

**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

Avaliação da eficácia de diferentes adsorventes para redução de efeitos tóxicos combinados de micotoxinas na alimentação de vacas em lactação

Luzianna Macedo Fonseca

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestra em Ciências. Área de concentração: Ciência
Animal e Pastagens

**Piracicaba
2024**

Luzianna Macedo Fonseca
Médica Veterinária e Zootecnista

Avaliação da eficácia de diferentes adsorventes para redução de efeitos tóxicos combinados de micotoxinas na alimentação de vacas em lactação versão revisada conforme resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador:
Prof. Dr. **CARLOS HUMBERTO CORASSIN**

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestra em Ciências. Área de concentração: Ciência Animal e Pastagens

Piracicaba
2024

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA – DIBD/ESALQ/USP

Fonseca, Luzianna Macedo

Avaliação da eficácia de diferentes adsorventes para redução de efeitos tóxicos combinados de micotoxinas na alimentação de vacas em lactação / Luzianna Macedo Fonseca. - - versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011 - - Piracicaba, 2024.

90 p.

Dissertação (Mestrado) - - USP / Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. Multi-micotoxinas 2. Aditivos antimicotoxinas 3. Redução de micotoxinas 4. Vacas leiteiras 5. Adsorventes I. Título

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus, por Sua constante orientação e força que me permitiram superar desafios e me tornar uma pessoa melhor, valorizando ainda mais a vida. Agradeço por me ajudar a crescer diariamente.

A mim por nunca desistir, por enfrentar noites mal dormidas, medos e ansiedades. Esses desafios foram fundamentais na construção das pontes que me levaram ao orgulho de superá-los e alcançar com êxito meus objetivos.

À minha avó, Maria Edite Venceslau Fonseca (*in memoriam*), agradeço por ter me apoiado incondicionalmente em momentos difíceis ao longo da minha jornada acadêmica e de vida. Ela esteve sempre ao meu lado.

Ao meu pai, Orlando Fonseca Sousa, minha madrastra, Maria Lucivalda Abreu Sousa, minha irmã Iolanda Abreu de Sousa e minha tia Maria Assunção Fonseca, pelo apoio ao longo destes anos.

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” da Universidade de São Paulo e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal e Pastagens pela oportunidade de realização do curso de Mestrado.

Ao Prof. Dr. Carlos Humberto Corassin, meu orientador, agradeço pela oportunidade concedida e pelo auxílio durante esta etapa.

À equipe do Laboratório de Microbiologia e Micotoxilogia de Alimentos (LMMA) da FZEA/USP, com destaque para Roice Eliana Rosim, agradeço por sua gentileza e contribuição ativa nas análises multi-micotoxinas das amostras coletadas.

A toda equipe do Laboratório de Pesquisa em Bovinos Leiteiros (LPBL) da FMVZ/USP, especialmente ao Prof. Dr. Francisco Palma Rennó, agradeço por contribuírem ativamente na execução do experimento.

Aos professores do Departamento de Zootecnia da ESALQ/USP, agradeço o conhecimento compartilhado.

À empresa DSM-firmenich ltda., Brasil S.A, pelo financiamento e apoio ao projeto.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES (processo nº 88887.672209/2022-00 - Código de Financiamento 001), pela concessão da bolsa de estudos no meu primeiro ano de mestrado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP (processo nº 2022/14662-4), pela concessão da bolsa de estudos e apoio à pesquisa para a condução do experimento.

Por fim, minha gratidão eterna a todos os animais que foram utilizados direta ou indiretamente ao longo do meu mestrado, pois eles contribuíram para meu aprendizado e crescimento. Respeito profundo e gratidão a todos eles.

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| RESUMO | 6 |
| ABSTRACT | 7 |
| LISTA DE FIGURAS..... | 8 |
| LISTA DE TABELAS | 9 |
| LISTA DE SIGLAS..... | 10 |
| 1. INTRODUÇÃO..... | 13 |
| 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA..... | 15 |
| 2.1 MICOTOXINAS | 15 |
| 2.2 AS PRINCIPAIS MICOTOXINAS QUE AFETAM A PECUÁRIA LEITEIRA | 15 |
| 2.2.1 Aflatoxinas | 16 |
| 2.2.2 Fumonisinias | 19 |
| 2.2.3 Zearalenona..... | 22 |
| 2.2.4 Tricotecenos | 26 |
| 2.2.4.1 Toxina T-2 | 26 |
| 2.2.4.2 Deoxinivalenol..... | 28 |
| 2.3 MITIGAÇÃO DE MICOTOXINAS EM ALIMENTOS DESTINADOS AOS BOVINOS | 31 |
| 2.3.1 Abordagens biológicas na prevenção de micotoxicoses em ruminantes..... | 31 |
| 2.3.1.1 Leveduras | 31 |
| 2.3.1.2 Bactérias..... | 32 |
| 2.3.1.3 Enzimas..... | 34 |
| 2.3.1.4 Extratos vegetais | 35 |
| 2.3.2 Abordagens físicas na prevenção de micotoxicoses em ruminantes..... | 37 |
| 2.3.2.1 Argilas | 37 |
| 2.3.2.2 Zeólitas..... | 38 |
| 2.3.2.3 Carvões | 40 |
| 2.3.2.4 Biomateriais | 41 |
| 2.4 IMPORTÂNCIA DOS BIOMARCADORES PARA MICOTOXINAS | 43 |
| 3. METODOLOGIA | 45 |
| 3.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS E TRATAMENTOS..... | 45 |
| 3.2 PRODUÇÃO E AVALIAÇÃO DE MICOTOXINAS NAS DIETAS | 47 |
| 3.3 MULTI-MICOTOXINAS E AVALIAÇÃO DE BIOMARCADORES..... | 48 |

| | |
|--|-----------|
| 3.4 ANÁLISE DE DADOS..... | 50 |
| 4. RESULTADOS..... | 51 |
| 4.1 MICOTOXINAS NA SILAGEM E NO CONCENTRADO..... | 51 |
| 4.2 MICOTOXINAS NO PLASMA SANGUÍNEO..... | 52 |
| 4.3 MICOTOXINAS NO LEITE..... | 53 |
| 4.4 MICOTOXINAS NA URINA..... | 55 |
| 5. DISCUSSÕES..... | 57 |
| 5.1 MICOTOXINAS NA SILAGEM E NO CONCENTRADO..... | 57 |
| 5.2 MICOTOXINAS NO PLASMA SANGUÍNEO..... | 58 |
| 5.3 MICOTOXINAS NO LEITE..... | 59 |
| 5.4 MICOTOXINAS NA URINA..... | 61 |
| 6. CONCLUSÕES..... | 65 |
| 7. AGRADECIMENTOS..... | 66 |
| REFERÊNCIAS..... | 67 |

RESUMO

Avaliação da eficácia de diferentes adsorventes para redução de efeitos tóxicos combinados de micotoxinas na alimentação de vacas em lactação

Micotoxinas são metabólitos tóxicos produzidos por fungos presentes em alimentos e rações e representam riscos à saúde de bovinos, bem como para a qualidade dos produtos derivados dessa espécie, como o leite. A crescente preocupação com esses compostos exige estratégias eficazes de mitigação. Aditivos antimicotoxinas, que se ligam às micotoxinas, surgem como solução promissora. Este estudo visou determinar a eficiência de diferentes aditivos antimicotoxinas em reduzir de aflatoxinas (AFLA), fumonisinas (FUM), zearalenona (ZEN), deoxinivalenol (DON) e toxina T-2 (T2) no sangue, leite e urina de vacas leiteiras. Doze vacas Holandesas em lactação foram divididas aleatoriamente em quatro tratamentos: 1) grupo controle (CON), composto por dieta basal sem aditivo antimicotoxina; 2) grupo aditivo antimicotoxina 1 (AD1), com a adição de 25 g/vaca/dia de HSCAS (aluminossilicato de cálcio e sódio hidratado) ao concentrado da dieta basal; 3) grupo aditivo antimicotoxina 2 (AD2), com a inclusão de 15 g/vaca/dia de *Mycofix® Plus 5.0* (DSM-firmenich Ltda., Brasil) ao concentrado da dieta basal; e 4) grupo aditivo antimicotoxina 3 (AD3), com a adição de 30 g/vaca/dia de *Mycofix® Plus 5.0* (DSM-firmenich Ltda., Brasil) ao concentrado da dieta basal. O experimento durou 21 dias, com sete dias de contaminação por AFLA, FUM, DON, ZEN e T2. Foram coletadas amostras de leite, urina e sangue para análise de biomarcadores multi-micotoxinas via cromatografia líquida de ultra desempenho acoplado a um espectrômetro de massas (UPLC-MS). As AFLA, FUM e ZEN estavam naturalmente presentes na dieta básica. No plasma sanguíneo os aditivos conseguiram reduzir aflatoxina M₁ (AFM₁) em 35% (AD1) e 91% (AD2), enquanto DON foi reduzido a níveis abaixo dos limites de detecção do método (LOD) (0,033 µg/L) pelos aditivos AD2 e AD3. A FUM e ZEN sofreram redução de 94,6% e 97,7%, respectivamente, por AD2 e ficaram abaixo do LOD com o uso de AD3. No leite, AD2 e AD3 reduziram AFM₁ entre 94,3% e 97,8%, e preveniram a secreção de DON, FUM, T2 e ZEN. Na urina, houve redução de aflatoxinas em 10,8% (AD1), 17,8% (AD2) e 26,1% (AD3). AD2 e AD3 reduziram DON e FUM para níveis abaixo do LOD (0,033 e 0,003 µg/L). T2 não foi detectada em nenhum tratamento. Conclui-se que a administração de aditivos antimicotoxinas, em um curto período de contaminação, reduz efetivamente a FUM, DON, FUM, T2 e ZEN no sangue, leite e urina de vacas leiteiras. Em todos os tratamentos contendo *Mycofix® plus 5.0*, observou-se uma resposta positiva contra a contaminação por múltiplas micotoxinas, com redução dos níveis de contaminação em biomarcadores, como leite, urina e sangue. AD3 apresentou maior redução de FUM no sangue, urina e leite, seguido por AD2 e HSCAS. AD3 reduziu todas as outras micotoxinas abaixo do LOD no sangue, urina e leite. A dose mais baixa de aditivo antimicotoxinas (AD2) apresentou grande redução em todas as micotoxinas, enquanto HSCAS apresentou pequena redução na FUM, e não foi capaz de reduzir outras secreções de micotoxinas em sangue, urina e leite. Os dados reforçam a eficácia dos aditivos alimentares antimicotoxinas na desativação das micotoxinas, destacando a importância de sua utilização.

Palavras-chave: Multi-micotoxinas, Aditivos antimicotoxinas, Redução de micotoxinas, Vacas leiteiras, Adsorventes.

ABSTRACT

Evaluation of the effectiveness of various adsorbents for reducing the combined toxic effects of mycotoxins in the diet of lactating cows

Mycotoxins are toxic metabolites produced by fungi present in food and feed, posing risks to the health of cattle, as well as to the quality of products derived from this species, such as milk. The growing concern about these compounds demands effective mitigation strategies. Antimycotoxin additives, which bind to mycotoxins, emerge as a promising solution. This study aimed to determine the efficiency of different antimycotoxin additives in reducing aflatoxins (AFLA), fumonisins (FUM), zearalenone (ZEN), deoxynivalenol (DON), and T-2 toxin (T2) in the blood, milk, and urine of dairy cows. Twelve Holstein lactating cows were randomly divided into four treatments: 1) control group (CON), consisting of a basal diet without antimycotoxin additive; 2) antimycotoxin additive group 1 (AD1), with the addition of 25 g/cow/day of HSCAS (hydrated sodium calcium aluminosilicate) to the concentrate of the basal diet; 3) antimycotoxin additive group 2 (AD2), with the inclusion of 15 g/cow/day of *Mycofix® Plus 5.0* (DSM-Firmenich Ltd., Brazil) to the concentrate of the basal diet; and 4) antimycotoxin additive group 3 (AD3), with the addition of 30 g/cow/day of *Mycofix® Plus 5.0* (DSM-Firmenich Ltd., Brazil) to the concentrate of the basal diet. The experiment lasted for 21 days, with seven days of contamination by AFLA, FUM, DON, ZEN, and T2. Samples of milk, urine, and blood were collected for multi-mycotoxin biomarker analysis via ultra-performance liquid chromatography coupled to a mass spectrometer (UPLC-MS). AFLA, FUM, and ZEN were naturally present in the basic diet. In the blood plasma, the additives managed to reduce aflatoxin M1 (AFM1) by 35% (AD1) and 91% (AD2), while DON was reduced to levels below the limit of detection (LOD) (0.033 µg/L) by additives AD2 and AD3. FUM and ZEN underwent a reduction of 94.6% and 97.7%, respectively, by AD2 and were below the LOD with the use of AD3. In the milk, AD2 and AD3 reduced AFM1 between 94.3% and 97.8% and prevented the secretion of DON, FUM, T2, and ZEN. In the urine, there was a reduction in aflatoxins by 10.8% (AD1), 17.8% (AD2), and 26.1% (AD3). AD2 and AD3 reduced DON and FUM to levels below the LOD (0.033 and 0.003 µg/L). T2 was not detected in any treatment. It is concluded that the administration of antimycotoxin additives, over a short contamination period, effectively reduces FUM, DON, FUM, T2, and ZEN in the blood, milk, and urine of dairy cows. In all treatments containing *Mycofix® Plus 5.0*, a positive response against contamination by multiple mycotoxins was observed, with a reduction in contamination levels in biomarkers such as milk, urine, and blood. AD3 exhibited the greatest reduction in FUM in blood, urine, and milk, followed by AD2 and HSCAS. AD3 reduced all other mycotoxins below the LOD in blood, urine, and milk. The lower dose of antimycotoxin additive (AD2) showed significant reduction in all mycotoxins, while HSCAS showed minor reduction in FUM and was unable to reduce other mycotoxin secretions in blood, urine, and milk. The data underscore the effectiveness of antimycotoxin feed additives in deactivating mycotoxins, highlighting the importance of their use.

Keywords: Multi-mycotoxins, Antimycotoxin additives, Mycotoxin reduction, Dairy cows, Adsorbents.

LISTA DE FIGURAS

| | | |
|-----------|---------------------------------------|----|
| Figura 1. | Desenho do ensaio..... | 46 |
| Figura 2. | Esquema de execução dos períodos..... | 48 |

LISTA DE TABELAS

| | | |
|-----------|--|----|
| Tabela 1. | Parâmetros de desempenho do método para determinação de micotoxinas em amostras de rações à base de ração total mista (TMR)..... | 49 |
| Tabela 2. | Parâmetros de desempenho do método para determinação de micotoxinas em amostras de leite de vacas leiteiras | 49 |
| Tabela 3. | Parâmetros de desempenho do método para determinação de micotoxinas em amostras de urina e plasma sanguíneo de vacas leiteiras..... | 50 |
| Tabela 4. | Concentrações de micotoxinas (aflatoxinas, desoxinivalenol, fumonisinas, Toxina-T2 e zearalenona) em ingredientes alimentares de ração mista total (TMR) de vacas leiteiras..... | 51 |
| Tabela 5. | Concentração na dieta e ingestão diária de micotoxinas (aflatoxinas, desoxinivalenol, fumonisinas, Toxina-T2 e zearalenona) por vacas leiteiras..... | 52 |
| Tabela 6. | Concentrações de micotoxinas (aflatoxina M ₁ , desoxinivalenol, fumonisinas, toxina-T2 e zearalenona) no plasma sanguíneo de vacas leiteiras submetidas a diferentes tratamentos com aditivos antimicotoxinas..... | 53 |
| Tabela 7. | Concentração de micotoxinas (aflatoxina M ₁ , desoxinivalenol, fumonisinas, toxina-T2 e zearalenona) no leite de vacas leiteiras submetidas a diferentes tratamentos com aditivos antimicotoxinas..... | 54 |
| Tabela 8. | Taxa de conversão de micotoxinas (aflatoxina M ₁ , desoxinivalenol, fumonisinas, toxina-T2, zearalenona) no leite de vacas leiteiras submetidas a diferentes tratamentos com aditivos antimicotoxinas..... | 54 |
| Tabela 9. | Concentrações de micotoxinas (aflatoxina M ₁ , desoxinivalenol, fumonisinas, toxina-T2, α -zearalenol e β -zearalenol) na urina de vacas leiteiras submetidas a diferentes tratamentos com aditivos antimicotoxinas..... | 55 |

LISTA DE SIGLAS

| | |
|------------------|--|
| AD1 | Grupo aditivo antimicotoxina 1 |
| AD2 | Grupo aditivo antimicotoxina 2 |
| AD3 | Grupo aditivo antimicotoxina 3 |
| AFB ₁ | Aflatoxina B ₁ |
| AFB ₂ | Aflatoxina B ₂ |
| AFG ₁ | Aflatoxinas G ₁ |
| AFG ₂ | Aflatoxinas G ₂ |
| AFL | Aflatoxicol |
| AFLA | Aflatoxinas |
| AFM ₁ | Aflatoxina M ₁ |
| AFM ₂ | Aflatoxina M ₂ |
| AlO ₄ | Tetraedros de alumínio |
| ANOVA | Análise de Variância |
| APPCC | Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle |
| CON | Grupo controle |
| CYP1A2 | Citocromo P450 1A2 |
| DOM-1 | De-epoxi-desoxinivalenol |
| DON | Desoxinivalenol |
| EDTA | Ácido Etilenodiamino Tetra-acético |
| EFSA | Autoridade Europeia de Segurança Alimentar |
| ESI | Ionização por <i>eletrospray</i> |
| FB ₁ | Fumonisina B ₁ |
| FB ₂ | Fumonisina B ₂ |
| FUM | Fumonisina |
| FUMzyme | Fumonisina-esterase |
| HPLC | Cromatografia Líquida de Alta Eficiência |
| HSCAS | Aluminossilicato Hidratado de Sódio e Cálcio |
| IARC | Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer |
| ic-ELISA | Ensaio Imunoenzimático Competitivo indireto |
| LABs | Bactérias lácticas |
| LCDM | Laboratório de Controle e Descontaminação de Micotoxinas |

| | |
|------------------|--|
| LMMA | Laboratório de Métodos de Massa e Espectrometria |
| LOD | Limite de detecção do método |
| MRM | Monitoramento de Reação Múltipla |
| MS | Espectrometria de Massas |
| NRC | Conselho Nacional de Pesquisa |
| OTA | Ocratoxina A |
| SC | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> |
| SiO ₄ | Tetraedros de sílica |
| TMR | Ração Total Mista |
| UE | União europeia |
| UPLC | Cromatografia Líquida de Ultra Desempenho |
| ZEN | Zearalenona |
| α -ZAL | Alfa Zearalanol |
| α -ZOL | Alfa Zearalenol |
| β -ZOL | Beta Zearalenol |

1. INTRODUÇÃO

A indústria pecuária desempenha um papel de extrema relevância ao assegurar o fornecimento global de alimentos e produtos de origem animal. Dentro desse contexto, a produção leiteira se destaca como um pilar fundamental dessa indústria, correspondendo à crescente demanda por produtos lácteos de alta qualidade nutricional (Fusco et al., 2020; Lagrange et al., 2015). Contudo, a manutenção da saúde e do desempenho otimizado das vacas em lactação emerge como um desafio complexo, agravado pela presença insidiosa de micotoxinas nos alimentos destinados a esses animais. Esse cenário é reconhecido como um problema global persistente, que se torna inevitável e imprevisível (Rodríguez & Núñez, 2020).

Micotoxinas são metabólitos tóxicos produzidos por fungos presentes em alimentos e rações. Essas substâncias biologicamente ativas representam um risco significativo para a saúde e o bem-estar animal, bem como para a qualidade dos produtos derivados, incluindo o leite. As micotoxinas têm sido associadas a uma variedade de problemas de saúde em bovinos, incluindo distúrbios gastrointestinais, imunossupressão, redução na produção de leite e até mesmo mortalidade em casos extremos (Gonçalves, Corassin, et al., 2015; Mostrom & Jacobsen, 2020). Entre as micotoxinas mais prevalentes e estudadas em bovinos estão as aflatoxinas, fumonisinas, zearalenona, deoxinivalenol e toxina T-2.

As vacas em lactação enfrentam demandas nutricionais substanciais para a produção de leite de qualidade e para manter sua própria saúde. Qualquer desvio na nutrição pode resultar em queda na produção de leite, diminuição da eficiência reprodutiva e maior suscetibilidade a doenças (Diao et al., 2017; D’Occhio et al., 2019). As micotoxinas comprometem não apenas a ingestão de alimentos, mas também afetam negativamente a absorção de nutrientes e a eficiência metabólica. Essas consequências têm um impacto direto na produtividade, reduzindo o consumo de ração e a produção de leite, culminando em perdas econômicas significativas (El-Sayed et al., 2022; Gonçalves, Corassin, et al., 2015).

Diante da crescente conscientização sobre os efeitos adversos das micotoxinas na produção leiteira, torna-se imperativo desenvolver estratégias eficazes para mitigar os riscos associados a esses compostos tóxicos (Gonçalves et al., 2017; Gonçalves, Rosim, et al., 2015; Rosim et al., 2018). A busca por soluções viáveis levou à exploração de aditivos alimentares antimicotoxinas como uma abordagem promissora para reduzir os riscos da exposição das vacas em lactação às micotoxinas. Os aditivos antimicotoxinas, capazes de se ligar às

micotoxinas e reduzir sua biodisponibilidade (Almeida Rego et al., 2021; Hamad et al., 2023), oferecem a possibilidade de minimizar os impactos negativos das micotoxinas na saúde e no desempenho dos bovinos.

Dentre as categorias de aditivos antimicotoxinas, as argilas aluminossilicatos ocupam uma posição de destaque, sendo alvo de extenso estudo científico para a mitigação de micotoxicoses. Uma variedade de argilas aluminossilicatos, incluindo o aluminossilicato hidratado de sódio e cálcio (HSCAS), bentonita, montmorilonita, esmectita e zeólita, tem revelado uma capacidade notável de se ligar às micotoxinas (Kang'Ethe et al., 2017; Papaioannou et al., 2005; Vila-Donat et al., 2019).

Numerosos estudos atestaram a capacidade de diversos aditivos antimicotoxinas em formar complexos de micotoxina-adsorvente altamente ligados entre suas estruturas, resultando na redução da biodisponibilidade das toxinas (Adunphatcharaphon et al., 2020; Rosim et al., 2018; Vila-Donat et al., 2019). Portanto, o objetivo principal desta pesquisa foi determinar a eficiência de diferentes aditivos antimicotoxinas em reduzir de aflatoxinas, fumonisinas, zearalenona, deoxinivalenol e toxina T-2 no sangue, leite e urina de vacas leiteiras.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Micotoxinas

Micotoxinas são substâncias tóxicas produzidas por fungos ascomicetos, e sua produção é afetada pelo ambiente em que os alimentos estão inseridos, seja durante o cultivo ou o armazenamento (H. Xu et al., 2021). Mesmo quando as condições ambientais são favoráveis, a ocorrência dessas substâncias é inevitável (Qu et al., 2022). Gêneros fúngicos proeminentes como *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium* e *Alternaria*, destacam-se como produtores significantes de micotoxinas, tendo a capacidade de contaminar extensas áreas agrícolas e, por consequência, os produtos finais destinados ao consumo humano (El-Sayed et al., 2022; I. M. de M. Silva et al., 2023).

A presença ou coexistência de fungos produtores de micotoxinas não implica automaticamente em níveis elevados destas substâncias no alimento. É crucial compreender que a produção e liberação dessas toxinas pelos fungos requerem condições específicas, incluindo umidade relativa e calor adequados (Gonçalves, Corassin, et al., 2015). Portanto, é essencial reconhecer a ocorrência de multimicotoxinas nas rações para o gado leiteiro, a fim de desenvolver metodologias analíticas precisas e sólidas para sua detecção, reduzindo os danos à saúde do rebanho (Gonçalves, Corassin, et al., 2015; Gonçalves, Muaz, et al., 2020; Rosim et al., 2018).

A ingestão de alimentos contaminados com micotoxinas pode desencadear distúrbios agudos ou crônicos em bovinos, assim como em humanos, denominados micotoxicoses (Rodríguez & Núñez, 2020). Em casos agudos, observam-se distúrbios hormonais, gastrointestinais e renais, além de imunossupressão. No entanto, a ingestão crônica dessas micotoxinas pode resultar em câncer, hepatopatias, mutagenicidade, redução da hematopoiese e graves disfunções nos sistemas imunológico, intestinal, urinário, digestivo, nervoso e reprodutivo dos animais (G. Cai et al., 2019; Karaman et al., 2020). Tais eventos estão intrinsecamente ligados à quantidade ingerida, ao período de exposição e à interação entre essas toxinas (Rodríguez & Núñez, 2020).

2.2 As principais micotoxinas que afetam a pecuária leiteira

Um grupo particular de micotoxinas destaca-se por sua significativa relevância em relação aos impactos econômicos na atividade leiteira. Entre elas, destacam-se a aflatoxina,

fumonisina, zearalenona e os tricotecenos (deoxinivalenol e toxina T-2). A presença dessas toxinas nos alimentos acarreta uma série de distúrbios que afetam a saúde dos bovinos e de outras espécies, tendo como consequência a redução no volume de leite produzido e a diminuição do rendimento de carcaça (H. J. Lee et al., 2021; J. Y. Lee et al., 2019).

2.2.1 Aflatoxinas

As aflatoxinas compreendem micotoxinas lipofílicas de baixo peso molecular, com a capacidade de serem absorvidas pelo trato gastrointestinal de mamíferos. Estes compostos, estruturalmente relacionados à difuranocumarina, são sintetizados por *Aspergillus flavus*, responsável pela liberação da aflatoxina B₁ (AFB₁) e aflatoxina B₂ (AFB₂), e pelo *Aspergillus parasiticus*, produtor das aflatoxinas G₁ (AFG₁) e G₂ (AFG₂) (Guan et al., 2021). As aflatoxinas demonstram uma alta toxicidade para o fígado, rim e sistema imunológico (Alshannaq & Yu, 2017).

Dentre as aflatoxinas, a AFB₁ é encontrada em concentrações mais elevadas, além de apresentar maior potencial de bioacumulação tóxica. Essa micotoxina pode induzir mutações carcinogênicas e teratogênicas, e está associada ao desenvolvimento de carcinoma hepatocelular (P. Cai et al., 2020), o que a torna um relevante problema de saúde pública (Mostrom & Jacobsen, 2020). A AFB₁ foi classificada como agente cancerígeno do Grupo 1 pela Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC) em 1993 (IARC, 1993).

Diversos alimentos, como mandioca, milho, amendoim, caroço de algodão, gergelim, pimenta malagueta, trigo, arroz, semente de girassol, sorgo, figos, nozes, especiarias, entre outros, especialmente quando armazenados inadequadamente, podem estar contaminados com AFB₁ (Bervis et al., 2021; Campagnollo et al., 2020; Dhakal et al., 2023; Ismail et al., 2018). A contaminação dos alimentos pelo fungo *Aspergillus* pode ocorrer tanto no campo quanto durante o armazenamento e transporte (Dhakal et al., 2023).

Os alimentos podem se contaminar quando fungos produtores de micotoxinas estão presentes. Isso pode ocorrer devido à produção aumentada de substâncias tóxicas por esses fungos, sob condições favoráveis (Ismail et al., 2018). As aflatoxinas (AFLA) demonstram estabilidade térmica, resistindo a temperaturas superiores a 100 °C, o que impede sua degradação durante o processamento de alimentos (Gonçalves et al., 2017; Gonçalves, Muaz, et al., 2020), como leite e derivados (I. M. de M. Silva et al., 2023). Isso ocorre uma vez que

os métodos tradicionais de tratamento térmico, incluindo a pasteurização, têm se mostrado insuficientemente eficazes (Dhakal et al., 2023; Guan et al., 2021; Ismail et al., 2018).

A ingestão de rações contaminadas com aflatoxinas pode resultar em uma série de efeitos adversos na saúde das vacas leiteiras. Na aflatoxicose aguda, bovinos podem experimentar um rápido declínio no estado geral, perda de apetite, baixa conversão alimentar, redução na taxa reprodutiva, imunossupressão, hepatite aguda, icterícia, hemorragia e, em casos mais graves, levar à morte (Gonçalves, Corassin, et al., 2015; Mostrom & Jacobsen, 2020). Animais contaminados com aflatoxina durante a gestação podem proter proles com anomalias genéticas, especialmente no sistema esquelético, como agenesia das vértebras caudais e ossificação incompleta dos ossos do crânio (El-Nahla et al., 2013; Wangikar et al., 2004, 2005).

Em animais adultos, a AFB₁ tem o potencial de induzir lesão hepática aguda, necrose hepática, cirrose e a formação de nódulos hiperplásicos atípicos (Oyagbemi et al., 2010). Em bovinos leiteiros e pequenos ruminantes, a exposição crônica à aflatoxina por meio da alimentação pode resultar na redução da produção de leite, ocorrência de falhas reprodutivas, lesões hepáticas e comprometimento do sistema imunológico, aumentando assim o risco de desenvolvimento de doenças (Gonçalves, Corassin, et al., 2015; Jovaišiene et al., 2016).

No processo de ingestão de alimentos contaminados com AFB₁, o fígado dos bovinos desempenha um papel crucial, utilizando o citocromo P450 1A2 (CYP1A2) para metabolizar essa micotoxina em distintos metabólitos. Uma hidroxilação no carbono terciário do anel difuranocumarínico conduz à conversão da AFB₁ em seu principal metabólito, a aflatoxina M₁ (AFM₁). Por meio desse processo de hidroxilação, esses compostos adquirem maior solubilidade em água, resultando em sua excreção por meio de diferentes fluidos orgânicos (Becker-Algeri et al., 2016).

Estudos evidenciam que a concentração de AFM₁ identificada no leite está correlacionada à quantidade de AFB₁ ingerida pelas vacas (Mora-Medina et al., 2023), sendo que a taxa de conversão da AFB₁ para AFM₁ é de 6,2% no início da lactação e 1,8% no final (Zentai et al., 2023). Além dos bovinos, outros animais que consomem rações contaminadas podem transferir os metabólitos da aflatoxina para seus produtos secundários, como ovos, produtos lácteos e carne. Esse cenário expõe, potencialmente, os seres humanos a essa toxina por meio da ingestão de produtos contaminados. Foi comprovado que a AFM₁ foi detectada

no leite humano de lactantes que consumiram alimentos contaminados com AFB₁ (Coppa et al., 2020).

Os metabólitos 4-hidroxilados, resultantes do metabolismo hepático das micotoxinas AFB₁ e AFB₂, são denominados AFM₁ e aflatoxina M₂ (AFM₂), respectivamente. A AFB₁, AFB₂, AFM₁ e a AFM₂ podem ser encontradas em rações e alimentos contaminados com aflatoxinas, bem como em tecidos vegetais, leite e seus derivados. Independentemente da quantidade, qualquer exposição a essas toxinas acarreta efeitos cumulativos, impactando diretamente o risco de câncer em várias espécies, inclusive nos seres humanos (P. Cai et al., 2020; L. T. Franco et al., 2019).

Embora a AFM₁ possua potencial cancerígeno, sua toxicidade é inferior à da AFB₁, levando-a a ser classificada como pertencente ao Grupo 2B pela IARC (IARC, 1993). O efeito carcinogênico ocorre quando o epóxido intercala no DNA e alquila as bases, causando mutações no gene p53. Esse gene normalmente inibe a progressão do ciclo celular na presença de mutações de DNA ou induz a apoptose (P. Cai et al., 2020; Carvajal-Moreno et al., 2019; Dhakal et al., 2023).

Outro metabólito produzido a partir das aflatoxinas é o aflatoxicol (AFL), cuja toxicidade é 18 vezes inferior à do AFB₁, e que tem a capacidade de ser convertido de volta em AFB₁ por meio da oxidação dos carbonos (Karabulut et al., 2014). O AFL pode ser identificado em tecidos, leite, ovos e produtos lácteos submetidos a processos de pasteurização ou fermentação (Carvajal-Moreno et al., 2019).

Nos ruminantes, a absorção de aflatoxinas pode ser desencadeada mesmo antes de o alimento contaminado alcançar o rúmen, ocorrendo através da boca e esôfago. Evidências indicam que seus metabólitos foram identificados no plasma de vacas leiteiras em apenas 5 minutos após a ingestão (Mostrom & Jacobsen, 2020; Nguyen et al., 2020). A excreção da AFM₁ se manifesta por meio da urina, leite, bile e fezes em um intervalo de 24 horas após a exposição (Alshannaq & Yu, 2017; Corassin et al., 2013; Memiş & Yalçın, 2021). Importante ressaltar que a velocidade de eliminação varia entre indivíduos, estágios de lactação e número de ordenhas realizadas após a exposição do animal às aflatoxinas (Su et al., 2020).

A interação entre as aflatoxinas e a saúde das vacas leiteiras cria um cenário desafiador para a indústria leiteira. Além do impacto direto nas vacas, a presença de aflatoxinas nos produtos lácteos pode ter consequências na saúde para os consumidores humanos. Portanto, mitigar a exposição das vacas leiteiras às aflatoxinas não apenas assegura

a sanidade e o bem-estar animal, mas também preserva a qualidade e a segurança dos produtos lácteos destinados ao consumo humano (Gonçalves et al., 2017; Gonçalves, Muaz, et al., 2020; I. M. de M. Silva et al., 2023).

Atualmente, a AFM₁ é a única micotoxina regulamentada no leite, não existindo regulamentação para outras micotoxinas, incluindo a ocratoxina A (OTA) e as toxinas produzidas pelo fungo *Fusarium*, como a zearalenona (ZEN), fumonisina (FUM) e desoxinivalenol (DON). Na União Europeia (UE), o limite permitido é de até 50 ng/L de AFM₁ no leite, enquanto no Brasil, o limiar permitido é 10 vezes maior, chegando a 500 ng/L (European Community, 2006b; Frey et al., 2021). A contaminação do leite bovino por ZEN é frequentemente observada (Falkauskas et al., 2022), assim como a presença de FUM (Y. Chen et al., 2022), e a co-ocorrência de diferentes micotoxinas (Frey et al., 2021).

Um estudo revelou que aproximadamente 91,2% das amostras de leite comercial no Brasil continham pelo menos um tipo de micotoxina, incluindo AFM₁, DOM-1, OTA, FB₁, FB₂, α -ZOL e β -ZOL (Frey et al., 2021), destacando efeitos adversos que essas toxinas podem exercer na saúde humana. Além de sua presença no leite, micotoxinas como a OTA e citrinina podem reduzir de forma significativa a viabilidade celular da barreira epitelial mamária, diminuir a resistência elétrica transepitelial de maneira dose-dependente e modular funções do sistema imunológico inato das vacas (R. Xu et al., 2022).

Regular a presença de micotoxinas no leite e produtos de origem animal é uma tarefa desafiadora, uma vez que a AFM₁ demonstra ser resistente ao calor, escapando de processos térmicos como pasteurização ou ultrapasteurização (Gonçalves, Uliana, et al., 2020). É de extrema importância adotar abordagens que diminuam a contaminação alimentar por aflatoxinas, ao passo que também evitem ou minimizem a transferência dessas substâncias para o leite. Isso tem como objetivo aprimorar a segurança alimentar, proteger a saúde dos consumidores e aumentar a rentabilidade na indústria de laticínios (Y. Jiang et al., 2021).

2.2.2 Fumonisinias

As fumonisinias (FUM) são um grupo de micotoxinas produzidas por *Fusarium verticillioides* e *Fusarium proliferatum*, e estão presentes em diversos tipos de substratos. Possuem hidrossolubilidade e têm estrutura poliálcool linear, caracterizada por duas cadeias laterais de ácido tricarbálico e uma porção de amina (J. Chen, Wen, et al., 2021).

Até o momento, dezoito diferentes tipos de fumonisinas foram identificados e isolados (Lumsangkul et al., 2019), incluindo a fumonisina B₁ (FB₁), que é a mais tóxica, e a fumonisina B₂ (FB₂). A FB₁ é uma das principais contaminantes, estando presente em cerca de 70% dos alimentos no mundo (J. Chen, Wei, et al., 2021; Renaud et al., 2021), o que pode alterar o valor nutricional e as características sensoriais da ração (Ismail et al., 2018), reduzir a ingestão de alimentos pelos animais, afetar a produção e causar impactos econômicos significativos (J. Chen, Wei, et al., 2021).

As FUM são encontradas de forma difundida em rações para animais, matérias-primas utilizadas na formulação de rações e até mesmo em alimentos destinados ao consumo humano. Essa disseminação ocorre devido à habilidade desses fungos micotoxigênicos em contaminar culturas agrícolas em regiões de climas temperados e quentes (EFSA, 2013). Assim como as AFLA, as FUM apresentam carcinogenicidade ou teratogenicidade (Khan et al., 2018; J. Wang et al., 2020), além de provocarem perdas econômicas na pecuária. Essa micotoxina pode ser transferida para a carne, ovos e leite, representando uma séria ameaça à saúde pública (J. Chen, Wen, et al., 2021; Lumsangkul et al., 2019; J. Wang et al., 2020).

Na Espanha, um estudo foi conduzido com o objetivo de avaliar a presença de micotoxinas em diferentes tipos de silagens destinadas à alimentação de vacas leiteiras. As amostras, que consistiam em silagens de milho, capim, alfafa, azevém e polpa de beterraba, foram analisadas em busca de contaminação por micotoxinas. Os resultados revelaram que aproximadamente 40% das amostras estavam contaminadas, sendo a FUM a micotoxina mais prevalente, especialmente na silagem de milho (Rodríguez-Blanco et al., 2021), destacando a relevância da monitorização da qualidade das silagens para garantir a segurança alimentar do gado leiteiro.

No Brasil, foi realizado um estudo que avaliou a presença simultânea de FUM, AFLA, OTA, ZEN e DON em rações à base de milho em propriedades nos estados de São Paulo e Santa Catarina. Os resultados revelaram que os níveis de FUM na farinha de milho excederam os limites de tolerância estabelecidos no Brasil, em comparação com outras toxinas. Além disso, foi constatada a presença simultânea de duas ou mais micotoxinas em 35% das amostras de alimentos e 51% das amostras de rações à base de milho. Esses achados apontam para uma exposição significativa dos animais de criação às micotoxinas presentes nas rações, destacando a importância, especialmente, da FUM (L. A. Franco et al., 2019).

No estudo conduzido por Awapak et al. (2021) na Tailândia, realizou-se uma avaliação da presença de metabólitos secundários e contaminantes em rações destinadas a vacas leiteiras. O estudo identificou um total de 113 metabólitos nas amostras analisadas, destacando a ZEN e as FUM como os mais frequentes. Além disso, foi observada a ocorrência simultânea de FB₁, AFB₁ e DON nesse contexto (Awapak et al., 2021).

A contaminação de alimentos por FUM representa um desafio global. É de extrema importância desenvolver métodos que possam reduzir a presença dessas micotoxinas em várias etapas, incluindo desde a produção no campo até o armazenamento, processamento e consumo pelos animais (Matusik & Deng, 2020). A adoção de boas práticas de gestão agrícola, o armazenamento correto, a implementação de análise de perigos e pontos críticos de controle (APPCC), a utilização de abordagens biológicas para controlar o *Fusarium spp.* e a aplicação de tratamentos químicos e físicos são estratégias eficazes para reduzir de forma significativa a contaminação por FUM (Alberts et al., 2016).

As FUM desencadeiam uma variedade de efeitos tóxicos em bovinos, englobando autofagia, apoptose, neurotoxicidade, imunotoxicidade, toxicidade reprodutiva, danos a tecidos e órgãos, além de potencial carcinogenicidade (Arumugam et al., 2021). A presença de disbiose ruminal ou no ambiente intestinal, bem como o aumento da permeabilidade do rúmen ou do epitélio intestinal e danos ao próprio epitélio intestinal, são indicadores comuns associados à essa micotoxina (Antonissen et al., 2014). Além de causar uma gama diversificada de distúrbios, a FUM também amplifica os efeitos tóxicos quando combinada com outras micotoxinas, como as aflatoxinas (Albonico et al., 2016; J. Chen, Wei, et al., 2021).

O mecanismo tóxico das FUM é complexo, uma vez que sua toxicidade interfere no metabolismo dos esfingolipídios e induz ao estresse oxidativo celular (Khan et al., 2018; Renaud et al., 2021). Isso leva à produção e acúmulo de radicais livres aeróbicos, que não são neutralizados pelos antioxidantes das células (Qu et al., 2022), resultando em peroxidação lipídica, dano oxidativo do DNA, redução da glutatona, glutatona peroxidase e superóxido dismutase, comprometendo a atividade fisiológica dos tecidos celulares (Khan et al., 2018; Sheik Abdul & Marnewick, 2020; Singh & Kang, 2017).

As FUM possuem um caráter citotóxico, hepatotóxico e nefrotóxico (Gallo et al., 2020). No ambiente intestinal, a presença dessas micotoxinas contribui para criar um cenário de imunossupressão, por meio da regulação negativa de sistemas moleculares, como o fator de

diferenciação mielóide 88 (MyD88) e *Toll-Like Receptor* (TLR) (Dąbrowski et al., 2017; Sugiyama et al., 2016). Estes sistemas desempenham um papel crucial na fase inicial do reconhecimento de patógenos, desencadeando a cascata inflamatória necessária para uma resposta eficaz contra esses agentes (Gallo et al., 2020). Entretanto, em ruminantes, ainda não há disponibilidade de dados que investiguem os efeitos das micotoxinas sobre os leucócitos circulantes.

A interseção entre FUM, saúde das vacas leiteiras e produção de leite cria desafios substanciais para a indústria pecuária. Além dos impactos diretos na saúde animal, as FUM podem ter efeitos indiretos, aumentando a susceptibilidade a infecções e diminuindo a eficiência do sistema imunológico (Dąbrowski et al., 2017; Gallo et al., 2020). Danos significativos nos cromossomos do espermatozoide bovino são observados durante a contaminação por FUM e resultam em toxicidade reprodutiva (Minervini et al., 2010). Equinos, suínos, ovinos e humanos também podem ser afetados por essa micotoxina (Lumsangkul et al., 2019), que é classificada como carcinógeno de classe 2B pela IARC (Mishra et al., 2020).

A incidência de FUM em amostras de leite não foi amplamente explorada, porém a transferência desses contaminantes para o leite e a resistência térmica de FB₁ e FB₂ em amostras submetidas à pasteurização (62 °C/30 min) e armazenadas a 4 °C por 11 dias é comprovada (Hammer et al., 1996; Spotti et al., 2001). Gazzotti et al. (2009) realizaram a quantificação de FB₁ em amostras de leite, por meio da cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa em tandem, e identificaram um nível médio de contaminação de 0,26 µg/kg em 80% das amostras (Gazzotti et al., 2009).

No Oriente Médio, a presença de FB₂ foi identificada em 10% das amostras de leite e produtos à base de cereais, excedendo os limites máximos estabelecidos pela UE (Z. U. Hassan et al., 2018). Além do leite de vaca, as FUM também são identificadas no leite de búfala. Uma pesquisa realizada por Youssef et al. (2023) identificou a presença dessas micotoxinas em 25% das amostras analisadas. Esses resultados destacam a importância não apenas de combater as FUM para proteger a saúde dos rebanhos, mas também como uma medida fundamental para manter a qualidade dos produtos derivados destinados ao consumo humano (Youssef et al., 2023).

2.2.3 Zearalenona

A zearalenona (ZEN) é uma micotoxina classificada como xenoestrogênio, produzida por *Fusarium graminearum* ou outras espécies *Fusarium sp.*, que desencadeia distúrbios hormonais e desequilíbrios reprodutivos (Mahato et al., 2021), incluindo a indução de hiperestrogenicidade em vacas (Barański et al., 2021). O processo de metabolização da ZEN tem início no rúmen e segue por vias hepáticas, envolvendo hidroxilação, glicuronidação e reações de conjugação da toxina. Essas transformações levam à formação de vários metabólitos, como o alfa-zearalenol (α -ZOL), que é 60 vezes mais potente que a ZEN, e o beta-zearalenol (β -ZOL), que é 0,2 vezes mais potente (Falkauskas et al., 2022).

A ZEN é tipicamente ingerida através de alimentos contaminados, e passa por modificações estruturais durante seu metabolismo, mediadas pela microbiota intestinal. Sua absorção é rápida pelo trato gastrointestinal e as alterações estruturais levam à formação de metabólitos reduzidos, oxidados e conjugados da ZEN (Alshannaq & Yu, 2017; G. L. Zhang et al., 2018).

A presença de ZEN é mais comum em alimentos e culturas que podem ser afetados por *F. graminearum*, como milho, trigo, arroz, cevada, sorgo, soja, aveia e seus subprodutos (Han et al., 2022; L. Li et al., 2021), especialmente sob condições chuvosas, como observado no trigo (Moraes et al., 2023). Além disso, produtos de origem animal, como o leite, também podem manifestar contaminação por ZEN quando as vacas apresentam altas concentrações dessa substância na corrente sanguínea (Han et al., 2022).

Um estudo conduzido no Irã investigou a contaminação por ZEN em diferentes alimentos, incluindo cevada, milho, silagem e farelo de trigo. Os resultados revelaram que o milho apresentou a maior incidência de contaminação, com uma concentração de 150 ng/g, seguido pela cevada com 136 ng/g e a silagem com 140 ng/g (Rashedi et al., 2012). Na China, foram coletadas e analisadas rações de 11 províncias diferentes. Os resultados indicaram que as rações à base de grãos secos de destilaria apresentaram o maior nível médio de contaminação por ZEN, atingindo 563,4 μ g/kg, seguida pela ração à base de milho, com nível médio de 393,1 μ g/kg (Pei et al., 2014).

No Brasil, grãos de arroz cultivados na região Sul apresentaram significativa presença de ZEN, com níveis variando entre 90,56 e 126,31 μ g/kg. Cerca de 36% das amostras excederam o limite máximo regulatório (Savi, Piacentini, et al., 2018). Na Índia, 84% das 117 amostras de cereais, incluindo trigo, arroz, milho e aveia, testaram positivas para ZEN, sendo que 33% delas ultrapassaram os limites estabelecidos pela UE (Rai et al., 2018). Na Polônia,

produtos à base de cereais também apresentaram ZEN, como farinha de milho, com média de 212,0 µg/kg, excedendo o limite de 75,0 µg/kg permitido (Pokrzywa & Surma, 2022).

A presença de ZEN está relacionada a condições climáticas propícias ao crescimento de fungos durante o cultivo e o armazenamento de alimentos. É conhecido que grãos colhidos precocemente e protegidos da chuva apresentam quantidades inferiores de ZEN em comparação com aqueles colhidos posteriormente ou que foram expostos à chuva antes da colheita (Moraes et al., 2023). A ocorrência dessa micotoxina nos alimentos é uma preocupação devido aos seus efeitos tóxicos em animais e humanos, além das implicações na segurança alimentar e qualidade dos produtos.

Após ser ingerida, a ZEN entra na corrente sanguínea e é distribuída para diversos órgãos, incluindo rins, intestino, ovários e testículos (Mally et al., 2016). Por meio da circulação entero-hepática, a ZEN alcança o fígado, onde passa por metabolização, resultando em uma molécula mais hidrossolúvel. Essa transformação facilita sua eliminação pelo sistema biliar, sendo excretada através da urina e fezes (Mally et al., 2016; G. L. Zhang et al., 2018). Em animais intoxicados, podemos identificar e quantificar os metabólitos circulantes de ZEN no fígado, intestino e fluidos como sangue, urina e leite (Barański et al., 2021; Falkauskas et al., 2022).

A ZEN é conhecida por sua toxicidade reprodutiva, devido à sua semelhança estrutural com o estrogênio endógeno. Essa semelhança permite que seus metabólitos se associem aos receptores de estradiol quando os níveis de estrogênio estão ausentes ou baixos, resultando em alterações morfológicas e biológicas nos órgãos reprodutivos (L. Li et al., 2021; G. L. Zhang et al., 2018). Animais expostos à toxicidade reprodutiva causada pela ZEN manifestam infertilidade, aumento no tamanho dos ovários e útero, diminuição na contagem de células espermáticas, redução nos níveis de hormônios reprodutivos e queda nas taxas de prenhez (Alshannaq & Yu, 2017; L. Li et al., 2021; Zhou et al., 2020).

Apesar da resistência das vacas ao efeito estrogênico da ZEN, devido à sua conversão predominante em β -ZOL em relação à α -ZOL (Liu & Applegate, 2020), quando esses animais estão intoxicados, podem manifestar condições como mastite, cistos ovarianos e piometra. É importante notar que o piometra, em particular, ocorre em animais com níveis mais elevados de contaminação no sangue, com uma concentração média de 44% (Barański et al., 2021). Além desses efeitos, a ZEN também possui a capacidade de induzir estresse oxidativo e apoptose em células epiteliais mamárias bovinas (Y. Fu et al., 2022; Y. R. Fu et al., 2019).

Além dos distúrbios reprodutivos, a ZEN pode desencadear uma variedade de alterações genéticas, incluindo genotoxicidade por fragmentação de DNA, formação de micronúcleos, anomalias cromossômicas e apoptose (Y. R. Fu et al., 2019; H. J. Lee et al., 2021). Além disso, outros efeitos que afetam as células, como inibição da proliferação celular, síntese de biomoléculas e distúrbios imunológicos, também podem ser observados (G. Cai et al., 2019; Islam et al., 2017; Karaman et al., 2020).

A toxicidade da ZEN em humanos ainda não foi conclusivamente estabelecida, assim como ocorre em animais. No entanto, evidências apontam para a capacidade da ZEN em causar a síndrome hiperestrogênica (Rai et al., 2020). Apesar de haver relatos de contaminação alimentar por ZEN em nível mundial, somente a UE e alguns países asiáticos estabeleceram limites regulatórios para esta micotoxina (European Community, 2006b).

A contaminação por ZEN acarreta perdas econômicas substanciais na agricultura e na pecuária, resultando em uma diminuição da produtividade e comprometendo a saúde dos animais devido aos seus efeitos estrogênicos (Rai et al., 2020). Além dos impactos nos aspectos reprodutivos, a presença de ZEN também leva a uma redução na diversidade microbiana do líquido ruminal, afetando inclusive os organismos eucarióticos (Hartinger et al., 2023).

A relação entre ZEN, saúde das vacas leiteiras e produção de leite apresenta desafios substanciais para a indústria pecuária. Na Argentina, Signorini et al., (2012) observou que a concentração de ZEN no leite cru foi medida em 0,125 µg/L, possivelmente associada às elevadas concentrações dessa micotoxina na dieta do gado (Signorini et al., 2012), a qual excedia 8,9% dos limites estabelecidos pela UE de 500 ppb (European Community, 2006a). Na China, ocorrências de ZEN foram identificadas em 23,3% das amostras de leite cru, 16,7% das amostras de leite pasteurizado e 25% das amostras de leite em pó (Huang et al., 2014).

A presença constante de ZEN na alimentação das vacas pode resultar em um aumento na concentração dessa micotoxina nos fluidos biológicos desses animais, pela tendência do organismo acumulá-la em seus tecidos. Vacas que receberam ração total misturada (TMR) contendo ZEN (500 ± 75 µg/kg - em matéria seca), duas vezes ao dia, demonstraram uma concentração média de 0,18 µg/L de ZEN no leite (Falkauskas et al., 2022).

Os níveis de ZEN no leite evidenciam a limitada capacidade do organismo das vacas em eliminar completamente a micotoxina por meio da urina e das fezes (L. Li et al., 2021; Seeling, Dänicke, Ueberschär, et al., 2007; G. L. Zhang et al., 2018). A disponibilização de

rações livres de micotoxinas para vacas pode levar a uma redução nas concentrações de ZEN e seus metabólitos no leite e em outros fluidos biológicos (Falkauskas et al., 2022). Isso, por sua vez, tem o potencial de mitigar os efeitos adversos sobre o rebanho e minimizar os impactos econômicos para os produtores.

2.2.4 Tricotecenos

Os tricotecenos constituem uma extensa família de micotoxinas estruturalmente relacionadas, produzidas por fungos pertencentes ao gênero *Fusarium*. Dentre essas micotoxinas, os tricotecenos dos tipos A (toxina T-2) e B (desoxinivalenol) despertam maior preocupação devido à sua considerável toxicidade amplamente reconhecida (El-Sayed et al., 2022). Dentro deste grupo de micotoxinas, o anel 12,13-epóxi, presente no desoxinivalenol e na toxina T-2, desempenha um papel crucial na sua toxicidade, tornando-as menos nocivas quando esse anel é aberto (Colović et al., 2019).

2.2.4.1 Toxina T-2

A toxina T-2, também conhecida como T-2 tricoteceno, pertence à categoria dos tricotecenos do tipo A e é produzida pelas espécies de *Fusarium spp.* A toxicidade sistêmica da T-2 ocorre por meio de exposição dérmica, oral ou respiratória. Além disso, objetos e superfícies contaminadas também representam potenciais fontes de contaminação por exposição direta à toxina T-2 (Adhikari et al., 2017; Nayakwadi et al., 2020). Esta micotoxina não é volátil e pode ser prontamente neutralizada por condições altamente ácidas ou alcalinas, além de poder ser reduzida por microrganismos com capacidade de detoxificação, resultando em alterações na sua estrutura química (Adhikari et al., 2017).

A toxina T-2 é produzida por fungos do gênero *Fusarium*, frequentemente encontrados em grãos e culturas agrícolas. A contaminação desses alimentos ocorre durante o crescimento, a colheita e o armazenamento inadequado. Na agricultura, a toxina T-2 apresenta um risco potencial para a saúde, devido à ampla ocorrência global de fungos micotoxigênicos em grãos (Polak-Śliwińska & Paszczyk, 2021). Sua presença é observada no trigo, milho, cevada, arroz e soja, sendo particularmente abundante na aveia e seus derivados (K. Zhang et al., 2017).

No momento, não há preocupações de saúde pública relacionadas a resíduos de T-2 em produtos de origem animal, como carne, leite e ovos (EFSA, 2011). No entanto, a toxina

T-2 afeta a medula óssea dos animais, desencadeando processos de apoptose, necrose celular, imunossupressão e danos orgânicos frequentemente associados à peroxidação lipídica (Polak-śliwińska & Paszczyk, 2021). Essa toxina é considerada o tricoteceno mais agudamente tóxico, com a sensibilidade variando entre diferentes espécies.

A toxina T-2 manifesta toxicidade tanto para plantas quanto para animais e seres humanos. A principal preocupação relacionada à toxina T-2 reside nas toxicoses subagudas, que podem progredir para quadros crônicos com manifestações clínicas pouco específicas. Entre os sinais, podem ser observados a inflamação da mucosa intestinal, diarreia, sialorreia e uma maior predisposição a infecções secundárias, que, quando combinados, levam a uma notável diminuição no desempenho produtivo dos animais (Polak-śliwińska & Paszczyk, 2021).

Os ruminantes demonstram relativa resistência à toxina T-2 em comparação com os animais monogástricos, devido à atividade de desepoxidação e desacetilação no rúmen (Nayakwadi et al., 2020). Entretanto, a exposição frequente de vacas leiteiras à toxina tem sido associada à recusa alimentar, perda de produção, gastroenterite, hemorragias intestinais e, em casos mais graves, óbito (Becker-Algeri et al., 2016). A intensidade da intoxicação por T-2 está diretamente relacionada à quantidade administrada e à forma de introdução da toxina no organismo. A excreção dessa toxina ocorre em uma proporção significativa (aproximadamente 80-90%) nas primeiras 48 horas após a ingestão, sem observar acúmulo nos tecidos (Adhikari et al., 2017).

A presença da toxina T-2 pode resultar em prejuízos à saúde, bem-estar e eficiência produtiva das vacas, afetando diretamente a qualidade do leite produzido. Apesar da escassez de relatos, estudos têm indicado que animais expostos a alimentos contaminados com a toxina T-2 passaram por processos de biotransformação e excreção dessas micotoxinas em fluidos biológicos, incluindo o leite (Robinson et al., 1979; Yoshizawa et al., 1981). Contudo, alguns resultados afirmam que o leite não é considerado uma fonte significativa dessas toxinas (Polak-śliwińska & Paszczyk, 2021). No entanto, a presença significativa da toxina no leite foi observada quando ocorreram altos níveis de tricotecenos nas rações e na silagem, aliados a desequilíbrios fisiológicos nos animais (Becker-Algeri et al., 2016).

Embora sua presença no leite não seja comumente identificada, estudos recentes têm indicado que a monitorização da toxina T-2 nesse substrato pode ser conduzida tanto por meio do método HPLC-MS/MS quanto pelo ensaio imunoenzimático competitivo indireto (ic-

ELISA). Este último se destaca como um método de triagem adequado para a detecção da toxina T-2 no leite (H. Xu et al., 2018).

2.2.4.2 Deoxinivalenol

O deoxinivalenol (DON), também conhecido como "vomitoxina" devido aos sinais de náuseas e vômitos provocados em animais e humanos, é uma micotoxina pertencente ao grupo dos tricotecenos do tipo B (Hooft & Bureau, 2021; Yao & Long, 2020). Essa micotoxina é produzida por diferentes espécies de fungos do gênero *Fusarium*. O consumo crônico de alimentos contaminados com DON está associado a uma variedade de sinais e sintomas em diferentes espécies de animais, incluindo anorexia, hipofagia, inapetência, conversão alimentar reduzida e supressão do sistema imunológico (Hooft & Bureau, 2021).

O DON é tóxico porque bloqueia a síntese de proteínas nas células. Isso acontece quando ele se liga ao sítio peptidil transferase do ribossomo, causando estresse nas células e danificando a estrutura dessa organela (Barbouche et al., 2020). É fundamental compreender os fatores que influenciam a cinética, o metabolismo e a biodisponibilidade do DON, uma vez que isso é crucial para a avaliação da transferência dessa toxina e de seus metabólitos para produtos de origem animal. Além disso, essa compreensão é vital para a detecção dos potenciais impactos adversos do DON na saúde e no desempenho das vacas.

Os fungos produtores de DON frequentemente infectam culturas de cereais, como trigo, cevada e milho (Mishra et al., 2020). A presença de DON nos alimentos consumidos pelas vacas leiteiras ocorre devido à infecção desses cultivos durante o crescimento, a colheita e o armazenamento inadequado (Barbouche et al., 2020; Mishra et al., 2020; Voss, 2010). Essa contaminação pode afetar diretamente a qualidade e a segurança dos produtos lácteos.

O DON possui uma notável estabilidade térmica, permitindo que suporte condições de temperatura elevadas (Vidal et al., 2018). Além disso, demonstra grande estabilidade em ambientes com pH ácido e em temperaturas elevadas, quando em meio aquoso (Mishra et al., 2014). É relevante destacar que a toxicidade do DON persiste mesmo após longos períodos de armazenamento, como visto em trigo que permaneceu contaminado por até quatro anos (Voss, 2010). A presença de DON nos alimentos aumenta as preocupações em relação à segurança alimentar, uma vez que essa micotoxina pode passar por hidrólise pela microflora intestinal (Bryła et al., 2018). Isso enfatiza a importância de realizar uma análise abrangente dos efeitos adversos decorrentes da exposição ao DON.

Os bovinos demonstram maior resistência ao DON em comparação aos monogástricos, uma vez que cerca de 90% da quantidade ingerida é convertida em de-epoxidoxinivalenol (DOM-1) por bactérias presentes no rúmen. Essa conversão pode ser realizada tanto por bactérias que ocorrem naturalmente no rúmen, quanto as que são suplementadas por aditivos alimentares antimicotoxinas (Novak et al., 2018). No entanto, é importante não negligenciar os efeitos adversos que essa toxina pode gerar em vacas, já que é possível detectar níveis de DOM-1 no sangue desses animais até 20 vezes mais elevados do que os níveis de DON presentes nos alimentos contaminados (Winkler et al., 2015).

A exposição de células bovinas ao DON desencadeia respostas hipóxicas, hipertônicas e ribotóxicas, como evidenciado por Bailey et al. (2019). Essas respostas celulares exercem um impacto significativo na produtividade das vacas, refletindo na diminuição dos teores de proteína e gordura no leite (Zhao et al., 2022), e na redução do volume de produção (J. Y. Lee et al., 2019). Além disso, as vacas podem manifestar deficiências na síntese proteica, o que é especialmente problemático para células imunes altamente proliferativas.

As células mononucleares presentes no sangue periférico bovino são mais suscetíveis às consequências negativas provocadas pelo DON, em comparação a aves e suínos (Novak et al., 2018). A toxicidade associada ao DON está intrinsecamente ligada à inibição da proliferação de subconjuntos de células T em bovinos, englobando células T CD4⁺, CD8β⁺ e γδ (Novak et al., 2018). Distúrbios provocados por DON também se manifestam em células epiteliais renais (Bailey et al., 2019) e células epiteliais intestinais (Reisinger et al., 2019).

A presença de DON na alimentação do gado também está associada a problemas reprodutivos, devido às altas concentrações do contaminante no fluido folicular de vacas leiteiras (Winkler et al., 2015). Além disso, danos significativos são observados nas células da granulosa (Guerrero-Netro et al., 2015) e nas células da teca ovariana (Guerrero-Netro et al., 2017), resultando na redução da motilidade dos espermatozoides bovinos e em falhas no desenvolvimento embrionário, devido a uma menor taxa de formação de blastocistos (Guerrero-Netro et al., 2021).

O DON induz a interrupções na síntese de proteínas eucarióticas, cujas origens estão na sua interação com o sítio peptidil transferase presente no ribossomo, resultando no fenômeno identificado como estresse ribotóxico. Esse estresse culmina na degradação das estruturas primordiais do ribossomo (Barbouche et al., 2020). Tais descobertas ressaltam a

complexidade das reações celulares em resposta ao DON e suas implicações em variadas espécies.

O impacto do DON é notório em células com metabolismo rápido, principalmente aquelas em processo de divisão celular, resultando na destruição de mitocôndrias e membranas celulares. Isso libera radicais livres, que desencadeiam a peroxidação lipídica, levando também à apoptose por meio do estresse oxidativo (Bailey et al., 2019; Yao & Long, 2020). Tais alterações têm como consequência a inflamação do tecido epitelial mamário bovino, o que pode ser uma explicação plausível para a diminuição na produção leiteira das vacas (J. Y. Lee et al., 2019; J. Wang et al., 2019).

A presença de DON na ração pode levar à redução na ingestão alimentar e afetar negativamente a absorção de nutrientes, resultando em diminuição na produção de leite e no bem-estar das vacas. Em vacas saudáveis alimentadas com dieta contaminada por DON, o principal produto do metabolismo microbiano dessa micotoxina é o di-epoxi-DON, um metabólito menos tóxico que pode ser excretado no leite (Dänicke & Brezina, 2013).

Seeling et al., (2007) observaram que a excreção diária de DON e di-epoxi-DON no leite de vacas alimentadas com trigo contaminado apresentou uma variação entre 1 e 10 µg e entre 14 e 104 µg, respectivamente. As taxas globais de transferência de DON no sangue e no leite foram de 0,0001 e 0,0002, respectivamente, enquanto para o di-epoxi-DON foram de 0,0004 e 0,0024. Foi observado um aumento significativo nas taxas globais de transferência de DON na forma de di-epoxi-DON no leite, conforme a produção de leite aumentava (Seeling, Dänicke, Valenta, et al., 2007).

Rubert et al., (2012) avaliaram a incidência natural de DON, 3-acetildeoxinivalenol e 15-acetildeoxinivalenol em alimentos infantis a base de leite, mas nenhuma amostra excedeu o limite máximo fixado pela UE para estas micotoxinas na alimentação infantil. No entanto, esta pesquisa destacou a ocorrência de micotoxinas em alimentos infantis à base de cereais. A atualidade é marcada por escassos relatos da presença natural desses compostos tóxicos em amostras de leite destinadas ao consumo humano.

A elevada frequência de ocorrência de DON em cereais destinados à alimentação animal ressalta a importância de conduzir estudos que avaliem o impacto dessa micotoxina e seus produtos de degradação em amostras de leite destinadas ao consumo humano (Soleimany et al., 2012). Além disso, é essencial a implementação de regulamentações para estabelecer limites desses contaminantes no leite e seus produtos derivados.

2.3 Mitigação de micotoxinas em alimentos destinados aos bovinos

Diversos métodos estão sendo investigados para a descontaminação de micotoxinas, abrangendo abordagens químicas, físicas e biológicas. No âmbito dos métodos químicos, ocorre a degradação estrutural por meio de aldeídos, agentes oxidantes, ácidos, bases e diferentes gases. Os métodos físicos, por sua vez, envolvem a extração das micotoxinas por meio de solventes ou a sua degradação através da exposição a altas temperaturas, radiação gama ou luz ultravioleta (Karlovsky et al., 2016). Já os métodos biológicos utilizam bactérias, leveduras ou suas enzimas e metabólitos para a descontaminação (Campagnollo et al., 2020; Corassin et al., 2013; Ismail et al., 2018; Oliveira et al., 2014). Todos esses métodos são direcionados à descontaminação ou à redução das micotoxinas presentes em matérias-primas alimentares.

2.3.1 Abordagens biológicas na prevenção de micotoxicoses em ruminantes

2.3.1.1 Leveduras

Os microrganismos desempenham diversas funções na mitigação dos efeitos adversos das micotoxinas em animais, agindo por meio da adsorção direta das toxinas ou pela modificação das condições no trato gastrointestinal. Uma abordagem comum é a utilização de leveduras probióticas. Esses microrganismos benéficos podem ser introduzidos na dieta dos animais para aprimorar o equilíbrio da microbiota intestinal, reduzindo, assim, os impactos das micotoxinas (Corassin et al., 2013; Gonçalves et al., 2017; Gonçalves, Rosim, et al., 2015; Hamad et al., 2022).

Os tratamentos biológicos, especialmente aqueles envolvendo leveduras, demonstraram eficácia em testes *in vitro* e *in vivo*, indicando um potencial uso para adsorção de micotoxinas, principalmente aflatoxinas (Campagnollo et al., 2020; Corassin et al., 2013). Gonçalves et al., (2017) observaram que que diferentes fontes de biomassa de *Saccharomyces cerevisiae* (SC) reduziram mais de 50% da AFB₁ no leite de vacas leiteiras expostas a 480µg de AFB₁ por dia. Isso sugere resultados promissores na utilização de subprodutos da fermentação industrial, como a parede celular e a levedura autolisada, como aditivos alimentares antimicotoxinas nas dietas de vacas leiteiras.

Keller et al., (2015) conduziram uma pesquisa sobre a descontaminação de forragem fornecida aos bovinos contaminada com ZEN e também utilizaram cepas de *Saccharomyces cerevisiae* (SC) isoladas. O estudo observou que a biotransformação realizada pelas cepas de SC favoreceu a formação de β -ZOL, que é menos estrogênico do que a ZEN e α -ZOL (Keller et al., 2015). Esses resultados sugerem que as cepas ativas podem atuar como aditivos antimicotoxinas para mitigar os efeitos metabólicos adversos (L. de A. Silva et al., 2021). Além disso, o uso combinado de probióticos e enzimas degradadoras de ZEN, como a ZHD101, também tem demonstrado uma abordagem eficaz na desintoxicação e biodegradação dessa micotoxina (N. Wang et al., 2019).

Nos últimos anos, uma série de estudos *in vitro* foram conduzidos em busca de compreender a biodegradação de tricotecenos no rúmen de vacas, através de modelos experimentais do trato gastrointestinal ou solo em laboratório. Essas pesquisas têm fornecido *insights* sobre os processos de biodegradação microbiana dos tricotecenos, incluindo vias como oxigenação, deepoxidação, epimerização e glicosilação. (Y. I. Hassan & Zhou, 2018). As abordagens para lidar com a toxina T-2 envolvem principalmente a utilização de substâncias naturais, probióticos e aminoácidos. Existem poucos estudos sobre a transformação das toxinas T-2 em HT-2, que é menos tóxica. Alguns microrganismos poderiam transformar T-2 em HT-2, mas a desintoxicação não foi registrada (Adhikari et al., 2017; Polak-śliwińska & Paszczyk, 2021).

A remoção ou degradação de micotoxinas da dieta bovina por leveduras apresenta boas perspectivas, sendo necessário aprimoramento no conhecimento dos mecanismos de desintoxicação por microrganismos, seus potenciais efeitos nas características dos alimentos e formas de utilização desses métodos (Gonçalves et al., 2017; Gonçalves, Muaz, et al., 2020; Khadivi et al., 2020). A utilização simultânea de compostos minerais, leveduras e compostos fitogênicos, também pode ser uma alternativa em prol de potencializar os efeitos de redução de micotoxinas na dieta (Almeida Rego et al., 2021; Horkey et al., 2021), buscando equilíbrio frente as vantagens e desvantagens da utilização de um único agente redutor.

2.3.1.2 Bactérias

As bactérias produtoras do ácido láctico, que ocorrem naturalmente, são amplamente consideradas microrganismos seguros, com um histórico extenso de uso em alimentos e presença na microflora intestinal. A maior parte das informações relacionadas aos efeitos das

bactérias lácticas (LABs) na remoção de micotoxinas está associada à sua capacidade de biodegradação, além de propriedades de adsorção, incluindo gêneros como *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus* e *Lactococcus* (Dong et al., 2023; Khadivi et al., 2020; Ondiek et al., 2022; Taheur et al., 2017). Esses microrganismos têm sido empregados na bioadsorção de micotoxinas em alimentos e rações.

A habilidade dos bacilos em remover micotoxinas é também corroborada pela capacidade de adsorção e biodegradação do DON pelo *Bacillus natto 16*, o que invalida a ação da micotoxina em alimentos (C. Zhang et al., 2021). Além disso, foi constatado que nanocorpos anti-FB₁ produzidos em *Escherichia coli* apresentaram uma remoção de 43,2% de FB₁ do leite quando utilizados na concentração de 1:2000 do nanocorpo 5 (Y. Chen et al., 2022). Na silagem de alfafa deteriorada, a fermentação promovida pela adição de LABs removeu 85,5% das micotoxinas (Zong et al., 2022).

Em rações líquidas, cepas de *Lactobacillus acidophilus* removeram 14% de ZEN após 24 horas de incubação, e 22% após 48 horas. Por sua vez, cepas de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* apresentaram redução de 10% após 24 horas e 23% após 48 horas (Ragoubi et al., 2021). Ademais, um estudo com cepas de *Enterococcus spp.* oriundas do rúmen demonstrou efeitos positivos na fermentação e qualidade sanitária das silagens de milho, resultando em melhorias nas comunidades microbianas e na desintoxicação de micotoxinas. Ambas as espécies estudadas, *E. faecium* e *E. faecalis*, foram capazes de reduzir as concentrações de DON, ZEN e AFB₁ nas silagens para ruminantes (Dong et al., 2023).

Cepas de LABs inativadas por calor a 100°C por 1 hora apresentam a capacidade de reduzir cerca de 50% dos níveis de AFB₁, OTA, ZEN e até 45% dos níveis de AFM₁ no leite (Møller et al., 2021). O tratamento térmico do leite utilizando *Lactobacillus plantarum*, combinado com filtração e centrifugação, resultou em uma remoção de até 96% de AFM₁ (Kuharić et al., 2018). Além disso, a eliminação de AFM₁ do leite em concentrações de 0,5 e 0,75 ng/ml foi alcançada através do uso de *Lactobacillus rhamnosus*, *L. plantarum* e *S. boulardii*, nas mesmas concentrações (107 e 109 UFC/ml). *Lactobacillus rhamnosus* atingiu 82% e 90% de remoção de AFM₁ do leite, *L. plantarum* apresentou 89% e 82%, enquanto *S. boulardii* obteve uma remoção de 75% e 90% (Khadivi et al., 2020).

Foram realizados experimentos de biotransformação e adsorção de micotoxinas em leite utilizando uma cultura de kefir contendo *Lactobacillus kefir*, *Acetobacter syzygii* e *Kazachstania servazzii*. O consórcio de kefir demonstrou adsorção e biotransformação de

micotoxinas, atingindo taxas de 82% e 31% para AFB₁, 94% e 12% para OTA, e 100% e 10% para ZEN, respectivamente (Taheur et al., 2017). Outra pesquisa examinou o impacto das LABs provenientes de produtos probióticos comerciais na eliminação de AFB₁ e toxina T-2. As bactérias viáveis removeram 46% de AFB₁ e 45% de T-2. A aplicação de calor às bactérias aumentou essa remoção, alcançando até 62% para AFB₁ e 52% para T-2, resultando em uma remoção mais eficaz das toxinas. (Ondiek et al., 2022).

É relevante destacar que a eficácia dessas abordagens pode variar com base nas propriedades específicas das micotoxinas, nas cepas bacterianas e nas condições do ambiente gastrointestinal. As bactérias ácido-láticas, também conhecidas como LABs, têm mostrado potencial no controle de micotoxinas em animais, especialmente pelo seu potencial de ligação às toxinas. No entanto, a pesquisa contínua é necessária para uma compreensão mais aprofundada sobre como esses microrganismos podem ser aplicados de forma eficaz e segura na pecuária (Corassin et al., 2013; Gonçalves, Muaz, et al., 2020; Kuharić et al., 2018; Ondiek et al., 2022).

2.3.1.3 Enzimas

As enzimas desempenham um papel crucial na degradação e neutralização de micotoxinas em sistemas biológicos (Ben Taheur et al., 2019). Elas são moléculas biológicas que catalisam reações químicas específicas, permitindo a conversão de substratos em produtos. No contexto do controle de micotoxinas, as enzimas podem ser utilizadas de diversas maneiras para mitigar os efeitos adversos dessas substâncias tóxicas em animais e humanos (Guan et al., 2021; H. Xu et al., 2018).

Uma abordagem é o uso de enzimas para degradar diretamente as micotoxinas (Ben Taheur et al., 2019; Guan et al., 2021). Alguns microrganismos possuem enzimas que têm a capacidade de quebrar ligações químicas nas moléculas das micotoxinas, transformando-as em compostos menos tóxicos ou mesmo inativos. Essa degradação enzimática pode ocorrer tanto no trato gastrointestinal dos animais (Gruber-Dorninger et al., 2021; H. Xu et al., 2018), quanto em alimentos contaminados (Kemboi et al., 2023; Z. Zhang et al., 2020).

Em modelo ruminal *in vitro*, o DON foi reduzido enzimaticamente por uma epoxidase de *Eubactéria BBSH 797* ao metabólito não tóxico DOM-1 (Debevere et al., 2020). Na biodegradação e desintoxicação do DON, em alguns casos, microrganismos ou cepas alteram sua estrutura, o convertendo em produtos de baixa ou nenhuma toxicidade por meio de

hidroxilação, hidrólise, des-epoxidação, desacetilação ou glicosilação (H. Xu et al., 2021). O uso de microrganismos ou enzimas sintetizadas por microrganismos para eliminar ou reduzir os danos do DON, são estratégias eficazes contra esta toxina e a promoção de micotoxicoses associada a esta e outras substâncias.

A Autoridade Europeia de Segurança Alimentar (EFSA) e outros grupos avaliaram a eficácia e segurança do aditivo alimentar FUMzymeVR, uma enzima produzida por uma cepa de levedura geneticamente modificada e atestaram sua capacidade de desintoxicação do FB₁ em alimentos (Masching et al., 2016; Rychen et al., 2016; Schwartz-Zimmermann et al., 2018). Outras enzimas, como a fumonisina esterase, também têm poder de converter FUM em metabólitos menos tóxicos e pode ser incluída na ração de bovinos (Kemboi et al., 2023).

Na remoção de ZEN, os métodos mais promissores utilizam enzimas de degradação expressas de forma heteróloga em vários hospedeiros microbianos maduros, como *Escherichia coli* e *Pichia pastoris* (J. Wang & Xie, 2020). Por outro lado, a remoção de ZEN por meio de fungos pode ocorrer através da redução de hidroxicetonas, clivagem de dupla ligação, hidroxilação, metilação, vulcanização, glicosilação e ruptura das cadeias carbônicas (H. Xu et al., 2021).

A lactonase, produzida por *Gliocladium roseum*, denominada ZENG, promove uma eficiente degradação de ZEN e de seus metabólitos tóxicos zearalenol (α -ZOL) e α -zearalanol (α -ZAL) (Z. Zhang et al., 2020), assim como outro metabólito enzimático denominado ZenA, que apresenta eficácia na prevenção dos efeitos estrogênicos da ração contaminada com ZEN (Debevere et al., 2020).

Várias enzimas têm sido estudadas para o controle de micotoxinas, incluindo as carboxilesterases (Distaso et al., 2023; K. Li et al., 2022; Z. Li et al., 2021), as epóxido hidrolases (König et al., 2019), e outras. No entanto, a aplicação eficaz de enzimas no controle de micotoxinas requer considerações como a estabilidade e a atividade da enzima em diferentes condições, a otimização das dosagens e a avaliação da segurança.

2.3.1.4 Extratos vegetais

A utilização de extratos vegetais tem sido amplamente estudada como uma abordagem natural e promissora no controle de micotoxinas presentes em alimentos e rações. Esses extratos são derivados de plantas e podem conter uma diversidade de compostos bioativos,

tais como polifenóis, flavonoides, terpenoides, entre outros. A adição de extratos naturais de plantas à ração revela-se uma alternativa segura em relação aos métodos convencionais de remoção de micotoxinas, evitando a presença de resíduos químicos tóxicos e minimizando os efeitos adversos para o gado (Perczak et al., 2019).

A utilização de extratos vegetais também pode ser uma vantagem na prevenção de micotoxicoses, sendo testadas com finalidade de redução do crescimento fúngico e produção de toxinas, além de apresentar recomendação como fonte nutricional. Um exemplo desses extratos são os óleos essenciais, obtidos de ervas comestíveis (Vaičiulienė et al., 2020).

Os óleos essenciais de limão, toranja, eucalipto e palmarosa demonstraram eficácia na desintoxicação da ZEN, oferecendo um meio interessante e eficaz para a remoção e/ou desintoxicação dessa micotoxina (Perczak et al., 2016). Além disso, os óleos essenciais de palmarosa e limão mostraram-se capazes de degradar DON *in vitro*, com a maior redução ocorrendo após 24 horas de experimento (até 72%). Essa degradação foi mais significativa em uma faixa de pH entre 3 e 6 e temperatura de 20 °C (Perczak et al., 2019).

A utilização do óleo essencial de gengibre (*Zingiber officinale Roscoe*) em concentrações de 4.000 e 5.000 µg/ml demonstrou uma inibição significativa na produção de FB₁ pelo *Fusarium verticillioides*, com reduções de 57% e 100%, respectivamente (Yamamoto-Ribeiro et al., 2013). Além disso, o óleo de canela, em uma concentração de 280 µg/ml, apresentou eficácia ao reduzir os níveis de FB₁ de 15,03 para 0,89 µg/ml (94,06%) (Xing et al., 2014). Esses resultados destacam o potencial promissor desses óleos como agentes na desintoxicação e controle da FB₁, especialmente em produtos derivados do milho.

A curcumina, um polifenol hidrofóbico presente no rizoma de *Curcuma longa*, também demonstrou a capacidade de aumentar os níveis de ceramida e melhorar os distúrbios metabólicos dos esfingolipídios causados pela toxicidade do FB₁ (García-Seisdedos et al., 2020). Ademais, análises *in vitro* do óleo essencial de *Litsea cubeba* revelou uma redução significativa no crescimento micelial de *F. verticillioides* e na produção de FB₁ e FB₂, demonstrando notáveis propriedades antioxidantes, fungicidas e antimicotoxigênicas (Pante et al., 2021).

Um estudo observou que as concentrações de AFB₁, DON, ZEN e toxina T-2, em amostras de silagem, foram reduzidas com a utilização de extrato de orégano (*Origanum vulgare*), extratos aquosos e etanólicos de tomilho (*Thymus vulgaris*), promovendo melhoria significativa na qualidade da ração e, conseqüente, garantia do bem-estar bovino (Vaičiulienė

et al., 2020). Outro estudo demonstrou um menor teor de FUM em culturas com adição de extrato de ervilha e farelo de aveia, estando relacionado aos metabólitos secundários e antioxidantes presentes nesses substratos (Perincherry et al., 2020).

É importante destacar que a eficácia dos extratos vegetais pode variar dependendo da fonte da planta, das condições de cultivo, do método de extração e da concentração utilizada. Além disso, a aplicação prática de extratos vegetais requer a otimização das dosagens, a avaliação da segurança e a consideração de possíveis interações com outros componentes da dieta (Perczak et al., 2019). A diversidade de extratos vegetais disponíveis oferece uma ampla gama de opções para os produtores de alimentos e rações enfrentarem o desafio das micotoxinas de maneira mais natural e sustentável.

2.3.2 Abordagens físicas na prevenção de micotoxicoses em ruminantes

Aditivos antimicotoxinas representam exemplos de métodos físicos empregados na descontaminação, visando à remoção ou degradação das micotoxinas por meio de sua ligação e imobilização. Isso ocorre através da formação de complexos que são subsequentemente excretados nas fezes (Di Gregorio et al., 2014; Gonçalves, Corassin, et al., 2015; Ismail et al., 2018). De maneira geral, essas substâncias podem ser categorizadas em minerais (como argilas, carvão ativado e terra de diatomáceas) e orgânicos (incluindo fibras vegetais, extratos de parede celular de leveduras e bactérias) (Ismail et al., 2018).

2.3.2.1 Argilas

As argilas são um grupo de minerais que possuem uma estrutura cristalina única, caracterizada pela interligação de tetraedros de sílica (SiO_4) e tetraedros de alumínio (AlO_4), formando uma matriz tridimensional. Essa estrutura proporciona uma superfície com cargas elétricas negativas e locais de adsorção, tornando as argilas eficazes na interação com moléculas carregadas positivamente, como as micotoxinas presentes nos alimentos (Kihal et al., 2022). Esse processo resulta na formação de complexos micotoxina-argila, que são relativamente estáveis e não são facilmente dissociados (Pate et al., 2018). Ao serem incluídas nas dietas dos animais, esses adsorventes ajudam a diminuir a biodisponibilidade das micotoxinas, reduzindo a absorção intestinal e, conseqüentemente, os riscos de intoxicação.

Pate et al. (2018) conduziram um estudo no qual diferentes concentrações de um argilomineral à base de aluminossilicato foram adicionados à dieta de vacas Holandesas. Essas vacas foram expostas a 100 µg de AFB₁/kg de matéria seca da dieta, e os resultados mostraram uma redução na presença de AFM₁ no leite, urina e fezes à medida que a concentração do adsorvente aumentava (Pate et al., 2018). Um fator fundamental nas características de um adsorvente eficaz reside em sua capacidade de manter uma ligação estável com a toxina em uma ampla faixa de pH. Isso é crucial, pois o produto deve ser capaz de resistir às variações de pH que ocorrem ao longo do trato gastrointestinal (Kihal et al., 2022; Rosim et al., 2018).

As bentonitas, que são argilominerais de origem vulcânica, demonstram uma notável capacidade de adsorção de micotoxinas, principalmente AFLA, devido à sua habilidade de realizar trocas iônicas (Ghazalah et al., 2021; Pappas et al., 2014; Vila-Donat et al., 2019). Vale ressaltar que essas substâncias não afetam a fermentação ruminal (Damato et al., 2022). Além disso, estudos tanto *in vitro* quanto *in vivo* evidenciaram sua capacidade moderada de adsorver outras micotoxinas, como ZEN e FUM (Avantaggiato et al., 2006; J. P. Wang et al., 2012).

No estudo realizado por Vila-Donat et al. (2019), a capacidade de adsorção de cinco micotoxinas (AFB₁, DON, OTA, FB₁ e ZEN) foi investigada em vinte e sete argilas bentoníticas de diversas origens geográficas. Dentre essas argilas, sete demonstraram a capacidade de adsorver a maior parte da AFB₁, enquanto três delas atingiram uma adsorção de OTA superior a 50%. Notavelmente, a capacidade de adsorção das bentonitas neste estudo aumentou à medida que a concentração da toxina diminuiu.

A eficácia das argilas aluminossilicatos como aditivos contra micotoxinas pode variar dependendo da estrutura da micotoxina, da concentração presente na dieta, do tipo de argila utilizada e das condições de pH e temperatura no trato gastrointestinal dos animais (Damato et al., 2022; Rosim et al., 2018; Vila-Donat et al., 2019). Portanto, estudos científicos e ensaios práticos são fundamentais para avaliar a eficiência desses adsorventes em situações reais de produção animal. Em geral, o uso de argilas representa uma estratégia promissora para mitigar os riscos associados à presença de micotoxinas nas rações, contribuindo para a saúde e o desempenho dos animais.

2.3.2.2 Zeólitas

Assim como as bentonitas, as zeólitas são exemplos comuns de adsorventes, notáveis por suas propriedades de troca catiônica e polaridade oposta (Arana et al., 2011; Dal Pozzo et al., 2016; Ghazalah et al., 2021). As zeólitas consistem em minerais cristalinos microporosos de aluminossilicato, caracterizados pela presença de tetraedros interligados de sílica (SiO_4) e alumínio (AlO_4). A adsorção das micotoxinas pelas zeólitas é resultado de interações físico-químicas, como atração eletrostática e ligações de van der Waals. Quando carregadas negativamente, essas estruturas aluminossilicatos atraem cátions carregados positivamente para seus poros, permitindo a retenção de moléculas como água, amônia, nitratos e carbonatos em sua estrutura porosa (Rosim et al., 2018). Essa capacidade de adsorção se estende também às micotoxinas presentes nos alimentos.

A administração dietética de zeólita clinoptilolita, especialmente em partículas de menor tamanho, na proporção de 200 g por vaca por dia, demonstrou ser eficaz na redução da concentração de AFM_1 no leite (Katsoulos et al., 2016). Além disso, a extração de aflatoxinas do leite utilizando estruturas de imidazolato zeolítico magnético modificadas com líquidos iônicos demonstrou eficiência, com taxas de recuperação superiores a 80,0% em apenas 15 minutos. As recuperações variaram entre 79,0% e 102,5%, com um desvio padrão relativo abaixo de 7,7% (Gao et al., 2019). A abordagem com Zeólita pode ser adotada como uma medida preventiva para mitigar os riscos decorrentes da presença de aflatoxinas.

O aluminossilicato de cálcio e sódio hidratados (HSCAS) é uma forma de zeólita empregada para a remoção de micotoxinas, sendo incorporado em alimentos e rações. O HSCAS age ao se ligar às micotoxinas, diminuindo a exposição de animais e seres humanos a essas substâncias nocivas. As pesquisas sobre HSCAS concentram-se, em particular, em aves e suínos (Wei et al., 2019; L. Zhang et al., 2020). Contudo, um estudo recente demonstrou que a transferência de AFB_1 da ração para AFM_1 foi significativamente reduzida com o uso de HSCAS ($1,04\% \pm 0,21$), em comparação com o controle ($1,7\% \pm 0,35$). Além disso, a excreção de AFM_1 no leite também diminuiu com a adição de HSCAS ($13,8 \mu\text{g/L} \pm 3,31$), em comparação com o grupo de controle ($22,1 \mu\text{g/L} \pm 5,33$) (Kihal et al., 2023).

As zeólitas oferecem uma superfície interna de alta área, o que potencializa sua capacidade de retenção de micotoxinas, contribuindo para minimizar sua biodisponibilidade no trato gastrointestinal dos animais. Nesse sentido, um estudo observou que a zeólita- Li^+ foi capaz de adsorver DON em 37% na concentração de 2 mg/mL além de inibir o crescimento de fungos *Fusarium spp.* (Savi, Cardoso, et al., 2018). As zeólitas podem ser incorporadas nas rações dos animais como aditivos alimentares, com o objetivo de reduzir os efeitos adversos

das micotoxinas na saúde e desempenho dos animais de produção (Gao et al., 2019; Katsoulos et al., 2016). Assim como outros adsorventes, a eficácia das zeólitas na remoção de micotoxinas pode variar dependendo das condições de pH, concentração de micotoxinas e interações com outros componentes presentes na dieta.

2.3.2.3 Carvões

Os carvões apresentam capacidade de adsorver uma ampla variedade de micotoxinas, incluindo AFLA, ZEN, FUM, OTA e outros compostos tóxicos presentes nas rações dos animais. Estes materiais, incluindo o carvão ativado, são reconhecidos por sua capacidade de adsorção, o que lhes permite ligar-se às micotoxinas e retirá-las de soluções líquidas, como água ou alimentos. Outros tipos de carvões, como carvão vegetal e o biocarvão, também podem ser utilizados com sucesso para essa finalidade, contribuindo significativamente para a segurança alimentar (Liao et al., 2013; H. P. Schmidt et al., 2019).

Os carvões vegetais, como o carvão de bambu, demonstram um potencial significativo para filtrar e adsorver micotoxinas. Esse tipo de carvão é produzido por meio da queima incompleta do bambu a altas temperaturas em uma atmosfera de nitrogênio (Y. H. Jiang et al., 2014; Liao et al., 2013). A capacidade de adsorção e a quantidade proporcionalmente adsorvida ($0,381 \mu\text{g}/\text{mg} \pm 0,955$) de AFB₁ pelo carvão de bambu foram observadas em estudos como superiores àquelas apresentadas pela argila esmectita ($0,372 \mu\text{g}/\text{mg} \pm 0,931$), um argilomineral que é um componente primário da bentonita. Isso foi particularmente evidente durante a fermentação ruminal *in vitro* de uma mistura de ração rica em feno (Y. H. Jiang et al., 2014).

O biocarvão, também denominado carvão ativado derivado de materiais orgânicos, é empregado na eliminação de micotoxinas. Ele consiste em um pó insolúvel que resulta da pirólise de vários compostos orgânicos, seguida de ativação química ou física, com o objetivo de criar uma estrutura altamente porosa. De acordo com a literatura, o carvão ativado demonstra ser eficaz na adsorção de micotoxinas, incluindo o DON, em experimentos *in vitro* (Avantaggiato et al., 2004; H. P. Schmidt et al., 2019; Vila-Donat et al., 2018).

Um estudo investigou a capacidade de diferentes adsorventes antimicotoxinas, incluindo carvão ativado, bentonita, aluminossilicato, heulandita e uma levedura, de

sequestrar diversas micotoxinas. Os resultados revelaram que o carvão ativado apresentou a maior taxa de sequestro de DON, atingindo 99,1%, o que foi significativamente superior aos outros produtos testados. No caso da micotoxina ZEN, a bentonita F (97,0%), o aluminossilicato A (99,6%) e o carvão ativado (100,0%) demonstraram as maiores taxas de sequestro entre todos os agentes testados. No geral, a maioria dos agentes teve a capacidade de se ligar à AFB₁, enquanto apenas o carvão ativado conseguiu sequestrar eficazmente DON e ZEN (Ahn et al., 2022).

Os carvões ativados desempenham um papel crucial na detecção de aflatoxinas devido à sua notável capacidade de adsorção e interação com íons metálicos. Essa interação facilita a identificação das aflatoxinas durante as etapas de análise. A presença de íons metálicos, como ferro e magnésio, no carvão ativado pode significativamente melhorar a eficácia da detecção de fungos produtores de aflatoxinas. Isso desempenha um papel essencial em aplicações de análise e monitoramento de micotoxinas em alimentos e rações (Suzuki & Toyoda, 2019).

As propriedades de adsorção do carvão ativado são influenciadas pela matéria-prima utilizada, pela área superficial e pela distribuição do tamanho dos poros (Kolossova & Stroka, 2011). No entanto, o carvão ativado não apresenta especificidade em sua adsorção, o que significa que nutrientes essenciais também podem ser retidos, especialmente quando suas concentrações na ração são significativamente maiores do que as das micotoxinas. Estudos demonstraram que o carvão ativado possui alta afinidade pela adsorção de vitaminas e minerais essenciais, os quais desempenham um papel vital no crescimento e desenvolvimento animal (Vekiru et al., 2007).

2.3.2.4 Biomateriais

Os biomateriais, provenientes de fontes naturais como plantas, resíduos agrícolas e microrganismos, apresentam diversas vantagens em relação aos adsorventes. Entre esses biomateriais, encontram-se polímeros naturais, resinas, quitosana, celulose, lignina, entre outros. Esses materiais podem ser modificados de forma funcional para aprimorar suas propriedades de adsorção e seletividade, com o objetivo de remover micotoxinas específicas. A origem natural dos biomateriais frequentemente os torna mais seguros e adequados para aplicação em alimentos e rações.

As fibras micronizadas são materiais vegetais que passaram por um processo de micronização, sendo reduzidas a partículas extremamente pequenas. Essas fibras são obtidas a

partir de cereais, como trigo, cevada, aveia, ou de leguminosas, como a casca de ervilha. Elas são compostas principalmente por celulose, hemicelulose e lignina e têm sido empregadas como adsorventes de micotoxinas, devido à sua favorável capacidade de adsorção no intestino e ao aumento da excreção fecal (Aoudia et al., 2009). Entretanto, grande parte dos estudos ainda se concentram em animais de laboratório (Aoudia et al., 2009; Kong et al., 2014).

Bagaços de uva, resíduos de alcachofra e cascas de amêndoa mostraram-se altamente eficazes *in vitro* contra AFB₁, ZEN e OTA. Sua capacidade de adsorção não foi afetada pelo pH do ambiente, e a fração adsorvida permaneceu estável mesmo quando o pH foi alterado de ácido para neutro (Greco et al., 2019). Dessa forma, alguns subprodutos agrícolas podem encontrar aplicações tecnológicas como aditivos alimentares antimicotoxinas.

Experimentos de adsorção com bagaço de uvas vermelhas (polpa e casca) mostraram capacidade de adsorver várias micotoxinas, sendo AFB₁ a mais adsorvida, seguida por ZEN, OTA e FB₁ (Avantaggiato et al., 2014). A farinha de semente de uva também adsorveu *in vitro* a AFB₁ e a ZEN. A máxima adsorção ocorreu com o uso de 30 mg do subproduto, ligando 85,9% de AFB₁ a 29 mg/mL, pH 5,95 e 33,6 °C, e 83,7% de ZEN a 28 mg/mL, pH 5,76 e 31,7 °C (Palade et al., 2020). A eficácia dos resíduos de uva na redução de micotoxinas é bem documentada *in vitro*, mas há evidências de sua eficácia *in vivo* na redução e excreção de micotoxinas em monogástricos, com o uso de biomarcadores urinários (Gambacorta et al., 2016). Estudos em ruminantes ainda são escassos.

A casca de *Durian Monthong* (*Durio zibthinus*) foi submetida a um processo de tratamento com ácido para aumentar sua porosidade, área superficial e modificar sua carga superficial, visando melhorar sua capacidade de adsorção de micotoxinas. Após as análises, as amostras tratadas com ácido demonstraram uma notável capacidade de adsorver AFB₁ (98,4%), ZEN (98,4%), OTA (97,3%), FB₁ (86,1%) e DON (2,0%). No entanto, o pH teve um impacto significativo na adsorção de OTA e FB₁ (Adunphatcharaphon et al., 2020).

A combinação de biomateriais com outros adsorventes, como carvão ativado ou zeólitas, pode melhorar a eficácia na remoção de micotoxinas, resultando em um efeito sinérgico e ampliando o espectro de micotoxinas capturadas. No entanto, é crucial observar que adsorventes orgânicos, como fibras de cereais, leguminosas, polpas e cascas de frutas, podem estar sujeitos à contaminação por fungos, sendo aconselhável realizar análises nesses materiais antes do uso para verificar a possível presença de micotoxinas e garantir a segurança do processo (Vila-Donat et al., 2018).

2.4 Importância dos biomarcadores para micotoxinas

A eficácia dos aditivos antimicotoxinas, empregados para reduzir a exposição de animais e seres humanos às aflatoxinas, tem sido avaliada por meio da utilização de biomarcadores (Adépo et al., 2019; P. Wang et al., 2008). Os biomarcadores desempenham um papel crucial na avaliação dos riscos associados à exposição às micotoxinas e na compreensão de seus efeitos na saúde humana e animal. Esses marcadores biológicos são substâncias ou sinais que indicam a presença, exposição ou efeitos de micotoxinas e demais substância tóxicas no organismo (Adépo et al., 2019; Gambacorta et al., 2016).

Biomarcadores de micotoxinas são produtos resultantes da via metabólica bioquímica, caracterizados por sua especificidade, sensibilidade e facilidade de quantificação em concentrações adequadas. Para uma avaliação precisa dos riscos associados à exposição a essas substâncias, é fundamental compreender a biotransformação das micotoxinas e identificar quais biomarcadores são confiáveis (Owen et al., 2008). Esses biomarcadores podem incluir a própria substância original, seus metabólitos ou parâmetros biológicos suscetíveis a alterações devido à interação com outras biomoléculas ou compartimentos do organismo (Llorens et al., 2022).

Foram realizadas análises de biomarcadores em novilhas em crescimento, com o objetivo de avaliar os efeitos crônicos da exposição a AFLA e FUM. Os resultados revelaram que os animais apresentaram níveis reduzidos de glicemia plasmática, alterações no estado nutricional e danos hepáticos duradouros, que culminaram em um atraso na puberdade das novilhas. O indicador sanguíneo mais significativo observado foi a atividade da enzima γ -glutamil transferase no plasma, que permaneceu alterada mesmo após a remoção das micotoxinas (Abeni et al., 2014).

Os biomarcadores são encontrados em matrizes biológicas em concentrações muito baixas, portanto, é comum utilizar uma técnica altamente sensível, como a espectrometria de massa em tandem, para quantificar vários biomarcadores simultaneamente. No entanto, a preparação de amostras para métodos que envolvem várias micotoxinas ainda representa um desafio (Tkaczyk & Jedziniak, 2021).

O α -ZOL e o β -ZOL, juntamente com a ZEN não metabolizada, representam os biomarcadores mais comuns para detectar a presença dessa micotoxina proveniente da

ingestão de alimentos. Na urina, a ZEN e seus metabólitos são predominantemente excretados sob a forma conjugada com ácido glucurônico ou sulfatos. Estes metabólitos desempenham um papel essencial na avaliação da exposição à ZEN por meio da análise da urina, sendo utilizados como indicadores confiáveis (Llorens et al., 2022).

A toxina T-2 está relacionada a biomarcadores, como receptor do hormônio folículo-estimulante (FSHR) e a proteína de ligação ao andrógeno (ABP), que simplificam a avaliação da expressão dos danos induzidos por essa toxina nas células de Sertoli. Em contrapartida, os biomarcadores ocludina (Ocln), zônula ocluden-1 (ZO-1), Conexina 43 (Cx-43) e N-Caderina (N-cad) são indicadores funcionais dessas células cultivadas *in vitro*. A toxina T-2 inibe a síntese de proteínas desses biomarcadores, comprometendo a integridade da barreira hemato-testicular e resultando em danos nas células de Sertoli devido à desestruturação das conexões celulares. Isso resulta em um aumento nos níveis dos biomarcadores FSHR e ABP, que estão diretamente associados ao dano celular. (X. Yang et al., 2021).

Biomarcadores como a β 2-microglobulina e a N-acetil- β -D-glucosaminidase são frequentemente utilizados para avaliar os efeitos ambientais causados por micotoxinas. Além disso, a molécula 1 de lesão renal e a lipocalina, associada à gelatinase de neutrófilos, são marcadores eficazes para a detecção de nefropatia induzida por micotoxinas em humanos e animais (Ráduly et al., 2023). A criação de biomarcadores validados é essencial para diminuir a incerteza associada à avaliação de risco de muitas micotoxinas e para determinar com um grau razoável de certeza se uma micotoxina, em particular, contribui para surtos de doenças (Riley et al., 2011).

Os biomarcadores devem ser analisados em conjunto com informações clínicas e epidemiológicas adicionais para uma compreensão abrangente dos riscos à saúde. Esses biomarcadores desempenham um papel crucial na avaliação precisa e na formulação de abordagens para gerenciar e prevenir os riscos relacionados às micotoxinas. Além disso, o estudo do perfil metabolômico resultante da exposição dietética a micotoxinas pode ser valioso tanto para uma avaliação completa de exposições individuais quanto para a identificação de biomarcadores relacionados à exposição crônica (De Ruyck et al., 2020).

3. METODOLOGIA

3.1 Animais experimentais e tratamentos

Este estudo foi conduzido entre abril e julho de 2022 nas instalações do Laboratório de Pesquisa em Bovinos de Leite (LPBL) e no Laboratório de Microbiologia e Micotoxicologia de Alimentos (LMMA) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade de São Paulo (USP), localizado em Pirassununga, Brasil. A pesquisa foi realizada com a aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da FMVZ/USP, sob o protocolo 6324160123. O período experimental abrangeu um total de 84 dias, durante os quais todas as vacas leiteiras experimentais receberam as dietas de tratamento de forma adequada ao longo do experimento. Os animais participantes do estudo consistiram em um grupo de 12 vacas da raça Holandesa (165 ± 45 DIM, 557 ± 49 kg PC e $32,1 \pm 4,57$ kg/d de produção de leite no início do experimento), que estavam no intervalo de 150 a 250 dias de lactação e apresentavam características semelhantes entre si.

Para otimizar a análise das distribuições em todos os tratamentos avaliados, utilizamos um quadrado latino 4×4 replicado. O experimento foi dividido em quatro períodos, cada um com duração de 21 dias. Nos primeiros 14 dias de cada período, as vacas foram submetidas a um processo de adaptação às dietas experimentais, enquanto os sete dias seguintes foram destinados para desafio com micotoxinas e coleta de dados.

Os tratamentos foram: 1) grupo controle (CON), composto por dieta basal sem aditivos antimicotoxinas; 2) grupo aditivo antimicotoxina 1 (AD1), com a adição de 25 g/vaca/dia de HSCAS (aluminossilicato de cálcio e sódio hidratado) ao concentrado da dieta basal; 3) grupo aditivo antimicotoxina 2 (AD2), com a inclusão de 15 g/vaca/dia de *Mycofix® Plus 5.0* (DSM-firmenich Ltda., São Paulo, Brasil) ao concentrado da dieta basal; e 4) grupo aditivo antimicotoxina (AD3), com a adição de 30 g/vaca/dia de *Mycofix® Plus 5.0* (DSM-firmenich Ltda., São Paulo, Brasil) ao concentrado da dieta basal (Figura 1). As doses utilizadas seguiram a recomendação do fabricante.

Segundo o fabricante, o mecanismo de ação do *Mycofix® Plus 5.0* envolve três propriedades fundamentais (Grenier et al., 2013; Murugesan et al., 2015; Pietri et al., 2009): (1) Componentes inorgânicos, como a bentonita, que podem adsorver micotoxinas polares e apolares; (2) A cepa de *Eubacterium* Biomin BBSH797, junto a componentes biológicos derivados de levedura inativada, desativam tricotecenos e ZEN. Além disso, uma enzima purificada chamada fumisin esterase (a uma concentração de 30.000 U/kg de *Mycofix®*

Plus 5.0) transforma FUM em metabólitos não tóxicos; (3) Substâncias ficolíticas, caracterizadas como uma mistura de plantas e extratos de algas, oferecem "bioproteção" que protege órgãos vulneráveis como o fígado e fortalece o sistema imunológico dos animais.

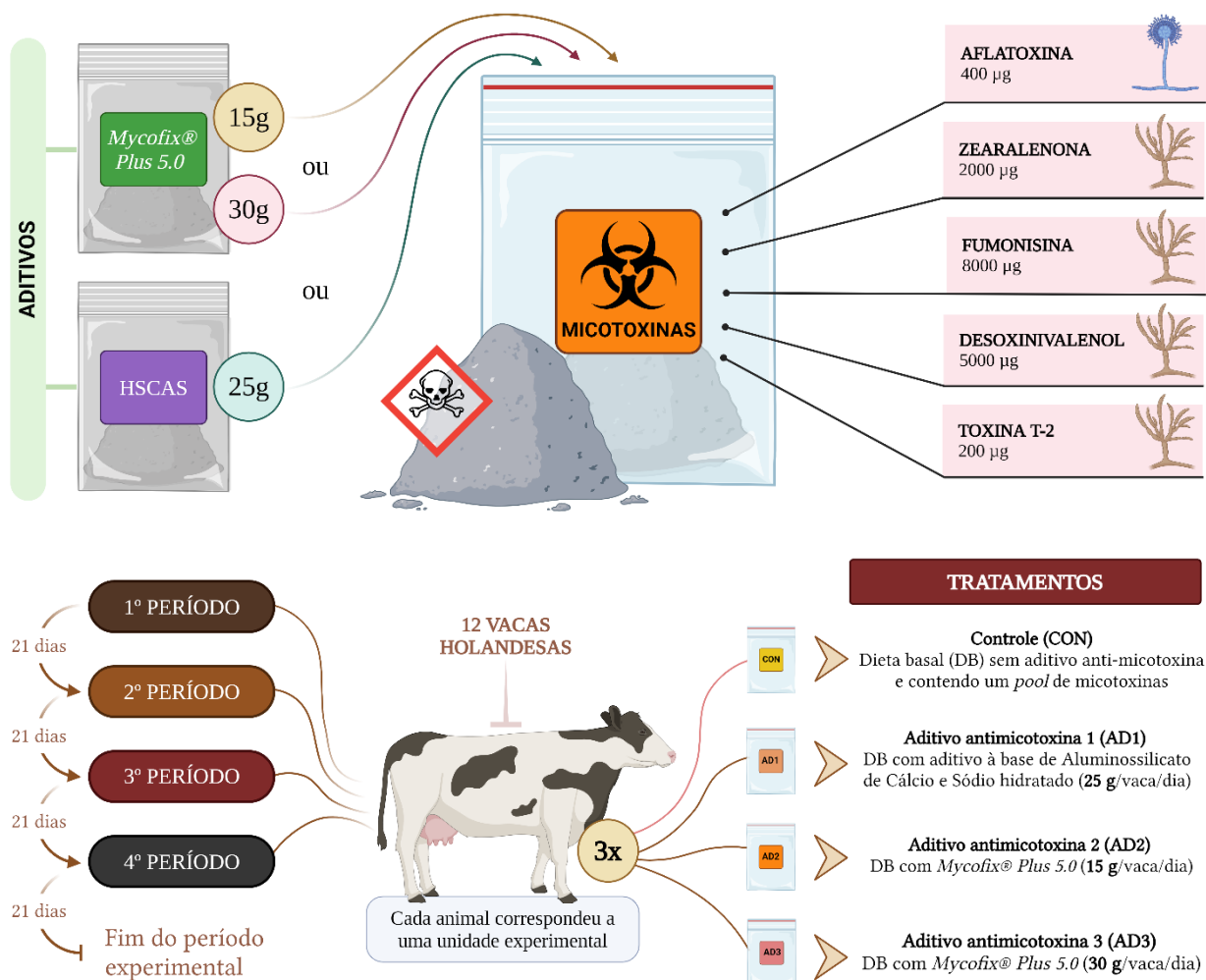


Figura 1. Desenho do ensaio

As vacas foram alojadas em galpões com baias individuais (17,5 m² de área), com piso de concreto, cama de areia, comedouro, bebedouro e sistema de ventilação forçada. As dietas foram elaboradas seguindo as diretrizes estabelecidas pelo NRC (2001), adotando uma proporção equilibrada de volumoso para concentrado de 48:52. Os animais receberam alimentação duas vezes ao dia, com a quantidade fornecida ajustada de acordo com o consumo de matéria seca do dia anterior. As recusas de cada vaca foram pesadas diariamente para manter as sobras entre 5 e 10% (em uma base alimentada) da ração fornecida no dia

anterior. As rações foram preparadas e fornecidas como uma ração total mista (TMR). Água e dieta foram fornecidas "*ad libitum*" durante todo o período experimental. O volumoso utilizado no experimento foi silagem de milho. A formulação da dieta visou satisfazer demandas nutricionais de vacas em fase de lactação, com peso vivo médio de cerca de 600 kg, produzindo diariamente 28,0 kg de leite contendo 3,5% de gordura.

3.2 Produção e avaliação de micotoxinas nas dietas

As doses de micotoxinas aplicadas neste estudo foram estabelecidas com base em uma investigação preliminar realizada com o propósito de identificar os tipos e níveis predominantes de micotoxinas presentes nas fazendas leiteiras do Brasil (Gruber-Dorninger et al., 2019).

A produção das aflatoxinas (B₁, B₂, G₁ e G₂), fumonisinas (B₁ e B₂), toxina T-2, DON e ZEN foi realizada nas instalações do Laboratório de Microbiologia e Micotoxicologia de Alimentos (LMMA) e do Laboratório de Controle e Descontaminação de Micotoxinas (LCDM) do Departamento de Engenharia de Alimentos da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (FZEA) da USP seguindo o protocolo de Muller et al., (2017). Fungos específicos foram cultivados para a síntese das micotoxinas desejadas durante a fermentação natural de amostras de arroz, milho ou trigo. A concentração de cada micotoxina na dieta foi padronizado durante todo o período experimental. Após a pesagem, essas micotoxinas foram adicionados e misturados às dietas nos últimos 7 dias de cada período experimental. O estoque de micotoxinas foi armazenado em recipientes até a sua utilização. Uma combinação de 400 µg de AFB, 5000 µg de DON, 2000 µg de ZEN, 8000 µg de FUM e 200 µg de T-2 foi administrada diariamente durante os últimos 7 dias, correspondendo a etapa de contaminação dos animais, ao final de cada período experimental. A suplementação diária de aditivos antimicotoxinas foi adicionada a mistura de concentrado.

Uma vez por semana, uma amostra de TMR foi coletada e armazenada para análise e monitoramento da presença de micotoxinas. Para a avaliação das micotoxinas, as amostras individuais foram encaminhadas aos LMMA e LCDM. A quantificação de nove diferentes micotoxinas foi conduzida por meio de um método validado de cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massa em tandem por ionização por *eletrospray* (UPLC-ESI-MS/MS, *Waters Acquity Tqd*; *Waters Corp.*, Milford, MA, EUA).

3.3 Multi-micotoxinas e avaliação de biomarcadores

Foram avaliados biomarcadores multi-micotoxinas em amostras de leite, urina e sangue de vacas leiteiras (Figura 2). As amostras de leite foram coletadas duas vezes durante cada período experimental, especificamente no 14º e no último dia do período (21º dia), durante o processo de ordenha das vacas. A urina também foi obtida duas vezes (14 e 21º dia) durante cada período experimental, através de estímulo sub-vulvar, sendo coletada 2 horas após a alimentação matinal das vacas. As amostras de leite e urina (40 ml) foram devidamente acondicionadas em tubos Falcon. Quanto às amostras de sangue (10 ml), estas foram obtidas no final de cada período experimental por meio de punção da veia caudal. A coleta ocorreu duas horas após a alimentação matinal das vacas, utilizando um sistema a vácuo (Vacutainer®) com tubos contendo anticoagulante à base de heparina de lítio.

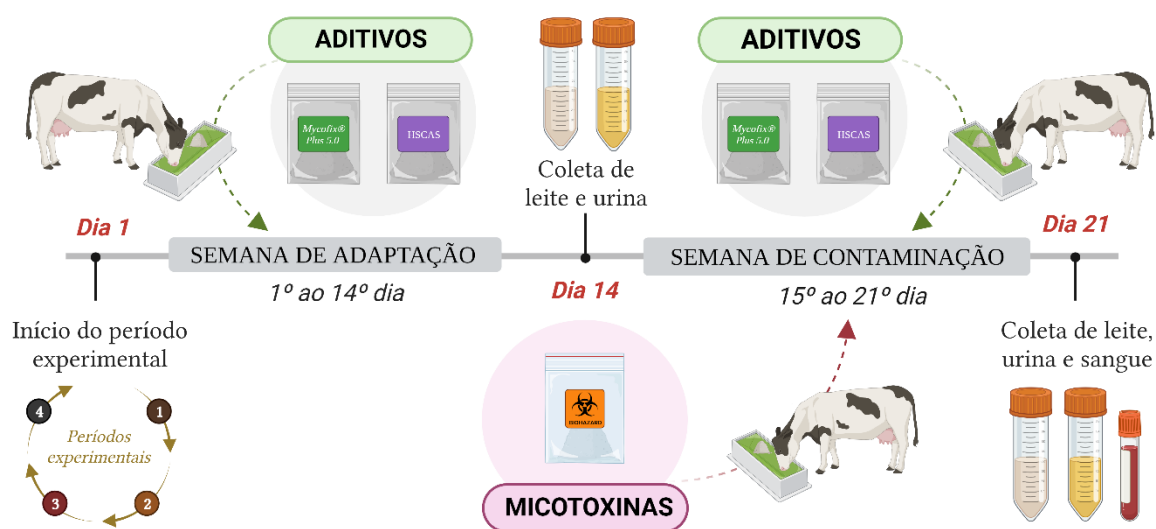


Figura 2. Esquema de execução dos períodos

Antes da determinação das multi-micotoxinas no leite, a produção diária de leite foi monitorada e os dados dos últimos sete dias de cada período experimental foram registrados. Para a avaliação das multi-micotoxinas no leite e na urina, as amostras foram coletadas no dia anterior à administração de um *pool* de micotoxinas e no último dia do período de contaminação. As amostras de sangue foram coletadas no último dia de cada período de contaminação por multi-micotoxinas. Todas as amostras, sem adição de conservante, foram armazenadas sob refrigeração a -80 °C antes das análises.

A determinação de multi-micotoxinas (AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂, DON, FUM₁, FUM₂, T₂ e ZEN) nas amostras de dieta, leite, urina e sangue foi realizada por meio de um sistema de cromatografia líquida de ultra eficiência (UPLC) *Waters Acquity I-Class* (*Waters*, Milford, MA, EUA), equipado com uma coluna BEH C18 (2,1 × 50 mm, 1,7 µm) e acoplado a um espectrômetro de massas Xevo TQ-S (*Waters*, Milford, MA, EUA). As análises de espectrometria de massas (MS) foram conduzidas no modo de monitoramento de reação múltipla (MRM), utilizando ionização por *electrospray* (ESI) em íon positivo. Os procedimentos cromatográficos, os parâmetros MS e as transições MRM (conforme Tabelas 1, 2 e 3) foram consistentes com os adotados por Franco et al. (2019).

Tabela 1. Parâmetros de desempenho do método para determinação de micotoxinas em amostras de rações à base de ração total mista (TMR).

| Micotoxina | TR (min) | Faixa de concentração (µg/kg) | Faixa de AR (%) | Faixa SSE (%) | Faixa RE (%) | LOD (µg/kg) | LOQ (µg/kg) |
|------------------|----------|-------------------------------|-----------------|---------------|--------------|-------------|-------------|
| AFB ₁ | 4,80 | 1.2-20 | 101-102 | 92-93 | 110 | 0,4 | 0,8 |
| AFB ₂ | 4,50 | 1.2-20 | 100 | 93-94 | 106-107 | 0,4 | 0,8 |
| AFG ₁ | 4.46 | 1.2-20 | 105-109 | 103-107 | 101-102 | 0,4 | 0,8 |
| AFG ₂ | 4.18 | 1.2-20 | 99 | 95 | 104 | 0,5 | 0,9 |
| DON | 1,98 | 9.3-150 | 93 | 89-91 | 102-104 | 5.6 | 16 |
| FB ₁ | 5.40 | 1.2-20 | 105 | 95-101 | 103-110 | 0,9 | 2.0 |
| FB ₂ | 3,74 | 1.2-20 | 92 | 96 | 96 | 0,7 | 2.0 |
| T ₂ | 5.91 | 1.2-20 | 105-115 | 97 | 105-108 | 0,3 | 1,0 |
| ZEN | 5,98 | 1.2-20 | 103 | 105 | 98 | 0,12 | 0,3 |

TR: Tempo de retenção; AR: Recuperação aparente; SSE: Supressão/aumento do sinal; RE: Recuperação de extração; LOD: Limite de detecção; LOQ: Limite de quantificação. AF: aflatoxina; DON: desoxinivalenol; FB: fumonisina; ZEN: zearalenona.

Tabela 2. Parâmetros de desempenho do método para determinação de micotoxinas em amostras de leite de vacas leiteiras.

| Micotoxina | TR (min) | Faixa de concentração (µg/kg) | Faixa de AR (%) | Faixa SSE (%) | Faixa RE (%) | LOD (µg/L) | LOQ (µg/L) |
|------------------|----------|-------------------------------|-----------------|---------------|--------------|------------|------------|
| AFM ₁ | 4.09 | 0,01-0,27 | 80,9 | 101,0 | 80.2 | 0,001 | 0,005 |
| DON | 2.04 | 0,10-5,0 | 75,5 | 90.2 | 83,7 | 0,033 | 1.223 |
| FB ₁ | 5.34 | 0,01-0,27 | 81.1 | 99,9 | 81.2 | 0,003 | 0,007 |
| FB ₂ | 5.74 | 0,01-0,27 | 82,4 | 102,5 | 80,4 | 0,001 | 0,033 |
| T ₂ | 5.91 | 0,01-0,27 | 59.2 | 74,8 | 80.1 | 0,013 | 0,040 |
| ZEN | 6.01 | 0,01-0,27 | 92,6 | 99,9 | 92,7 | 0,001 | 0,003 |

TR: Tempo de retenção; AR: Recuperação aparente; SSE: Supressão/aumento do sinal; RE: Recuperação de extração; LOD: Limite de detecção; LOQ: Limite de quantificação. AF: aflatoxina; DON: desoxinivalenol; FB: fumonisina; ZEN: zearalenona.

Tabela 3. Parâmetros de desempenho do método para determinação de micotoxinas em amostras de urina e plasma sanguíneo de vacas leiteiras.

| Micotoxina | TR (min) | Faixa de concentração ($\mu\text{g}/\text{kg}$) | Faixa de AR (%) | Faixa SSE (%) | Faixa RE (%) | LOD ($\mu\text{g}/\text{L}$) | LOQ ($\mu\text{g}/\text{L}$) |
|------------------|----------|---|-----------------|---------------|--------------|--------------------------------|--------------------------------|
| AFM ₁ | 4.03 | 0,01-0,27 | 80,9 | 101,0 | 80.2 | 0,001 | 0,004 |
| DON | 1,98 | 0,10-5,0 | 75,5 | 90.2 | 83,7 | 0,033 | 1.223 |
| FB ₁ | 5.40 | 0,01-0,27 | 81.1 | 99,9 | 81.2 | 0,003 | 0,007 |
| FB ₂ | 5.74 | 0,01-0,27 | 82,4 | 102,5 | 80,4 | 0,001 | 0,013 |
| T2 | 5.91 | 0,01-0,27 | 59.2 | 74,8 | 80.1 | 0,013 | 0,040 |
| ZEN | 5,98 | 0,01-0,27 | 92,6 | 99,9 | 92,7 | 0,001 | 0,003 |
| α -ZOL | 5.53 | 0,05-0,8 | 91,9 | 89,6 | 102.6 | 0,020 | 0,183 |
| β -ZOL | 5.76 | 0,05-0,8 | 90,4 | 91 | 99,3 | 0,060 | 0,200 |

TR: Tempo de retenção; AR: Recuperação aparente; SSE: Supressão/aumento do sinal; RE: Recuperação de extração; LOD: Limite de detecção; LOQ: Limite de quantificação. AF: aflatoxina; DON: desoxinivalenol; FB: fumonisina; ZEN: zearalenona; α ZOL = α zearalenol; β ZOL = β zearalenol.

3.4 Análise de dados

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) utilizando o procedimento *SAS General Linear Models* (SAS Institute, 1992). Cada animal foi tratado como uma unidade experimental. As médias dos tratamentos que demonstraram diferenças estatisticamente significativas na análise de variância foram contrastadas por meio do procedimento de *Tukey*. Todas as determinações de significância foram baseadas no nível de probabilidade de 0,05.

4. RESULTADOS

4.1 Micotoxinas na silagem e no concentrado

Nesta avaliação longitudinal das dietas utilizadas na alimentação das vacas, envolvendo a coleta de amostras nos dias 10 e 20 de cada período experimental, identificou-se a presença de diversas micotoxinas. Na forragem (silagem de milho) e na ração composta não houve inclusão de micotoxinas durante o experimento. Contudo, houve contaminação natural por AFLA, FUM e ZEA. A forragem apresentou contaminação natural por AFLA com concentrações médias de 2,1 µg/kg e a ração 1,0 µg/kg, enquanto as FUM foram detectadas com médias de 61,6 µg/kg na forragem e 16,4 µg/kg na ração composta. É relevante destacar que a ZEN, com uma média de 2,0 µg/kg, foi encontrada exclusivamente na forragem.

A análise desses resultados revelou que, mesmo em concentrações relativamente baixas, as micotoxinas AFLA, FUM e ZEN estavam presentes devido à contaminação natural na dieta básica fornecida às vacas deste rebanho. Ao realizar a análise micotoxicológica para confirmar os níveis de contaminação planejados no experimento, constatou-se que os valores estão em estreita concordância com as metas estabelecidas, conforme a Tabela 4.

Tabela 4. Concentrações de micotoxinas (aflatoxinas, desoxinivalenol, fumonisinas, Toxina-T2 e zearalenona) em ingredientes alimentares de ração mista total (TMR) de vacas leiteiras.

| Ingredientes da dieta | Micotoxinas (µg/kg) | | | | |
|-----------------------------|---------------------|--------|--------|-------|--------|
| | AF | DON | FUM | T2 | ZEN |
| Forragem (silagem de milho) | 2,1 | ND | 61,6 | ND | 2,0 |
| Ração composta | 1,0 | ND | 16,4 | ND | ND |
| <i>Pool</i> de micotoxinas | 404,0 | 5025,0 | 8046,0 | 195,0 | 2008,0 |

AF: Aflatoxinas totais (B₁, B₂, G₁, G₂); DON: Desoxinivalenol; FUM: Fumonisinas (FB₁, FB₂); T2: Toxina T2; ZEN: Zearalenona.

Uma vez que o nível de micotoxinas foi ajustado considerando o consumo diário da vaca e a contaminação natural da dieta, podemos observar que a ingestão diária de micotoxinas pelas vacas foi um pouco maior do que o esperado devido à ocorrência natural de AFLA, FUM e ZEN no alimento (Tabela 5). Assim, o consumo médio diário das vacas foi de 0,7 µg/kg de peso vivo (PV) para AF, 7,7 µg/kg de PV para DON, 15 µg/kg de PV para FUM,

0,3 µg/kg de PV para toxina T2 e 3,1 µg/kg de PV para ZEN, que está dentro do esperado, e sem diferenças significativas entre os diferentes tratamentos propostos no estudo.

Tabela 5. Concentração na dieta e ingestão diária de micotoxinas (aflatoxinas, desoxinivalenol, fumonisinas, Toxina-T2 e zearalenona) por vacas leiteiras.

| Tratamentos | Peso vaca (Kg) | Ingestão diária (Kg/MS/animal) | Ingestão diária total de micotoxinas (µg/animal) | | | | |
|-------------|------------------|--------------------------------|--|-------------------|--------------------|------------------|-------------------|
| | | | AF | DON | FUM | T2 | ZEN |
| CON | 649 ^A | 26,7 ^A | 446,0 ^A | 5025 ^A | 10052 ^A | 195 ^A | 2629 ^A |
| AD 1 | 651 ^A | 26.6 ^A | 445,8 ^A | 5025 ^A | 10044 ^A | 195 ^A | 2289 ^A |
| AD 2 | 653 ^A | 27.1 ^A | 446,6 ^A | 5025 ^A | 10082 ^A | 195 ^A | 2294 ^A |
| AD 3 | 652 ^A | 27.1 ^A | 446,6 ^A | 5025 ^A | 10082 ^A | 195 ^A | 2294 ^A |
| | µg/kg de PV | | 0,7 | 7,7 | 15 | 0,3 | 3,1 |

CON: dieta basal concentrada + 400 µg de AFB + 5000 µg de DON + 8000 µg de FUM + 200 µg de T2 + 2000 µg de ZEN; AD1: dieta basal concentrada + 400 µg de AFB + 5000 µg de DON + 8000 µg de FUM + 200 µg de T2 + 2000 µg de ZEN + 25 g/vaca/dia de aluminossilicato de cálcio e sódio hidratado; AD2: dieta basal concentrada + 400 µg de AFB + 5000 µg de DON + 8000 µg de FUM + 200 µg de T2 + 2000 µg de ZEN + 15 g/vaca/dia de *Mycofix® plus 5.0*; AD3: dieta basal concentrada + 400 µg de AFB + 5000 µg de DON + 8000 µg de FUM + 200 µg de T2 + 2000 µg de ZEN + 30g/vaca/dia de *Mycofix® plus 5.0*; AF: Aflatoxinas totais (B₁, B₂, G₁, G₂); DON: Desoxinivalenol; FUM: Fumonisinas (FB₁, FB₂); T2: Toxina T2; ZEN: Zearalenona; PV: Peso vivo; A-D: Médias seguidas por letras diferentes nas colunas diferem umas das outras pelo teste de Tukey a 5%.

4.2 Micotoxinas no plasma sanguíneo

Os resultados da quantificação de micotoxinas no plasma sanguíneo das vacas é demonstrado na Tabela 6. O efeito dos aditivos antimicotoxinas na redução da AFM₁ foi observado, com reduções de 35% no aditivo antimicotoxina 1 (AD1) e 91% no aditivo antimicotoxina 2 (AD2). Notavelmente, o tratamento com no aditivo antimicotoxina 3 (AD3) alcançou uma redução ainda mais significativa, com resíduos de AFM₁ abaixo do limite de detecção do método (LOD) (0,001 µg/L). Em relação ao DON, houve redução significativa apenas nos tratamentos AD2 e AD3, nos quais os resíduos dessa micotoxina ficaram abaixo do LOD (0,033 µg/L).

No que diz respeito às FUM e à ZEN, houve uma redução significativa nos tratamentos AD2, com reduções de 94,6% e 97,7%, respectivamente. No entanto, no tratamento AD3, os resíduos de FUM e ZEN foram menores que o LOD (0,003 µg/L e 0,001 µg/L). A avaliação não detectou resíduos da toxina T2 no plasma sanguíneo em nenhum dos

tratamentos (CON, AD1, AD2, AD3) em níveis superiores ao LOD (0,013 µg/L), tornando impossível verificar a eficácia dos tratamentos para essa micotoxina.

Tabela 6. Concentrações de micotoxinas (aflatoxina M₁, desoxinivalenol, fumonisinas, toxina-T2 e zearalenona) no plasma sanguíneo de vacas leiteiras submetidas a diferentes tratamentos com aditivos antimicotoxinas.

| Tratamentos | Micotoxinas no plasma sanguíneo (µg/kg) | | | | |
|-------------|---|--------------------|--------------------|-----------------|--------------------|
| | AFM ₁ | DON | FUM | T2 | ZEN |
| CON | 0,281 ^A | 0,153 ^A | 0,299 ^A | ND ^A | 0,269 ^A |
| AD 1 | 0,182 ^B | 0,151 ^A | 0,276 ^A | ND ^A | 0,267 ^A |
| AD 2 | 0,025 ^C | ND ^B | 0,016 ^B | ND ^A | 0,006 ^B |
| AD 3 | ND ^D | ND ^B | ND ^C | ND ^A | ND ^C |

CON: dieta basal concentrada + 400 µg de AFB + 5000 µg de DON + 8000 µg de FUM + 200 µg de T2 + 2000 µg de ZEN; AD1: dieta basal concentrada + 400 µg de AFB + 5000 µg de DON + 8000 µg de FUM + 200 µg de T2 + 2000 µg de ZEN + 25 g/vaca/dia de aluminossilicato de cálcio e sódio hidratado; AD2: dieta basal concentrada + 400 µg de AFB + 5000 µg de DON + 8000 µg de FUM + 200 µg de T2 + 2000 µg de ZEN + 15 g/vaca/dia de *Mycofix® plus 5.0*; AD3: dieta basal concentrada + 400 µg de AFB + 5000 µg de DON + 8000 µg de FUM + 200 µg de T2 + 2000 µg de ZEN + 30g/vaca/dia de *Mycofix® plus 5.0*; AFM₁: Aflatoxina M₁; DON: Desoxinivalenol; FUM: Fumonisinas (FB₁, FB₂); T2: Toxina T2; ZEN: Zearalenona; A-D: Médias seguidas por letras diferentes nas colunas diferem umas das outras pelo teste de *Tukey* a 5%.

4.3 Micotoxinas no leite

Em relação à determinação e quantificação da secreção de micotoxinas no leite, todos os aditivos adicionados demonstraram efeitos protetores contra aflatoxinas (Tabela 7). Assim, o tratamento à base de aditivos antimicotoxinas (AD1 – AD3) reduziu significativamente a secreção de AFM₁, com reduções de 39,6% (AD1), 94,3% (AD2) e 97,8% (AD3). Além disso, AD2 e AD3 (*Mycofix® Plus 5.0* 15 ou 30 g/vaca/dia) foram capazes de prevenir a secreção de outras micotoxinas, como DON, FUM, T2 e ZEN no leite. Para essas micotoxinas, não houve diferença entre o tratamento AD1 e o grupo controle.

Tabela 7. Concentração de micotoxinas (aflatoxina M₁, desoxinivalenol, fumonisinas, toxina-T2 e zearalenona) no leite de vacas leiteiras submetidas a diferentes tratamentos com aditivos antimicotoxinas.

| Tratamentos | Micotoxinas no leite (µg/L) | | | | |
|-------------|-----------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| | AFM ₁ | DON | FUM | T2 | ZEN |
| CON | 1,310 ^A | 0,301 ^A | 0,758 ^A | 0,006 ^A | 0,095 ^A |
| AD 1 | 0,792 ^B | 0,287 ^A | 0,718 ^A | 0,005 ^A | 0,092 ^A |
| AD 2 | 0,075 ^C | ND ^B | ND ^B | ND ^B | ND ^B |
| AD 3 | 0,029 ^D | ND ^B | ND ^B | ND ^B | ND ^B |

CON: dieta basal concentrada + 400 µg de AFB + 5000 µg de DON + 8000 µg de FUM + 200 µg de T2 + 2000 µg de ZEN; AD1: dieta basal concentrada + 400 µg de AFB + 5000 µg de DON + 8000 µg de FUM + 200 µg de T2 + 2000 µg de ZEN + 25 g/vaca/dia de aluminossilicato de cálcio e sódio hidratado; AD2: dieta basal concentrada + 400 µg de AFB + 5000 µg de DON + 8000 µg de FUM + 200 µg de T2 + 2000 µg de ZEN + 15 g/vaca/dia de *Mycofix® plus 5.0*; AD3: dieta basal concentrada + 400 µg de AFB + 5000 µg de DON + 8000 µg de FUM + 200 µg de T2 + 2000 µg de ZEN + 30g/vaca/dia de *Mycofix® plus 5.0*; AFM₁: Aflatoxina M₁; DON: Desoxinivalenol; FUM: Fumonisinas (FB₁, FB₂); T2: Toxina T2; ZEN: Zearalenona; A-D: Médias seguidas por letras diferentes nas colunas diferem umas das outras pelo teste de *Tukey* a 5%.

De acordo com os dados das micotoxinas quantificadas no leite e seu ajuste com a produção média diária de leite, foi possível calcular a taxa de conversão de micotoxinas (Tabela 8).

Tabela 8. Taxa de conversão de micotoxinas (aflatoxina M₁, desoxinivalenol, fumonisinas, toxina-T2, zearalenona) no leite de vacas leiteiras submetidas a diferentes tratamentos com aditivos antimicotoxinas.

| Tratamentos | Produção de Leite (kg/d) | Taxa de conversão | | | | |
|-------------|--------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| | | AFM ₁ | DON | FUM | T2 | ZEN |
| CON | 31,4 ^A | 9.22% ^A | 0.19% ^A | 0.23% ^A | 0.09% ^A | 0.13% ^A |
| AD 1 | 31,8 ^A | 6.65% ^B | 0.18% ^A | 0.22% ^A | 0.08% ^A | 0.13% ^A |
| AD 2 | 32,0 ^A | 2.40% ^C | ND ^A | ND ^A | ND ^A | ND ^A |
| AD 3 | 31,4 ^A | 0.91% ^D | ND ^A | ND ^A | ND ^A | ND ^A |

CON: dieta basal concentrada + 400 µg de AFB + 5000 µg de DON + 8000 µg de FUM + 200 µg de T2 + 2000 µg de ZEN; AD1: dieta basal concentrada + 400 µg de AFB + 5000 µg de DON + 8000 µg de FUM + 200 µg de T2 + 2000 µg de ZEN + 25 g/vaca/dia de aluminossilicato de cálcio e sódio hidratado; AD2: dieta basal concentrada + 400 µg de AFB + 5000 µg de DON + 8000 µg de FUM + 200 µg de T2 + 2000 µg de ZEN + 15 g/vaca/dia de *Mycofix® plus 5.0*; AD3: dieta basal concentrada + 400 µg de AFB + 5000 µg de DON + 8000 µg de FUM + 200 µg de T2 + 2000 µg de ZEN + 30g/vaca/dia de *Mycofix® plus 5.0*; AFM₁: Aflatoxina M₁; DON: Desoxinivalenol; FUM: Fumonisinas (FB₁, FB₂); T2: Toxina T2; ZEN: Zearalenona; A-D: Médias seguidas por letras diferentes nas colunas diferem umas das outras pelo teste de *Tukey* a 5%.

4.4 Micotoxinas na urina

O resultado da determinação quantitativa de micotoxinas na urina de vaca, conforme apresentado na Tabela 9, demonstra o efeito protetor dos aditivos antimicotoxinas (AD1 - AD3) contra as aflatoxinas. Os tratamentos à base de aditivos apresentaram redução nas aflatoxinas na urina, que variou de 10,8% (AD1) a 26,1% (AD3), com valor intermediário para o AD2 (17,8%). Os tratamentos AD2 e AD3 (*Mycofix® Plus 5.0* 15 e 30 g/vaca/dia) também reduziram os níveis de DON e FUM na urina, com resíduos abaixo do LOD (0,033 e 0,003 µg/L, respectivamente).

O tratamento AD2 causou redução de 97,5% na excreção de α -Zearalenol, enquanto ao longo do tratamento com AD3, o nível de resíduos da mesma toxina ficou abaixo do LOD de 0,020 µg/L. No caso do β -Zearalenol, o mesmo efeito foi verificado, comprovando a eficácia dos tratamentos de AD2 (redução de 92,4%) e AD3 (resíduos abaixo do LOD de 0,060 µg/L). Resíduos da toxina T2 na urina não foram detectados em nenhum dos tratamentos (CON, AD1, AD2, AD3) em níveis acima do LOD de 0,013 µg/L, não sendo possível verificar a ação dos tratamentos para esta micotoxina.

Tabela 9. Concentrações de micotoxinas (aflatoxina M₁, desoxinivalenol, fumonisinas, toxina-T2, α -zearalenol e β -zearalenol) na urina de vacas leiteiras submetidas a diferentes tratamentos com aditivos antimicotoxinas.

| Tratamentos | Micotoxinas na urina (µg/L) | | | | | |
|-------------|-----------------------------|--------------------|--------------------|-----------------|--------------------|--------------------|
| | AFM ₁ | DON | FUM | T2 | α -ZOL | β -ZOL |
| CON | 0,249 ^A | 54,26 ^A | 40,86 ^A | ND ^A | 0,954 ^A | 1,102 ^A |
| AD 1 | 0,222 ^B | 54,98 ^A | 41,21 ^A | ND ^A | 0,901 ^A | 1,094 ^A |
| AD 2 | 0,205 ^C | ND ^B | ND ^B | ND ^A | 0,023 ^B | 0,083 ^B |
| AD 3 | 0,184 ^D | ND ^B | ND ^B | ND ^A | ND ^C | ND ^C |

CON: dieta basal concentrada + 400 µg de AFB + 5000 µg de DON + 8000 µg de FUM + 200 µg de T2 + 2000 µg de ZEN; AD1: dieta basal concentrada + 400 µg de AFB + 5000 µg de DON + 8000 µg de FUM + 200 µg de T2 + 2000 µg de ZEN + 25 g/vaca/dia de aluminossilicato de cálcio e sódio hidratado; AD2: dieta basal concentrada + 400 µg de AFB + 5000 µg de DON + 8000 µg de FUM + 200 µg de T2 + 2000 µg de ZEN + 15 g/vaca/dia de *Mycofix® plus 5.0*; AD3: dieta basal concentrada + 400 µg de AFB + 5000 µg de DON + 8000 µg de FUM + 200 µg de T2 + 2000 µg de ZEN + 30g/vaca/dia de *Mycofix® plus 5.0*; AFM₁: Aflatoxina M₁; DON: Desoxinivalenol; FUM: Fumonisinas (FB₁, FB₂); T2: Toxina T2; α -ZOL: α Zearalenol; β -ZOL: β Zearalenol; A-D: Médias seguidas por letras diferentes nas colunas diferem umas das outras pelo teste de *Tukey* a 5%.

5. DISCUSSÕES

5.1 Micotoxinas na silagem e no concentrado

Os resultados da análise das dietas das vacas confirmam a presença de micotoxinas, como aflatoxina (AFLA) e fumonisina (FUM), em ambas as fontes de alimento, silagem e concentrado, juntamente com a zearalenona (ZEN) encontrada exclusivamente na silagem de milho. Estes achados corroboram com os de Biscoto et al. (2022), que revelaram que 97% das amostras de rações e seus componentes no Brasil, entre 2017 e 2021, estavam contaminadas por pelo menos uma micotoxina. Na mesma pesquisa, a presença das micotoxinas ZEN, AFLA e FUM foi observada em 61%, 55% e 26% das amostras de silagem, respectivamente. Schmidt et al. (2015) também documentaram a presença de ZEN na silagem de milho em cinco regiões produtoras de leite no Brasil, onde essa micotoxina esteve presente em 72,8% das amostras contaminadas por micotoxinas, representando 91% do total das amostras avaliadas.

A presença de micotoxinas em rações e seus componentes destinados à alimentação de bovinos é comum no Brasil. Essas substâncias tóxicas, embora em baixas concentrações, originam-se da contaminação natural da dieta basal fornecida ao rebanho (Biscoto et al., 2022; Penagos-Tabares et al., 2023; P. Schmidt et al., 2015). Neste trabalho, os níveis de contaminação estão de acordo com o planejamento do estudo, indicando eficácia no controle da contaminação durante o experimento. A ingestão diária de micotoxinas pelas vacas ficou ligeiramente acima do esperado devido à ocorrência natural de AFLA, FUM e ZEN na dieta.

Os tratamentos CON, AD1, AD2 e AD3 não apresentaram diferenças no consumo de ração das vacas leiteiras, indicando que a adição de aditivos antimicotoxinas, como HSCAS ou *Mycofix® plus 5.0*, não afetou o consumo. Esse resultado está alinhado com a pesquisa de Gallo et al. (2020), que utilizaram aditivo semelhante com três componentes principais, incluindo componentes inorgânicos como bentonita, uma cepa de *Eubacterium* Biomin BBSH797 e a enzima purificada fumonisina-esterase (FUMzyme) a uma concentração de 30.000 U/kg de *Mycofix®*, bem como substâncias de origem ficofítica e fitogênica em vacas Holandesas (Gallo et al., 2020). Além disso, vacas da raça Lithuanian Red tratadas com o aditivo *Mycofix® plus 3.0*, contendo bentonita, *Eubacterium spp*, diatomita, levedura inativa, substâncias ficolíticas e fitogênicas, também não demonstraram alterações no consumo (Jovaišiene et al., 2016).

A ocorrência de aflatoxinas, mesmo em concentrações relativamente baixas nas dietas das vacas, é uma preocupação devido aos reconhecidos impactos adversos dessas micotoxinas na saúde dos animais, que inclui a diminuição da produção de leite, o risco de transferência de AFM₁ para o leite e as possíveis implicações para a saúde humana (Biscoto et al., 2022; P. Cai et al., 2020; Dhakal et al., 2023; Gonçalves, Uliana, et al., 2020; Kihal et al., 2023). O mesmo se aplica às FUM e ZEN, que também podem representar riscos significativos para a saúde do rebanho (Biscoto et al., 2022; J. Chen, Wei, et al., 2021; Gruber-Dorninger et al., 2021; Kemboi et al., 2023; L. Li et al., 2021; Lumsangkul et al., 2019; Qu et al., 2022; G. L. Zhang et al., 2018).

Esses resultados destacam a importância de monitorar e controlar a qualidade das dietas fornecidas aos animais de produção, a fim de reduzir a exposição a micotoxinas e mitigar seus efeitos prejudiciais (Pereira et al., 2019; Vila-Donat et al., 2019; C. Yang et al., 2020). Medidas de manejo adequadas e estratégias de prevenção, como o uso de aditivos antimicotoxinas, podem ser necessárias para garantir a segurança e o desempenho adequado dos animais (Assaf et al., 2019; Gallo et al., 2020; Hamad et al., 2023; Luo et al., 2020; Rosim et al., 2018; Vila-Donat et al., 2019).

5.2 Micotoxinas no plasma sanguíneo

Os resultados da análise do plasma sanguíneo das vacas indicam que os aditivos antimicotoxinas AD1, AD2 e AD3 tiveram um impacto positivo na redução dos resíduos de AFM₁. Tais dados corroboram com os de Kemboi et al., (2023), que utilizaram aditivos antimicotoxinas a base de bentonita e FUMzyme, e observaram redução de AFM₁ e FUM no plasma e no leite. É importante destacar que o tratamento com AD3 demonstrou a eficácia mais significativa na redução de AFM₁, com resíduos abaixo do LOD. Essa observação é crucial para garantir a qualidade do leite produzido pelo rebanho.

A redução dos níveis de DON nos tratamentos AD2 e AD3 também é uma descoberta significativa, uma vez que o DON é uma micotoxina com um impacto considerável na saúde dos animais. Tal micotoxina é prejudicial para subpopulações específicas de células T bovinas, incluindo TCD4⁺, TCD8β⁺ e γδ (Novak et al., 2018), além de apresentar relação linear entre a ingestão de DON e os níveis plasmáticos dessa toxina no sangue (Winkler, Kersten, Meyer, et al., 2014). Contudo, é importante destacar que bovinos saudáveis possuem

mecanismos naturais eficazes para reduzir o DON, graças à presença de bactérias no ambiente ruminal, como o gênero *Eubacterium* Biomin BBSH797, que são capazes de converter a forma tóxica de DON em DOM-1, que é menos prejudicial (Debevere et al., 2020; Novak et al., 2018).

A *Eubacterium* Biomin BBSH797 é um dos componentes dos aditivos AD2 e AD3. Tal cepa foi originalmente isolada do fluido ruminal bovino e incorporada a aditivos para bovinos, como o *Mycofix® Plus 5.0*, bem como em aditivos para suínos e aves (Awad et al., 2010; S. J. Li et al., 2022), sendo eficaz na redução dos efeitos negativos dos tricotecenos. É importante observar que esses aditivos são regulamentados pela UE, garantindo sua segurança e eficácia (European Commission, 2013). Não foram detectados resíduos da toxina T2 no plasma sanguíneo em nenhum dos tratamentos, fato que pode ser explicado devido aos baixos níveis de inclusão dessa micotoxina na dieta das vacas testadas.

Os resíduos de FUM e ZEN também sofreram redução no tratamento AD2 e AD3, sugerindo que esses aditivos podem desempenhar um papel importante na mitigação da contaminação por essas micotoxinas. Resultados semelhantes foram obtidos por Kemboi et al., (2023) quando adicionaram FUMzyme, um dos componentes presentes nos aditivos AD2 e AD3, a rações contaminadas com FUM. Isso resultou em uma redução nos níveis plasmáticos de FUM e conseqüente aumento nos níveis de FUM hidrolisadas não tóxicas e FUM parcialmente hidrolisadas no plasma sanguíneo de bovinos (Kemboi et al., 2023). Em estudos com ZEN, Tonini et al., (2014) observaram que aditivos antimicotoxinas de origem desconhecida não demonstraram diferença significativa na remoção de β -zearalenol (β -ZOL) no sangue. No entanto, esses aditivos foram eficazes como biomarcadores de exposição ao ZEN por meio da dieta, permitindo a avaliação dos efeitos dos aditivos em parâmetros sorológicos (Tonini et al., 2020).

Globalmente, os resultados indicam que a inclusão de aditivos antimicotoxinas, especialmente AD2 e AD3, pode ser uma estratégia eficaz na redução da exposição das vacas a várias micotoxinas, contribuindo assim para a saúde do rebanho e a qualidade do leite produzido.

5.3 Micotoxinas no leite

A concentração de AFM₁ no leite foi a mais baixa no grupo AD3, seguida por AD2, HSCAS e CON. Os tratamentos que utilizaram o *Mycofix® Plus 5.0* (AD2 e AD3) demonstraram maior capacidade de inativação da AFM₁, com reduções de 94,3% e 97,8%, respectivamente, em comparação com o AD1, que adsorveu apenas 39,6% da AFM₁. Essa superioridade pode ser atribuída à formulação mais complexa do *Mycofix® Plus 5.0*, que incorpora ingredientes como bentonita, *Eubacterium sp.*, *Trichosporon mycotoxinivorans* e FUMzyme (Gallo et al., 2020; Kemboi et al., 2023; Schwartz-Zimmermann et al., 2018). Em contraste, o aluminossilicato de cálcio e sódio hidratado (HSCAS) é um adsorvente mais simples, composto principalmente por minerais (Kihal et al., 2023; Pate et al., 2018; Wei et al., 2019).

Estudos anteriores comprovaram a eficácia dos componentes do *Mycofix®* na redução de micotoxinas, tais como a AFM₁, em vacas leiteiras (Gallo et al., 2020; Jovaišiene et al., 2016; Kiyothong et al., 2012; Pietri et al., 2009). A combinação de elementos como as bentonitas e os microrganismos presentes nesse aditivo demonstrou ser mais eficaz na neutralização dos efeitos das aflatoxinas (Bhatti et al., 2018; Ghazalah et al., 2021; Kihal et al., 2023; Pappas et al., 2014; Vila-Donat et al., 2019), quando comparados à utilização de um único composto, como o HSCAS. Kihal et al. (2023) já evidenciaram que o HSCAS possui uma capacidade reduzida na diminuição da conversão da AFB₁ em AFM₁, quando comparado à bentonita. Essa diferença pode explicar a maior eficácia dos aditivos AD2 e AD3 em relação ao AD1.

Além disso, os tratamentos AD2 e AD3 (*Mycofix® Plus 5.0* com 15 e 30 g/vaca/dia) também reduziram significativamente a secreção de DON, FUM, T2 e ZEN no leite, com os níveis de secreção dessas micotoxinas abaixo do LOD. Tais dados corroboram com estudos anteriores que utilizaram versões similares deste produto em rações para bovinos de leite, embora sem especificar doses, mas seguindo recomendações de 30 a 40g dia/animal, para mitigar as mesmas micotoxinas abordadas nesta pesquisa, incluindo a OTA (Gallo et al., 2020; Jovaišiene et al., 2016; Kiyothong et al., 2012; Pietri et al., 2009; Zouagui et al., 2017). Nossos dados sugerem que a inclusão de *Mycofix® Plus 5.0*, mesmo na dose de 15 g/dia/animal, já é eficaz na redução da secreção de micotoxinas no leite de vaca, contribuindo para a segurança alimentar.

A taxa de conversão de micotoxinas indica que a inclusão dos aditivos antimicotoxinas (AD1, AD2 ou AD3) não teve um impacto significativo na produção de leite durante o

período experimental. É importante notar que estudos anteriores com níveis moderados a baixos de contaminação por micotoxinas, incluindo AFB₁, DON, ZEN e FB, relataram um aumento na produção de leite quando foram adicionados produtos aditivos antimicotoxinas (Jovaišiene et al., 2016; Kiyothong et al., 2012; Zouagui et al., 2017). Por outro lado, Gallo et al. (2020) observou que a produção de leite foi menor ($P < 0,05$) em comparação com o grupo controle (-1,18 kg/d) no tratamento de TMR contaminada com níveis de FUM (1.247,1 µg/kg) e DON (897,3 µg/kg) acima do grupo controle, em combinação com 35 g/animal/dia do aditivo *Mycofix® Plus 3.0*.

Este resultado é relevante, pois sugere que a incorporação dos aditivos antimicotoxinas (AD1, AD2 ou AD3) não afetou negativamente a produção de leite das vacas durante o período experimental. Isso é crucial para a indústria leiteira, pois demonstra que as vacas podem continuar produzindo leite em níveis adequados, mesmo quando submetidas a tratamentos com aditivos destinados a reduzir a presença de micotoxinas no leite (Ahn et al., 2022; Gallo et al., 2020; Ghazalah et al., 2021; Jovaišiene et al., 2016; Zouagui et al., 2017). Portanto, os aditivos podem ser considerados uma medida eficaz de controle de micotoxinas sem prejudicar a produção de leite (Gallo et al., 2020; Jovaišiene et al., 2016; Kihal et al., 2023; Zouagui et al., 2017).

5.4 Micotoxinas na urina

Os resultados da análise de urina das vacas evidenciam que os aditivos antimicotoxinas AD1, AD2 e AD3 tiveram um impacto positivo na redução da excreção de aflatoxinas. Esses aditivos provaram ser eficazes na diminuição dos níveis de aflatoxinas na urina das vacas em todos os tratamentos, com a maior redução ocorrendo no grupo AD3. Vale mencionar um estudo conduzido por Fushimi et al. (2014), que investigou o *Mycofix® Plus 3.0* e sua capacidade de reduzir a esterigmatocistina, um precursor da AFB₁, tanto na ração quanto na urina de bovinos, não observou efeitos protetores do aditivo quando utilizou a urina como marcador (Fushimi et al., 2014), apesar de ter demonstrado a redução da ZEN na urina com o mesmo produto (Hasunuma et al., 2012; Takagi et al., 2011).

Neste estudo, ao analisarmos as médias de excreção de AFM₁ em µg/kg, notamos que, apesar da redução da AFM₁ promovida pelo uso de aditivos, as quantidades permaneceram mais elevadas na urina do que no leite, apresentando diferenças entre os tratamentos. Essa tendência também foi identificada em pesquisas anteriores (Pantaya et al., 2016; Rodrigues et

al., 2019; Sulzberger et al., 2017; Weatherly et al., 2018). Similarmente, Rodrigues et al. (2019), em um estudo envolvendo aditivos minerais argilosos e leveduras inativadas, também encontraram concentrações médias de AFM₁ na urina superiores às excretadas no leite de vacas leiteiras, apesar de os aditivos antimicotoxinas terem sido eficazes em comparação com o grupo controle, que recebeu 2,8 mg de AF (Rodrigues et al., 2019).

Embora neste estudo os níveis de AFM₁ excretados na urina sejam superiores aos encontrados no leite, o *Mycofix® Plus 5.0* demonstrou eficácia na redução da excreção urinária de aflatoxina. No entanto, resultados de Sulzberger et al. (2017) também indicaram concentrações mais elevadas de AFM₁ na urina em comparação com o leite, mas os aditivos comerciais à base de argila testados não demonstraram efeito redutor significativo nas concentrações de AFM₁ na urina, apesar de terem reduzido a AFM₁ presente no leite. De forma semelhante, Weatherly et al. (2018) encontraram concentrações mais altas de AFM₁ na urina em comparação com o leite, mas nenhum dos aditivos dietéticos, à base de levedura e argila bentonita, testados naquele estudo foi eficaz na redução das concentrações de AFM₁ tanto no leite quanto na urina.

As discrepâncias nas concentrações de aflatoxina indicam que as vacas eliminam essa toxina através de distintos sistemas fisiológicos, não se limitando ao sistema digestivo e à glândula mamária (Rodrigues et al., 2019). Isso possivelmente ocorre porque, quando o AFM₁ é hidroxilado nas vias de ativação hepática, pode se disseminar pelo organismo, atingindo vários sistemas, incluindo a glândula mamária e o sistema excretor, resultando na excreção na urina (Dhakal et al., 2023; Rodrigues et al., 2019; Rushing & Selim, 2019; Sulzberger et al., 2017; Weatherly et al., 2018). A inclusão de aditivos na dieta das vacas desempenha um papel importante na redução da excreção de metabólitos associados às micotoxinas. Um estudo de Sulzberger et al. (2017) demonstrou que vacas expostas a 100 µg de AFB₁/kg na dieta excretaram significativamente mais AFM₁ na urina em comparação com vacas do grupo controle que não receberam aditivos nem aflatoxinas (P = 0,004).

A excreção de AFM₁ na urina é claramente mais pronunciada do que sua excreção no leite. No entanto, os mecanismos subjacentes que regulam essa discrepância na absorção entre os rins e a glândula mamária, e como eles podem ser afetados por aditivos dietéticos, como agentes sequestrantes de micotoxinas, ainda permanecem em grande parte desconhecidos. São necessárias investigações adicionais para aprofundar nossa compreensão dos efeitos dos

aditivos sequestrantes de micotoxinas no metabolismo e na eliminação de AFM₁, tanto no leite quanto na urina.

Além disso, os aditivos também mostraram eficácia na redução da excreção de outras micotoxinas, como DON e FUM. Em alguns casos, os níveis dessas micotoxinas na urina caíram abaixo do LOD, indicando uma redução significativa em sua excreção. Entretanto, Pantaya et al., (2016) ao usarem apenas levedura viva (*Saccharomyces cerevisiae*) como aditivo na dieta de vacas em lactação, não observaram efeitos no equilíbrio de excreção das formas conjugadas de DON e FB₁ na urina. É importante notar também que o DON pode ser facilmente degradado por microrganismos ruminais em metabólitos menos tóxicos. Aproximadamente 20% do DON administrado é recuperado na urina e nas fezes em formas não conjugadas, como de-epoxydeoxinivalenol e desoxinivalenol (Schwartz-Zimmermann et al., 2017; Winkler, Kersten, Valenta, et al., 2014).

Os resultados também destacam a eficácia dos tratamentos AD2 e AD3 na redução da excreção dos metabólitos de ZEN (α -Zearalenol e β -Zearalenol), com níveis abaixo do LOD em alguns casos. Nossos dados corroboram com os de Takagi et al. (2011), que conduziram um estudo com aditivo antimicotoxina (*Mycofix*®) em dietas para bovinos de leite. Este estudo revelou uma redução significativa nos níveis de ZEN ($P < 0,05$) após 2 semanas de suplementação com o aditivo. Notavelmente, mesmo após a interrupção da suplementação, as reduções nos níveis de ZEN permaneceram evidentes por até 3 semanas. No entanto, após um período contínuo de 6 semanas sem a adição do aditivo antimicotoxina, as concentrações de ZEN aumentaram novamente para os níveis originais (Takagi et al., 2011).

Neste estudo, observou-se que as concentrações totais de α -Zearalenol (α -ZOL) na urina foram mais baixas do que as de β -Zearalenol (β -ZOL). Essa discrepância pode ser explicada pela presença de concentrações intrínsecas mais baixas de α -ZOL no organismo das vacas leiteiras, devido aos processos naturais de desintoxicação que ocorrem no fígado e no rúmen (Dänicke et al., 2014). Esses processos transformam a ZEN em maior quantidade em β -ZOL, que é uma forma menos tóxica em comparação ao α -ZOL (Falkauskas et al., 2022). De acordo com a Autoridade Europeia para a Segurança Alimentar (EFSA), é mais comum encontrar os derivados β na urina e no soro sanguíneo das vacas leiteiras do que os derivados α (Knutsen et al., 2017).

É importante mencionar que este estudo não teve como objetivo analisar α -ZOL e β -ZOL no sangue. Contudo, vale ressaltar que correlações estatisticamente significativas já

foram exploradas por Falkauskas et al., (2022), indicando que o aumento das concentrações de ZEN no sangue pode estar relacionado à concentração de ZEN na urina, enquanto o aumento das concentrações de ZEN na ração pode estar associado à concentração de α -ZOL na urina e também ser influenciado pela concentração de ZEN no leite.

Nossos resultados indicam que a incorporação de aditivos alimentares antimicotoxinas, especialmente AD2 e AD3, pode representar uma abordagem eficaz para minimizar a exposição das vacas a diversas micotoxinas, beneficiando a saúde do rebanho e a qualidade do leite produzido. No entanto, é fundamental realizar pesquisas adicionais para ampliar nossa compreensão dos efeitos dos aditivos sequestrantes no metabolismo e na eliminação dos metabólitos de micotoxinas em vacas leiteiras.

6. CONCLUSÕES

A administração de aditivos antimicotoxinas, em um curto período de contaminação, reduz efetivamente a FUM, DON, FUM, T2 e ZEN no sangue, leite e urina de vacas leiteiras. Em todos os tratamentos contendo *Mycofix® plus 5.0*, observou-se uma resposta positiva contra a contaminação por múltiplas micotoxinas, com redução dos níveis de contaminação em biomarcadores, como leite, urina e sangue. AD3 apresentou maior redução de FUM no sangue, urina e leite, seguido por AD2 e HSCAS. AD3 reduziu todas as outras micotoxinas abaixo do LOD no sangue, urina e leite. A dose mais baixa de aditivo antimicotoxinas (AD2) apresentou grande redução em todas as micotoxinas, enquanto HSCAS apresentou pequena redução na FUM, e não foi capaz de reduzir outras secreções de micotoxinas em sangue, urina e leite. Os dados reforçam a eficácia dos aditivos alimentares antimicotoxinas na desativação das micotoxinas, destacando a importância de sua utilização.

7. AGRADECIMENTOS

Agradecemos o apoio de: DSM-firmenich ltda; Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processos nº 2022/07439-7 e nº 2022/14662-4; Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), processo nº 304262/2021-8, e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES; código financeiro 001). Ao apoio das equipes do Laboratório de Pesquisa em Bovinos de Leite (Pirassununga, Brasil) e do Laboratório de Microbiologia e Micotoxicologia de Alimentos (Pirassununga, Brasil) durante o experimento.

REFERÊNCIAS

- Abeni, F., Migliorati, L., Terzano, G. M., Capelletti, M., Gallo, A., Masoero, F., & Pirlo, G. (2014). Effects of two different blends of naturally mycotoxin-contaminated maize meal on growth and metabolic profile in replacement heifers. *Animal*, 8(10), 1667–1676. <https://doi.org/10.1017/S1751731114001475>
- Adépo, J. B. A., Manda, P., Ngbé, J. V., Diakit , A., Tigori Sangar , B., & Dano, S. D. (2019). Study of aflatoxicosis reduction: effect of *Alchornea cordifolia* on biomarkers in an aflatoxin B1 exposed rats. *Drug and Chemical Toxicology*, 42(3), 243–251. <https://doi.org/10.1080/01480545.2017.1416625>
- Adhikari, M., Negi, B., Kaushik, N., Adhikari, A., Al-Khedhairy, A. A., Kaushik, N. K., & Choi, E. H. (2017). T-2 mycotoxin: toxicological effects and decontamination strategies. *Oncotarget*, 8(20), 33933–33952. <https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.15422>
- Adunphatcharaphon, S., Petchkongkaew, A., Greco, D., D’Ascanio, V., Visessanguan, W., & Avantaggiato, G. (2020). The Effectiveness of Durian Peel as a Multi-Mycotoxin Adsorbent. *Toxins*, 12(2). <https://doi.org/10.3390/TOXINS12020108>
- Ahn, J. Y., Kim, J., Cheong, D. H., Hong, H., Jeong, J. Y., & Kim, B. G. (2022). An In Vitro Study on the Efficacy of Mycotoxin Sequestering Agents for Aflatoxin B1, Deoxynivalenol, and Zearalenone. *Animals : An Open Access Journal from MDPI*, 12(3). <https://doi.org/10.3390/ANI12030333>
- Alberts, J. F., van Zyl, W. H., & Gelderblom, W. C. A. (2016). Biologically Based Methods for Control of Fumonisin-Producing *Fusarium* Species and Reduction of the Fumonisin. *Frontiers in Microbiology*, 7(APR). <https://doi.org/10.3389/FMICB.2016.00548>
- Albonico, M., Sch tz, L. F., Caloni, F., Cortinovis, C., & Spicer, L. J. (2016). Toxicological effects of fumonisin B1 alone and in combination with other fusariotoxins on bovine granulosa cells. *Toxicon : Official Journal of the International Society on Toxicology*, 118, 47–53. <https://doi.org/10.1016/J.TOXICON.2016.04.041>
- Almeida Rego, F. C. de, Savio, P. L. O., Pertile, S. F. N., dos Santos, J. S., Eleodoro, J. I., Teixeira, A. J. C., Zundt, M., da Cunha Filho, L. F. C., & Barreto, J. V. P. (2021). Viability of the use of mycotoxin adsorbent in the finishing of Texel lambs in confinement. *Tropical Animal Health and Production*, 53(1). <https://doi.org/10.1007/S11250-021-02619-0>
- Alshannaq, A., & Yu, J. H. (2017). Occurrence, Toxicity, and Analysis of Major Mycotoxins in Food. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 14(6). <https://doi.org/10.3390/IJERPH14060632>
- Antonissen, G., Martel, A., Pasmans, F., Ducatelle, R., Verbrugge, E., Vandenbroucke, V., Li, S., Haesebrouck, F., Van Immerseel, F., & Croubels, S. (2014). The Impact of *Fusarium* Mycotoxins on Human and Animal Host Susceptibility to Infectious Diseases. *Toxins 2014, Vol. 6, Pages 430-452*, 6(2), 430–452. <https://doi.org/10.3390/TOXINS6020430>
- Aoudia, N., Callu, P., Grosjean, F., & Larondelle, Y. (2009). Effectiveness of mycotoxin sequestration activity of micronized wheat fibres on distribution of ochratoxin A in

- plasma, liver and kidney of piglets fed a naturally contaminated diet. *Food and Chemical Toxicology*, 47(7), 1485–1489. <https://doi.org/10.1016/J.FCT.2009.03.033>
- Arana, S., Dagli, M. L. Z., Sabino, M., Tabata, Y. A., Rigolino, M. G., & Hernandez-Blazquez, F. J. (2011). Evaluation of the efficacy of hydrated sodium aluminosilicate in the prevention of aflatoxin-induced hepatic cancer in rainbow trout. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 31(9), 751–755. <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2011000900005>
- Arumugam, T., Ghazi, T., & Chuturgoon, A. A. (2021). Molecular and epigenetic modes of Fumonisin B 1 mediated toxicity and carcinogenesis and detoxification strategies. *Critical Reviews in Toxicology*, 51(1), 76–94. <https://doi.org/10.1080/10408444.2021.1881040>
- Assaf, J. C., Nahle, S., Chokr, A., Louka, N., Atoui, A., & El Khoury, A. (2019). Assorted Methods for Decontamination of Aflatoxin M1 in Milk Using Microbial Adsorbents. *Toxins*, 11(6). <https://doi.org/10.3390/TOXINS11060304>
- Avantaggiato, G., Greco, D., Damascelli, A., Solfrizzo, M., & Visconti, A. (2014). Assessment of multi-mycotoxin adsorption efficacy of grape pomace. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(2), 497–507. <https://doi.org/10.1021/JF404179H>
- Avantaggiato, G., Havenaar, R., & Visconti, A. (2004). Evaluation of the intestinal absorption of deoxynivalenol and nivalenol by an in vitro gastrointestinal model, and the binding efficacy of activated carbon and other adsorbent materials. *Food and Chemical Toxicology*, 42(5), 817–824. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2004.01.004>
- Avantaggiato, G., Solfrizzo, M., & Visconti, A. (2006). Recent advances on the use of adsorbent materials for detoxification of Fusarium mycotoxins. <Http://Dx.Doi.Org/10.1080/02652030500058312>, 22(4), 379–388. <https://doi.org/10.1080/02652030500058312>
- Awad, W. A., Ghareeb, K., Böhm, J., & Zentek, J. (2010). Decontamination and detoxification strategies for the Fusarium mycotoxin deoxynivalenol in animal feed and the effectiveness of microbial biodegradation. *Food Additives & Contaminants. Part A, Chemistry, Analysis, Control, Exposure & Risk Assessment*, 27(4), 510–520. <https://doi.org/10.1080/19440040903571747>
- Awapak, D., Petchkongkaew, A., Sulyok, M., & Krska, R. (2021). Co-occurrence and toxicological relevance of secondary metabolites in dairy cow feed from Thailand. *Food Additives & Contaminants. Part A, Chemistry, Analysis, Control, Exposure & Risk Assessment*, 38(6), 1013–1027. <https://doi.org/10.1080/19440049.2021.1905186>
- Bailey, J. R., Breton, J., Panic, G., Cogan, T. A., Bailey, M., Swann, J. R., & Lee, M. R. F. (2019). The Mycotoxin Deoxynivalenol Significantly Alters the Function and Metabolism of Bovine Kidney Epithelial Cells In Vitro. *Toxins*, 11(10). <https://doi.org/10.3390/TOXINS11100554>
- Barański, W., Gajęcka, M., Zielonka, Ł., Mróz, M., Onyszek, E., Przybyłowicz, K. E., Nowicki, A., Babuchowski, A., & Gajęcki, M. T. (2021). Occurrence of Zearalenone and Its Metabolites in the Blood of High-Yielding Dairy Cows at Selected Collection Sites in Various Disease States. *Toxins*, 13(7). <https://doi.org/10.3390/TOXINS13070446>

- Barbouche, R., Gaigé, S., Airault, C., Poirot, K., Dallaporta, M., Troadec, J. D., & Abysique, A. (2020). The food contaminant deoxynivalenol provokes metabolic impairments resulting in non-alcoholic fatty liver (NAFL) in mice. *Scientific Reports*, *10*(1). <https://doi.org/10.1038/S41598-020-68712-W>
- Becker-Algeri, T. A., Castagnaro, D., de Bortoli, K., de Souza, C., Drunkler, D. A., & Badiale-Furlong, E. (2016). Mycotoxins in Bovine Milk and Dairy Products: A Review. *Journal of Food Science*, *81*(3), R544–R552. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.13204>
- Ben Taheur, F., Kouidhi, B., Al Qurashi, Y. M. A., Ben Salah-Abbès, J., & Chaieb, K. (2019). Review: Biotechnology of mycotoxins detoxification using microorganisms and enzymes. *Toxicon : Official Journal of the International Society on Toxinology*, *160*, 12–22. <https://doi.org/10.1016/J.TOXICON.2019.02.001>
- Bervis, N., Lorán, S., Juan, T., Carramiñana, J. J., Herrera, A., Ariño, A., & Herrera, M. (2021). Field Monitoring of Aflatoxins in Feed and Milk of High-Yielding Dairy Cows under Two Feeding Systems. *Toxins*, *13*(3). <https://doi.org/10.3390/TOXINS13030201>
- Bhatti, S. A., Khan, M. Z., Hassan, Z. U., Saleemi, M. K., Saqib, M., Khatoon, A., & Akhter, M. (2018). Comparative efficacy of Bentonite clay, activated charcoal and Trichosporon mycotoxinivorans in regulating the feed-to-tissue transfer of mycotoxins. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *98*(3), 884–890. <https://doi.org/10.1002/JSFA.8533>
- Biscoto, G. L., Salvato, L. A., Alvarenga, É. R., Dias, R. R. S., Pinheiro, G. R. G., Rodrigues, M. P., Pinto, P. N., Freitas, R. P., & Keller, K. M. (2022). Mycotoxins in Cattle Feed and Feed Ingredients in Brazil: A Five-Year Survey. *Toxins*, *14*(8). <https://doi.org/10.3390/TOXINS14080552>
- Bryła, M., Ksieniewicz-Woźniak, E., Waśkiewicz, A., Szymczyk, K., & Jędrzejczak, R. (2018). Natural Occurrence of Nivalenol, Deoxynivalenol, and Deoxynivalenol-3-Glucoside in Polish Winter Wheat. *Toxins*, *10*(2). <https://doi.org/10.3390/TOXINS10020081>
- Cai, G., Pan, S., Feng, N., Zou, H., Gu, J., Yuan, Y., Liu, X., Liu, Z., & Bian, J. (2019). Zearalenone inhibits T cell chemotaxis by inhibiting cell adhesion and migration related proteins. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *175*, 263–271. <https://doi.org/10.1016/J.ECOENV.2019.03.045>
- Cai, P., Zheng, H., She, J., Feng, N., Zou, H., Gu, J., Yuan, Y., Liu, X., Liu, Z., & Bian, J. (2020). Molecular Mechanism of Aflatoxin-Induced Hepatocellular Carcinoma Derived from a Bioinformatics Analysis. *Toxins*, *12*(3). <https://doi.org/10.3390/TOXINS12030203>
- Campagnollo, F. B., Mousavi Khaneghah, A., Borges, L. L., Bonato, M. A., Fakhri, Y., Barbalho, C. B., Barbalho, R. L. C., Corassin, C. H., & Oliveira, C. A. F. (2020). In vitro and in vivo capacity of yeast-based products to bind to aflatoxins B 1 and M 1 in media and foodstuffs: A systematic review and meta-analysis. *Food Research International (Ottawa, Ont.)*, *137*. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2020.109505>
- Carvajal-Moreno, M., Vargas-Ortiz, M., Hernández-Camarillo, E., Ruiz-Velasco, S., & Rojo-Callejas, F. (2019). Presence of unreported carcinogens, Aflatoxins and their

hydroxylated metabolites, in industrialized Oaxaca cheese from Mexico City. *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, 124, 128–138.
<https://doi.org/10.1016/J.FCT.2018.11.046>

- Chen, J., Wei, Z., Wang, Y., Long, M., Wu, W., & Kuca, K. (2021). Fumonisin B 1: Mechanisms of toxicity and biological detoxification progress in animals. *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, 149. <https://doi.org/10.1016/J.FCT.2021.111977>
- Chen, J., Wen, J., Tang, Y., Shi, J., Mu, G., Yan, R., Cai, J., & Long, M. (2021). Research Progress on Fumonisin B1 Contamination and Toxicity: A Review. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 26(17). <https://doi.org/10.3390/MOLECULES26175238>
- Chen, Y., Qu, G., Quan, H., Wang, Y., Wang, C., Haque, M. A., & He, C. (2022). A Novel Cost-Effective Nanobody against Fumonisin B1 Contaminations: Efficacy Test in Dairy Milk and Chickens. *Toxins*, 14(12). <https://doi.org/10.3390/TOXINS14120821>
- Colović, R., Puvača, N., Cheli, F., Avantaggiato, G., Greco, D., Đuragić, O., Kos, J., & Pinotti, L. (2019). Decontamination of Mycotoxin-Contaminated Feedstuffs and Compound Feed. *Toxins*, 11(11). <https://doi.org/10.3390/TOXINS11110617>
- Coppa, C. F. S. C., Cirelli, A. C., Gonçalves, B. L., Barnabé, E. M. B., Mousavi Khaneghah, A., Corassin, C. H., & Oliveira, C. A. F. (2020). Dietary exposure assessment and risk characterization of mycotoxins in lactating women: Case study of São Paulo state, Brazil. *Food Research International (Ottawa, Ont.)*, 134. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2020.109272>
- Corassin, C. H., Bovo, F., Rosim, R. E., & Oliveira, C. A. F. (2013). Efficiency of *Saccharomyces cerevisiae* and lactic acid bacteria strains to bind aflatoxin M1 in UHT skim milk. *Food Control*, 31(1), 80–83.
<https://doi.org/10.1016/J.FOODCONT.2012.09.033>
- Dąbrowski, M., Jakimiuk, E., Gajęcka, M., Gajęcki, M. T., & Zielonka. (2017). Effect of deoxynivalenol on the levels of toll-like receptors 2 and 9 and their mRNA expression in enterocytes in the porcine large intestine: a preliminary study. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, 20(2), 213–220. <https://doi.org/10.1515/PJVS-2017-0026>
- Dal Pozzo, M., Viegas, J., Kozloski, G. V., Stefanello, C. M., da Silveira, A. M., Bayer, C., & Santurio, J. M. (2016). The Effect of Mycotoxins Adsorbents Beta Glucans or Montmorillonite on Bovine Ruminal Fermentation In Vitro. *Acta Scientiae Veterinariae*, 44(1), 6–6. <https://doi.org/10.22456/1679-9216.80851>
- Damato, A., Vanzani, P., Giannuzzi, D., Giaretta, E., Novelli, E., Vianello, F., Tagliapietra, F., & Zennaro, L. (2022). Bentonite does not affect in vitro ruminal gross fermentations but could modify ruminal metabolome and mineral content. A proof of concept. *Research in Veterinary Science*, 144, 78–81. <https://doi.org/10.1016/J.RVSC.2022.01.012>
- Dänicke, S., & Brezina, U. (2013). Kinetics and metabolism of the *Fusarium* toxin deoxynivalenol in farm animals: Consequences for diagnosis of exposure and

- intoxication and carry over. *Food and Chemical Toxicology*, *60*, 58–75.
<https://doi.org/10.1016/J.FCT.2013.07.017>
- Dänicke, S., Keese, C., Meyer, U., Starke, A., Kinoshita, A., & Rehage, J. (2014). Zearalenone (ZEN) metabolism and residue concentrations in physiological specimens of dairy cows exposed long-term to ZEN-contaminated diets differing in concentrate feed proportions. *Archives of Animal Nutrition*, *68*(6), 492–506.
<https://doi.org/10.1080/1745039X.2014.973236>
- De Ruyck, K., Huybrechts, I., Yang, S., Arcella, D., Claeys, L., Abbeddou, S., De Keyzer, W., De Vries, J., Ocke, M., Ruprich, J., De Boevre, M., & De Saeger, S. (2020). Mycotoxin exposure assessments in a multi-center European validation study by 24-hour dietary recall and biological fluid sampling. *Environment International*, *137*.
<https://doi.org/10.1016/J.ENVINT.2020.105539>
- Debevere, S., Schatzmayr, D., Reisinger, N., Aleschko, M., Haesaert, G., Rychlik, M., Croubels, S., & Fievez, V. (2020). Evaluation of the Efficacy of Mycotoxin Modifiers and Mycotoxin Binders by Using an In Vitro Rumen Model as a First Screening Tool. *Toxins*, *12*(6). <https://doi.org/10.3390/TOXINS12060405>
- Dhakal, A., Hashmi, M. F., & Sbar, E. (2023). Aflatoxin Toxicity. *StatPearls*.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557781/>
- Di Gregorio, M. C., Neeff, D. V. De, Jager, A. V., Corassin, C. H., Carão, Á. C. D. P., Albuquerque, R. De, Azevedo, A. C. De, & Oliveira, C. A. F. (2014). Mineral adsorbents for prevention of mycotoxins in animal feeds.
<http://Dx.Doi.Org/10.3109/15569543.2014.905604>, *33*(3), 125–135.
<https://doi.org/10.3109/15569543.2014.905604>
- Diao, Q. yu, Zhang, R., & Tu, Y. (2017). Current research progresses on calf rearing and nutrition in China. *Journal of Integrative Agriculture*, *16*(12), 2805–2814.
[https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(17\)61767-2](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(17)61767-2)
- Distaso, M. A., Chernikova, T. N., Bargiela, R., Coscolín, C., Stogios, P., Gonzalez-Alfonso, J. L., Lemak, S., Khusnutdinova, A. N., Plou, F. J., Evdokimova, E., Savchenko, A., Lunev, E. A., Yakimov, M. M., Golyshina, O. V., Ferrer, M., Yakunin, A. F., & Golyshin, P. N. (2023). Thermophilic Carboxylesterases from Hydrothermal Vents of the Volcanic Island of Ischia Active on Synthetic and Biobased Polymers and Mycotoxins. *Applied and Environmental Microbiology*, *89*(2). <https://doi.org/10.1128/AEM.01704-22>
- D’Occhio, M. J., Baruselli, P. S., & Campanile, G. (2019). Influence of nutrition, body condition, and metabolic status on reproduction in female beef cattle: A review. *Theriogenology*, *125*, 277–284.
<https://doi.org/10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2018.11.010>
- Dong, T., Liang, Y., Shao, T., Wang, W., Ma, P., Wang, W., Li, J., & Yuan, X. (2023). Detoxifying mycotoxins and antifungal properties of two rumen-derived *Enterococcus* species in artificially contaminated corn silages. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *103*(12). <https://doi.org/10.1002/JSFA.12670>

- EFSA. (2011). Scientific Opinion on the risks for animal and public health related to the presence of T-2 and HT-2 toxin in food and feed. *EFSA Journal*, 9(12).
<https://doi.org/10.2903/J.EFSA.2011.2481>
- EFSA. (2013). Scientific Opinion on risks for animal and public health related to the presence of nivalenol in food and feed. *EFSA Journal*, 11(6).
<https://doi.org/10.2903/J.EFSA.2013.3262>
- El-Nahla, S. M., Imam, H. M., Moussa, E. A., Ibrahim, A. M., & Ghanam, A. R. (2013). Teratogenic effects of aflatoxin in Rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). *Journal of Veterinary Anatomy*, 6(2), 67–85. <https://doi.org/10.21608/JVA.2013.45024>
- El-Sayed, R. A., Jebur, A. B., Kang, W., El-Esawi, M. A., & El-Demerdash, F. M. (2022). An overview on the major mycotoxins in food products: characteristics, toxicity, and analysis. *Journal of Future Foods*, 2(2), 91–102.
<https://doi.org/10.1016/J.JFUTFO.2022.03.002>
- European Commission. (2013). Commission Implementing Regulation (EU) No. 1016/2013 of 23 October 2013 concerning the authorisation of a preparation of a micro-organism strain DSM 11798 of the Coriobacteriaceae family as a feed additive for pigs. *Official Journal of the European Union*, 11, 36–38.
- European Community. (2006a). Commission Recommendation 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*.
<http://www.efsa.europa.eu/etc/medialib/efsa/science/contam/>
- European Community. (2006b). Setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs (Text with EEA relevance). *Official Journal of the European Union*, Art. 1881/2006. <http://www.efsa.europa.eu/etc/medialib/efsa/>
- Falkauskas, R., Bakutis, B., Jovaišienė, J., Vaičiulienė, G., Gerulis, G., Kerzienė, S., Jacevičienė, I., Jacevičius, E., & Baliukonienė, V. (2022). Zearalenone and Its Metabolites in Blood Serum, Urine, and Milk of Dairy Cows. *Animals : An Open Access Journal from MDPI*, 12(13). <https://doi.org/10.3390/ANI12131651>
- Franco, L. A., Petta, T., Rottinghaus, G., Bordin, K., Gomes, G., & Oliveira, C. (2019). Co-occurrence of mycotoxins in maize food and maize-based feed from small-scale farms in Brazil: a pilot study. *Mycotoxin Research*, 35(1), 65–73. <https://doi.org/10.1007/S12550-018-0331-4>
- Franco, L. T., Petta, T., Rottinghaus, G. E., Bordin, K., Gomes, G. A., Alvito, P., Assunção, R., & Oliveira, C. A. F. (2019). Assessment of mycotoxin exposure and risk characterization using occurrence data in foods and urinary biomarkers in Brazil. *Food and Chemical Toxicology : An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, 128, 21–34. <https://doi.org/10.1016/J.FCT.2019.03.046>
- Frey, M., Rosim, R., & Oliveira, C. (2021). Mycotoxin Co-Occurrence in Milks and Exposure Estimation: A Pilot Study in São Paulo, Brazil. *Toxins*, 13(8).
<https://doi.org/10.3390/TOXINS13080507>

- Fu, Y., Jin, Y., Tian, Y., Yu, H., Wang, R., Qi, H., Feng, B., & Zhang, J. (2022). Zearalenone Promotes LPS-Induced Oxidative Stress, Endoplasmic Reticulum Stress, and Accelerates Bovine Mammary Epithelial Cell Apoptosis. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(18). <https://doi.org/10.3390/IJMS231810925>
- Fu, Y. R., Jin, Y. C., Zhao, Y., Shan, A. S., Fang, H. T., Shen, J. L., Zhou, C. H., Yu, H., Zhou, Y. F., Wang, X., Wang, J. M., Li, R. H., Wang, R., & Zhang, J. (2019). Zearalenone induces apoptosis in bovine mammary epithelial cells by activating endoplasmic reticulum stress. *Journal of Dairy Science*, 102(11), 10543–10553. <https://doi.org/10.3168/JDS.2018-16216>
- Fusco, V., Chieffi, D., Fanelli, F., Logrieco, A. F., Cho, G. S., Kabisch, J., Böhnlein, C., & Franz, C. M. A. P. (2020). Microbial quality and safety of milk and milk products in the 21st century. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 19(4), 2013–2049. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12568>
- Fushimi, Y., Takagi, M., Uno, S., Kokushi, E., Nakamura, M., Hasunuma, H., Shinya, U., Deguchi, E., & Fink-Gremmels, J. (2014). Measurement of Sterigmatocystin Concentrations in Urine for Monitoring the Contamination of Cattle Feed. *Toxins 2014*, Vol. 6, Pages 3117-3128, 6(11), 3117–3128. <https://doi.org/10.3390/TOXINS6113117>
- Gallo, A., Minuti, A., Bani, P., Bertuzzi, T., Cappelli, F. P., Doupovec, B., Faas, J., Schatzmayr, D., & Trevisi, E. (2020). A mycotoxin-deactivating feed additive counteracts the adverse effects of regular levels of Fusarium mycotoxins in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 103(12), 11314–11331. <https://doi.org/10.3168/JDS.2020-18197>
- Gambacorta, L., Pinton, P., Avantaggiato, G., Oswald, I. P., & Solfrizzo, M. (2016). Grape Pomace, an Agricultural Byproduct Reducing Mycotoxin Absorption: In Vivo Assessment in Pig Using Urinary Biomarkers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64(35), 6762–6771. <https://doi.org/10.1021/ACS.JAFC.6B02146>
- Gao, S., Wu, Y., Xie, S., Shao, Z., Bao, X., Yan, Y., Wu, Y., Wang, J., & Zhang, Z. (2019). Determination of aflatoxins in milk sample with ionic liquid modified magnetic zeolitic imidazolate frameworks. *Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 1128. <https://doi.org/10.1016/J.JCHROMB.2019.121778>
- García-Seisdedos, D., Babiy, B., Lerma, M., Casado, M. E., Martínez-Botas, J., Lasunción, M. A., Pastor, Ó., & Busto, R. (2020). Curcumin stimulates exosome/microvesicle release in an in vitro model of intracellular lipid accumulation by increasing ceramide synthesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1865(5), 158638. <https://doi.org/10.1016/J.BBALIP.2020.158638>
- Gazzotti, T., Lugoboni, B., Zironi, E., Barbarossa, A., Serraino, A., & Pagliuca, G. (2009). Determination of fumonisin B1 in bovine milk by LC–MS/MS. *Food Control*, 20(12), 1171–1174. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCONT.2009.02.009>
- Ghazalah, A. A., Abd-Elsamee, M. O., Moustafa, K. E. M. E., Khattab, M. A., & Rehan, A. E. A. A. (2021). Effect of Nanosilica and Bentonite as Mycotoxins Adsorbent Agent in Broiler Chickens' Diet on Growth Performance and Hepatic Histopathology. *Animals : An Open Access Journal from MDPI*, 11(7). <https://doi.org/10.3390/ANI11072129>

- Gonçalves, B. L., Corassin, C. H., & Oliveira, C. A. F. (2015). Mycotoxicoses in dairy cattle: A review. *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances*, *10*(11), 752–760. <https://doi.org/10.3923/AJAVA.2015.752.760>
- Gonçalves, B. L., Gonçalves, J. L., Rosim, R. E., Cappato, L. P., Cruz, A. G., Oliveira, C. A. F., & Corassin, C. H. (2017). Effects of different sources of *Saccharomyces cerevisiae* biomass on milk production, composition, and aflatoxin M 1 excretion in milk from dairy cows fed aflatoxin B 1. *Journal of Dairy Science*, *100*(7), 5701–5708. <https://doi.org/10.3168/JDS.2016-12215>
- Gonçalves, B. L., Muaz, K., Coppa, C. F. S. C., Rosim, R. E., Kamimura, E. S., Oliveira, C. A. F., & Corassin, C. H. (2020). Aflatoxin M 1 absorption by non-viable cells of lactic acid bacteria and *Saccharomyces cerevisiae* strains in Frescal cheese. *Food Research International (Ottawa, Ont.)*, *136*. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2020.109604>
- Gonçalves, B. L., Rosim, R. E., Oliveira, C. A. F. de, & Corassin, C. H. (2015). The in vitro ability of different *Saccharomyces cerevisiae* – Based products to bind aflatoxin B1. *Food Control*, *47*, 298–300. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCONT.2014.07.024>
- Gonçalves, B. L., Uliana, R. D., Coppa, C. F. S. C., Lee, S. H. I., Kamimura, E. S., Oliveira, C. A. F., & Corassin, C. H. (2020). Aflatoxin M1: biological decontamination methods in milk and cheese. *Food Science and Technology*, *42*. <https://doi.org/10.1590/FST.22920>
- Greco, D., D'Ascanio, V., Santovito, E., Logrieco, A. F., & Avantaggiato, G. (2019). Comparative efficacy of agricultural by-products in sequestering mycotoxins. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *99*(4), 1623–1634. <https://doi.org/10.1002/JSFA.9343>
- Grenier, B., Bracarense, A. P. F. L., Schwartz, H. E., Lucioli, J., Cossalter, A. M., Moll, W. D., Schatzmayr, G., & Oswald, I. P. (2013). Biotransformation approaches to alleviate the effects induced by *Fusarium* Mycotoxins in swine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *61*(27), 6711–6719. https://doi.org/10.1021/JF400213Q/ASSET/IMAGES/MEDIUM/JF-2013-00213Q_0006.GIF
- Gruber-Dorninger, C., Faas, J., Doupovec, B., Aleschko, M., Stoiber, C., Höbartner-Gußl, A., Schöndorfer, K., Killinger, M., Zebeli, Q., & Schatzmayr, D. (2021). Metabolism of Zearalenone in the Rumen of Dairy Cows with and without Application of a Zearalenone-Degrading Enzyme. *Toxins*, *13*(2), 84. <https://doi.org/10.3390/TOXINS13020084>
- Gruber-Dorninger, C., Jenkins, T., & Schatzmayr, G. (2019). Global Mycotoxin Occurrence in Feed: A Ten-Year Survey. *Toxins*, *11*(7). <https://doi.org/10.3390/TOXINS11070375>
- Guan, Y., Chen, J., Nepovimova, E., Long, M., Wu, W., & Kuca, K. (2021). Aflatoxin Detoxification Using Microorganisms and Enzymes. *Toxins*, *13*(1). <https://doi.org/10.3390/TOXINS13010046>
- Guerrero-Netro, H. M., Barreta, M. H., Costa, E., Goetten, A., Dupras, R., Mills, L., Koch, J., Portela, V. M., Price, C. A., & Chorfi, Y. (2021). Effects of the mycotoxin metabolite de-

- epoxy-deoxynivalenol (DOM-1) on embryo development and sperm motility in cattle. *Journal of Applied Toxicology : JAT*, *41*(8), 1180–1187. <https://doi.org/10.1002/JAT.4102>
- Guerrero-Netro, H. M., Chorfi, Y., & Price, C. A. (2015). Effects of the mycotoxin deoxynivalenol on steroidogenesis and apoptosis in granulosa cells. *Reproduction (Cambridge, England)*, *149*(6), 555–561. <https://doi.org/10.1530/REP-15-0018>
- Guerrero-Netro, H. M., Estienne, A., Chorfi, Y., & Price, C. A. (2017). The mycotoxin metabolite deepoxy- deoxynivalenol increases apoptosis and decreases steroidogenesis in bovine ovarian theca cells. *Biology of Reproduction*, *97*(5), 746–757. <https://doi.org/10.1093/BIOLRE/IOX127>
- Hamad, G. M., Amer, A., El-Nogoumy, B., Ibrahim, M., Hassan, S., Siddiqui, S. A., EL-Gazzar, A. M., Khalifa, E., Omar, S. A., Abd-Elmohsen Abou-Alella, S., Ibrahim, S. A., Esatbeyoglu, T., & Mehany, T. (2022). Evaluation of the Effectiveness of Charcoal, *Lactobacillus rhamnosus*, and *Saccharomyces cerevisiae* as Aflatoxin Adsorbents in Chocolate. *Toxins*, *15*(1). <https://doi.org/10.3390/TOXINS15010021>
- Hamad, G. M., El-Makarem, H. S. A., Allam, M. G., El Okle, O. S., El-Toukhy, M. I., Mehany, T., El-Halmouch, Y., Abushaala, M. M. F., Saad, M. S., Korma, S. A., Ibrahim, S. A., Hafez, E. E., Amer, A., & Ali, E. (2023). Evaluation of the Adsorption Efficacy of Bentonite on Aflatoxin M1 Levels in Contaminated Milk. *Toxins*, *15*(2). <https://doi.org/10.3390/TOXINS15020107>
- Hammer, P. , A. Bluthgen, & H. G. Walte. (1996). Carry-over of fumonisin B-1 into the milk of lactating cows-Web of Science Core Collection. *MILCHWISSENSCHAFT-MILK SCIENCE INTERNATIONAL*, *51*(12), 691–695. <https://www.webofscience.com/wos/woscc/full-record/WOS:A1996WE36700009?SID=USW2EC0D7FTvj4f8IbmCp1AMKZzVQ>
- Han, X., Huangfu, B., Xu, T., Xu, W., Asakiya, C., He, X., & Huang, K. (2022). Research Progress of Safety of Zearalenone: A Review. *Toxins*, *14*(6). <https://doi.org/10.3390/TOXINS14060386>
- Hartinger, T., Kröger, I., Neubauer, V., Faas, J., Doupovec, B., Schatzmayr, D., & Zebeli, Q. (2023). Zearalenone and Its Emerging Metabolites Promptly Affect the Rumen Microbiota in Holstein Cows Fed a Forage-Rich Diet. *Toxins*, *15*(3), 185. <https://doi.org/10.3390/TOXINS15030185>
- Hassan, Y. I., & Zhou, T. (2018). Promising Detoxification Strategies to Mitigate Mycotoxins in Food and Feed. *Toxins*, *10*(3). <https://doi.org/10.3390/TOXINS10030116>
- Hassan, Z. U., Al Thani, R., A. Atia, F., Al Meer, S., Migheli, Q., & Jaoua, S. (2018). Co-occurrence of mycotoxins in commercial formula milk and cereal-based baby food on the Qatar market. <https://doi.org/10.1080/19393210.2018.1437785>, *11*(3), 191–197. <https://doi.org/10.1080/19393210.2018.1437785>
- Hasunuma, H., Takagi, M., Kawamura, O., Taniguchi, C., Nakamura, M., Chuma, T., Uno, S., Kokushi, E., Matsumoto, D., Tshering, C., Deguchi, E., & Fink-Gremmels, J. (2012). Natural contamination of dietary rice straw with zearalenone and urinary zearalenone

concentrations in a cattle herd. *Journal of Animal Science*, 90(5), 1610–1616.
<https://doi.org/10.2527/JAS.2011-4579>

- Hooft, J. M., & Bureau, D. P. (2021). Deoxynivalenol: Mechanisms of action and its effects on various terrestrial and aquatic species. *Food and Chemical Toxicology : An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, 157. <https://doi.org/10.1016/J.FCT.2021.112616>
- Horky, P., Gruberova, H. A., Aulichova, T., Malyugina, S., Slama, P., Pavlik, A., Skladanka, J., Skoric, M., & Skalickova, S. (2021). Protective effect of a new generation of activated and purified bentonite in combination with yeast and phyto-genic substances on mycotoxin challenge in pigs. *PloS One*, 16(10).
<https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0259132>
- Huang, L. C., Zheng, N., Zheng, B. Q., Wen, F., Cheng, J. B., Han, R. W., Xu, X. M., Li, S. L., & Wang, J. Q. (2014). Simultaneous determination of aflatoxin M1, ochratoxin A, zearalenone and α -zearalenol in milk by UHPLC-MS/MS. *Food Chemistry*, 146, 242–249. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2013.09.047>
- IARC. (1993). Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. In *IARC Scientific Publication* (Vol. 56). <https://monographs.iarc.who.int/wp-content/uploads/2018/06/mono56.pdf>
- Islam, M. R., Kim, J. W., Roh, Y. S., Kim, J. H., Han, K. M., Kwon, H. J., Lim, C. W., & Kim, B. (2017). Evaluation of immunomodulatory effects of zearalenone in mice. *Journal of Immunotoxicology*, 14(1), 125–136. <https://doi.org/10.1080/1547691X.2017.1340371>
- Ismail, A., Gonçalves, B. L., de Neeff, D. V., Ponzilacqua, B., Coppa, C. F. S. C., Hintzsche, H., Sajid, M., Cruz, A. G., Corassin, C. H., & Oliveira, C. A. F. (2018). Aflatoxin in foodstuffs: Occurrence and recent advances in decontamination. *Food Research International (Ottawa, Ont.)*, 113, 74–85.
<https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2018.06.067>
- Jiang, Y. H., Wang, P., Yang, H. J., & Chen, Y. (2014). The efficacy of bamboo charcoal in comparison with smectite to reduce the detrimental effect of aflatoxin B1 on in vitro rumen fermentation of a hay-rich feed mixture. *Toxins*, 6(7), 2008–2023.
<https://doi.org/10.3390/TOXINS6072008>
- Jiang, Y., Ogunade, I. M., Vyas, D., & Adesogan, A. T. (2021). Aflatoxin in Dairy Cows: Toxicity, Occurrence in Feedstuffs and Milk and Dietary Mitigation Strategies. *Toxins*, 13(4). <https://doi.org/10.3390/TOXINS13040283>
- Jovaišiene, J., Bakutis, B., Baliukoniene, V., & Gerulis, G. (2016). Fusarium and Aspergillus mycotoxins effects on dairy cow health, performance and the efficacy of Anti-Mycotoxin Additive. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, 19(1), 79–87.
<https://doi.org/10.1515/PJVS-2016-0011>
- Kang'Ethe, E. K., Sirma, A. J., Murithi, G., Mburugu-Mosoti, C. K., Ouko, E. O., Korhonen, H. J., Nduhiu, G. J., Mungatu, J. K., Joutsjoki, V., Lindfors, E., & Ramo, S. (2017). Occurrence of mycotoxins in food, feed, and milk in two counties from different agro-ecological zones and with historical outbreak of aflatoxins and fumonisins poisonings in

- Kenya. *Food Quality and Safety*, 1(3), 161–170.
<https://doi.org/10.1093/FQSAFE/FYX018>
- Karabulut, S., Paytakov, G., & Leszczynski, J. (2014). Reduction of aflatoxin B1 to aflatoxicol: a comprehensive DFT study provides clues to its toxicity. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94(15), 3134–3140. <https://doi.org/10.1002/JSFA.6663>
- Karaman, E. F., Zeybel, M., & Ozden, S. (2020). Evaluation of the epigenetic alterations and gene expression levels of HepG2 cells exposed to zearalenone and α -zearalenol. *Toxicology Letters*, 326, 52–60. <https://doi.org/10.1016/J.TOXLET.2020.02.015>
- Karlovsky, P., Suman, M., Berthiller, F., De Meester, J., Eisenbrand, G., Perrin, I., Oswald, I. P., Speijers, G., Chiodini, A., Recker, T., & Dussort, P. (2016). Impact of food processing and detoxification treatments on mycotoxin contamination. *Mycotoxin Research*, 32(4), 179–205. <https://doi.org/10.1007/S12550-016-0257-7>
- Katsoulos, P. D., Karatzia, M. A., Boscós, C., Wolf, P., & Karatzias, H. (2016). In-field evaluation of clinoptilolite feeding efficacy on the reduction of milk aflatoxin M1 concentration in dairy cattle. *Journal of Animal Science and Technology*, 58. <https://doi.org/10.1186/S40781-016-0106-4>
- Keller, L., Abrunhosa, L., Keller, K., Rosa, C. A., Cavaglieri, L., & Venâncio, A. (2015). Zearalenone and Its Derivatives α -Zearalenol and β -Zearalenol Decontamination by *Saccharomyces cerevisiae* Strains Isolated from Bovine Forage. *Toxins*, 7(8), 3297–3308. <https://doi.org/10.3390/TOXINS7083297>
- Kemboi, D., Antonissen, G., Ochieng, P., Croubels, S., De Baere, S., Scippo, M. L., Okoth, S., Kangethe, E., Faas, J., Doupovec, B., Lindahl, J., & Gathumbi, J. (2023). Efficacy of Bentonite and Fumonisin Esterase in Mitigating the Effects of Aflatoxins and Fumonisin in Two Kenyan Cattle Breeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 71(4), 2143–2151. <https://doi.org/10.1021/ACS.JAFC.2C08217>
- Khadivi, R., Razavilar, V., Anvar, S. A. A., & Akbari-Adergani, B. (2020). Aflatoxin M1-Binding Ability of Selected Lactic Acid Bacteria Strains and *Saccharomyces boulardii* in the Experimentally Contaminated Milk Treated with Some Biophysical Factors. *Archives of Razi Institute*, 75(1), 63–73. <https://doi.org/10.22092/ARI.2019.123985.1265>
- Khan, R. B., Phulukdaree, A., & Chaturgoon, A. A. (2018). Fumonisin B1 induces oxidative stress in oesophageal (SNO) cancer cells. *Toxicon*, 141, 104–111. <https://doi.org/10.1016/J.TOXICON.2017.12.041>
- Kihal, A., Rodríguez-Prado, M., & Calsamiglia, S. (2022). The efficacy of mycotoxin binders to control mycotoxins in feeds and the potential risk of interactions with nutrient: a review. *Journal of Animal Science*, 100(11). <https://doi.org/10.1093/JAS/SKAC328>
- Kihal, A., Rodríguez-Prado, M., & Calsamiglia, S. (2023). A network meta-analysis on the efficacy of different mycotoxin binders to reduce aflatoxin M1 in milk after aflatoxin B1 challenge in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 106(8). <https://doi.org/10.3168/JDS.2022-23028>
- Kiyothong, K., Rowlinson, P., Wanapat, M., Khampa, S., Kiyothong, K., Rowlinson, P., Wanapat, M., & Khampa, S. (2012). Effect of mycotoxin deactivator product

supplementation on dairy cows. *Animal Production Science*, 52(9), 832–841.
<https://doi.org/10.1071/AN11205>

- Knutsen, H. K., Alexander, J., Barregård, L., Bignami, M., Brüschweiler, B., Ceccatelli, S., Cottrill, B., Dinovi, M., Edler, L., Grasl-Kraupp, B., Hogstrand, C., Hoogenboom, L., Nebbia, C. S., Petersen, A., Rose, M., Roudot, A. C., Schwerdtle, T., Vlemminckx, C., Vollmer, G., ... Oswald, I. P. (2017). Risks for animal health related to the presence of zearalenone and its modified forms in feed. *EFSA Journal*, 15(7), e04851.
<https://doi.org/10.2903/J.EFSA.2017.4851>
- Kolosova, A., & Stroka, J. (2011). Substances for reduction of the contamination of feed by mycotoxins: a review. *Http://Doi.Org/10.3920/WMJ2011.1288*, 4(3), 225–256.
<https://doi.org/10.3920/WMJ2011.1288>
- Kong, C., Shin, S. Y., & Kim, B. G. (2014). Evaluation of mycotoxin sequestering agents for aflatoxin and deoxynivalenol: An in vitro approach. *SpringerPlus*, 3(1), 1–4.
<https://doi.org/10.1186/2193-1801-3-346/TABLES/2>
- König, S., Pace, S., Pein, H., Heinekamp, T., Kramer, J., Romp, E., Straßburger, M., Troisi, F., Proschak, A., Dworschak, J., Scherlach, K., Rossi, A., Sautebin, L., Haeggström, J. Z., Hertweck, C., Brakhage, A. A., Gerstmeier, J., Proschak, E., & Werz, O. (2019). Gliotoxin from *Aspergillus fumigatus* Abrogates Leukotriene B4 Formation through Inhibition of Leukotriene A4 Hydrolase. *Cell Chemical Biology*, 26(4), 524-534.e5.
<https://doi.org/10.1016/J.CHEMBIOL.2019.01.001>
- Kuharić, Ž., Jakopović, Ž., Čanak, I., Frece, J., Bošnjir, J., Pavlek, Ž., Ivešić, M., & Markov, K. (2018). Removing aflatoxin M1 from milk with native lactic acid bacteria, centrifugation, and filtration. *Arhiv Za Higijenu Rada i Toksikologiju*, 69(4), 334–339.
<https://doi.org/10.2478/AIHT-2018-69-3160>
- Lagrange, V., Whitsett, D., & Burris, C. (2015). Global market for dairy proteins. *Journal of Food Science*, 80 Suppl 1(S1), A16–A22. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.12801>
- Lee, H. J., Oh, S. Y., & Jo, I. (2021). Zearalenone Induces Endothelial Cell Apoptosis through Activation of a Cytosolic Ca²⁺/ERK1/2/p53/Caspase 3 Signaling Pathway. *Toxins*, 13(3). <https://doi.org/10.3390/TOXINS13030187>
- Lee, J. Y., Lim, W., Park, S., Kim, J., You, S., & Song, G. (2019). Deoxynivalenol induces apoptosis and disrupts cellular homeostasis through MAPK signaling pathways in bovine mammary epithelial cells. *Environmental Pollution (Barking, Essex : 1987)*, 252(Pt A), 879–887. <https://doi.org/10.1016/J.ENVPOL.2019.06.001>
- Li, K., Yu, S., Yu, D., Lin, H., Liu, N., & Wu, A. (2022). Biodegradation of Fumonisin by the Consecutive Action of a Fusion Enzyme. *Toxins*, 14(4).
<https://doi.org/10.3390/TOXINS14040266>
- Li, L., Zhang, T., Ren, X., Li, B., & Wang, S. (2021). Male reproductive toxicity of zearalenone-meta-analysis with mechanism review. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 221. <https://doi.org/10.1016/J.ECOENV.2021.112457>
- Li, S. J., Zhang, G., Xue, B., Ding, Q., Han, L., Huang, J. chu, Wu, F., Li, C., & Yang, C. (2022). Toxicity and detoxification of T-2 toxin in poultry. *Food and Chemical*

Toxicology : An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association, 169. <https://doi.org/10.1016/J.FCT.2022.113392>

- Li, Z., Wang, Y., Liu, Z., Jin, S., Pan, K., Liu, H., Liu, T., Li, X., Zhang, C., Luo, X., Song, Y., Zhao, J., & Zhang, T. (2021). Biological detoxification of fumonisin by a novel carboxylesterase from Sphingomonadales bacterium and its biochemical characterization. *International Journal of Biological Macromolecules*, 169, 18–27. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2020.12.033>
- Liao, P., Yuan, S., Xie, W., Zhang, W., Tong, M., & Wang, K. (2013). Adsorption of nitrogen-heterocyclic compounds on bamboo charcoal: kinetics, thermodynamics, and microwave regeneration. *Journal of Colloid and Interface Science*, 390(1), 189–195. <https://doi.org/10.1016/J.JCIS.2012.09.037>
- Liu, J., & Applegate, T. (2020). Zearalenone (ZEN) in Livestock and Poultry: Dose, Toxicokinetics, Toxicity and Estrogenicity. *Toxins*, 12(6). <https://doi.org/10.3390/TOXINS12060377>
- Llorens, P., Herrera, M., Juan-García, A., Payá, J. J., Moltó, J. C., Ariño, A., & Juan, C. (2022). Biomarkers of Exposure to Zearalenone in In Vivo and In Vitro Studies. *Toxins 2022*, Vol. 14, Page 291, 14(5), 291. <https://doi.org/10.3390/TOXINS14050291>
- Lumsangkul, C., Chiang, H. I., Lo, N. W., Fan, Y. K., & Ju, J. C. (2019). Developmental Toxicity of Mycotoxin Fumonisin B₁ in Animal Embryogenesis: An Overview. *Toxins*, 11(2). <https://doi.org/10.3390/TOXINS11020114>
- Luo, Y., Liu, X., Yuan, L., & Li, J. (2020). Complicated interactions between bio-adsorbents and mycotoxins during mycotoxin adsorption: Current research and future prospects. *Trends in Food Science & Technology*, 96, 127–134. <https://doi.org/10.1016/J.TIFS.2019.12.012>
- Mahato, D. K., Devi, S., Pandhi, S., Sharma, B., Maurya, K. K., Mishra, S., Dhawan, K., Selvakumar, R., Kamle, M., Mishra, A. K., & Kumar, P. (2021). Occurrence, Impact on Agriculture, Human Health, and Management Strategies of Zearalenone in Food and Feed: A Review. *Toxins*, 13(2). <https://doi.org/10.3390/TOXINS13020092>
- Mally, A., Solfrizzo, M., & Degen, G. H. (2016). Biomonitoring of the mycotoxin Zearalenone: current state-of-the art and application to human exposure assessment. *Archives of Toxicology*, 90(6), 1281–1292. <https://doi.org/10.1007/S00204-016-1704-0>
- Masching, S., Naehrer, K., Schwartz-Zimmermann, H. E., Sărăndan, M., Schaumberger, S., Dohnal, I., Nagl, V., & Schatzmayr, D. (2016). Gastrointestinal Degradation of Fumonisin B₁ by Carboxylesterase FumD Prevents Fumonisin Induced Alteration of Sphingolipid Metabolism in Turkey and Swine. *Toxins 2016*, Vol. 8, Page 84, 8(3), 84. <https://doi.org/10.3390/TOXINS8030084>
- Matusik, J., & Deng, Y. (2020). Fumonisin B₁ Interaction with Mg-Al and Mg-Fe Layered Double Hydroxides: Removal Efficiency and Mechanisms. *Materials (Basel, Switzerland)*, 13(19), 1–17. <https://doi.org/10.3390/MA13194344>
- Memiş, E. Y., & Yalçın, S. S. (2021). Human milk mycotoxin contamination: smoking exposure and breastfeeding problems. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal*

Medicine : The Official Journal of the European Association of Perinatal Medicine, the Federation of Asia and Oceania Perinatal Societies, the International Society of Perinatal Obstetricians, 34(1), 31–40. <https://doi.org/10.1080/14767058.2019.1586879>

- Minervini, F., Lacalandra, G. M., Filannino, A., Garbetta, A., Nicassio, M., Dell'Aquila, M. E., & Visconti, A. (2010). Toxic effects induced by mycotoxin fumonisin B1 on equine spermatozoa: assessment of viability, sperm chromatin structure stability, ROS production and motility. *Toxicology in Vitro : An International Journal Published in Association with BIBRA*, 24(8), 2072–2078. <https://doi.org/10.1016/J.TIV.2010.05.024>
- Mishra, S., Dwivedi, P. D., Pandey, H. P., & Das, M. (2014). Role of oxidative stress in Deoxynivalenol induced toxicity. *Food and Chemical Toxicology : An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, 72, 20–29. <https://doi.org/10.1016/J.FCT.2014.06.027>
- Mishra, S., Srivastava, S., Dewangan, J., Divakar, A., & Kumar Rath, S. (2020). Global occurrence of deoxynivalenol in food commodities and exposure risk assessment in humans in the last decade: a survey. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 60(8), 1346–1374. <https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1571479>
- Møller, C. O. de A., Freire, L., Rosim, R. E., Margalho, L. P., Balthazar, C. F., Franco, L. T., Sant'Ana, A. de S., Corassin, C. H., Rattray, F. P., & Oliveira, C. A. F. de. (2021). Effect of Lactic Acid Bacteria Strains on the Growth and Aflatoxin Production Potential of *Aspergillus parasiticus*, and Their Ability to Bind Aflatoxin B 1, Ochratoxin A, and Zearalenone in vitro. *Frontiers in Microbiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2021.655386>
- Moraes, W. B., Madden, L. V., Gillespie, J., & Paul, P. A. (2023). Environment, Grain Development, and Harvesting Strategy Effects on Zearalenone Contamination of Grain from Fusarium Head Blight-Affected Wheat Spikes. *Phytopathology*, 113(2), 225–238. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-05-22-0190-R>
- Mora-Medina, R., Lora-Benítez, A. J., Molina-López, A. M., Ayala-Soldado, N., & Moyano-Salvago, R. (2023). Effects of chronic low-dose aflatoxin B1 exposure in lactating Florida dairy goats. *Journal of Dairy Science*. <https://doi.org/10.3168/JDS.2022-22704>
- Mostrom, M. S., & Jacobsen, B. J. (2020). Ruminant Mycotoxicosis: An Update. *The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice*, 36(3), 745–774. <https://doi.org/10.1016/J.CVFA.2020.08.011>
- Murugesan, G. R., Ledoux, D. R., Naehrer, K., Berthiller, F., Applegate, T. J., Grenier, B., Phillips, T. D., & Schatzmayr, G. (2015). Prevalence and effects of mycotoxins on poultry health and performance, and recent development in mycotoxin counteracting strategies. *Poultry Science*, 94(6), 1298–1315. <https://doi.org/10.3382/PS/PEV075>
- Nayakwadi, S., Ramu, R., Sharma, A. K., Gupta, V. K., Rajukumar, K., Kumar, V., Shirahatti, P. S., Rashmi, L., & Basalingappa, K. M. (2020). Toxicopathological studies on the effects of T-2 mycotoxin and their interaction in juvenile goats. *PloS One*, 15(3). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0229463>

- Nguyen, T., Flint, S., & Palmer, J. (2020). Control of aflatoxin M 1 in milk by novel methods: A review. *Food Chemistry*, 311. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2019.125984>
- Novak, B., Vatzia, E., Springler, A., Pierron, A., Gerner, W., Reisinger, N., Hessenberger, S., Schatzmayr, G., & Mayer, E. (2018). Bovine Peripheral Blood Mononuclear Cells Are More Sensitive to Deoxynivalenol Than Those Derived from Poultry and Swine. *Toxins*, 10(4). <https://doi.org/10.3390/TOXINS10040152>
- Oliveira, C. A. F., Corassin, C. H., Correa, B., & Oswald, I. P. (2014). Animal health: Mycotoxins. *Encyclopedia of Agriculture and Food Systems*, 1, 358–377.
- Ondiek, W., Wang, Y., Sun, L., Zhou, L., On, S. L. W., Zheng, H., & Ravi, G. (2022). Removal of aflatoxin b1 and t-2 toxin by bacteria isolated from commercially available probiotic dairy foods. *Food Science and Technology International*, 28(1), 15–25. https://doi.org/10.1177/1082013220987916/ASSET/IMAGES/LARGE/10.1177_1082013220987916-FIG4.JPEG
- Owen, R., Galloway, T. S., Hagger, J. A., Jones, M. B., & Depledge, M. H. (2008). Biomarkers and environmental risk assessment: guiding principles from the human health field. *Marine Pollution Bulletin*, 56(4), 613–619. <https://doi.org/10.1016/J.MARPOLBUL.2008.01.022>
- Oyagbemi, A. A., Azeez, O. I., & Saba, A. B. (2010). Hepatocellular carcinoma and the underlying mechanisms. *African Health Sciences*, 10(1), 93. [/pmc/articles/PMC2895801/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2895801/)
- Palade, L. M., Dore, M. I., Marin, D. E., Rotar, M. C., & Taranu, I. (2020). Assessment of Food By-Products' Potential for Simultaneous Binding of Aflatoxin B1 and Zearalenone. *Toxins*, 13(1). <https://doi.org/10.3390/TOXINS13010002>
- Pantaya, D., Morgavi, D. P., Silberberg, M., Chaucheyras-Durand, F., Martin, C., Suryahadi, Wiryawan, K. G., & Boudra, H. (2016). Bioavailability of aflatoxin B1 and ochratoxin A, but not fumonisin B1 or deoxynivalenol, is increased in starch-induced low ruminal pH in nonlactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 99(12), 9759–9767. <https://doi.org/10.3168/JDS.2016-11421>
- Pante, G. C., Castro, J. C., Lini, R. S., Romoli, J. C. Z., Almeida, R. T. R. de, Garcia, F. P., Nakamura, C. V., Pilau, E. J., Abreu Filho, B. A. de, & Machinski, M. (2021). Litsea cubeba essential oil: chemical profile, antioxidant activity, cytotoxicity, effect against *Fusarium verticillioides* and fumonisins production. <https://doi.org/10.1080/03601234.2021.1890519>, 56(4), 387–395. <https://doi.org/10.1080/03601234.2021.1890519>
- Papaoannou, D., Katsoulos, P. D., Panousis, N., & Karatzias, H. (2005). The role of natural and synthetic zeolites as feed additives on the prevention and/or the treatment of certain farm animal diseases: A review. *Microporous and Mesoporous Materials*, 84(1–3), 161–170. <https://doi.org/10.1016/J.MICROMESO.2005.05.030>
- Pappas, A. C., Tsiplakou, E., Georgiadou, M., Anagnostopoulos, C., Markoglou, A. N., Liapis, K., & Zervas, G. (2014). Bentonite binders in the presence of mycotoxins: Results of in vitro preliminary tests and an in vivo broiler trial. *Applied Clay Science*, 99, 48–53. <https://doi.org/10.1016/J.CLAY.2014.06.009>

- Pate, R. T., Paulus Compart, D. M., & Cardoso, F. C. (2018). Aluminosilicate clay improves production responses and reduces inflammation during an aflatoxin challenge in lactating Holstein cows. *Journal of Dairy Science*, *101*(12), 11421–11434. <https://doi.org/10.3168/JDS.2018-15024>
- Pei, S. C., Zhen, Y. P., Gao, J. W., Lee, W. J., Zhang, H. F., Ji, C., Zhang, X. Z., & Chen, C. (2014). Screening and monitoring zearalenone-producing *Fusarium* species by PCR and zearalenone by monoclonal antibodies in feed from China. *Food Additives & Contaminants. Part B, Surveillance*, *7*(4), 282–287. <https://doi.org/10.1080/19393210.2014.925981>
- Penagos-Tabares, F., Sulyok, M., Artavia, J. I., Flores-Quiroz, S. I., Garzón-Pérez, C., Castillo-Lopez, E., Zavala, L., Orozco, J. D., Faas, J., Krska, R., & Zebeli, Q. (2023). Mixtures of Mycotoxins, Phytoestrogens, and Other Secondary Metabolites in Whole-Plant Corn Silages and Total Mixed Rations of Dairy Farms in Central and Northern Mexico. *Toxins*, *15*(2). <https://doi.org/10.3390/TOXINS15020153>
- Perczak, A., Jus, K., Gwiazdowska, D., Marchwinska, K., & Waskiewicz, A. (2019). The Efficiency of Deoxynivalenol Degradation by Essential Oils under In Vitro Conditions. *Foods* 2019, Vol. 8, Page 403, *8*(9), 403. <https://doi.org/10.3390/FOODS8090403>
- Perczak, A., Juś, K., Marchwińska, K., Gwiazdowska, D., Waśkiewicz, A., & Goliński, P. (2016). Degradation of Zearalenone by Essential Oils under In vitro Conditions. *Frontiers in Microbiology*, *7*(AUG). <https://doi.org/10.3389/FMICB.2016.01224>
- Pereira, C. S., Cunha, S. C., & Fernandes, J. O. (2019). Prevalent Mycotoxins in Animal Feed: Occurrence and Analytical Methods. *Toxins* 2019, Vol. 11, Page 290, *11*(5), 290. <https://doi.org/10.3390/TOXINS11050290>
- Perincherry, L., Ajmi, C., Oueslati, S., Waśkiewicz, A., & Stępień, Ł. (2020). Induction of *Fusarium lytic* Enzymes by Extracts from Resistant and Susceptible Cultivars of Pea (*Pisum sativum* L.). *Pathogens (Basel, Switzerland)*, *9*(11), 1–15. <https://doi.org/10.3390/PATHOGENS9110976>
- Pietri, A., Bertuzzi, T., Piva, G., Binder, E. M., Schatzmayr, D., & Rodrigues, I. (2009). Aflatoxin transfer from naturally contaminated feed to milk of dairy cows and the efficacy of a mycotoxin deactivating product. *International Journal of Dairy Science*, *4*(2), 34–42. <https://doi.org/10.3923/IJDS.2009.34.42>
- Pokrzywa, P., & Surma, M. (2022). Level of contamination with deoxynivalenol, zearalenone and fumonisins in cereal products - assessment of consumer exposure. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine : AAEM*, *29*(1), 72–79. <https://doi.org/10.26444/AAEM/144416>
- Polak-śliwińska, M., & Paszczyk, B. (2021). Trichothecenes in Food and Feed, Relevance to Human and Animal Health and Methods of Detection: A Systematic Review. *Molecules (Basel, Switzerland)*, *26*(2). <https://doi.org/10.3390/MOLECULES26020454>
- Qu, L., Wang, L., Ji, H., Fang, Y., Lei, P., Zhang, X., Jin, L., Sun, D., & Dong, H. (2022). Toxic Mechanism and Biological Detoxification of Fumonisins. *Toxins*, *14*(3). <https://doi.org/10.3390/TOXINS14030182>

- Ráduly, Z., Szabó, A., Mézes, M., Balatoni, I., Price, R. G., Dockrell, M. E., Pócsi, I., & Csernoch, L. (2023). New perspectives in application of kidney biomarkers in mycotoxin induced nephrotoxicity, with a particular focus on domestic pigs. *Frontiers in Microbiology*, *14*. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2023.1085818>
- Ragoubi, C., Quintieri, L., Greco, D., Mehrez, A., Maatouk, I., D'ascanio, V., Landoulsi, A., & Avantaggiato, G. (2021). Mycotoxin Removal by *Lactobacillus* spp. and Their Application in Animal Liquid Feed. *Toxins*, *13*(3). <https://doi.org/10.3390/TOXINS13030185>
- Rai, A., Das, M., & Tripathi, A. (2020). Occurrence and toxicity of a fusarium mycotoxin, zearalenone. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *60*(16), 2710–2729. <https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1655388>
- Rai, A., Dixit, S., Singh, S. P., Gautam, N. K., Das, M., & Tripathi, A. (2018). Presence of Zearalenone in Cereal Grains and Its Exposure Risk Assessment in Indian Population. *Journal of Food Science*, *83*(12), 3126–3133. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.14404>
- Rashedi, M., Sohrabi, H. R., Ashjaazadeh, M. A., Azizi, H., & Rahimi, E. (2012). Zearalenone contamination in barley, corn, silage and wheat bran. *Toxicology and Industrial Health*, *28*(9), 779–782. <https://doi.org/10.1177/0748233711422733>
- Reisinger, N., Schürer-Waldheim, S., Mayer, E., Debevere, S., Antonissen, G., Sulyok, M., & Nagl, V. (2019). Mycotoxin Occurrence in Maize Silage-A Neglected Risk for Bovine Gut Health? *Toxins*, *11*(10). <https://doi.org/10.3390/TOXINS11100577>
- Renaud, J. B., Desrochers, N., Hoogstra, S., Garnham, C. P., & Sumarah, M. W. (2021). Structure Activity Relationship for Fumonisin Phytotoxicity. *Chemical Research in Toxicology*, *34*(6), 1604–1611. <https://doi.org/10.1021/ACS.CHEMRESTOX.1C00057>
- Riley, R. T., Voss, K. A., Coulombe, R. A., Pestka, J. J., & Williams, D. E. (2011). Developing mechanism-based and exposure biomarkers for mycotoxins in animals. *Determining Mycotoxins and Mycotoxigenic Fungi in Food and Feed*, 245–275. <https://doi.org/10.1533/9780857090973.3.245>
- Robinson, T. S., Mirocha, C. J., Kurtz, H. J., Behrens, J. C., Chi, M. S., Weaver, G. A., & Nystrom, S. D. (1979). Transmission of T-2 toxin into bovine and porcine milk. *Journal of Dairy Science*, *62*(4), 637–641. [https://doi.org/10.3168/JDS.S0022-0302\(79\)83301-9](https://doi.org/10.3168/JDS.S0022-0302(79)83301-9)
- Rodrigues, R. O., Rodrigues, R. O., Ledoux, D. R., McFadden, T. B., Rottinghaus, G. E., Borutova, R., & Averkieva, O. (2019). Feed additives containing sequestrant clay minerals and inactivated yeast reduce aflatoxin excretion in milk of dairy cows. *Journal of Dairy Science*, *102*(7), 6614–6623. <https://doi.org/10.3168/JDS.2018-16151>
- Rodríguez, M., & Núñez, F. (2020). Novel Approaches to Minimizing Mycotoxin Contamination. *Toxins*, *12*(4). <https://doi.org/10.3390/TOXINS12040216>
- Rodríguez-Blanco, M., Ramos, A. J., Sanchis, V., & Marín, S. (2021). Mycotoxins occurrence and fungal populations in different types of silages for dairy cows in Spain. *Fungal Biology*, *125*(2), 103–114. <https://doi.org/10.1016/J.FUNBIO.2019.08.006>

- Rosim, R. E., Oliveira, C. A. F. de, & Corassin, C. H. (2018). Aflatoxina M1 e Aflatoxina B1-lisina como Biomarcadores de Avaliação da Eficiência de Adsorventes para Aflatoxinas: Artigo de Revisão. *Ensaio e Ciência C Biológicas Agrárias e Da Saúde*, 22(3), 171–178. <https://doi.org/10.17921/1415-6938.2018V22N3P171-178>
- Rubert, J., Soler, C., & Mañes, J. (2012). Application of an HPLC–MS/MS method for mycotoxin analysis in commercial baby foods. *Food Chemistry*, 133(1), 176–183. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2011.12.035>
- Rushing, B. R., & Selim, M. I. (2019). Aflatoxin B1: A review on metabolism, toxicity, occurrence in food, occupational exposure, and detoxification methods. *Food and Chemical Toxicology : An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, 124, 81–100. <https://doi.org/10.1016/J.FCT.2018.11.047>
- Rychen, G., Aquilina, G., Azimonti, G., Bampidis, V., De, M., Bastos, L., Bories, G., Chesson, A., Cocconcelli, P. S., Flachowsky, G., Urgan Groppe, J. €., Kolar, B., Kouba, M., L Opez-Alonso, M., Mantovani, A., Mayo, B., Ramos, F., Saarela, M., Villa, R. E., ... L Opez Puente, S. (2016). Safety and efficacy of fumonisin esterase (FUMzyme®) as a technological feed additive for all avian species. *EFSA Journal*, 14(11), e04617. <https://doi.org/10.2903/J.EFSA.2016.4617>
- Savi, G. D., Cardoso, W. A., Furtado, B. G., Bortolotto, T., Zanoni, E. T., Scussel, R., Rezende, L. F., Machado-de-Ávila, R. A., Montedo, O. R. K., & Angioletto, E. (2018). Antifungal activities against toxigenic Fusarium specie and deoxynivalenol adsorption capacity of ion-exchanged zeolites. *Journal of Environmental Science and Health. Part. B, Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes*, 53(3), 184–190. <https://doi.org/10.1080/03601234.2017.1405639>
- Savi, G. D., Piacentini, K. C., Rocha, L. O., Carnielli-Queiroz, L., Furtado, B. G., Scussel, R., Zanoni, E. T., Machado-de-Ávila, R. A., Corrêa, B., & Angioletto, E. (2018). Incidence of toxigenic fungi and zearalenone in rice grains from Brazil. *International Journal of Food Microbiology*, 270, 5–13. <https://doi.org/10.1016/J.IJFOODMICRO.2018.02.004>
- Schmidt, H. P., Hagemann, N., Draper, K., & Kammann, C. (2019). The use of biochar in animal feeding. *PeerJ*, 7(7). <https://doi.org/10.7717/PEERJ.7373>
- Schmidt, P., Novinski, C. O., Junges, D., Almeida, R., & de Souza, C. M. (2015). Concentration of mycotoxins and chemical composition of corn silage: a farm survey using infrared thermography. *Journal of Dairy Science*, 98(9), 6609–6619. <https://doi.org/10.3168/JDS.2014-8617>
- Schwartz-Zimmermann, H. E., Hametner, C., Nagl, V., Fiby, I., Macheiner, L., Winkler, J., Dänicke, S., Clark, E., Pestka, J. J., & Berthiller, F. (2017). Glucuronidation of deoxynivalenol (DON) by different animal species: identification of iso-DON glucuronides and iso-deepoxy-DON glucuronides as novel DON metabolites in pigs, rats, mice, and cows. *Archives of Toxicology*, 91(12), 3857. <https://doi.org/10.1007/S00204-017-2012-Z>
- Schwartz-Zimmermann, H. E., Hartinger, D., Doupovec, B., Gruber-Dorninger, C., Aleschko, M., Schaumberger, S., Nagl, V., Hahn, I., Berthiller, F., Schatzmayr, D., & Moll, W. D.

- (2018). Application of biomarker methods to investigate FUMzyme mediated gastrointestinal hydrolysis of fumonisins in pigs. *Http://Doi.Org/10.3920/WMJ2017.2265*, 11(2), 201–214. <https://doi.org/10.3920/WMJ2017.2265>
- Seeling, K., Dänicke, S., Ueberschär, H., Lebzien, P., & Flachowsky, G. (2007). On the effects of Fusarium toxin-contaminated wheat and the feed intake level on the metabolism and carry over of zearalenone in dairy cows. *Http://Dx.Do.Org/10.1080/02652030500163708*, 22(9), 847–855. <https://doi.org/10.1080/02652030500163708>
- Seeling, K., Dänicke, S., Valenta, H., Van Egmond, H. P., Schothorst, R. C., Jekel, A. A., Lebzien, P., Schollenberger, M., Razzazi-Fazeli, E., & Flachowsky, G. (2007). Effects of Fusarium toxin-contaminated wheat and feed intake level on the biotransformation and carry-over of deoxynivalenol in dairy cows. *Http://Dx.Do.Org/10.1080/02652030600723245*, 23(10), 1008–1020. <https://doi.org/10.1080/02652030600723245>
- Sheik Abdul, N., & Marnewick, J. L. (2020). Fumonisin B1 -induced mitochondrial toxicity and hepatoprotective potential of rooibos: An update. *Journal of Applied Toxicology : JAT*, 40(12), 1602–1613. <https://doi.org/10.1002/JAT.4036>
- Signorini, M. L., Gaggiotti, M., Molineri, A., Chiericatti, C. A., Zapata de Basílico, M. L., Basílico, J. C., & Pisani, M. (2012). Exposure assessment of mycotoxins in cow's milk in Argentina. *Food and Chemical Toxicology*, 50(2), 250–257. <https://doi.org/10.1016/J.FCT.2011.09.036>
- Silva, I. M. de M., da Cruz, A. G., Ali, S., Freire, L. G. D., Fonseca, L. M., Rosim, R. E., Corassin, C. H., Oliveira, R. B. A. de, & Oliveira, C. A. F. de. (2023). Incidence and Levels of Aflatoxin M1 in Artisanal and Manufactured Cheese in Pernambuco State, Brazil. *Toxins*, 15(3), 182. <https://doi.org/10.3390/TOXINS15030182>
- Silva, L. de A., de Mello, M. R. B., Oliveira Pião, D. de, Silenciato, L. N., de Quadros, T. C. O., de Souza, A. H., & Barbero, R. P. (2021). Effects of experimental exposure to zearalenone on reproductive system morphometry, plasma oestrogen levels, and oocyte quality of beef heifer. *Reproduction in Domestic Animals = Zuchthygiene*, 56(5), 775–782. <https://doi.org/10.1111/RDA.13917>
- Singh, M. P., & Kang, S. C. (2017). Endoplasmic reticulum stress-mediated autophagy activation attenuates fumonisin B1 induced hepatotoxicity in vitro and in vivo. *Food and Chemical Toxicology*, 110, 371–382. <https://doi.org/10.1016/J.FCT.2017.10.054>
- Soleimany, F., Jinap, S., Faridah, A., & Khatib, A. (2012). A UPLC–MS/MS for simultaneous determination of aflatoxins, ochratoxin A, zearalenone, DON, fumonisins, T-2 toxin and HT-2 toxin, in cereals. *Food Control*, 25(2), 647–653. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCONT.2011.11.012>
- Spotti, M., Pompa, G., & Caloni, F. (2001). Fumonisin B1 metabolism by bovine liver microsomes. *Veterinary Research Communications*, 25(6), 511–516. <https://doi.org/10.1023/A:1010668521649>

- Su, Z., Zhao, G., & Dou, W. (2020). Determination of trace aflatoxin M1 (AFM1) residue in milk by an immunochromatographic assay based on (PEI/PSS) 4 red silica nanoparticles. *Mikrochimica Acta*, *187*(12). <https://doi.org/10.1007/S00604-020-04636-6>
- Sugiyama, K. I., Muroi, M., Kinoshita, M., Hamada, O., Minai, Y., Sugita-Konishi, Y., Kamata, Y., & Tanamoto, K. I. (2016). NF- κ B activation via MyD88-dependent Toll-like receptor signaling is inhibited by trichothecene mycotoxin deoxynivalenol. *The Journal of Toxicological Sciences*, *41*(2), 273–279. <https://doi.org/10.2131/JTS.41.273>
- Sulzberger, S. A., Melnichenko, S., & Cardoso, F. C. (2017). Effects of clay after an aflatoxin challenge on aflatoxin clearance, milk production, and metabolism of Holstein cows. *Journal of Dairy Science*, *100*(3), 1856–1869. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-11612>
- Suzuki, T., & Toyoda, M. (2019). Metal Ions in Activated Carbon Improve the Detection Efficiency of Aflatoxin-Producing Fungi. *Toxins*, *11*(3). <https://doi.org/10.3390/TOXINS11030140>
- Taheur, F. Ben, Fedhila, K., Chaieb, K., Kouidhi, B., Bakhrouf, A., & Abrunhosa, L. (2017). Adsorption of aflatoxin B1, zearalenone and ochratoxin A by microorganisms isolated from Kefir grains. *International Journal of Food Microbiology*, *251*, 1–7. <https://doi.org/10.1016/J.IJFOODMICRO.2017.03.021>
- Takagi, M., Uno, S., Kokushi, E., Shiga, S., Mukai, S., Kuriyagawa, T., Takagaki, K., Hasunuma, H., Matsumoto, D., Okamoto, K., Shahada, F., Chenga, T., Deguchi, E., & Fink-Gremmels, J. (2011). Measurement of urinary zearalenone concentrations for monitoring natural feed contamination in cattle herds: On-farm trials. *Journal of Animal Science*, *89*(1), 287–296. <https://doi.org/10.2527/JAS.2010-3306>
- Tkaczyk, A., & Jedziniak, P. (2021). Mycotoxin Biomarkers in Pigs-Current State of Knowledge and Analytics. *Toxins*, *13*(8). <https://doi.org/10.3390/TOXINS13080586>
- Tonini, C., Oliveira, M. S., Parmeggiani, E. B., Sturza, D. A. F., Mallmann, A. O., Rubin, M. I. B., & Mallmann, C. A. (2020). Serological biomarkers of zearalenone exposure in beef heifers receiving anti-mycotoxin additive. <https://doi.org/10.3920/WMJ2019.2548>, *14*(3), 357–365. <https://doi.org/10.3920/WMJ2019.2548>
- Vaičiulienė, G., Bakutis, B., Jovaišienė, J., Falkauskas, R., Gerulis, G., & Baliukonienė, V. (2020). Origanum vulgare and Thymus vulgaris Extract Usability to Improve Silage Hygienic Quality and Reduce Mycotoxin Concentrations. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, *30*(8), 1149–1155. <https://doi.org/10.4014/JMB.2003.03010>
- Vekiru, E., Fruhauf, S., Sahin, M., Ottner, F., Schatzmayr, G., & Krska, R. (2007). Investigation of various adsorbents for their ability to bind aflatoxin B1. *Mycotoxin Research*, *23*(1), 27–33. <https://doi.org/10.1007/BF02946021>
- Vidal, A., Sanchis, V., Ramos, A. J., & Marín, S. (2018). Stability of DON and DON-3-glucoside during baking as affected by the presence of food additives. *Food Additives & Contaminants. Part A, Chemistry, Analysis, Control, Exposure & Risk Assessment*, *35*(3), 529–537. <https://doi.org/10.1080/19440049.2017.1401741>
- Vila-Donat, P., Marín, S., Sanchis, V., & Ramos, A. J. (2018). A review of the mycotoxin adsorbing agents, with an emphasis on their multi-binding capacity, for animal feed

- decontamination. *Food and Chemical Toxicology : An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, 114, 246–259. <https://doi.org/10.1016/J.FCT.2018.02.044>
- Vila-Donat, P., Marín, S., Sanchis, V., & Ramos, A. J. (2019). New mycotoxin adsorbents based on tri-octahedral bentonites for animal feed. *Animal Feed Science and Technology*, 255, 114228. <https://doi.org/10.1016/J.ANIFEEDSCI.2019.114228>
- Voss, K. A. (2010). A new perspective on deoxynivalenol and growth suppression. *Toxicological Sciences : An Official Journal of the Society of Toxicology*, 113(2), 281–283. <https://doi.org/10.1093/TOXSCI/KFP287>
- Wang, J., Jin, Y., Wu, S., Yu, H., Zhao, Y., Fang, H., Shen, J., Zhou, C., Fu, Y., Li, R., Wang, R., Wang, J., Zheng, K., Fan, Q., Chen, B., & Zhang, J. (2019). Deoxynivalenol induces oxidative stress, inflammatory response and apoptosis in bovine mammary epithelial cells. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 103(6), 1663–1674. <https://doi.org/10.1111/JPN.13180>
- Wang, J., Liu, Z., Han, Z., Wei, Z., Zhang, Y., Wang, K., & Yang, Z. (2020). Fumonisin B 1 triggers the formation of bovine neutrophil extracellular traps. *Toxicology Letters*, 332, 140–145. <https://doi.org/10.1016/J.TOXLET.2020.07.006>
- Wang, J. P., Chi, F., & Kim, I. H. (2012). Effects of montmorillonite clay on growth performance, nutrient digestibility, vulva size, faecal microflora, and oxidative stress in weaning gilts challenged with zearalenone. *Animal Feed Science and Technology*, 178(3–4), 158–166. <https://doi.org/10.1016/J.ANIFEEDSCI.2012.09.004>
- Wang, J., & Xie, Y. (2020). Review on microbial degradation of zearalenone and aflatoxins. *Grain & Oil Science and Technology*, 3(3), 117–125. <https://doi.org/10.1016/J.GAOST.2020.05.002>
- Wang, N., Wu, W., Pan, J., & Long, M. (2019). Detoxification Strategies for Zearalenone Using Microorganisms: A Review. *Microorganisms*, 7(7). <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS7070208>
- Wang, P., Afriyie-gyawu, E., Tang, Y., Johnson, N. M., Xu, L., Tang, L., Huebner, H. J., Ankrah, N. A., Ofori-adjei, D., Ellis, W., Jolly, P. E., Williams, J. H., Wang, J. S., & Phillips, T. D. (2008). NovaSil clay intervention in Ghanaians at high risk for aflatoxicosis: II. Reduction in biomarkers of aflatoxin exposure in blood and urine. *Food Additives & Contaminants. Part A, Chemistry, Analysis, Control, Exposure & Risk Assessment*, 25(5), 622–634. <https://doi.org/10.1080/02652030701598694>
- Wangikar, P. B., Dwivedi, P., & Sinha, N. (2004). Effect in rats of simultaneous prenatal exposure to ochratoxin A and aflatoxin B1. I. Maternal toxicity and fetal malformations. *Birth Defects Research. Part B, Developmental and Reproductive Toxicology*, 71(6), 343–351. <https://doi.org/10.1002/BDRB.20021>
- Wangikar, P. B., Dwivedi, P., Sinha, N., Sharma, A. K., & Telang, A. G. (2005). Effects of aflatoxin B1 on embryo fetal development in rabbits. *Food and Chemical Toxicology : An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, 43(4), 607–615. <https://doi.org/10.1016/J.FCT.2005.01.004>

- Weatherly, M. E., Pate, R. T., Rottinghaus, G. E., Roberti Filho, F. O., & Cardoso, F. C. (2018). Physiological responses to a yeast and clay-based adsorbent during an aflatoxin challenge in Holstein cows. *Animal Feed Science and Technology*, *235*, 147–157. <https://doi.org/10.1016/J.ANIFEEDSCI.2017.11.019>
- Wei, J. T., Wu, K. T., Sun, H., Khalil, M. M., Dai, J. F., Liu, Y., Liu, Q., Zhang, N. Y., Qi, D. S., & Sun, L. H. (2019). A Novel Modified Hydrated Sodium Calcium Aluminosilicate (HSCAS) Adsorbent Can Effectively Reduce T-2 Toxin-Induced Toxicity in Growth Performance, Nutrient Digestibility, Serum Biochemistry, and Small Intestinal Morphology in Chicks. *Toxins*, *11*(4). <https://doi.org/10.3390/TOXINS11040199>
- Winkler, J., Kersten, S., Meyer, U., Engelhardt, U., & Dänicke, S. (2014). Residues of zearalenone (ZEN), deoxynivalenol (DON) and their metabolites in plasma of dairy cows fed Fusarium contaminated maize and their relationships to performance parameters. *Food and Chemical Toxicology : An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, *65*, 196–204. <https://doi.org/10.1016/J.FCT.2013.12.020>
- Winkler, J., Kersten, S., Meyer, U., Stinshoff, H., Locher, L., Rehage, J., Wrenzycki, C., Engelhardt, U. H., & Dänicke, S. (2015). Diagnostic opportunities for evaluation of the exposure of dairy cows to the mycotoxins deoxynivalenol (DON) and zearalenone (ZEN): reliability of blood plasma, bile and follicular fluid as indicators. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, *99*(5), 847–855. <https://doi.org/10.1111/JPN.12285>
- Winkler, J., Kersten, S., Valenta, H., Hüther, L., Meyer, U., Engelhardt, U., & Dänicke, S. (2014). Simultaneous determination of zearalenone, deoxynivalenol and their metabolites in bovine urine as biomarkers of exposure. *https://Doi.Org/10.3920/WMJ2014.1745*, *8*(1), 63–74. <https://doi.org/10.3920/WMJ2014.1745>
- Xing, F., Hua, H., Selvaraj, J. N., Yuan, Y., Zhao, Y., Zhou, L., & Liu, Y. (2014). Degradation of fumonisin B1 by cinnamon essential oil. *Food Control*, *38*(1), 37–40. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCONT.2013.09.045>
- Xu, H., Dong, Y., Guo, J., Jiang, X., Liu, J., Xu, S., & Wang, H. (2018). Monoclonal antibody production and the development of an indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay for screening T-2 toxin in milk. *Toxicon : Official Journal of the International Society on Toxinology*, *156*, 1–6. <https://doi.org/10.1016/J.TOXICON.2018.10.307>
- Xu, H., Wang, L., Sun, J., Wang, L., Guo, H., Ye, Y., & Sun, X. (2021). Microbial detoxification of mycotoxins in food and feed. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1–19. <https://doi.org/10.1080/10408398.2021.1879730>
- Xu, R., Shandilya, U. K., Yiannikouris, A., & Karrow, N. A. (2022). Ochratoxin A and Citrinin Differentially Modulate Bovine Mammary Epithelial Cell Permeability and Innate Immune Function. *Toxins*, *14*(9). <https://doi.org/10.3390/TOXINS14090640>
- Yamamoto-Ribeiro, M. M. G., Grespan, R., Kohiyama, C. Y., Ferreira, F. D., Mossini, S. A. G., Silva, E. L., De Abreu Filho, B. A., Mikcha, J. M. G., & Machinski, M. (2013).

- Effect of *Zingiber officinale* essential oil on *Fusarium verticillioides* and fumonisin production. *Food Chemistry*, 141(3), 3147–3152.
<https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2013.05.144>
- Yang, C., Song, G., & Lim, W. (2020). Effects of mycotoxin-contaminated feed on farm animals. *Journal of Hazardous Materials*, 389, 122087.
<https://doi.org/10.1016/J.JHAZMAT.2020.122087>
- Yang, X., Liu, P., Zhang, X., Zhang, J., Cui, Y., Song, M., & Li, Y. (2021). T-2 toxin causes dysfunction of Sertoli cells by inducing oxidative stress. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 225, 112702. <https://doi.org/10.1016/J.ECOENV.2021.112702>
- Yao, Y., & Long, M. (2020). The biological detoxification of deoxynivalenol: A review. *Food and Chemical Toxicology : An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, 145. <https://doi.org/10.1016/J.FCT.2020.111649>
- Yoshizawa, T., Mirocha, C. J., Behrens, J. C., & Swanson, S. P. (1981). Metabolic fate of T-2 toxin in a lactating cow. *Food and Cosmetics Toxicology*, 19(1), 31–39.
[https://doi.org/10.1016/0015-6264\(81\)90300-X](https://doi.org/10.1016/0015-6264(81)90300-X)
- Youssef, N. H., El Gammal, M. H., Altaie, H. A. A., Qadhi, A., Tufarelli, V., Losacco, C., Abd El-Hack, M. E., & Abdelsalam, N. R. (2023). Mycotoxins in milk: Occurrence and evaluation of certain detoxification attempts. *Food Science & Nutrition*, 11(6), 2751.
<https://doi.org/10.1002/FSN3.3254>
- Zentai, A., Józwiak, Á., Süth, M., & Farkas, Z. (2023). Carry-Over of Aflatoxin B1 from Feed to Cow Milk-A Review. *Toxins*, 15(3), 195. <https://doi.org/10.3390/TOXINS15030195>
- Zhang, C., Yu, X., Xu, H., Cui, G., & Chen, L. (2021). Action of *Bacillus natto* 16 on deoxynivalenol (DON) from wheat flour. *Journal of Applied Microbiology*, 131(5), 2317–2324. <https://doi.org/10.1111/JAM.15094>
- Zhang, G. L., Feng, Y. L., Song, J. L., & Zhou, X. S. (2018). Zearalenone: A Mycotoxin With Different Toxic Effect in Domestic and Laboratory Animals' Granulosa Cells. *Frontiers in Genetics*, 9. <https://doi.org/10.3389/FGENE.2018.00667>
- Zhang, K., Schaab, M. R., Southwood, G., Tor, E. R., Aston, L. S., Song, W., Eitzer, B., Majumdar, S., Lapainis, T., Mai, H., Tran, K., El-Demerdash, A., Vega, V., Cai, Y., Wong, J. W., Krynitsky, A. J., & Begley, T. H. (2017). A Collaborative Study: Determination of Mycotoxins in Corn, Peanut Butter, and Wheat Flour Using Stable Isotope Dilution Assay (SIDA) and Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(33), 7138–7152.
<https://doi.org/10.1021/ACS.JAFC.6B04872>
- Zhang, L., Ma, R., Zhu, M. X., Zhang, N. Y., Liu, X. L., Wang, Y. W., Qin, T., Zheng, L. Y., Liu, Q., Zhang, W. P., Karrow, N. A., & Sun, L. H. (2020). Effect of deoxynivalenol on the porcine acquired immune response and potential remediation by a novel modified HSCAS adsorbent. *Food and Chemical Toxicology : An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, 138.
<https://doi.org/10.1016/J.FCT.2020.111187>

- Zhang, Z., Xu, W., Wu, H., Zhang, W., & Mu, W. (2020). Identification of a Potent Enzyme for the Detoxification of Zearalenone. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68(1), 376–383. <https://doi.org/10.1021/ACS.JAFC.9B06223>
- Zhao, X., Sun, P., Liu, M., Liu, S., Huo, L., Ding, Z., Liu, M., Wang, S., Lv, C., Wu, H., Yang, L., & Liang, A. (2022). Deoxynivalenol exposure inhibits biosynthesis of milk fat and protein by impairing tight junction in bovine mammary epithelial cells. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 237. <https://doi.org/10.1016/J.ECOENV.2022.113504>
- Zhou, Y., Zhang, D., Sun, D., & Cui, S. (2020). Zearalenone affects reproductive functions of male offspring via transgenerational cytotoxicity on spermatogonia in mouse. *Comparative Biochemistry and Physiology. Toxicology & Pharmacology : CBP*, 234. <https://doi.org/10.1016/J.CBPC.2020.108766>
- Zong, C., Wu, Q., Dong, Z., Wu, A., Wu, J., Shao, T., & Liu, Q. (2022). Recycling deteriorated silage to remove hazardous mycotoxins and produce a value-added product. *Journal of Hazardous Materials*, 424(Pt C). <https://doi.org/10.1016/J.JHAZMAT.2021.127627>
- Zouagui, Z., Asrar, M., Lakhdissi, H., & Abdennebi, E. H. (2017). Prevention of mycotoxin effects in dairy cows by adding an anti-mycotoxin product in feed. *J. Mater. Environ*, 8, 3766–3770.