seguida de oxidação (ESKIN, 1990). Além dos fatores citados anteriormente, o tipo de matriz alimentícia, presença de enzimas, disponibilidade de água e presença de antioxidantes e/ou pró-oxidantes podem influenciar neste processo (BURTON, 1989; GOLDMAN; HOREV; SAGUY, 1983).

Os carotenóides são pigmentos naturais que têm despertado o interesse de pesquisadores de diversas áreas há mais de um século (TEE, 1992). Extensamente distribuídos na natureza, estão presentes em plantas, animais e microrganismos. Segundo alguns autores, não podem ser considerados apenas como mais um grupo de pigmentos, mas, como substâncias com propriedades muito especiais. Dentre as funções conhecidas dos carotenóides estão à absorção de luz, atividade antioxidante, atividade anticancerígena, transporte de oxigênio, atividade pró-vitáminica A, sendo esta última apresentada por apenas alguns destes compostos (BRITTON, 1995; OLSON, 1989; PASSOTTO; PENTEADO; MANCINI-FILHO, 1995; ROCK et al., 1996).

Dentre os carotenóides permitidos para o uso em alimentos no Brasil, os principais são β -caroteno, bixina e norbixina e o licopeno. Os carotenos são encontrados em plantas, especialmente na cenoura, tomate, folhagem verde dos vegetais, damasco, em rosas e laranjas, presentes também em produtos de origem animal como: ovos, lagostas e pescados diversos. O β -caroteno tem ponto de fusão 176 a 182 °C, é sensível ao calor, ar, luz e umidade. É insolúvel em água e álcool e pouco solúvel em gordura vegetal, e sua IDA não foi estabelecida ainda (MULTON, 1988). Provavelmente, a cenoura seja a matéria-prima mais utilizada para a extração do β -caroteno com gama enorme de aplicações, tanto na indústria farmacêutica como na de alimentos, como corantes na margarina, manteiga, queijos, carnes e macarrão (BARUFFALDI et al., 1983). De acordo com Silva (2004), outras aplicações dessas substâncias são: o uso como suplementos alimentares (atividade pró-vitáminica), na piscicultura, para pigmentação de crustáceos e peixes, como o salmão (JOHNSON; SCHROEDER, 1995), na dieta de galinhas poedeiras para melhorar a intensidade da pigmentação da gema do ovo (CARVALHO et al., 2006) e como corantes de alimentos e de ração. Para Oliveira e Junqueira (2006), a utilização de carotenóides como corante natural

para alimentos preencherá um quesito de valor na motivação do consumidor que é a sensação de cor dos alimentos

Uma fonte rica em carotenóides é a semente de urucum (*Bixa orellana*, L.). Desta semente são extraídos carotenóides (amarelo-alaranjado) bixina e norbixina (FRANCIS, 1996). A bixina em condições alcalinas pode sofrer saponificação e produzir o ácido dicarboxílico livre, denominado norbixina. Em excesso de alcali, o ácido dicarboxílico dissocia-se para formar um sal, geralmente de potássio ou sódio, solúvel em água que nas formas cis e trans apresentam coloração alaranjada (ARAÚJO, 1995). Para aplicações em produtos aquosos esta é a forma de pigmento normalmente empregada (COLLINS, 1992). A série de duplas ligações conjugadas é também a causa da suscetibilidade da bixina ao oxigênio, a luz e a temperatura (NAJAR et al., 1988), sendo que principal reação que ocorre é a oxidação, particularmente importante quando o pigmento é adicionado em matriz alimentícia. A velocidade em que ocorre a perda de cor devido à oxidação depende da temperatura, da luminosidade e principalmente da disponibilidade de oxigênio no meio (COLLINS, 1992). Quando comparado com outros grupos de corantes naturais, a bixina e a norbixina são considerados mais estáveis. A bixina é sensível às variações de pH, tendo a coloração alterada do amarelo alaranjado para o rosa fraco. Entretanto, em pH reduzido apresenta estabilidade térmica satisfatória em temperaturas abaixo de 100 °C (ARAÚJO, 1995). O extrato lipossolúvel do urucum foi um dos primeiros corantes a ser usado em margarina e manteiga. O corante hidrossolúvel tem sido por sua vez, tradicionalmente empregado em queijos, como o queijo prato. Apresenta aplicação também em produtos cárneos como salsichas, peixes defumados e, quando na forma em pó, em bebidas instantâneas e misturas secas (LEVY; RIVADENEIRA, 2000).

O licopeno é outro carotenóide utilizado como corante natural e antioxidante, ele é extraído principalmente do tomate, e confere coloração vermelha aos alimentos. O ponto de fusão do licopeno é em torno de 172-173 °C, sendo solúvel em clorofórmio e benzeno e praticamente insolúvel em metanol e etanol. Os principais produtos corados por licopeno são: cereais, aperitivos, confeitos, coberturas, sobremesas, lácteos aromatizados, massas, molhos, queijos, recheios, refrescos e refrigerantes, sucos de frutas, xaropes para refrescos (MULTON, 1988).

Cabe ressaltar também, a importância do uso de carotenóides como suplementos na alimentação de aves de companhia, uma vez que a plumagem de aves é afetada. A adição de corantes naturais em rações e os efeitos sobre a plumagem dos animais estão bem relatos na literatura. A lipossolubilidade desses compostos é fator determinante para a absorção eficiente

pelos animais, porém a instabilidade dos corantes naturais frente aos artificiais ainda é uma desvantagem e um desafio (MCGRAW; HILL, 2000; SENAR; ESCOBAR, 2002; MCGRAW et al., 2004; PIKE et al., 2009).

Dentre a classe de corantes que merece maior destaque em relação à coloração da plumagem de aves aparecem os carotenóides. São estas substâncias que conferem a cor às penas das aves. Os pigmentos carotenóides podem conferir desde tons de vermelho claro, laranja, amarelo, verde, violeta a roxo. Os animais não são capazes de sintetizar essa substância, portanto é através de sua dieta que obtém os substratos que serão modificados por enzimas até tornarem-se as substâncias capazes de serem absorvidas pelas penas dentre as principais substâncias estão: astaxantina, canxantina, robexantina, carotenos cíclicos, xantofilas, entre outros (SEIXAS; SEIXAS, 2001).

Em pássaros os oxicarotenóides são absorvidos preferencialmente, sendo que a maioria das colorações brilhosas e expressivas das plumagens é devida a esses compostos. Pássaros são geralmente animais de hábitos diurnos e dependem muito da comunicação visual, logo os padrões e as cores da plumagem e conseqüentemente os carotenóides possuem um papel importante na biologia aviária (HUDON et al., 2007).

McGraw et al. (2003) observaram que todas as espécies de pássaros cantadores avaliados em seu estudo usaram somente luteína (carotenóide) para o incremento da coloração amarela em sua plumagem. Muitos animais, particularmente os pássaros e peixes usam pigmentos carotenóides para desenvolver plumagens vermelhas, laranja ou amarelas para atrair os machos para (HILL, 1999; MOLLER et al., 2000; OLSON; OWENS, 1998). Para desenvolver suas cores sexuais, os animais devem adquirir estes pigmentos da dieta e entregá-los aos tecidos periféricos tais como penas e pele para a pigmentação (HILL, 1996, 2000; MCGRAW et al., 2003).

(a.3) Clorofila

As clorofilas são moléculas formadas por complexos derivados da porfirina, tendo como átomo central o magnésio (Mg). Esse composto é uma estrutura macrocíclica assimétrica totalmente insaturada constituída por quatro anéis de pirrol (SCHOEFS, 2002). As clorofilas *a* e *b* diferem-se nos substituintes de carbono C-3. Na clorofila *a*, o anel de porfirina contém um grupo metil (-CH₃) e a clorofila *b* (considerada um pigmento acessório) contém um grupo aldeído (-CHO). A estabilidade da clorofila *b* deve-se ao efeito atrativo de elétrons de seu grupo aldeído no C-3 (VON ELBE, 2000). A clorofila *a* apresenta uma cor azul-

esverdeada em solução, enquanto a clorofila *b* uma cor amarelo-esverdeada. Esta diferença pode ser quantificada por três métodos: espectrofotometria, fluorimetria e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (BARROSO, 1998).

A estrutura genérica e os substituintes para formação da clorofila *a* e *b* estão apresentados na Figura 4

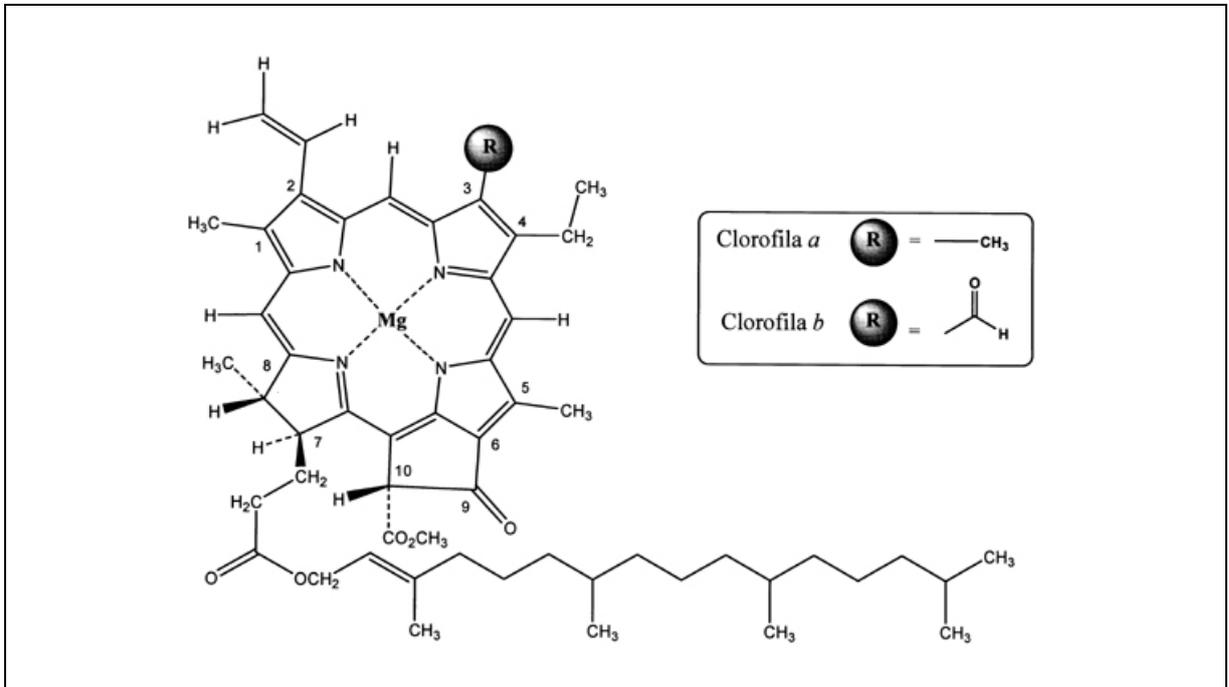


Figura 4. Estrutura genérica para as clorofilas
Fonte: Streit et al. (2005).

A clorofila *b*, os carotenóides e as ficobilinas constituem os chamados pigmentos acessórios. A energia absorvida pelos pigmentos é transferida para sítios bem definidos, localizados sobre as membranas tilacóides, os chamados centros de reação. Há dois centros de reação, um deles absorvendo em 680 nm e outro em 700 nm, os quais interagem entre si através de transportadores de elétrons (KLUGE, 2004).

As clorofilas são pigmentos verdes encontrados em legumes e em várias frutas. Devido a sua cor e as propriedades físico-químicas, são usadas como aditivos para produtos alimentícios, e são os únicos corantes naturais verdes permitidos para o uso em alimentos. Estes pigmentos são quimicamente instáveis e podem ser alterados ou destruídos facilmente, modificando a percepção e a qualidade dos produtos (SCHOEFS, 2002).

É importante ressaltar que as opções naturais de corantes começam a ganhar mais mercado com a proibição crescente aos corantes sintéticos para alimentos. A clorofila, utilizada de modo esporádico no Brasil, é importada de fábricas de grupos na Europa, de onde

é extraída da alfafa (FURTADO, 2004).

A clorofila é insolúvel em água, mas mediante tratamento com ácido pode-se produzir a clorofilina, a qual é solúvel em água. Em geral, tanto as clorofilas quanto a clorofilina são relativamente instáveis e sensíveis à luz, aquecimento, oxigênio e a degradação química, devido a este motivo, a clorofila sofre alteração na sua molécula, substituindo o átomo de magnésio por cobre, originando a chamada clorofilina cúprica, a qual é estável e pode ser utilizada em formulação hidro ou lipossolúvel (FURTADO, 2004; MULTON, 1988).

O fenômeno de reverdescimento foi primeiramente observado em 1943, ao acaso, por Fischbach, neste processo ocorre à formação de complexos espontâneos entre átomos metálicos e a clorofila durante o processamento. Esse fenômeno então foi atribuído à formação de um complexo com zinco ou com cobre que possuía uma cor verde brilhante e estável. Essa descoberta revolucionou o desenvolvimento tecnológico dos corantes naturais, que resultou na aprovação em alguns países, de dois corantes comerciais, conhecidos por clorofila e clorofilina cúpricas, na forma de sal de sódio, potássio, ou de amônio. O cobre forma complexos mais rapidamente do que o zinco, mas o uso de complexos com zinco é preferível devido à natureza tóxica dos íons cobre (Cu^{2+}) (LABORDE; VON ELBE, 1994).

No Brasil, os produtos industrializados clorofila-Mg (E 140) e clorofila-Cu (E 141) são permitidos como aditivos de alimentos, embora a substância E 141 tenha se mostrado mais estável do que a substância E 140, levando em consideração a exposição à luz, oxigênio, temperatura, bissulfito de sódio, peróxido de benzoila e ácidos (EDER, 1996).

A clorofila pura não é fácil de ser extraída, sendo que a clorofila comercialmente disponível contém outros pigmentos, ácidos gordurosos e fosfatos, sendo conhecida como clorofila técnica. As fontes usuais de obtenção são: alfafa, grama e urtiga. Os principais produtos alimentícios corados com clorofila são: cereais, aperitivos, confeitos, coberturas, sobremesas, lácteos aromatizados, massas, molhos, queijos, recheios, refrescos e refrigerantes, sucos de frutas, xaropes para refrescos (MULTON, 1988).

As principais alterações de cor das clorofilas no processamento dos alimentos estão relacionadas à perda de cor durante o armazenamento sob congelamento pela feofitinação e a remoção da cadeia fitol, conduzindo à formação de clorofilida ou feoforbídeo (STREIT et al., 2005).

Na feofitinação, o átomo de magnésio do centro da molécula de clorofila é substituído por dois átomos de hidrogênio, esta reação provoca desvanecimento da cor verde vívida da clorofila *a*, em uma marrom azeitona, característica da feofitina. Durante o processamento térmico, a principal via de degradação é a feofitinação, além de poder

ocorrer também uma epimerização. As feofitinas estão sujeitas a hidrólise química, que resulta na liberação da molécula do fitol, produzindo um feoforbídeo hidrossolúvel (HEATON; LENCKY; MARANGONI, 1996; SCHWARTZ, LORENZO, 1991; TENG, CHENG, 1999). Esta reação é considerada o mecanismo mais importante de destruição de clorofila durante o processamento de alimento. Além disso, a precipitação de proteínas que ocorrem no armazenamento sob congelamento, provocam a diminuição do pH, ampliando as taxas de reações de catálises ácidas, como a feofitinação (MARTINS; SILVA, 2002).

Outro fator que contribui para a decomposição das clorofilas é o pH, em pH ácido (3,0) as clorofilas são mais instáveis, já em pH básico (9,0) ela se torna mais estável ao calor (VON ELBE, 2000). Porém em um estudo realizado por Ferruzzi, Failla e Schwartz, (2001), foi observado uma feofitinação muito reduzida em pH 4,0 e em pH 6,0, logo a clorofila se mostrou estável durante 1 hora de incubação a 37 C.

A desidratação de vegetais, usados com frequência como ingredientes em sopas instantâneas, condimentos e outros alimentos secos, costuma levar a uma perda da clorofila e concomitante aumento na concentração de feofitinas. Esta mudança de coloração aumenta com a temperatura empregada, sendo acompanhada por um decréscimo do pH natural do vegetal pela liberação de ácidos orgânicos celulares, criando as condições favoráveis para a feofitinação. Contudo, alguns tratamentos prévios podem reter maior quantidade do pigmento (HEATON; MARANGONI, 1996; MINGUEZ-MOSQUERA; GARRIDO-FERNANDEZ; GANDUL-ROJAS, 1989). Porém, a perda da cor observada posteriormente ao processamento, durante o armazenamento, independente do pH, tem sido atribuída a outras vias de degradação (MAHARAJ, SANKAT, 1996).

As principais vias de degradação das clorofilas estão apresentadas nas Figuras 5a e 5b

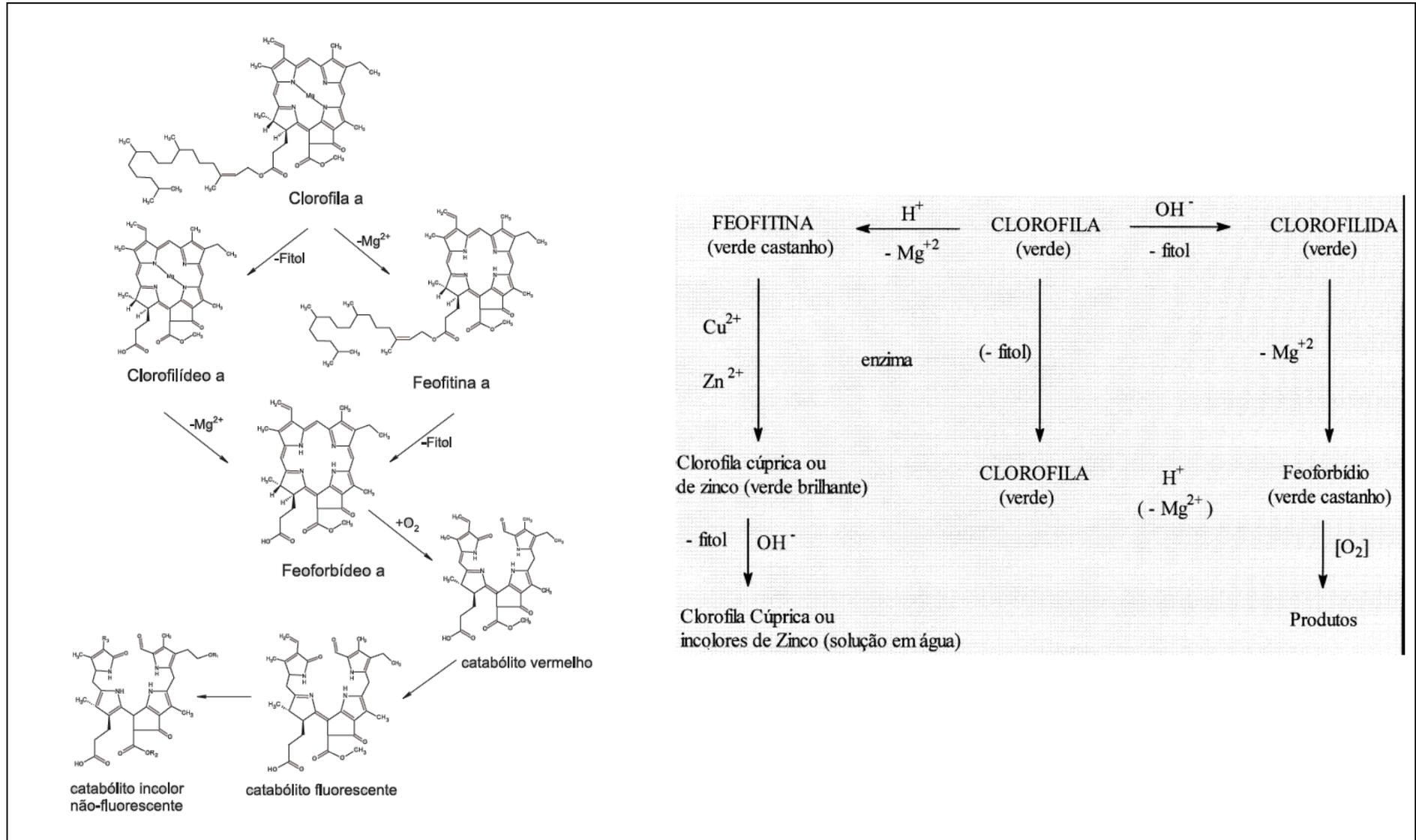


Figura 5. Principais vias de degradação das clorofilas, compostos formados e respectivas colorações
 Fonte: (a) Lanfer-Marques (2003) e (b) Bobbio (1995 apud STREIT et al., 2005).

(a.4) Vermelho beterraba

As betalaínas são substâncias N-heterocíclicos solúveis em água. Seu precursor comum é o ácido betalâmico. Na natureza foram identificadas mais de cinqüenta estruturas (CAI; SUN; CORKE, 2005; SCHOEFS, 2004). As betalaínas não pertencem ao grupo dos alcalóides, pois na natureza se apresentam na forma ácida devido à presença de vários grupos carboxilas (DELGADO-VARGAS; JIMÉNEZ; PAREDES-LÓPEZ, 2000).

Quimicamente, as betalaínas são definidas por uma estrutura que engloba todos os componentes que apresentam uma fórmula geral (Figura 6). A estrutura geral das betalaínas contém o ácido betalâmico acompanhado de um radical R1 ou R2. Estes radicais são uma representação geral para os possíveis substituintes desse ponto da estrutura, que podem ser de um simples hidrogênio a um complexo substituinte. A variação desses grupos é em função das diferentes fontes de onde podem ser obtidos esses pigmentos e determinam sua tonalidade e estabilidade. Desta forma, as betalaínas podem ser divididas em dois grupos estruturais: as betacianinas (vermelho ao vermelho violeta) e as betaxantinas (amarelo) (CAI; SUN; CORKE, 2005; SCHOEFS, 2004).

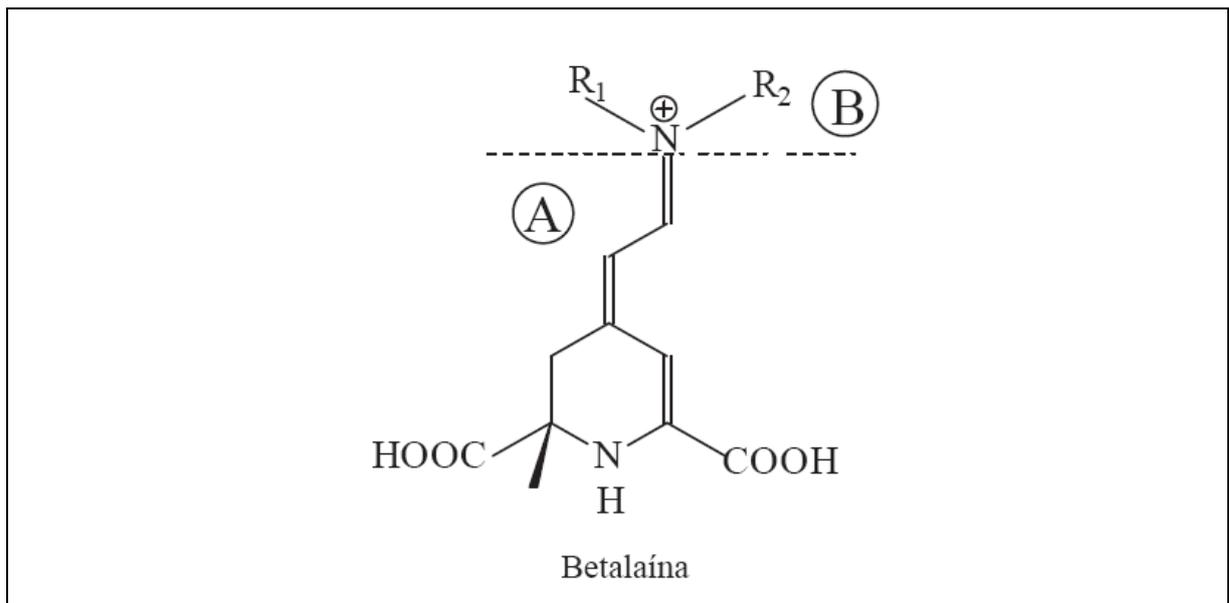


Figura 6. Estrutura geral da betalaína: (A) molécula de ácido betalâmico, (B) estrutura que R1 e R2

Fonte: Delgado-Vargas, Jiménez e Paredes-López, (2000).

As betalaínas são divididas em dois grupos estruturais: as betaxantinas, responsáveis pela coloração amarela, e as betacianinas, que imprimem colorações vermelhas e arroxeadas (BÖHM; RINK, 1988 apud DELGADO-VARGAS; JIMÉNEZ; PAREDES-LÓPEZ, 2000).

Essas substâncias associadas podem produzir coloração vermelha, amarela, rosa e laranja em flores e frutas, sendo que a beterraba constitui a principal fonte deste pigmento (PIATELLI; IMPERATO, 1969).

As betacianinas podem ser classificadas por sua estrutura química em quatro tipos: betanina, amarantina, gonferina e bougainvilina. Até o momento são descritos aproximadamente 50 tipos de betacianinas e 20 tipos de betaxantinas. Na beterraba vermelha (*Beta vulgaris* L.) são encontradas betalaínas tanto da classe das betacianinas, quanto das betaxantinas 5. Dentre as principais betacianinas destacam-se a betanina e seu diastereoisômero isobetanina. Já na classe das betaxantinas as principais substâncias são vulgoxantina I e II (JACKMAN; SMITH, 1992; MEGARD, 1993; STRACK, VOGT; SCHLIEMANN, 2003). A Figura 7 apresenta as principais betalaínas da beterraba vermelha (*Beta vulgaris* L.)

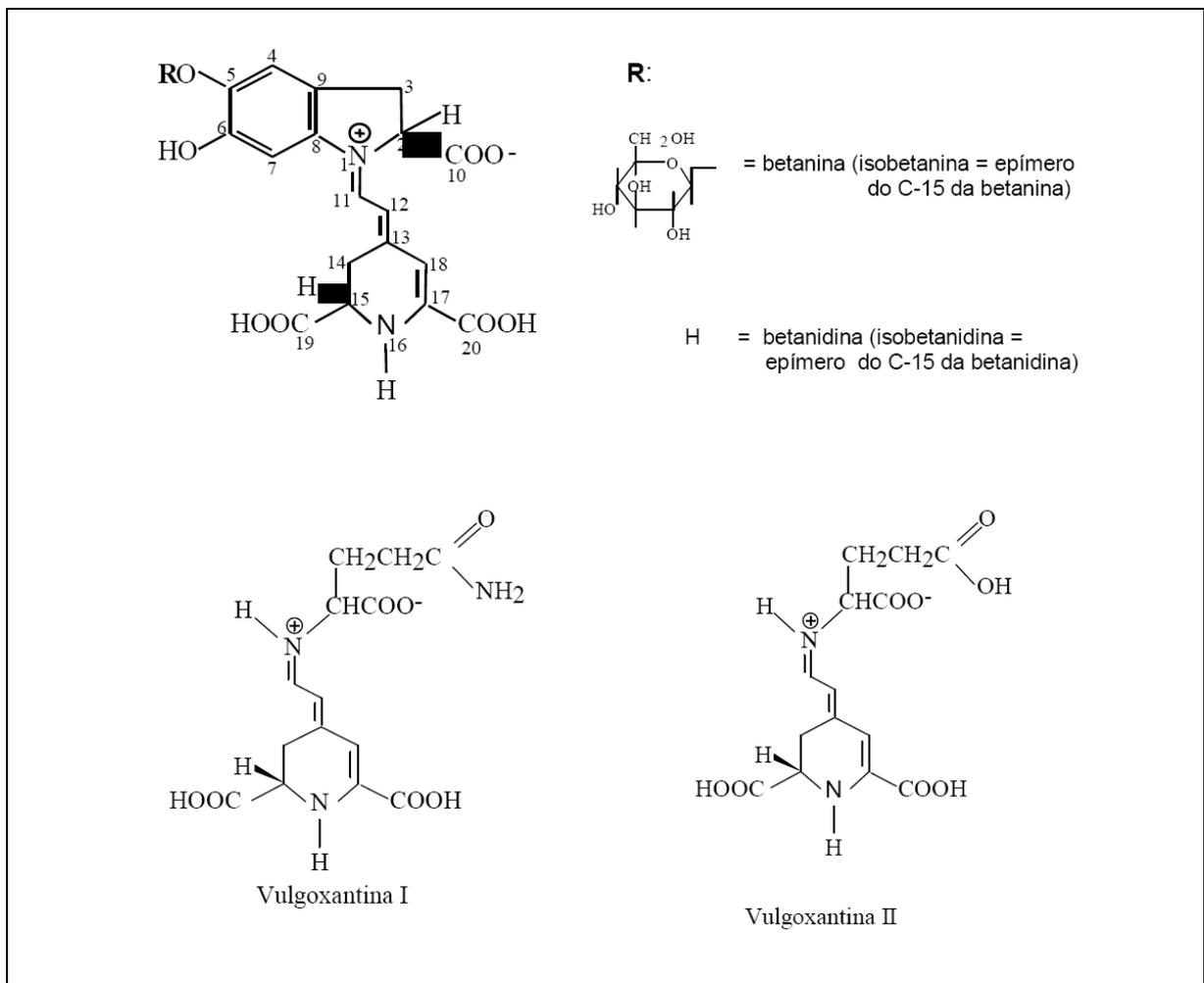


Figura 7. Principais estruturas químicas das betacianinas e betaxantinas encontradas na beterraba vermelha

Fonte: Adaptado de Jackman e Smith (1992 apud DRUNKLER; FETT; BORDIGNON-LUIZ, 2006).

Observa-se na ilustração anterior que a betanidina é a unidade estrutural básica da maioria das betacianinas (PIATELLI; MINALE, 1964). Porém um considerável número de diferentes betacianinas pode ser obtido com a glicosilação de um dos grupos hidroxil localizados nas posições 5 e 6 da Figura 7.

Alguns trabalhos têm sido publicados a respeito do papel fisiológico das betalaínas nos mamíferos. Os primeiros estudos já indicavam que a beterraba vermelha, principal fonte desta substância, não exercia ação hepatotóxica ou mutagênica, mas por outro lado, as raízes de beterraba apresentavam um significativo efeito inibitório no câncer de pele e de pulmão em ratos. Em estudo investigando a relação estrutura-atividade de várias betaxantinas e betacianinas com sua atividade sobre radicais livres, observou-se uma relação com a estrutura das betalaínas. Desta forma, recentes estudos já mostram a beterraba como um dos dez mais potentes antioxidantes. Este potencial antioxidante foi atribuído a características estruturais das betalaínas. Além disso, as betaninas (em forma de extratos da beterraba) demonstraram atuar também na prevenção de alguns tipos de câncer, dentre eles os cânceres de pele e fígado, devido suas propriedades antioxidantes. Outras propriedades funcionais das betalaínas incluem atividades antivirais e antimicrobianas (LILA, 2004).

A cor das betalaínas não é afetada em valores de pH entre 3,5 e 7, sendo mais estável em pH entre 4,0 e 6,0 (MULTON, 1988). Soluções de betalaína nesta faixa de pH são similarmente visíveis tanto para betacianinas quanto para betaxantinas. O comprimento de onda de máxima absorbância para betacianinas está entre 537 e 538 nm, e para as betaxantinas está entre 475 e 477 nm (VON ELBE, 1977). Huang e Von Elbe (1987) observaram que o pH ótimo para a máxima estabilidade da betanina na presença de oxigênio está entre 5,5 e 5,8. Já no estudo realizado por 10, a estabilidade da betanina depende do pH (excelente estabilidade entre pH 4 e 5 e razoável entre pH 3 e 4 e pH 5 e 7).

Foi demonstrado que a termoestabilidade de soluções de betanina é dependente do pH e parcialmente reversível. Para Multon (1988), a termoestabilidade é maior entre pH 4,0 e 5,0. Tanto a luz quanto o ar tem efeito degradativo sobre a betanina e, esse efeito é cumulativo. Von Elbe, Maing e Amundson (1974) observaram que o aquecimento de soluções de betanina produz uma redução gradual da cor vermelha e o eventual surgimento de coloração marrom.

Além da temperatura e do pH, a presença de luz e oxigênio desestabiliza as moléculas das betalaínas (CONSTANT; STRINGUETA; SANDI, 2002). A taxa de degradação da betanina aumenta 15,6 % após o pigmento ser exposto à luz do dia a 15 °C. Também se observou que a degradação devido à exposição à luz foi maior a pH 3,0 do que a

pH 5,0 (VON ELBE; MAING; AMUNDSON, 1974). Embora vários autores estudem o processo de degradação das betalaínas pela ação da luz, os mecanismos de fotodegradação ainda não são conhecidos.

A atividade de água (a_w) constitui um dos fatores primários que afetam a estabilidade das betalaínas e a cor dos produtos que contêm estes pigmentos (VON ELBE, 1987 apud DELGADO-VARGAS; JIMÉNEZ; PAREDES-LÓPEZ, 2000). Simon et al. (1993) verificaram em seu estudo que quanto menor a atividade de água maior a estabilidade desses pigmentos. O aumento na estabilidade das betaninas com o decréscimo da atividade de água pode ser atribuído à reduzida mobilidade de reagentes ou limitada solubilidade de oxigênio. Conseqüentemente, umidades elevadas acarretam altas taxas de degradação. Além disso, a especificação da atividade de água somente, sem a umidade, não é suficiente para prever a estabilidade do pigmento.

Outro fator que torna as betalaínas instáveis é a presença de oxigênio. Em estudos realizados por Von Elbe, Maing e Amundson (1974), soluções de betanina foram armazenadas a pH 7,0 sob atmosfera de ar e nitrogênio por 6 dias a 15 °C. Observou-se que a degradação da cor aumenta 15 % na presença de ar. Muitos métodos têm sido pesquisados para prevenir a destruição ou aumentar a estabilidade dos pigmentos, incluindo adição de antioxidantes e estabilizantes, tratamentos com aquecimento mínimo e controle de pH, todos direcionados para a aplicação de betalaínas em produtos alimentícios (ATTOE; VON ELBE, 1981; BILYK, A.; KOLODIJ; SAPERS, 1981; HAN; KIM, S. J.; KIM, D. M, 1998; PASCH; VON ELBE, 1979).

Atualmente a beterraba representa a principal fonte comercial da betalaína (concentrado ou pó), dentre as desvantagens do uso desta substância como aditivo está a influência do cheiro de terra devido a presença da substância geosmim, além da presença de várias pirazinas que conferem outras características indesejáveis, limitando seu uso em produtos lácteos e preparados de frutas (STINTZING; CARLE, 2004).

Em contrapartida, as betalaínas possuem uma grande aplicabilidade em alimentos como em gelatinas, sobremesas, produtos de confeitaria, cereais, aperitivos, coberturas, lácteos aromatizados, massas, molhos, queijos, recheios, refrescos e refrigerantes, sucos de frutas, xaropes para refrescos, misturas secas, produtos avícolas, e produtos cárneos (DELGADO-VARGAS; JIMÉNEZ; PAREDES-LÓPEZ, 2000; MULTON, 1988).

Entretanto quando as betalaínas são utilizadas como corantes alimentícios, a estabilidade da cor, é o principal aspecto ser considerado (CONSTANT, STRINGUETA; SANDI, 2002; DRUNKLER; FETT; LUIZ, 2003; STINTZING; CARLE, 2004). Como visto

anteriormente, existem muitos fatores que reconhecidamente afetam a estabilidade destes pigmentos, tais como: pH, temperatura, luz, atividade de água, presença de oxigênio e metais, esses fatores que afetam sua estabilidade restringem seu uso (ATTOE; VON ELBE, 1985; CZAPSKI, 1990; DRDÁK et al., 1990; PÁTKAI; BARTA, 1996; SALGADO, 1997).

No Brasil, o corante natural vermelho de beterraba é de uso permitido em alimentos e bebidas (BRASIL, 2005). Em relação à segurança de uso, não foram estipulados valores máximos de consumo, ou seja, as betalaínas não possuem IDA estabelecida, desta forma, essas substâncias são consideradas seguras para o uso como corantes alimentares representando uma alternativa natural segura na substituição de corantes sintéticos (DELGADO-VARGAS; JIMÉNEZ; PAREDES-LÓPEZ, 2000; DOWNHAM; COLLINS, 2000; MASCARENHAS, 1998).

A substituição dos pigmentos sintéticos, usados em alimentos, por pigmentos naturais é um importante passo para produzir alimentos mais saudáveis. A utilização de corantes naturais na alimentação de animais ainda é um desafio no que diz respeito a sua inclusão em alimentos completos, uma vez que as rações extrusadas ou peletizadas passam por processos térmicos a altas temperaturas e pressão o que provoca alterações nas cores e propriedades dos pigmentos naturais. Por outro lado, a lipossolubilidade de corantes naturais poderia ser uma alternativa para a incorporação destes na etapa de engorduramento dos alimentos já processados (SIMÃO et al. 2009).

Outra classe de corante que tem sido incorporada em alimentos destinados à alimentação de pássaros são os corantes orgânicos sintéticos, tema esse abordado no tópico a seguir.

(b) Corante orgânico sintético

Os corantes orgânicos sintéticos são aqueles obtidos por síntese orgânica mediante o emprego de processos tecnológicos adequados e não encontrados em produtos naturais, sendo dividido em dois grupos: idênticos aos naturais e artificiais.

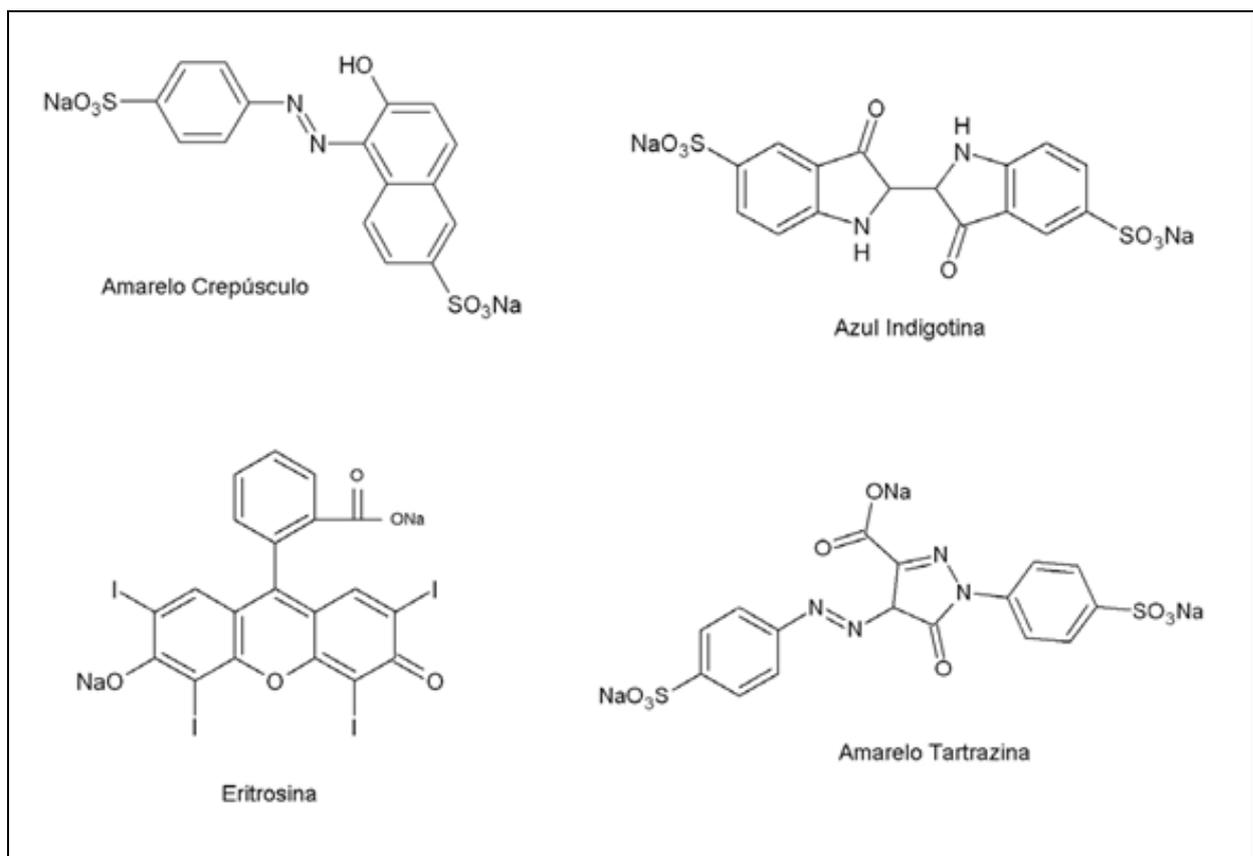
(b.1) Idêntico ao natural

São substâncias sintéticas, cuja estrutura química corresponde as dos corantes naturais correspondentes, apresentando características de identidade e pureza apropriada ao seu emprego para fins alimentares (BRASIL, 2004). Os corantes sintéticos apresentam

algumas vantagens em relação aos naturais. Muitos dos corantes naturais são sensíveis a luz, ao calor, ao oxigênio ou a ação das bactérias. Conseqüentemente, não são estáveis. Os sintéticos, mais estáveis, têm durabilidade maior e propiciam cores mais intensas. Também são utilizados em menores quantidades e muitas vezes são menos onerosos que os corantes naturais. Dentre os principais exemplos dessa classe tem-se: β -caroteno; β -apo-8'-carotenal; éster etílico ou metílico do ácido β -apo-8'-carotenóico; riboflavina; xantofilas (cantaxantina, criptoxantina, flavoxantina, luteína, rodoxantina, rubixantina, violoxantina). Essas substâncias conferem aos alimentos colorações amarelo e laranja de várias tonalidades diferentes (CARVALHO, 2004).

(b.2) Artificial

Os corantes artificiais são substâncias sintéticas, cuja estrutura química não corresponde a dos corantes naturais, apresentando características de identidade e pureza apropriada ao seu emprego para fins alimentares. No Brasil, 11 corantes são admitidos para o uso em alimentos. Na Figura 8 são apresentadas as estruturas químicas dos corantes artificiais permitidos para a utilização em alimentos no Brasil.



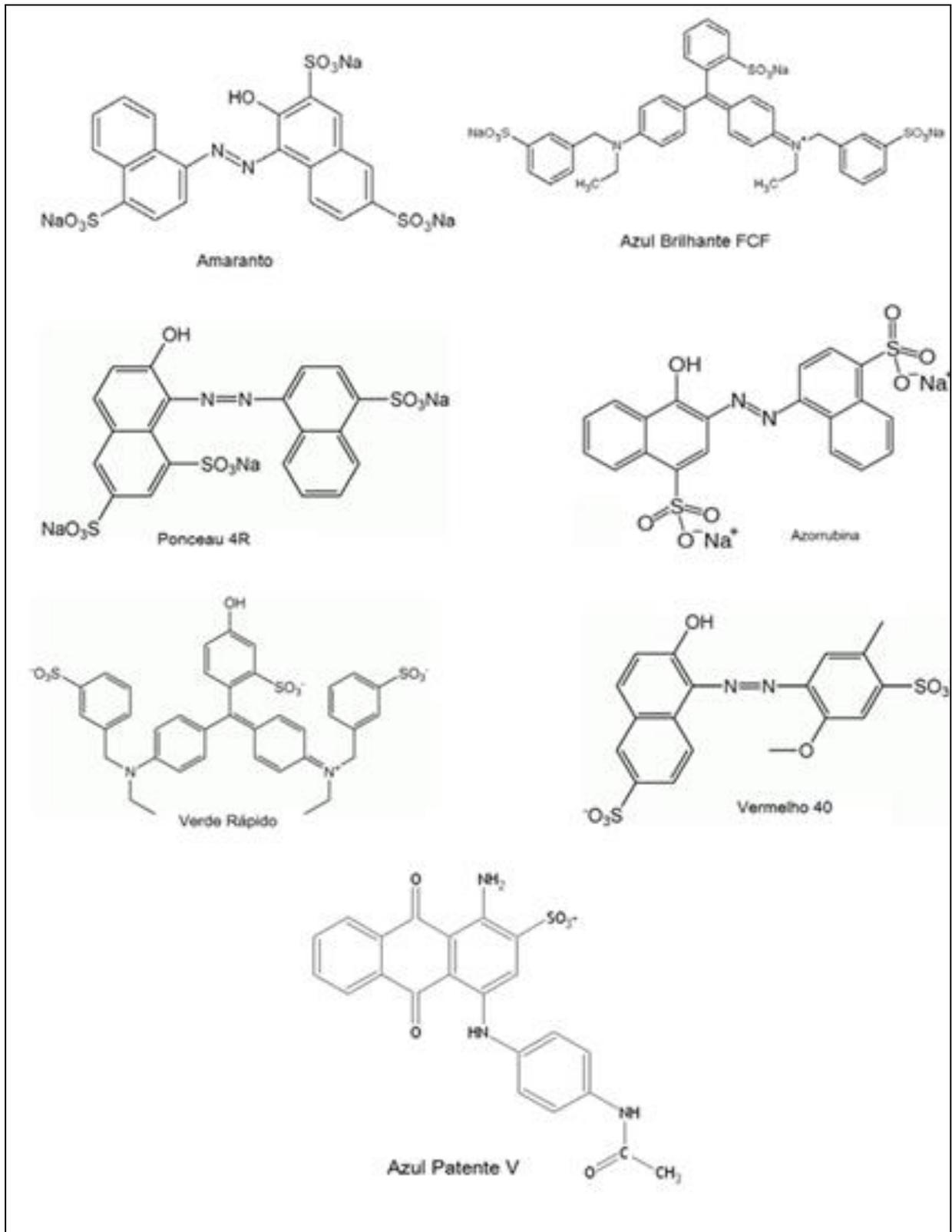


Figura 8. Estrutura química dos principais corantes utilizados em alimentos
 Fonte: Adaptado de Marmitt, Pirotta e Stülz (2010) e Prado e Godoy (2003).

Os corantes permitidos para uso em alimentos e rações no Brasil são 11, e estão divididos em quatro classes: monoazo, trifenilmetanos, indigóides e xantenos. A seguir cada

um destes corantes será abordado sucintamente.

(b.2.1) Monoazo

O corante **amarelo crepúsculo FCF** (E 110) é sintetizado a partir da tinta do alcatrão de carvão e tintas azóicas (derivadas do petróleo). Possui boa estabilidade na presença de luz, calor e ácido, apresentando descoloração na presença de ácido ascórbico e dióxido de enxofre. Este corante é pouco solúvel em etanol e insolúvel em azeites, estável até 130 °C, em meio alcalino apresenta coloração vermelha. Propicia cor amarela e dentre suas principais aplicações está o uso em produtos como: cereais, aperitivos, confeitos, cereja em calda, coberturas, sobremesas, lácteos aromatizados, massas, molhos, queijos, recheios, revestimentos, refrescos e refrigerantes, sucos de frutas, xaropes para refrescos (MULTON, 1988). Os Estados Unidos, Japão e países da União Européia permitem seu emprego em alimentos, já o Canadá permite seu emprego em alguns produtos específicos (BERDICK, 1982; DOWNHAM; COLLINS, 2000).

A função do corante **amaranto ou bourdeaux S** (E 123) é propiciar coloração vermelha aos alimentos. Também é um derivado do alcatrão da hulha, é solúvel em água e pouco solúvel em álcool, em meio ácido a intensidade da cor é alterada. Este corante possui boa estabilidade à luz, calor e ácido, mas descolore em presença de agentes redutores como o ácido ascórbico e dióxido de enxofre (MULTON, 1988).

Quanto à segurança deste corante, os estudos são contraditórios. Em se tratado da inocuidade carcinogênica deste corante, sendo, por medida de segurança, proibido nos Estados Unidos desde 1976. No Canadá é permitido, pois sua estrutura química é bastante semelhante a outros corantes considerados não carcinogênicos. Na Inglaterra seu uso é permitido em caráter provisório até que se apresentem estudos mais conclusivos. No Japão foi voluntariamente banido pelas indústrias de alimentos e na União Européia assim como no Brasil, seu uso é permitido (BERDICK, 1982; DOWNHAM; COLLINS, 2000).

Também sintetizado a partir do alcatrão do carvão, o corante **ponceau 4R** (E 124) possui coloração vermelha, e apresenta boa estabilidade ao calor, à luz e ao ácido, descolore parcialmente na presença de alguns agentes redutores como o ácido ascórbico e dióxido de enxofre. Não é permitido nos Estados Unidos, na Inglaterra seu uso é provisório e restrito, nos países da UE (União Européia) e no Japão seu uso é permitido, mas foi voluntariamente banido pelos industriais japoneses. Isso se deve aos poucos estudos relevantes realizados sobre sua toxicidade (BERDICK, 1982; DOWNHAM; COLLINS, 2000).

O corante **tartrazina** (E 102) é sintetizado a partir do alcatrão do carvão e confere a coloração amarela a alimentos como: cereais, aperitivos, confeitos, cereja em calda, coberturas, sobremesas, lácteos aromatizados, massas, molhos, queijos, recheios, revestimentos, refrescos e refrigerantes, sucos de frutas, xaropes para refrescos. A tartrazina é pouco solúvel em etanol, solúvel em água, porém em meio alcalino apresenta coloração vermelha. Além disso, possui excelente estabilidade à luz, calor e ácido, sendo descolorido na presença de ácido ascórbico e dióxido de enxofre. Dentre os corantes azos, a tartrazina tem despertado uma maior atenção dos toxicologistas e alergistas (CROCE, 1965; DOWNHAM; COLLINS, 2000), sendo apontada como a responsável por várias reações adversas, causando desde urticária até asma. Estima-se que uma em cada 10 mil pessoas apresenta reações a esse corante (BERDICK, 1982). Provavelmente, de 8 a 20% dos consumidores sensíveis à aspirina, são também sensíveis a tartrazina. Entretanto, é um dos corantes mais empregados em alimentos e é permitido em muitos países, como Canadá, Estados Unidos e União Européia (BERDICK, 1982; DOWNHAM; COLLINS, 2000).

O corante **vermelho 40** (E 129) também é sintetizado quimicamente e é utilizado para conferir coloração vermelha principalmente em bebidas, doces, sobremesas, alimentos para animais de companhia. Este corante apresenta boa estabilidade à luz, calor e ácido, além de ser o corante vermelho mais estável para bebidas na presença do ácido ascórbico. Estudos metabólicos mostraram que o vermelho 40 é pouco absorvido pelo organismo e em estudos de mutagenicidade não apresentou potencial carcinogênico, desta forma tendo seu uso é liberado para alimentos no Canadá e Estados Unidos (DOWNHAM; COLLINS, 2000; IFT, 1986).

Países da UE permitem seu uso. Lymphomas (tumores da linfa) Proibido na CEE (a comunidade económica europeia)

A **azorrubina** (E 122) possui boa estabilidade à luz, calor e ácido. Sua principal utilização se refere à coloração de doces e sobremesas que passam pelo processo de cocção. Seu uso é liberado para alimentos nos países da UE, porém é proibido nos Estados Unidos. Mesmo com seu uso liberado necessita de estudos adicionais sobre o seu metabolismo. (DOWNHAM; COLLINS, 2000; MARMION, 1977; MARMION, 1991; VETORAZZI, 1981).

(b.2.2) Trifenilmetanos

O **azul brilhante** (E 133) é um corante amplamente utilizado na indústria de alimentos tanto para conferir coloração azul como verde (combinação com tartrazina) em

alimentos. Possui razoável estabilidade à luz, calor e ácido, mas possui baixa estabilidade oxidativa. Os corantes da classe do trifenilmetanos possuem em sua estrutura química, três radicais arila, em geral grupos fenólicos, ligados a um átomo de carbono central e apresentam, ainda, grupos sulfônicos que lhes conferem alta solubilidade em água. Seu uso é incondicional nos Estados Unidos, no Canadá seu limite máximo é de 100 ppm, na Inglaterra pode ser utilizado apenas em alguns alimentos e na União Europeia seu uso é liberado (BERDICK, 1982; CLYDESDALE, 1993). No Brasil, a partir da legislação das normas do MERCOSUL, passam a integrar esse grupo além do azul brilhante, o verde rápido e o azul patente V e azorrubina.

O **azul patente V** (E 131), possui excelente estabilidade à luz, ácido e calor, mas apresenta descoloração na presença de ácido ascórbico. Seu uso não é permitido nos Estados Unidos, porém é liberado para uso em alimentos nos países da UE. É um dos corantes utilizados em alimentos que também apresenta a necessidade de mais estudos sobre seu metabolismo (DOWNHAM; COLLINS, 2000; MARMION, 1977; MARMION, 1991; VETORAZZI, 1981). Já o **verde rápido** (E 143) possui razoável estabilidade à luz, calor e ácido, mas possui baixa estabilidade oxidativa. Seu uso é permitido nos Estados Unidos desde 1927, mas proibido nos países da EU, por existirem estudos que associam o câncer de bexiga com o consumo deste corante (DOWNHAM; COLLINS, 2000; MARMION, 1977; MARMION, 1991; VETORAZZI, 1981).

(b.2.3) Xantenos

O único corante artificial da classe dos xantenos permitido para o uso em alimentos no Brasil é a **eritrosina** (E 127). Este corante possui coloração vermelha, variando para o rosa, é solúvel em água e álcool, em meio ácido apresenta coloração amarela. Em pHs abaixo de 5 se torna insolúvel (MULTON, 1988). É também permitido nos Estados Unidos, países da UE, Reino Unido e Canadá (BERDICK, 1982; DOWNHAM; COLLINS, 2000). Existem estudos de uma possível associação com tumores na tiróide pela provável liberação de iodo no organismo, porém esses estudos não foram conclusivos (DRAKE, 1975; FDA, 2007). Pode ser adicionado em alimentos como: cereais, aperitivos, confeitos, cereja em calda, coberturas, sobremesas, lácteos aromatizados, massas, molhos, queijos, recheios, revestimentos, refrescos e refrigerantes, sucos de frutas, xaropes para refrescos (MULTON, 1988).

(b.2.4) Indigóides

A **indigotina** (E 132) também é o único corante artificial da classe dos indigóides permitido para o uso em alimentos no Brasil. Ele é solúvel em água, pouco solúvel em etanol e insolúvel na maior parte dos solventes orgânicos, apresenta-se sensível a luz e muito sensível a agentes oxidantes, descolorindo-se na presença de ácido ascórbico e dióxido de enxofre (MULTON, 1988). A UE considera seu uso seguro, sendo também empregado no Japão, Estados Unidos e Inglaterra (BERDICK, 1982; DOWNHAM; COLLINS, 2000; WALFORD, 1980).

O uso de corantes artificiais na alimentação humana e animal têm recebido muitas críticas, uma vez que seu uso está justificado com base nos hábitos alimentares e também está relacionado com a aparência e marketing realizado para aumentar as vendas dos produtos. Além disso, a partir do descobrimento dos corantes sintéticos, seu uso foi relatado diversas vezes com o propósito de encobrir má qualidade de matérias-primas e produtos (PRADO; GODOY, 2003).

De acordo com os órgãos oficiais como ANVISA, CODEX ALIMENTARIUS, FAO/OMS e JECFA, o uso dos corantes artificiais é seguro desde que se estabeleçam ingestão diária aceitável (IDA) para cada corante, entretanto o JECFA recomenda que estudos sejam realizados periodicamente para a determinação do consumo total na dieta para que os valores de IDA não sejam ultrapassados. Cabe ressaltar, que os estudos encontrados na literatura são insuficientes e contraditórios e desta forma novos trabalhos devem ser realizados. Nas Tabelas 2 e 3 são apresentadas algumas características dos corantes artificiais permitidos para uso no Brasil.

Tabela 2. Propriedades dos corantes artificiais permitidos para uso em alimentos e rações no Brasil

Nome Usual	Tartrazina	Amarelo Crepúsculo	Azorrubina	Amaranto	Ponceau 4R	Eritrosina	Vermelho 40	Azul Patente V	Azul Indigotina	Azul Brillante	Verde Rápido
Nome Químico	sal tri-sódico 5-hidroxi-1-(4-sulfofenil)-4-[(4-sulfofenil) azo]-pirazole-3-carboxilato	sal di-sódio 6-hidroxi-5-[(4-sulfofenil) azo]-naftaleno-2-sulfonato	sal di-sódico 4-hidroxi-3-[(4-sulfo-1-naftil) azo]-naftaleno-1-sulfonato	sal tri-sódico do ácido 3-hidroxi-4-(4-sulfo-1-naftil azo)-naftaleno-2,7-di-sulfonato	sal tri-sódico 7-hidroxi-8-(4-sulfo-1-naftil azo)-naftaleno-1,3-di-sulfonato	sal di-sódico 2,4,5,7-tetraiodo fluoresceína	sal di-sódico de 1-(2-metoxi-5-metil-4-sulfofenilazo)-2-naftol-6-sulfonato	sal de cálcio di-4-[dietilamino ciclohexa-2,5-dienilideno-(4-dietilaminofenil) metil]-6-hidroxibenzeno – 1,3-di-sulfonato	sal di-sódico do ácido 5,5'-indigotino sulfonato	sal tri-sódico de 4',4''-di (N-etil-3-sulfonatobenzil amino)-trifenil metil-2-sulfonato	sal tri-sódico 4-[4-(N-etil-p-sulfobenzil amino)-fenil]-(4-hidroxi-2-sulfofenil-metileno)-1-(N-etil-N-p-sulfobenzil)-Δ ² ,5-ciclohexa dienimina.
Classe	monoazo	monoazo	monoazo	monoazo	monoazo	xanteno	monoazo	trifenilmetano	indigóide	trifenilmetano	trifenilmetano
Fórmula	C ₁₆ H ₉ N ₄ Na ₃ O ₇ S ₂	C ₁₆ H ₁₀ N ₂ Na ₂ O ₇ S ₂	C ₂₀ H ₁₂ N ₂ Na ₂ O ₇ S ₂	C ₂₀ H ₁₁ N ₂ Na ₃ O ₁₀ S ₃	C ₂₀ H ₁₁ N ₂ Na ₃ O ₁₀ S ₃	C ₂₀ H ₆ I ₄ Na ₂ O ₅	C ₁₈ H ₁₄ N ₂ Na ₂ O ₆ S ₂	C ₂₇ H ₃₁ N ₂ Na ₂ O ₆ S ₂	C ₁₆ H ₆ N ₂ Na ₃ O ₈ S ₂	C ₃₇ H ₃₄ N ₂ Na ₂ O ₉ S ₃	C ₃₇ H ₃₄ N ₂ Na ₂ O ₁₀ S ₃
Massa Molar	534,35781	452,36374	502,42354	604,46361	604,46361	879,86194	496,41674	566,66147	466,34734	792,84314	808,84254
CAS Number	1934-21-0	2783-94-0	3567-69-9	915-67-3	2611-82-7	16423-68-0	25956-17-6	3536-49-0	860-22-0	3844-45-9	2353-45-9
Color Index (C.I.)	19140	15985	14720	16185	16255	45430	16035	42051	73015	42090	42053
Código Brasil	E-102	E-110	E-122	E-123	E-124	E-127	E-129	E-131	E-132	E-133	E-143
Absorção Máxima	λ _{max} = 426nm	λ _{max} = 480nm	λ _{max} = 515nm	λ _{max} = 523nm	λ _{max} = 505nm	λ _{max} = 526nm	λ _{max} = 502nm	λ _{max} = 635nm	λ _{max} = 610	λ _{max} = 629nm	λ _{max} = 625nm
Absortividade (em água)	1% E _{1cm} = 527	1% E _{1cm} = 551	1% E _{1cm} = 545	1% E _{1cm} = 438	1% E _{1cm} = 431	1% E _{1cm} = 1154	1% E _{1cm} = 556	1% E _{1cm} = 2000	1% E _{1cm} = 498	1% E _{1cm} = 1637	1% E _{1cm} = 1560
Solubilidade (g/100mL) a 25°C	Água 20 Glicerina 18 Propileno 7 Etanol <0,1	Água 19 Glicerina 20 Propileno 2,2 Etanol <0,1	Água 5-10 g/100mL a 19°C Propileno 0,4	Água 8 Glicerina 1,5 Propileno 0,4 Etanol <0,1	Água 25 Glicerina 1,4 Propileno 1,4 Etanol 0,02	Água 9 Glicerina 20 Propileno 20 Etanol 1	Água 22 Glicerina 3 Propileno 1,5 Etanol 0,001	Água <10	Água 1,6 Glicerina 1 Propileno 0,1 Etanol <0,1	Água 20 Glicerina 20 Propileno 20 Etanol 0,15	Água <10
IDA (mg/Kg peso corpóreo)	7,5	2,5	4,0	0,5	4,0	0,1	7,0	15,0	5,0	10,0	10,0
Sinônimos	Tartrazine, FD&C Yellow No. 5, Food Yellow No.4	Sunset yellow FCF; Food Yellow No.5, FD&C Yellow No.6	Carmoisine, Food Red 3, Acid ed 14	Amaranth; Food Red No.2; Bordeaus S	New coccine, Food Red 7, Food Red No.102	Erythrosine B, Food Red 14, Acid Red 18	Allura Red AC, Food Red 17	Acid blue 3; Patent Blue V, Food Blue 5	Indigo carmine, FD&C Blue No. 2, Food Blue No.2	FD&C Blue No.1, Food Blue 2, Brilliant blue FCF	Fast green FCF, Food Green 3, FD&C Green No 3

Fonte: Prado e Godoy (2003)

Tabela 3. Relação dos corantes artificiais permitidos no Brasil, e respectivos INS, IDA, LMP e riscos a saúde

Corante	INS ^a	IDA ^b mg/Kg/p.c. ^c	LMP ^d mg/kg	Efeitos na saúde
Amaranto	E ^e -123	10	100	Angioedema Prurido Urticária Broncoconstrição (combinado com E-124 e E-110) Broncoconstrição (combinado com E-133 ou E-132) Resposta vascular seqüencial
Eritrosina	E-127	5	100	Elevação das ligações entre protina-iodeto Tumores na tireóide Dano nos cromossomos
Vermelho 40	E-139	30	100	Tumores e linfomas
Ponceau 4R	E-124	10	100	Broncoconstrição (combinado com E-123 ou E-110) Reação anafilática (combinado com E-110) Urticária Renite Congestão nasal Broncoconstrição (combinado à E-123 e E-124) Reação anafilática Resposta eosinofílica
Amarelo Crepúsculo	E-110	10	150	Purpura Alergias Tumores nos rins Danos cromossômicos Dor abdominal Vômito Indigestão Aversão ao alimento Alergias Tumors na tireóide
Amarelo Tartrazina	E-102	7,5	150	Linfomas finfocíticos Danos cromossômicos Ataques de asma Urticária Hyperatividade
Indigotina	E-132	30	100	Tumores no cérebro Broncoconstrição (combinado com E-133 ou E-127) Broncoconstrição (combinado com E-132 ou E-127)
Azul Brillhante	E-133	30	100	Resposta eosinofílica Danos cromossômicos
Azorrubina	E-122	5	100	Informações não avaliadas ainda nos EUA
Verde Rápido	E-143	30	100	Tumores na bexiga Purpura
Azul Patente V	E-131	30	150	Dermatites Sintomas não específicos e subjetivos

a- INS – *International Numbering System* b- IDA – Ingestão Diária Aceitável c- p.c. peso corpóreo d - LMP – Limite Máximo Permitido e - E – Corantes permitidos pela União Européia utilizam deste prefixo

Fonte: PCHTRG (1985) e EC (2003; 2010).

2.3 Legislação Nacional e Internacional para Corantes em Alimentos para Animais

A legislação para aditivos alimentares e conseqüentemente corantes surgiu da necessidade de controlar o uso dessas substâncias, uma vez que o número de produtos e finalidades aumentou com o passar do tempo. A legislação que regulamenta o uso de aditivos em alimentos destinados à humanos já está bem definida no Brasil, Estados Unidos e nos países da União Européia, porém em se tratando da regulamentação de aditivos em alimentos destinados a alimentação de animais, mais especificamente para animais de companhia, ela ainda é falha.

A regulamentação brasileira para aditivos foi estabelecida primeiramente pelo Decreto nº 50.040, de 24 de janeiro de 1961, o qual dispunha sobre as normas técnicas especiais reguladoras do emprego de aditivos químicos em alimentos, sendo alterado pelo Decreto nº 691, de 1962 e posteriormente pelo Decreto nº 55.871 de março de 1965, o último vigente até a presente data (BRASIL, 1965). Após o estabelecimento do decreto de n. 55.871, várias atualizações foram realizadas como a Resolução n. 44 de 1977, a qual estabeleceu as condições de essenciais de qualidade dos corantes empregados na produção de alimentos e bebidas; a Portaria n. 2 de 1987, a qual excluiu os corantes Amarelo Ácido ou Amarelo Sólido (13015), Azul de Indantreno ou Azul de Alizarina (69800), Laranja GGN (15980), Vermelho Sólido E (16045), e Escarlata GN (14815) para uso em alimentos; as Resoluções n. 382 e 388, de 1999, na qual são mencionados os 11 corantes permitidos no Brasil para alimentos e bebidas, sendo eles: amaranto, eritrosina, vermelho 40, ponceau 4R, amarelo crepúsculo, tartrazina, indigotina, azul brilhante, azorrubina, verde rápido e azul patente V (PRADO; GODOY, 2003).

Em se tratando da regulamentação para alimentos destinados à animais de companhia, não existe legislação específica no Brasil, porém Portaria n. 384, de 2003 e a Instrução Normativa n. 13 de 2004 fazem menção ao regulamento técnico sobre avaliação da segurança de uso, registro e comercialização de aditivos para alimentação animal e regulamento técnico sobre aditivos para produtos destinados à alimentação animal, respectivamente (BRASIL, 2003; 2004).

Atualmente o que se verifica na literatura é que os dados e regulamentações utilizadas para humanos são extrapoladas para animais, sem considerar que a frequência e o tipo de alimentos administrados para animais de companhia são diferentes dos consumidos por humanos.

As Instruções Normativas n. 3; n. 30 e n. 66 do ano de 2009 contemplam os

regulamentos técnicos para procedimentos de registro de estabelecimentos e produtos destinados para animais de companhia. Essas normativas foram os primeiros regulamentos específicos para essa classe de animais (BRASIL, 2009a; BRASIL, 2009b).

Já para alimentos destinados para o consumo animal, de acordo com a legislação, aditivos sensoriais (corantes) e tecnológicos, constantes na formulação dos produtos devem ser declarados na composição básica e ficam dispensados de ter seus elementos ativos declarados nos níveis de garantia (BRASIL, 2009b). É observado que nas regulamentações para alimentos para animais não se especificam quais as substâncias permitidas, LMP ou IDA para as espécies destinadas. Dessa forma, subtende-se que as regulamentações para animais são derivadas das para humanos.

No caso do uso de corantes em alimentos para o consumo humano, comitês internacionais, tais como a Comissão do *Codex Alimentarius*, organismo subsidiário da FAO e da OMS, têm sido criados com o intuito de, entre outros objetivos, estabelecer especificações e critérios para a utilização de aditivos alimentares, incluindo os corantes sintéticos. Os Estados Unidos que chegou a ter no início do século XX mais de 700 substâncias com poder corante, hoje reduziu a quantidade de corantes sintéticos permitidos em alimentos para 9, sendo 2 de uso restrito (FDA, 2007). No Japão, segundo a legislação, permite-se o uso de 11 corantes sintéticos. Com a criação da União Européia, houve a necessidade de uma harmonização das legislações dos países membros. Assim, foram elaboradas as diretrizes que controlam o uso de aditivos em alimentos, sendo as que englobam os corantes são as diretrizes 94/36/EC e a 95/45/EC. Atualmente 17 corantes artificiais são permitidos na União Européia para uso em alimentos e bebidas. Cabe destacar que alguns países, como a Noruega e Suécia, proíbem o uso de corantes artificiais nos alimentos (EC, 1994; 1999; 2003).

No caso da União Européia a legislação para aditivos em alimentos destinados para animais de companhia é determinada pelos regulamentos (EC) n. 1831/2003 e diretiva 2003/7/EC, sendo que estes regulamentos determinam as normas para o uso dos aditivos na nutrição animal, bem como determina os procedimentos para autorização, venda, e a rotulagem desses produtos. De acordo com a diretiva citada anteriormente, as substâncias corantes pertencem ao grupo assim chamado de aditivos sensoriais, sendo as substâncias que melhoram ou mudam as propriedades organolépticas da alimentação ou as características visuais do alimento destinado ao animal. Este regulamento descreve nove xantofilas podem ser adicionados à alimentação animal. A cantaxantina é permitida como um aditivo para a alimentação de animais de companhia como cães, gatos, peixes e pássaros ornamentais

(BREITHAUPT, 2007; EC, 2003; 2010). Quanto aos corantes artificiais, o regulamento (EC) n. 1831/2003 estabelece o uso de corantes como azul patente V, amarelo crepúsculo e tartrazina, em alimentos destinados para pássaros ornamentais e pequenos roedores, e azul patente V, amarelo crepúsculo, tartrazina, indigotina, eritrosina e ponceau 4R, em alimentos destinados para peixes ornamentais, e azul patente V para cães e gatos. Além dessas especificações a norma faz menção a outros corantes artificiais e naturais.

2.4 Qualidade dos Ingredientes, Aditivos Alimentares e Alimentos Completos

Devido à globalização, a competitividade entre as indústrias tem aumentado. Portanto, como diferencial competitivo, as indústrias de ração devem reduzir custos sem o comprometimento da qualidade do produto final. Desta forma, é imprescindível que a indústria de rações mantenha um controle rigoroso de seus produtos, sendo que para isso são necessários constantes monitoramentos e avaliações dos ingredientes que compõem a ração e no processo de produção, com o intuito de identificar e solucionar os problemas que possam comprometer a qualidade do produto final.

Conforme Bellaver (2002), produzir rações significa submeter os ingredientes a processos distintos e conhecidos, operacionalizando os procedimentos de fabricação, com controle de pontos críticos dos processos. Alguns exemplos de processamento são: redução do tamanho das partículas (p. ex. trituração, moagem e/ou prensagem), modificação da densidade (p. ex. aglomeração, peletização e/ou extrusão), mistura tratamento por calor e pressão (p. ex. cozimento, tostagem e/ou extrusão); mudanças na estrutura do amido, proteína e gorduras. Estes processos têm como objetivo melhorar a palatabilidade e digestibilidade dos nutrientes, bem como remover algumas das substâncias antinutricionais e reduzir a contaminação por microrganismos patogênicos.

Corroborando a idéia anterior, Alves (2003, p. 2) afirma que “gerenciar eficazmente cada etapa do processo produtivo, evitando perdas ou falhas e mantendo a qualidade do produto, pode ser um grande diferencial para os produtores de alimentos para animais de companhia”. Além do mais, a complexidade da composição dos alimentos para cães e gatos (produtos de origem animal e vegetal) é um desafio para a garantia de qualidade uma vez que uma grande variedade de contaminantes, toxinas e agentes patogênicos, podem estar presentes nas matérias-primas ou se desenvolver no momento da colheita, processamento ou estocagem.

Na Figura 9 podem ser visualizadas as principais etapas do processo de produção de alimentos completos para animais de companhia.

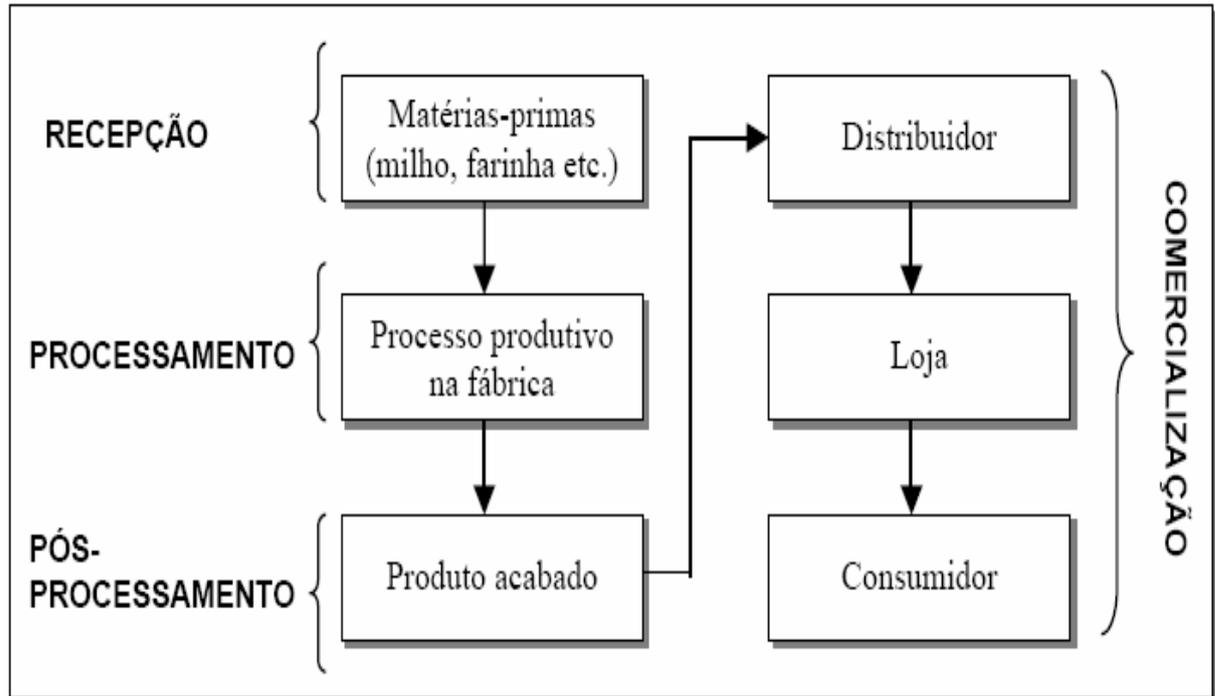


Figura 9. Cadeia produtiva para controle na indústria de alimentos completos
 Fonte: Alves (2003).

As etapas envolvidas nos processos externos, como a distribuição, a venda nos lojistas e o uso e conservação do alimento pelo dono do animal, devem receber atenção especial no controle de qualidade, pois quando controladas as etapas de todo o processo de fabricação de alimentos completos (internas e externas), a garantia de qualidade e segurança dos produtos torna-se viável sem acarretar prejuízo para indústria (ALVES, 2003).

Deve-se ressaltar que a qualidade do produto final depende dessas etapas de processamento. Entretanto, outros pontos anteriores ao processamento são tão ou mais importantes para a qualidade final dos alimentos completos. Alguns exemplos de etapas anteriores que devem ser controladas são: a seleção de ingredientes e de fornecedores, o transporte e recebimento, o eventual acondicionamento (secagem, limpeza), a estocagem, as pesagens, o empacotamento e transporte das matérias-primas. Além disso, para o mesmo autor, estas etapas devem ser controladas também em relação ao produto final, (para que se obtenha um produto de qualidade (BELLAVÉR, 2002).

Com relação ao controle dos ingredientes Bellaver (2002) ressalta que três (3) tipos de provas podem ser feitas:

- a) provas sensoriais (cor, odor, textura, umidade, sujidades, entre outros);
- b) provas rápidas (granulometria, luz UV para fungos) e
- c) provas de laboratório (composição centesimal, substâncias tóxicas, rancidez, putrefação, amido, energia, entre outras).

A obtenção de ingredientes de boa qualidade, sem descuidar-se dos aspectos ligados ao processo de fabricação de alimentos completos deve ser preconizado pela indústria de alimentos completos. Para que isso fique evidente, devem ser estabelecidas rotinas de verificação da qualidade, as quais podem conter provas sensoriais, rápidas e laboratoriais. A garantia de qualidade do produto final (ração) dependerá do atendimento comprovado e sem atalhos dos índices técnicos obtidos com as provas citadas (BELLAVÉR, 2002).

Atualmente, muitos estudos têm sido realizados com o objetivo de estudar alternativas para a produção de alimentos em um processo cada vez mais rentável, seguro e de qualidade. Alves (2003) ressalta que vários procedimentos e práticas adotadas na área de alimentação humana são recomendados na produção de alimentos para cães e gatos, visto que oferecem mecanismos de redução de perigos e ações preventivas, visando garantir a segurança alimentar dos animais. Dentre esse procedimentos destacam-se:

- a) Boas Práticas de Fabricação - BPF estabelecidas inicialmente como “Boas Práticas de Produção e de Prestação de Serviços na Área de Alimentos” pela Portaria no. 1428, de 26/11/93, do Ministério da Saúde e mais tarde, renomeadas como “Boas Práticas de Fabricação para Estabelecimentos Produtores/Industrializadores de Alimentos”, através da Portaria no. 326, de 30/07/97, da Vigilância Sanitária, Ministério da Saúde;
- b) Manual de Boas Práticas de Fabricação para Estabelecimentos de Produtos para Alimentação Animal, publicado em novembro de 2002 pelo Sindirações – Sindicato Nacional da Indústria de Alimentação Animal, pela Anfal – Associação Nacional dos Fabricantes de Alimentos para Animais e pela Asbram – Associação Brasileira das Indústrias de Suplementos Minerais;
- c) a Portaria SARC no. 5, de 03 de abril de 2002, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, submetida à consulta pública, publicada no Diário Oficial da União em 08 de abril de 2002;
- d) Manual de Boas Práticas de Fabricação para Empresas Processadoras de Alimentos e o Manual de Boas Práticas de Transporte e Armazenagem de Alimentos (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS E PELA ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS PROFISSIONAIS DA QUALIDADE DE ALIMENTOS (1995 e 1996); o primeiro estabelece as normas de Boas Práticas de Fabricação para assegurar que os envolvidos as conheçam, as entendam e as cumpram, alcançando-se assim a higiene pessoal, assim como a sanitização e controles aplicados aos processos e produtos,

assegurando que os mesmos cheguem aos clientes e consumidores com qualidade e livres de qualquer tipo de contaminação; o segundo fixa os procedimentos para transporte e armazenagem de alimentos industrializados, desde a sua expedição pela empresa produtora até a exposição para a venda, visando à manutenção da qualidade inicial do produto, do qual podem ser extraídas orientações extremamente úteis e totalmente aplicáveis às indústrias de alimentos para cães e gatos;

e) normas do grupo ISO 9000:2000 (ABNT, 2000).

Conclui-se desta forma, que o processo de produção de alimentos completos deve passar por um criterioso controle de qualidade, no intuito de produzir um alimento que atenda as necessidades nutricionais e que seja seguro para o animal, para o homem e para o ambiente. Logo, este produto deve ser monitorado nas diferentes fases de processamento, as quais vão desde o recebimento dos ingredientes, da avaliação de sua qualidade, da estocagem e do uso adequado dos mesmos, até o processo de venda, transporte, armazenamento dos alimentos completos nas lojas (*pet shops*), agropecuárias, supermercados, e nas casas dos consumidores finais.

2.5 Contaminação de Alimentos Completos

Como abordado anteriormente, sabe-se que a composição complexa das rações e alimentos completos, permite que se apresentem nestes produtos uma variedade de contaminantes, toxinas e agentes patogênicos, provenientes dos ingredientes vegetais. Essa contaminação pode ocorrer no momento da colheita, no processamento e na estocagem, quando estes são inadequados. A seguir abordar-se-ão dois assuntos relacionados a este estudo: a contaminação por fungos toxigênicos e micotoxinas.

2.5.1 Fungos toxigênicos

Os fungos são os principais contaminantes de grãos no Brasil, sendo responsáveis pela perda da qualidade de produtos agrícolas e seus derivados. Esse grupo de microrganismo pode ser classificado como (a) fungos deteriorantes, ou seja, que provocam mudanças de coloração, redução do poder germinativo, alterações no odor e paladar dos grãos, depreciando sua qualidade, e (b) fungos toxigênicos, ou seja, aqueles que são capazes de produzir toxinas (LAZZARI; LAZZARI, 2000; SCUSSEL, 2002b).

A classe de fungos deteriorantes pode ser subdividida em fungos de campo e de armazenagem. Os principais gêneros fúngicos de campo são: *Fusarium*, *Alternaria*, *Cladosporium*, entre outros. Já no grupo de armazenagem, os gêneros fúngicos que se destacam são: *Aspergillus* e *Penicillium* (SCUSSEL, 1998; SILVA, 2005).

Os fungos produtores de toxinas, logo toxigênicos, têm despertado grande interesse devido ao impacto que a contaminação por micotoxinas e as micotoxicoses geram sobre a saúde humana e animal, bem como sobre as perdas econômicas proporcionadas pelo descarte dos substratos contaminados. Neste grupo destacam-se os gêneros *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Claviceps*, *Fusarium*, *Penicillium*, entre outros (CORRÊA, 2000).

Diversos trabalhos têm sido realizados a fim de obter uma maior atenção com relação à contaminação de substratos por fungos toxigênicos. De acordo com estes estudos a prevalência de cepas toxigênicas recai sobre os gêneros *Fusarium*, *Aspergillus* e *Penicillium* (COSTA; SCUSSEL, 2002; FARIAS et al., 2000; ROSS et al., 2004; ZINEDINE et al., 2005).

É importante ressaltar que a microflora dos grãos é muito diversificada sendo que a presença de fungos não indica obrigatoriamente a contaminação por micotoxinas. Porém em condições favoráveis de umidade relativa do ar, umidade e atividade de água do substrato, e temperatura, esses fungos são potencialmente produtores de micotoxinas. Também vale ressaltar que mesmo em condições não favoráveis para a sobrevivência do fungo, este pode produzir a toxina envenenando os grãos anteriormente à sua morte (CORRÊA, 2000; FONSECA, 2005; GONÇALEZ; PINTO; FELÍCIO, 2001; LAZZARI; LAZZARI, 2000).

O quadro 5 mostra a relação entre substratos e os principais gêneros fúngicos contaminantes.

Quadro 5. Gêneros de fungos isolados de diversos tipos de grãos e produtos derivados

Substrato	Fungos
Sorgo	<i>Aspergillus</i> , <i>Fusarium</i> , <i>Phoma</i>
Arroz	<i>Aspergillus</i> , <i>Cladosporium</i> <i>Nigrospora</i> , <i>Penicillium</i>
Feijão	<i>Aspergillus</i> , <i>Fusarium</i> , <i>Phoma</i> <i>Penicillium</i>
Trigo	<i>Aspergillus</i> , <i>Fusarium</i> , <i>Penicillium</i>
Café	<i>Alternaria</i> , <i>Aspergillus</i> , <i>Cladosporium</i> <i>Penicillium</i>
Maçã	<i>Alternaria</i> , <i>Cladosporium</i> , <i>Penicillium</i> , <i>Fusarium</i>
Soja	<i>Aspergillus</i> , <i>Penicillium</i> , <i>Rhizopus</i>
Milho	<i>Aspergillus</i> , <i>Eurotium</i> , <i>Fusarium</i> <i>Penicillium</i>
Amendoim	<i>Aspergillus</i>
Cevada	<i>Aspergillus</i> <i>Fusarium</i> <i>Penicillium</i>
Rações e Ingredientes	<i>Aspergillus</i> , <i>Fusarium</i>

Fonte: Scussel (1998), FAO (2004) e Silva (2005).

2.5.2 Micotoxinas

Micotoxinas são metabólitos secundários tóxicos de algumas espécies de fungos, que podem intoxicar seres humanos e animais. Acredita-se que os fungos produzam esses metabólitos a fim de impedir que outros organismos utilizem seu alimento (FONSECA, 2005; SILVA, 2005).

A intoxicação pode proceder de forma direta ou indireta. A forma direta ocorre quando o produto é diretamente utilizado na alimentação humana ou de animais. Enquanto a forma indireta resulta quanto subprodutos e derivados (leite, carne, sucos, outros) contaminados são empregados. A ingestão de micotoxinas pode levar animais e o homem a quadros de intoxicação aguda ou crônica. Dentre as principais micotoxinas encontradas em produtos alimentícios e grãos têm-se: aflatoxinas (AFLs), fumonisinas (FBs) zearalenona (ZON), ocratoxina A (OTA) entre outras (GONÇALEZ; PINTO; FELÍCIO, 2001; SILVA, 2005).

(a) Histórico

O nome micotoxina é derivado da palavra grega “Mykes” que significa fungo e “Toxicum” que significa veneno ou toxina. A doença ou síndrome (condição patológica) decorrente da ingestão de micotoxinas é denominada micotoxicose (GONÇALEZ; PINTO; FELÍCIO, 2001; SCUSSEL, 2002d).

O conhecimento que as micotoxicoses são o resultados do metabolismo fúngico é uma descoberta relativamente recente, na década de 60, isto porque a doença causada não está diretamente relacionada à presença ou contaminação por fungos, mas sim ao consumo alimentos contaminados por toxinas produzidas pelos fungos.

Entretanto a existência da relação entre alimentos mofados e doenças em humanos e animais já estava sob suspeita muito antes de sua comprovação científica. A explicação para a descoberta tardia a das micotoxinas pode estar relacionada ao armazenamento dos alimentos. Antigamente não se armazenavam os produtos, eles eram produzidos e consumidos em um curto prazo tempo. Enquanto que atualmente com os avanços tecnológicos e industriais, e produções em grande escala o armazenamento de alimentos tornou-se essencial. Porém agora produtos e seus derivados são armazenados por períodos longos de tempo proporcionando uma oportunidade de desenvolvimento de fungos e contaminação por micotoxinas nos alimentos (FONSECA, 2005).

Na Itália, antes de 1900, pesquisadores já suspeitavam que o consumo de milho mofado por crianças acarretava o desenvolvimento de doenças. Através do isolamento e crescimento de colônias fúngicas, os investigadores acreditavam que compostos tóxicos do fungo que provocavam a doença. Entretanto como não se era capaz de identificar e isolar o composto tóxico, a confirmação da teoria não podia ser realizada. Não obstante, acreditava-se que havia a correlação entre a doença e o consumo de milho mofado (CHRISTENSEN, 1975 apud WONG, 2007).

Em 1957, Burnside e outros pesquisadores, estudaram um surto da doença do milho mofado nos Estados Unidos, onde centenas de porcos selvagens que se alimentavam em campos de milho ficaram doentes e muito morreram. Neste caso, micologistas e veterinários, isolaram uma gama de fungos do milho e inocularam estas culturas em milhos esterilizados. Os porcos foram alimentados com o milho inoculado com *Aspergillus flavus* e os animais apresentaram as mesmas lesões internas e externas encontradas na doença do milho mofado. Entretanto pouca atenção foi dada ao estudo de forma que não havia uma toxina isolada (WONG, 2007).

Então somente em 1960, quando cerca de cem mil perus e algumas aves domésticas morreram na Inglaterra, acarretando perdas de milhares de dólares, a primeira micotoxina foi isolada e identificada. Esta descoberta não ocorreu repentinamente, a primeira hipótese era que a doença era causada por um vírus, mas em pouco tempo foi recorrido à causa alimentar, uma vez que os sintomas da intoxicação desapareciam com a substituição das rações que antes continham farelo amendoim por outra sem o ingrediente. Este estudo foi semelhante ao de Burnside, o fungo isolado da ração também foi *Aspergillus flavus*, porém ao contrário do estudo anterior uma equipe de químicos isolou e identificou a toxina proveniente da ração de farelo de amendoim. A esta micotoxina foi dado o nome aflatoxina, “a” de *Aspergillus* e “fla” de *flavus* (FONSECA, 2005; SCUSSEL, 2002d).

Cerca de 300 micotoxinas diferentes já foram identificadas, mas um grupo menor destas toxinas é considerado de importância na contaminação alimentar devido às conseqüências de suas propriedades tóxicas sobre a saúde humana e animal (SCUSSEL, 1998). A Figura 10 ilustra as estruturas químicas de algumas das principais micotoxinas de interesse econômico.

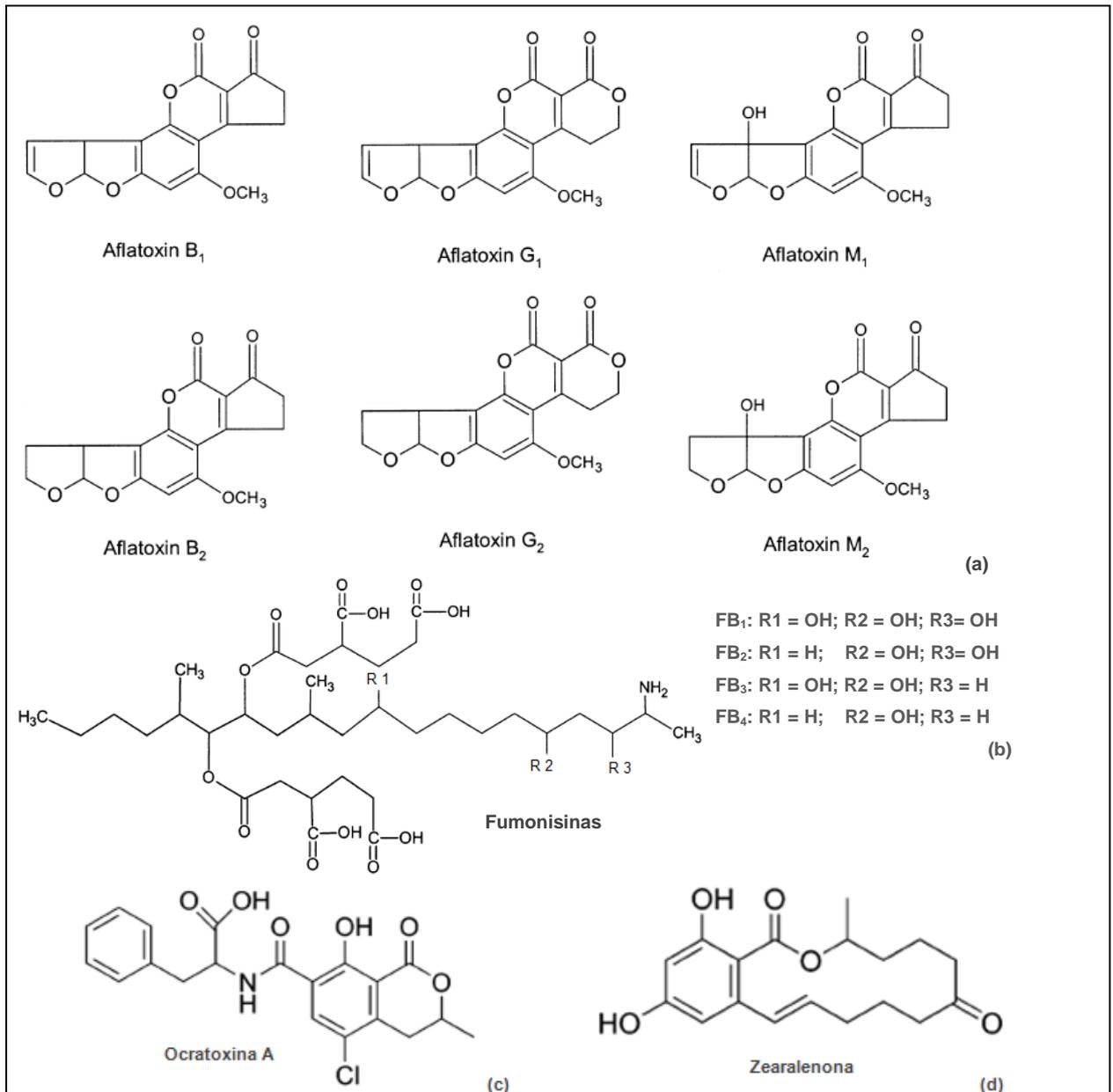


Figura 10. Estruturas químicas das micotoxinas (a) AFLs, (b) FBs, (c) OTA e (d) ZON
 Fonte: (a) e (b) Hussein e Brasel (2001); (c) e (d) Leung, Díaz-Llano e Smith (2006).

(b) Aflatoxinas

As AFLs constituem um grupo de metabólitos secundários tóxicos produzidos principalmente pelas espécies de fungos *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus* e *Aspergillus nominus*. Neste grupo de micotoxinas cerca de 20 metabólitos derivados já foram relatados, porém as toxinas identificadas são aflatoxina B₁ (AFB₁), aflatoxina B₂ (AFB₂), aflatoxina G₁ (AFG₁) e aflatoxina G₂ (AFG₂). As iniciadas B e G se devem ao fato destas apresentarem fluorescência azulada e esverdeada, respectivamente, quando observadas sob luz ultravioleta. Duas outras micotoxinas são derivadas hidroxiladas resultantes do

metabolismo das toxinas AFB₁ e AFB₂ são elas: aflatoxina M₁ (AFM₁) e aflatoxina M₂ (AFM₂). Foram detectadas no leite e seus derivados, urina e fezes de mamíferos. A toxicidade da AFM₁ e AFM₂ é menor que da AFB₁, porém a maior preocupação está no seu consumo principalmente por crianças (KAMKAR, 2006; SCUSSEL, 2002d; SILVA, 2005). A Figura 10a mostra as estruturas químicas das AFLs.

Os fungos produtores de AFLs podem crescer em determinados alimentos e sob circunstâncias favoráveis de temperatura e umidade e gerar AFLs antes e/ou durante a colheita e durante o armazenamento (GIRAY et al., 2007).

Os principais alimentos susceptíveis à contaminação por AFLs são: amendoim, milho, frutas secas, figos, cereais, soja, painço, nozes, avelãs, sorgo, trigo entre outros. Animais como cavalo, macaco, peru e pato são extremamente sensíveis a ação das AFLs (KOS; KRŠKA, 2006; SCUSSEL, 2002d; SILVA, 2005).

AFLs têm se mostrado altamente tóxicas, demonstrando ter efeitos carcinogênicos, teratogênicos e mutagênicos. A intoxicação por essa toxina é denominada de aflatoxicose. A AFB₁ é o composto com maior potencial toxigênico (hepatocarcinogênico) conhecido em mamíferos, por isso a *International Agency for Research on Cancer* (IARC) classificou essa toxina como carcinógeno humano do Grupo I. Logo mesmo a exposição crônica na dieta a pequenas quantidades desse composto deve ser considerada prejudicial à saúde humana (CALONI et al., 2006; GIRAY et al., 2007).

O órgão de ataque preferencial em humanos e animais pela toxicidade e carcinogenicidade da AFLs é o fígado. Sabe-se que esta toxicidade se deve a alta reatividade da 8,9 – epóxido - AFB₁ no seu metabolismo no fígado mediado pelo sistema do citocromo P450. Os efeitos metabólicos incluem: inibição da síntese protéica, DNA e RNA, redução de atividade enzimática, depressão do metabolismo de glicose, inibição de síntese de lipídeos, fosfolipídios, ácidos graxos livres, entre outros. Já o aumento do risco de desenvolvimento de hepatocarcinoma é devido às mutações no gene de supressão tumoral P53 e pela ativação de oncogenes dominantes (GIRAY et al., 2007).

Existe um grande número de relatórios que sugerem a intoxicação dos seres humanos pelo consumo de produtos agrícolas. Estudos epidemiológicos mostraram que a exposição à AFLs associada com o vírus da hepatite B aumenta o risco de carcinoma hepatocelular, e a presença desse vírus parece aumentar a potencia das AFLs (IARC/WHO, 1993; SCUSSEL, 2002d).

(c) Fumonisin

Fumonisin (FBs) é um grupo de micotoxinas que foram isoladas a partir de culturas de *Fusarium (moniliforme) verticillioides* Nirenberg em 1988 por Gelderblom e colaboradores. No mesmo período Bezuidenhout e colegas elucidaram a estrutura química dessas toxinas. 7 FBs já foram caracterizadas entre elas: fumonisin B₁ (FB₁), fumonisin B₂ (FB₂), fumonisin B₃ (FB₃), fumonisin B₄ (FB₄), fumonisin A₁ (FA₁), fumonisin A₂ (FA₂) e fumonisin C (FC), porém as toxinas de maior importância devido à sua toxicidade e também por serem contaminantes naturais de alimentos são FB₁, FB₂ e FB₃. A Figura 10b mostra a estrutura química dessas toxinas (SCUSSEL, 1998; SORIANO; DRAGACCI, 2004).

As fumonisin não são fluorescentes naturalmente já que não possuem grupos cromóforos em sua estrutura e não possuem ligações duplas conjugadas na cadeia carbonada (KOS; KRŠKA, 2006).

Fusarium é o principal gênero produtor de FBs, e as espécies que merecem maior destaque são: *F. (moniliforme) verticillioides*, *F. proliferatum* e *F. subglutinans*. A contaminação por esses fungos ocorre ainda no campo (pré-colheita) e entre os grãos com maior susceptibilidade estão o milho, trigo e sorgo. Além desses substratos seus derivados e rações contendo esses ingredientes também podem ser fontes de contaminação (SANTÚRIO et al., 2002; SCUSSEL, 2002d).

Os animais com maior sensibilidade aos efeitos das FBs são bovinos, suínos e eqüinos (LAZZARI; LAZZARI, 2000). As FBs induzem a toxicidade cardiovascular, edema pulmonar (EP) e degeneração hepatocelular em suínos; leucoencefalomalácia (LEM) em eqüinos e nefropatia em ratos coelhos e cordeiros. Além disso, existem relatos de hepato e nefrocarcinogenicidade em ratos, injúria hepática em roedores, eqüinos e suínos, aterosclerose em macacos vervet, hemorragia cerebral em coelhos e hipertrofia de artérias pulmonares em suínos (HE; KIM; SHARMA, 2005; SANTÚRIO et al., 2002; SORIANO; DRAGACCI, 2004).

Em humanos têm sido correlacionados os altos índices de câncer esofágico com altos níveis de contaminação em alimentos por FB₁, principalmente na África do Sul, norte da Itália, Iran e China, e provavelmente é promotora de câncer hepático primário. Logo a *International Agency for Research on Cancer* classificou esse grupo de micotoxinas como carcinógeno da classe 2B (HE; KIM; SHARMA, 2005; NELSON et al., 1997). Porém os dados para humanos não são totalmente confirmatórios para a relação entre a intoxicação por FBs e o aparecimento de câncer de esôfago, mas existem suspeitas (KOS; KRŠKA, 2006;

SCUSSEL, 2002d).

O mecanismo de ação das FBs está relacionado ao metabolismo de esfingolipídios e à inibição das enzimas N-aciltransferase e esfinganina N-aciltransferase, isto provavelmente pela similaridade entre as estruturas químicas da toxina e da esfingosina (lipídio encontrado no cérebro) (SANTÚRIO et al., 2002; SCUSSEL, 1998). Muitos estudos têm relatado casos de LEM e EP. Nos Estados Unidos foram identificados vários focos de surtos ocorridos entre 1989 e 1990 em regiões do Arizona e da Pensilvânia, estes relacionados à produção de FBs por cepas de *F. moniliforme* e *F. proliferatum* (NELSON et al., 1997; ROSS et al., 1990). No Brasil, o primeiro caso de LEM reportado foi em 1949 no estado de São Paulo. A síndrome era caracterizada por severos sinais de degeneração nervosa e os animais afetados mais severamente morriam entre 6-72 horas após o aparecimento dos sintomas. Em 1979 dois surtos de LEM foram identificados no Rio Grande do Sul, e entre 1979 e 1996, foram relatados surtos no Paraná, Santa Catarina, Minas Gerais além de São Paulo e Rio Grande do Sul. Os sinais clínicos observados nesses surtos incluíam anorexia, sonolência e depressão ou hipersensibilidade, ataxia e tremores e paralisia uni ou bilateral. A necropsia indicava necrose de um hemisfério cerebral, com presença de áreas amareladas e marrons devido à liquefação cerebral e lesões hemorrágicas (MEIRELES, 2000).

(d) Ocratoxina A

As ocratoxinas são substâncias tóxicas produzidas por várias espécies de fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* (*A. ochraceus*, *A. melleus*, *A. carbonarius*, *A. niger*) compreendendo uma família de sete compostos, sendo que apenas a ocratoxina A (OTA), um derivado da fenilalanina substituída na isocumarina (Figura 10c), parece contaminar alimentos, recebendo maior atenção. Sua produção ocorre principalmente por *Aspergillus ochraceus* e *Penicillium verrucosum* na faixa de 4 e 31; 12 e 37 °C, respectivamente, e em atividade de água superior a 0,85 (PIMENTA; VILELA, 2003; PRADO et al., 2000; SANTIN et al., 2001).

O desenvolvimento dos fungos e produção desta micotoxina está associado a países de clima tropical. A OTA já foi detectada em vários alimentos, incluindo cereais, café, produtos fermentados, cerveja, vinho, suco de uva, rações, produtos de origem animal (carne de aves e suínos) e também pode ser encontrada no soro e leite humano (CHULZE; MAGNOLI; DALCERO, 2006; PRADO et al., 2003; SANTIN et al., 2001).

No Brasil, a OTA tem despertado o interesse de pesquisadores, pois se tem

encontrado concentrações desta micotoxina em café em concentrações que variam entre 0,2 e 360 ng.g⁻¹. Por isso, países exportadores são objetos de regulamentação (LEONI et al., 2001).

OTA coloca em risco a saúde humana e animal devido aos seus efeitos nefrotóxicos, imunotóxicos, mutagênicos, teratogênicos e carcinogênicos. Em aves os principais aspectos da ocratoxicose referem-se a severas lesões renais e hepáticas que resultam em imunossupressão e perda de desempenho. Esta micotoxina parece estar relacionada com a nefropatia endêmica dos Balcãs, doença degenerativa dos rins que afeta exclusivamente população adulta rural. Esta síndrome ocorre em várias regiões do sul e leste da Europa. Mais recentemente, foram descritos evidências de uma possível correlação entre ocratoxina A e desenvolvimento de tumores do trato urinário de seres humanos na Bulgária (CHULZE; MAGNOLI; DALCERO, 2006; PRADO et al., 2000).

A *International Agency for Research on Cancer* classificou esta toxina como possível agente carcinogênico (grupo 2B) em humanos devido a seus efeitos tóxicos (IARC/WHO, 1993)

(e) Zearalenona

A zearalenona (ZON) é uma micotoxina estrogênica não esteroideal sendo classificada como uma lactona ácido fenol resorcílico (Figura 10d) produzida principalmente por espécies de fungos do gênero *Fusarium*, entre elas: *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. equiseti*, *F. moniliforme*, entre outros. Esta toxina está amplamente distribuída por todo mundo, e pode estar presente em vários cereais como: milho, trigo, arroz, aveia, feno e sorgo. Pode ser considerado um fitoestrógeno já que possui propriedades estrogênicas em várias espécies e ocorre naturalmente, estando associada a grãos utilizados na dieta humana bem como ingredientes para rações (MINERVINI et al., 2005; STOPPER; SCHMITT; KOBAS, 2005; SCUSSEL, 2002d; TURCOTTE; HUNT; BLAUSTEIN, 2005).

Em suínos e provavelmente em humanos a ZON é rapidamente absorvida após a administração oral e então é metabolizada por células intestinais. Na intoxicação de suínos os sintomas característicos observados são: inflamação do útero, mamas e vulva, podendo provocar prolapso vaginal em fêmeas púberes e em machos atrofia testicular e inflamação das mamas (SCUSSEL, 2002d).

Esta toxina exhibe uma baixa afinidade por proteínas globulares séricas, por isso altas concentrações da toxina podem ser detectadas no sangue. Desta forma, o aumento da atividade estrogênica parece estar relacionado a estas concentrações. Além disso, a ZON e

seus metabólitos competem por receptores estrogênicos, isto pode explicar as alterações que ocorrem em animais com o decréscimo da fertilidade, aumento da embriotoxicidade e mudanças no peso de glândulas pituitária e adrenal. Em ratos a consequência reprodutiva pela exposição à ZON é uma diminuição da fertilidade, deformidade dos fetos e aborto em casos de ingestão de altas doses da toxina (MINERVINI et al., 2005; TURCOTTE; HUNT; BLAUSTEIN, 2005).

A maioria dos estudos correlaciona os efeitos desta micotoxina sobre órgãos reprodutores periféricos, porém é importante destacar que estrógenos e fitoestrógenos são capazes de atravessar a barreira hematoencefálica em ratos, alterando o gene de expressão neural (TURCOTTE; HUNT; BLAUSTEIN, 2005).

2.6 Fatores que Afetam o Desenvolvimento de Fungos e Produção de Micotoxinas

Com a produção em larga escala de produtos agrícolas, a armazenagem de grãos se tornou imprescindível. Os grãos precisam ser estocados em condições que assegurem a qualidade do alimento antes de seu consumo, inibindo então a contaminação principalmente por fungos.

A deterioração de produtos armazenados, desenvolvimento de fungos e produção de micotoxinas resulta da interação de diversos fatores físicos, químicos e biológicos. Dentre os principais podemos citar: atividade de água (aw), umidade relativa (UR), conteúdo de umidade (CM), temperatura, microclima, composição e pH do substrato, entre outros (JAYAS; WHITE, 2003; SCUSSEL, 1998). Os fungos podem se desenvolver em amplas faixas de temperatura (-2 a 55°C), CM (9 a 23%) e UR (70 a 90%) sendo que cada espécie possui condições ótimas para seu crescimento e proliferação. A Tabela 2 mostra algumas espécies e gêneros de fungos e parâmetros para seu crescimento (SCUSSEL, 2002a).

Tabela 4. Espécies fúngicas e parâmetros de desenvolvimento

Espécie	UR ^a do ar %	CM ^b dos grãos - %	Temperatura °C			Aw ^c mín.
			Mín.	Ótima	Máx.	
<i>Aspergillus halophilieus</i>	68	12-14	-	-	-	-
<i>Aspergillus restrictus</i>	70	13-15	5-10	30-35	40-45	0,75
<i>Aspergillus glaucus</i>	73	13-15	0-5	30-35	40-45	0,70
<i>Aspergillus candidus</i> ,	80	14-16	10-15	45-50	50-55	0,76
<i>Aspergillus ochraeus</i>	80	15-15,2	-	-	-	-
<i>Aspergillus flavus</i>	85	17-18	10-15	30-35	45-50	0,86-0,80
<i>Penicillium</i>	80-90	-	5-0	20-25	35-40	-
<i>Fusarium</i>	90-100	22-23	-	-	-	-

a - umidade relativa do ar b - conteúdo de umidade c - atividade de água

Fonte: Dados compilados da literatura (apud SILVA 2005; SCUSSEL, 2002a).

Os fungos que produzem toxinas podem ser classificados como (a) fungos de campo e (b) fungos de armazenagem. Geralmente os fungos de campo necessitam de maiores UR e CM para a infestação, proliferando quando as condições de UR estão entre 90 e 100 % e o substrato possui um CM entre 22 e 23 %, já os de armazenagem crescem em ambientes com UR entre 70 e 90 % e CM de 15 %. As FBs são exemplos de micotoxinas produzidas por fungos de campo, principalmente do gênero *Fusarium*; AFLs, OTA, EST e CTR são exemplos de toxinas produzidas por fungos de armazenagem (JAYAS; WHITE, 2003; SCUSSEL, 1998). Nos grãos, sementes e alimentos existem interações entre o substrato e o ambiente. Estas interações geram um microclima influenciado pela *aw*, UR, CM, composição gasosa do ambiente, entre outros.

2.6.1 Atividade de água e conteúdo de umidade

A *aw* e o CM são características inerentes ao substrato e estão diretamente relacionados. A *aw* é a água disponível no substrato que pode ser utilizada pelo microrganismo para seu desenvolvimento, ela varia de 0 a 1. Quando a *aw* atinge valores inferiores a 0,62, este parâmetro já não favorece a germinação de fungos. Já o CM é a umidade absoluta do material. Faixas extremas de CM não favorecem a proliferação de fungos, porém apenas CM críticos são seguros (1 a 2 %) uma vez que fungos germinam em ambientes com baixo CM, geram calor e liberação de água, esta por sua vez pode ser utilizada por outras espécies para seu crescimento (SCUSSEL, 2002a).

2.6.2 Umidade relativa

A UR relaciona-se com o equilíbrio entre o alimento e o ambiente. Sendo que grãos que possuem *aw* e CM relativamente baixos quando expostos a um alta UR tendem a absorver umidade (higroscópicos) e favorecer o crescimento de fungos. Mas quando um alimento com alta *aw* e CM é submetido à UR menores, eles tendem a desidratar-se para entrar então em equilíbrio com o meio. Por este fato a secagem de grãos e a manutenção do ambiente de armazenagem em condições de UR controlada são critérios que podem controlar a contaminação por microrganismos (SCUSSEL, 2002a).

2.6.3 Temperatura

A temperatura não se mostra como um fator determinante para a contaminação por fungos, uma vez que ela depende de outros fatores como a disponibilidade de nutrientes, UR, CM e *aw*. Em países tropicais como o Brasil, a temperatura pode ser um agravante na deterioração dos alimentos por fungos e produção de micotoxinas, pois as temperaturas médias em torno de 30 °C correspondem à temperatura ótima para o desenvolvimento de muitas espécies fúngicas (SCUSSEL, 2002a).

2.6.4 Microclima, composição do substrato e outros

A composição de gases no microclima influencia a sobrevivência desses microrganismos, pois apesar de tolerarem baixas concentrações de oxigênio, são inibidos pela presença de altas concentrações de dióxido de carbono e nitrogênio.

A composição do substrato (grãos, sementes, derivados e subprodutos) age como fator seletivo para a determinação da espécie de fungo que será favorecida. Por exemplo, fungos produtores de AFLs necessitam de substratos oleosos, pois são melhores fontes de energia (calor). No entanto, alimentos com pHs inferiores a 5 e superiores a 7 podem inibir o crescimento fúngico (SCUSSEL, 2002a).

Outros fatores que podem afetar o desenvolvimento de fungos e produção de micotoxinas são: competição microbiológica, prevalência de cepas toxigênicas, o uso de fungicidas, danos mecânicos nas sementes, presença de insetos, roedores e luz e o período em que o alimento é armazenado (JAYAS; WHITE, 2003; SCUSSEL, 1998; 2002a; SILVA, 2005).

2.7 Legislação Nacional e Internacional para Micotoxinas em Alimentos para Animais

2.7.1 Animais de produção

Os níveis de micotoxinas na alimentação animal são regulados no mundo inteiro, porém os mesmos são focalizados principalmente para a alimentação de animais de produção.

Para alimentos de consumo animal, ingredientes e rações, o MAPA aprovou a Portaria n. 7 (MA/SNAD/SFA) de 09/11/88 (BRASIL, 1988) que define como limite máximo permitido de AFLs em 50 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$, para o somatório de AFLs ($\text{AFB}_1 + \text{AFB}_2 + \text{AFG}_1 +$

AFG₂).

Embora exista legislação para AFLs no Brasil, ela se mostra muito falha, já que os níveis estabelecidos estão ultrapassados em comparação com alguns países da Europa. Também a legislação brasileira vigente não abrange um número significativo de micotoxinas e produtos regulamentados, sendo necessário que os níveis propostos devam obedecer à toxicidade relativa à espécie que consumirá o produto. 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.

De acordo com a FAO (2004), a distribuição dos limites para AFLs totais (soma das AFLs) nas alimentações animais também são aplicadas ao gado leiteiro, sendo observada uma distribuição relativamente uniforme, com limites de ocorrência em 20 $\mu\text{g.kg}^{-1}$, principalmente na região das Américas.

A Tabela 5 mostra legislações pertinentes em vários países do mundo e grupos econômicos (MERCOSUL e União Européia) quanto aos limites permitidos de micotoxinas em produtos para alimentação animal.

Tabela 5. Limites máximos permitidos na legislação para alimentos destinados para animais de produção

País	Produto	Micotoxina	Limite ($\mu\text{g.kg}^{-1}$)
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
Brasil	Ingredientes e rações semente de algodão, amendoim, arroz, aveia, linhaça, dendê, cacau, mandioca, babaçu, semente de girassol, trigo, soja, leveduras, malte, cana de açúcar, resíduo de vísceras de aves.	Σ AFLs	50
Barbados	Rações	Σ AFLs	50
Canadá	Rações	Σ AFLs	20
	Rações para gado e aves	DON	5000
		HT-2	100
	Rações para porcos, novilhas e animais em lactação	DON	1000
		HT-2	25
	Rações para suínos e aves domésticas	OTA	2000
		T-2	1000
	Rações para bovinos e aves domésticas	DON	5000
		HT-2	100
	Rações para suínos, gado leiteiro, terneiros	DON	1000
	Rações para leitões leitoas	ZON	3000
	Rações para suínos	DAS	2000
	Rações para aves domésticas	Alcalóides do Ergot	6000
	Rações para bovinos, suínos e cavalos	DAS	1000
Rações para frangos	Alcalóides do Ergot	3000	
Chile	Rações	AFB ₁	20
		Σ AFLs	50
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 (para ração)	AFB ₁	50

Colômbia	Rações para gado	∑AFLs	50
	Alimentos para aves	∑AFLs	20
Costa do Marfim	Ingredientes para ração	∑AFLs	100
	Rações prontas	∑AFLs	10
	Rações prontas para porcos, aves (exceto animais jovens e marrecos)	∑AFLs	38
	Rações completas para gado, ovinos e caprinos	∑AFLs	75
	Rações completas para gado leiteiro	∑AFLs	50
Costa Rica	Milho, para alimentação animal	∑AFLs	50
Cuba	Rações e ingredientes para rações	∑AFLs	5
Egito	Alimentos para animais e aves	∑AFLs	20
El salvador	Rações em geral	AFB ₁	10
	Suplementos alimentares para porcos, gado leiteiro; rações para bovinos, caprinos, ovinos	AFB ₁	20
Estados Unidos	Rações de crescimento - aves e suínos	∑AFLs	20
	Ração final - suínos	ZON	2
	Produtos de milho e amendoim para rações finais para bovinos	∑AFLs	300
	Semente de algodão para alimentação de bovinos, suínos e aves domésticas de corte	∑AFLs	300
	Produtos de milho para suínos (>100 lbs)	∑AFLs	200
	Produtos de milho e amendoim para criação de bovinos, suínos ou aves domésticas maduras de corte	∑AFLs	100
	Produtos de milho e amendoim para , e outros ingredientes e rações com exceção de alimentos com semente de algodão para animais imaturos	∑AFLs	20
	Milho e seus produtos, amendoim, alimentos com semente de algodão e outros ingredientes e rações para animais produtores de leite ou espécies não especificados acima ou quando o uso não é conhecido	∑AFLs	20
	Grãos e seus produtos destinados para ruminantes e bovinos (> 4 meses) e frangos	DON	10000
	Grãos e seus produtos destinados para suínos	DON	5000
	Grãos e seus produtos destinados para todos os outros animais	DON	5000
	Milho e seus produtos, destinados para equinos e coelhos	∑ FBs	5000
	Milho e seus produtos, destinados para suínos e bagres	∑ FBs	20000
	Milho e seus produtos, destinados para bovinos, aves domésticas e furões de produção (incluindo vacas leiteiras lactentes e galinhas produtoras de ovos para consumo humano)	∑ FBs	30000
	Ruminates >3 meses para abate e furões para produção de pele	∑ FBs	60000
	Aves para abate	∑ FBs	100000
	Todas as outras species de animais de produção e animais de companhia	∑ FBs)	10000
Filipinas	Rações para aves	∑AFLs	20
	Rações para gado de engorda	∑AFLs	50
Guatemala	Concentrados para rações	∑AFLs	20
Indonésia	Copra em ração para vacas, porcos, marrecos, ovinos	∑AFLs	1000
	Mandioca em ração de frangos	∑AFLs	200
		AFB ₁	20
Israel	Grãos para rações	OTA	300
		T2	100
		DAS	1000
Japão	Rações	AFB ₁	1000
Jordânia	Amêndoas, cereais, milho, amendoim, pistache, nozes de pinheiros, arroz e rações	∑AFLs	30
		AFB ₁	15
México	Cereais para bovinos e rações de engorda para suínos	∑AFLs	200
Nigéria	Rações para vacas leiteiras e aves	∑AFLs	0
	Rações	AFB ₁	50
Omã	Rações completas	AFB ₁	10
	Rações completas para aves	AFB ₁	20
Polônia	Rações, ingredientes para rações, rações completas para gado, ovinos e caprinos	AFB ₁	50
		PTL	30
		OTA	5
Romênia	Rações em geral	DON	5
		Estaquibotriotoxina	0
		Quetomina	0
Senegal	Produtos de amendoim como ração	AFB ₁	50
	Produtos de amendoim como ingrediente para ração	AFB ₁	300
Suriname	Rações	∑AFLs	30
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 leiteiro	AFB ₁	3
	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

	Rações	\sum AFLs	200
União Européia	Todos os ingredientes para ração	\sum AFLs	50
		AFB ₁	20
	Rações completas para bovinos ovinos e caprinos exceto para animais produtores de leite, terneiros e cordeiros	AFB ₁	20
	Rações completas para animais produtores de leite	AFB ₁	5
	Rações completas para terneiros e cordeiros	AFB ₁	10
	Rações completas para suínos e aves domésticas (exceto animais jovens)	AFB ₁	20
	Outras rações completas	AFB ₁	10
	Rações complementares para bovinos ovinos e caprinos exceto (para animais produtores de leite, terneiros e cordeiros)	AFB ₁	20
	Rações complementares para suínos e aves domésticas (exceto animais jovens)	AFB ₁	20
	Outras rações complementares	AFB ₁	5
	Ingredientes para ração		
	• cereais e seus produtos com exceção de produtos com milho	DON	8000
	• Milho e seus produtos		12000
	Rações completas e complementares com exceção:	DON	5000
	• Para suínos		900
	• Para terneiros (< de 4 meses) e cordeiros jovens		2000
	Ingredientes para ração	ZON	
	• cereais e seus produtos com exceção de produtos com milho		2000
	• Milho e seus produtos		3000
	Ingredientes completos e complementares com exceção:		
	• Para leitões e matrizes (porcas jovens)		100
	• Para suínos para engorda		250
	• Para Vitelas, gado leiteiro, ovelhas (incluindo cordeiros) e cabras (incluindo cabritos)		500
Ingredientes para ração	OTA		
• cereais e seus produtos		250	
Ingredientes completos e complementares			
• Para suínos		50	
• Para aves domésticas		100	
Ingredientes para ração	\sum FBs		
• Milho e seus produtos		60000	
Ingredientes completos e complementares para suínos, cavalos (<i>Equidae</i>), coelhos e animais de companhia		5000	
• Peixes		10000	
• Aves domésticas, terneiros (< de 4 meses) e cordeiros jovens		20000	
• Ruminantes adultos (> de 4 meses) e furdões		50000	
Zimbabwe	Rações para aves	AFB ₁ + AFG ₁	10

AFB₁- Aflatoxina B₁, AFB₂ - Aflatoxina B₂, AFG₁ - Aflatoxina G₁, AFG₂ - Aflatoxina G₂, \sum AFLs - Somatório das Aflatoxinas (AFB₁; AFB₂; AFG₁; AFG₂) FB₁ - Fumonissina B₁, FB₂ - Fumonissina B₂, \sum FBs - Somatório das Fumonissinas, OTA - Ocratoxina A, ZON - Zearalenona, DON - Desoxinivalenol, DAS - Diacetoxiscirpenol, PTL - Patulina, T2 - Toxina T2, HT-2 - Toxina HT-2.

Fonte: FAO (2004), EC (2003; 2006).

2.7.2 Animais de companhia

Na maioria dos países, o alimento de animal de companhia é regulado por uma contaminação máxima de micotoxina generalizada, ou seja, para todos os tipos de animais, e não por uma legislação específica para este tipo de produto (LEUNG; DÍAZ-LLANO; SMITH, 2006).

No Brasil, embora já exista legislação específica para padronização da identidade de alimentos para cães e gatos isso não ocorre para outras espécies de animais de companhia. Neste regulamento também não é realizada menção quanto aos níveis máximos permitidos para micotoxinas.

Os regulamentos governamentais da contaminação por micotoxinas parecem refletir limites de detecção analíticos e a predominância regional assim como os relacionamentos de

comércio entre diferentes países, mas não representam necessariamente o limite seguro para a exposição dos animais de companhia às micotoxinas. Desta forma, em alguns países foram criadas associações com o intuito de colaborar com produtores e órgãos fiscalizadores para a manutenção da qualidade dos produtos para animais de companhia, por exemplo, nos Estados Unidos existe a *Association of American Feed Control Officials* (AAFCO) que colabora com outros órgãos na defesa destes produtos e no Brasil a já mencionada Associação Nacional dos Fabricantes de Alimentos para Animais de companhia (ANFAL-PET).

Tabela 6. Níveis máximos de micotoxinas permitidos em produtos acabados utilizados na nutrição de animais de companhia

Micotoxinas	Limites para produto acabado (ppb) ^a
Aflatoxina Total (B ₁ +B ₂ +G ₁ +G ₂)	20
Aflatoxina B ₁	10
Ocratoxina A	50
Fumonisina (B ₁ +B ₂)	5000
Zearalenona	200
DON (Vomitoxina)	1000
Citrinina	500
Nivalenol	100
T2	100

a- µg/kg

Fonte: Adaptado de ANFALPET (2007).

2.8 Metodologias analíticas para determinação de aditivos alimentares

2.8.1 Corantes

Os métodos para análise de corantes artificiais são baseados principalmente em técnicas cromatográficas, espectrofotometria e eletroforese capilar. Porém, todos esses métodos exigem que etapas analíticas sejam realizadas anteriormente à detecção e quantificação do corante. Essas etapas são: preparo da amostra, a extração do corante, limpeza do extrato e, detecção e quantificação do corante.

O preparo da amostra depende do tipo e composição da amostra corada, geralmente, ocorre desengorduramento do alimento e moagem. Em seguida soluções ou solventes são misturados à amostra para a extração da toxina. Essa etapa não é seletiva, dessa forma outras substâncias interferentes são extraídas juntamente, para purificar o extrato do corante é então realizada uma ou mais etapas de limpeza Atualmente, diferentes tecnologias têm sido aplicadas para a limpeza dos extratos. Após a separação dos interferentes, a análise dos extratos pode ser realizada para detecção e quantificação do corante (BRASIL, 2005).

Dentre os métodos clássicos de análise de corantes artificiais em alimentos estão a cromatografia em papel (CP) e a cromatografia em camada delgada (CCD). Esses métodos começaram a ser utilizados para análise de alimentos nas décadas de 60 e 70 (CHIANG, 1969; CHIANG; LIN, 1969; HADDAD, 1997; CLERQ; MASSART, 1974).

Os primeiros trabalhos de separação e identificação dos corantes artificiais foram baseados nos trabalhos de Arata, o qual nomeou os métodos de cromatografia em papel, conhecido também como método da lã natural. Esta técnica sofreu algumas modificações, mas continua sendo utilizada, sendo ela baseada na adsorção dos corantes artificiais pela lã natural. Após algumas etapas de extração com solução amoniaca, as amostras concentradas neutras dos corantes são separadas através da cromatografia em papel. Esta metodologia permite diferenciar corantes naturais de artificiais, pois os naturais não se ligam à lã, ou seja, não são desorvidos, tornando essa etapa de extração também uma etapa de limpeza. Porém, cabe salientar, que essa técnica apresenta algumas desvantagens, como os longos períodos necessários para a realização de todas as etapas analíticas a fim de obter um extrato puro, a lenta e incompleta adsorção que alguns corantes e como os extratos são submetidos temperaturas elevadas e variações extremas de pH a estrutura dos corantes podem apresentar mudanças irreversíveis e dificultar sua identificação. Além disso, as matrizes de análise complexas podem interferir na fixação do corante à lã (LEHMANN, et al., 1970; PEARSON, 1974; YANUKA, et al., 1963).

Outros métodos cromatográficos também utilizados são a CCD, cromatografia de camada delgada de alta eficiência (CCDAE) e cromatografia em coluna (CC). Ambas as técnicas são semelhantes à CP, porém os solventes de extração e o eluente e a fase estacionária são de naturezas diferentes. CCDs e CCs utilizando alumina e sílica gel 60, poliamida, celulose, apresentam bons resultados na separação de corantes e quantificações satisfatórias quando acoplados a análise densitométrica (BIZZOZERO; MICHELI, 1983 RIZOVA; STAFILOV, 1995; ANDERTON; INCARVITO; SHERMA, 1997).

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é um método que foi desenvolvido para substituir os anteriores, uma vez que os métodos clássicos não apresentavam separações satisfatórias para análises de compostos complexos. Além disso, esta metodologia possui um alto poder de separação e capacidade de detecção de limites muito pequenos das substâncias objetos de análise. As evoluções dessa técnica ocorreram principalmente em decorrência do uso de colunas de separação (fase fixa) com materiais mais desenvolvidos e com natureza diversa (C18, C8, troca iônica, entre outros), além do uso de diferentes gradientes de eluição e fases móveis (mistura de solventes e soluções tamponadas)

(McKONE; IVIE, 1980; CALVEY; GOLDBERG; MADIGAN, 1981; MACRAE, 1981; GOLDBER; CALVEY, 1982; SINGH, 1982).

De acordo com Prado e Godoy (2002), o uso deste tipo de sistema tem apresentado bons níveis de detecção, com análises bastante rápidas. Os autores desenvolveram e validaram métodos para separação simultânea de corantes artificiais permitidos pela legislação brasileira em alimentos e bebidas utilizando a CLAE, uma vez que, essa metodologia é uma das principais técnicas para análise de corantes em alimentos e poucos sistemas foram desenvolvidos para a separação simultânea desses corantes

Outros métodos para identificação e quantificação de corantes artificiais é a espectrometria. Esta metodologia dispensa a necessidade de separação dos mesmos, porém esse método necessita que os corantes não apresentem uma alta sobreposição de seus espectros, e assim possam ser identificados e quantificados de maneira satisfatória. A maior desvantagem da utilização desse método é quando se têm grupos de corantes que apresentam máximos de absorvância muito próximos, espectros com grande área de sobreposição ou misturas de corantes (OHLWEILER, 1991; NI; GONG, 1997; TAKAHASHI; YABIKU; MARSIGLIA, 1988).

Atualmente, a eletroforese capilar (EC) vem sendo apontada como uma alternativa bastante satisfatória para a determinação dos corantes nos alimentos, por ser uma técnica simples, além de apresentar menores custos e maior durabilidade da coluna e menores tempo de análise, volume de amostra, logo menor custo final de análise (FRAZIER; AMES; NURSTEN, 1999). Além disso, EC oferece vantagens sobre a CLAE e outras técnicas cromatográficas devido ao pouco uso de solventes químicos, velocidade de análise e maior eficiência de separação. Entretanto, as limitações da EC incluem sua baixa sensibilidade e limpeza freqüente das colunas (BUICK; TRENERRY, 1995; MAZAR; KANIANSKY; MADAJOVA, 1996; FRAZIER; AMES; NURSTEN, 1999).

Das diferentes técnicas existentes em EC, os tipos de eletroforese capilar que se destacam para determinações de corantes artificiais são: a por zona (CZE) e a micelar (CME). Muitos trabalhos confirmam que a CZE pode ser aplicada com sucesso em análise de alimentos na determinação de várias substâncias, como, os corantes artificiais; as vitaminas hidrossolúveis, incluindo a C, B1, B2, B3; conservantes como o ácido benzóico e sórbico; adoçantes artificiais, incluindo o ciclamato, sacarina aspartame e acessulfame K; ácidos orgânicos; e ânions como os cloretos, nitritos e nitratos (HADDAD, 1997; PÉREZ-URQUIZA; BELTRÁN, 2000; PRADO; GODOY, 2002), porém são poucos os trabalhos existentes na literatura que utilizam esta técnica para análise de corantes artificiais. As

variações existentes nas técnicas de CZE e CME vão desde o simples uso do tampão (borato ou fosfato) até o uso destes com tensoativos. Embora não seja uma técnica recente, somente nas últimas décadas a EC vem se destacando como uma possível técnica a ser aplicada na rotina dos laboratórios. A CLAE tem sido usada como principal parâmetro de comparação das performances da EC, seja em termos de limites de detecção ou quantificação, seja em termos de teores dos analitos (JANDERA et al., 1996; JIMIDAR et al., 1993; KUNKEL et al., 1997).

2.9 Metodologias Analíticas para Determinação da Micobiota e Micotoxinas

2.9.1 Micobiota: contagem total de bolores e leveduras e verificação do potencial toxigênico

As análises microbiológicas de alimentos envolvem a enumeração de microorganismos presentes nas amostras. Três são os principais métodos empregados para este fim, sendo eles: contagem em placas, número mais provável e filtração por membrana.

Dentre os métodos citados anteriormente, as técnicas do plaqueamento por diluição são projetadas para determinar populações de fungos viáveis por unidade de peso ou volume de alimento. As técnicas de plaqueamento direto, por outro lado, são projetadas para avaliar a micoflora interna de partes ou de alimentos individuais, por exemplo, sementes ou frutas secas, e os resultados são expressos em porcentagem das partes contaminadas (BEUCHAT, 1992).

Ambas as técnicas são usadas pela indústria e por entidades reguladoras para monitorar níveis de contaminação fúngica nos estágios da manipulação, armazenagem, processamento e venda do alimento. A água peptonada (0,1 %) é o principal diluente utilizado para homogeneizar e misturar as amostras. Diluentes tamponados que contêm até 30 % de glicose ou de 60 % de sacarose são recomendados para a enumeração de fungos xerófilos. Nenhum meio de cultura é eficaz o suficiente para detectar, isolar e enumerar todas as leveduras em todos os tipos de alimentos (BEUCHAT, 1993). O autor verificou que o ágar dicloran rosa de bengala – cloranfenicol, o ágar do extrato de levedura glicose oxitetraciclina e o ágar rosa de bengala - cloranfenicol são superiores ao ágar batata dextrose acidificado, para a enumeração de fungos e leveduras. Já o ágar glicerol – Dicloran 18% executa bem a enumeração leveduras e bolores xerófilos moderados. Nenhum meio de cultura é eficaz o suficiente para detectar, isolar e enumerar todas as leveduras em todos os tipos de alimentos.

De acordo com Braendlin (1996), os xerófilos fastidiosos exigem meios que contenham concentrações elevadas de açúcares e/ou de cloreto de sódio. Os meios têm sido

formulados para detectar o potencial aflatoxigênico de *Aspergillus* e cepas micotoxigênicas de *Penicillium* e *Fusarium*, porém é necessário que a seletividade e especificidade dos meios para detectar fungos micotoxigênicos sejam aumentadas. Os bolores ascósporos resistentes ao calor exigem freqüentemente o tratamento térmico antes do plaqueamento a fim ativar o processo da germinação. A técnica de espalhamento em placa é preferida sobre a técnica de estriamento para enumerar leveduras e bolores. A temperatura recomendada da incubação é 25 °C, mas o tempo da incubação entre o plaqueamento e a contagem das colônias pode variar de 5 dias para a determinação de populações gerais da micoflora a 4 semanas ou mais para xerófilos fastidiosos.

Para Beuchat (1993) e Askun, Eltem e Taskin (2007), o ágar dicloran glicerol (18 %), ou DG18, executa bem enumerando leveduras moderadamente xerotolerantes. O extrato de levedura malte com glicose (até 60 %) pode ser usado para a detecção e contagem de xerófilos moderados a extremos.

Existe a necessidade para o desenvolvimento de meios de cultura novos e melhorados para isolar seletivamente vários grupos, gêneros, espécie e/ou estirpes de fungos capazes de crescer somente sob condições ambientais específicas, por exemplo, baixa *aw* ou, no caso das células feridas quase mortalmente, sob as condições que facilitam sua reabilitação. Dentre as características requeridas para esses meios melhorados, pode-se destacar a necessidade de detectar exatamente os fungos produtores de micotoxinas específicas em diferentes de tipos do alimento (SAMSON et al., 2002).

Desta forma, observa-se que existe a necessidade de desenvolvimentos de meios novos e melhorados para isolar seletivamente vários grupos, gêneros, espécies e estirpes de leveduras capazes de crescer somente sob condições ambientais específicas em tipos específicos de alimentos e de bebidas.

2.9.2 Micotoxinas

Uma grande área envolvendo a toxicologia de alimentos é a contaminação fúngica e o conseqüente aparecimento de micotoxinas, isso se deve ao fato que os alimentos servem como substrato riquíssimo para o desenvolvimento dos mesmos. Desta forma, cada vez mais, pesquisadores tem se empenhado em desenvolver novas técnicas e métodos para a análise dessas toxinas. As pesquisas que envolvem estes métodos visam torná-los mais rápidos, sensíveis, precisos, porém com esta evolução o custo dos equipamentos e das análises tem aumentado.

Os métodos utilizados para detecção e determinação de micotoxinas podem ser divididos em: ensaios químicos, imunoenaios e ensaios biológicos.

- a) **químicos:** os ensaios químicos são geralmente os métodos mais utilizados para análises de micotoxinas uma vez que são rápidos, baratos, sensíveis e reprodutíveis;
- b) **imunoenaios:** a metodologia para imunoenaios combina métodos químicos e biológicos, são rápidos, mas possuem o inconveniente do custo elevado. Os imunoenaios podem ser aplicados em diversas etapas da análise de micotoxinas, por exemplo, colunas de imunoafinidade são utilizadas para a limpeza de extrato e separação de toxina, já o *radio immuno assay* (RIA), é utilizado na fase de detecção e quantificação. Os kits de *enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA) podem ser aplicados na triagem de toxinas, porém resultados quanto à reprodutibilidade e acuidade desse método ainda são controversos. Avaliações estão sendo realizadas por órgãos internacionais competentes garantindo segurança nos testes (SCUSSEL, 2002c);
- c) **biológicos:** os ensaios biológicos geralmente são indicados para pesquisa e identificação de toxinas desconhecidas. Para a realização desses ensaios são utilizados animais de laboratório, cultura de células e microrganismos, embriões e tecidos. Após a identificação e isolamento da nova toxina, outros métodos (químicos e imunoenaios) podem ser desenvolvidos para as análises subsequentes de detecção e quantificação (SCUSSEL, 1998).

As etapas analíticas envolvidas na análise de micotoxinas em alimentos são: amostragem, preparo da amostra, extração da toxina, limpeza do extrato, detecção, quantificação e confirmação da toxina

Analisar um produto em vários pontos da cadeia produtiva tornou-se um modo de assegurar sua qualidade. Para tanto é necessário que toda a produção obedeça aos mesmos critérios de qualidade, ou seja, esteja uniforme. Para Fonseca (2000), o primeiro passo para que a análise de micotoxinas tenha êxito, deve ser uma correta amostragem, sendo que a coleta da amostra ou calagem deve ser realizada sempre ao acaso e em lugares diferentes, para que os resultados não sejam viciados ou não representativos (SCUSSEL, 1998).

(a) Amostragem

A amostragem tem como objetivo, coletar uma amostra que seja uma parte

representativa do todo. A contaminação por micotoxinas pode-se dar de forma muito heterogênea, por isso quando realizada a calagem, ou seja, a coleta de amostra representativa deve ser realizada de acordo com planos amostrais e obedecer a critérios estatísticos simples (FONSECA, 2000). Alimentos como grãos, sementes, nozes possuem uma distribuição de toxinas mais heterogênea, que farinhas, pastas, pós, e líquidos, desta forma o tamanho da amostra para o primeiro grupo de alimentos deve ser maior que para os posteriores. Lotes com tamanhos acima de 50 toneladas ou armazenados em silos (grande quantidade) dificultam o processo de amostragem, uma vez que a tomada da amostra dificilmente será representativa. Para cada tipo de amostra e tamanho de lote deve-se utilizar o coletor mais apropriado. Para coleta de grãos em sacas deve-se utilizar calador em forma de lança, com comprimento de 20 a 30 cm e entradas laterais por onde os grãos entram e posteriormente saem através do cabo (capacidade = amostras < 100 g) (FONSECA, 2000; SCUSSEL, 1998).

Outros coletores são: coletor para grãos com seções com capacidade de coleta de amostras de até 1 Kg; coletor de grãos a vácuo, que possui capacidade ilimitada e atinge profundidade de até 30 metros, coletor de fluxo acoplado a amostrador de gravidade que controla o tamanho da amostra; coletor de amostra em correias transportadoras (manual ou mecânico) coletando a amostra com canecos à medida que a correias se desloca. Os amostradores mais recentes são automáticos e conseguem amostrar em pouco tempo um grande lote (15 a 70 amostras de 100 g/hora). Para coletas manuais indica-se calador composto com vários compartimentos, assim a amostragem ocorre em toda a altura de cada ponto de furo. Já com caladores automáticos por aspiração deve-se inserir o calador fechado até a porção inferior, coletar a amostra, fechar e levar até a porção intermediária, coletar novamente e fechar o calador, por fim coletar uma porção da parte superior (DALPASQUALE, 2002).

Em amostras a granel, transportadas por caminhões, o procedimento de calagem pode ser realizado determinando-se: o número de locais que serão feitas as coletas (furos) de acordo com o tamanho da carroceria (FONSECA, 2000).

Quanto à escolha dos pontos de coleta, Dalpasquale (2002) indicou método como critério de aleatoriedade, desta forma para uma série de veículos o plano sempre será aleatório. O método baseia-se em dividir a carroceria do caminhão em 2 medidas: largura (x) e comprimento (y), o comprimento é então dividido em 10 porções iguais e a largura em 4. Após o sorteio de 4 a 10 números para o comprimento, sorteia-se um número par ou ímpar para largura. A correlação entre as duas variantes x e y indica os pontos de coleta

As características a serem verificadas incluem a composição aproximada, o conteúdo

de umidade, presença de bolores e insetos, e a presença de micotoxinas. Ao contrário das características nutritivas, as micotoxinas não são distribuídas uniformemente nos grãos.

Cucullu, Lee e Pons (1977) e Johnson e Greenaway (1969) relataram que a contaminação individual de sementes pode sofrer grandes variações, tanto em amostras de diferentes locais de armazenamento (silos) como em embalagens do mesmo lote. De acordo com Blanc (2006), a operação de amostragem é frequentemente a fonte de erros na análise de micotoxinas devido à distribuição desigual dessas substâncias nos grãos.

Miraglia et al. (2005) afirmam, que o protocolo de amostragem ideal deve (1) incluir a análise objetivo-orientada para determinar porque, onde, e quando obter amostras; e (2) levar em consideração a natureza heterogênea da contaminação por micotoxinas. O Ministério da Agricultura dos Estados Unidos da América (USDA) preconiza que sejam amostrados no mínimo 5 kg, sendo que para uma subamostra sejam coletados 250 g, para uma única análise de cromatografia de camada delgada (CCD). De acordo com Whitaker, Dickens e Monroe (1974), a variação total associada a este procedimento é 630,7, incluindo 521,4 (82,7 %) devido à amostragem, 59,2 (9,4 %) devido à subamostragem, e 50,1 (7,9 %) devido à análise por CCD. Porém, segundo os mesmos autores, ao aumentar o tamanho de amostra para 20 kg utilizando um misturador vertical, e coletar uma subamostra de 100 g ao invés de 250 g homogeneizando-as, e substituindo o método de CCD por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) pode-se reduzir a variação total a 176. Além disso, Campbell, Whitaker e Pohland (1986), ações como moer a subamostra em partículas menores que a amostra, homogeneizar e subdividi-la também reduzem a variabilidades da análise.

Para determinar a aceitação ou rejeição de um lote de produto, geralmente, existem níveis de tolerância máxima para algum tipo de micotoxina. Se a amostra referente a este lote não é coletada apropriadamente, um lote com concentrações de micotoxinas mais elevadas do que o máximo permitido pode ser aceito, bem como um lote com concentrações de micotoxinas baixa pode ser rejeitado. Logo, reduzir a variabilidade, conseqüentemente reduzirá o risco para o vendedor e o comprador de rejeitarem uma expedição aceitável ou de aceitarem uma expedição inaceitável (BLANC, 2006; WHITAKER, 2003).

Após a coleta, todo o material amostrado ele deve ser homogeneizado ou quarteado. O quarteamento pode ser realizado manualmente ou mecanicamente através de divisores, até a obtenção de uma subamostra com massa desejada. Para amostras muito grandes devem ser utilizados subamostradores automáticos. Alguns exemplos de quarteadores mecânicos são: bandeja divisora com cavidade ou com compartimento, divisor de Boerner e divisor Gamet. A Figura 11 mostra alguns exemplos de divisores (FONSECA, 2000; SCUSSEL, 1998).



Figura 11. Tipos de divisores de amostras: (a) divisor de Boerner e cargo; (b) divisor de precisão elétrico e (c) divisor de Gamet

(b) Preparo da amostra

A amostra bruta, coletada de caminhões, silos, sacas, entre outros, não possui tamanho ideal para a análise de micotoxinas, desta forma, é requerido que seja dividida em amostras médias das quais serão coletas as subamostras ou também chamadas de amostras analíticas.

Para que se obtenham amostras analíticas representativas do lote todo, é necessária uma homogeneização eficiente e a amostra deve ser sempre identificada. No rótulo deve conter o tipo de produto, o número do lote, a data de coleta, nome do responsável pela amostra. Não esquecendo que o acondicionamento da mesma deve ser realizado de forma a manter suas características inalteradas (FONSECA, 2000).

Se a massa da subamostra permanecer ainda grande, novo quarteamento pode ser realizado até a obtenção de uma amostra analítica com massa conveniente para análise. Como abordado anteriormente, a variação na subamostragem é menor do que aquela vista na amostragem. De acordo com Campbell, Whitaker e Pohland (1986), as subamostras devem ser preparadas por: (1) moagem grosseira de 1 kg da amostra a um tamanho de partícula que possa passar em tela de tamiz tamanho padrão 14; seguida de (2) mistura para homogeneização do material; (3) subdivisão para moagem adicional mais fina (passar uma tela de tamiz padrão 20); e (4) pesagem de uma subamostra para a análise que pode ser 25-100 g.

(c) Extração da toxina

A extração tem como objetivo retirar ou isolar o analito desejado através da dissolução quantitativa do mesmo em um solvente. A extração pode ser executada em 2 fases

imiscíveis ou em uma fase contínua, geralmente não é um método seletivo e a limpeza do extrato é quase sempre requerida (KOS; KRŠKA, 2006).

A escolha do solvente é uma etapa importante, pois além de ter afinidade com a toxina, ele deve mantê-la estável, ser de fácil recuperação, não ser tóxico ou inflamável, além disso, devem ser observadas algumas características do solvente que podem interferir nas etapas da análise, como: volatilidade (mais volátil, mais fácil de concentrar); estabilidade (térmica, quando o extrato deve ser aquecido) e coloração (interfere na visualização no UV-vis.) (KOS; KRŠKA, 2006).

(d) Limpeza do extrato

A limpeza do extrato da amostra tem como finalidade a remoção de substâncias que possam interferir na análise da toxina. Este procedimento pode ser tipo partição sólido-líquido (precipitação); partição líquido-líquido e extração de fase contínua (colunas C_8 e C_{18} , de troca iônica e imunoafinidade).

- a) partição sólido-líquido: é baseada na precipitação das substâncias indesejáveis pela adição de adsorventes ou compostos precipitantes ou ainda formação de compostos insolúveis. Após a precipitação o extrato é separado dos interferentes por filtração. Alguns agentes precipitantes são: carbonato de cobre, gel férrico, sulfato de amônia (SCUSSEL, 1998);
- b) partição líquido-líquido: este método de limpeza está baseado na utilização de solventes imiscíveis e migração do analito por afinidade. Esta técnica exige quantidades maiores de solventes e é menos usada, pelas perdas de contaminação ocasionadas por adsorventes como lã de vidro e sulfato de sódio anidro (KOS; KRŠKA, 2006);
- c) limpeza por extração de fase contínua (SPE): este tipo de limpeza tem sido empregada em substituição às anteriores, e está baseada na separação da toxina pelo uso de colunas. Antes da aplicação do analito, a coluna é condicionada para que o analito encontre um ambiente favorável para sua retenção, após isso ele é eluído e coletado para ser concentrado. A coluna utilizada neste método (C_8 e C_{18}) pode ser substituída de acordo com as características da micotoxina, por exemplo, colunas de troca iônica podem ser utilizadas para toxinas que conseguem ser ionizadas. A coluna de troca aniônica (SAX) é empregada para isolar FBs através de atração eletrostática entre as cargas adquiridas no condicionamento da coluna

de sílica. Porém outras substâncias carregadas podem ficar retidas na coluna; Ventura et al. (2006) descreveram um método para detecção de concentrações de 0,1 µg/L de para AFLs e OTA simultaneamente utilizando na etapa de limpeza cartuchos SPE e e para quantificação cromatografia líquida de ultraperformance acoplada a detector de massas (CLUP ou UPLC).

- d) já colunas de imunoafinidade (IAC) são extremamente específicas uma vez que as moléculas da toxina ficam aderidas a anticorpos monoclonais presentes na coluna e ativos após um pré-condicionamento, enquanto os interferentes não são capazes de ficarem retidos (KOS; KRŠKA, 2006). De acordo com Castegnaro et al. (2006), a tendência atual para a etapa de limpeza dos extratos da análise do micotoxinas é o uso de IACs, pois estas melhoram a sensibilidade do método;
- e) outras formas de limpeza são a cromatografias de minicoluna (MC) e a cromatografia de camada delgada (CCD), que além de serem formas de triagem, também colaboram com a separação de interferentes.

Cabe reassaltar, que a medida que novos protocolos de limpeza e purificação são desenvolvidos para os métodos cromatográficos, os limites de detecção e quantificação para diferentes micotoxinas podem ser reduzidos.

(e) Detecção, quantificação e confirmação

De acordo com Leung, Días-Llano e Smith, (2006), vários métodos foram e ainda são desenvolvidos para CCD e CLAE para a quantificação de micotoxinas em produtos agrícolas e alimentos. Os métodos objetivam diminuir os limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ), analisar muitas toxinas simultaneamente utilizando apenas uma amostra para extração, tornando assim a análise mais rápida e segura.

Para analisar AFLs, a CCD é fácil e descomplicada e exige equipamentos mais baratos do que os outros métodos analíticos. Alguns pesquisadores afirmam que limites de detecção para AFLs em milho e refeições da semente de algodão utilizando CCD podem ser tão baixos quanto os outros métodos cromatográficos (JOHNSON; GREENAWAY, 1969). Em contra partida Pons Jr. e Franz (1978) destacam que a exatidão da CCD, é menor se comparadas a outros métodos mais caros tais como CLAE. Para analisar ZON, a CCD é menos sensível com um limite de detecção de 50 µg/kg, já por cromatografia gasosa com detector de massas (CG-MS) o limite da detecção e de quantificação para esta micotoxina é de 0,5 e 20 µg/kg, respectivamente. Para a análise de tricotecenos as metodologias de CCD e CG

são limitadas, uma vez que substâncias interferentes atrapalham o cromatograma, provocando confusão na identificação das toxinas. Além disso, o uso de CLAE para a detecção dessas micotoxinas é consideravelmente difícil porque estas não absorvem luz UV e não apresentam fluorescência naturalmente. Desta forma, para análise de tricotecenos a técnica mais apropriada é a CG-MS, pois elimina a maioria das complicações relativas às substâncias que interferem na detecção dessas toxinas (MIROCHA; CHRISTENSEN, 1982). Tanaka et al. (2000), descreveram em um estudo, uma metodologia de multitoxinas, para a determinação simultânea do deoxinivalenol, acetildeoxinivalenol 3, do nivalenol, do fusarenona-X, T-2, neosolaniol, diacetoxiscirpenol, ZON por CG-MS. Logo este método mostrou-se uma ferramenta conveniente para a detecção dos tricoteceno e ZON nos cereais.

Os kits comerciais de imunoensaio tipo *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) são simples, baratos, rápidos, e adotado extensamente como métodos de análise de micotoxinas para a seleção de ingredientes na recepção de matérias-primas para alimentos. Porém este método pode produzir os resultados falso-positivos, devido às reações cruzadas entre antígeno-anticorpo, desta forma, a utilização de outros métodos como CLAE e CG podem ser necessário (SCUDAMORE, 2005). O desenvolvimento novas técnicas e tecnologias moleculares de recombinação gênica de anticorpos (monoclonais e policlonais) específicos para micotoxinas prometem aplicações novas para ELISA e para a purificação dos extratos das amostras (WEISS et al., 2003; YAU; LEE; HALL, 2003).

O método de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) tem sido usado principalmente no campo de micotoxinas, para a separação de componentes da matriz e posterior detecção e quantificação do analito de interesse. Os métodos de CLAE estão cada vez mais difundidos, devido ao seu desempenho e confiabilidade superiores quando comparados com CCD (SCUDAMORE, 2005; KOS; KRŠKA, 2006).

Na CLAE uma fase móvel (ou o solvente) é usada para transportar a amostra através da coluna, que é empacotada com uma fase estacionária. O analito é dividido então entre as duas fases enquanto passa através da coluna, conduzindo a uma separação dos compostos devido aos coeficientes diferentes. Dois tipos de CLAE são comuns: cromatografia de fase normal com uma fase estacionária polar (coluna C₈) e um solvente apolar (por exemplo hexano) ou de fase reversa, usando com uma fase estacionária apolar (coluna C₁₈) e com solvente polar. A cromatografia de fase reversa com coluna C₁₈ (apolar) é a mais utilizada para a determinação de micotoxinas em produtos agrícolas. Através da coluna uma mistura de solventes polares (água:metanol ou água:acetonitrila) é eluída e separa os componentes de interesse que ao momento de sair da coluna possuem seu tempo de retenção determinado. As

técnicas da extração e de limpeza são aplicadas antes da separação e detecção por CLAE para que os resultados não sofram interferência de certas substâncias (SCUSSEL, 1998).

Para a detecção de micotoxinas, existem vários tipos de equipamentos detectores, os mais utilizados são: disposição de diodo (DAD), fluorescência (FD) e ultravioleta visível (UV-vis), massa (MS) e massa/massa (MS/MS). O DAD é um detector capaz de através de um sistema multicanal medir vários comprimentos de onda simultaneamente. O solvente interfere geralmente com as medidas do espectro e somente um número limitado de comprimento de ondas está acessível para a detecção. As velocidades de exploração são lentas, mas os sistemas são simples e fáceis de usar. Os limites de detecção estão em escala menor que $1 \mu\text{g.kg}^{-1}$, dependendo das técnicas da extração e limpeza do extrato empregado (KOS; KRŠKA, 2006).

A detecção por FD usa a emissão da luz das moléculas que foram excitadas a níveis de energia mais elevados por absorção de energia eletromagnética, por isso possui uma sensibilidade maior embora frequentemente a derivatização do analito seja necessária. Um detector típico de fluorescência contém uma fonte clara UV (lâmpada do deutério ou de xenônio), a pilha do fluxo (acoplada ao CLAE) e o detector. Um comprimento de onda de excitação e de emissão é escolhido com o monocromador. A luz fluorescente emissora é dispersa por um segundo monocromador e detectada com um tubo de fotomultiplicação (KOS; KRŠKA, 2006).

Os métodos mais modernos de detecção de micotoxinas envolvem detectores MS ou MS/MS acoplados à CLAE. Os métodos de determinação de multi-micotoxinas têm sido desenvolvidos na tentativa de analisar o maior número possível de micotoxinas em uma amostra com apenas uma extração. Os métodos recentes focalizam na identificação e na quantificação por cromatografia líquida com detector de massa (LC-MS). Os limites de detecção para todas as micotoxinas determinadas por CLAE são geralmente menores que $\mu\text{g.kg}^{-1}$ (KOS; KRŠKA, 2006).

A cromatografia líquida com detecção por espectrometria de massa (LC-MS) é uma das técnicas mais avançadas disponíveis para a detecção dos micotoxinas. As técnicas de extração e limpeza têm que ser aplicadas antes da separação e da detecção a fim permitir picos bem separados sem interferência dos componentes da matriz. A ionização das moléculas é fornecida por diversos bombardeios químicos, as fontes de ionização mais utilizadas são *eletrospray* (ESI) e ionizador químico a pressão atmosférica (APCI). APCI é baseado na ionização da amostra e as moléculas do solvente com uma descarga, enquanto que o ESI emprega gotas carregadas que são produzidas forçando a solução do analito através de

uma agulha. Um potencial é usado, para que a dispersão da solução emergente seja alta o suficiente para pulverizar finamente as gotas carregadas. O solvente evapora afastado, encolhendo o tamanho da gota e aumentando a concentração da carga na superfície da gota. Eventualmente, a tensão de superfície da gota alcança um ponto em que a gota explode, dando forma a uma série de gotas menores, menos carregadas. O processo é repetido até que os íons individualmente carregados do analito tenham se formado. A fragmentação ocorre em uma câmara da colisão, e os fragmentos são incorporados à região de alto vácuo do MS onde a detecção ocorre. Os instrumentos de captura de íons são geralmente melhores para a identificação do que instrumentos quadrupole triplos, visto que os instrumentos quadrupole triplos fornecem a informação melhor para a quantificação (exploração mais rápida, sensibilidade mais elevada). Com a disponibilidade crescente de instrumentos de LC-MS e do desenvolvimento de métodos, a identificação e a quantificação estão tornando-se cada vez mais populares para produtos como cereais, amendoins, frutas secas, entre outros. Devido à seletividade elevada do instrumento (os fragmentos do analito podem ser identificados e quantificados) alguns casos são possíveis reduzir o número de etapas da preparação da amostra e injetar extratos crus (KOS; KRŠKA, 2006).

2.10 Contaminação de Alimentos Completos por Fungos, Micotoxinas e Outros Contaminantes

2.10.1 Fungos e Micotoxinas

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

Scudamore et al. (1997) analisaram 100 amostras de alimentos completos, sendo 35 de alimentos secos para cães, 35 alimentos secos para gatos, 15 alimentos para aves companhia e 15 para aves selvagens (silvestres). As toxinas analisadas foram AFB₁, OTA e FB₁. No total de amostras, 16 % estavam contaminadas com algum tipo de micotoxina, sendo que nas amostras para aves, das 30 analisadas 23,3 % (7) estavam contaminadas. Nas amostras contaminadas com AFB₁ 28,6 % (2), os níveis de contaminação encontrados foram de 2,1 e 370 µg.kg⁻¹. Para OTA, 10% (3) das amostras estavam contaminadas e os níveis de contaminação variavam de 1 a 7 µg.kg⁻¹. Do total de amostras analisadas para FB₁ (n=20), 30

% apresentaram contaminação que variava de 90 a 690 $\mu\text{g.kg}^{-1}$. Além da contaminação por micotoxinas esse estudo também verificou a contaminação por fungos em 10 amostras de alimentos completos, 5 para cães e 5 para gatos, quando submetidas às condições úmidas controladas de armazenagem. Inicialmente, a contagem de bolores era muito baixa em todas as amostras analisadas, após o tratamento nas amostras com maior conteúdo de umidade era possível visualizar os bolores na superfície. As principais espécies fúngicas identificadas foram: *Penicillium*, *Eurotium* e *Aspergillus*, porém em nenhuma dessas amostras foi encontrado contaminação por AFBs ou OTA.

A micoflora de alimentos completos comercializadas na Argentina também foi avaliada. Neste estudo Bueno, Silva e Oliver (2004) coletaram 21 amostras secas de alimentos completos, sendo 12 para cães e 9 para gatos. As rações eram de 8 marcas diferentes tanto de procedência nacional como internacional. Os principais gêneros encontrados foram: *Aspergillus* (62 %), *Rhizopus* (48 %) and *Mucor* (38 %). Dentre as espécies com maior prevalência no gênero *Aspergillus*, aparecem o *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger* e *Aspergillus terreus* e no gênero *Mucor* as principais espécies foram: *Mucor racemosus*, *Mucor plumbeus* e *Mucor globosus*. Os autores enfatizaram que embora os conteúdos de umidade encontrados nas rações fossem relativamente baixos, a presença das espécies fúngicas relatadas anteriormente pode ser um risco potencial para a saúde de animais de companhia, uma vez que podem ser produtoras de micotoxinas.

As AFLs são o grupo de micotoxinas com maior expressividade na avaliação de rações, isso é justificado por sua maior toxicidade nos animais. Desta forma, Sharma e Márquez (2001) avaliaram 35 amostras de alimentos completos (19 para cães e 16 para gatos), de 12 marcas registradas diferentes obtidas em lojas de departamento. Essas amostras foram analisadas quanto a presença de 7 AFLs e aflatoxicol. A presença destes contaminantes foi observada na maioria das amostras analisadas, sendo que AFB₁ foi a micotoxina com maior frequência de aparecimento e seus níveis foram altos em 6 (17,1 %) das 35 amostras analisadas para essa micotoxina. Os níveis mais altos encontrados para AFB₁ foram de 46,1; 30,8 e 22,2 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ em 3 rações para gatos e 39,7 e 27 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ em 2 rações para cães. De acordo com os autores, não houve diferença estatisticamente significativa entre as contaminações entre as rações de cães e gatos analisadas, isso se deve ao fato do alto desvio padrão obtidos das análises.

Espécies de aves selvagens têm sido consideradas animais de companhia, uma vez que em países como Estados Unidos a prática de atrair e alimentar aves silvestres em quintais e jardins de residências é comum. Logo, a qualidade das sementes e rações para esses animais

tem sido estudada. Henke et al. (2001) coletaram 142 amostras de sementes para aves silvestres em diferentes regiões do Texas. As amostras foram adquiridas em cooperativas de grãos, *pet shops* e mercearias, durante a primavera e verão do ano de 1999. As concentrações do somatório de AFLs nas amostras variaram de não detectável a $2.780 \mu\text{g.kg}^{-1}$. Do total de amostras analisadas, 17 % (24) apresentavam concentrações acima de $100 \mu\text{g.kg}^{-1}$. Os autores também relacionaram essa contaminação a presença de milho como um ingrediente em 83 % das amostras. As maiores concentrações médias de AFLs foram encontradas na ordem decrescente: sementes para aves compradas das cooperativas de grãos > lojas de animais de companhia > mercearias, quando analisados os estabelecimentos de varejo nas regiões sul e ocidentais. Não foi observada diferença significativa nos níveis médios de AFLs das amostras adquiridas em *pet shops* das diferentes regiões, porém em se tratando dos produtos obtidos de mercearias e cooperativas de grãos foram observadas que nas regiões de faixa de terra mais ao norte os níveis de AFLs foram os mais altos se comparados as outras regiões. Já para os produtos comercializados em cooperativas foi observado que a região norte, sul e ocidental os níveis de AFLs encontrados eram maiores que os produtos das cooperativas da região central e leste do Texas. Logo, pode-se concluir que os diferentes tipos de comercialização, armazenamento e localização regional (clima) são fatores que podem influenciar na qualidade de rações.

A presença de cereais e de grãos na formulação de alimentos de animal de companhia, na concepção de Maia e Pereira Bastos de Sequeira (2002), sugere a necessidade de controlar a contaminação por AFLs nestes alimentos. O objetivo do estudo dos autores era analisar o alimento de animal de companhia doméstico para determinar a ocorrência das AFLs assim como seu risco à sanidade animal. Cem amostras de alimento (45 para cães, 25 para gatos, 30 para aves) foram coletadas aleatoriamente em lojas para animais de companhia na cidade de Alfenas, sudeste do Brasil. O método de análise para AFLs foi a cromatografia de camada delgada, a qual foi usada para a separação, a identificação e a quantificação dos compostos após a validação do método. As AFLs foram detectadas em 12,0 % das amostras. Das 12 amostras contaminadas 5 (41,7 %) apresentavam os níveis das AFLs ($\text{AFB}_1 + \text{AFB}_2 + \text{AFG}_1 + \text{AFG}_2$) acima do limite máximo estabelecido no Brasil ($50 \mu\text{g.kg}^{-1}$) para o alimento animal. A concentração de AFLs totais variou entre os níveis de 15 a $374 \mu\text{g.kg}^{-1}$, sendo que a média de contaminação foi de $131 \mu\text{g.kg}^{-1}$. Todas as amostras que continham amendoins em sua composição foram positivas para AFLs, sendo que a AFB_1 é conhecidamente um carcinógeno e seu consumo pôde ser um risco para a sanidade animal doméstica. Conforme os autores, a grande frequência de AFB_1 em alimentos para aves, espécie altamente suscetível

aos efeitos tóxicos das AFLs, confirma a necessidade da re-avaliação do uso do amendoim (presente em sete dos oito positivos das amostras para a AFLs) e/ou a adição de fungicidas ao alimento.

Para Martins, Martins e Bernardo (2003), o papel das contaminações fúngicas e da presença de micotoxinas nos alimentos destinados a animais de companhia não está devidamente avaliado em Portugal. Os autores referem à identificação da micoflora e a presença de micotoxinas em 60 amostras de alimentos secos para animais de companhia de diferentes marcas, adquiridas em lojas da especialidade, sendo 20 amostras de alimentos para cães, 20 para gatos, 10 para periquitos e 10 para catatus. A contagem e identificação dos agentes fúngicos foram efetuadas por métodos micológicos convencionais, e a pesquisa de micotoxinas, AFLs, OTA, FB₁ e deoxynivalenol (DON) foi efetuada por CLAE. Os limites de detecção foram: 1,0 µg.kg⁻¹ para AFLs, 2,0 µg.kg⁻¹, OTA 10 µg.kg⁻¹, FB₁ e 100 µg.kg⁻¹ para DON. O nível de contaminação fúngica foi baixa em todas as amostras. O gênero mais freqüente foi *Aspergillus* com 58,3 %, seguido de *Penicillium* e de *Mucor* ambas em 38,3 % das amostras positivas. Nenhuma amostra continha AFLs. OTA foi detectada em 5 amostras (8,3 %) com níveis que oscilaram de 2,0 a 3,6 µg.kg⁻¹. FB₁ e DON estavam presentes em três amostras (5,0 %) com níveis de contaminação de 12,0 a 24,0 µg.kg⁻¹ e 100,0 a 130,0 µg.kg⁻¹, respectivamente. Estas micotoxinas (OTA, FB₁ e DON), foram detectadas apenas em alimentos para cães. Estes resultados confirmam a presença de flora fúngica e de micotoxinas em alimentos para animais de companhia, representando um perigo sanitário potencial.

Além disso, para Zwierzchowski et al. (2004), as anomalias do tempo são a causa da ocorrência cada vez mais freqüente dos derivados do ácido resorcílico (zearalenona, ZON) em forragens da origem animal. Esta micotoxina induz, no organismo de porcas jovens, efeitos estrogênicos que levam a prejuízos econômicos nas criações principalmente em se tratando de animais reprodutores. De acordo com algumas pesquisas os derivados da ZON foram encontrados nos gêneros alimentícios humanos no mercado de varejo. Portanto, considerou-se importante analisar as concentrações desta micotoxina em alimentos para cães. Como resultados deste estudo os autores, em 57 das amostras analisadas 48 estavam contaminadas.

Sabendo dos efeitos tóxicos que as micotoxinas podem desempenhar sobre animais de companhia, como danos ao fígado, aos rins, ao cérebro e/ou ao aparelho gastrointestinal, além de interferir na reprodução animal e ser letal em alguns casos. Scussel et al. (2006) avaliaram no Brasil, um total de 123 amostras para alimentação de animais de companhia, entre eles: aves, gatos, cães, hamster, cavalos, coelhos, peixes e tartaruga, para as micotoxinas: AFLs, OTA, ZON e FBs, com o objetivo de determinar a extensão da

contaminação por estas toxinas em alimentos completos. Estas amostras eram comercializadas na cidade de Florianópolis, estado de Santa Catarina, sul do Brasil e foram coletadas em *pet shops* agropecuárias, clínicas veterinárias, hípcas e supermercados da região no período de fevereiro a julho, 2006. O número total de amostras para cada animal era: 19, 19, 46, 6, 26, 3, 3 e 1 para aves, gatos, cães, hamster, cavalos, coelhos, peixes ornamentais e tartaruga, respectivamente. A metodologia usada foi cromatografia-líquida massa/massa (LC-MS/MS) que utilizava como modalidades de fonte de ionização *eletrospray* e ionização química à pressão atmosférica (*atmospheric pressure chemical ionization* - APCI). Todas as amostras apresentaram alguma contaminação por uma ou mais micotoxina examinada, à exceção da amostra da tartaruga. Os alimentos para cães foram os que apresentaram maior frequência de contaminação (100 % - AFB₁), seguidos dos coelhos (100 % - AFB₁), os hamster (100 % - ZON), peixes (100 % - ZON), aves (94,7 % - AFB₁) e gatos (84,2 % - AFB₁). Os níveis totais de AFLs variaram 0,879 a 209 µg.kg⁻¹. A contaminação AFB₁ a mais elevada foi detectada na alimentação para hamsters com 185 µg.kg⁻¹ e o mais baixo na alimentação do cavalo (1,14 µg.kg⁻¹). A alimentação do cavalo apresentou baixos níveis de FB₁ que variava entre 4,76 a 91,6 µg.kg⁻¹ (MRL: 5000 µg.kg⁻¹). De acordo com as legislações internacionais (50 e 50/100 de µg.kg⁻¹ para AFLs e ZON, respectivamente), do total de amostras examinadas, apenas 6 (4,9 %) para o total de AFLs e 19 (15,5 %) para ZON, excediam os níveis estipulados nos regulamentos.

Conforme Campos et al. (2008), em cães, o efeito das micotoxinas é severo e pode acarretar a morte. Poucos relatórios quanto à influência de micotoxinas em dietas para animais de companhia foram encontrados na literatura científica. Logo, este estudo teve objetivo de isolar e identificar a micoflora de alimentos secos para animais de companhia e determinar a ocorrência de AFLs em matérias-primas e rações prontas. Quanto à micoflora, o gênero *Aspergillus* foi predominante (65-89 %), seguido por *Penicillium* e *Fusarium* spp. O *Aspergillus flavus* foi a principal espécie identificada, seguida pelo *A. sydowii*, *A. fumigatus*, e *A. versicolor*. As frequências de aparecimento de *A. flavus* variaram de 58 % a 86 %, exceto na refeição de sorgo. Quanto à presença do gênero *Fusarium* spp, todas as amostras analisadas (exceto grãos de milho e a ração pronta) apresentaram esse fungo. Todas as amostras de farinhas de milho e de glúten de milho apresentaram a cepas de *F. verticillioides*. O *F. graminearum* foi isolado do alimento de sorgo. Quanto ao potencial toxigênico das cepas isoladas, 75 % das variedades de *A. flavus* de materiais crus e 57 % dos alimentos completos, podiam produzir AFLs. As amostras de milho, farinha de milho e farinha de sorgo apresentaram frequência de contaminação por AFLs de 100 %, as amostras de farinha de

milho e glúten de 70 %; porém nos alimentos completos avaliadas não foram encontrados níveis quantitativos das toxinas testadas.

Devido à grande variabilidade de resultados, conclui-se que mais estudos devam ser realizados para novas discussões referentes às contaminações de *alimentos completos* e sua micoflora.

Para Gonzáles, Martinez e Resnik (1997), os cereais presentes nos alimentos para animais de companhia são boas matrizes para o crescimento de fungos. Porém, Chelkowski (1991) e Dalcero et al. (2002) afirmam que o processo de extrusão em que os alimentos para animais de companhia são submetidos permite a diminuição das contagens microbiológicas, fato este confirmado pela diminuição significativa de contagens de fungos quando o processo de granulação foi realizado.

Os estudos relacionados com a determinação do potencial toxigênico de fungos filamentosos em alimentos para animais de companhia são insuficientes. Além disso, de acordo com os autores supracitados, não existem levantamentos da produção de AFLs produzidas por estirpes isoladas de *A. flavus* presentes nesses produtos.

Cabe ressaltar que a identificação de espécies toxigênicas e sua relação com os tipos de ingredientes utilizados para produção de alimentos e rações é de suma importância. Uma vez que a determinação do risco da contaminação por micotoxinas pode ser relacionado com a presença estirpes toxigênicas. Porém, a presença desses fungos não indica a produção e/ou contaminação obrigatória desses produtos por micotoxinas, mas sim indicativos da sobrevivência de estirpes aflatoxigênicas e ocratoxigênicas ao processo da manufatura, (processo de extrusão e pelletização), ou seja, indícios de risco potencial para saúde dos animais. Além disso, a contaminação por micotoxinas tem sido correlacionada com a complexa composição dos produtos destinados à alimentação de animais de companhia, por diversos autores. A presença de grãos e cereais, como milho, sorgo, soja, arroz, aveia, amendoim, sementes de girassol, produtos derivados de ovo e leite, entre outros, podem sugerir esta ocorrência (SHARMA; MÁRQUEZ, 2001; HENKE et al., 2001; SCUSSEL et al., 2006, CAMPOS et al., 2008; SIMÃO et al., 2009). Outros fatores que podem influenciar na qualidades de alimentos completos e rações são: os diferentes tipos de comercialização, armazenamento; a localização regional e clima (umidade relativa do ar) e o conteúdo de umidade dos ingredientes e produtos acabados (HENKE et al., 2001; ZWIERZCHOSWSKI et al., 2004; CAMPOS et al., 2008; SIMÃO et al., 2009).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABARCA, M. L.; BRAGULAT, M. R.; CASTELLA, G.; CABANES, F. J. Mycoflora and Aflatoxin-Producing Strains in Animal Mixed Feeds. **Journal of Food Protection**, v. 57, n. 3, p. 256-258, 1994.
- ACCENSI, F.; ABARCA, M. L.; CABANES, F. J. Occurrence of Aspergillus species in mixed feeds and component raw materials and their ability to produce ochratoxin A. **Food Microbiology**, v. 21, n. 5, p. 623-627, 2004.
- AGOSTINI-COSTA, T. da S.; ABREU, L. N. de; ROSSETTI, A. G. Efeito do congelamento e do tempo de estocagem da polpa de acerola sobre o teor de carotenóides. **Rev. Bras. Frutic.**, Jaboticabal, v. 25, n. 1, Apr., 2003.
- ALKEMA, D.; HADER, P. A.; BELL, R. A.; NEILSON, T. Effects of flanking G . C base pairs on internal Watson-Crick, G . U, and nonbonded base pairs within a short ribonucleic acid duplex. **Biochemistry**, v. 21, n. 9, p. 2109-2117, 1982.
- ALVES, N. A. **Utilização da ferramenta “Boas Práticas de Fabricação (BPF)” na produção de alimentos para cães e gatos**. 2003. 1007 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola, na área de concentração em Tecnologia Pós-Colheita). Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Agrícola, Campinas, 2003.
- AMBRÓSIO, C. L. B.; CAMPOS, F. A. C. S.; FARO, Z. P. Carotenóides como alternativa contra a hipovitaminose **Revista de Nutrição**, v. 19, n.2, p. 233-243, 2006.
- ANDERTON, S. M.; INCARVITO, C. D.; SHERMA, J. Determination of natural and synthetic colors in alcoholic and non-alcoholic beverages by quantitative HPTLC. **J. Liq. Chromatogr. Related Technol.**, v. 20, n 1, p. 101-110, 1997.
- ANDRIGUETTO, J. M.; PERLY, L.; MINARDI, I.; GEMAEL, A.; FLEMMING, J. S.; SOUZA, G. A.; BONA FILHO, A. **Nutrição animal**. 4. ed. São Paulo: Nobel,. 1985. 395p.
- ANFAL PET – Associação Nacional dos Fabricantes de Alimentos para Animais de Estimação. **Mercado Pet 2010**, *Press release*. Disponível em: <http://anfalpet.org.br/portal/index.php?option=com_content&view=article&id=7&Itemid=22>. Acesso em: 20 jan. 2010.
- ANFAL PET – Associação Nacional dos Fabricantes de Alimentos para Animais de Estimação. **Guia de identidade e qualidade pet - PIQPET**. São Paulo: Anfalpet, 2007. 48p.
- APHA. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 19. ed. New York: American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation, 1995.
- ARAÚJO, J. M. A. **Química de alimentos: teoria e prática**. Viçosa: UFV, 1995. p. 279-295
- ASKUN, T.; ELTEM, R.; TASKIN, E. Comparison of rose-bengalchloramphenicol agar and dichloran glycerol agar (DG18) for enumeration and isolation of moulds from raisins.

Journal of Applied Biological Sciences, v. 1, n. 2, p. 71-75, 2007.

ATTOE, E. L.; VON ELBE, J. H. Oxygen involvement in betanine degradation: effect of antioxidants. **J. Food Sci.**, v. 50, p. 106-110, 1985.

ATTOE, E. L.; VON ELBE, J. H. Photochemical degradation of betanine and selected anthocyanins. **J. Food Sci.**, v. 46, p. 1934-1937, 1981.

BARROSO, G. F. BMLP - **Programa Brasileiro de Intercâmbio em Maricultura. Programa de Monitoramento Ambiental. Protocolo para Análise de clorofila a e feopigmentos pelo método fluorímetro TD- 700**. Vitória, Espírito Santo, 1998. p.1-21.

BARUFFALDI, R.; VESSONI PENNA, T. C.; COLOMBO, A. J.; PITOMBO, R. N. Efeito do armazenamento em condições ambientais na qualidade de cenoura. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v. 3, n. 2, p. 155-160, 1983.

BELLAVER, C. **Qualidade dos ingredientes e das rações**. Embrapa Suínos e Aves. 2002. Disponível em: <http://www.cnpsa.embrapa.br/down.php?tipo=artigos&cod_artigo=100>. Acesso em: 19 nov. 2008.

BERDICK, M. Safety of food colors In: HANTHCOCK, J. N. (Ed.) **Nutritional toxicology**. New York: Academic Press, 1982. p. 383-434. v. 1.

BETINA, V. Aflatoxins, sterigmatocystins and versicolorins. In: BETINA, V. **Mycotoxins: chemical, biological and environmental aspects**. New York: Elsevier, 1989. p. 114-150.

BEUCHAT, L. R. Media for detectetion and enumeration yeasts and moulds. **International Journal of Food Microbiology**, v. 17, n. 2, p. 145-158, Oct. 1992.

BEUCHAT, L. R. Selective media for detectetion and enumeration foodborne yeasts. 2002 **International Journal of Food Microbiology**, v. 19, n.1, p. 1-14, jun. 1993.

BILYK, A.; KOLODIJ, M. A.; SAPERS, G. M. Stabilization of red beet pigments with isoascorbic acid. **J. Food Sci.**, v. 46, p. 1616-1617, 1981.

BIZZOZERO, N.; MICHELI, G. Research and identification of natural and synthetic colouring agents in sample of gnochi. **Ind. Alim.**, v. 35, p. 1300-1303, 1996.

BLANC, M. Sampling: the weak link in the sanitary quality control system of agricultural products. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 50, n. 6, p. 473 – 479, May 2006.

BRAENDLIN, N. Enumeration of xerophilic yeasts in the presence of xerophilic moulds: a collaborative estudy. **International Journal of Food Microbiology**, v. 29, p. 185-192, 1996.

BRASIL, 1965. Decreto n. 55.871, de 26 de março de 1965. Normas Reguladoras do Emprego de Aditivos para Alimentos, **D.O.U.**, Poder Executivo, Brasília, DF, 29 abr.1965.

BRASIL, 2003. MAPA. SARC e DFFPA. Portaria n. 384, de 26 de dezembro de 2003. Institui consulta pública da Instrução Normativa que aprova o Regulamento Técnico sobre Avaliação da Segurança de Uso, Registro e Comercialização de Aditivos para Alimentação

Animal. **D.O.U.**, Poder Executivo, Brasília, DF, 30 dez. 2003.

BRASIL, 2004. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento e Secretaria de Apoio Rural e Cooperativismo. Instrução Normativa nº 13, de 30 de novembro de 2004. Aprova regulamento técnico sobre aditivos para produtos destinados à alimentação animal **D.O.U.**, Poder Executivo, Brasília, DF, 1 dez. 2004.

BRASIL, 2005. Instituto Adolfo Lutz. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz:** métodos químicos e físicos para análise de alimentos. São Paulo:Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, 2005.

BRASIL, 2009a. MAPA/SDA. Portaria nº 3, de 22 de janeiro de 2009. Registro de estabelecimento e produtos, rotulagem e propaganda e para isenção de registro de produtos destinados à alimentação de animais de companhia e aprova os padrões de qualidade e identidade para alimentos destinados à cães e gatos. **D.O.U.**, Poder Executivo, Brasília, DF, 23 jan. 2009. Seção 1, p. 12.

BRASIL, 2009b. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 30, de 5 de agosto de 2009. Estabelece critério e procedimentos para registro de produtos, para rotulagem e propaganda e para isenção de registro de produtos destinados à alimentação de animais de companhia. **D.O.U.**, Poder Executivo, Brasília, DF, 7 ago. 2009. Seção 1, p. 13.

BREITHAUPT, D. E. Modern application of xanthophylls in animal feeding e a review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 18, p. 501-506, 2007.

BRITTON, G. Carotenoids. In: HENDRY, G. F. **Natural foods colorants**. New York: Blackie, 1992. p.141-148.

BRITTON, G. Structure and properties of carotenoids in relation to function. **FASEB J.**, Bethesda, v. 9, n. 15, p. 1551-8, 1995.

BROUILLARD, R.; DUBOIS, J. E. Mechanism of the structural transformations of anthocyanins in aqueous media. **Journal of American Chemistry Society**, v. 99, p. 1359-1363, 1977.

BROUILLARD, R.; IACOBUCCI, G. A.; SWEENEY, J. G.. Chemistry of anthocyanin pigments 9. UV- visible spectrophotometric determination of acidity constants of apigeninidin and three related 3-deoxyflavylium salts. **J. Am. Chem. Soc.**, 1982, v. 104, n. 26, p. 7585-7590, 1982.

BUENO, D. J.; SILVA, J. O.; OLIVER, G. Fungal isolation and enumeration in foods. **Methods Mol Biol**, v. 268, n. p. 127-131, 2004.

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.

BUICK, D. R.; TRENERRY, V. C. **Capillary electrophoresis:** competitor or complementary to HPLC in food analysis. Los Banos, Laguna Philippines International Rice Research Inst. Library, 1995. 30 p.

- BUNGE alimentos. Nutrição Animal/Artigos Técnicos. **Conceitos para formulação da ração 1. Ingrediente e nutriente**. 2008. Disponível em: <<http://www.bungealimentos.com.br/nutricao/artigos.asp?id=3029>>. Acesso em: 16 jul. 2007.
- BURTON, G. W. Antioxidant action of carotenoids. **The Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 119, p.1 09-111, 1989.
- CAI, Y.Z.; SUN, M.; CORKE, H. Characterization and application of betalain pigments from plants of the *Amaranthaceae*. **Trends Food Sci. Technol.**, n. 16, p. 370-376, 2005.
- CALONI, F.; STAMMATI, A.; FRIGGE, G.; DE ANGELIS, I. Aflatoxin M1 absorption and cytotoxicity on humanintestinal in vitro model. **Toxicon**. v. 47 p. 409–415, 2006.
- CALVEY, R. J.; GOLDBERG, A. L.; MADIGAN, E. A. HPLC determination of intermédiates / side reaction products in fd and c yellow n° 5. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.**, v. 64, n. 3, p. 665-669, 1981.
- CAMPBELL, A. D.; WHITAKER, T. B.; POHLAND, A. E. Sampling, sample preparation, and sampling plans for foodstuffs for mycotoxin analysis. **Pure and Applied Chemistry**, v. 58, n. 2, p. 305 – 314, 1986.
- CAMPOS, S. G.; CAVAGLIERI, L. R.; FERNANDEZ JURI, M. G.; DALCERO, A. M.; KRUGER, C.; KELLER, L. A.; MAGNOLI, C. E.; ROSA, C. A. Mycobiota and aflatoxins in raw materials and pet food in Brazil. **J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)**, v. 92, n. 3, p. 377-383, 2008.
- CARCIOFI, A. C. **Avaliação de dieta à base de sementes e frutas para papagaios (*Amazona sp*)**: determinações da seletividade dos alimentos, consumo, composição nutricional, digestibilidade e energia metabolizável. 1996. 104 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1996.
- CARCIOFI, A. C. Reflexões sobre a qualidade de uma ração para cães e gatos. In: I SIMPÓSIO DE PRODUÇÃO, NUTRIÇÃO E ALIMENTAÇÃO DE CÃES E GATOS, 2005., Londrina. **Anais...** Londrina: UEL, 2005. CD.
- CARVALHO, J. C. de **Desenvolvimento de bioprocessos para a produção de pigmentos a partir de *Monascus* por fermentação em substrato sólido**. 2004. 101 f. Tese (Doutorado em Processos Biotecnológicos) - Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2004.
- CARVALHO, P.R.; PITA, M. C. G.; PIBER-NETO, E.; MIRANDOLA, R. M. S.; MENDONÇA-JÚNIOR, C. X. Influência da adição de fontes marinhas de carotenóides à dieta de galinhas poedeiras na pigmentação da gema do ovo. **Brazilian Journal Veterinary Research animal Science**, v. 43, n. 5, p. 654-663, 2006.
- CASTEGNARO, M.; TOZLOVANU, M.; WILD, C.; MOLINIE, A.; SYLLA, A. PFOHL-LESZKOWICZ, A. Advantages and drawbacks of immunoaffinity columns in analysis of mycotoxins in food. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 50, n. 6, p. 480 – 487, Jun. 2006.

CHELKOWSKI, J. Mycological quality of mixed feeds and ingredients. In: CHELKOWSKI, J. (Ed). **Cereal grain, mycotoxins, fungi and quality in drying and storage**. Amsterdam: Elsevier, 1991. p. 217–227.

CHIANG, H. C. Polyamide - silica gel thin – layer chromatography of red food dyes. **J. Chromatogr.**, v. 40, p. 189-190, 1969.

CHIANG, H. C.; LIN, S. L. Polyamide kieselguhr thin – layer chromatography of yellow food dyes. **J. Chromatogr**, v. 44 1, p. 203-204, 1969.

CHULZE, S. N.; MAGNOLI, C. E.; DALCERO, A. M. Occurrence of ochratoxin A in wine and ochratoxigenic mycoflora in grapes and dried vine fruits in South America. **Int J Food Microbiol**, v. 111, Suppl 1, p. S5-9, 2006.

CLERQ, H.; MASSART, D. L. The thin-layer chromatography separation of water soluble food dyes on silica gel layer. **J. Chromatogr**, v. 93, n. 1, p. 243-247, 1974.

CLYDESDALE, F.M. Color as a factor in food choice, **Crit. Rev. Food Sci. Nutr.**, v. 33, n. 1, p. 83-101, 1993.

COLLINS, P. The role of annatto in food colouring. **Food Ingredients and Processing International**, v. 23, p. 23-27, Feb. 1992.

CONSTANT, P. B. L.; STRINGUETA, P. C.; SANDI, D. Corantes alimentícios. **Boletim do CEPPA**, v. 20, n. 2, p. 203-220, jul./dez. 2002.

CORRÊA, B. *Fungos Toxigênicos*: Panorama Nacional. In: SCUSSEL, V. M. **Atualidades em Micotoxinas e Armazenagem de Grãos**. Florianópolis: VMS, 2000. p. 163-168.

COSTA, L. L. F.; SCUSSEL, V. M. Toxigenic fungi in beans (*Phaseolus vulgaris* L.) classes black and color cultivated in the state of Santa Catarina, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 33, n. 2, abr./jun. 2002. Disponível em: <<http://www.scielo.br>>. Acesso em: 19 jul. 2006.

COULOMBE, R. A., JR.; WILSON, D. W.; HSIEH, D. P. Metabolism, DNA binding, and cytotoxicity of aflatoxin B1 in tracheal explants from Syrian hamster. **Toxicology**, v. 32, n. 2, p. 117-130, 1984.

COUTO, A. B. C.; RAMOS, L. A. R.; CAVALHEIRO, E. T. G. Aplicação de pigmentos de flores no ensino de química. **Química Nova**, v. 21, n. 2, p. 221-227, 1998.

CROCE, J. Muita cor e algum risco nas balas. **Consumidor S.A.** v. 2, p. 5-8, 1965.

CUCULLU, A. F.; LEE, L. S.; PONS, W. A. Relationship of physical appearance of individual mold damaged cottonseed to aflatoxin content. **Journal of American Oil Chemical Sociation**, v. 45, p. 235A – 237A, 1977.

CZAPSKI, J. Heat stability of betacyanins in red beet juice and in betanin solutions. **Lebensm. Unters. Forsch.**, v. 191, p. 275-278, 1990.

DALCERO, A.; MAGNOLI, C.; HALLAK, C.; CHIACCHIERA, S. M.; PALACIO, G.; ROSA, C. A. Detection of ochratoxin A in animal feeds and capacity to produce this mycotoxin by *Aspergillus section Nigri* in Argentina. **Food Addit Contam**, v. 19, n. 11, p. 1065-1072, 2002.

DALE, N. Improving nutrient utilization by ingredient and dietary modification. **Word Poultry**, v. 12, n. 2, p. 33, 1996.

DALPASQUALE, V. A. Procedimentos essenciais de recepção e limpeza de grãos. In: LORINI, I.; MIKE, L. H.; SCUSSEL, V. M. **Armazenagem de grãos**. Campinas: Editora IBG, 2002, p. 195-199.

DELGADO-VARGAS, F.; JIMÉNEZ, A. R.; PAREDES-LÓPEZ, O. Natural pigments: carotenoids, anthocyanins, and betalains - characteristics, biosynthesis, processing, and stability. **Crit. Rev. Food. Sci. Nutr.**, v. 40, n. 3, p. 173-289, 2000.

DOWNHAM, A.; COLLINS, P. Colouring our food in the last and next millennium. **Int. J. Food Sci. Technol.**, v. 35, p. 5-22, 2000.

DRAKE, J. J. P. Food colours - harmless aesthetics or epicurean luxuries? **Toxicology**, v. 5, p. 3-42, 1975.

DRDÁK, M. et al. Influence of water activity on the stability of betanine. **Lebensm. Unters. Forsch.**, v. 190, n. 2, p. 121-122, 1990.

DRUNKLER, D. A.; FETT, R.; LUIZ, M. T. B. Avaliação da estabilidade de betalaínas em extrato de beterraba (*Beta vulgaris* L.) #945;-; β - e Y- com ciclodextrinas. **Boletim CEPPA**, Curitiba, v. 24, n. 1, p. 259-276, jan./jun. 2006.

DRUNKLER, D. A.; FETT, R.; LUIZ, M. T. B. Betalaínas extraídas da beterraba vermelha (*Beta vulgaris* L.). **Boletim da SBCTA**, v. 37, n. 1, p. 14-21, 2003.

EC. EUROPEAN COMMISSION. Commission Recommendation 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. **Official Journal of the European Union**, 23 of Aug. of 2006. L 229 p. 7-9.

EC. EUROPEAN COMMISSION. Community Register of Feed Additives pursuant to Regulation (EC) No 1831/2003 **Appendixes 3 & 4. Annex : List of additives**. 77 ed. Animal Health and Welfare: 2010.

EC. EUROPEAN COMMISSION. Decisão da Comissão de 21 de dezembro de 1998, relativa as disposições nacionais notificada pelo Reino da Suécia respeitantes à utilização de determinados corantes e edulcorantes nos géneros alimentícios. **Jornal Oficial das Comunidades Europeias**, 1 de jan. de 1999. L 3 p. 13-22.

EC. EUROPEAN COMMISSION. Directiva n. 94/36/CE do Parlamento Europeu e do Conselho de 30 de junho de 1994, relativa aos corantes para utilização nos géneros alimentícios. **Jornal Oficial das Comunidades Europeias**, 10 de set. de 1994. L 237 p. 13-29

EC. EUROPEAN COMMISSION. Regulation (EC) n. 1831/2003 of the European Parliament and of the Council of 22 September 2003, on additives for use in animal nutrition. **Official Journal of the European Union**, 18 of Oct. of 2003. L 268 p. 29-43

EDER, R. Pigments. In: NOLLET, L. M. **Handbook of food analysis: physical characterization and nutrient analysis**. New York: CRC Press, 1996. p. 805-968, v. 1.

ESKIN, M. N. A. Biochemical changes in raw foods: fruits and vegetables. In: ESKIN, M. N. A. **Biochemistry of food**. 2. ed. San Diego: Academic, 1990. part 1, p. 69-145.

FAO . FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **Worldwide regulations for mycotoxins in food and feed in 2003**. FAO Food and Nutrition Paper 81. Roma, 2004. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/007/y5499e/y5499e00.htm#Contents>>. Acesso em: 2 ago. 2006.

FARIAS, A. X. de; ROBBS, C. F.; BITTENCOURT, A. M.; ANDERSEN, P. M.; CORRÊA, T. B. S. Contaminação endógena por *Aspergillus* spp. Em milho pós-colheita no estado do Paraná. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 35, n. 3, p. 617-621, mar. 2000. Disponível em: <<http://www.scielo.br>>. Acesso em: 20 jul. 2006.

FDA. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Department of Health and Human Services. **Code of federal regulations**. 2007. Disponível em: <<http://www.gpoaccess.gov/cfr/>> Acesso em: 11 jan. 2010.

FERNANDES, M. E. **Alergia alimentar em cães**. 2005. 104 f. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública, área de concentração; Epidemiologia) Universidade de São Paulo, Faculdade de Saúde Pública, São Paulo, 2005.

FERRUZZI, M. G.; FAILLA, M. L.; SCHWARTZ, S. J. Assessment of degradation and intestinal cell uptake of carotenoids and chlorophyll derivatives from spinach puree using an *in vitro* digestion and Caco-2 human cell model. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v. 49, p. 2082- 2089, 2001.

FONSECA, H. Amostragem: representatividade e técnicas utilizadas. In: SCUSSEL, V. M. **Atualidades em micotoxinas e armazenagem de grãos**. Florianópolis: VMS, 2000. p. 222-236.

FONSECA, H. Mycotoxins. **First Botany**, 135 Exam. 11 Oct 2005. Disponível em: <<http://www.micotoxinas.com.br>>. Acesso em: 17 jul. 2006.

FOSTER, M. Plant pigments as acid-base indicators: na exercise for the junior high school. **J. Chem. Educ.** v. 55, n. 2, p. 107, 1978.

FRAGA, M. E.; CURVELLO, F.; GATTI, M. J.; CAVAGLIERI, L. R.; DALCERO, A. M.; ROSA, C. A. D. Potential aflatoxin and ochratoxin a production by *Aspergillus* species in poultry feed processing. **Veterinary Research Communications**, v. 31, n. 3, p. 343-353, 2007.

FRANCIS, F. J. Less common natural colorants. In: HENDRY, G.A.F.; HOUGHTON, J. D.

Natural food colorants. 2. ed. Glasgow: Blackie Academic and Professional, 1996.

FRASER, C. M. **Manual Merck de Veterinária**. 6. ed. São Paulo: Roca, 1991. 1803p.

FRASER, P. D.; BRAMLEY, P. M. The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. *Prog Lipid Res*, v. 43, n. 3, p. 228-265, 2004.

FRAZIER, R. A.; AMES, J. M.; NURSTEN, H. E. The development and application of capillary electrophoresis method for food analysis. **Electrophoresis**, v. 20, p. 3156- 3180, 1999.

FURTADO, M. **Corantes: indústria de alimentos adere aos corantes naturais**. 2004.

Disponível em: < <http://www.quimica.com.br/revista/qd421/corantes1.htm>>. Acesso em: 13 fev. 2010.

GAZZONI, D. L. **Alimentos funcionais**. Embrapa soja, Londrina, maio 2003. Disponível em: Homepage: Disponível em: <http://www.agropolis.hpg.ig.com.br/alimentos_funcionais.htm>. Acesso em: 10 fev. 2007.

GIRAY, B.; GIRGIN, G.; ENGIN, A. B.; AYDIN, S.; SAHIN, G. Aflatoxin levels in wheat samples consumed in some regions of Turkey. **Food Control**. v. 18, p. 23-29, jan. 2007.

GOLDBER, A. L.; CALVEY, R. J. Automated HPLC determination of intermediates and side reaction products in FD C red n ° 3. **J. Ass. Off. Anal. Chem.**, v. 65, n. 1, p. 103-107, 1982.

GOLDMAN, M.; HOREV, B.; SAGUY, I. Decolorization of β -carotene in model systems simulating dehydrated foods: mechanism and kinetic principles. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 48, p.751-754, 1983.

GONÇALEZ, E.; PINTO, M. M.; FELICIO, J. D. Análise de micotoxinas no Instituto Biológico de 1989 a 1999. **Biológico**, São Paulo, v. 63, n. 1/2, p. 15-19, jan./dez., 2001.

GONZALEZ, H. H. L.; MARTINEZ, E. J.; RESNIK, S. L. Fungi associated with sorghum grain from Argentina. **Mycopathologia**, v. 139, n. 1, p. 35-41, 1997.

HADDAD, P. R. Comparison of ion chromatography and capillary electrophoresis for the determination of inorganic ions. **J. Chromatogr. A**, v. 770, p. 281-290, 1997.

HAN, D.; KIM, S. J.; KIM, S. H.; KIM, D. M. Repeated regeneration of degraded red beet juice pigments in the presence of antioxidants. **Journal of Food Science: Chemistry/Biochemistry**, v. 63, n. 1, p. 69-72, 1998.

HE, Q.; KIM, J. Y.; SHARMA, R. P. Fumonisin B₁ hepatotoxicity in mice is attenuated by depletion of Kupffer cells by gadolinium chloride. **Toxicology**, v. 207, p. 137-147, 2005.

HEATON, J. W.; LENCKI, R. W.; MARANGONI, A. G. Kinetic model for chlorophyll degradation in green tissue. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v. 44, n. 2, p. 399-402, 1996.

HEATON, J. W.; MARANGONI, A. G. Chlorophyll degradation in processed foods and senescent plant tissues. **Trends Food Sci. Technol.**, Amsterdam, v. 7, n. 1, p. 8-15, 1996.

HENKE, S. E.; GALLARDO, V. C.; MARTINEZ, B.; BAILEY, R. Survey of aflatoxin concentrations in wild bird seed purchased in Texas. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 37, n. 4, p. 831-835, 2001.

HILL, G. E. Energetic constraints on expression of carotenoid-based plumage coloration. **Journal of Avian Biology**, v. 31, p. 559–566, 2000.

HILL, G. E. Mate choice, male quality, and carotenoid-based plumage coloration. In: ADAMS, N.; SLOTOW, R. (Eds), 22nd INTERNATIONAL ORNITHOLOGICAL CONGRESS, 1999., **Proceedings** ... University of Natal: Johannesburg, 1999. p. 1654-1668.

HILL, G. E.. Redness as a measure of the production costs of ornamental traits. **Ethology Ecology and Evolution**, v. 8, p. 157–175. 1996.

HUANG, A. S.; VON ELBE, J. H. Effect of pH on the degradation and regeneration betanine. **J. Food Sci.**, v. 52, p. 1689-1693, 1987.

HUDON, J.; ANCIÃES, M.; BERTACCHE, V.; STRADI, R. Plumage carotenoids of the Pin-tailed Manakin (*Ilicura militaris*): Evidence for the endogenous production of rhodoxanthin from a colour variant. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part B, v. 147, n. 3, p. 402–411, jul. (2007)

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

IACOBUCCI, G. A.; SWEENEY, J. G. The chemistry of anthocyanins, anthocyanidins, and related flavilium salts. **Tetrahedron Letters**, v. 39, p. 3005-3012, 1983.

IARC/WHO – INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER/WORLD HEALTH ORGANIZATION. Some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. **IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans**, v. 56, p. 247; 397; 445; 489, 1993. Disponível em: <<http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol56/volume56.pdf>>. Acesso em: 15 ago. 2006.

IARC/WHO – INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER/WORLD HEALTH ORGANIZATION. Some naturally occurring and synthetic food components, furocoumarins and ultraviolet radiation. **IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans**, v. 40, p. 67; 83; 1986. Disponível em: <<http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol56/volume56.pdf>>. Acesso em: 15 ago. 2006.

IARC/WHO – INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER/WORLD HEALTH ORGANIZATION. Some Naturally Occurring Substances. **IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans**, v. 10, p. 245, 1976. Disponível em: <<http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol56/volume56.pdf>>. Acesso em: 15 ago. 2006.

IFT. INSTITUTE OF FOOD TECHNOLOGYST'S. Food colours. **A Scientific status summary by the Institute of Food Technologist's expert panel of food safety and nutrition and the Comite of Public Information**. [S.l.:s.n.], 1986.

JACKMAN, R. L.; SMITH, J. L. Anthocyanins and betalains. In: HENDRY, G. A. F.; HOUGHTON, J. D. (Ed). **Natural food colorant**. 4th ed. New York, USA: AVI, 1992. p. 183-241.

JANDERA, P. et al. Separation of aromatic sulphonic acid dye intermediates by high-performance liquid chromatography and capillary zone electrophoresis. **J. Chromatogr A**, v. 738, p. 201-213, 1996.

JAYAS, D. S.; WHITE, N. D. G. Storage and drying of grain in Canada: low cost approaches. **Food Control**. v. 14, p. 255-261, 2003. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com>>. Acesso em: 18 jul. 2006.

JIMIDAR, M. et al. Comparison of capillary zone electrophoresis with high-performance liquid chromatography for the determination of additives in foodstuffs. **J. Chromatogr**, v. 636, p. 179-186, 1993

JOHNSON, E. A.; SCHROEDER, W. A. Microbial carotenoids. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, v. 53, p. 119-178, 1995.

JOHNSON, R. M.; GREENAWAY, W. T. Sampling stored corn for aflatoxin assay. **Cereal Science Today**, v. 14, p. 25-29, 1969.

KAMKAR, A. A study on the occurrence of aflatoxin M₁ in Iranian Feta cheese. **Food Control**. v. 17, p. 768-775. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com>>. Acesso em: 18 jul. 2006.

KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. (Ed). **Clinical biochemistry of domestic animals**. 5. th New York: Academic Press, 1997. 932p.

KILL, J. L.; HAESE, D.; VASCONCELOS, C. H. F.; PUPPLO, D. D. Avanços na nutrição de pássaros: quebrando paradigmas. **Natureza on line**, n. 6, v. 2, p. 53-54, 2008. Disponível em: <http://www.naturezaonline.com.br/natureza/conteudo/pdf/01_KillJLetal_5354.pdf>. Acesso em: 13 mar. 2010.

KLUGE, R.A. **Fisiologia vegetal: apontamentos de aulas teóricas de fotossíntese**. ESALQ/USP. 2004. Disponível em: <<http://orion.cpa.unicamp.br/sbfv/arquivos/aulas/grade01/06fotoquimicadafotossintese/fotossinteseKluge>>. Acesso em: 17 jul. 2006.

KOS, G.; KRŠKA, R. **Analytical methodology**. EMAN – European Mycotoxin Awareness Network, 2006. Disponível em: <<http://www.mycotoxins.org>>. Acesso em: 10 ago. 2006.

KUNKEL, A. et al. Quantitation of insulin by capillary electrophoresis and high-performance liquid chromatography method comparison and validation. **J. Chromatogr A**, v. 781, p. 445-455, 1997.

LABORDE, L. F.; VON ELBE, J. H. Chlorophyll degradation and zinc complex formation with chlorophyll derivatives in heated green vegetables. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v. 42, p. 1100-1103, 1994.

LAZZARI, F.; LAZZARI, S. M. N. Microorganismos, micotoxinas e problemas associados manejo de fungos e insetos. In: SCUSSEL, V. M. **Atualidades em micotoxinas e armazenagem de grãos**. Florianópolis: VMS, 2000. p. 357-360.

LEHMANN, G. et al. Rapid method for detection and identification of synthetic water-soluble coloring matter in food and drugs. **J. Ass. Off. Anal. Chem.**, v. 53, n 6, p. 1182-1189, 1970.

LEONI, L. A. B.; FURLANI, R. P. Z.; VALENTE-SOARES, L. M.; OLIVEIRA, P. L. C. Ochratoxin A in Brazilian Green Coffee. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 21, n. 1, p. 105-107, jan./abr. 2001. Disponível em: <<http://www.scielo.br>>. Acesso em: 21 jul. 2006.

LEUNG, M. C. K.; DIAZ-LLANO, G.; SMITH, T. K. Mycotoxins in pet food: A review on worldwide prevalence and preventative strategies. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 26, p. 9623-9635, 2006.

LEVY, L.W.; RIVADENEIRA, D.M. Annatto. In: NATURAL food colorants science and technology. Chicago, DC: IFT, 2000. p. 115- 152. (IFT Basic Symposium Series).

LEWIS, L. D.; MORRIS JR, M. L.; HAND, M. S. **Small animal clinical nutrition III**. 6th. Topeka: Mark Morris Institute, 1994. 460p.

LILA, M. A. Plant pigments and human health. In: DAVIS, S. **Plant pigments and their manipulation**. Oxford: CRC Press/Blackwell Publ., 2004. p. 248-274.

LIMA, A. L. dos S.; PEREIRA, M. H. G.; PINTO, L. H. P. A. da C. **Corantes sintéticos: a química das cores**. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Química. Disponível em: <<http://server2.iq.ufrj.br/~angelo/corantes.pdf>>. Acesso em: 25 jul. 2007.

LIMA, V. L. A. G. de; MÉLO, E. de A.; MACIEL, M. I. S.; LIMA, D. E. da S. Avaliação do teor de antocianinas em polpa de acerola congelada proveniente de frutos de 12 diferentes aceroleiras (*Malpighia emarginata* D.C.). **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v. 23, n. 1, p. 101-103, jan./abr. 2003.

MACHADO, P. A. R.; SAAD, C. E. P. O futuro das rações para aves ornamentais e silvestres no Brasil. **Aves - Revista Sul Americana de Ornitofilia**, Belo Horizonte, v. 3, p. 37-40, 2000.

MACRAE, R. Recent applications of HPLC to food analysis. **J. Food Technol.**, v. 16, p. 1-11, 1981.

MAGNOLI, C.; DALCERO, A. M.; CHIACCHIERA, S. M.; MIAZZO, R.; SAENZ, M. A. Enumeration and identification of Aspergillus group and Penicillium species in poultry feeds from Argentina. **Mycopathologia**, v. 142, n. 1, p. 27-32, 1998.

MAGNOLI, C.; HALLAK, C.; ASTORECA, A.; PONSONE, L.; CHIACCHIERA, S.; DALCERO, A. M. Occurrence of ochratoxin A-producing fungi in commercial corn kernels in Argentina. **Mycopathologia**, v. 161, n. 1, p. 53-58, 2006.

- MAHARAJ, V.; SANKAT, C. K. Quality changes in dehydrated dasheen leaves, effects of blanching pretreatments and drying conditions. **Food Res. Int.**, Amsterdam, v. 29, p. 563-568, 1996.
- MAIA, P. P.; PEREIRA BASTOS DE SIQUEIRA, M. E. Occurrence of aflatoxins B1, B2, G1 and G2 in some Brazilian pet foods. **Food Addit Contam**, v. 19, n. 12, p. 1180-1183, 2002.
- MALACRIDA, C. R.; MOTTA, S. da. Antocianinas em suco de uva: composição e estabilidade. **Boletim do CEPPA**, Curitiba, v. 24, n. 1, p. 59-82 jan./jun. 2006.
- MARKAKIS, P. Stability of anthocyanins in foods. In: MARKAKIS, P. (Ed.) **Anthocyanins as food colors**. New York: Academic Press, 1982. p. 163-180.
- MARMION, D. M. **Handbook of U.S. colorants: foods, drugs, cosmetics, and medical devices**. 3rd ed. USA: John Wiley & Song, 1991. 575p.
- MARMION, D. M. HPLC Determination of 4,4-diazoamino of dibenzene sulfonic acid in FD and C yellow nº 6. **J. Ass. Off. Anal. Chem.**, v. 60, n 1, p. 168-172, 1977.
- MARMITT, S.; PIROTTA, L. V.; STÜLP, S. Aplicação de fotólise direta e UV/H₂O₂ a efluente sintético contendo diferentes corantes alimentícios **Quim. Nova**, v. 33, n. 2, p. 384-388, 2010.
- MARTINS, M. L.; MARTINS, H. M.; BERNARDO, F. Fungal flora and phycotoxins detection in commercial pet food. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v. 98, n. 548, p. 179–183, 2003.
- MARTINS, R. C.; SILVA, C. L. M. Modelling colour and chlorophyll losses of frozen green beans (*Phaseolus vulgaris*. L.). **International Journal of Refrigeration**, v. 25, p. 966-974, 2002.
- MASCARENHAS, J. M. O. **Corantes em alimentos: perspectivas, uso e restrições**. 1998. 150 f. Tese (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1998.
- MAZAR, M.; KANIANSKY, D.; MADAJOVA, V. Separation of synthetic food colourants by capillary zone electrophoresis in a hydrodynamically closed separation. **J. Chromatogr A**, v. 724, p. 327-336, 1996.
- MCGRAW, K. J.; BEEBEE, M. D.; HILL, G. E.; PARKER, R. S. Lutein-based plumage coloration in songbirds is a consequence of selective pigment incorporation into feathers. **Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol**, v. 135, n. 4, p. 689-696, 2003.
- MCGRAW, K. J.; HILL, G. E. Carotenoid-based ornamentation and status signaling in the house finch. **Behavioral Ecology**, v. 11, n. 5, p. 520-527, 2000.
- MCGRAW, K. J.; SAFRAN, R. J.; EVANS, M. R.; WAKAMATSUD, K. European barn swallows use melanin pigments to color their feathers brown. **Behavioral Ecology**, v. 15, n. 5, p. 889–891, 2004.

- McKONE, H. T.; IVIE, K. An introduction to HPLC: separation of some FD&C dyes. **J. Chem. Educ.**, v. 57, n. 4, p. 321-322, 1980.
- MEBANE, R. C.; RYBOLT, T. R. Edible acid-base indicators. **J. Chem. Educ.**, v. 62, n. 4, p. 285, 1985
- MEGARD, D. Stability of red beet pigments for use as food colorant: a review. **Foods & Food Ingred. J.**, v. 158, p. 130-150, 1993.
- MEIRELES, M. C. A. Equine leucoencephalomalacia in Brazil. In: SCUSSEL, V. M. **Atualidades em micotoxinas e armazenagem de grãos**. Florianópolis: VMS, 2000. p. 80-84.
- MESCHTER, E. L. Effects of carbohydrates and other factors on strawberry products. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 1, p. 579-583, 1954.
- MINERVINI, F.; GIANNOCCARO, A.; CAVALLINI, A.; VISCONTI, A. Investigations on cellular proliferation induced by zearalenone and its derivatives in relation to the estrogenic parameters. **Toxicology Letters**. v. 159 p. 272-283, 2005.
- MINGUEZ-MOSQUERA, M. I.; GARRIDO-FERNANDEZ, J.; GANDUL-ROJAS, B. Pigment changes in olives during fermentation and brine storage. **J. Agric. Food Chem.**, Columbus, v. 37, p. 8-11, 1989.
- MIRAGLIA, M.; DE SANTIS, B.; MINARDI, V.; DEBEGNACH, F.; BRERA, C. The role of sampling in mycotoxin contamination: an holistic view. **Food Additives and Contaminantes**, v. 22, suppl. 1, p. 31-36, 2005.
- MIROCHA, C. J.; CHRISTENSEN, C. M. Mycotoxins. In: CHRISTENSEN, C. M. (Ed.) **Storage of cereal grains and their products**. Saint. Paul: American Association of Cereal Chemists, 1982. p. 241 - 280.
- MOLLER, A. P.; BIARD, C.; BLOUNT, J. D.; HOUSTON, D. C.; NINNI, P.; SAINO, N.; SURAI, P. F. Carotenoid dependent signals: Indicators of foraging efficiency, immunocompetence or detoxification ability? **Avian & Poultry Biol. Rev.**, v. 11, p. 137-159, 2000.
- MULTON, J. L. Spoilage mechanisms of grains and seeds in the post-harvest ecosystem, the resulting losses and strategies for the defense of stocks. In: MULTON, J. L. (Ed.) **Preservation and storage of grains, seeds and their by-products**. New York: Lavoisier, 1988. p. 3 - 59.
- NELSON, P. E.; PLATTNER, R. D.; SHACKELFORD, D. D.; DESJARDINS, A. E. Production of fumonisins by fusarium moniliforme strains from various substrates and geographic areast. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 57 n. 8 p. 2410-2412, Aug. 1997.
- NI, Y.; GONG, X. Simultaneous spectrophotometric determination of mixtures of food colorants. **Anal. Chim. Acta**, v. 354, p. 163-171, 1997.

- NUNES, I. J. **Nutrição animal básica**. 2. ed. Belo Horizonte: FEP MVZ, 1998. 388 p.
- OHLWEILER, O. A. **Fundamentos da análise instrumental**. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos, 1991. 486p.
- OLIVEIRA, R. Q.; JUNQUEIRA, V. C. **Plano de negócios: microteno**. Feira de Santana: [s.n], 2006.
- OLIVER, J.; PALOU, A. Chromatographic determination of carotenoids in foods. **J. Chromatogr.**, Amsterdam, v. 881, p. 543-555, 2000.
- OLSON, J.A. Provitamin A function of carotenoids: the conversion of beta-carotene into vitamin A. **J. Nutr.**, Philadelphia, v. 119, n.1, p. 105-8, 1989.
- OLSON, V. A.; OWENS, I. P. F. Costly sexual signals: are carotenoids rare, risky or required? **Trends Ecol. Evol.**, v. 13, p. 510–514, 1998.
- PASCH, J. H.; VON ELBE, J. H. Betanine stability in buffered solutions containing organic acids, metal cations, antioxidants, or sequestrants. **J. Food Sci.**, v. 44, p. 72-74, 1979.
- PASSOTTO, J. A.; PENTEADO, M. D. V. C.; MANCINI-FILHO, J. Oxidative resistance and antioxidative activity of carotenoids in food. **Boll. Chim. Farmaceutico**. v. 134, n. 6, p. 306-311, 1995.
- PÁTKAI, G.; BARTA, J. Decomposition of betacyanins and betaxanthins by heat and pH changes. **Die Nahrung**, v. 40, n. 5, p. 267-270, 1996.
- PCHTRG. PUBLIC CITIZEN HEALTH RESEARCH GROUP. **Dyes in your food**. The American Academy of Pediatrics Committed on Drugs in Pediatrics: October, 1985. Disponível em: <<http://www.feingold.org/pg-research.html>>. Acesso em: 25 de fev. 2010.
- PEARSON, D. The identification of EEC food colours. **J. Ass. Publ. Anal.**, v. 11, p. 127-134, 1973.
- PÉREZ-URQUIZA, M.; BELTRÁN, J. L. Determination of dyes in foodstuffs by capillary zone electrophoresis. **J. Chromatogr A**, v. 898, p. 271-275, 2000.
- PETBR. O mais complete guia do mercado Pet Brasileiro. **Rações**. Disponível em: <<http://www.petbrasil.com.br/racao1.asp>>. Acesso em: mar. 2010.
- PIATELLI, M.; IMPERATO, F. Betacyanins of the family cactaceae. **Phytochemistry**, v. 8, p. 1503–1507, 1969.
- PIATELLI, M.; MINALE, L. Pigments Centrospermae. I. Betacyanins from *Phyllocactus hybridus* Hort. and *Opuntia ficus indica*, **Phytochemistry**, v. 3, p. 307-311, 1964.
- PIMENTA, C. J.; VILELA, E. R. Composição microbiana e ocratoxina a no café (*coffea arabica* l.) submetido a diferentes tempos de espera antes da secagem. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 27, n. 6, p. 1315-1320, nov./dez. 2003.

PIKE, T. W.; BLOUNT, J. D.; LINDSTRÖM, J.; METCALFE, N. B. Dietary carotenoid availability, sexual signalling and functional fertility in sticklebacks **Biology Letters – Animal Behaviour**, p. 1-3, 18 nov. 2009. [*published online*]

PINHEIRO, K. A. de P. N. História dos hábitos alimentares ocidentais. **Universitas Ciências da Saúde**, v. 3, n. 1, p.173-190, 2005.

PINHEIRO-SANT'ANA, H. M.; STRINGHETA, P. C.; BRANDÃO, S. C. C.; PÁEZ, H. H.; QUEIRÓZ, V. M. V. Evaluation of total carotenoids, a-and b-carotene in carrots (*Daucus carota* L.) during home processing. **Ciênc.Tecnol. Aliment.**, Campinas, v. 18, n. 1, p. 39-44, 1998.

POLÔNIO, M. L. T.; PERES, F. Consumo de aditivos alimentares e efeitos à saúde: desafios para a saúde pública brasileira. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 25, n. 8, p. 1653-1666, ago. 2009

PONS JR., W. A.; FRANZ, A. O. J. High pressure liquid chromatographic determination of aflatoxins in peanut products. **Journal - Association of Official Analytical Chemists**, v. 61, n. 4, p. 793 – 800, Jul. 1978.

PRADO, G.; OLIVEIRA, M. S. de; ABRANTES, F. M.; SANTOS, L. G dos; VELOSO, T.; BARROSO, R. E. de S. Incidência de ocratoxina A em café torrado e moído e em café solúvel consumido na cidade de Belo Horizonte, MG. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 20, n. 2, maio/ago. 2000.

PRADO, G.; OLIVEIRA, M. S. de; CARVALHO, E. P.; LIMA, L. C. O.; VELOSO, T.; SOUZA, L. A. F.; CARDOSO, A. C. F. Ochratoxin A determination in beer by immunoaffinity column clean-up and high-performance liquid chromatography. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 23 (supl.), p. 58-61, dez. 2003.

PRADO, M. A.; GODOY, H. T. Corantes artificiais em alimentos **Alim. Nutr.**, Araraquara, v.14, n.2, p. 237-250, 2003.

PRADO, M. A.; GODOY, H. T. Validation of the methodology to determine synthetic dyes in foods and beverages by HPLC. **J. Liq. Chromotogr. Related Technol.**, v. 25, n. 16, p. 2455-2472, 2002.

RÊGO, F. M. Psitacédeos. **Revista Animais de Companhia**, n. 5, p. 24-26, mar. 2009. Disponível em: < http://www.nutricao.vet.br/pdfs/revista_animais_de_cia_mar_2009.pdf> .

RIZOVA, V.; STAFILOV, T. XAD-2 HPTLC method of identification and determination of some synthetic food colorings. **Anal. Lett.**, v. 28, p. 1305-1316, 1995.

ROCK, C. L.; FADA, R. D.; JACOB, R. A.; BOWEN, P. E. Update on the biological characteristics of the antioxidante micronutrients: vitamin C, vitamin E, and the carotenoids. **J. Am. Diet. Assoc.**, Chicago, v. 96, n. 7, p. 693-702, 1996.

RODRIGUES-AMAYA, D. **A guide to carotenoid analysis in foods**. Washington D. C.: OMNI Research: ILSI Press, 1999.

ROSS, G. U.; TANIWAKI, M. H.; SABINO, M.; VIZONI, T.; HIROOKA, E. H. Produção de Patulina em Maçã (*Malus domestica* Borkhausen), Cultivares Gala e Fuji Inoculadas com *Penicillium* spp. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 24, n. 4, p. 641-645, Out./Dez. 2004.

ROSS, P. F.; NELSON, P. E.; RICHARD, J. L.; OSWEILER, G. D.; RICE, L. G.; PLATTNER, R. D.; WILSON, T. M. Production of Fumonisin by *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum* Isolates Associated with Equine Leukoencephalomalacia and a Pulmonary Edema Syndrome in Swine. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, n. 10, p. 3225-3226, Oct. 1990.

ROSTAGNO, H. S. et al. **Tabelas brasileiras para aves e suínos, composição de alimentos e exigências nutricionais**. Viçosa: Imprensa Universitária, 2000.

SAAD, C. E. do P.; FERREIRA, W. M.; BORGES, F. M. de O.; LARA, L. B. Avaliação nutricional de rações comerciais e semente de girassol para papagaios-verdadeiros (*Amazona aestiva*) **Ciênc. Agrotec.**, Lavras, v. 31, n. 5, p. 1493-1499, set./out., 2007.

SALGADO, S. M. A. **Estudo da estabilidade da betalaína extraída da beterraba**. Viçosa, 1997. 48 p. Dissertação (Mestrado em *Magister Scientiae*) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1997.

SAMSON, R. A.; HOCKSTRA, E. S.; FRISVAD, J. C.; FILTENBORG, O. **Introduction to food and airborne fungi**. Wageningen Press, The Netherlands: Centaalbureau Voorschimmelculturs-Utrecht Ponson & Looyen, 2002:

SANTIN, E.; MAIORKA, A.; GAMA, N. M. S. Q.; DAHLKE, F.; KRABBE, E. L.; PAULILLO, A. C. Efeitos de produto de exclusão competitiva na prevenção dos efeitos tóxicos da ocratoxina A em frangos. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, Campinas. v. 3, n. 2, p. 185-191, maio 2001.

SANTURIO, J. M.; DOTTO, F. L.; BARROS, C. S. L. de; MALUFF, F.; GRIS, J.; OLIVEIRA, F. N.; ALVES, S. H. Intoxicação espontânea e experimental por fumonisinas em suínos no Brasil. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 30, n. 3, p. 191-195, Oct. 2002.

SARANTÓPOULOS, C. I. G. L.; OLIVEIRA, L. M.; CANAVESI, E. Alterações de alimentos que resultam em perda de qualidade. In: SARANTÓPOULOS, C. I. G. L.; OLIVEIRA, L. M.; CANAVESI, E. **Requisitos de conservação de alimentos em embalagens flexíveis**. Campinas: CETEA/ITA, 2001. p. 1-22.

SCHOEFS, B. Chlorophyll and carotenoid analysis in food products. Properties of the pigments and methods of analysis. **Trends in Food Science & Technology**, v. 13, p. 361-371, 2002.

SCHOEFS, B. Determination of pigments in vegetables. **J. Chromatogr.**, v. 1054, p. 217-226, 2004.

SCHWARTZ, S. J.; LORENZO, T. V. Chlorophyll stability during continuous aseptic processing and storage. **J. Food Sci.** Chicago, v. 56, p. 1059-1062, 1991.

SCUDAMORE, K. A. Principles and applications of mycotoxin analysis. In: DUARTE, D. E.

The mycotoxin blue book. Nottingham: Nottingham University Press, 2005; p. 157 – 185.

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

SCUSSEL, V. M. Fatores que favorecem o desenvolvimento de fungos e produção de micotoxinas. In: LORINI, I.; MIIKE, L. H. **Armazenagem de Grãos**. Campinas: Editora IBG, 2002a. p. 739-756.

SCUSSEL, V. M. Fungos em grãos armazenados. In: LORINI, I.; MIIKE, L. H. **Armazenagem de grãos**. Campinas: Editora IBG, 2002b. p. 675-690.

SCUSSEL, V. M. Metodologia analítica para micotoxinas. In: LORINI, I.; MIIKE, L. H. **Armazenagem de grãos**. Campinas: Editora IBG, 2002c. p. 775-786.

SCUSSEL, V. M. **Micotoxinas em alimentos**. Florianópolis: Insular, 1998.

SCUSSEL, V. M. Micotoxinas em grãos armazenados. In: LORINI, I.; MIIKE, L. H. **Armazenagem de grãos**. Campinas: Editora IBG, 2002d. p. 693-712; 721-727.

SCUSSEL, V. M.; GIORDANO, B. N. E.; SIMAO, V.; da ROCHA, M. W.; dos REIS, L. F. C.; XAVIER, J. J. M. Mycotoxins evaluation in feed for pets using tandem liquid chromatography mass/mass. In: 9th INTERNATIONAL WORKING CONFERENCE ON STORED PRODUCT PROTECTION, 2006, Campinas: **Proceedings...** Campinas: ABRAPOS, 2006. v. 1. p. 182-188.

SEIXAS, E.; SEIXAS, G. A plumagem dos canários: comprimento, pigmentação e colocação **Revista da UPCC**, p. 1-5, 2001. Disponível em: <http://www.spco.com.br/Artigos_tecnicos/plumagem.pdf>. Acesso em 15 jan. 2010.

SENAR, J. C.; ESCOBAR, D. Carotenoid derived plumage coloration in the siskin *Carduelis spinus* is related for foraging ability. **Avian Science**, v. 2, n. 1, p. 19-24, 2002.

SHARMA, M.; MARQUEZ, C. Determination of aflatoxins in domestic pet foods (dog and cat) using immunoaffinity column and HPLC. **Animal Feed Science and Technology**, v. 93, n. 1-2, p. 109-114, 2001.

SHOTWELL, O. L.; GOULDEN, M. L.; BOTHAST, R. J.; HESSELTINE, C. W. Mycotoxins in hot spots in grains. I. Aflatoxin and zearalenone occurrence in stored corn. **Cereal Chemistry**, v. 52, n. 5, p. 687 – 697, Sep./Oct. 1975.

SILVA, L. C. **Fungos e micotoxinas em grãos armazenados**. Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, mar. 2005 Disponível em: <<http://www.agais.com/fungos.htm>>. Acesso em: 16 jul. 2006.

SILVA, M. C. **Alterações na biossíntese de carotenóides em leveduras induzidas por agentes químicos**. 2004. Tese (Doutorado em Ciências de Alimento), Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.

- SILVA, V. R. F. da. **Hipovitaminose A em papagaio verdadeiro (*Amazona aestiva*)**. 2008. 15f. Especialização (Pós-Graduação em Clínica Médica de Pequenos Animais) - Universidade Castelo Branco, Florianópolis, 2008.
- SIMÃO, V.; BASSO, G.; MOECKE, E. H. S.; MANFIO, D.; SCUSSEL, V. M. .
Determinação do perfil de corantes e ingredientes e em rações para pássaros de estimação. In: XVI ENCONTRO NACIONAL DE ANALISTAS DE ALIMENTOS, 2009, Minas Gerais. **Anais...** Belo Horizonte: SBAAL, 2009.
- SINGH, M. Automation HPLC determination of uncobined intermédiantes of in FD and C red n. 40. **J. Ass. Off. Anal. Chem.**, v. 72, n 6, p. 1342-1347, 1982.
- SORIANO, J. M.; DRAGACCI, S. Intake, decontamination and legislation of fumonisins in foods. **Food Research International**, v. 37 p. 367-374, Jan. 2004.
- STAHL, W.; SIES, H. Antioxidant activity of carotenoids. **Molecular Aspects of Medicin.**, v. 24, n. 6, p. 345-351, 2003.
- STINTZING, F. C.; CARLE, R. Functional properties of anthocyanins and betalains in plants, food, and in human nutrition. **Trends Food Sci. Technol.**, v. 5, p. 19-38, 2004.
- STOPPER, H.; SCHMITT, E.; KOBRAS, K. Genotoxicity of phytoestrogens. **Mutation Research**, v. 574 p. 139–155, 2005.
- STRACK, D.; VOGT, T.; SCHLIEMANN, W. Recent advances in betalain research. **Phytochemistry**, v. 62, p. 247-269, 2003.
- STREIT, N. M.; CANTERLE, L. P.; CANTO, M. W. do; HECKTHEUER, L. H. H. As clorofilas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 35, n. 3, p. 748-755, maio/jun., 2005.
- SWENSON, M. J.; REECE, W. O. **Dukes Fisiologia dos animais domésticos**. 11. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan 1996. 856p.
- TAKAHASHI, M. Y.; YABIKU, H. Y.; MARSIGLIA, D. A. P. Determinação quantitativa de corantes artificiais em alimentos. **Rev. Inst. Adolfo Lutz** v. 48, n 1/2, p. 7-15 1988.
- TANAKA, T.; YONEDA, A.; INOUE, S.; SUGIURA, Y.; UENO, Y. Simultaneous determination of trichothecene mycotoxins and zearalenone in cereals by gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of chromatography. A**, v. 882, n. 1/2, p. 23 – 28, Jun. 2000.
- TEIXEIRA C. G. Aditivos em alimentos. **Boletim do CEPPA**, n. 18, p. 1-22, jun. 1969.
- TENG, S. S.; CHENG, B. H. Formation of pyrochlorophylls and their derivatives in spinach leaves during heating. **Food Chem.** Amsterdam, v. 65, p. 367-373, 1999.
- TERCI, D. B. L.; ROSSI, A. V. Indicadores naturais de ph: usar papel ou solução? **Química Nova**, v. 25, n. 4, p. 684-688, 2002.
- TIMBERLAKE, C. F.; BRIDLE, P. In: HARBONE, J. B.; MABRY, T. J.; MABRY, H. (Ed.)

The Flavonoids. New York: Academic Press: 1975, p. 215.

TRICARD C.; CAZABEIL, J. M.; MEDINA, B. Identification of natural dyes added to food products. **Sciences Des Aliments**, v. 18, p. 25-40, 1998.

TURCOTTE, J. C.; HUNT, P. J. B.; BLAUSTEIN, J. D. Estrogenic effects of zearalenone on the expression of progesterin receptors and sexual behavior in female rats. **Hormones and Behavior**. v. 47 p. 178– 184, 2005.

VENTURA, M.; GUILLEN, D.; ANAYA, I.; BROTO-PUIG, F.; LLIBERIA, J. L.; AGUT, M.; COMELLAS, L. Ultra-performance liquid chromatography/ tandem mass spectrometry for the simultaneous analysis of aflatoxins B1, G1, B2, G2 and ochratoxin A in beer. **Rapid Communications in Mass Spectrometry: RCM**, v. 20, n. 21, p. 3199 – 3204, 2006.

VETORAZZI, G. Toxicological profiles of food colorants In: VETORAZZI, G. **Handbook of international food regulatory toxicology**. Lancaster: MTP Press, 1981. p. 13-86. v. 2.

VON ELBE, J. H. Colorantes. In: FENNEMA, O. W. **Química de los alimentos**. 2. ed. Zaragoza : Wisconsin - Madison, 2000. p. 782-799.

VON ELBE, J. H. The betalains. In: FURIA, E. T. (Ed.). **Current Aspects of Food Colorants**. Boca Raton: CRC Press Inc., 1977. p 29-39.

VON ELBE, J. H.; MAING, I.; AMUNDSON, C. H. Color stability of betanin. **J. Food Sci.**, v. 39, p. 334-337, 1974.

WEISS, R.; FREUDENSCHUSS, M.; KRŠKA, R.; MIZAIKOFF, B. Improving methods of analysis for mycotoxins: molecularly imprinted polymers for deoxynivalenol and zearalenone. **Food Additives and Contaminantes**, v. 20, n. 4, p. 386 – 395, Apr. 2003.

WHITAKER, T. B.; DICKENS, J. W.; MONROE, R. J. Variability of aflatoxin test results. **Journal of American Oil Chemical Sociation**, v. 51, p. 214 – 218, 1974.

WHO/FAO. World Health Organization. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Evaluation of certain food additives and contaminants. **Codex general standard for food additives**. Codex STAN 192-1995. Geneva: World Health Organization, 1995.

WONG, G. J. **Mycotoxins**. First Botany 135 Exam, October 9, 2007. Disponível em: <<http://www.botany.hawaii.edu/faculty/wong/bot135/lect11.htm>> . Acesso em: jun. 2006.

YANUKA, Y. et al. The isolation and separation of dyes from foodstuffs by column chromatography. **Analyst**, v. 88, p. 872-876, 1963.

YAU, K. Y.; LEE, H.; HALL, J. C. Emerging trends in the synthesis and improvement of hapten-specific recombinant antibodies. **Biotechnology advances**, v. 21, n. 7, p. 599 – 637, Oct. 2003.

ZINEDINE, A.; BRERA, C.; ELAKHDARI, S.; CATANO, C.; DEBEGNACH, F.; ANGELINI, S.; De SANTIS, B.; FAID, M.; BENLEMLIH, M.; MINARDI, V.; MIRAGLIA, M. Natural occurrence of mycotoxins in cereals and spices commercialized in Morocco. **Food Control**,

v. 17, p. 868–874, Jun. 2005.

ZWIERZCHOWSKI, W.; GAJEŃCKI, M.; OBREMSKI, K.; ZIELONKA, Ł.;
BARANOWSKI, M. The occurrence of zearalenone and its derivatives in standard and
therapeutic feeds for companion animals. **Polish Journal of Veterinary Sciences**, v. 7, n. 4,
p. 289-293. 2004,

3 ARTIGO

**DETERMINAÇÃO DO PERFIL DE INGREDIENTES E CORANTES ARTIFICIAIS
EM ALIMENTOS PARA AVES DE COMPANHIA E SUA RELAÇÃO COM
MICOTOXINAS**

DETERMINAÇÃO DO PERFIL DE INGREDIENTES E CORANTES ARTIFICIAIS EM ALIMENTOS PARA AVES DE COMPANHIA E SUA RELAÇÃO COM MICOTOXINAS

3.1 Resumo

A formulação de alimentos para aves de companhia é uma atividade complexa, uma vez que envolve ingredientes diversificados bem como aditivos para suprir tanto as necessidades nutricionais bem como estéticas, como a intensificação da cor de suas plumagens. Neste contexto, é importante ressaltar o controle de qualidade destes produtos no que diz respeito à padronização na composição de seus ingredientes, a verificação da presença de substâncias nocivas à saúde destes animais (corantes artificiais e micotoxinas) e a correta rotulagem. Não existe legislação nacional e internacional específica para o controle de aditivos e micotoxinas em alimentos para animais de companhia. Esse trabalho reporta um estudo dos ingredientes e corantes artificiais nesses alimentos, correlacionando-os com sua toxicidade, proporções dos Tipos de ingredientes com o risco de contaminação por micotoxinas. Foram coletadas 36 amostras de alimentos para aves de companhia, sendo 26 comercializadas em embalagens lacradas e 10 à granel. Os corantes artificiais foram extraídos dos ingredientes corados e identificados por espectroscopia com varredura (300 à 700 nm). Os ingredientes dos alimentos para aves foram selecionados através de separação (visual) macroscópica e microscópica e suas respectivas proporções calculadas. Os dados obtidos foram confrontados com a composição básica relatada nos rótulos e com a legislação vigente. Quanto ao perfil de corantes foi observado que em 100 % dos ingredientes de cor laranja estava presente o corante amarelo crepúsculo (E 110), nos amarelos 100% eram corados artificialmente com tartrazina (E 102). Somente um ingrediente estava corado com azul brilhante (E 133), dos ingredientes verdes, 50 % eram misturas de corantes tartrazina (E 102) e azul brilhante (E 133), porém outras misturas coradas foram identificadas. Entre os corantes vermelhos encontrados são destacados: vermelho 40, azorrubina, ponceau 4R e amaranto. Quanto à indicação no rótulo da presença de corantes apenas quatro fabricantes relatavam a presença do mesmo, porém não era especificado qual corante. Os principais ingredientes encontrados nos alimentos para aves foram em ordem decrescente: (a) ração (extrusada e/ou peletizada), com biscoito e/ou frutas (cristalizada e/ou desidratadas), (b) amendoim (com e sem casca), (c) grãos (milho, arroz, soja, trigo, triticale, triguilho, ervilha e aveia) e (d) outros (farelo de soja e trigo, quirera de milho e arroz, alpiste, painço). Os ingredientes presentes em maior quantidade foram: ração extrusada e/ou peletizada, sementes de girassol, milho e amendoim. Como esperado houve variação na composição dos ingredientes dos produtos de acordo com a especificação (diferentes espécies de pássaros), sendo muitos deles passíveis de contaminação por micotoxinas. Do total de alimentos analisados, 36 % apresentaram conteúdo de umidade acima do permitido (12 %). Este fato aliado à complexa composição dos alimentos completos pode favorecer o desenvolvimento de bolores, leveduras e contaminação por micotoxinas. Há necessidade de mais estudos voltados para rações e o mercado pets, tanto quanto a sua composição, como possível contaminação por micotoxinas, para garantir sua qualidade e segurança para os animais.

Palavras-chave: aves de companhia, alimentos completos, ingredientes, corantes artificiais, toxicidade, micotoxinas.

3.2 Introdução

Animais de companhia são aqueles pertencentes às espécies criadas e mantidas pelo homem para seu entretenimento, sem propósito de fornecimento de produtos ou subprodutos de interesse econômico (BRASIL, 2009a). Dentre os principais animais de companhia destacam-se: cães, gatos, aves, peixes ornamentais e hamsters.

A qualidade dos produtos para a alimentação desses animais deve ser investigada, uma vez que tem sido observado um aumento significativo do número destes animais e da produção de alimentos completos voltada a esse mercado (SIMÃO; SCUSSEL, 2008; SCUSSEL et al., 2006). Devido a este cenário, cada vez mais os órgãos reguladores e fiscalizadores estão preocupados em garantir aos consumidores a qualidade destes produtos.

No caso das aves de companhia (silvestres ou exóticas), muitos alimentos, misturas, suplementos e concentrados tem aparecido como novos produtos para sua alimentação. Estes produtos por sua vez têm por objetivo proporcionar uma alimentação balanceada e que atenda as necessidades nutricionais diárias de cada animal.

Os alimentos destinados a esses animais possuem uma complexa formulação, e isto possibilita a ocorrência de contaminação, erros na rotulagem e na própria formulação, sendo que estes fatos podem acarretar prejuízos à saúde animal. Logo, a investigação das características dos ingredientes e produto acabado é de grande importância (SIMÃO et al., 2009, SIMÃO; SCUSSEL, 2008, BOERMANS; LEUNG, 2007; LEUNG; DÍAZ-LLANO; SMITH, 2006).

Os ingredientes são os componentes que fornecerão todos os nutrientes necessários aos animais. É preciso lembrar que os animais apresentam exigências de níveis determinados para cada nutriente, e desta forma é preciso avaliar quais fontes tem a melhor qualidade de nutrientes, pois um único alimento geralmente não é capaz de atender todas as exigências do animal ao mesmo tempo. Logo, para atender as necessidades dos animais é necessário combinar vários alimentos para que o resultado final seja um composto mais balanceado e eficiente do ponto de vista nutricional (ROSTAGNO et al., 2000). No caso das aves de companhia, é importante salientar que, apesar das várias semelhanças entre elas, cada espécie tem uma exigência nutricional, o que requer uma observação cuidadosa no que se refere ao tipo de alimento fornecido. Normalmente, são encontrados como oferta de alimento, misturas de sementes ou, em alguns casos, apenas um tipo (por exemplo, a semente de girassol). Esse fato pode acarretar distúrbios nutricionais, já que aves que consomem sementes selecionarão apenas as mais palatáveis, deixando nutrientes essenciais para sua dieta nas sementes

desprezadas (RÊGO, 2009).

De acordo com Kill et al. (2008), a prática distorcida de utilizar sementes como alimento único para passeriformes e psitacídeos em cativeiro, na tentativa de reproduzir o que eles comem na natureza, pode ocasionar muitas doenças e até a morte prematura desses animais, uma vez que essa prática pode fazer com que eles desenvolvam graves deficiências nutricionais, por serem pobres em alguns nutrientes, tais como vitaminas, minerais e aminoácidos. Desta forma, modificar os hábitos de fornecimento de sementes e, ou, alimentos inespecíficos, substituindo-os por alimentos na forma de alimentos completos são atividades que contribuem com a promoção da saúde desses animais.

Entretanto, cabe ressaltar que uma das grandes dificuldades na criação de aves de companhia em cativeiro é a obesidade provocada por uma alimentação desbalanceada e rica em energia. O excesso de energia proveniente deste tipo de alimentação é depositado no organismo como gordura (tecido adiposo), podendo ter conseqüências negativas sobre a reprodução, desencadeando doenças hepáticas e cardiovasculares, comprometendo assim, a longevidade e a qualidade de vida das aves (KILL et al., 2008).

Além do desequilíbrio nutricional que uma alimentação não balanceada pode provocar, outros problemas podem ser observados quanto à qualidade de alimentos para animais de companhia. Dentre eles está a contaminação por agentes químicos (resíduos de agrotóxicos, metais pesados, e corantes artificiais acima dos LMRs) (LINDINO et al. 2008; PRADO; ABUJAMRA; GODOY, 2003, SIMÃO et al., 2009); toxinas (produzidas por bactérias - enterotoxinas e fungos - micotoxinas), além da presença de microorganismos (bactérias e fungos - patogênicos e/ou toxigênicos) (MARTINS; MARTINS; BERNARDO, 2002; SCUSSEL et al. 2006; CAMPOS et al. 2008).

A presença de substâncias que podem afetar a saúde animais de companhia varia com os ingredientes presentes nos alimentos, bem como, o tipo de animal à que se destina. No caso das aves de companhia esses contaminantes são principalmente as micotoxinas e os aditivos alimentares tais como os corantes artificiais.

A adição de corantes na alimentação de aves tem por objetivo torná-los mais atrativos para o consumo, podendo também intensificar a cor das plumagens das aves. São permitidos para adição em produtos alimentícios animais corantes artificiais, (Brasil, 11) (Estados Unidos, 7) (alguns países europeus como a Suécia são proibidos) (BRASIL, 1965; 2003; 2004, FDA, 2007; EC, 2003; 2010). A grande variabilidade de regulamentações no que diz respeito a aditivos para alimentos destinados à animais é um fator agravante para o controle de qualidade destes produtos.

Os corantes permitidos são principalmente da classe dos azóicos (monoazo) derivados do alcatrão da hulha (PRADO; ABUJAMRA; GODOY, 2003). Dentre os possíveis efeitos tóxicos destacam-se: reação anafilática, broncoconstrição, asma, bronquite, urticária, prurido, tumores na tireóide, entre outros. Além disso, os corantes artificiais podem apresentar níveis altos de metais pesados, o que agravaria os efeitos tóxicos destas substâncias, no organismo (LINDINO et al., 2008). Não existe uma legislação específica para o controle deste tipo de aditivo na alimentação animal e os estudos com espécies específicas de animais de companhia ainda são insuficientes, principalmente aqueles relativos à toxicidade e segurança. Logo as regulamentações pertinentes a esses aditivos alimentares (corantes) utilizados em alimentos destinados à animais de companhia são extrapolações das regulamentações utilizadas para alimentos para humanos (BRASIL, 1965; 2003; 2004).

Outro problema verificado na alimentação de animais de companhia é sua contaminação por micotoxinas. Embora seja tema abordado mais freqüentemente, são poucos os estudos específicos para esta classe de animais. Logo, os órgãos reguladores devem se preocupar em garantir aos consumidores a qualidade destes produtos quanto à presença de micotoxinas como aflatoxinas (AFLs), ocratoxina A (OTA), fumonisinas (FBs) e zearalenona (ZON) (BOERMANS; LEUNG, 2007; SIMÃO; SCUSSEL, 2008). A toxicidade das micotoxinas está associada a efeitos como: icterícia, câncer hepático, (AFLs), tumores (carcinogenicidade), imunossupressão, nefrotoxicidade (OTA), estrogênicos, infertilidade (ZON). No Brasil a legislação vigente para os limites máximos de resíduos (LMR) permitidos para micotoxinas abrange apenas a contaminação para AFLs ($50 \mu\text{g.kg}^{-1}$) em ingredientes e alimentos para animais em geral (FAO, 2004). Logo, este regulamento não observa a especificidade dos efeitos tóxicos em cada espécie de animal, além disso, não abrange outras micotoxinas que podem acarretar importantes prejuízos econômicos à indústrias produtoras de alimentos para animais, agricultores e à saúde dos animais. Em outros países como, Estados Unidos e na União Européia, a legislação já regulamenta os LMRs para outras micotoxinas como ZON, OTA, FBS, ($0,5$ a 3 ; $0,05$ a $0,25$; e 5 a 60 mg.kg^{-1} , respectivamente) (EC, 2006).

Em se tratando de animais de companhia, ainda não existe legislação oficial que regulamente a contaminação por micotoxinas, porém algumas associações como ANFAL-PET e AAFCO, recomendam valores para esse mercado AFLs ($20 \mu\text{g.kg}^{-1}$) (AAFCO, 2000; ANFAL-PET, 2007).

Este trabalho relata a avaliação de alimentos para aves de companhia quanto seu perfil de ingredientes, sua qualidade e relação com micotoxinas. A identificação de corantes artificiais e os dados declarados na rotulagem com a legislação vigente.

3.3 Material e Métodos

Material

Amostras: total de 36 amostras de alimentos completos e mistura de grãos para aves de companhia silvestres ou exóticas (papagaios, trinca-ferro, pássaro preto, sabiá, calopsitas, curió, mandarim, entre outros), sendo 26 comercializadas em embalagens lacradas e 10 comercializadas à granel. As amostras eram de 19 marcas diferentes e produzidas nos estados de São Paulo (SP), Santa Catarina (SC), Minas Gerais (MG), Rio Grande do Sul (RS) e Paraná (PR). O Quadro 1 apresenta detalhes das amostras, tal como local de coleta e estado de fabricação. *Nota:* os produtos não se destinavam para uma espécie específica de ave, pois nos rótulos os fabricantes indicavam diferentes espécies de aves as quais poderiam consumir o mesmo produto.

Solventes, reagentes e padrões: hidróxido de amônio, acetato de amônio, ácido acético glacial, éter de petróleo, metanol e PBS, todos p.a. (Vetec). Acetonitrila e metanol (Carlos Herba e JT Baker - grau HPLC) e água Milli-Q (Sistema MilliQ, Millipore). *Padrões de corantes:* amarelo (Tartrazina e Crepúsculo), vermelho (Amaranto, Azorrubina, Boudeaux, Ponceau 4R, Vermelho 40 e Eritrosina) e azul (Brilhante e Indigotina), cedidos pela empresa Duas Rodas, Jaraguá do Sul, Santa Catarina, Brasil. *Padrões de micotoxinas:* AFLs (AFB₁, AFB₂, AFG₁ e AFG₂), FBs (FB₁ e FB₂), ZON e OTA, todos da Sigma®.

Equipamentos: manta de aquecimento (Dist), balanças semi-analítica (CAB) e analítica (Mettler), microscópio estereoscópico (Carlzeiss Jena) e estufa bacteriológica (Fanem). Moinho/quarteador - Moedor de grãos (mesh: 13 mm), série II (Romer Labs), liquidificadores de aço inoxidável (Skymesen Eletro) agitador de tubos (Fanem), concentrador de amostras (Tecnal), espectrofotômetro (Hitachi) e cromatógrafo líquido de alta eficiência (Agilent 1200) acoplado a detector MS: ABI 3200 QTrap (Applied Biosystem).

Outros materiais: cápsulas de porcelana, gral de porcelana e pistilo, beakers (50 mL), frascos com tampa de polietileno e septo de silicone (2 mL), capilares de vidro, microseringas (Hamilton), papel cromatográfico nº1 (Wathman), fios de lã natural, cuba cromatográfica (30 cm x 25 cm x 10 cm), pinças de inox, dessecadores, discos de alumínio para determinação de umidade (Ø 4 cm). Colunas de imunoafinidade AOZ (Vicom), cartuchos amino quaternário (N⁺ - Applied Separations) e coluna cromatográfica Phenomenex, C18, 50 x 2,10 mm, tamanho de partícula 2,6 µm.

Quadro 1. Local de fabricação, coleta e descrição das amostras de alimentos para aves de companhia avaliadas - embalagens fechadas e à granel

Fabricação			Alimento para aves de companhia				
Estado	Cidade	Local de coleta	Marca	Descrição	Tipo	Peso (g)	Código
[A] Produto comercial (embalagem fechada)							
SANTA CATARINA							
	Camboriú	Florianópolis/SC	Q	Ração para sabiá e pássaro preto	Ração extrusada/pelletizada	500	28
	Palhoça	Belo Horizonte/MG	L	Mistura para trinca-ferro	Mistura de grãos e ração extrusada com frutas	500	15
	São José	Florianópolis/SC	N	Mistura para papagaio	Mistura de grãos	500	18
		Florianópolis/SC	O	Mistura trinca-ferro	Mistura de grãos e ração extrusada/pelletizada com frutas	500	22
		Florianópolis/SC	N	Painço Alemão ou branco	Grãos	200	26
		Florianópolis/SC	N	Painço Francês ou vermelho	Grãos	200	30
		Florianópolis/SC	N	Painço Chileno ou verde	Grãos	200	32
		Florianópolis/SC	N	Painço Colorido	Grãos	200	34
	Tubarão	Passo Fundo/RS	G	Alimento para pássaros Trinca-ferro	Mistura de grãos e ração extrusada/pelletizada com frutas	500	8
		Passo Fundo/RS	G	Alimento para pássaros Trinca-ferro	Mistura de grãos e ração extrusada/pelletizada	500	9
SÃO PAULO							
	Campinas	Passo Fundo/RS	J	Alimento especial para pixinho, trinca-ferro	Mistura de grãos e ração extrusada/pelletizada com frutas	500	13
		Florianópolis/SC	P	Ração balanceada Sabiá Pellets	Ração extrusada/pelletizada	200	24
	Dourado	Florianópolis/SC	S	Alimento super premium para aves Calopsitas	Ração extrusada/pelletizada com frutas	300	36
	Indaiatuba	Passo Fundo/RS	C	Alimento especial para papagaio	Mistura de grãos e ração extrusada/pelletizada com frutas	400	12
		Passo Fundo/RS	C	Ração para pássaros silvestres	Ração extrusada/pelletizada	500	3
	Mogi Guaçu	Belo Horizonte/MG	K	Ração especial para pixinho/trinca-ferro	Mistura de grãos e ração extrusada com frutas	500	14
	Mogi Mirim	Passo Fundo/RS	D	Alimento completo para papagaios	Mistura de grãos	500	4
	Rio Claro	Florianópolis/SC	F	Ração para trinca-ferro	Mistura de grãos e ração extrusada/pelletizada com frutas	500	20
		Passo Fundo/RS	F	Ração para pássaros frutamix	Mistura de grãos e frutas desidratadas cristalizadas	500	7
	Sales de Oliveira	Belo Horizonte/MG	E	Gorjeio alimento para animais	Ração extrusada/pelletizada	500	6
MINAS GERAIS							
	Betim	Belo Horizonte/MG	A	Mistura Premium para papagaios cacatuas e araras	Mistura de grãos e ração extrusada/pelletizada	500	5
		Belo Horizonte/MG	A	Love birds	Mistura para papagaios com frutas desidratadas/cristalizadas	250	1
	Belo Horizonte	Belo Horizonte/MG	M	Ração para papagaio	Mistura de grãos e ração extrusada/pelletizada	500	16
RIO GRANDE DO SUL							
	Passo Fundo	Passo Fundo/RS	H	Mix para papagaio	Mistura de grãos sem frutas	500	10
		Passo Fundo/RS	I	Mix para papagaio	Mistura de grãos com frutas	500	11
PARANÁ							
	Cambará	Passo Fundo/RS	B	Ração para papagaios	Mistura de grãos e ração extrusada/pelletizada	500	2
		<i>Total empacotadas</i>	26				
[B] Produto à granel (embalagem aberta)							
SANTA CATARINA							
	São José	Florianópolis/SC	N	Ração para papagaio	Mistura de grãos	500	17
		Florianópolis/SC	O	Mistura trinca-ferro	Mistura de grãos e ração extrusada/pelletizada com frutas	500	21
		Florianópolis/SC	O	Mistura trinca-ferro	Mistura de grãos e ração extrusada/pelletizada com frutas	500	23
		Florianópolis/SC	N	Painço Alemão ou branco	Grãos	500	25
		Florianópolis/SC	N	Alpiste branco e vermelho	Grãos	500	27
		Florianópolis/SC	N	Painço Francês ou vermelho	Grãos	500	29
		Florianópolis/SC	N	Painço Chileno ou verde	Grãos	500	31
		Florianópolis/SC	R	Ração para pássaros	Ração extrusada/pelletizada com frutas	500	33
	Florianópolis	Florianópolis/SC	R	Ração para pássaros	Ração extrusada/pelletizada	500	35
SÃO PAULO							
	Rio Claro	Florianópolis/SC	F	Ração para trinca-ferro Mix	Mistura de grãos e ração extrusada/pelletizada com frutas	500	19
		<i>Total à granel</i>	10				
		Total geral	36				

Métodos

Coleta das amostras: as amostras foram coletadas por conveniência em agropecuárias, supermercados e lojas especializadas em alimentação para animais de companhia, nas cidades de Belo Horizonte, MG, Florianópolis, SC e Passo Fundo, RS (produzidas em diferentes estados das regiões Sul e Sudeste), no ano de 2009. As amostras de produtos *comerciais* estavam acondicionadas em embalagens (pacotes) lacradas (26) e as adquiridas à *granel* (10), em sacos plásticos de polietileno. Os pacotes eram de 200 a 500 g dependendo da marca e/ou fabricante. Já as amostras à *granel* foram adquiridas com peso total de 500 g cada.

Preparo das amostras: Após a coleta, as amostras foram homogeneizadas por quarteamento e separadas em porções para avaliação do perfil de ingredientes, ingredientes corados e corantes artificiais, bem como, para análises de micotoxinas (AFLs, FBs, ZON e OTA) e conteúdo de umidade, com 100; 0,5 a 5; 50 e 6 g, respectivamente. As amostras restantes foram embaladas à vácuo, acondicionadas em caixa acrílica com tampa e armazenadas em temperatura ambiente. A Figura 1 ilustra os tipos de alimentos avaliados (comerciais e à granel) e acondicionamento (à vácuo) para armazenamento. As amostras analíticas reservadas à avaliação para corantes e micotoxinas foram trituradas anteriormente à análise. Para corantes foi utilizado gral de porcelana e pistilo e para micotoxinas moinho quarteador.



Figura 1. Amostras de alimentos para aves de companhia (a) comercializadas embaladas e (b) acondicionadas à vácuo para estocagem

Métodos de separação de ingredientes dos alimentos para aves de companhia: A proporção de cada Tipo de ingrediente e ingredientes corados presente nos alimentos (100 g) em estudo foi avaliada por **(a) Tipo:** através de métodos de separação visual: macroscópico (seleção manual de cada ingrediente – visualmente diferentes – com Tipos e formatos e classificados por Grupos) e microscópico (identificação e separação com auxílio de microscópio estereoscópico dos ingredientes que não puderam ser identificados macroscopicamente). Posteriormente foi realizada a pesagem de cada Tipo de ingredientes e calculadas as proporções em 100 g (resultado expresso em porcentagem: %). Os dados obtidos foram correlacionados com a composição de ingredientes relatada nos rótulos dos produtos e confrontados com a legislação pertinente (BRASIL, 2009a,b,c). **(b) Coloridos:** após a determinação das proporções dos ingredientes por Tipo, aqueles que apresentavam adição de corante foram selecionados e em seguida agrupados conforme a coloração apresentada (amarela, azul, laranja, verde e vermelha). Além dessa classificação, foi realizada a separação dos tipos de ingredientes por intensidades de cada cor. Os ingredientes corados então foram pesados e as análises para identificação dos corantes realizadas.

Análise de corantes artificiais nos ingredientes corados: o perfil de corantes presentes nos ingredientes foi traçado conforme metodologias descritas pelo Instituto Adolfo Lutz (BRASIL, 2005) baseadas em (a) cromatografia em papel (método de Arata) e (b) espectrometria UV-visível com varredura. A extração dos corantes foi realizada com soluções de hidróxido de amônio e acetato de amônio, respectivamente. Os extratos foram concentrados, e identificados por (a) cromatografia em papel ou (b) espectrofotometria com varredura entre 300 a 700 nm. Tanto os Rfs encontrados quanto os espectros obtidos foram comparados com comprimentos de onda (λ) de padrões puros, bem como com a literatura específica (BRASIL, 2005; LINDINO et al., 2008) e legislação vigente para corantes permitidos (BRASIL, 1965, 1996; 2003; 2004). A Tabela 1 apresenta os $\lambda_{\text{máx}}$ reportados na literatura para os corantes relacionados com os extratos dos ingredientes (variação de ± 2 a 3 nm). Os corantes naturais foram identificados através da metodologia citada acima em (a), onde estes se diferenciavam dos corantes ácidos por seu comportamento e estabilidade frente às mudanças de pH, ocorridas no processo de extração e concentração dos corantes no método de Arata (método da lã) (BRASIL, 2005).

Determinação do conteúdo de umidade: o conteúdo de umidade das amostras foi determinado utilizando o método gravimétrico descrito na AOAC (2005). 2 g de cada amostra foram dessecados em estufa a temperatura de 135 °C até peso constante (variação menor que 0,05 g). Os ensaios foram realizados em triplicata (n = 3). O resultado final determinado pela

média dos resultados \pm o desvio padrão relativo (DPR) e correlacionados com a legislação específica e com os níveis de garantia relatados nos rótulos.

Tabela 1. Absorbâncias máximas de padrões de corantes artificiais da literatura utilizados no presente estudo

Corantes artificiais	Números (códigos)			Classe	$\lambda_{\text{máx.}}$ (nm)			
	E	CAS	Color Index		Prado e Godoy (2003)	Brasil (2005) ^a	Brasil (2005) ^b	Lindino et al. (2008)
Amarelo								
Tartrazina	102	1934-21-0	19140	Monoazo	426	430	426	420, 425, 427
Crepúsculo	110	2783-94-0	15985	Monoazo	480	480	481	482
Azul								
Indigotina	132	860-22-0	73015	Indigóide	610	615	610	NE
Brilhante	133	3844-45-9	42090	Trifenilmetano	629	NE	630	629
Patente V	131	3536-49-0	42051	Trifenilmetano	635	NE	640	NE
Vermelho								
Eritrosina	127	16423-68-0	45430	Xanteno	526	525	524	525
Ponceau 4R	124	2611-82-7	16255	Monoazo	505	NE	507	507
Amaranto	123	915-67-3	16185	Monoazo	523	520	519	NE
Bordeaux S					523	520	519	NE
40	129	25956-17-6	16035	Monoazo	502	NE	505	NE
Azorrubina	122	3567-69-9	14720	Monoazo	515	NE	515	505
Verde								
Rápido FCF	143	2353-45-9	42053	Trifenilmetano	625	NE	625	NE

E (prefixo utilizado para aditivos permitidos na Europa) – código para identificação dos aditivos alimentares NE – não estabelecido a método da lâ de Arata b método espectrofotométrico CAS número de registro único no banco de dados do *Chemical Abstracts Service*

Avaliação da rotulagem dos produtos comerciais embalados: Os rótulos foram avaliados conforme a Instrução Normativa n. 30 de 5/08/2009 para animais de companhia (BRASIL, 2009c) quanto à presença de informações obrigatórias: *classificação do produto, nome do produto, marca comercial, quando houver, conteúdo ou peso líquido, composição básica qualitativa, exceto veículos e excipientes, níveis de garantia, indicação de uso que justifique os parâmetros formulados, espécies e categorias de animal (is) a que se destina, modo de usar, cuidados e restrições.*

Quando houver, a expressão no que couber “PRODUTO ISENTO DE REGISTRO NO MAPA” ou “PRODUTO REGISTRADO NO MAPA N...” Razão social, endereço completo, número de inscrição no CNPJ e telefone de atendimento ao consumidor do estabelecimento fabricante, fracionador ou importador, a expressão “Indústria Brasileira”, quando fabricado no Brasil ou a identificação do país de origem, no caso de produto importado e a expressão “Produto importado”, data de validade (indicar claramente o dia, mês e ano, prazo de consumo quando houver, condições de conservação e carimbo oficial da inspeção e fiscalização federal e a expressão “uso proibido na Alimentação de Ruminantes” quando houver ingredientes de origem animal na composição do produto.

Além disso, foram avaliados se os rótulos continham as seguintes informações como previsto na legislação: (a) níveis de garantia: Umidade (máxima), Proteína Bruta (mínimo), Extrato Etéreo (mínimo), Matéria Fibrosa (máxima), Matéria Mineral (máxima), Cálcio

(máximo) e Fósforo (mínimo); **(b)** aditivos e macrominerais constantes na formulação dos produtos deverão ter suas substâncias ativas ou elementos ativos declarados nos níveis de garantia **(c)** aditivos sensoriais e tecnológicos ficam dispensado de ter seus elementos declarados nos níveis de garantia e deverão ser declarados na composição básica.

Os valores de umidade observados (VO) foram comparados com os valores declarados (VD) no rótulo pelo fabricante. De acordo com a legislação em vigor, criou-se o seguinte critério de classificação quanto à adequação de rótulo: em conformidade (C) - produtos que apresentaram resultados da análise laboratorial de acordo com os valores declarados no rótulo; em não conformidade (NC) - produtos que apresentaram resultados da análise não de acordo com os valores declarados (CARCIOFI et al., 2006).

Análise de micotoxinas: As análises de AFLs (AFB₁, AFB₂, AFG₁ e AFG₂), FBs (FB₁ e FB₂), ZON e OTA foram realizadas a partir de 50 g de amostra previamente triturada. Para extração foi utilizado como solvente uma mistura de metanol:água (80:20), para a limpeza do extrato foram utilizadas colunas de imunoafinidade (AOZ, Vicam) e cartuchos amino quaternário (N⁺ - Applied Separations). A detecção e quantificação das toxinas foi realizada por LC – MS/MS. O gradiente de fase móvel metanol: água está apresentado na Tabela 2. A curva de calibração foi realizada com cinco pontos, em triplicata (XAVIER; SCUSSEL, 2008). *Análise estatística:* os dados foram tabulados e analisados por meio de análise estatística descritiva, utilizando como instrumento programa ANOVA e teste de Tukey. Foi considerada diferença significativa com valor $p < 0,05$.

Tabela 2. Gradiente de fase móvel (methanol:água) com acetato de amônio 5 mM para análise de micotoxinas em amostras de alimentos para aves de companhia

Etapa	Tempo (min)	Fluxo (ml/min.)	Metanol (%)	Água (%)
0	3,00	1	45	55
1	5,00	1	15	85
2	5,01	1	0	100
3	12,90	1	0	100

Identificação de insetos: os insetos que foram encontrados nas amostras de alimentos para aves de companhia (grãos e/ou rações) em estudo foram identificados macroscopicamente com auxílio das informações contidas em Athié e Paula (2002), FDA (1998), FAO (2003) e CANADA (2009). A Figura 2 apresenta o fluxograma das análises realizadas no presente estudo.

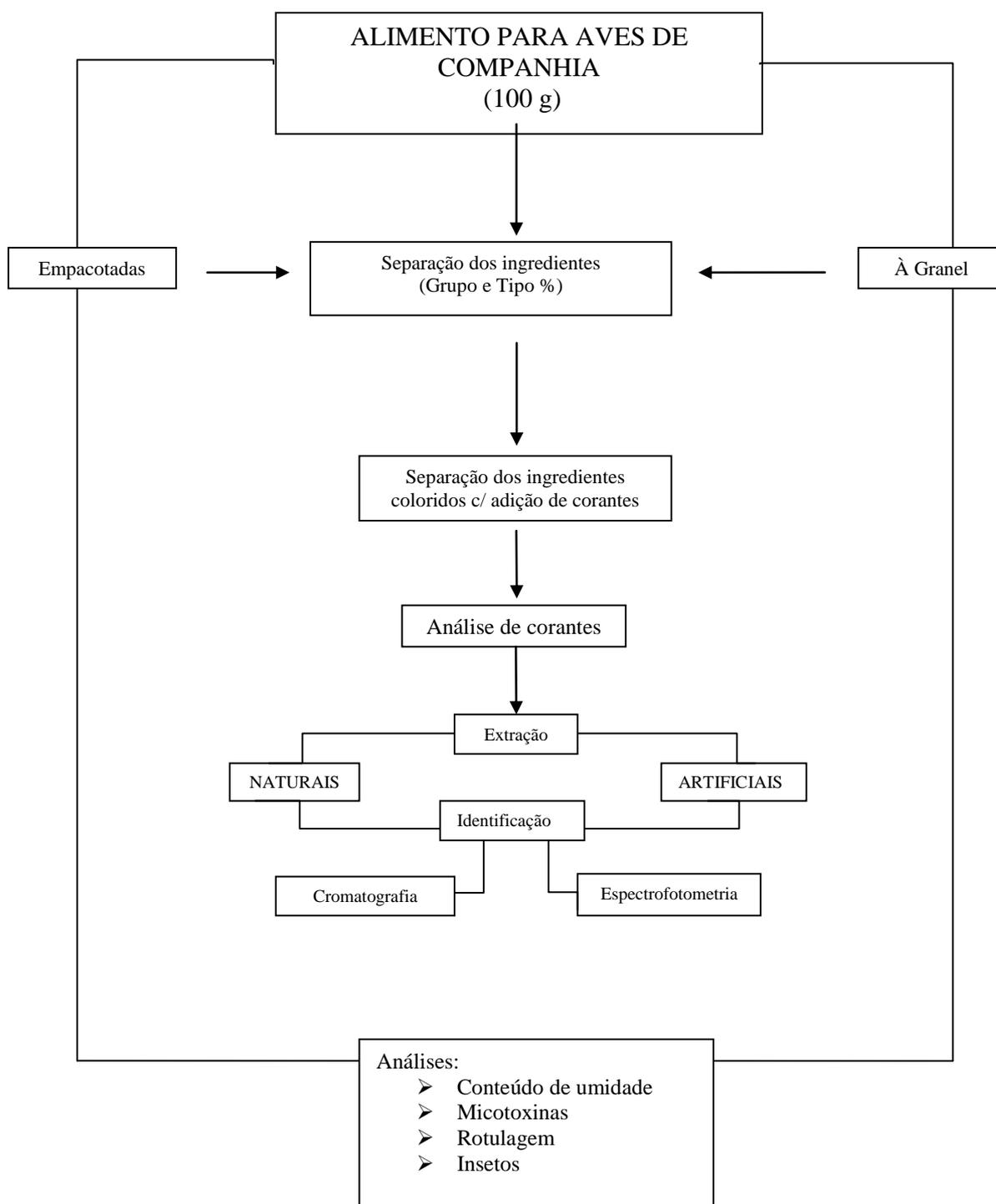


Figura 2. Fluxograma do estudo do perfil de ingredientes e corantes em alimentos para aves de companhia e sua relação com micotoxinas

3.4 Resultados e Discussão

Do total de alimentos completos e misturas de grãos para aves de companhia comercializados nas Regiões Sul e Sudeste e *coletados* para o presente estudo, 52,8; 5,5 e 2,7 % eram da Região Sul (SC; RS e PR) e 30,6 e 8,4 % da Região Sudeste (SP e MG), respectivamente. Das marcas avaliadas, 52,6 % eram *fabricadas* nos estados de SC, RS e PR (Região Sul) e 47,4 % provenientes de SP e MG (Região Sudeste), respectivamente.

Avaliação do perfil de ingredientes presentes nos alimentos para aves de companhia.

(a) Tipos de ingredientes versus proporção

Como esperado, a composição dos alimentos para aves de companhia variou de acordo com os Tipos e Grupos de ingredientes. De acordo com os Tipos, os ingredientes foram agrupados em: **(a)** rações (extrusada ou peletizada), **(b)** grãos (milho, arroz, soja, trigo, aveia, sorgo), **(c)** frutas secas (cristalizada e/ou desidratadas: papaia, figo, abacaxi, maçã, uva), **(d)** sementes (girassol, abóbora e tomate), **(e)** nozes (amendoim com e sem casca, castanha-do-Brasil, castanha de caju), e **(f)** outros ingredientes (biscoito, farelo de milho, farelo de soja, flocos de milho). Os alimentos avaliados eram predominantemente compostos por misturas desses ingredientes, como ração extrusada ou peletizada, misturas de grãos e cereais, com ou sem adição de frutas desidratadas e/ou cristalizadas, correspondendo a 77,8 %. O restante dos produtos eram compostos de apenas um Tipo de grão, correspondendo a 22,2 %. Desta forma, os produtos foram classificados quanto sua composição como: mistura de ração extrusada ou peletizada e grãos com ou sem adição de frutas; somente ração extrusada ou peletizada com ou sem adição de frutas; um único tipo de grão e mistura de grãos com ou sem adição de frutas; correspondendo a 41,7; 22,2; 22,2 e 13,9 % do total de amostras avaliadas, respectivamente.

Dos 26 produtos comerciais (fechadas) 63,9 % continham ração extrusada ou peletizada, sendo que 38,4; 23,1; 23,1 e 15,4 % eram amostras de mistura de grãos e ração; somente ração extrusada ou peletizada; apenas mistura de grãos; e apenas um tipo de grão, respectivamente. As proporções em que ração estava presente variavam entre 100 e 4,3 %. Isto demonstra que atualmente a indústria de alimentos para animais de companhia está preocupada em atender as necessidades nutricionais dos animais, uma vez que a dieta composta por apenas um tipo de grão não permite esse fato. Além disso, a utilização de grãos

em alimentos para animais é uma alternativa para o uso de matérias-primas que não passaram pelo controle de qualidade para consumo humano.

Já nas amostras comercializadas à granel 60 % continham ração em sua composição, em proporções que variaram entre 100 e 12,7 %. Quanto à composição dos produtos 40; 40; e 20 % eram mistura de grãos e ração; somente ração extrusada ou peletizada; e apenas um tipo de grão, respectivamente.

Outros ingredientes que predominavam na composição dos alimentos para aves de companhia eram amendoim, milho, semente de girassol, arroz, sorgo e frutas desidratadas e ou cristalizadas.

A Figura 3 ilustra os Grupos e Tipos de ingredientes e as Tabelas 3 e 4 apresentam as porcentagens dos ingredientes presentes nos alimentos para aves de companhia por amostras (comercializadas fechadas e à granel), respectivamente.

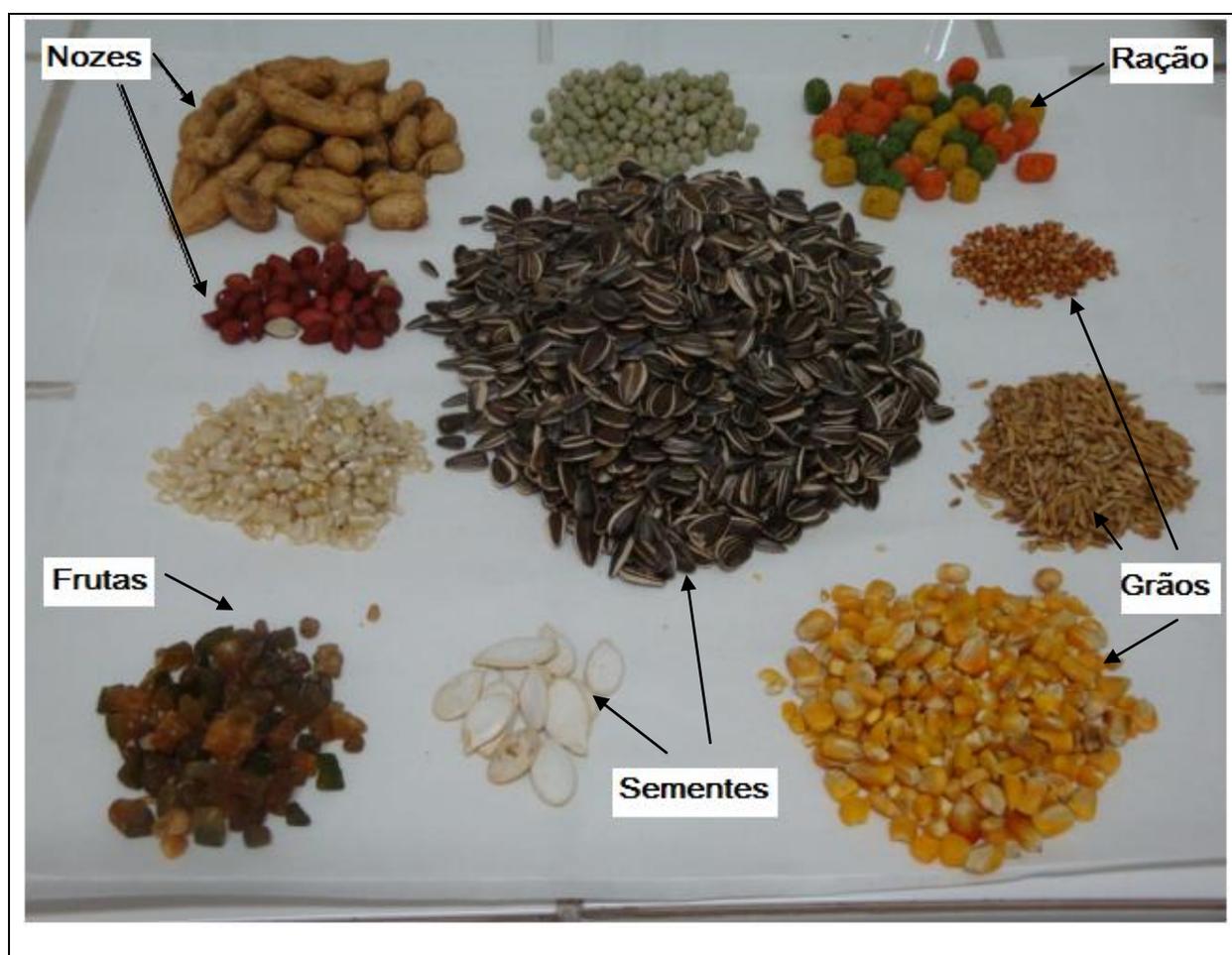


Figura 3. Exemplos dos Grupos (Ração, Grãos, Frutas, Semente e Nozes) e Tipos de ingredientes (grãos de milho, frutas cristalizadas, sementes de girassol, ração extrusada, amendoim com e sem casca) presentes nos alimentos destinados á aves de companhia

Os ingredientes que se apresentaram em maior quantidade e mais freqüentemente

encontrados nos alimentos para aves de companhia foram em ordem decrescente: ração (extrusada ou peletizada), frutas secas cristalizadas e/ou desidratadas, sementes de girassol, amendoim e milho. Dependendo da espécie do pássaro, a composição dos ingredientes variou. Em muitos casos os ingredientes não obedeceram à ordem decrescente reportada na composição básica presente no rótulo. Cabe salientar que a legislação brasileira menciona apenas a obrigatoriedade de listar qualitativamente os ingredientes da composição básica, diferente das legislações americana e européia que especificam a apresentação dos ingredientes por ordem decrescente. Essa apresentação dos ingredientes é um fator importante para garantir a qualidade do produto, principalmente no que diz respeito à qualidade nutricional.

Foi observado que nas amostras comercializadas à granel, as proporções de ingredientes não correspondiam quando comparadas as comercializadas em embalagem fechada. Isso pode ser explicado pelo fato que na venda de produtos à granel a distribuição dos ingredientes não se dá de forma homogênea. Cabe ressaltar, que este tipo de atividade pode provocar equívocos quanto a quantidade de nutrientes ou qualidade nutricional do produto, o que pode colocar a saúde dos animais a que se destinam em risco.

Quanto ao perfil de ingredientes foi observado neste estudo, que já existe uma preocupação maior em complementar a alimentação de aves de companhia de estimação, a qual antigamente era baseada somente em grãos e frutos. Foi verificado que o mercado de produtos para animais de companhia continua em expansão e dessa forma os investimentos em novos produtos e tecnologias tem aumentado. As grandes empresas têm apresentado como diferencial competitivo o uso de novos ingredientes e aditivos, embalagens tecnologicamente mais desenvolvidas (mais resistentes, atmosfera controlada) e processos de fabricação mais complexos (extrusão, peletização versus mistura) com objetivo de garantir a qualidade e segurança de seus produtos. Porém no caso dos produtos para aves de companhia ainda há o predomínio da comercialização de produtos compostos por misturas de grãos e frutos.

Foi observado que existe uma grande variação quanto a composição básica dos alimentos destinados à aves de companhia e este fato está ligado a variação de cada espécie a que se destina o alimento. Embora a complexa formulação das rações seja um fator positivo para o aumento da qualidade nutricional para os animais, a má qualidade dos ingredientes pode ser um risco para a saúde desses, logo se entende que o desequilíbrio entre as formulações, a contaminação dos ingredientes e a adição indiscriminada de aditivos são fatores de risco para a segurança alimentar desses produtos.

Tabela 3. Determinação das porcentagens dos diferentes Grupos e Tipos de ingredientes utilizados nos alimentos para aves de companhia - amostras fechadas

Ingredientes		Porcentagem (%)																										
Grupo	Tipo	→ n° amostra	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	18	20	22	24	26	28	30	32	34	36
RAÇÃO																												
	Extrusada ou pelletizada ^a	NP	8,8	100	7,6	8,9	100	45,9	21,9	18,7	NP	NP	6,4	30,3	51,7	27,2	20,3	4,3	44,3	27,5	100	NP	100	NP	NP	NP	NP	81,1
GRÃOS																												
	Alpiste	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	7,2	4,7	NP	20,0	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP								
	Arroz ^c	NP	5,9	NP	12,4	8,5	NP	NP	6,2	8,2	0,5	1,0	3,0	8,4	NP	1,4	NP	5,5	8,4	2,8	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP
	Aveia	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	8,3	18,2	3,0	1,1	9,0	0,7	NP	4,1	13,2	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP
	Canjica	NP	7,2	NP	4,8	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	6,7	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP
	Cártamo	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	6,2	8,2	2,5	NP	NP	NP	0,8	1,4	NP	NP	NP	3,4	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP
	Cevada	NP	NP	NP	5,4	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	6,1	1,1	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP
	Colza	NP	NP	NP	NP	0,4	NP	NP	1,0	2,3	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP									
	Ervilha	NP	NP	NP	2,7	3,8	NP	NP	2,1	1,2	2,5	1,6	NP	0,6	6,2	4,5	NP	7,3	NP	11,7	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP
	Milho ^b	NP	20,7	NP	18,8	21,8	NP	0,9	3,1	3,5	23,7	17,9	8,6	12,3	6,6	8,9	6,1	12,2	NP	2,1	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP
	(a) branco	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	100	NP	NP	NP	25	NP
	(b) vermelho	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	4,7	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	100	NP	25	NP
	(c) verde	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	100	25	NP
	(d) preto	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	4,8	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	25	NP
	Soja	NP	NP	NP	NP	1,7	NP	NP	NP	NP	NP	NP	3,1	NP	2,3	NP	0,7	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP
	Sorgo	NP	NP	NP	NP	2,9	NP	NP	7,2	17,5	3,5	2,2	9,6	30,3	NP	9,5	10,2	1,7	7,4	7,4	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP
	Triticale c/ casca ^b	NP	5,6	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	3,6	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP
	s/ casca ^b	NP	NP	NP	NP	2,1	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	3,4	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP
	Triguilho/trigo	NP	5,5	NP	5,4	NP	NP	NP	9,3	10,5	3,5	3,3	6,7	NP	NP	NP	2,7	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP
	Trigo sarraceno	NP	NP	NP	11,3	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	4,4	NP	NP	NP	0,9	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP
FRUTAS																												
	^c Cristalizadas	36,4	NP	NP	NP	2,1	NP	20,1	7,7	1,8	NP	NP	2,8	1,3	3,1	NP	3,4	6,0	7,9	8,8	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	16,5
	Desidratadas ^c	40,7	NP	NP	NP	NP	NP	20,2	7,8	1,7	NP	5,7	NP	NP	NP	3,4	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	2,4
SEMENTES																												
	Girassol ^a	NP	34,3	NP	25,8	37,9	NP	NP	5,2	7,0	46,5	47,3	31,2	0,6	19,3	12,3	25,7	41,1	3,3	11,9	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP
	Tomate	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP
	Abóbora	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	1,1	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP
NOZES																												
	Amendoim c/ casca ^a	NP	NP	NP	5,9	1,7	NP	NP	3,1	NP	3,0	10,9	9,5	0,6	5,4	6,8	3,4	11,2	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP
	s/ casca ^a	NP	10,8	NP	NP	3,4	NP	NP	NP	1,8	7,1	5,4	3,7	NP	NP	NP	7,4	3,2	2,5	2,4	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP
	Castanha-do-Brasil c/ casca ^a	22,9	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	0,6	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP
	de caju																											
OUTROS																												
	Biscoito	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	4,1	2,3	3,0	2,7	0,7	0,7	3,9	0,7	1,4	NP	NP	6,18	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP
	Adsorvente de micotoxinas	NP	NP	NP	NP	5,1	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP
	Matérias estranhas e/ou outros	NP	1,20	NP	NP	NP	NP	12,8	NP	NP	NP	1,0	0,5	1,1	14,2	0,8	3,4	3,7	2,2	6,5	4,8	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP

^a Passível de contaminação por AFLs

^b Passível de contaminação por FBs, ZON

^c Passível de contaminação por OTA, PTL

NP ingredientes não presente na amostra avaliada

Tabela 4. Determinação das porcentagens dos diferentes Grupos e Tipos de ingredientes utilizados nos alimentos para aves de companhia - amostras à granel

Ingredientes		Porcentagem (%)										
Grupo	Tipo	→ n. amostra	17	19	21	23	25	27	29	31	33	35
RAÇÃO												
	Extrusada ou pelletizada ^a		12,7	60,6	42,9	37,5	NP	NP	NP	NP	100	87,4
GRÃOS												
	Alpiste		NP	7,5	NP	NP	100	NP	NP	NP	NP	NP
	Arroz ^e		1,0	10,4	8,5	10,1	NP	NP	NP	NP	NP	NP
	Aveia		NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP
	Canjica		NP	NP	2,8	2,7	NP	NP	NP	NP	NP	NP
	Cártamo		NP	NP	NP	2,4	NP	NP	NP	NP	NP	NP
	Cevada		NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP
	Colza		NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP
	Ervilha		NP	NP	4,4	5,6	NP	NP	NP	NP	NP	NP
	Milho ^b		8,9	NP	7,8	10,2	NP	NP	NP	NP	NP	NP
	(a) branco		NP	NP	NP	NP	NP	100	NP	NP	NP	NP
	(b) vermelho		NP	NP	NP	NP	NP	NP	100	NP	NP	NP
	(c) verde		NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	100	NP	NP
	(d) preto		NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP
	Soja		NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP
	Sorgo		0,6	2,1	6,1	7,8	NP	NP	NP	NP	NP	NP
	Triticale c/ casca ^b		NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP
	s/ casca ^b		NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP
	Triguilho/trigo		0,7	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP
	Trigo sarraceno		NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP
FRUTAS												
	Cristalizadas ^c		3,6	4,4	6,9	5,1	NP	NP	NP	NP	NP	7,4
	Desidratadas ^c		6,8	NP	0,9	0,9	NP	NP	NP	NP	NP	1,4
NOZES												
	Amendoim c/ casca ^a		10,7	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP
	s/ casca ^a		14,3	1,7	7,2	6,7	NP	NP	NP	NP	NP	NP
	Castanha-do-Brasil c/casca ^a		NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP
	de caju											
SEMENTES												
	Girassol ^a		33,1	4,2	8,7	7,2	NP	NP	NP	NP	NP	NP
	Tomate		NP	NP	1,4	0,4	NP	NP	NP	NP	NP	NP
	Abóbora		0,1	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP
OUTROS												
	Biscoito		6,8	NP	1,1	2,2	NP	NP	NP	NP	NP	3,8
	Adsorvente para micotoxinas		NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP
	Matérias estranhas e/ou outros		0,7	9,1	1,3	1,5	NP	NP	NP	NP	NP	NP

^a Passível de contaminação por AFLs; ^b Passível de contaminação por FBs, ZON; ^c Passível de contaminação por OTA, PTL;
NP ingredientes não presente na amostra avaliada

(b) Ingredientes contendo corantes

Do total de amostras avaliadas, 63,9 % possuía algum ingrediente adicionado de corantes naturais e/ou artificiais. Desse total, 78,3 % eram comercializadas fechadas e 21,7 % à granel. O Quadro 2 apresenta detalhes dos principais Tipos de ingredientes corados por Grupo, e os respectivos códigos das amostras, além de apresentar sua separação de acordo com cores e formatos.

Do total de amostras comercializadas fechadas e à granel 69,2 e 50 % continham ingredientes corados, respectivamente. O principal ingrediente corado foi do grupo de ração (extrusada ou peletizada) seguido por biscoito, pipoca e adsorvente de micotoxinas.

O ingrediente colorido de maior frequência foi ração (extrusada ou peletizada), que esteve presente em 83,3 % (20) das amostras coradas e apresentava diferentes formas (tuboa, tubob e redonda) e cores (vermelho, laranja, amarelo e verde) provavelmente para mimetizar diferentes alimentos. O ingrediente biscoito estava presente em 58,3 % (14) das amostras coradas, sendo este ingrediente apresentava cinco cores, porém em diferentes tonalidades.

As formas de apresentação das rações foram determinadas de acordo com seu formato e medidas. Os ingredientes pipoca e adsorvente para micotoxinas foram encontrados em apenas uma amostra. Foi observado também que nas amostras comercializadas à granel o aparecimento de ingredientes corados não correspondia se comparado com sua amostra comercializada em embalagem fechada (menor ou maior o número de ingredientes e tonalidades), isso pode ser explicado pelo fato que na venda de produtos à granel a distribuição dos ingredientes não se dá de forma homogênea.

As cores, amarelo, azul, laranja, verde e vermelho estiveram presentes em 73,9; 8,7; 69,6; 78,3 e 87 % do total de amostras coletadas, respectivamente. 54,7 % dos produtos comercializados em embalagens fechadas apresentavam ingredientes com colorações amarela, laranja e verde enquanto nas amostras à granel essas cores apareceram com a frequência de 80; 60 e 100 %, respectivamente. Já, a cor azul estava presente em apenas 2 amostras fechadas.

Quadro 2. Ingredientes corados presentes nos alimentos para aves de companhia e seus respectivos códigos – identificação visual

Ingredientes corados				Tonalidades (código das amostras)
Grupo	Tipo	Formato	Cores	
RAÇÃO				
Extrusada ou peletizada				
	Tube ^a		Verde	5 (3) 30 (2)
			Amarelo	6 (3)
			Amarelo/caramelo	24 (12,16)
			Amarelo/caramelo	25 (5)
			Vermelho	7 (3) 31 (2) 39(19, 20)
			Vermelho/ bordô	32 (17, 22)
	Redonda		Verde	9 (14) 27 (7, 9) 41 (19, 20)
			Amarelo	42 (19, 20, 28) 45 (22) 52 (36)
			Laranja	10 (14) 28 (9) 46 (21, 28) 56 (36)
			Vermelho	11 (14) 26 (7) 29 (9) 40 (19, 20) 48 (22) 49 (24) 50 (36)
	Tube ^b		Verde	20 (12) 38 (17, 18) 55(35)
			Amarelo	21 (12) 33 (17, 18) 57 (21, 28)
			Laranja	22 (12) 36 (17, 18, 22)
			Vermelho	23 (12, 16)
			Amarelo	2 (8, 9, 12, 15, 16) 13 (10, 11) 34 (17,18, 22) 53 (35)
			Laranja	3 (8, 9, 12, 15, 16) 14 (10, 11) 37 (17, 20) 54 (35)
			Vermelho	4 (8, 9, 12, 15, 16) 15 (10, 11) 44 (17, 21) 51 (35)
			Azul	16 (10, 11)
			Vermelho/ rosa	43(21, 35)
OUTROS				
Adsorvente de micotoxinas				
	Circular		Laranja	8 (5)
Biscoito				
	Lascas		Verde	1 (8, 9, 12, 15, 16) 12 (10, 11) 47 (17, 21, 23)
			Amarelo	2 (8, 9, 12, 15, 16) 13 (10, 11) 34 (17,18, 22) 53 (35)
			Laranja	3 (8, 9, 12, 15, 16) 14 (10, 11) 37 (17, 20) 54 (35)
			Vermelho	4 (8, 9, 12, 15, 16) 15 (10, 11) 44 (17, 21) 51 (35)
			Azul	16 (10, 11)
			Vermelho/ rosa	43(21, 35)
Pipoca				
	Característico		Verde	17 (16)
			Amarelo	18 (16)
			Vermelho	19 (16)

a – peletizada menor de 1 cm Ø até 2 mm

b – extrusada menor que 3 cm Ø até 5 mm

Do total de amostras com ingredientes corados (24) a cor predominante foi a vermelha. Esta cor apareceu com frequência de 83,3 e 100 % nas amostras comercializadas fechadas e à granel, respectivamente, seguida do verde, amarelo e laranja com frequências de 72,2 e 100; 72,2 e 80 e 72,2 e 60 %, respectivamente. Também foram observadas nuances nas cores como vermelho, rosa, bordô, entre outras. O Quadro 3 apresenta os detalhes das amostras de alimentos para aves de companhia, como a determinação da ocorrência das cores e suas diferentes tonalidades.

Quadro 3. Diversidade e número de cores dos ingredientes colorados presentes nos alimentos para aves de companhia - identificação visual

Amostras c/ ingredientes corados		No. de cores por ingrediente				
Embalagem	No. da amostra	Amarelo	Azul	Laranja	Verde	Vermelho
Empacotadas						
	2	AC	AC	AC	✓	✓
	3	✓	AC	AC	✓	✓
	5	AC	AC	✓	AC	AC
	7	AC	AC	AC	✓	✓
	8	✓	AC	✓	✓	✓
	9	✓	AC	✓✓	✓✓	✓✓
	10	✓	✓	✓	✓	✓
	11	✓	✓	✓	✓	✓
	12	✓✓	AC	✓✓	✓✓	✓✓
	14	AC	AC	✓	✓	✓
	15	✓	AC	✓	✓	✓
	16	✓✓	AC	✓	✓✓	✓✓✓
	18	✓✓	AC	✓	✓	AC
	20	✓	AC	✓	✓	✓✓
	22	✓	AC	✓	AC	✓✓
	24	AC	AC	AC	AC	✓
	28	✓✓	AC	AC	AC	AC
	36	✓	AC	✓	AC	✓
À granel						
	17	✓✓✓	AC	✓✓	✓✓	✓
	19	✓	AC	AC	✓	✓✓
	21	✓	AC	✓	✓	✓✓
	23	AC	AC	AC	✓	✓
	35	✓	AC	✓	✓	✓✓

✓ - número de diferentes tonalidades/intensidades da mesma cor (✓)1 tom (✓✓) 2 tons (✓✓✓) 3 tons AC – ausência de cor
a - os códigos das amostras que não constam nesta listagem é devido a ausência de ingredientes colorados

Determinação do perfil de corantes artificiais em alimentos para aves de companhia.

Corantes artificiais: Dos ingredientes colorados que continham algum tipo de corante (naturais e/ou artificiais) foi possível extrair 58 subamostras (extratos). Este número foi obtido, pois em muitos casos, uma mesma amostra apresentava até cinco cores diferentes e ainda em diferentes subtipos de ingredientes. Na Tabela 5 são indicados os valores de $\lambda_{\text{máx}}$ (nm) para a leitura dos padrões utilizados, bem como detalhes relativos à toxicidade dos corantes artificiais.

Os corantes podem gerar diversos efeitos tóxicos (Tabela 5) perante a saúde dos animais, entretanto existe dificuldade em correlacionar estes efeitos com os sintomas apresentados, uma vez que esses são inespecíficos. De acordo com Polônio e Peres (2009), para avaliar os riscos e efeitos tóxicos que os aditivos alimentares representam para a saúde humana e animal, todas as possíveis variantes (exposição, espécie, presença de outros contaminantes, fatores genéticos, entre outros) devem ser observadas. E este fato é que dificulta a eficaz identificação dos fatores ou agentes causadores de uma intoxicação ou

doença.

Tabela 5. Corantes artificiais permitidos no Brasil e respectivos IDA, LMR e toxicidade

Padrões dos corantes artificiais	$\lambda_{\text{máx.}}^a$ (nm)	IDA ^b (mg/kg de p.c.)	LMR ^c (mg/kg)	Toxicidade
Tartrazina	427,5 e 421	0-7,5	150	Alergias, Tumores na tireóide, Linfomas fínocíticos, Danos cromossômicos, Ataques de asma, Urticária e Hyperatividade
Amarelo Crepúsculo ^h	480,5 e 481,5	0-2,5	150	Urticária, Renite, Congestão nasal, Broncoconstricção (combinado à E-123 e E-124), Reação anafilática, Resposta eosinofílica, Purpura, Alergias, Tumores nos rins, Danos cromossômicos, Dor abdominal, Vômito, Indigestão, Aversão ao alimento
Indigotina	608,5	0-5	100	Tumores no cérebro, Broncoconstricção (combinado com E-133 ou E-127).
Azul Brilhante ^f	628,5	0-12,5	100	Broncoconstricção (combinado com E-132 ou E-127), Resposta eosinofílica, Danos cromossômicos
Azul Patente V ^d	635	0-15	150	Purpura, Dermatites, Sintomas não específicos e subjetivos...
Eritrosina	525,5	0-0,1	100	Broncoconstricção (combinado com E-133 ou E-132), Resposta vascular seqüencial, Elevação das ligações entre proteína-iodeto, Tumores na tireóide, Dano nos cromossomos
Ponceau 4R ^{df}	506,0	0-4	-	Broncoconstricção (combinado com E-123 ou E-110), Reação anafilática (combinado com E-110)
Amaranto ou Bordeaux S ^{dfg}	521,5 520,5	0-0,5	100	Angioedema, Prurido, Urticária, Broncoconstricção (combinado com E-124 e E-110)
Vermelho 40	512	0-7	-	Tumores e linfomas
Azorrubina ^d	502	0-4	-	Informações não avaliadas ainda nos EUA
Verde-rápido FCF ^e	625	0-10	-	Tumores na bexiga

a = comprimento máximo de onda; b = ingestão diária aceitável; c = limite máximo de resíduo permitido; d = proibido nos EUA; e = proibido na EU; f = restrito e provisório na Inglaterra; g = proibido no Japão; h = restrito e provisório na Canadá. NE = não estabelecido

Fonte: Adaptado de PCHRG (1985), EC (2003; 2010), Prado e Godoy (2003) e Lindino et al. (2008).

Foram encontrados corantes naturais e artificiais nos alimentos para aves de companhia tanto nas amostras comercializadas em embalagens fechadas quanto nas à granel. Os corantes artificiais encontrados nas rações extrusadas ou peletizadas e biscoitos foram: tartrazina, amarelo crepúsculo, vermelho 40 e azorrubina, ponceau 4R, amaranto, azul brilhante e indigotina, cujos códigos são: E 102; E 110; E 129; E 122; E 124; E 123; E 133; E 132, respectivamente. A Tabela 6 mostra os resultados encontrados para as análises de corantes artificiais em alimentos para aves de companhia.

Nos alimentos destinados à aves de companhia, os ingredientes corados de laranja, amarelo, verde e vermelho houve predomínio do uso dos corantes alimentares artificiais: amarelo crepúsculo, tartrazina, misturas de azul brilhante e tartrazina e vermelho 40, sendo a frequência de utilização de 100; 100; 54,5 e 44,4 %, respectivamente. As leituras médias para os corantes tartrazina, amarelo crepúsculo, azul brilhante e tartrazina (verdes) e vermelho 40 foram: $426 \pm 1,72$ (mín. 423 e máx. 429); $489,3 \pm 0,58$ (mín. 479,5 e máx. 481,5); $422 \pm 3,03$ (mín. 418,5 e máx. 427,5); $627,9 \pm 0,69$ (mín. 626,5 e máx. 628,5) e $501,9 \pm 3,7$ (mín. 495,5 e máx. 505,5) nm, respectivamente.

Tabela 6. Identificação espectrofotométrica dos corantes artificiais e naturais extraídos de ingredientes presentes em alimentos para aves de companhia

Ingredientes coloridos		Análise espectrofotométrica		
Cor	Extratos (código)	Corante identificado	$\lambda_{\text{máx.}}$ (nm)	
Artificiais identificados				
Amarelo	2	Tartrazina	427,0	
	6		427,5	
	13		429	
	18		427	
	25		428,5	
	33		424,5	
	34		426	
	35		425	
	45		425,5	
	42		425	
	52		423	
	53		425,5	
	58		424,5	
Azul	16	Azul brilhante	628	
Laranja	3	Amarelo crepúsculo	480,5	
	8		479,5	
	10		479,5	
	14		480,5	
	22		480	
	28		480,5	
	36		480	
	37		480,5	
	46		481	
	54		480	
57	480			
Verde	1	Tartrazina e Azul brilhante	426,5 e 627,5	
	9		420,0 e 627,5	
	12		422 e 626,5	
	38		423,5 e 628,5	
	47		418,5 e 628,5	
	56		422 e 628,5	
	20		Tartrazina e NI	421,0 e 602,5
	17		Tartrazina e Indigotina	427,5 e 615,5
	27		Tartrazina e NI	426,5
	41		Tartrazina e NI	421,5
	30		NI e Azul brilhante	407,5 e 628
Vermelho	32	Amaranto ou Bordeaux S	518,5	
	43		512,5	
	31		515,5	
	4	Ponceau 4R	507,5	
	15		506,0	
	51		506,5	
	23	Vermelho 40	501,0	
	11		495,5	
	39		503,5	
	40		505	
	44		505,5	
	48	505,5		
	49	500,5		
	50	498,5		
	29	Amarelo crepúsculo	481,5	
	7		NI	552,5
	19		NI	552,0
Naturais identificados				
	5	Clorofila	381	
	21	Amarelo – Carotenóide	380	
	26	Vermelho/rosa	(quantidade insuficiente)	
	24	Natural/caramelo	Não absorveu	

NI – não identificado

Algumas inconsistências foram observadas na identificação dos corantes presentes em algumas amostras (7), sendo que em uma delas a quantidade de ingrediente corado era insuficiente para a realização da análise. Já nas seis restantes o comportamento frente à extração com as soluções de hidróxido de amônio e acetato de amônio não foram os esperados para corantes azóicos neutros ou os espectros não coincidiram com os dos padrões. Este fato leva a crer que nesses ingredientes possa haver mistura de corantes, corantes não permitidos (básicos) ou algum interferente que prejudicou a análise. Cabe ressaltar que Ohlweiler (1991) Ni e Gong (1997) e Takahashi, Yabiku e Marsiglia (1988) verificaram que a espectrometria como método para análise de corantes artificiais é limitada. Esta metodologia dispensa a necessidade de separação dessas substâncias, porém exige que os corantes não apresentem uma alta sobreposição de seus espectros, e assim possam ser identificados e quantificados de maneira satisfatória. A maior desvantagem da utilização desse método é quando se tem grupos de corantes que apresentam máximos de absorbância muito próximos, espectros com grande área de sobreposição ou misturas de corantes.

Apenas 4 amostras embaladas continham em seus rótulos a informação da presença de corante na formulação, porém não havia especificação do tipo de corante, código internacional ou número E, desses conforme exige legislação (BRASIL, 2009a,b,c). Na União Européia já existe legislação que define padrões para adição de corantes naturais e artificiais em alimentos para animais de companhia (EC, 2003; 2010). Porém no Brasil, isso ainda não ocorre, portanto as especificações utilizadas para estes produtos são adaptações dos valores determinados para alimentos para humanos. De acordo com Prado, Abujamra e Godoy (2003), o uso indiscriminado destes corantes pode acarretar problemas à saúde nestes animais, uma vez que, os estudos sobre os efeitos dos mesmos ainda são insuficientes e contraditórios (problemas alérgicos, respiratórios, renais e hepáticos).

Cabe ressaltar, que no caso dos animais de companhia, como o alimento não é direcionado para humanos não existe uma preocupação com o efeito que o uso indiscriminado desses corantes possa acarretar para sua saúde, além disso, não existem dados toxicológicos suficientes para estimar uma IDA e LMR para esses animais. É importante destacar que a alimentação destinada para animais de companhia, muitas vezes é a única fonte de nutrientes para o animal (mistura de grão e/ou alimento completo), a qual geralmente é administrada livremente. Portanto, determinar doses seguras de ingestão e limites máximos de resíduos de corantes artificiais nesses alimentos é um desafio para os órgãos regulamentadores.

Corantes Naturais: Além dos corantes artificiais encontrados, também foi verificada a adição de corantes naturais, tanto nas comercializadas em embalagens fechadas quanto nas à

granel. Os corantes naturais encontrados nos ingredientes para aves de companhia foram clorofila, carotenos e o caramelo, presentes em três (5, 21 e 24) amostras. Estes compostos foram identificados, a partir das características observadas nas reações de extração tanto por adição de hidróxido de amônio como acetato de amônio. Foi verificada a instabilidade dos pigmentos frente à mudança de pH. Quando utilizado o método Arata (cromatografia de papel), não foi observado o desprendimento do corante da lã natural com adição de ácido.

Logo, foi observado que os corantes mais utilizados são artificiais. Poucas amostras apresentaram corantes naturais. Os corantes artificiais eram aqueles permitidos na legislação brasileira, porém em algumas amostras não foi identificado os corantes presentes. Não existem estudos similares para correlacionar os dados encontrados, e os estudos toxicológicos ainda são escassos. Para alimentação humana já existe uma maior preocupação com o uso abusivo de corantes, porém não é o que ocorre para a alimentação animal.

Avaliação da rotulagem dos alimentos para aves de companhia produzidos nas Regiões Sul e Sudeste do Brasil

Foi observado que as amostras acondicionadas em embalagens comerciais não apresentavam algumas das informações exigidas pela legislação brasileira (BRASIL, 2009a,b,c), ou seja, não apresentavam os níveis de garantia (composição %) obrigatórios, nem a composição básica (ordem decrescente de ingredientes), dificultando inclusive a correlação dos dados.

Além disso, foi verificado que embora algumas indústrias de maior porte estejam investindo no desenvolvimento de rótulos mais explicativos e completos, não existe uma padronização no que diz respeito a alimentos para aves de companhia e este fato se deve a ambigüidade que a legislação permite.

As embalagens utilizadas para a comercialização dos alimentos completos eram em sua maioria constituída de polietileno (diferentes densidades) e algumas em polietileno aluminizado. Duas das 26 amostras empacotadas apresentavam ainda, embalagens primárias e secundárias. Foi observado que os produtos que eram embalados em material mais rígido não continham contaminação por insetos e nem odor de ranço. Em contrapartida, os alimentos vendidos à granel eram mantidos em caixas de polipropileno (abertas ou fechadas) e eram comercializadas em sacos plásticos após pesadas, e algumas destas estavam contaminadas por insetos e apresentavam odor de ranço

Além disso, notou-se que grandes empresas investem em melhores embalagens com

utilização novas tecnologias, como por exemplo, embalagens com vácuo, aluminizados, em plásticos mais rígidos, e com dispositivos de abre e fecha que ajudam na melhor conservação do alimento mesmo após a comercialização e abertura dos produtos. Porém é importante ressaltar que a comercialização de produtos à granel coloca em risco a qualidade dos produtos, uma vez que não se pode controlar todos os fatores extrínsecos que os mesmos são submetidos na comercialização. Este fato aliado ao decréscimo da qualidade pode agravar riscos à saúde e bem estar dos animais de companhia.

Perfil de ingredientes e sua correlação com conteúdo de umidade, contaminação por micotoxinas e infestação por insetos

A Tabela 7 apresenta resultados das análises para a determinação dos conteúdos de umidade e micotoxinas em alimentos para aves de companhia.

Ingredientes versus contaminação por micotoxinas e insetos: Amendoim e milho, semente de girassol e frutas, foram os ingredientes majoritários identificados como possíveis substratos para contaminação por micotoxinas. Do total de amostras analisadas, amendoim e milho estavam presentes em 50 e 52,8 % das amostras, respectivamente. Esses ingredientes estavam presentes em 15 amostras embaladas e 3 e 4 nas comercializadas à granel, respectivamente. Esses ingredientes estão relacionados à possível presença de AFLs, e por AFLs e *Fusarium* toxinas (FBs e ZON). Além desses grãos, como esperado a semente de girassol foi identificada em grandes proporções nos alimentos, sendo relacionada a contaminação por AFLs. Também foram encontradas com alta frequência frutas desidratadas e/ou cristalizadas (55,6 %) relacionadas com a contaminação de produtos com OTA e PTL. Foi verificado que muitos dos ingredientes das amostras analisadas se encontravam danificados e infestados por insetos. Os principais ingredientes infestados foram milho, arroz e amendoim. Os insetos identificados foram das espécies de coleópteros, correspondentes ao gênero *Sitophilus* spp. (Curculionidae) e à *Sitophilus zeamais* (milho), *Sitophilus oryzae* (arroz), *Sitophilus granarius* (trigo), e *Rhizopertha dominica* (Bostrychidae). Esses insetos são característicos de infestação interna dos grãos, e foram encontrados vivos dentro das amostras ainda embaladas. A contaminação por insetos provoca o decréscimo da qualidade dos alimentos, acarretando a perda do valor nutricional, diminuição no peso dos grãos, perda do valor comercial dos produtos, além de favorecer a proliferação de fungos e contaminação por micotoxinas.

Conteúdo de umidade: Do total de amostras coletadas (36), 36 % apresentavam

conteúdo de umidade acima do preconizado pela legislação. Sendo que das 26 amostras fechadas, 8 (30,8 %) estavam irregulares e das 10 avulsas 5 (50 %) estavam com a umidade acima dos limites preconizados pela legislação para alimentos destinados para aves de companhia, ou seja, acima de 12 % (BRASIL, 2003). Alguns rótulos inclusive colocavam os níveis de garantia acima deste. Este fato aliado a composição complexa, pode ser fator determinante para a contaminação por micotoxinas.

Micotoxinas: No presente estudo, todas as amostras apresentaram contaminação por AFLs, OTA, ZON ou FBs abaixo dos LOQs, ou seja, menores que 100; 100; 200; 250; 100; 80 ng.kg⁻¹ e 5 µg.kg⁻¹ para AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂, OTA, ZON e FB₁, respectivamente. Estes dados são corroborados com os obtidos por Scudamore et al. (1997), Maia e Pereira Bastos de Sequeira (2002), Martins, Martins e Bernardo (2003) e Campos et al. (2008), nos quais foram encontradas nenhuma ou baixas frequências de contaminação por micotoxinas em amostras de alimentos completos secos (conteúdo de umidade < 12 %) para animais de companhia (pássaros). Scudamore et al. (1997) e Maia e Pereira Bastos de Sequeira (2002) verificaram que as amostras que continham amendoins em sua composição foram as que apresentaram contaminação por AFLs. Já Campos et al. (2008) verificaram que os ingredientes baseados em milho e sorgo eram os que apresentavam maior frequência e quantidade de AFLs.

Em contrapartida, Henke et al. (2001) e Scussel et al. (2006) encontraram em seus estudos elevada frequência e níveis de contaminação por micotoxinas como AFLs, OTA, FBs e ZON, em alimentos para aves de estimação. Os autores também correlacionaram contaminação por estas substâncias com a presença de ingredientes como amendoim e milho.

Embora, no presente estudo, os níveis de toxinas não fossem quantificáveis, foi observado que amendoim, milho, sementes de girassol, frutas desidratadas e cristalizadas estavam presentes na composição dos alimentos para aves de companhia em grande proporção. A contaminação por micotoxinas tem sido correlacionada com a complexa composição dos produtos destinados à alimentação de animais de companhia, por diversos autores. A presença de grãos e cereais, como milho, sorgo, soja, arroz, aveia, amendoim, sementes de girassol, produtos derivados de ovo e leite, entre outros, podem sugerir esta ocorrência (HENKE et al., 2001; SCUSSEL et al., 2006, CAMPOS et al., 2008; SIMÃO et al., 2009). Além disso, os diferentes tipos de comercialização, armazenamento, localização regional e clima (umidade relativa do ar) e conteúdo de umidade dos ingredientes e produtos acabados são fatores que podem influenciar na qualidade de rações (HENKE et al., 2001; ZWIERZCHOWSKI et al., 2004; CAMPOS et al., 2008; SIMÃO et al., 2009).

Tabela 7. Conteúdo de umidade das amostras de alimentos para pássaros comercializados embalados e à granel

Amostra n.	Alimentos para aves de companhia					Micotoxinas (ng.kg ⁻¹)					OTA ^f	FB ₁ ^g	ZON ^h
	Conteúdo de umidade					AFLs ^e							
	Média (%)	Min ^a . (%)	Máx ^b . (%)	DP ^c	DPR ^d (%)	AFB ₁	AFB ₂	AFG ₁	AFG ₂	ΣAFLs			
Amostras empacotadas													
1	20,84	20,38	21,11	0,41	1,95	< 100	< 100	< 200	< 250	< 650	< 100	< 5000	< 80
2	9,96	9,38	10,98	0,89	8,92	< 100	< 100	< 200	< 250	< 650	< 100	< 5000	< 80
3	11,63	11,45	11,76	0,16	1,41	< 100	< 100	< 200	< 250	< 650	< 100	< 5000	< 80
4	10,99	10,71	11,18	0,25	2,29	< 100	< 100	< 200	< 250	< 650	< 100	< 5000	< 80
5	9,44	9,13	9,79	0,33	3,53	< 100	< 100	< 200	< 250	< 650	< 100	< 5000	< 80
6	10,03	10,02	10,03	0,01	0,09	< 100	< 100	< 200	< 250	< 650	< 100	< 5000	< 80
7	15,39	15,30	15,48	0,09	0,58	< 100	< 100	< 200	< 250	< 650	< 100	< 5000	< 80
8	11,28	11,00	11,79	0,45	3,96	< 100	< 100	< 200	< 250	< 650	< 100	< 5000	< 80
9	11,41	11,06	11,73	0,34	2,95	< 100	< 100	< 200	< 250	< 650	< 100	< 5000	< 80
10	10,79	9,76	11,63	0,95	8,81	< 100	< 100	< 200	< 250	< 650	< 100	< 5000	< 80
11	10,09	8,52	12,32	1,98	19,67	< 100	< 100	< 200	< 250	< 650	< 100	< 5000	< 80
12	11,76	11,20	12,17	0,50	4,25	< 100	< 100	< 200	< 250	< 650	< 100	< 5000	< 80
13	12,39	11,97	12,99	0,54	4,34	< 100	< 100	< 200	< 250	< 650	< 100	< 5000	< 80
14	10,26	9,95	10,85	0,51	4,99	< 100	< 100	< 200	< 250	< 650	< 100	< 5000	< 80
15	10,66	10,32	10,86	0,30	2,77	< 100	< 100	< 200	< 250	< 650	< 100	< 5000	< 80
16	11,18	10,88	11,15	0,32	2,85	< 100	< 100	< 200	< 250	< 650	< 100	< 5000	< 80
18	12,26	10,62	14,27	1,85	15,09	< 100	< 100	< 200	< 250	< 650	< 100	< 5000	< 80
20	10,84	10,29	11,65	0,72	6,62	< 100	< 100	< 200	< 250	< 650	< 100	< 5000	< 80
22	11,95	11,12	12,99	0,95	7,98	< 100	< 100	< 200	< 250	< 650	< 100	< 5000	< 80
24	6,28	6,24	6,33	0,05	0,73	< 100	< 100	< 200	< 250	< 650	< 100	< 5000	< 80
26	11,58	12,61	12,88	0,19	1,62	< 100	< 100	< 200	< 250	< 650	< 100	< 5000	< 80
28	9,09	8,95	9,23	0,14	1,59	< 100	< 100	< 200	< 250	< 650	< 100	< 5000	< 80
30	13,05	13,26	13,55	0,21	1,58	< 100	< 100	< 200	< 250	< 650	< 100	< 5000	< 80
32	12,37	12,34	12,38	0,02	0,17	< 100	< 100	< 200	< 250	< 650	< 100	< 5000	< 80
34	13,05	12,99	13,14	0,08	0,58	< 100	< 100	< 200	< 250	< 650	< 100	< 5000	< 80
36	12,36	11,10	13,06	1,09	8,86	< 100	< 100	< 200	< 250	< 650	< 100	< 5000	< 80
Amostras à granel													
17	10,67	9,17	12,27	1,55	14,54	< 100	< 100	< 200	< 250	< 650	< 100	< 5000	< 80
19	11,58	11,06	12,03	0,49	4,24	< 100	< 100	< 200	< 250	< 650	< 100	< 5000	< 80
21	11,56	10,93	12,68	0,97	8,40	< 100	< 100	< 200	< 250	< 650	< 100	< 5000	< 80
23	11,14	10,65	11,60	0,48	4,26	< 100	< 100	< 200	< 250	< 650	< 100	< 5000	< 80
25	13,25	13,26	13,64	0,27	2,02	< 100	< 100	< 200	< 250	< 650	< 100	< 5000	< 80
27	12,99	12,85	13,14	0,15	1,15	< 100	< 100	< 200	< 250	< 650	< 100	< 5000	< 80
29	13,26	13,17	13,38	0,11	0,86	< 100	< 100	< 200	< 250	< 650	< 100	< 5000	< 80
31	12,99	12,92	13,07	0,08	0,59	< 100	< 100	< 200	< 250	< 650	< 100	< 5000	< 80
33	10,43	10,39	10,49	0,05	0,48	< 100	< 100	< 200	< 250	< 650	< 100	< 5000	< 80
35	13,65	12,38	14,53	1,12	8,23	< 100	< 100	< 200	< 250	< 650	< 100	< 5000	< 80

a = valor mínimo b = valor máximo c = Desvio Padrão d = Desvio Padrão Relativo e = Aflatoxinas f = Fumonisinas g = Ocratoxina A h = Zearalenona LOD e LOQ foram: 34 e 100; 34 e 100; 67 e 200; 83 e 250; 34 e 100; 27 e 80 ng.kg⁻¹ e 1,7 e 5 µg.kg⁻¹ para AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂, OTA, ZON e FB₁, respectivamente

3.5 Conclusão

Quanto ao perfil de ingredientes foi observado que novos produtos e tecnologias estão sendo empregados para produção de alimentos completos, porém no caso dos produtos para aves de companhia ainda há o predomínio da comercialização de produtos compostos por misturas de grãos e frutos. Este fato gera grande variação quanto a composição básica dos alimentos. Embora a complexa formulação das rações e alimentos completos seja um fator positivo para o aumento da qualidade nutricional dos produtos, a má qualidade dos ingredientes pode ser um risco para a saúde dos animais. Portanto, o desequilíbrio entre as formulações, a contaminação dos ingredientes e a adição indiscriminada de aditivos (corantes artificiais) são fatores de risco para a segurança alimentar desses produtos.

Quanto o perfil de corantes foi observado que os corantes mais utilizados são artificiais. Poucas amostras apresentaram corantes naturais. Os corantes artificiais eram aqueles permitidos na legislação brasileira, porém em algumas amostras não se conseguiu identificar os corantes presentes. A dificuldade na identificação destes corantes ocorreu pelo uso de quantidades não padronizadas, e por não se ter limites pré-estabelecidos pela legislação.

Algumas indústrias têm investido no desenvolvimento de rótulos explicativos e completos, porém foi observado que não existe uma padronização no que diz respeito a alimentos para aves de companhia e este fato se deve a ambigüidade que a legislação permite.

Embora, os alimentos para aves de companhia eram compostos de ingredientes passíveis de contaminação por micotoxinas, essas substâncias foram detectadas em quantidades muito pequenas (traços). Cabe ressaltar que mesmo não encontrando quantidades de micotoxinas acima dos LMRs preconizados pela legislação, o controle e avaliação da qualidade desses produtos devem ser realizados constantemente, a fim de garantir a segurança destes alimentos.

No que se refere à prática de comercialização de produtos à granel, destaca-se que esta coloca em risco a qualidade dos produtos, uma vez que não se pode controlar todos os fatores extrínsecos que os mesmos são submetidos na comercialização.

Na literatura científica são poucos os relatos referentes à qualidade dos produtos voltados para a alimentação de animais de companhia, no que se referem a sua composição, aditivos alimentares e contaminantes como micotoxinas e insetos. Além disso, foi observada uma carência de regulamentações para o controle de qualidade de alimentos para esses animais.

3.6 Referências Bibliográficas

AAFCO. Association of American Feed Control Officials. **Feed Inspector's Manual**. 2 ed. AAFCO/Inspection and Sampling Committee, May 1, 2000.

ANFAL PET – Associação Nacional dos Fabricantes de Alimentos para Animais de Estimação. **Mercado Pet 2010**, *Press release*. Disponível em: <
http://anfalpet.org.br/portal/index.php?option=com_content&view=article&id=7&Itemid=22>
. Acesso em: 20 jan. 2010.

ANFAL PET – Associação Nacional dos Fabricantes de Alimentos para Animais de Estimação. **Guia de identidade e qualidade pet - PIQPET**. São Paulo: Anfalpet, 2007. 48p.

AOAC. Association of Official Analytical Chemists. **Official Method of Analysis of AOAC International**. Thiex, N. J. W. (Ed.) Animal feed. Art. 965.16. Sampling of animal feed and Art. 930.15 Moisture content. 18 ed. Maryland: AOAC International, 2005.

ATHIÉ, I.; PAULA, D. C. **Insetos de grãos armazenados: aspectos biológicos e identificação**. 2. ed. São Paulo: Varela, 2002. 244 p.

BOERMANS, H. J.; LEUNG, M. C. K. Micotoxinas and the pet food industry: Toxicological evidence and risk assessment. **International Journal of Food Microbiology**, v. 119, n. 1 e 2, p. 95-102, Oct. 2007.

BRASIL, 1996. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), através da Portaria nº 183 de 21/03/1996, publicada no **Diário Oficial da União** de 25 de março de 1996, Seção I, página 4929.

BRASIL, 1965. Decreto n. 55871, de 26 de março de 1965 Modifica o Decreto nº 50.040, de 24 de janeiro de 1961, referente a normas reguladoras do emprego de aditivos para alimentos, alterado pelo Decreto nº 691, de 13 de março de 1962. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 9 abr. 1965. seção1 , p. 3610

BRASIL, 2003. MAPA. SARC e DFFPA. Portaria n. 384, de 26 de dezembro de 2003. Institui consulta pública da Instrução Normativa que aprova o Regulamento Técnico sobre Avaliação da Segurança de Uso, Registro e Comercialização de Aditivos para Alimentação Animal. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 30 dez. 2003.

BRASIL, 2004. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento e Secretaria de Apoio Rural e Cooperativismo. Instrução Normativa nº 13, de 30 de novembro de 2004. Aprova regulamento técnico sobre aditivos para produtos destinados à alimentação animal **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 1 dez. 2004.

BRASIL, 2005. Instituto Adolfo Lutz. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz: métodos químicos e físicos para análise de alimentos**. São Paulo:Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, 2005.

BRASIL, 2009a. MAPA/SDA. Portaria nº 3, de 22 de janeiro de 2009. Registro de estabelecimento e produtos, rotulagem e propaganda e para isenção de registro de produtos

destinados à alimentação de animais de companhia e aprova os padrões de qualidade e identidade para alimentos destinados à cães e gatos. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 23 jan. 2009. Seção 1, p. 12.

BRASIL, 2009b. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 22, de 2 de junho de 2009. Regulamenta a embalagem, rotulagem e propaganda dos produtos destinados à alimentação animal. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 4 jun. 2009. Seção 1.

BRASIL, 2009c. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 30, de 5 de agosto de 2009. Estabelece critério e procedimentos para registro de produtos, para rotulagem e propaganda e para isenção de registro de produtos destinados à alimentação de animais de companhia. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 7 ago. 2009. Seção 1, p. 13.

CAMPOS, S. G.; CAVAGLIERI, L. R.; FERNANDEZ JURI, M. G.; DALCERO, A. M.; KRUGER, C.; KELLER, L. A.; MAGNOLI, C. E.; ROSA, C. A. Mycobiota and aflatoxins in raw materials and pet food in Brazil. **J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)**, v. 92, n. 3, p. 377-383, 2008.

CANADA. Canadian Grain Commission. **Managing stored grain to prevent insect infestations: identifying insect pests found in stored grain**. 2009. Disponível em: <<http://www.grainscanada.gc.ca/storage-entrepose/pip-irp/gw-cg-eng.htm>>. Acesso em: 12 nov. 2009.

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

EC. EUROPEAN COMMISSION. Commission Recommendation 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. **Official Journal of the European Union**, 23 of Aug. of 2006. L 229 p. 7-9.

EC. EUROPEAN COMMISSION. Community Register of Feed Additives pursuant to Regulation (EC) No 1831/2003 **Appendixes 3 & 4. Annex : List of additives**. 77 ed. Animal Health and Welfare: 2010.

EC . EUROPEAN COMMISSION. Regulation (EC) n. 1831/2003 of the European Parliament and of the Council of 22 September 2003, on additives for use in animal nutrition. **Official Journal of the European Union**, 18 of Oct. of 2003. L 268 p. 29-43

FAO . FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **Worldwide regulations for mycotoxins in food and feed in 2003**. FAO Food and Nutrition Paper 81. Roma, 2004. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/007/y5499e/y5499e00.htm#Contents>>. Acesso em: 2 ago. 2006.

FAO. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS **Compendium on Post-harvest Operations**. Cap. XXII. 2003. Versão eletrônica. Disponível

em: <http://www.fao.org/inpho/content/compnd/text/ch23_04.htm>. Acesso em: 12 nov. 2009

FDA. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Department of Health and Human Services. **Code of federal regulations**. 21 CFR Part 500 – Animal Food, Parte 570 - Food Additives, 2007. Disponível em: <<http://www.gpoaccess.gov/cfr/>> Acesso em: 11 jan. 2010.

FDA. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Macroanalytical Procedures Manual (MPM)**. Technical Bulletin Number 5. Washington DC: Center for Food Safety and Applied Nutrition; Versão eletrônica 1998. Disponível em: <<http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/MacroanalyticalProceduresManualMPM/default.htm>>. Acesso em: 12/11/2009.

HENKE, S. E.; GALLARDO, V. C.; MARTINEZ, B.; BAILEY, R. Survey of aflatoxin concentrations in wild bird seed purchased in Texas. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 37, n. 4, p. 831-835, 2001.

KILL, J. L.; HAESE, D.; VASCONCELOS, C. H. F.; PUPPLO, D. D. Avanços na nutrição de pássaros: quebrando paradigmas. **Natureza on line**, n. 6, v. 2, p. 53-54, 2008. Disponível em: <http://www.naturezaonline.com.br/natureza/conteudo/pdf/01_KillJLetal_5354.pdf>. Acesso em: 13 mar. 2010.

LEUNG, M. C. K.; DIAZ-LLANO, G.; SMITH, T. K. Mycotoxins in pet food: A review on worldwide prevalence and preventative strategies. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 26, p. 9623-9635, 2006.

LINDINO, C. A.; GONÇALVES JÚNIOR, A. C.; ORTH, G. G.; SCHREINER, J. S.; DE FARINA, L. O. Determinação de metais em corantes alimentícios artificiais. **Acta Sci. Technol.**, Maringá, v. 30, n. 1, p. 93-98, 2008

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

MARTINS, H. M.; MARTINS, M. L.; BERNARDO, F. Study of Ochratoxinogenic strains of *Aspergillus niger*. In: INTERNATIONAL CONFERENCE. FOOD PROTECTION, 2002, Almada. **Proceedings ...** Des Moines: IAFP, 2002. p. 64.

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

NI, Y.; GONG, X. Simultaneous spectrophotometric determination of mixtures of food colorants. **Anal. Chim. Acta**, v. 354, p. 163-171, 1997.

OHLWEILER, O. A. **Fundamentos da análise instrumental**. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos, 1991. 486p.

PCHRG. PUBLIC CITIZEN HEALTH RESEARCH GROUP. **Dyes in your food**. The American Academy of Pediatrics Committed on Drugs in Pediatrics: October, 1985.

Disponível em: <<http://www.feingold.org/pg-research.html>>. Acesso em: 25 de fev. 2010.

POLÔNIO, M. L. T.; PERES, F. Consumo de aditivos alimentares e efeitos à saúde: desafios para a saúde pública brasileira. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 25, n. 8, p. 1653-1666, ago. 2009

PRADO, M. A.; ABUJAMRA, F.; GODOY, H. T. Análise de corantes em chás aromatizados. **Revista Analytica**, n. 5, p. 31-35, jun.jul. 2003.

PRADO, M. A.; GODOY, H. T. Corantes artificiais em alimentos **Alim. Nutr.**, Araraquara, v.14, n.2, p. 237-250, 2003.

RÊGO, F. M. Psitacídeos. **Revista Animais de Companhia**, n. 5, p. 24-26, mar. 2009.
Disponível em: < http://www.nutricao.vet.br/pdfs/revista_animais_de_cia_mar_2009.pdf> .

ROSTAGNO, H. S.; ALBINO, L. F. T.; DONZELE, J. L.; GOMES, P. C.; FERREIRA, A. S.; OLIVEIRA, R. F.; LOPES, D.C. **Tabelas brasileiras para aves e suínos, composição de alimentos e exigências nutricionais**. Viçosa: UFV. 2000. .141p.

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

SCUSSEL, V. M.; GIORDANO, B. N. E.; SIMAO, V.; da ROCHA, M. W.; dos REIS, L. F. C.; XAVIER, J. J. M. Mycotoxins evaluation in feed for pets using tandem liquid chromatography mass/mass. In: 9th INTERNATIONAL WORKING CONFERENCE ON STORED PRODUCT PROTECTION, 2006, Campinas: **Proceedings...** Campinas: ABRAPOS, 2006. v. 1. p. 182-188.

SIMÃO, V.; BASSO, G.; MOECKE, E. H. S.; MANFIO, D.; SCUSSEL, V. M. .
Determinação do Perfil de Corantes e Ingredientes e em Rações para Pássaros de Estimação. In: XVI ENCONTRO NACIONAL DE ANALISTAS DE ALIMENTOS, 2009, Minas Gerais. **Anais...** Belo Horizonte: SBAAL, 2009.

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

TAKAHASHI, M. Y.; YABIKU, H. Y.; MARSIGLIA, D. A. P. Determinação quantitativa de corantes artificiais em alimentos. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, v. 48, n 1/2, p. 7-15, 1988.

XAVIER, J. J. M.; SCUSSEL, V. M. Development of an LC-MS/MS method for the determination of aflatoxin B1, B2, G1, and G2 in brazil nuts. **International Journal of Environmental Analytical Chemistry**, v. 28, n. 6, p. 425-433, 2008.

ZWIERZCHOWSKI, W.; GAJECKI, M.; OBREMSKI, K.; ZIELONKA, Ł.;
BARANOWSKI, M. The occurrence of zearalenone and its derivatives in standard and therapeutic feeds for companion animals. **Polish Journal of Veterinary Sciences**, v. 7, n. 4, p. 289-293. 2004.

4 ARTIGO

**AVALIAÇÃO DA MICROBIOTA E DE MICOTOXINAS EM ALIMENTOS PARA
AVES DE COMPANHIA COMERCIALIZADAS NO SUDESTE E SUL DO BRASIL**

AVALIAÇÃO DA MICBIOTA E DE MICOTOXINAS EM ALIMENTOS PARA AVES DE COMPANHIA COMERCIALIZADAS NO SUDESTE E SUL DO BRASIL

4.1 Resumo

A contaminação por fungos e micotoxinas em rações para animais de produção têm sido extensivamente estudada. No entanto, um nicho tem chamado atenção diferenciada atualmente é: o mercado de alimentos para animais de companhia. Neste trabalho, foi enfatizado um grupo de animais que não tem recebido a necessária atenção em se tratando da contaminação de seus alimentos por fungos e micotoxinas: as aves de companhia (silvestres e exóticas). Espécies de aves de companhia silvestres têm sido consideradas animais de companhia, uma vez que em países como Estados Unidos a prática de atrair e alimentar aves em quintais e jardins de residências é comum (HENKE et al., 2001). O objetivo deste estudo foi verificar a contaminação de alimentos para aves de companhia quanto à contaminação por bolores, leveduras e micotoxinas. Foram coletadas 36 amostras de alimentos completos ou misturas de grãos para aves (sabiá, curió, trinca-ferro, papagaio, pássaro-preto, calopsitas, entre outros) produzidas em diferentes regiões brasileiras. Estes produtos foram adquiridos em supermercados, agropecuárias e lojas especializadas neste tipo de alimento nas cidades de Belo Horizonte, Florianópolis, Passo Fundo, nos estados de Minas Gerais, Santa Catarina e Rio Grande do Sul, respectivamente. A contagem total de bolores e leveduras foi realizada utilizando métodos e meios de cultura convencionais. Já para determinação da micobiota toxigênica foi utilizado meio diferencial ágar *Aspergillus flavus* e *A. parasiticus*. Para a análise das micotoxinas foi utilizado o método de multi-toxinas (AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂, OTA, ZON e FB₁) por cromatografia líquida e detecção massa/massa (LC-MS/MS). As fontes de ionização foram por: *electrospray* e química à pressão atmosférica. Os limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) para AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂, OTA, ZON e FB₁ foram: 34 e 100; 34 e 100; 67 e 200; 83 e 250; 34 e 100; 27 e 80 ng.kg⁻¹ e 1,7 e 5 µg.kg⁻¹, respectivamente. A contagem média de bolores e leveduras foi 1,1 x 10⁵ UFC/g, (mín. 4,5 x 10² e máx. 6,6 x 10⁵). Foi observado que 75 % das amostras apresentaram contagem acima de 1 x 10⁴ UFC/g, padrão este, preconizado pelo GMP (2007). Como esperado, as amostras comercializadas à granel foram as que apresentaram maior contagem (mín. 7,5 x 10³ e máx. 4,5 x 10⁵), esse fato possivelmente está relacionado ao tipo e condições de armazenagem a que as amostras são submetidas. Como esperado, houve uma correlação entre os conteúdos de umidades e a contagem de bolores e leveduras, sendo que as amostras com menor porcentagem de umidades foram as que apresentaram também menor contagem total de bolores e leveduras. Houve crescimento de colônias leveduriformes em 44,4 % das amostras validadas de alimentos para aves de companhia. Os gêneros de fungos filamentosos encontrados foram *Aspergillus* e *Cladosporium* ambos em 47,2 % das amostras, seguido de *Mucor* e *Penicillium* 38,9 e 27,8 %, respectivamente. Do total de amostras analisadas, 22,2 % apresentaram crescimento de estirpes toxigênicas de *Aspergillus*. As espécies identificadas foram: *A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. niger* e *A. ochraceus*. Embora, as amostras analisadas contivessem em sua composição ingredientes passíveis de contaminação por micotoxinas como: ração (69,4 %), amendoim (52,8 %), milho (50 %), frutas desidratadas e cristalizadas (55,6 %), semente de girassol (52,8 %), nenhuma amostra apresentou contaminação acima dos LOQs para AFLs, OTA, FBs ou ZON.

Paravras-chave: aves de companhia, micobiota, fungos toxigênicos, micotoxinas, LC-MS/MS,

4.2 Introdução

A contaminação de alimentos destinados à animais de companhia por microorganismos e substâncias tóxicas representa um risco para sua saúde, tanto por inalação (micélios, esporos), como por ingestão (micotoxinas). Desordens respiratórias são associadas, com a exposição a matérias-primas de má qualidade contaminadas por fungos e *Fusarium* toxinas, em zootécnicos e trabalhadores rurais. Em cavalos esportivos a exposição à ração contaminada por fungos tem sido associada com inflamação das vias aéreas inferiores (RAYMOND; SMITH; SWAMY, 2003).

Fungos podem contaminar cereais, alimentos e rações durante os períodos de pré e pós-colheita, armazenamento, fabricação e processamento de matérias-primas. Durante estes períodos, a temperatura e a umidade têm um papel importante no crescimento dos fungos. Os fungos filamentosos são mais frequentemente encontrados em cereais armazenados e sementes oleaginosas, e os principais gêneros são *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*. A presença desses fungos em alimentos provoca a deterioração, perda de nutrientes, à alteração de propriedades organolépticas, contaminação por diferentes micotoxinas e à diminuição da vida útil do produto (DEVEGOWDA; CASTALDO, 2000; CAMPOS et al., 2008).

As espécies toxigênicas mais comuns de *Aspergillus* são *A. flavus* e *A. parasiticus* e podem ser encontradas em vários tipos de alimentos (MAGNOLI et al., 2002; MARTINS; MARTINS; BERNARDO, 2003; BUENO; SILVA; OLIVER, 2004). Estas espécies produzem aflatoxinas (AFLs), micotoxinas mais tóxicas, com efeitos carcinogênicos. Outras espécies de *Aspergillus*, tais como o *A. ochraceus*, *A. carbonarius* e *A. niger* produzem ocratoxina A (OTA), e já foram isoladas de cereais e de alimentos baseados em cereais e grãos, em países com clima subtropical e tropical (ACCENSI; ABARCA; CABANES, 2004; MAGNOLI et al., 2006)

Diversas espécies de *Penicillium* são envolvidas na deterioração dos alimentos e os principais metabólitos tóxicos deste gênero de fungos são: ácido ciclopiazônico, patulina, citrinina, ácido penicílico (PITT; HOCKING, 1997).

Embora muitas espécies de *Fusarium* existam na natureza, um número pequeno contamina cereais nos campos. As principais micotoxinas produzidas por esse gênero são fumonisinas (FBs) e zearalenona (ZON) e tricotecenos, e estão associados à micotoxicoses em animais de produção (CAMPOS et al., 2008).

De acordo com Martins, Martins e Bernardo (2003), os alimentos destinados à alimentação de animais de estimação são preparados com vegetais (cenoura, mamão e

beterraba), cereais (milho, sorgo e arroz), e/ou carne (galinha, carne, peru e peixes), gordura, vitaminas e minerais, sendo que durante sua fabricação, ele pode ser contaminado com os esporos de fungos especialmente quando os grãos dos cereais são moídos e o alimento é granulado (SUÁREZ, 1999). Além disso, esses alimentos podem conter quantidades concentradas de toxinas (SCUDAMORE; NAWAZ; HETMANSKI, 1998; BOERMANS; LEUNG, 2007).

No caso dos alimentos para aves de companhia, uma grande variedade de grãos de cereais e nozes é encontrada em sua composição e ainda são poucos os estudos específicos para esta classe de animais.

A maioria das toxinas, principalmente AFLs, FBs e OTA são estáveis nas circunstâncias normais da manufatura de produtos alimentares, inclusive aos processos que envolvem altas temperaturas (extrusão e peletização). Conseqüentemente, as toxinas presentes na matéria-prima contaminada permanecerão no produto final mesmo após seu processamento (CAMPOS et al., 2008). Logo, os órgãos reguladores devem se preocupar em garantir aos consumidores a qualidade destes produtos quanto à presença de micotoxinas como AFLs, OTA, FBs e ZON (BOERMANS; LEUNG, 2007; SIMÃO; SCUSSEL, 2008). A toxicidade das micotoxinas está associada a efeitos como: icterícia, hepatite, câncer hepático (hepatotoxicidade), letargia, depressão, (AFLs), teratogênico, imunossupressão, nefrototoxicidade (nefrocarcinogênico) (OTA), estrogênicos, infertilidade (ZON), câncer hepático e renal (FBs) (NEWBERNE; BUTLER, 1969; RAZZAZI et al., 2001; HUSSEIN; BRASEL, 2001; LEUNG; DIAZ-LLANO; SMITH, 2006). No Brasil a legislação vigente para os limites máximos de resíduos (LMR) permitidos para micotoxinas abrange apenas a contaminação por AFLs ($50 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$) em ingredientes e rações para animais em geral (FAO, 2004). Logo, este regulamento não observa a especificidade dos efeitos tóxicos em cada espécie de animal, além disso, não abrange outras micotoxinas que podem acarretar importantes prejuízos econômicos aos agricultores, às indústrias produtoras de alimentos e rações, e à saúde dos animais. Em outros países como, Estados Unidos e na União Européia, a legislação já regulamenta os LMRs para outras micotoxinas como ZON, OTA, FBS, (0,5 a 3; 0,05 a 0,25; e 5 a 60 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, respectivamente) entre outras, entretanto essas regulamentações são mais específicas para cada espécie de animal (EC, 2006).

Em se tratando de animais de companhia, ainda não existe legislação oficial mundial que regulamente a contaminação por micotoxinas, porém algumas associações como ANFAL-PET (Brasil) e AAFCO (EUA), recomendam valores para AFLs ($20 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$) (BRITO, 2009; AAFCO, 2000).

Embora muitos estudos e dados existam para aves de corte, poucos são os relatos da influência de fungos e micotoxinas na alimentação para aves de companhia. Considerando este fato, e as condições climáticas do Brasil bem como, a maior suscetibilidade das aves aos efeitos tóxicos das micotoxinas, foi realizado um estudo para avaliar a micobiota, sua possível toxigenicidade e a contaminação por micotoxinas em alimentos para papagaios, trinca-ferro, pássaro preto, sabiá, calopsitas, curió, mandarim, entre outros.

4.3 Material e Métodos

Material

Amostras. Total de 36 amostras de alimentos para aves de companhia (papagaios, trinca-ferro, pássaro preto, sabiá, calopsitas, curió, mandarim, entre outros), sendo 26 comercializadas em embalagens lacradas e 10 comercializadas à granel. As amostras eram de 19 marcas diferentes e produzidas nos estados de Minas Gerais (MG), Paraná (PR), Rio Grande do Sul (RS), Santa Catarina (SC) e São Paulo (SP).

Conteúdo de umidade. Dessecadores, discos de alumínio para determinação de umidade (50 mm x 40 mm ou Ø 4 cm), balanças semi-analítica (CAB) e analítica (Mettler), estufas bacteriológicas (Fanen).

Testes micológicos. (a) meios de cultura: ágar batata dextrosado (PDA- Himedia), ágar diferencial para *A. flavus* e *A. parasiticus* (AFPA, Fluka) e peptona bacteriológica (Himedia); (b) Cloranfenicol 98% (Sigma-Aldrich); (c) equipamentos: bico de Bunsen; autoclave (Phoenix), balanças semi-analítica (CAB) e analítica (Mettler), estufa bacteriológica (Fanen), Estufa DBO - incubadora ajustada em 20-25°C (Dist), microscópio óptico (PZO), microscópio estereoscópio (Carlzeiss Jena), contador de colônias (Phoenix); (d) outros materiais: *vidrarias*: erlenmeyer (2000 mL), tubos de ensaio, alças de Drygalski; pipetas graduadas (0,5; 1; 2 e 10 mL), provetas (250 e 1000 mL); *plásticos*: placas de Petry descartáveis e estéreis (90 x 15 mm JProLab), sacos amostradores e homogeneizadores baglight® (190 mm x 300 mm - Interscience), pipetas automáticas 100; 1000 µl (Digipet), ponteiras estéreis com filtro 1000 µl (Greiner Labortechnik).

Análise de micotoxinas (AFBs, FBs, ZON e OTA). (a) padrões: AFLs (AFB₁, AFB₂, AFG₁ e AFG₂), FBs (FB₁ e FB₂), ZON e OTA, todos da Sigma-Aldrich®; (b) solventes, reagentes: metanol e PBS, p.a. (Vetec), acetonitrila e metanol (Carlos Herba e JT Baker - grau HPLC). Metanol (Vetec - P.A.), água Milli-Q (Sistema MilliQ, Millipore); (c) equipamentos:

moinho/quarteador - Moedor de grãos (mesh: 13 mm), série II (Romer Labs); liquidificadores de aço inoxidável (Skymesen Eletro) agitador de tubos, concentrador de amostras (Tecnal), capela química; espectrofotômetro (Hitachi) e cromatógrafo líquido de alta eficiência (Agilent 1200) acoplado a detector MS: ABI 3200 QTrap (Applied Biosystem). (d) outros materiais: beakers (50 mL), frascos com tampa de polietileno e septo de silicone (2 mL), microseringas (Hamilton), pinças de inox, colunas de imunoafinidade AOZ (Vicam), cartuchos amino quaternário (N⁺ - Applied Separations) e coluna cromatográfica Phenomenex, C18, 50 x 2,10 mm, tamanho de partícula 2,6 µm.

Métodos

A metodologia desenvolvida para a avaliação dos alimentos para aves de companhia iniciou com a coleta e preparo das amostras, seguida da realização dos testes de conteúdo de umidade, micológicos e micotoxicológicos. A identificação das amostras e os procedimentos realizados estão sumarizados no Quadro 1 e Figura 1.

Coleta das amostras. As amostras foram coletadas por conveniência em agropecuárias, supermercados e lojas especializadas em alimentação para animais de companhia, nas cidades de Belo Horizonte, MG, Florianópolis, SC e Passo Fundo, RS (produzidas em diferentes estados das regiões Sul e Sudeste), no ano de 2009. As amostras de produtos *comerciais* estavam acondicionadas em embalagem (pacotes) lacradas (26) e as adquiridas à *granel* (10), em sacos plásticos de polietileno. Os pacotes eram de 200 a 500 g dependendo da marca e/ou fabricante. Já as amostras à *granel* foram adquiridas com peso total de 500 g cada. O Quadro 1, apresentado a seguir, reporta os detalhes de cada amostra coletada.

Preparo das amostras. Após a coleta, as amostras foram homogeneizadas por quarteamento e separadas em porções para as análises micológicas (contagem total bolores e leveduras, determinação da micobiota e potencial toxigênico das estirpes encontradas), micotoxicológicas (AFLs, FBs, ZON e OTA) e de conteúdo de umidade, com 25; 50 e 6 g, respectivamente. As amostras restantes foram embaladas à vácuo, acondicionadas em caixa acrílica com tampa e armazenadas em temperatura ambiente. As amostras analíticas reservadas à avaliação de micotoxinas foram trituradas em moinho quarteador anteriormente à análise.

Quadro 1. Local de fabricação, coleta e descrição das amostras de ração para aves de companhia avaliadas - embalagens fechadas e à granel

Fabricação			Alimento para aves de companhia				
Estado	Cidade	Local de coleta	Marca	Descrição	Tipo	Peso (g)	Código
[A] Produto comercial (embalagem fechada)							
SANTA CATARINA							
	Camboriú	Florianópolis/SC	Q	Ração para sabiá e pássaro preto	Extrusada/pelletizada	500	28
	Palhoça	Belo Horizonte/MG	L	Mistura para trinca-ferro com frutas	Mistura de grãos e ração extrusada	500	15
	São José	Florianópolis/SC	N	Mistura para papagaio	Mistura de grãos	500	18
		Florianópolis/SC	O	Mistura trinca-ferro com frutas	Mistura de grãos e ração extrusada/pelletizada com frutas	500	22
		Florianópolis/SC	N	Painço Alemão ou branco	Grãos	200	26
		Florianópolis/SC	N	Painço Francês ou vermelho	Grãos	200	30
		Florianópolis/SC	N	Painço Chileno ou verde	Grãos	200	32
		Florianópolis/SC	N	Painço Colorido	Grãos	200	34
	Tubarão	Passo Fundo/RS	G	Alimento para pássaros Trinca-ferro frutas	Mistura de grãos e ração extrusada	500	8
		Passo Fundo/RS	G	Alimento para pássaros Tinca-ferro grãos	Mistura de grãos e ração extrusada	500	9
SÃO PAULO							
	Campinas	Passo Fundo/RS	J	Alimento especial para pizarro, trinca-ferro com frutas	Mistura de grãos e ração extrusada	500	13
		Florianópolis/SC	P	Ração balanceada Sabiá Pellets	Extrusada/Pelletizada	200	24
	Dourado	Florianópolis/SC	S	Alimento super premium para aves com frutas Calopsitas	Extrusada/pelletizada	300	36
	Indaiatuba	Passo Fundo/RS	C	Alimento especial para papagaio com frutas	Ração extrusada/pelletizada	400	12
		Passo Fundo/RS	C	Ração para pássaros Brasileirinha silvestres	Ração extrusada/pelletizada	500	3
	Mogi Guaçu	Belo Horizonte/MG	K	Ração especial com frutas para pizarro/trinca-ferro	Mistura de grãos e ração extrusada	500	14
	Mogi Mirim	Passo Fundo/RS	D	Alimento completo para papagaios	Mistura de grãos	500	4
	Rio Claro	Florianópolis/SC	F	Ração para trinca-ferro com frutas	Mistura de grãos e ração extrusada/pelletizada	500	20
		Passo Fundo/RS	F	Ração para pássaros frutamix	Mistura de grãos e frutas desidratadas cristalizadas	500	7
	Sales de Oliveira	Belo Horizonte/MG	E	Gorjeio alimento para animais	Ração extrusada/pelletizada	500	6
MINAS GERAIS							
	Betim	Belo Horizonte/MG	A	Mistura Premium para papagaios cacatus e araras	Mistura de grãos e ração extrusada pelletizada	500	5
		Belo Horizonte/MG	A	Love birds	Mistura para papagaios Frutas desidratadas/cristalizadas	250	1
	Belo Horizonte	Belo Horizonte/MG	M	Ração para papagaio	Mistura de grãos e ração extrusada	500	16
RIO GRANDE DO SUL							
	Passo Fundo	Passo Fundo/RS	H	Mix para papagaio sem frutas	Mistura de grãos	500	10
		Passo Fundo/RS	I	Mix para papagaio com frutas	Mistura de grãos	500	11
PARANÁ							
	Cambará	Passo Fundo/RS	B	Ração para papagaios	Mistura de grãos e ração extrusada/pelletizada	500	2
		<i>Total empacotadas</i>	26				
[B] Produto à granel (embalagem aberta)							
SANTA CATARINA							
	São José	Florianópolis/SC	N	Ração para papagaio	Mistura de grãos	500	17
		Florianópolis/SC	O	Mistura trinca-ferro com frutas	Mistura de grãos e ração extrusada/pelletizada com frutas	500	21
		Florianópolis/SC	O	Mistura trinca-ferro com frutas	Mistura de grãos e ração extrusada/pelletizada com frutas	500	23
		Florianópolis/SC	N	Painço Alemão ou branco –	Grãos	500	25
		Florianópolis/SC	N	Alpiste branco e vermelho –	Grãos	500	27
		Florianópolis/SC	N	Painço Francês ou vermelho –	Grãos	500	29
		Florianópolis/SC	N	Painço Chileno ou verde –	Grãos	500	31
		Florianópolis/SC	R	Ração para pássaros Canina –	Extrusada/pelletizada com frutas	500	33
	Florianópolis	Florianópolis/SC	R	Ração para pássaros Canina –	Extrusada/pelletizada	500	35
SÃO PAULO							
	Rio Claro	Florianópolis/SC	F	Ração para trinca-ferro Saporito Mix com frutas -	Mistura de grãos e ração extrusada/pelletizada	500	19
		<i>Total à granel</i>	10				
		Total geral	36				

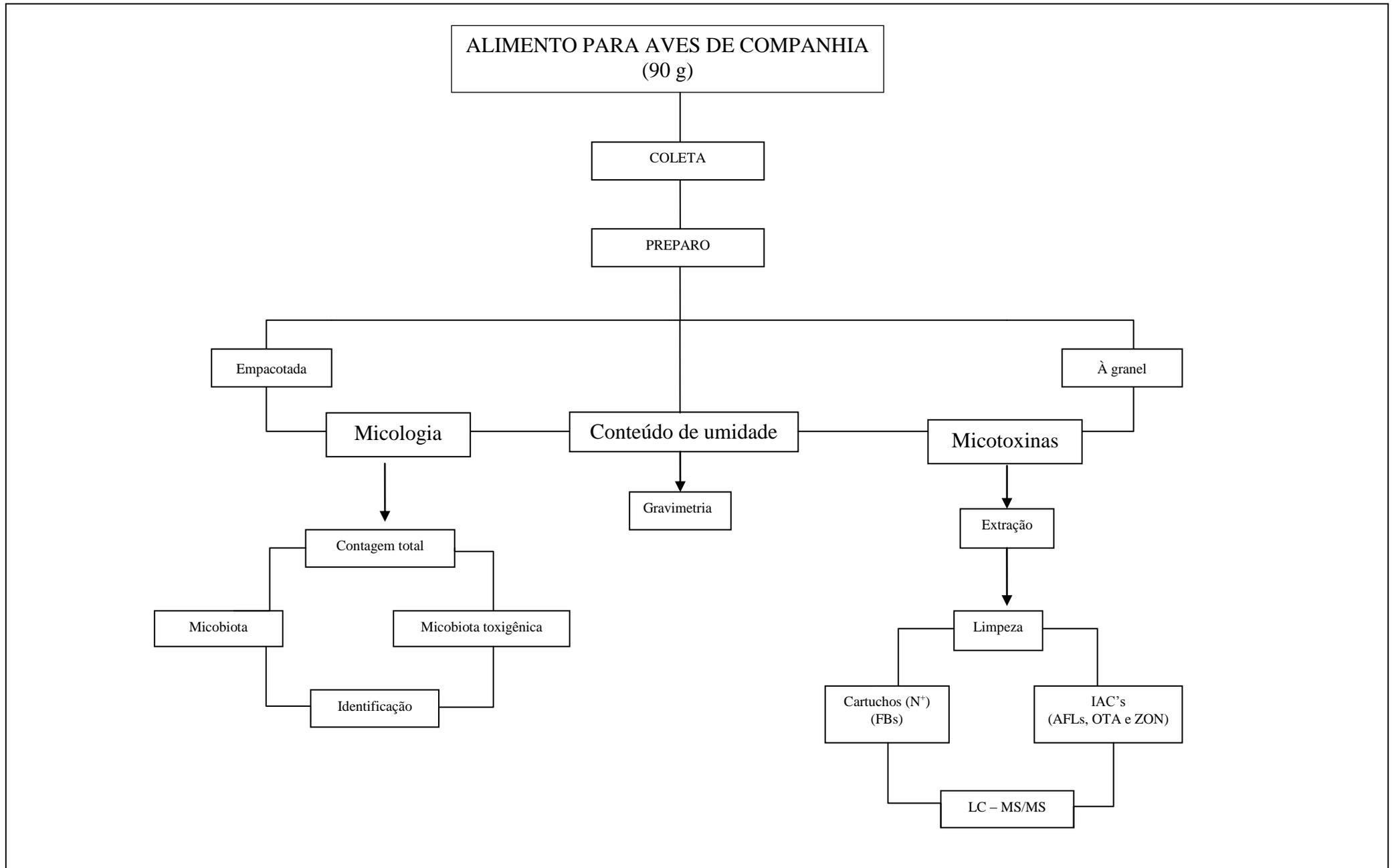


Figura 1. Fluxograma do estudo da contaminação de alimentos para aves de companhia por fungos e micotoxinas

Determinação do conteúdo de umidade. O conteúdo de umidade dos alimentos para aves de companhia foi determinado utilizando o método gravimétrico descrito na AOAC (2005). 2 g de cada amostra foram dessecados em estufa a temperatura de 135 °C até peso constante (variação menor que 0,05 g). Os ensaios foram realizados em triplicata (n = 3). O resultado final foi determinado pela média dos resultados \pm o desvio padrão relativo (DPR) e correlacionados com a legislação específica e com os níveis de garantia relatados no rótulo.

Testes micológicos. (a) *contagem total de bolores e leveduras:* foram coletadas 25 g de cada ração em sacos estéreis de amostragem e foram adicionadas a 225 mL de água peptonada (0,1%), e após agitação por 1 minuto, foram realizadas diluições seriadas (10^{-1} a 10^{-5}). De cada concentração 0,1 mL foi transferido para o plaqueamento de superfície no meio de cultura PDA (PITT; HOCKING; GLENN, 1983). O plaqueamento foi realizado em duplicata e a contagem total de bolores e leveduras foi expresso pela média dos plaqueamentos em UFC/g, após a incubação das placas em estufa a 22-25 °C por 3-5 dias (APHA, 1992). Os dados da contagem total de bolores e leveduras foram expressos de forma exponencial e logarítmica (Microsoft Excel). (b) *identificação da micobiota:* as estirpes dos fungos filamentosos detectados na contagem de bolores e leveduras foram isoladas e repicadas para meio PDA e então foram identificados os principais gêneros por microscopia (MACHIDA; SAITO, 1999) e as principais espécies foram determinadas pelas chaves descritas por Samson et al. (2002). (c) *identificação da micobiota toxigênica:* o plaqueamento foi realizado conforme descrito na análise anterior (seção b) utilizando como meio de cultura AFPA. A identificação das estirpes toxigênicas foi realizada conforme metodologia descrita por Pitt, Hocking e Glenn (1983) e por Samson et al. (2002).

Micotoxinas. As análises de AFLs (AFB₁, AFB₂, AFG₁ e AFG₂), FBs (FB₁ e FB₂), ZON e OTA foram realizadas a partir de 50 g de amostra previamente triturada e quarteada. Para extração foi utilizado como solvente uma mistura de metanol:água (80:20), para a limpeza do extrato foram utilizadas colunas de imunoafinidade (AOZ, Vicam) e cartuchos amino quaternário (N⁺ - Applied Separations). A detecção e quantificação das toxinas foram realizadas por LC – MS/MS. A curva de calibração foi realizada com cinco pontos, em triplicata (XAVIER; SCUSSEL, 2008). O gradiente de fase móvel está apresentado na Tabela 1.

Tabela 1. Gradiente de fase móvel (metanol:água) para análise de micotoxinas em amostras de alimentos para aves de companhia

etapa	tempo (min)	fluxo (ml/min.)	metanol (%)	água (%)
0	3.00	1	45	55
1	5.00	1	15	85
2	5.01	1	0	100
3	12.90	1	0	100

Os LOD e LOQ foram: 34 e 100; 34 e 100; 67 e 200; 83 e 250; 34 e 100; 27 e 80 ng.kg⁻¹ e 1,7 e 5 µg.kg⁻¹ para AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂, OTA, ZON e FB₁, respectivamente. Nota: padrão de FB₂ não foi detectado pelo método possivelmente por sua degradação na etapa de transporte.

Análise estatística. Os dados foram tabulados e analisados por meio de análise estatística descritiva, utilizando como instrumento programa ANOVA e teste de Tukey. Foi considerada diferença significativa com valor $p < 0,05$.

4.4 Resultados e Discussão

Trabalhos referentes à contaminação de alimentos completos para animais de companhia têm sido desenvolvidos em todo o mundo, principalmente pela representatividade econômica que este mercado tem apresentado, além do estreitamento das relações afetivas entre humanos e animais de companhia. Na Tabela 2 são apresentados os resultados de conteúdo de umidade, contagem total de bolores e leveduras, micobiota (identificação e toxigenicidade) e micotoxinas para as amostras avaliadas.

Do total de amostras analisadas produzidas em diferentes estados das regiões Sul e Sudeste do Brasil, 52,8; 30,6; 8,3; 5,6 e 2,8 % eram de SC; SP; MG; RS e PR, respectivamente. As amostras de produtos *comerciais* fechadas e a *granel* correspondiam a 72,2 e 27,8 %, respectivamente, do total de amostras coletadas. As espécies das aves a que se destinavam os alimentos coletados eram principalmente trinca-ferro e papagaio, porém os fabricantes destacavam que os produtos não eram de uso exclusivo para apenas uma espécie.

Testes Micológicos.

Contagem total de bolores e leveduras. A contagem média de bolores e leveduras foi $1,1 \times 10^5$ UFC/g de alimento para aves de estimação (mín. $4,5 \times 10^2$ e máx. $6,6 \times 10^5$). As normas para boas práticas de fabricação de alimentos (BPF) ou *good manufacturing practices* (GMP)

reportam que contagens de até 1×10^4 UFC/g indicam boas condições higiênicas sanitárias dos produtos (BRASIL, 2001; GMP, 2007), desta forma foi observado que 69,4 % das amostras estavam com níveis acima deste valor. Foi observado também que as amostras comercializadas à granel foram as que apresentaram maior contagem, sendo que 90 % delas estavam acima de 1×10^4 UFC/g. Já nas comercializadas empacotadas 61,5 % estavam acima deste valor.

Das 26 amostras comerciais fechadas 10 apresentavam contagem de bolores e leveduras abaixo ou igual a 10^4 UFC/g, sendo que destas 4 eram de SP, 2 de MG; 3 de SC; 1 do PR. Dos produtos que apresentaram boas condições higiênicas-sanitárias, 40; 30; 20 e 10 % eram compostos por somente ração extrusada ou peletizada; mistura de grãos e ração; só um tipo de grão e mistura de grãos e frutas, respectivamente. Das 16 amostras que indicavam níveis de bolores e leveduras acima de 10^4 UFC/g, 11 apresentaram contagem intermediária ($10^4 - 10^5$ UFC/g), o que de acordo com Santos et al. (2000) e Andriquetto et al. (1990) podem ser considerados níveis aceitáveis de contaminação para alimentos destinados à animais. Dessas amostras, 4; 4; 2; 1 eram originárias de SC; SP; MG e RS, sendo que 54,5 % eram compostas de mistura de grãos e ração; 27,3 % só de mistura de grãos com ou sem frutas e 18,2 % só um tipo de grão. Já das 5 amostras que apresentaram contagem de bolores e leveduras a níveis inaceitáveis ($> 10^5$ UFC/g), 3; 1 e 1 eram de SP; SC e RS, respectivamente e eram compostas principalmente por misturas de grãos com ou sem frutas; mistura de grãos e ração e ração com frutas. Outro fato observado foi que algumas das amostras que apresentaram maior contaminação por fungos estavam infestadas por insetos, e já apresentavam odor de rancidez.

Das 10 amostras comercializadas à granel apenas uma (mistura de grãos e ração) apresentava contagem boa de bolores e leveduras ($< 10^4$ UFC/g) sendo esta, do estado de SP. Todas as outras amostras eram comercializadas em agropecuárias de SC e sua composição era principalmente de apenas um tipo de grão, seguida de mistura de grãos e ração e ração com ou sem adição de frutas. A venda de alimentos para aves de companhia à granel foi uma prática observada principalmente em SC. Das 9 amostras com valores de contagem acima de 10^4 UFC/g, 5 apresentaram contagem intermediária ou aceitável ($10^4 - 10^5$ UFC/g) e 4 inaceitável. Foi verificado que apenas uma nas amostras à granel que continha umidade baixa apresentou níveis elevados de bolores e leveduras. Este fenômeno pode ser justificado por se tratar de uma amostra de composição complexa (mistura de grãos) e também pelo alto desvio padrão e desvio padrão relativo (DP e DPR - grande variabilidade) encontrado para o conteúdo de umidade desta amostra.

No presente estudo foi observado que os alimentos compostos por rações extrusadas ou peletizadas apresentaram contagem menor que os alimentos compostos por mistura de grãos. Portanto as amostras que apresentaram pior qualidade eram compostas por misturas de grãos (com ou sem adição de ração ou frutas) ou ainda somente um tipo de grão e eram comercializadas e produzidas no estado de SC .

Do total de amostras coletadas (36), cerca 36 % apresentavam conteúdo de umidade acima do preconizado pela legislação. Sendo que das 26 amostras fechadas, 30,8 % estavam irregulares (<12 %) - limites preconizados pela legislação para alimentos completos secos - (BRASIL, 2003; EC 2003; 2006). Como esperado, foi verificado que o conteúdo de umidade foi maior nas amostras comercializadas à granel (10 amostras - 50 % <12 %). Além disso, foi verificada uma correlação entre os conteúdos de umidades, a composição das amostras e a contagem de bolores e leveduras, sendo que as amostras com menores conteúdos de umidades eram aquelas processadas utilizando técnicas como extrusão ou peletização (perdem umidade durante processo) e foram as que apresentaram menores níveis de bolores e leveduras. Algumas observações foram realizadas durante os experimentos. (a) 5 amostras com conteúdos de umidade relativamente altos (20,8 - 12,4 % com média de 15 %) tiveram contagens baixas (mín. $2,5 \times 10^3$ e máx. $4,0 \times 10^4$ com média de $1,9 \times 10^4$ CFU/g). Este fato pode estar relacionado com a composição dos produtos, bem como com tipo de processamento e de embalagem utilizada para armazenagem (2 eram só um tipo de grão, 2 estavam em embalagem aluminizada, com várias camadas e a vácuo, e 2 eram mistura de grãos com frutas cristalizadas ou desidratadas as quais geralmente tem teor de umidade maior); (b) nas amostras comercializadas empacotadas com maiores contagem de bolores e leveduras ($> 10^5$ UFC/g), os conteúdos de umidade não eram altos, porém DP e DPR variaram muito. Este fato pode ser explicado pela composição das amostras que eram em 80 % misturas de grão com adição ou não de frutas e rações, além disso, algumas dessas amostras apresentavam infestação por insetos e odor característico de rancidez; (c) das 10 amostras comercializadas à granel 6 possuíam produto idêntico comercializado em embalagem lacrada, foi observado que destas 83,3 % apresentaram contagem maior se comparadas com as comercializadas fechadas. Isso ocorre, pois esta prática permite que os alimentos fiquem expostos as intempéries climáticas e modificações atmosféricas.

A presença de um conteúdo de umidade elevado pode colaborar com o decréscimo da qualidade do produto (p. ex. permite a proliferação de microorganismos e possivelmente contaminação por toxinas) e acarretar prejuízos a saúde animal. Este fato aliado a composição complexa (p. ex. grãos, substratos passíveis de contaminação) podem ser fatores

determinantes para a contaminação por fungos e micotoxinas.

Para Gonzáles, Martínez e Resnik (1997) os cereais presentes nos alimentos para animais de estimação são ótimos substratos para o crescimento de fungos. No Brasil, um estudo realizado por Campos et al. (2008), as contagens totais de bolores e leveduras em ingredientes para alimentos destinados a animais de companhia variaram de $1,3 \times 10^3$ a $1,5 \times 10^5$ CFU/g, sendo que o alimento com sorgo foi o que apresentou maior valor. Os autores observaram que os ingredientes avaliados continham contaminação por fungos maior que os alimentos prontos. Martins, Martins e Bernardo (2003), também verificaram, em seu estudo, que todas as amostras apresentavam baixos níveis de contaminação por fungos (10^1 a 10^2 CFU/g) se comparadas com cereais e ingredientes, porém nenhuma amostra apresentava contaminação acima de 10^4 CFU/g. Martins, Martins e Bernardo (2003) observaram que nos alimentos para cães a porcentagem da contaminação foi maior se comparado com as amostras de sementes para aves de companhia. Este fato pode ser explicado, pois os alimentos de animal de estimação prontos submetem-se a um processo de granulação durante sua elaboração o que diminui os esporos viáveis dos fungos. O processo de extrusão permite a diminuição das contagens microbiológicas, fato esse observado no presente estudo. Esta informação coincide com estudos que relataram uma diminuição significativa de contagens de fungos quando o processo de granulação foi realizado (CHELKOWSKI, 1991; DALCERO et al., 2002).

Identificação da microbiota: os principais gêneros de fungos filamentosos encontrados nas amostras foram: *Aspergillus* spp e *Cladosporium* spp; *Mucor* spp; *Penicillium* spp; *Rhizopus* spp; *Fusarium* spp; *Acremonium* spp e *Emeristela* spp, com 47,2; 38,9; 27,8; 22,2; 13,9; 5,6 e 2,8 %, respectivamente. A frequência de contaminação por colônias leveduriformes foi de 44,4 %. Os resultados encontrados neste estudo, para os principais gêneros de fungos filamentosos presentes em alimentos para aves de companhia são similares aos encontrados por outros autores como Abarca et al. (1994) Scudamore et al.(1997), Bueno, Silva e Oliver (2001), Martins, Martins e Bernardo (2003) e Campos et al. (2008).

Cabe ressaltar que a microbiota encontrada condiz com a composição dos alimentos para aves de companhia. Os dados da literatura destacam que *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Cladosporium*, *Rhizopus* e *Eurotium* são os principais gêneros fúngicos encontrados em rações e seus ingredientes (milho, amendoim, soja, arroz, sorgo, trigo e cevada) (SCUSSEL, 1998; SILVA, 2005).

Os principais gêneros fúngicos contaminantes de rações são *Penicillium*, *Aspergillus*

e *Fusarium*, para bovinos, suínos e aves domésticas (ABARCA et al., 1994). Para aves domésticas e aves selvagens (silvestres), Scudamore et al. (1997) identificaram como gêneros fúngicos *Penicillium*, *Eurotium* e *Aspergillus*. Dentre as espécies com maior prevalência em alimentos no gênero *Aspergillus*, apareceram *A. flavus*, *A. niger* e *A. terreus* e no gênero *Mucor* as principais espécies foram: *M. racemosus*, *M. plumbeus* e *M. globosus*. Além disso, Martins, Martins e Bernardo (2003) identificaram a micoflora em 20 amostras de alimentos para aves de companhia, sendo 10 para periquitos e 10 para catatuas. Os gêneros mais freqüentes foram *Aspergillus* (58,3 %), *Penicillium* e *Mucor* (38,3 %). A espécie de *Aspergillus* mais freqüente foi a de *A. niger* encontrada em 10,0 % para aves de companhia. No estudo realizado por Campos et al. (2008), o gênero *Aspergillus* foi predominante (65-89 %), seguido por *Penicillium* e *Fusarium* spp. O *Aspergillus flavus* foi a principal espécie identificada, seguida pelo *A. sydowii*, *A. fumigatus*, e *A. versicolor*. As freqüências de aparecimento de *A. flavus* variaram de 58% a 86%, exceto na refeição de sorgo.

No presente, estudo das 36 amostras avaliadas, apenas 4 (11,1 %) apresentaram crescimento para gênero *Fusarium*, este resultado corrobora com os encontrados por Campos et al. (2008), no qual apenas 11 % dos produtos finais destinados à animais de companhia apresentaram este fungo. Cabe salientar, que o gênero *Fusarium*, possui exigências de crescimento maiores quanto à umidade relativa, o conteúdo de umidade se comparado com os outros gêneros (SCUSSEL, 1998; SAMSON et al., 2002). Foi verificada, assim como em estudos precedentes, uma correlação entre o crescimento dos gêneros fúngicos e o conteúdo de umidade das amostras. Embora algumas amostras apresentassem conteúdo de umidade relativamente baixo, as espécies fúngicas identificadas podem apresentar risco para saúde dos animais de companhia. Todavia, ainda são poucos os relatos quanto à influência da micobiota em alimentos para animais de companhia, logo, novos estudos devem ser realizados para identificar o real risco desta contaminação na saúde destes animais.

Avaliação da micobiota toxigênica dos alimentos para pássaros: do total de amostras analisadas, 25 % apresentaram crescimento de estirpes toxigênicas de *Aspergillus*. As espécies identificadas foram: *A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. niger*, *A. ochraceus*, e a freqüência de aparecimento destas espécies foram de 13,9; 11,1; 5,6 e 5,6 %, respectivamente.

Das amostras comercializadas fechadas (26) e a granel (10), 26,9 e 20 % apresentaram estirpes toxigênicas de *Aspergillus*. Foi observado que as estirpes toxigênicas encontradas apareceram principalmente nas amostras com contagem de bolores e leveduras elevada ($> 10^5$ UFC/g) ou intermediária ($10^4 - 10^5$ UFC/g), com exceção de uma amostra de

mistura de grãos e ração extrusada/peletizada ($3,0 \times 10^3$ UFC/g).

Além disso, foi verificado que a composição destes produtos era majoritariamente formada de grãos de milho, semente de girassol, amendoim e ração em proporções que variavam de 2,1 – 18,8; 47,3 – 5,2; 2,4 – 25; 0 – 27,5 g/100 g, respectivamente. Apenas uma amostra era composta por um único tipo de cereal (alpiste) e outra de uma mistura de frutas desidratadas, cristalizadas e castanhas.

Quanto ao conteúdo de umidade das amostras que apresentaram contaminação por *Aspergillus* toxigênicos, foi observado que os valores encontrados de três produtos estavam acima do valor permitido pela legislação (< 12 %), porém foi observado que DP e DPR apresentados nas amostras restantes foram altos.

Os resultados encontrados corroboram com os estudos realizados por Magnoli et al. (1998) e Fraga et al. (2007), nos quais as estirpes aflatoxigênicas de *A. flavus* apareceram com baixa frequência, ou seja, 47 e 21,3 %, respectivamente, em rações para aves de produção. Porém, no estudo realizado por Campos et al. (2008), todos os ingredientes avaliados apresentaram estirpes aflatoxigênicas de *A. flavus* com frequência de 70-77 %. Já nos alimentos completos para animais de companhia a frequência foi menor com 57 %. Para Betina (1989), as principais espécies toxigênicas de *Aspergillus* são: *A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. nominus*, *A. fumigatus*, *A. versicolor* e *A. ochraceus*, presentes em cereais e grãos e vegetais. Dentre estas espécies *A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. nominus* e *A. ochraceus*, *A. carbonarius* e *A. niger*, são capazes de produzir AFLs e OTA, respectivamente (SCUSSEL, 1998; SAMSON et al., 2002, ACCENSI; ABARCA; CABANES, 2004; MAGNOLI et al., 2006).

Os estudos relacionados com a determinação do potencial toxigênico de fungos filamentosos em alimentos para animais de companhia são insuficientes. Além disso, de acordo com os autores supracitados, não existem levantamentos da produção de AFLs produzidas por estirpes isoladas de *A. flavus* presentes nesses produtos.

Cabe ressaltar que a identificação de espécies toxigênicas e sua relação com os tipos de ingredientes utilizados para produção de alimentos e rações é de suma importância. Uma vez que a determinação do risco da contaminação por micotoxinas pode ser relacionado com a presença estirpes toxigênicas. Porém, a presença desses fungos não indica a produção e/ou contaminação obrigatória desses produtos por micotoxinas, mas sim indicativos da sobrevivência de estirpes aflatoxigênicas e ocratoxigênicas ao processo da manufatura, (processo de extrusão e peletização), ou seja, indícios de risco potencial para saúde dos animais.

Micotoxinas: no presente estudo, todas as amostras apresentaram contaminação por AFLs, OTA, ZON ou FBs abaixo dos LOQs, ou seja, menores que 100; 100; 200; 250; 100; 80 ng.kg^{-1} e 5 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ para AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂, OTA, ZON e FB₁, respectivamente. Estes dados são corroborados com os obtidos por Scudamore et al. (1997) Maia e Pereira Bastos de Sequeira (2002), Martins, Martins e Bernardo (2003) e Campos et al. (2008), nos quais foram encontradas nenhuma ou baixas freqüências de contaminação por micotoxinas em amostras de alimentos completos secos (conteúdo de umidade < 12 %) para animais de estimação (pássaros).

Scudamore et al. (1997) analisaram 30 amostras de alimentos para aves de companhia, (15 domésticas e 15 silvestres). As toxinas analisadas foram AFB₁, OTA e FB₁. Das 30 amostras analisadas 23,3 % estavam contaminadas com alguma das toxinas, sendo que 2 dessas amostras apresentaram as maiores concentrações para AFB₁ e OTA, 370 e 7 $\mu\text{g.kg}^{-1}$, respectivamente. Estes resultados foram muitos semelhantes aos encontrados por Maia e Pereira Bastos de Sequeira (2002), os quais avaliaram 30 amostras de alimento para aves de companhia, comercializadas no Brasil, quanto à presença por AFLs, das quais 26,7 % estavam contaminadas. Embora a freqüência de toxinas fosse baixa, a concentração média encontrada para as amostras de alimentos para pássaros foi de 110 $\mu\text{g.kg}^{-1}$. Scudamore *et al.* (1997) e Maia e Pereira Bastos de Sequeira (2002) verificaram que as amostras que continham amendoins em sua composição foram as que apresentaram contaminação por AFLs. Conforme os autores, a grande freqüência de AFB₁ em alimentos para aves de companhia, espécie altamente suscetível aos efeitos tóxicos das AFLs, confirma a necessidade da reavaliação do uso do amendoim e/ou a adição de fungicidas ao alimento. Martins, Martins e Bernardo (2003) analisaram 20 amostras de alimentos para aves de companhia (10 papagaios e 10 canários), sendo que nenhuma apresentou contaminação por micotoxinas. No estudo de Campos et al. (2008), nenhuma das amostras de alimentos completos prontos apresentou contaminação por AFLs acima dos limites de quantificação, porém quando avaliados os ingredientes utilizados na fabricação destes produtos, a freqüência de contaminação foi alta. Para os grãos de milho, refeições de milho, sorgo e milho combinado com glúten a freqüência de contaminação foi 100, 100, 100 e 70 %, respectivamente.

Em contrapartida, Henke et al. (2001) Zwierzchoswski et al. (2004) e Scussel *et al.* (2006) encontraram em seus estudos elevada freqüência e níveis de contaminação em alimentos para animais de estimação.

Henke et al. (2001) coletaram 142 amostras de sementes para aves de companhia silvestres em diferentes regiões do Texas. As concentrações do somatório de AFLs nas

amostras variaram de não detectável a $2.780 \mu\text{g.kg}^{-1}$. Do total de amostras analisadas, 17 % (24) apresentavam concentrações acima de $100 \mu\text{g.kg}^{-1}$. Além disso, Zwierzchoswski *et al.* (2004) verificaram que 84,2 % das amostras analisadas de alimentos padrões e terapêuticos para cães estavam contaminadas com ZON. Em um estudo realizado por Scussel *et al.* (2006) foram avaliadas 19 amostras para alimentação para aves de companhia. As micotoxinas avaliadas foram: AFLs, OTA, ZON e FBs. Todos os alimentos para aves de companhia apresentaram contaminação por alguma toxina, a frequência de contaminação por cada toxina foi: 94,7; 78,9; 89,5 e 100 % e os níveis variaram entre 0,22 – 4,77; 0,36 – 9,04; 1,23 – 4,67 e 2,87 – $153 \mu\text{g.kg}^{-1}$, para AFB₁; AFB₂, AFG₁, AFG₂, respectivamente. Para OTA e ZON as frequências foram de 42,1 e 15,8 % e os níveis variaram entre 3,11 – 750 e 6,33 – $19,7 \mu\text{g.kg}^{-1}$, respectivamente.

Embora os níveis de toxinas não fossem quantificáveis, neste estudo foi observado que amendoim, milho, sementes de girassol, frutas desidratadas e cristalizadas estavam presentes na composição dos alimentos para aves de companhia em grande proporção, e que muitos dos ingredientes se encontravam danificados e infestados por insetos, fato estes que poderiam favorecer a proliferação de fungos e formação de micotoxinas. A contaminação por micotoxinas tem sido correlacionada com a complexa composição dos produtos destinados à alimentação de animais de companhia, por diversos autores. A presença de grãos e cereais, como milho, sorgo, soja, arroz, aveia, amendoim, sementes de girassol, produtos derivados de ovo e leite, entre outros, podem sugerir esta ocorrência (HENKE *et al.*, 2001; SCUSSEL *et al.*, 2006; CAMPOS *et al.*, 2008; SIMÃO *et al.*, 2009). Além disso, os diferentes tipos de comercialização, armazenamento, localização regional e clima (umidade relativa do ar) e conteúdo de umidade dos ingredientes e produtos acabados são fatores que podem influenciar na qualidade de rações (HENKE *et al.*, 2001; ZWIERZCHOSWSKI *et al.* 2004; CAMPOS *et al.*, 2008; SIMÃO *et al.*, 2009).

Tabela 2. Contagem total de bolores e leveduras, microbiota, espécies toxigênicas de *Aspergillus*, conteúdo de umidade e níveis de micotoxinas em amostras para aves de companhia

Amostra n.	Alimentos para aves de companhia																
	Fungos			Conteúdo de umidade						Micotoxinas (ng.kg ⁻¹)							
	Contagem total		Micobiota	Espécies toxigênicas de <i>Aspergillus</i>	Média (%)	Min ^a . (%)	Máx ^b . (%)	DP ^c	DPR ^d (%)	AFLs ^e					OTA ^f	FB ₁ ^g	ZON ^h
(10 ²) CFU/g	Log CFU/g	Gêneros								AFB ₁	AFB ₂	AFG ₁	AFG ₂	ΣAFLs			
Amostras empacotadas																	
1	400	4,60	<i>Acremonium Aspergillus Cladosporium</i>	<i>A. niger</i>	20,84	20,38	21,11	0,41	1,95	< 100	< 100	< 200	< 250	< 650	< 100	< 5000	< 80
2	60	3,78	Leveduras <i>Penicillium</i>	NC ⁱ	9,96	9,38	10,98	0,89	8,92	< 100	< 100	< 200	< 250	< 650	< 100	< 5000	< 80
3	35	3,54	<i>Aspergillus Cladosporium Mucor Rhizopus</i>	NC	11,63	11,45	11,76	0,16	1,41	< 100	< 100	< 200	< 250	< 650	< 100	< 5000	< 80
4	740	4,87	<i>Aspergillus Leveduras Mucor Rhizopus</i>	<i>A. ochraceus</i>	10,99	10,71	11,18	0,25	2,29	< 100	< 100	< 200	< 250	< 650	< 100	< 5000	< 80
5	25	3,40	<i>Acremonium Cladosporium Leveduras</i>	NC	9,44	9,13	9,79	0,33	3,53	< 100	< 100	< 200	< 250	< 650	< 100	< 5000	< 80
6	4,5	2,65	<i>Cladosporium Mucor</i>	NC	10,03	10,02	10,03	0,01	0,09	< 100	< 100	< 200	< 250	< 650	< 100	< 5000	< 80
7	50	3,70	Leveduras <i>Mucor</i>	NC	15,39	15,30	15,48	0,09	0,58	< 100	< 100	< 200	< 250	< 650	< 100	< 5000	< 80
8	400	4,60	<i>Aspergillus Cladosporium Leveduras</i>	<i>A. flavus</i>	11,28	11,00	11,79	0,45	3,96	< 100	< 100	< 200	< 250	< 650	< 100	< 5000	< 80
9	840	4,92	<i>Cladosporium Rhizopus</i>	NC	11,41	11,06	11,73	0,34	2,95	< 100	< 100	< 200	< 250	< 650	< 100	< 5000	< 80
10	170	4,22	<i>Aspergillus Fusarium</i>	NC	10,79	9,76	11,63	0,95	8,81	< 100	< 100	< 200	< 250	< 650	< 100	< 5000	< 80
11	1200	5,06	<i>Aspergillus (nigri)</i>	<i>A. flavus</i>	10,09	8,52	12,32	1,98	19,67	< 100	< 100	< 200	< 250	< 650	< 100	< 5000	< 80
				<i>A. parasiticus</i>													
12	30	3,48	<i>Aspergillus Leveduras Cladosporium</i>	<i>A. flavus</i>	11,76	11,20	12,17	0,50	4,25	< 100	< 100	< 200	< 250	< 650	< 100	< 5000	< 80
				<i>A. parasiticus</i>													
13	150	4,18	<i>Cladosporium Leveduras Penicillium</i>	NC	12,39	11,97	12,99	0,54	4,34	< 100	< 100	< 200	< 250	< 650	< 100	< 5000	< 80
14	180	4,24	<i>Cladosporium Leveduras Mucor</i>	NC	10,26	9,95	10,85	0,51	4,99	< 100	< 100	< 200	< 250	< 650	< 100	< 5000	< 80
15	6600	5,82	Leveduras <i>Emericella</i>	NC	10,66	10,32	10,86	0,30	2,77	< 100	< 100	< 200	< 250	< 650	< 100	< 5000	< 80
16	170	5,23	Leveduras <i>Penicillium</i>	NC	11,18	10,88	11,15	0,32	2,85	< 100	< 100	< 200	< 250	< 650	< 100	< 5000	< 80
18	1200	4,08	<i>Penicillium Aspergillus</i>	<i>A. ochraceus</i>	12,26	10,62	14,27	1,85	15,09	< 100	< 100	< 200	< 250	< 650	< 100	< 5000	< 80
20	130	3,48	<i>Mucor Leveduras</i>	NC	10,84	10,29	11,65	0,72	6,62	< 100	< 100	< 200	< 250	< 650	< 100	< 5000	< 80
22	3700	5,54	<i>Fusarium Rhizopus</i>	<i>A. parasiticus</i>	11,95	11,12	12,99	0,95	7,98	< 100	< 100	< 200	< 250	< 650	< 100	< 5000	< 80
24	35	5,48	<i>Penicillium Mucor</i>	NC	6,28	6,24	6,33	0,05	0,73	< 100	< 100	< 200	< 250	< 650	< 100	< 5000	< 80
26	11	4,04	<i>Cladosporium</i>	NC	11,58	12,61	12,88	0,19	1,62	< 100	< 100	< 200	< 250	< 650	< 100	< 5000	< 80
28	60	3,78	<i>Aspergillus Cladosporium Leveduras</i>	NC	9,09	8,95	9,23	0,14	1,59	< 100	< 100	< 200	< 250	< 650	< 100	< 5000	< 80
30	350	3,54	<i>Cladosporium Mucor Penicillium</i>	NC	13,05	13,26	13,55	0,21	1,58	< 100	< 100	< 200	< 250	< 650	< 100	< 5000	< 80
32	740	4,87	<i>Aspergillus Rhizopus Mucor</i>	NC	12,37	12,34	12,38	0,02	0,17	< 100	< 100	< 200	< 250	< 650	< 100	< 5000	< 80
34	25	3,40	<i>Aspergillus Cladosporium Leveduras</i>	NC	13,05	12,99	13,14	0,08	0,58	< 100	< 100	< 200	< 250	< 650	< 100	< 5000	< 80
36	1600	5,19	<i>Penicillium Fusarium Rhizopus Mucor</i>	NC	12,36	11,10	13,06	1,09	8,86	< 100	< 100	< 200	< 250	< 650	< 100	< 5000	< 80
Amostras à granel																	
17	4500	5,65	<i>Aspergillus</i>	<i>A. niger A. flavus</i>	10,67	9,17	12,27	1,55	14,54	< 100	< 100	< 200	< 250	< 650	< 100	< 5000	< 80
				<i>A. parasiticus</i>													
19	75	4,88	<i>Mucor Levedura</i>	NC	11,58	11,06	12,03	0,49	4,24	< 100	< 100	< 200	< 250	< 650	< 100	< 5000	< 80
21	160	4,20	Leveduras	NC	11,56	10,93	12,68	0,97	8,40	< 100	< 100	< 200	< 250	< 650	< 100	< 5000	< 80
23	600	5,78	<i>Aspergillus Cladosporium Mucor Penicillium</i>	NC	11,14	10,65	11,60	0,48	4,26	< 100	< 100	< 200	< 250	< 650	< 100	< 5000	< 80
25	250	5,40	<i>Cladosporium Aspergillus</i>	<i>A. flavus</i>	13,25	13,26	13,64	0,27	2,02	< 100	< 100	< 200	< 250	< 650	< 100	< 5000	< 80
27	840	4,92	<i>Aspergillus Cladosporium Mucor</i>	NC	12,99	12,85	13,14	0,15	1,15	< 100	< 100	< 200	< 250	< 650	< 100	< 5000	< 80
29	1200	5,06	<i>Aspergillus Cladosporium Leveduras</i>	NC	13,26	13,17	13,38	0,11	0,86	< 100	< 100	< 200	< 250	< 650	< 100	< 5000	< 80
31	1200	4,08	<i>Fusarium Penicillium Rhizopus</i>	NC	12,99	12,92	13,07	0,08	0,59	< 100	< 100	< 200	< 250	< 650	< 100	< 5000	< 80
33	130	3,48	<i>Aspergillus</i>	NC	10,43	10,39	10,49	0,05	0,48	< 100	< 100	< 200	< 250	< 650	< 100	< 5000	< 80
35	1600	5,19	<i>Penicillium Fusarium Rhizopus Mucor</i>	NC	13,65	12,38	14,53	1,12	8,23	< 100	< 100	< 200	< 250	< 650	< 100	< 5000	< 80

a = valor mínimo b = valor máximo c = Desvio Padrão d = Desvio Padrão Relativo e = Aflatoxinas f = Fumonisinhas g = Ocratoxina A h = Zearalenona LOD e LOQ foram: 34 e 100; 34 e 100; 67 e 200; 83 e 250; 34 e 100; 27 e 80 ng.kg⁻¹ e 1,7 e 5 µg.kg⁻¹ para AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂, OTA, ZON e FB₁, respectivamente

4.5 Conclusão

O conteúdo de umidade nos alimentos para aves de companhia é fator determinante para o crescimento de bolores e leveduras, inclusive das espécies toxigênicas. Além disso, os tipos e características dos ingredientes utilizados na manufatura dos produtos, as condições do clima, bem como as formas de processamento, armazenamento e comercialização podem afetar a qualidade higiênico-sanitária e toxicológica das amostras.

Embora tenha sido observada a presença de estirpes toxigênicas nas amostras analisadas, os níveis de contaminação por micotoxinas foram baixos, o que indica boa qualidade dos ingredientes utilizados na produção dos alimentos, bem como conteúdo de umidade das amostras estavam em níveis seguros para impedir a proliferação dos fungos e a contaminação por micotoxinas. Desta forma, as informações sobre a qualidade de ingredientes, microbiota, fungos toxigênicos, são importantes para determinar o risco de contaminação por micotoxinas em alimentos para animais de companhia.

Cabe ressaltar, que para prevenir as micotoxicoses nesses animais, é necessário observar alguns procedimentos importantes como: seleção de ingredientes (boa qualidade, baixo conteúdo de umidade) investir em processos de descontaminação, armazenagem segura e processamento que possam controlar os fatores que favorecem a contaminação (umidade, pH, bem como embalagem). Além disso, os ingredientes e produtos finais devem ser constantemente avaliados para garantir sua qualidade quanto a presença de micotoxinas.

4.6 Referências Bibliográficas

AAFCO. Association of American Feed Control Officials. **Feed Inspector's Manual**. 2 ed. AAFCO/Inspection and Sampling Committee, May 1, 2000.

ABARCA, M. L.; BRAGULAT, M. R.; CASTELLA, G.; CABANES, F. J. Mycoflora and Aflatoxin-Producing Strains in Animal Mixed Feeds. **Journal of Food Protection**, v. 57, n. 3, p. 256-258, 1994.

ACCENSI, F.; ABARCA, M. L.; CABANES, F. J. Occurrence of *Aspergillus* species in mixed feeds and component raw materials and their ability to produce ochratoxin A. **Food Microbiology**, v. 21, n. 5, p. 623-627, 2004.

ANDRIGUETTO, J. M.; PERLY, L.; MINARDI, I.; GEMAEL, A. **As bases e os fundamentos da nutrição animal**. 4. ed. São Paulo: Nobel, 1990.

AOAC. **Official Method of Analysis of AOAC**. Thiex, NJW ed, Animal Feed. Sampling of

Animal Feed & Moisture content. 18.ed. Maryland, 2005.

APHA. **Standard methods for the examination of water and wastewater.** 19. ed. New York: American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation, 1992.

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

BETINA, V. Aflatoxins, sterigmatocystins and versicolorins. In: BETINA, V. **Mycotoxins:chemical, biological and environmental aspects.** New York: Elsevier, 1989. p. 114-150.

BOERMANS, H. J.; LEUNG, M. C. Mycotoxins and the pet food industry: toxicological evidence and risk assessment. **Int J Food Microbiol**, v. 119, n. 1-2, p. 95-102, 2007.

BRASIL, 2003. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), Instrução Normativa n. 9 de 9 de julho de 2003. Aprova regulamento técnico sobre fixação de padrões de identidade e qualidade de alimentos completos para cães e gatos. Publicado no **Diário Oficial da União**, de 14/07/2003, seção I, p. 7.

BRITO, Cleusa Bernardete Marcon de. **Efeito de diferentes níveis de umidade com e sem utilização de antifúngico em dietas para cães.** 2009.51 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.

BUENO, D. J.; SILVA, J. O.; OLIVER, G. Fungal isolation and enumeration in foods. **Methods Mol Biol**, v. 268, n. p. 127-131, 2004.

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.; MAGNOLI, C. E.; ROSA, C. A. Mycobiota and aflatoxins in raw materials and pet food in Brazil. **J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)**, v. 92, n. 3, p. 377-383, 2008.

CHELKOWSKI, J. Mycological quality of mixed feeds and ingredients. In: CHELKOWSKI, J. (Ed). **Cereal grain, mycotoxins, fungi and quality in drying and storage.** Amsterdam: Elsevier, 1991. p. 217–227.

COULOMBE, R. A., JR.; WILSON, D. W.; HSIEH, D. P. Metabolism, DNA binding, and cytotoxicity of aflatoxin B1 in tracheal explants from Syrian hamster. **Toxicology**, v. 32, n. 2, p. 117-130, 1984.

DALCERO, A.; MAGNOLI, C.; HALLAK, C.; CHIACCHIERA, S. M.; PALACIO, G.; ROSA, C. A. Detection of ochratoxin A in animal feeds and capacity to produce this mycotoxin by *Aspergillus section Nigri* in Argentina. **Food Addit Contam**, v. 19, n. 11, p. 1065-1072, 2002.

DEVEGOWDA, G.; CASTALDO, D. Mycotoxins: hidden killers in pet foods. Is there a solution? In: Proceedings of the Technical Symposium on Mycotoxins. Nicholasville: Alltech Inc., 2000:

EC . EUROPEAN COMISSION. Commission Directive 2003/100/EC of 31 October 2003 amending annex to Directive 2002/32/EC of European Parliament and of the Council on undesirable substances in animal feed **Official Journal of the European Union**, 1 of Nov. of 2003. L 285 p. 33-37

EC. EUROPEAN COMISSION. Comission Recommendation 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. **Official Journal of the European Union**, 23 of Aug.of 2006. L 229 p. 7-9.

FAO . FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **Worldwide regulations for mycotoxins in food and feed in 2003**. FAO Food and Nutrition Paper 81. Roma, 2004. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/007/y5499e/y5499e00.htm#Contents>>. Acesso em: 2 ago. 2006.

FILTENBORG, O.; FRISVAD, J. C.; THRANE, U. Moulds in food spoilage. **Int J Food Microbiol**, v. 33, n. 1, p. 85-102, 1996.

FRAGA, M. E.; CURVELLO, F.; GATTI, M. J.; CAVAGLIERI, L. R.; DALCERO, A. M.; ROSA, C. A. D. Potential aflatoxin and ochratoxin a production by *Aspergillus* species in poultry feed processing. **Veterinary Research Communications**, v. 31, n. 3, p. 343-353, 2007.

GMP, 2007. **GMP+ Certification Scheme Animal Feed Sector 2006**. Appendix 1: Product standards (incl. Residue standards). Netherland: Product Board Animal Feed, version 15 May 2007. 37p.

GONZÁLEZ, H. H. L.; MARTINEZ, E. J.; RESNIK, S. L. Fungi associated with sorghum grain from Argentina. **Mycopathologia**, v. 139, n. 1, p. 35-41, 1997.

HENKE, S. E.; GALLARDO, V. C.; MARTINEZ, B.; BAILEY, R. Survey of aflatoxin concentrations in wild bird seed purchased in Texas. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 37, n. 4, p. 831-835, 2001.

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

KURTZMAN, C. P.; HORN, B. W.; HESSELTINE, C. W. *Aspergillus nomius*, a new aflatoxin-producing species related to *Aspergillus flavus* and *Aspergillus tamarii*. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 53, n. 3, p. 147-158, 1987.

LEUNG, M. C. K.; DIAZ-LLANO, G.; SMITH, T. K. Mycotoxins in pet food: A review on worldwide prevalence and preventative strategies. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 26, p. 9623-9635, 2006.

MACHIDA, S.; SAITO, M. A rapid identification method for aflatoxins-producing strains of

Aspergillus flavus and *A. parasiticus* by amomnia vapor. **Mycoscience**, v. 40, p. 205-208, 1999.

MAGAN, N.; ALDRED, D. Post-harvest control strategies: minimizing mycotoxins in the food chain. **Int J Food Microbiol**, v. 119, n. 1-2, p. 131-139, 2007.

MAGNOLI, C.; CHIACCHIERA, S. M.; MIAZZO, R.; PALACIO, G.; ANGELETTI, A.; HALLAK, C.; DALCERO, A. The mycoflora and toxicity of feedstuffs from a production plant in Córdoba, Argentina. **Mycotoxin Research**, v. 18, p. 8-22, 2002.

MAGNOLI, C.; DALCERO, A. M.; CHIACCHIERA, S. M.; MIAZZO, R.; SAENZ, M. A. Enumeration and identification of *Aspergillus* group and *Penicillium* species in poultry feeds from Argentina. **Mycopathologia**, v. 142, n. 1, p. 27-32, 1998.

MAGNOLI, C.; HALLAK, C.; ASTORECA, A.; PONSONE, L.; CHIACCHIERA, S.; DALCERO, A. M. Occurrence of ochratoxin A-producing fungi in commercial corn kernels in Argentina. **Mycopathologia**, v. 161, n. 1, p. 53-58, 2006.

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

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

NEWBERNE, P. M.; BUTLER, W. H. Acute and chronic effects of aflatoxin on the liver of domestic and laboratory animals: a review. **Cancer Res**, v. 29, n. 1, p. 236-250, 1969.

PITT, J. I.; HOCKING, A. D.; GLENN, D. R. An improved medium for the detection of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus*. **J Appl Bacteriol**, v. 54, n. 1, p. 109-114, 1983.

PITT, J. I.; HOCKING, A. D. **Fungi and food spoilage**. CSIRO, Division of Food Science and Technology, Sydney/Australia: Academic Press, 1997.

RAYMOND, S. L.; SMITH, T. K.; SWAMY, H. V. Effects of feeding a blend of grains naturally contaminated with *Fusarium* mycotoxins on feed intake, serum chemistry, and hematology of horses, and the efficacy of a polymeric glucomannan mycotoxin adsorbent. **J Anim Sci**, v. 81, n. 9, p. 2123-2130, 2003.

RAZZAZI, E.; BOHM, J.; GRAJEWSKI, J.; SZCZEPANIAK, K.; KUBBER-HEISS, A. J.; IBEN, C. H. Residues of ochratoxin A in pet foods, canine and feline kidneys. **J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)**, v. 85, n. 7-8, p. 212-216, 2001.

SAMSON, R. A.; HOCKSTRA, E. S.; FRISVAD, J. C.; FILTENBORG, O. Introduction to food and airborne fungi. Wageningen Press, The Netherlands: Centaalbureau Voorschimmelculturs-Utrecht Ponson & Looyen, 2002:

- SANTOS, E. J. dos; 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 **Ciênc. Agrotec.**, v. 24, n. 2, p. 425-433, abr./jun., 2000.
- SCOTT, P. M. Fumonisins. **Int J Food Microbiol**, v. 18, n. 4, p. 257-270, 1993.
- SCUDAMORE, K. A.; NAWAZ, S.; HETMANSKI, M. T. Mycotoxins in ingredients of animal feeding stuffs: II. Determination of mycotoxins in maize and maize products. **Food Addit Contam**, v. 15, n. 1, p. 30-55, 1998.
- SCUDAMORE, K. A.; HETMANSKI, M. T.; NAWAZ, S.; NAYLOR, J.; RAINBIRD, S. Determination of mycotoxins in pet foods sold for domestic pets and wild birds using linked-column immunoassay clean-up and HPLC. **Food Additives and Contaminants**, v. 14, n. 2, p. 175-186, 1997.
- SCUSSEL, V. M. **Micotoxinas em alimentos**. Florianópolis: Insular, 1998.
- SCUSSEL, V. M.; GIORDANO, B. N. E.; SIMAO, V.; da ROCHA, M. W.; dos REIS, L. F. C.; XAVIER, J. J. M. Mycotoxins evaluation in feed for pets using tandem liquid chromatography mass/mass. In: 9th INTERNATIONAL WORKING CONFERENCE ON STORED PRODUCT PROTECTION, 2006, Campinas. **Proceedings...** Campinas: ABRAPOS, 2006. v. 1. p. 182-188.
- SIMÃO, V.; BASSO, G.; MOECKE, E. H. S.; MANFIO, D.; SCUSSEL, V. M. Determinação do perfil de corantes e ingredientes e em rações para pássaros de estimação. In: XVI ENCONTRO NACIONAL DE ANALISTAS DE ALIMENTOS, 2009, Minas Gerais. **Anais...** Minas Gerais: SBAAL, 2009.
- SIMÃO, V.; SCUSSEL, V. M. Qualidade na produção de rações e ingredientes para pets. In: SCUSSEL, V. M.; da ROCHA, M. W.; LORINI, I.; SABINO, M.; ROSA, C. A. da R.; CARVAJAL, M. M. (Org.). **Atualidades em micotoxinas e armazenagem de grãos II**. Florianópolis: ABMAG, 2008, v. 1, p. 101-105.
- SILVA, L. C. **Fungos e micotoxinas em grãos armazenados**. Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, mar. 2005 Disponível em: <<http://www.agais.com/fungos.htm>>. Acesso em: 16 jul. 2006.
- SUÁREZ, O. Manejo de los granos en las fábricas de alimentos. **Industria Avícola**, v. 10, p. 18-21, 1999.
- XAVIER, J. J. M.; SCUSSEL, V. M. Development of an LC-MS/MS method for the determination of aflatoxin B1, B2, G1, and G2 in brazil nuts. **International Journal of Environmental Analytical Chemistry**, v. 23, p. 145-149, 2008.
- ZWIERZCHOWSKI, W.; GAJECKI, M.; OBREMSKI, K.; ZIELONKA, L.; BARANOWSKI, M. The occurrence of zearalenone and its derivatives in standard and therapeutic feeds for companion animals. **Pol J Vet Sci**, v. 7, n. 4, p. 289-293, 2004.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O mercado de alimentos para animais de companhia está em pleno desenvolvimento em todo o mundo, e devido a essa evolução os consumidores tem se mostrado cada vez mais exigentes. Desta forma, a cada dia novos produtos mais chamativos aparecem no mercado. Entretanto, foi verificado que o segmento voltado para aves de companhia não tem acompanhado o de cães e gatos, uma vez que os alimentos para essas espécies de animais ainda são artesanais, ou seja, baseados em grãos e suas misturas. Alguns grandes produtores já têm desenvolvido alimentos completos (processados) para esses animais, e foi verificada a adição de aditivos sensoriais (corantes artificiais) com alta frequência.

Porém em se tratando da adição de corantes artificiais e perfil dos ingredientes, foi observada uma grande variação entre os produtos, inclusive para animais da mesma espécie. Este fato permite considerar esses parâmetros como riscos potenciais para a saúde das aves de companhia quanto à qualidade nutricional e toxicológica dos alimentos.

Quanto mais complexa a formulação de um alimento maior a diversidade de nutrientes disponíveis, porém maior a possibilidade de contaminação tanto microbiológica como micotoxicológica. Muitos fatores podem favorecer o desenvolvimento de fungos e produção de micotoxinas em alimentos para aves de companhia. Apesar de alguns alimentos completos apresentarem conteúdo de umidade e contagem de bolores e leveduras acima dos padrões preconizados pela legislação e pelas normas de boas práticas de fabricação, as amostras encontravam-se seguras quanto os parâmetros micotoxicológicos.

Observou-se que ainda são poucos os estudos existentes que abordem a qualidade de alimentos para animais de companhia. Além disso, a legislação brasileira específica para estes produtos é muito recente (2009) e apresenta uma série de lacunas que não permitem uma avaliação mais rigorosa da qualidade e da segurança destes alimentos.

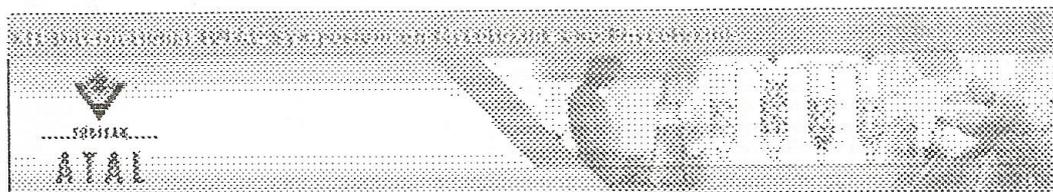
Com relação à comercialização de alimentos para aves de companhia à granel (fracionado), percebeu-se que esta prática pode colaborar com o decréscimo da qualidade dos produtos, portanto, pode ser considerada um problema para preservação da saúde dos animais.

Em função do impacto que podem causar na saúde dos animais de companhia, bem como os prejuízos econômicos (produtores) e emocionais (donos desses animais), o monitoramento da qualidade toxicológica e nutricional dos alimentos completos deve ser realizado frequentemente. Assim verificou-se que os resultados obtidos podem contribuir com futuros estudos e com a busca e manutenção da segurança dos alimentos destinados à animais de companhia.

APÊNDICE A – Trabalho apresentado no XII International Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins, Istanbul, Turquia, 2007

:::XII International IUPAC Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins:::

Página 1 de 9



- Home
- Invitation Letter
- Information
- Committees
- Programme
- Abstract
- Registration
- Sponsors
- Login
- Contact

Thu, Dec 1

SCIENTIFIC PROGRAMME

Oral Presentations

Monday, 21st May 2007

Tuesday, 22nd May 2007

Wednesday, 23rd May 2007

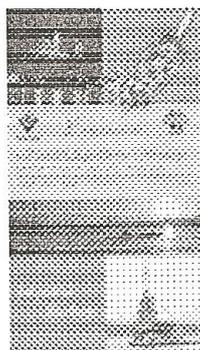
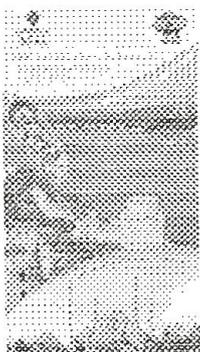
Thursday, 24th May 2007

Friday, 25th May 2007

Poster Presentations

Monday, 21st May 2007

Tuesday, 22nd May 2007



Session 2.1.	Paralytic Shellfish Poisoning (PSP)
1073 / Germany	Determination of PSP toxins (saxitoxins) - derivatization <i>Buck, C., Thielert, G.M.</i>
1197 / Spain	Interlaboratory exercises on paralytic shellfish poisoning toxins determination in the European Network of National Reference Laboratories of Marine Biotoxins. <i>Ben-Gigirey, B., Rodríguez-Velasco, M., Botana, L.M.</i>
1220 / Spain	Shellfish matrices do not interfere with psp toxin detection using an spr-based biosensor assay. BIO COP Poster. <i>Natalia Vilariño, Eva S. Fonfria, Katrina Campbell, Chris Elliot, Simon A. Haughey, Luis M. Botana</i>
1374 / Japan	Within-day variations in response of the mouse bioassay using both sexes of mice for routinely extracted paralytic shellfish poisoning toxins <i>Machii, K., Kawasaki, M.</i>

Session 2.2.	Amnesic Shellfish Poisoning(asp) And Other Marine Toxins
	Developmental toxicity of okadaic acid in zebrafish,

1357 / Brazil	Performance of an AOAC TLC method for aflatoxins using safer and environmental friendly solvents <i>Sirnao, V, Dos Reis, L.C.F, Da Rocha, M. W, Paludo, E., Xavier, J.J.M, Scussel, V.M.</i>
1365 / Brazil	Two interlaboratory control programs involving mycotoxin laboratories from coffee producing countries within two international projects: global FAO/ICO/CFC project GCP/INT/743/CFC enhancement of coffee quality through prevention of mould formation & the technical cooperation <i>Eliene A. Santos, Luciana De Castro, Regina Coeli A. França, Júlio César Garcia, Ana Lucia Lopes, Eugênia A. Vargas</i>
1366 / Brazil	Ten years of interlaboratory control for the Brazilian ministry of agriculture, livestock and supply (MAPA)'s mycotoxin licensed laboratories network <i>Luciana De Castro, Cristiane M. G. Silva, Eliene A. Santos, Regina Coeli A. França, Romana A. Souza, Ana Lucia Lopes, Patricia A. Martins, Eugenia A. Vargas</i>
1367 / Brazil	Interlaboratory control involving participant laboratories within the INCO-DEV MYCOTOX PROJECT 2003-2005 "the development of a food quality management system for the control of mycotoxins in cereal production and processing chains in Latin America, South Cone Countries <i>Luciana De Castro, Eliene A Santos., Regina Coeli A França, Jacqueline Cea, Mário V Herrera., Otaniel Freitas-Silva, Eugenia A Vargas</i>
1368 / Brazil	Evaluation of a flow-through rapid test kit for ochratoxin A kit in green coffee samples under the technical cooperation project between food and agriculture organization (FAO) and the ministry of agriculture, livestock and supply (MAPA) of Brazil <i>Eliene A. Santos, Ariane A. G. Soares, Pedro Prates, Eugenia A. Vargas</i>
1375 / Canada	Purification of Patulin from <i>Penicillium Expansum</i> Culture: High-speed Counter-current Chromatography Versus Preparative High Performance Liquid Chromatography <i>Jianwei He, Rong Tsao, Ting Zhou, Raymond Yang</i>
1376 / Turkey	Application of technical requirements of ISO/IEC 17025 In to a routine aflatoxin analysis laboratories <i>Omeroglu, Yolci P., Saner, S., Durmaz, G., Karadag, A.</i>
1391 / Brazil	Effect of time interval prior to drying step on natural fumonisin contamination in freshly harvested corn of the state of paran�, Brazil <i>Marcelo Da Silva, �dio Vizoni, Glauco T. Garcia, Fernando A. Frac�o, Plinio P.M. Uchoa Jr, Myrna Sabino, Joice Sifuentes Dos Santos, Osamu Kawamura, Elisa Y. Hirooka, Elisabete Y. S. Ono</i>
1392 / Brazil	Immunoassay for fusarium Sp. detection in corn <i>Paula G. Meirelles, Mario A. Ono, Eiko N. Itano, Osamu Kawamura, Myrna Sabino, Elisa Y. Hirooka, Elisabete Y. S. Ono</i>
1408 / Brazil	Immunochemical method for mycotoxin detection: production of immunoreagent with emphasis on ochratoxin for application in agri-food system <i>Silvone Fujii, Eiko N. Itano, Elisabete Y. Sataque Ono, Luciana Hayashi, Joice S. Santos, Ricardo Marcelo Reche Ribeiro, C�ssia L. Takabayashi, Maria Brigida Dos Santos Scholz, Ivone Mizubuti, Carlos Kemmelmeier, Myrna Sabino, Mario A. Ono, Tereza Cristina</i>
1416 / United Kingdom	Improved methods of analysis for T-2 and HT-2 in cereals using immunoaffinity columns <i>A. Pollock, E. Marley, C Donnelly</i>
1426 / Italy	Development of immunoaffinity columns for simultaneous analysis of aflatoxins, ochratoxin A, fumonisins, deoxynivalenol, zearalenone, T-2 and HT-2 toxins by liquid chromatography tandem mass spectrometry <i>Solfrizzo M., V.M.T. Lattanzio, S. Powers, A. Visconti</i>

<input checked="" type="checkbox"/>	Home	
<input checked="" type="checkbox"/>	Information	Abstract Details
<input checked="" type="checkbox"/>	Committees	Abstract No 1357
<input checked="" type="checkbox"/>	Programme	Title Performance of an AOAC TLC method for aflatoxins using safer and friendly solvents
<input checked="" type="checkbox"/>	Abstracts List	Authors Simão, V., Dos Reis, L.C.F, Da Rocha, M. W, Paludo, E., Xavier, J.J.I
<input checked="" type="checkbox"/>	List of Participants	Corresponding author name V.M. Scussel
<input checked="" type="checkbox"/>	Sponsors	Corresponding Author Address LABMICO, Food Science and Technology Department, Center of Agri Federal University of Santa Catarina, P.O. Box 476, Florianópolis - 8
<input checked="" type="checkbox"/>	Contact	Corresponding Author E-Mail vildescussel_2000@yahoo.co.uk
	Abstract	Several countries still use the TLC (thin layer chromatography) mel (AFIs) analysis recommended by the AOAC. Those methods require prior and during chromatography, most of them being toxic (benze The extent of technician's exposure to those solvents may lead to c Occupational safety and health agencies recommend threshold limi weighted average of airborne concentration (TLV/TWA) of solvents, exposure without adverse effects. Thus we evaluated the performa AOAC TIC method for AFIs (arts. 975.36 and 968.22) when modifi environmental friendly solvents. The evaluated steps were clean up dissolution and elution solvent system. Solvent studied: dichlorome toluene. AFL levels: 1 & 5 for AFB1 µg.kg-1 and 2; 4 & 20 µg.kg-1 (AFB1+AFB2+AFG1+AFG2), corresponding to MRIs of EU & Mercos Mercosur/USA/Brazil, respectively. The modified method presented not significant chromatography Rfs variation, and higher TLV/TWA. broader than when using the AOAC solvent system leading to a low reading. The recovery was 19% lower than the AOAC method. Desq improved with further adjustments. The most important is that the those three solvents (dichloromethane, toluene and acetone) for te (TLV/TWA) per workday was higher (50/174; 50/188 and 750/178 work environment than those of AOAC (10/32; 10/50, 750/1780 fo chloroform and acetone).
	Keywords	aflatoxins, AOAC method, modification, dichloromethane, acetone, toluene

APÊNDICE B – Resumo do trabalho “Avaliação da contaminação por micotoxinas em amendoim, milho, e soja no período de 2002 a 2007” apresentado no XV Congresso Brasileiro de Toxicologia, Búzios (RJ), 2007



Revista Brasileira de Toxicologia

ISSN 1415-2983

Brazilian Journal of Toxicology

Órgão Oficial da Sociedade Brasileira de Toxicologia



Sociedade
Brasileira de Toxicologia

Volume 20 - Suplemento nº 3 - novembro 2007

PO 211

AVALIAÇÃO DA CONTAMINAÇÃO POR MICOTOXINAS EM AMENDOIM, MILHO E SOJA NO PERÍODO DE 2002 A 2007.

SCUSSEL, V. M.1.; GIORDANO, B. N. E.1; SIMÃO, V. * 1; XAVIER, J. J. M.1; NONES, J.; ZANETTE, A. P. C.1; MANFIO, D.1 ; DOS REIS, L. F. C. 1; DA ROCHA, M. W. I. - 1 Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos/LABMICO, Florianópolis, SC, Brasil.

Micotoxinas são metabólitos secundários produzidos por certas espécies fúngicas que causam efeitos tóxicos quando ingeridas por humanos e animais. Os principais efeitos relacionados a ingestão de alimentos contaminados com micotoxinas são sintomas gastrintestinais, desnutrição, hepatotoxicidade, nefrotoxicidade, carcinogênese, mutagênese, podendo levar ao óbito. Este trabalho teve como objetivo avaliar os dados referentes à contaminação por fumonisinas (FB₁; FB₂), aflatoxinas (AFB₁; AFB₂; AFG₁; AFG₂), zearalenona (ZON) ocratoxina A (OTA) e esterigmatocistina (EST) em amostras de milho, soja e amendoim no período de 2002 a 2007 analisados no LABMICO/UFSC. A metodologia analítica utilizada para AFLs, OTA e EST foi a descrita no Association of Official Analytical Chemists (AOAC, 2005), utilizando cromatografia de camada delgada (CCD). Já para FBs o procedimento experimental envolveu a extração da toxina, limpeza do extrato utilizando colunas de fase sólida (SPE) e posterior quantificação com cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e detector de fluorescência (ex. 335 e em. 440 nm). O total de amostras analisadas / ano foi de 131, 128, 271, 331, 196 e 61 em 2002, 2003, 2004, 2005, 2006 e 2007, respectivamente. As amostras que mais apresentaram contaminação por alguma toxina foram: milho > amendoim > soja. Considerando AFLs, o produto que apresentou maior número de amostras contaminadas foi o amendoim, sendo que em 2002, 5 amostras (12,5%) apresentaram contaminação por esta micotoxina. Nos anos de 2005 e 2006, 4 (3 amendoim e 1 milho) e 8 (5 amendoim e 3 milho) amostras também estavam contaminadas sendo todas com níveis acima do limite permitido pela legislação brasileira (20 µg.Kg⁻¹ Σ de AFLs). Por outro lado, apenas uma amostra de soja de 2006 apresentou contaminação e estava abaixo deste limite. As amostras avaliadas nos anos de 2003, 2004 e 2007 não estavam contaminadas. Quanto a FBs, os produtos analisados foram milho e soja. No ano de 2003, das 3 amostras analisadas de soja todas estavam contaminadas. As amostras de milho apresentaram alta incidência de contaminação por FBs nos anos de 2002 a 2006 com 91,5; 93,8; 96,1; 80,6 e 78,9%, respectivamente. Apenas no ano de 2006 a contaminação por ZON foi verificada em 3 amostras de milho e uma de soja. Nenhuma amostra apresentou contaminação por OTA e EST. Estes resultados podem ser indicativos de que as condições climáticas, temperatura e umidade relativa do ar, não foram adequadas durante o cultivo e/ou armazenagem desses produtos, favorecendo a proliferação de fungos toxigênicos.

PO 212

AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE AGROTÓXICOS EM MORANGO COMERCIALIZADO NO BRASIL EM 2006.

PEIXOTO, T. M. G.; FRANKLIN, H. M. H.; DRUMMOND, A. L.; SILVA, V. R.; FARIA, V. H. F.; FRANCO, V. P.; FILIPPETTO, P.; DUARTE, K. A. S; SILVA, M. F; SOUZA, D. M.. Fundação Ezequiel Dias (Funed) Belo Horizonte/MG.

Poucos produtos têm uso autorizado no Brasil para controle de pragas em morango, porém esta cultura tem apresentado irregularidade com relação a resíduos de agrotóxicos, podendo ser fonte de agravos à saúde da população. Com o objetivo de verificar o grau de contaminação do morango in natura por agrotóxicos foram analisadas, em 2006, na Fundação Ezequiel Dias, 138 amostras coletadas pelas vigilâncias sanitárias de vários estados do Brasil, dando prosseguimento ao Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos - Para, coordenado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Anvisa. Foram utilizados um método específico para determinar ditiocarbamatos (conversão em dissulfeto de carbono com quantificação espectrofotométrica) e um de multi-resíduos (General Inspectorate for Health Protection, Analytical Methods for Pesticides Residues in Foodstuffs) com determinação por cromatografia gasosa, detectores de captura de elétrons, fotométrico de chama, nitrogênio fósforo e seletivo de massa e por cromatografia líquida com detectores de fluorescência e de UV/Visível possibilitando a análise de 95 princípios ativos. Das 138 amostras analisadas, 130 (94%) apresentaram resíduos, sendo 72 (52%) com resultados insatisfatórios. Entre estas 55 (40%) foram insatisfatórias devido à presença de produtos não autorizados, 6 (4%) por apresentarem resíduos acima do limite máximo permitido e 11 (8%) apresentaram as duas irregularidades simultaneamente. Os agrotóxicos não autorizados detectados com maior frequência foram captana, endossulfam, metamidofós, procloraz e tetradifona. Entre os autorizados, os ditiocarbamatos foram os únicos que apresentaram resíduos acima do limite máximo permitido. Os resultados das análises de morangos coletados em 2006 foram semelhantes aos encontrados em 2002, 2003 e 2004, cujo monitoramento foi realizado por outros laboratórios participantes do Programa Para, mostrando que não houve uma diminuição da contaminação por agrotóxicos nesta cultura. Isto evidencia a importância de realizar um trabalho mais eficaz de conscientização de produtores e comerciantes quanto ao uso correto de agrotóxicos e manter o monitoramento para se ofertar à população produtos de melhor qualidade, visando a proteção da saúde e do meio ambiente.

APOIO FINANCEIRO: Anvisa.

COLABORAÇÃO: Vigilâncias Sanitárias Estaduais

APÊNDICE C – Certificado da apresentação do trabalho “Avaliação da contaminação por micotoxinas em amendoim, milho, e soja no período de 2002 a 2007” apresentado no XV Congresso Brasileiro de Toxicologia, Búzios (RJ), 2007



APÊNDICE D - Certificado de participação no XV Congresso Brasileiro de Toxicologia, Búzios (RJ), 2007

**APÊNDICE E - Certificado de participação como palestrante do Workshop em qualidade e segurança de rações para animais de estimação –
PETFOOD SAFE'2007, Florianópolis (SC), 2007**



Universidade Federal de Santa Catarina
Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos
Laboratório de Micotoxilogia - LABMICO
Associação Brasileira de Micotoxilogia e Armazenagem Qualitativa de Grãos

ABMAG

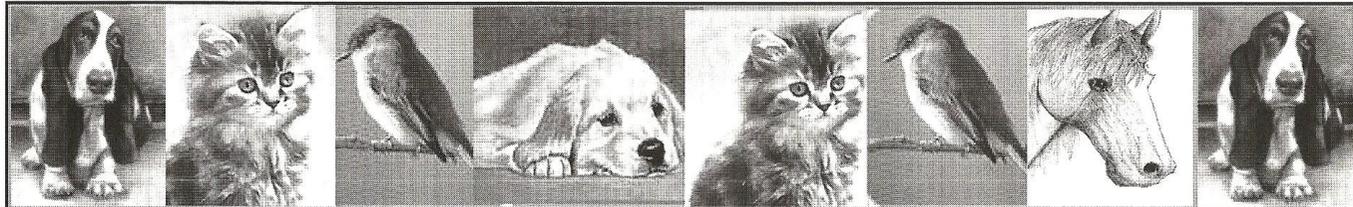


CERTIFICADO

Conferido à *Vanessa Simão*
por ter participado do **WORKSHOP EM QUALIDADE E SEGURANÇA DE
RAÇÕES PARA ANIMAIS DE ESTIMAÇÃO - PETFOOD SAFE'2007** realizado
em 3 e 4 de Dezembro de 2007 na cidade de Florianópolis, estado de Santa Catarina como
PALESTRANTE - "Qualidade de rações e seus ingredientes."

Profª Vildes M. Scussel

Presidente do **PETFOOD SAFE'2007** e **ABMAG**



APÊNDICE F - Certificado de participação como membro do comitê administrativo e de apoio do Workshop em qualidade e segurança de rações para animais de estimação – PETFOOD SAFE'2007, Florianópolis (SC), 2007



Universidade Federal de Santa Catarina
 Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos
 Laboratório de Micotoxicologia - LABMICO
 Associação Brasileira de Micotoxicologia e Armazenagem Qualitativa de Grãos

ABMAG

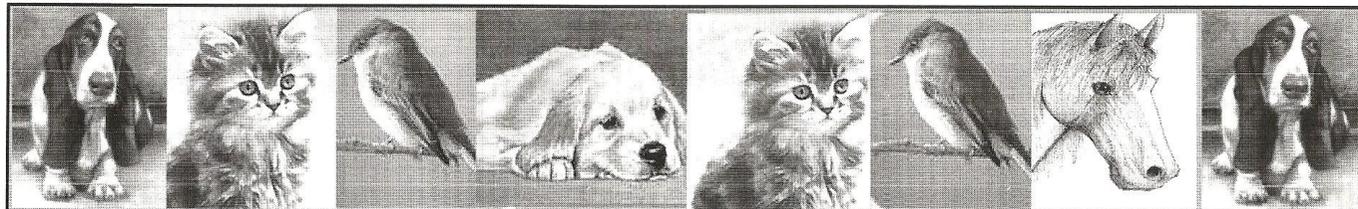


CERTIFICADO

Conferido à *Vanessa Simão*
 por ter participado do **WORKSHOP EM QUALIDADE E SEGURANÇA DE RAÇÕES PARA ANIMAIS DE ESTIMAÇÃO - PETFOOD SAFE'2007** realizado em 3 e 4 de Dezembro de 2007 na cidade de Florianópolis, estado de Santa Catarina como
Comitê Administrativo e de Apoio - Membro.....

Profª Vildes M. Scussel

Presidente do **PETFOOD SAFE'2007 e ABMAG**



APÊNDICE G - Certificado de participação como membro do comitê científico do Workshop em qualidade e segurança de rações para animais de estimação – PETFOOD SAFE'2007, Florianópolis (SC), 2007



Universidade Federal de Santa Catarina
 Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos
 Laboratório de Micotoxicologia - LABMICO
 Associação Brasileira de Micotoxicologia e Armazenagem Qualitativa de Grãos

ABMAG



CERTIFICADO

Conferido à *Vanessa Simão*
 por ter participado do **WORKSHOP EM QUALIDADE E SEGURANÇA DE RAÇÕES PARA ANIMAIS DE ESTIMAÇÃO - PETFOOD SAFE'2007** realizado em 3 e 4 de Dezembro de 2007 na cidade de Florianópolis, estado de Santa Catarina como
Comitê Científico...Membro.....

Profª Vildes M. Scussel

Presidente do **PETFOOD SAFE'2007** e **ABMAG**



APÊNDICE H – Artigo “Effect of ozone gás on Brazil Nut (*Bertholletia excelsa* H. B. K.): mycoflora and aflatoxin reduction” apresentado no CAF 2008, Controlled Atmosphere and Fumigation – Green, Safe, Harmony and Development, Chengdu, China, 2008

**Proceedings of the 8th
International Conference
on Controlled Atmosphere
and Fumigation in Stored Products**



**CONTROLLED ATMOSPHERE AND FUMIGATION
– GREEN, SAFE, HARMONY AND DEVELOPMENT
CHENGDU, CHINA SEPTEMBER 21–26**

Edited by:

**Guo Daolin, Shlomo Navarro, Yang Jian, Tao Cheng,
Jin Zuxun, Li Yue, Liu Yang and Wang Haipeng**

**SICHUAN PUBLISHING GROUP
SICHUAN PUBLISHING HOUSE
OF SCIENCE & TECHNOLOGY**

0307

Effect of Ozone Gas on Brazil Nut (*Bertholletia excelsa* H. B. K.) Mycoflora and Aflatoxin Reduction

Giordano, B. N. E., Simão, V. and Scussel, V. M. *

Abstract: Raw Brazil nuts grow and are harvested in the wild of the Amazon forest. At post-harvest they are submitted to two storage stages prior to their drying process. The first storage is in the forest (on pallets) and the second in cities near the Amazon River or its tributaries to be subsequently sent to the factories by boat. They are kept in wooden silos inside suspended stalls to keep them away from the environment. Despite of that, the relative forest humidity and temperature are high and suitable to fungi proliferation. The main biological factor that can affect in-shell nuts' quality during storage is fungi (deteriorating and aflatoxigenic strains) apart from forest termites. This work reports on an evaluation of ozone (O_3) gas influence on Brazil nut fungi load and its effect on aflatoxins (AFLs). Groups of in-shell Brazil nuts (14kg) from the year 2006 harvest, AFL contaminated with 5.62 (g/kg, collected in the Brazilian Amazon were submitted to O_3 treatment at different concentrations and conditions. After the gas exposure period, nuts were submitted to mycology tests, moisture and AFL analysis. Total fungi count was carried out utilizing malt extract agar and the aflatoxigenic fungi identification with *A. flavus* and *Parasiticus* agar. The nuts' moisture was determined by gravimetry and AFB₁ by high performance liquid chromatography with fluorescence-detection. As expected, the mycological tests showed that O_3 treatment affected mycoflora growth, lowering their cfu/g count and so the moisture content (from 8.2% to 5.6%). The O_3 treatment applied within 5 hours at 31 mg/L was able to successfully destroy nuts' fungi contamination (initial cfu/g: 40×10^4). Fungi reduction just after harvesting by applying O_3 will certainly reduce the possibility of further fungi proliferation and so AFL formation. From a food quality and safety point of view, prevention is a better strategy than detoxification which is much more complicated and so are the implications towards human and animal health.

Key words: Brazil nut, ozone, post-harvest, mycoflora, aflatoxin

Introduction

Brazil nut (*Bertholletia excelsa* Humb. and Bonpl.) is native to the Amazon forests of South America and represents some of the oldest living tree species on earth. Many of these trees date back more than 1 100 years^[12]. Harvesting of Brazil nuts, a major non-timber forest product, not only helps in preserving the Amazon rainforest but also creates an economy on which thousands of local people depend^[3,25,26]. Brazil nut is widely recognized as the cornerstone species of the Amazonian extractive economy, and is the only internationally traded nut collected almost entirely from natural populations in mature forest^[7,24]. The occurrence of aflatoxins (AFLs) produced by *Aspergillus flavus* Link, in Brazil nuts has been confirmed in several studies^[6,36,15,5,25]. In many instances, the presence of the mycotoxins were detected on the surface of shelled nuts exhibiting visible mold growth and/or inside shriveled, cracked, or brown spot-

ted nuts^[15,8].

Several environmental factors are known to influence AFL production, but temperature and relative humidity (r. h.) are considered to be the most critical. Studies performed on hazelnuts and pistachios suggested that optimum temperature and r. h. for AFL production is 25°C to 30°C and 97% to 99%, respectively^[9,10,34,22,35]. Additional factors such as water activity, moisture content, substrate composition^[31], storage time, insect damage^[18,33], and presence of a shell^[4] also influence fungal growth and AFLs production. It is also important to recognize, however, that the interaction of all these factors may provide for varying results in regards to fungal growth and mycotoxin production even on identical substrates. The presence of AFLs is a serious concern for exporters of Brazil nuts especially since 1998, when the European Community decreased the maximum tolerance limit of total and B1 AFLs to 4 and 2 ng/g, respectively^[11]. Moreover,

*Food Science and Technology Department, Center of Agricultural Sciences, Federal University of Santa Catarina, P. O. Box 476, Florianopolis SC, CEP 88034-001, Brazil, vildescussel_2000@yahoo.co.uk

APÊNDICE I – Resumo expandido do trabalho “Determinação do perfil de corantes e ingredientes em rações para pássaros de estimação” apresentado no XVII Encontro Nacional e II Congresso Latinoamericano de Analistas de Alimentos, Belo Horizonte (MG) 2009

DETERMINAÇÃO DO PERFIL DE CORANTES E INGREDIENTES EM RAÇÕES PARA PÁSSAROS DE ESTIMAÇÃO

*SIMÃO¹, V.; BASSO², G.; MANFIO¹, D.; MOECKE³, E. H. S.; SCUSSEL⁴, V. M.

¹Mestranda do curso de pós-graduação em Ciência dos Alimentos CAL/CCA da Universidade Federal de Santa Catarina.

Endereço: Rod. Admar Gonzaga 1346, Florianópolis-SC CEP 56.314-520. ²Graduanda do Curso de Farmácia – UFSC ³ Ph.D

Coordenadora do Laboratório de Microscopia NUMIC/CAL ⁴Ph.D - Professora titular do curso de Graduação e Pós-graduação da UFSC

*Autor para correspondência – nessesimao@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

Animais de estimação (*pets*) são das espécies criadas e mantidas pelo homem para seu entretenimento, sem propósito de fornecimento de produtos ou subprodutos de interesse econômico (BRASIL, 2009). Dentre os principais animais de companhia destacam-se: cães, gatos, pássaros e peixes ornamentais. A qualidade dos produtos para a alimentação desses animais (*pet food*) deve ser investigada, uma vez que se tem observado um aumento significativo do número destes animais e da produção de rações voltadas a esse mercado (SIMÃO e SCUSSEL, 2008; SCUSSEL et al., 2006). Logo, os órgãos reguladores preocupam-se em garantir aos consumidores a qualidade destes produtos, inclusive a presença de agrotóxicos e aflatoxinas (AFLs). Investigações quanto às características apresentadas pelos fabricantes na rotulagem e o encontrado no produto acabado são de grande importância. No caso dos pássaros de estimação, a complexa formulação de suas rações possibilita a ocorrência de erros na rotulagem e na própria formulação, inclusive na adição indiscriminada de corantes artificiais, os quais podem levar a problemas nos animais (rins, fígado, pulmões, pele) e propiciando a contaminação dessas rações (BOERMANS e LEUNG, 2007; SIMÃO e SCUSSEL, 2008). Cabe ressaltar, a importância dos ingredientes, o processamento e a manipulação dessas rações, enfatizando que as informações descritas pelos fabricantes nos rótulos devem corroborar com o conteúdo real contido na embalagem.

2. OBJETIVOS

Determinar o perfil de corantes artificiais adicionados em rações destinadas para *pets* - pássaros, verificar a composição desses produtos *versus* o declarado na rotulagem, bem como avaliar o possível risco de contaminação com micotoxinas de acordo com os tipos de ingredientes.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Amostras e Coleta: rações para aves de estimação (papagaio, trinca-ferro, pássaro preto, sabiá, calopsita, curió, entre outros) de diversas marcas. Foram coletadas 20 amostras,

APÊNDICE J – Certificado da apresentação do trabalho “Determinação do perfil de corantes e ingredientes em rações para pássaros de estimação” apresentado no XVII Encontro Nacional e II Congresso Latinoamericano de Analistas de Alimentos, Belo Horizonte (MG) 2009



Certificado

Certificamos que o trabalho

Determinação do perfil de corantes e ingredientes em rações para pássaros de estimação

de autoria de Simão, V.; Basso, G.; Manfio, D.; Moecke, E. H. S.; Scussel, V. M.

foi apresentado no

XVI Encontro Nacional e II Congresso Latino-americano de Analistas de Alimentos

Belo Horizonte, 23 de Julho de 2009


Deise Aparecida Pinati Marsiglea
Presidente da SBAAL


Rita Maria Lopes Portocarrero Naveira
Presidente do ENAAL

PROMOÇÃO



REALIZAÇÃO



APÊNDICE K - Certificado da apresentação do trabalho “Estudo do efeito do ozônio sobre a qualidade de castanha-do-Brasil sem casca embalada à vácuo” apresentado no XVII Encontro Nacional e II Congresso Latinoamericano de Analistas de Alimentos, Belo Horizonte (MG) 2009



Certificado

Certificamos que o trabalho

Estudo do efeito do ozônio sobre a qualidade de castanha-do-Brasil sem casca embalada a vácuo.

de autoria de Tanello, A. C.; Scussel, V. M.; Simão, V.; Manfio, D.

XVI Encontro Nacional e II Congresso Latino-americano de Analistas de Alimentos

Belo Horizonte, 23 de Julho de 2009


Deise Aparecida Pinati Marsiglea
Presidente da SBAAL


Rita Maria Lopes Portocarrero Naveira
Presidente do ENAAL

PROMOÇÃO



REALIZAÇÃO



APÊNDICE L - Certificado de participação no XVII Encontro Nacional e II Congresso Latinoamericano de Analistas de Alimentos, Belo Horizonte (MG) 2009



APÊNDICE M - Resumo expandido do trabalho “Estudo do efeito do ozônio sobre a qualidade de castanha-do-Brasil sem casca embalada à vácuo” apresentado no XVII Encontro Nacional e II Congresso Latinoamericano de Analistas de Alimentos, Belo Horizonte (MG) 2009

ESTUDO DO EFEITO DO OZÔNIO SOBRE A QUALIDADE DE CASTANHA-DO-BRASIL SEM CASCA EMBALADA A VÁCUO

*TANELLO¹, A. C.; SCUSSEL², V. M.; SIMÃO¹, V.; MANFIO¹, D.

¹Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos - PGCAL/UFSC-Laboratório de Micotoxinas e Contaminantes Alimentares-LABMICO.

²Professora e Coordenadora do Laboratório de Micotoxinas e Contaminantes Alimentares-LABMICO/UFSC. Endereço: Rodovia Admar Gonzaga, Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Florianópolis- SC. CEP: 88040-900.

*Autor para correspondência – aninhatanello@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A castanha-do-Brasil é natural da Amazônia e pode ser contaminada por fungos e aflatoxinas (AFLs). As espécies aflatoxigênicas que podem crescer nas castanhas são: *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* e *A. nomius* (OLSEN *et al.*, 2008) e estão diretamente relacionadas com condições climáticas da floresta, armazenagem/comercialização como: umidade, temperaturas elevadas e ambientes ricos em oxigênio (O₂) (MCKENZIE *et al.*, 1998; PACHECO & SCUSSEL, 2006). O uso de atmosferas modificadas na armazenagem/embalagens tem como objetivo reduzir a concentração de O₂ pela adição de um gás inibitório como o ozônio (O₃), reduzindo a taxa de respiração e crescimento de microrganismos. O O₃ é um agente desinfetante e oxidante, que se decompõe rapidamente e não tem caráter tóxico (MCKENZIE *et al.*, 1998).

2. OBJETIVO

O objetivo deste estudo foi avaliar a influência do O₃ e do vácuo durante armazenagem da castanha-do-Brasil sem casca e relacionar sua influência na proliferação fúngica e redução no conteúdo de aflatoxinas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 1,7 Kg de castanhas-do-Brasil sem casca. As castanhas foram divididas em dois grupos: Grupo I- (sem contaminação artificial) e Grupo II com contaminação artificial: concentração de 15 ppb com mistura das 4 toxinas (AFB₁, AFB₂, AFG₁ e AFG₂). Os grupos foram divididos em porções de 100 g, e aplicadas 2 concentrações de O₃: Tratamento 1 (3,08 ppm de O₃) e Tratamento 2 (11,14 ppm), embalados a vácuo e armazenadas por 2 meses. Ao final de cada mês foram realizadas análises do Conteúdo de Umidade (CU) (AOAC, art. 925.40), Contagem Total de Bolores e Leveduras - plaqueamento em superfície em Meio MEA (Meio Extrato de Malte) de acordo com Pitt *et al.*, (1983) e determinação do conteúdo de AFLs (Cromatografia de Camada Delgada-AOAC art. 698.22) para o Grupo I. As adicionadas de AFL (Grupo II) foram analisadas somente no final da armazenagem.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com a aplicação do O₃ e a armazenagem, foi observado (Figura 1) uma diminuição no crescimento fúngico e uma melhor eficácia na concentração de 11,14 ppm de O₃, o qual reduziu a contaminação das castanhas de 1,0 x 10⁴ UFC/g a níveis de 2,0 x 10² UFC/g. A mesma concentração também eliminou leveduras que estavam presentes no grupo controle, já no primeiro mês de armazenagem.

As castanhas apresentaram redução no CU durante o período de armazenagem quando tratadas com O₃ (3,08 ppm-1,33% e 11,14 ppm-3,01%). A menor quantidade de fungos foi encontrada nas embalagens submetidas a 11,14 ppm de O₃.

Em nenhuma das amostras de castanhas foram detectados níveis de AFLs até o limite de detecção - quantificação do método utilizado. Nas amostras adicionadas AFLs o O₃ foi capaz de reduzir a quantidade da toxina, com redução da fluorescência das AFLs, nas castanhas tratadas com 11,14 e 3,08 ppm de O₃ quando comparadas com o grupo Controle (Tabela 1). Apesar da Legislação Brasileira não possuir legislação específica para castanhas, as quantidades encontradas estavam abaixo dos limites estipulados para outros alimentos (como amendoim e milho) onde o limite é de 20 ppb para o somatório de AFLs (BRASIL, 2002).

APÊNDICE N - Resumo do trabalho "Evaluation of ozone treatment and vaccum for in-shell Brazil nuts shipment and aflatoxin reduction" apresentado no ISM Conference 2009, Tulln. Worldwide Mycotoxin Reduction In Food and Feed Chains.

179

Evaluation of Ozone treatment and Vaccum for In-shell Brazil nuts Shipment and Aflatoxin Reduction

Bárbara Nantua Evangelista Giordano^a, Daniel Manfio^a, Vanessa Simao^a, Vildes Maria Scussel^a

^a Food Science and Technology Department, Center of Agricultural Sciences, Federal University of Santa Catarina, P.O. Box 476, Rod Admar Gonzaga 1346, Itacorubi, Florianopolis – SC, CEP 88034-001, Brazil - e-mail: vildescussel_2000@yahoo.co.uk

Fungi and aflatoxins can develop in/on in-shell Brazil nuts and methods for their prevention and reduction need to be developed. Ozone (O₃) is a gas suitable for use in storage of grains for fungi control. It is also indicated for other foods as it leaves no residue due to fast decomposition. Some papers have reported aflatoxin degradation by O₃. Therefore, a study utilizing O₃ and vacuum packaging was carried out, to find out their behavior on in-shell Brazil nuts fungi and aflatoxin degradation. It was also evaluated the effect of that treatment on nuts lipid stability and consumers acceptance after 60 days of application. In-shell Brazil nuts were O₃ treated (at 31.5 mg/L, 5h), vacuum packaged in low oxygen permeability polyethylene bags, heat sealed and stored for a period of 60 days (Group I). Two Groups of nuts were kept as Controls: without O₃ treatment but with vacuum (Group II) and no O₃ and no vacuum at all (Group III). The nuts initial fungi load: was 6.9 x 10⁴ cfu/g, moisture content: 9.37% and aflatoxins: 11.58 µg/kg. Any fungi load change (on MEA media) *Aspergillus flavus* and *parasiticus* (on AFPA media) growth/inhibition, aflatoxin presence (analyzed either in-shell and after shelling by LC/FD), lipid oxidation (TBA test) and nut acceptance/rejection by sensory evaluation (attributes: nut shell and edible part appearance, strange odor, residual taste, rancidity and firmness) were registered. Right after O₃ treatment no fungi (cfu) neither toxigenic species (*parasiticus* and/or *flavus*) of *Aspergillus* were detected on/in the nuts. Also no yeast growth was observed. The same persisted after 30 and 60 days of storage. Different behavior was observed in the Control Groups (with and without vacuum) that kept similar fungi count as the beginning of the experiment (slightly lower) probably due to lack of oxygen (micro-atmosphere) – Group II. That Control Group presented 9.8 x 10⁴ cfu at the end of the storage. On the other hand, as expected for Group III, fungi load increased quite high. With the exposure of O₃, aflatoxins were not detected neither in the 30th or 60th Day of storage up to the LOQ of the method 0.25; 0.08; 0.25 and 0.08 µg/kg. That contamination could be either due to fungi growth or to the heterogeneity of the original nut contamination. The sensory evaluation showed that nuts were still palatable and were accepted by the panelist groups, as no significant changes (p<0.05) were found between nut sensory attributes. As far as the oxidation or rancidity of lipids (TBA test) in the Brazil nuts O₃ treated and vacuum packaged are concerned the values of malonaldehyde were constant throughout the storage period. This method can be a safer alternative for shipping batches of Brazil nut (in-shell) abroad. It can prevent and control fungi and aflatoxins, at the same time, it maintains nut sensory acceptance. Trips to foreigner countries can be long reaching 3 to 4 weeks thus keeping nuts safer/stable during the journey. A study on packaging material will be a future work to be carried out.

APÊNDICE O - Resumo expandido do trabalho “Dogs and cats pathologies mycotoxin related: a survey” apresentado no congresso Myco & Phycotoxins 2010, Mérida, México, 2010

DOGS AND CATS PATHOLOGIES MYCOTOXIN RELATED - A SURVEY

Karina Koerich de Souza, Vanessa Simão, Vildes Maria Scussel*.

Laboratory of Mycotoxicology and Food Contaminants - LABMICO, Food Science and Technology Department, Center of Agricultural Sciences, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brazil www.labmico.ufsc.br.
Tel: +55 48-3721-5386, vildescussel_2000@yahoo.co.uk

Background: Several pathologies affect pets. Some factors responsible for these pathologies and the increasing incidence of neoplasias are animal genetic predisposition, physical (radiation) and chemical intoxication (pharmaceuticals, heavy metals, pesticides), environmental (manners of breeding, stress, pollution) conditions and diet quality (unbalanced composition, lack of nutrients, mycotoxins contamination) and can be currently found in the everyday's life of these animals (Withrow, 2007). Among the factors related to diet, the mycotoxin contamination can play an important role on pets health, especially if the commercial feed has low quality ingredients and/or lack of storage quality (either, in the pet shops or in the animal owners homes) (Maia and Siqueira, 2002). Despite of the massive data reported in animals for meat industry, there is a lack of information on toxicity of mycotoxins or other contaminants for pets and their related pathologies. Due to the increasing of the pet food market, there is an urgent need of information on these pathologies and their relation to feed quality for pets, especially to find out the real factors, how to sort the problem and improve pet food safety.

Aim: The aim of this study was to evaluate the incidence of pathologies that affect dogs and cats in southern Brazil and their correlation with predisposing factors such as type of feeding, manners of breeding and living environment that they are exposed. The types of pathologies were selected according to their target-organs and systems affected when the possible contaminant (mycotoxins) is present in their diet.

Materials and Methods: Therefore, a survey was carried out in the Veterinary Clinics of the Santa Catarina State in the year 2009 on the following pathologies mycotoxin related: hepatic (aflatoxins and citrinin; ochratoxin A – secondary target-organ), reproductive (zearalenone), circulatory (trichothecenes), nervous (fumonisins), renal (ochratoxin A, citrinin) and the neoplasias (chronic mycotoxicosis). Eighty six casebooks were investigated for the type of pathologies affecting the animals, type of feeding, breeding environment and any other adverse condition registered that could may cause/lead to the illness.

Results and discussion: casebooks from the total cases investigated, 67 (78%) and 19 (22%) were of dogs and cats, and 45 (52%) and 41 (48%) of females and males, respectively. Among the pathologies, the major casuistic was of (a) hepatic portal system (28 cases/32%) with hepatic failure and hepatitis (21 and 7 cases, 75 and 25%, respectively), followed by the (b) renal system with 26 cases (30%), all diagnosed as renal failure. In the (c) nervous system (23 cases/27%) was observed convulsion (10 cases/43.5%), tremorgenia (muscle tremor and motor incoordination), loss of proprioception (8 cases/35%) and epilepsy (5 cases/21.5%). The (d) reproductive system had 5 cases (6%) registered with uterus infection-pyometra (2 cases/40%), dead fetus (2 cases/40%) and one abortion (20%). Neoplasias corresponded to 4 cases (5%) of total pathologies: in the liver (2 cases/50%), the spleen and the adrenal gland. Regarding the factors that could be pathologies related, feeding: 68 (96%) and 3 (4%) animals were fed with commercial and commercial+homemade food (mixed diet), respectively and all dogs had mainly dry feed and cats, dry and moist food (50% each). As expected, the commercial feed composition was considered balanced, giving all the nutrients they need, different of the homemade food fed, as not control was made. Several ingredients utilized in pet food are known as good substrates for toxigenic fungi growth. In some cases their quality are bad and that can make the difference regarding toxins and animal safety (Boermans and Leung, 2007). Among the mycotoxins, the aflatoxins, fumonisins, zearalenone e ochratoxin A are more prevalent in Brazil. They may be found in pet food ingredients such as cereals (corn, wheat, millet, sorghum, oats, barley, ray), followed by pulses, seeds and nuts (peas, peanuts, sunflower, *alpiste*, among others) when stored in conditions that are allow fungi growth (Simão and Scussel, 2008; Scussel et al., 2006). In addition, corn is the main ingredient of most dry pet food (ca. 70-80% of total ingredients) depending on pet food type. Breeding environment: it was observed that 51 animals (72%) lived inside the houses and 19 animals (27%) lived outside; stress was observed in 84% and 10% of dogs (indoors) and cats, respectively. Animals under environmental stress may show the more pronounced signs. Important to emphasize that, animals living outside the house can get their wet feed in rainy days and if not fresh can lead to fungi growth, and possibly toxigenic ones, thus toxin formation, apart from bacterias.

Conclusion: The clinical signs of mycotoxicosis are nonspecific and can confuse the veterinary final diagnostic. The epidemiologic preliminary data obtained in the present study is important tool to help elucidation of the current pet's situation reported in the veterinary clinics in Southern Brazil. They can indicate that mycotoxins may be clinically present, however, not usually considered as their final diagnostic. That has been resulting on few discussions and considerations about mycotoxicosis between vets of pets in Brazil. Recommendation on mycotoxins analysis of the sick animal feed, should be carried out together with enzymes related and also education of pets owners on how to choose and store to keep pet food safe – the same way as it is carried out when breeding zootecnic animals for meat industries (make sure feed ingredients quality and final feed products safe). “No treatment is effective if the cause of the illness is persistent.”

References

- BOERMANS, H. J.; LEUNG, M. C. K. Micotoxinas and the pet food industry: Toxicological evidence and risk assessment. *International Journal of Food Microbiology*, v.119, n.1 e 2, p. 95-102, Oct. 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.
- SCUSSEL, V.M, GIORDANO, B.N.E., SIMÃO, V, ROCHA, M.W. da, REIS, L.F.C. dos, XAVIER, J.J.M. Mycotoxin evaluation in feed for pets using tandem liquid chromatography mass/mass. *Proceedings of the 9 th International Working, Conference on Stored Product Protection*, Abrapós: 2006. p 182-188.
- SIMÃO, V.; SCUSSEL, V. M. Qualidade na produção de rações e ingredientes de rações para pets. In: *Atualidades em Micotoxinas e Armazenagem Qualitativa de Grãos II*. SCUSSEL, V. M. et al., ed. ABMAG: Florianópolis, 2008. p.101-105.
- WITHROW S.J. Why worry about cancer in pets?, p. 15 - 17. In: WITHROW S.J.& MACEWEN E. G. (ed.), *Small Animal Clinical Oncology*. 4rd ed. Saunders, Philadelphia, 2007.

APÊNDICE P - Resumo expandido do trabalho “Determination of the profile of ingredients in feed for pet birds versus mycotoxins contamination” apresentado no congresso Myco & Phycotoxins 2010, Mérida, México, 2010

DETERMINATION OF THE PROFILE OF INGREDIENTS IN FEED FOR PET BIRDS VERSUS MYCOTOXINS CONTAMINATION

Vanessa Simão, Gabriele Basso, Karina Koerich de Souza, Vildes Maria Scussel*.

Laboratory of Mycotoxicology and Food Contaminants - LABMICO, Food Science and Technology Department, Center of Agricultural Sciences, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brazil www.labmico.ufsc.br.
Tel: +5548-3721-5386, vildescussel_2000@yahoo.co.uk*

Background: The product quality of pet feed must be investigated as a significant increase of the number of these animals being fed by commercial feed and the production of feed is on a rise (SIMÃO and SCUSSEL, 2008; SCUSSEL et al., 2006). Regulating agencies have to warrant to consumers, the quality of these products regarding to mycotoxins presence. Thus establishing regulatory limits, mainly for aflatoxins (AFLs), ocratoxin A (OTA), fumonisins (FBs), zearalenone (ZON) and patulin (PTL), the most frequently observed in contaminated foods, is necessary. In the case of the pet birds, the complexity of ingredient in the feeds formulation make them possible for a higher occurrence of mycotoxins contamination (BOERMANS and LEUNG, 2007; SIMÃO and SCUSSEL, 2008). Thus, it is very important the certify the quality of ingredients, processing and manipulation of these feeds by the manufacturers. In addition, labels must corroborate with the real content in the packing.

Aims: To determine the profile of ingredients added in feed destined for pets birds, correlating the types of ingredients (composition) of these products to possible risk of contamination b mycotoxins.

Materials and Methods: 20 samples of birds feed were collected: 10 commercialized in sealed packs and 10 commercialized in bulk (500 packs of 200 g, respectively). The proportion (%) of each ingredient in the feeds were determined by means of manual separation and with microscope stereoscopic. After the separation, each group of ingredient was weighed and the respective ratios were calculated for 100 g. The data obtained were checked with the basic composition reported in the feed labels. Moisture content was also evaluated AOAC (2005).

Results and Discussion: The main ingredients present in the birds feed were: (a) feed in pellets, supreme biscuit and dried fruits (crystallized and/or plain dehydrated), (b) peanut (with and without rind), (c) (maize, rice, soy, wheat, triticale, *triguilho*, pea and oats), (d) others (bran of soy and wheat, *quirera* of maize and rice, canary seed, *painço*). The ingredients presented in larger amounts were: feed in pellets, seeds of sunflower, maize and peanut. It was observed variations in the ingredients composition ratio by the specification of different bird's species *versus* labels. In fact some of these feed presented moisture content above of the allowed, being able to favor the development of yeasts and moulds (also toxigenic species), being that about 50% of the samples (11 feeds - 6 closed and 5 in bulk). They had moisture content above of the limits established for the legislation for pet food, that is above of 12% (BRAZIL, 2003). This fact, together with the complex composition of the feed, can be a determinative factor for mycotoxin contamination. When the ingredients were correlated to the possible contamination by mycotoxins, it was observed that the peanut was present in 25% of the total samples (5 samples - 2 packed and 3 in bulk), being that component related to the possible presence of AFLs. Also maize was present in 9 samples (45%), which can be related to contamination by AFLs and *Fusarium* toxins (FBs and ZON). Also dehydrated and crystallized fruits could be contaminated by OTA and PTL. In addition, many ingredients were found damaged and infested by insects, which could favor the proliferation of moulds and formation of mycotoxins.

Conclusions: It is necessary to pay more attention on pets food quality, especially related to their composition & moisture content control, in order to reduce/avoid possibility of mycotoxins contamination.

References:

- AOAC. Official Method of Analysis of AOAC. Thiex, NJW ed, Animal Feed. Sampling of Animal Feed & Moisture content. 18ed. Maryland, 2005.
BOERMANS, H. J.; LEUNG, M. C. K. Micotoxinas and the pet food industry: Toxicological evidence and risk assessment. Intl. J. Food Microbiol., v.119, n.1 e 2, p. 95-102, Oct. 2007.
BRASIL. MAPA. Portaria nº 3, de 22/01/2009. DOU, DF, 23/01/2009. Seção 1, p.12.
BRASIL.ANVISA. Métodos Físico-Químicos Análise de Alimentos. 4ed. Brasília, MS, 2005.
SCUSSEL, V. M. et al. Mycotoxin evaluation in feed for pets using tandem liquid chromatography mass/mass. Procendings of the 9 th Intl. WCSPP, Abrapós: 2006. p 182-188.
SIMÃO, V.; SCUSSEL, V. M. Qualidade na produção de rações e ingredientes de rações para pets. In: Atualidades em Micotoxinas e Armazenagem Qualitativa de Grãos II. SCUSSEL, V. M. et al., ed. ABMAG: Florianópolis, 2008. p.101-105.

APÊNDICE Q - Resumo expandido do trabalho “Toxigenic fungal and mycotoxins in petfood for wild birds” apresentado no congresso Myco & Phycotoxins 2010, Mérida, México, 2010

TOXIGENIC FUNGAL AND MYCOTOXINS IN PETFOOD FOR WILD BIRDS

Vanessa Simão, Karina Koerich de Souza, José Junior Mendonça Xavier, Vildes Maria Scussel*.

Laboratory of Mycotoxicology and Food Contaminants - LABMICO, Food Science and Technology Department, Center of Agricultural Sciences, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brazil www.labmico.ufsc.br.
Tel: +55 48-3721-5386, vildescussel_2000@yahoo.co.uk*

Background: Mycotoxins are toxic products originating from the secondary metabolism of toxigenic fungi. The presence of those fungi and toxins in foods for humans and animals has represented a danger for these groups health. In the case of the pet animals, among them, the birds, the toxic effect can be fatal. (Boermans and Leung, 2007; Hussein and Brasel, 2001). The main toxins found in foods for birds are: aflatoxins (AFLs), fumonisins (FBs), ocratoxin A (OTA) and zearalenone (ZON) (Scussel et al., 2006; Simão and Scussel, 2008).

Aims: To determine the presence of mycotoxins and toxigenic fungi in foods for wild birds commercialized in Brazil.

Materials and Methods: Birds feed samples (36) were collected from the southern and southeastern regions of Brazil from May to July of 2009. The assays carried out for quality and safety of those feed were: (a) moisture content (AOAC, 2005); (b) total fungi and yeasts count (APHA, 1992); (c) determination of the toxigenic potential strains on *Aspergillus flavus* and *parasiticus* Agar (AFPA) (Pitt et al., 1983); (d) mycotoxins AFLs, OTA and ZON analysis by AOZ immunoaffinity columns (Vicam ®) clean-up and quantification by LC-MSMS (Xavier and Scussel, 2006). To determinate of FBs, the extract clean-up was carried through SPE (+NH₄, quaternary amino) cartridges followed by LC-MSMS (Xavier and Scussel, 2006 – modified).

Results and Discussion:

From 36 samples analyzed, 14 (39%) presented moisture content above of the limit of 12% established by legislation. This fact can result in the total counting of yeasts and moulds above of the expected and consequently can favor the presence of toxigenic strains of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. Those in turn, were found in some feeds. It is indicative of possibility of mycotoxins contamination.

In Brazil, the legislation established for animals feed that the AFLs levels do not exceed 50 ppb. However regulation for the other mycotoxins does not exist. In the case of the birds feed, the great variety of ingredients (maize, peanut, soy, rice, oats, wheat, fruits crystallized and/or dehydrated, *alpiste*, *painço*, among others) that are present in this type of food is a fact that can contribute for the contamination of a product for multiple toxins.

Conclusions: Evaluation of quality of foods for wild birds must be carried frequently in order to guarantee the safety of products and consequently, the health of the animals in question. Multi-toxins analysis should be recommended as multi-genera / species of fungi can be present in the feed.

References:

- AOAC. Official Method of Analysis of AOAC. Thiex, NJW ed, Animal Feed. Sampling of Animal Feed & Moisture content. 18ed. Maryland, 2005.
- APHA. Standard methods for the examination of water and wastewater. 19. ed. New York: American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation, 1992.
- BOERMANS, H. J.; LEUNG, M. C. K. Micotoxinas and the pet food industry: Toxicological evidence and risk assessment. Intl. J. Food Microbiol., v.119, n.1 e 2, p. 95-102, Oct. 2007.
- HUSSEIN, H. S., BRASEL, J. M., 2001. Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. Toxicology, v. 167, 101-134.
- PITT, J. I.; HOCKING, A. D.; GLENN, D.R. An improved medium for detection of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus*. Journal Applied Bacteriological, v. 53, p. 109-114, 1983.
- SCUSSEL, V.M, GIORDANO, B.N.E., SIMÃO, V, ROCHA, M.W. da, REIS, L.F.C. dos, XAVIER, J.J.M. Mycotoxin evaluation in feed for pets using tandem liquid chromatography mass/mass. Procendings of the 9 th International Working, Conference on Stored Product Protection, Abrapós: 2006. p 182-188.
- SIMÃO, V.; SCUSSEL, V. M. Qualidade na produção de rações e ingredientes de rações para pets. In: Atualidades em Micotoxinas e Armazenagem Qualitativa de Grãos II. SCUSSEL, V. M. et al., ed. ABMAG: Florianópolis, 2008. p.101-105.
- XAVIER, J. J. M.; SCUSSEL, V. M. Desenvolvimento de um multi-método por LC-MS/MS para quantificação de Patulina, Fumonisina B1, Citrinina, Ocratoxina A e Zearalenona. Livro de Resumos, V CLAM & ENM' 2006 e IV SAG-MERCOSUL, p. 139, 2006