

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

GABRIELA LAGO BISCOTO

**MICOTOXINAS NA ALIMENTAÇÃO DE BOVINOS NO BRASIL:
UM ESTUDO DE 2017 A 2021**

Belo Horizonte

2022

GABRIELA LAGO BISCOTO

**MICOTOXINAS NA ALIMENTAÇÃO DE BOVINOS NO BRASIL:
UM ESTUDO DE 2017 A 2021**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor.

Área de concentração: Medicina Veterinária Preventiva

Orientadora: Prof^ª Dr^ª Kelly Moura Keller

Co-Orientadora: Dr^ª Érika Ramos de Alvarenga

Co-Orientadora: Prof^ª Dr^ª Rossimiriam Pereira de Freitas

Belo Horizonte

2022

B621m Biscoto, Gabriela Lago, 1993-
Micotoxinas na alimentação de bovinos no Brasil: um estudo de 2017 a 2021/ Gabriela Lago Biscoto.
– 2022.
147f: il.

Orientadora: Kelly Moura Keller
Coorientadoras: Érika Ramos de Alvarenga
Rossimiriam Pereira de Freitas

Tese (Doutorado) apresentada à Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais para obtenção do título de Doutora em Ciência animal.

Área de concentração: Medicina veterinária preventiva.

Bibliografia: f. 113 a 133.

1. Bovino- Doenças - Teses - 2. Milho – Silagem - Teses - 3. Micotoxinas - Teses-
I. Keller, Kelly Moura - II. Alvarenga, Érika Ramos de – III. Freitas, Rossimiriam Pereira de
IV. Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária - V. Título.

CDD – 636.089 69

Bibliotecária responsável Cristiane Patrícia Gomes – CRB2569
Biblioteca da Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE VETERINÁRIA
COLEGIADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

FOLHA DE APROVAÇÃO

GABRIELA LAGO BISCOTO

Tese submetida à banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL, como requisito para obtenção do grau de DOUTOR(A) em CIÊNCIA ANIMAL, área de concentração em Medicina Veterinária Preventiva.

Aprovado(a) em 05 de agosto de 2022, pela banca constituída pelos membros:

Dr.(a). Kelly Moura Keller - Presidente - Orientador(a)

Dr.(a). Lilia Renée Cavaglieri

Dr.(a). Águida Aparecida de Oliveira

Dr.(a). Marília Martins Melo

Dr.(a). Débora Cristina Sampaio de Assis



Documento assinado eletronicamente por **Kelly Moura Keller, Professora do Magistério Superior**, em 08/08/2022, às 10:05, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Águida Aparecida de Oliveira, Usuário Externo**, em 08/08/2022, às 11:22, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Marília Martins Melo, Professora do Magistério Superior**, em 09/08/2022, às 16:46, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Debora Cristina Sampaio de Assis, Professora do Magistério Superior**, em 12/08/2022, às 13:09, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Lilia Renée Cavaglieri, Usuário Externo**, em 20/08/2022, às 14:48, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1601229** e o código CRC **B64FA3AD**.

RESUMO

As micotoxinas são metabólitos secundários tóxicos produzidos por certos fungos, que quando ingeridas podem causar diversos efeitos deletérios à saúde de seres humanos e animais. O consumo de alimentos contaminados com micotoxinas é um grande problema em todo o mundo, tornando o monitoramento destes metabólitos essencial para a segurança dos alimentos. Neste trabalho foram realizadas a detecção e a quantificação, pelo método de ELISA, de seis micotoxinas (aflatoxinas - AFLA, deoxinivalenol - DON, fumonisinas - FUMO, ocratoxina A - OTA, T-2 toxina - T-2 e zearalenona - ZEA) em 1.749 amostras de dieta total, silagens, milho / subprodutos, ração e outras amostras destinadas à bovinos, coletadas no Brasil entre 2017 e 2021. Além disso, foram criados modelos estatísticos explicativos para a contaminação por AFLA, FUMO, OTA, T-2 e ZEA nas amostras de dieta total analisadas. No total, 97% das amostras estavam contaminadas com pelo menos uma micotoxina, sendo DON, ZEA e AFLA as micotoxinas mais frequentes, com 68%, 62% e 59% de contaminação, respectivamente. A maior parte destas amostras estavam contaminadas com quantidades de micotoxinas abaixo dos limites máximos tolerados recomendados pela União Europeia para bovinos e o cálculo da ingestão diária estimada também mostrou baixo risco para os animais. Porém, as coocorrências foram muito observadas (87% das amostras continham duas ou mais micotoxinas). Este fato requer atenção, pois, a presença de mais de uma micotoxina ao mesmo tempo nos alimentos pode levar a interações, predominantemente sinérgicas, e causar prejuízos à saúde animal. Em conclusão, a contaminação de alimentos para bovinos com micotoxinas no Brasil é muito comum, sendo o monitoramento destas micotoxinas de grande importância evitar perdas econômicas e possíveis prejuízos à saúde dos animais.

Palavras-chave: Dieta total. Ração. Silagens. Coocorrências. ELISA. Aflatoxinas. Deoxinivalenol. Zearalenona.

ABSTRACT

Mycotoxins are toxic secondary metabolites produced by a variety of fungi, which when ingested cause several deleterious effects to the health of humans and animals. The consumption of food and feed contaminated with mycotoxins is one of the main food safety problems worldwide, making the monitoring of these metabolites essential for food safety. In this work, detection and quantification of six major mycotoxins (aflatoxins - AFLA, deoxynivalenol - DON, fumonisins - FUMO, ochratoxin A - OTA, T-2 toxin – T-2 and zearalenone - ZON) in 1,749 samples of TMR, silages, maize / maize products, feed and other samples for cattle, collected in Brazil between 2017 and 2021 was carried using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). In addition, explanatory statistical models were created for contamination by AFLA, FUMO, OTA, T-2 and ZON in the TMR (Total Mixed Ration) samples analyzed. In total, 97% of the samples were contaminated with at least one mycotoxin, with DON, ZON and AFLA being the most frequent ones, with 68%, 62% and 59% of contamination, respectively. Most of these samples were contaminated with amounts of mycotoxins below the lowest European Union guidance values for cattle, and the estimated daily intake also showed a low risk for the animals. However, co-occurrences were widely observed - 87% of the samples contained two or more mycotoxins - and the presence of more than one mycotoxin at the same time in feed can lead to interactions, mainly synergistic, and harm to animal's health. In conclusion, the contamination of feed and feed ingredients for cattle with mycotoxins in Brazil is very common, and the monitoring of these mycotoxins is of significant importance to avoid economic losses and possible harm to the animal's health.

Keywords: TMR. Feed. Maize. Silages. Co-occurrences. ELISA. Aflatoxins. Deoxynivalenol. Zearalenone.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Principais efeitos das micotoxinas em bovinos	24
Tabela 2 -	Resumo dos limites máximos tolerados (LMT) estabelecidos pela legislação da União Europeia para aflatoxina B ₁ , deoxinivalenol, fumonisinas B ₁ + B ₂ , ocratoxina A, T-2 toxina e zearalenona na alimentação animal. Fonte: EU, 2003; EU, 2006; EU, 2013	58
Tabela 3 -	Limites de detecção (LoD) e quantificação (LoQ) em µg/kg para aflatoxinas, deoxinivalenol, fumonisinas, ocratoxina A, T-2 toxina e zearalenona	78
Tabela 4 -	Níveis de contaminação em diferentes tipos de amostra	87
Tabela 5 -	Porcentagem de amostras contaminadas com cada combinação possível de micotoxinas duas a duas	100
Tabela 6 -	Valores dos coeficientes β , erro padrão, <i>odds ratio</i> , intervalo de confiança (95%), Valor-p e interpretação dos resultados em porcentagem para o modelo de aflatoxinas	106
Tabela 7 -	Valores dos coeficientes β , erro padrão, <i>odds ratio</i> , intervalo de confiança (95%), Valor-p e interpretação dos resultados em porcentagem para o modelo de fumonisinas	107
Tabela 8 -	Valores dos coeficientes β , erro padrão, <i>odds ratio</i> , intervalo de confiança (95%), Valor-p e interpretação dos resultados em porcentagem para o modelo de ocratoxina A	108
Tabela 9 -	Valores dos coeficientes β , erro padrão, <i>odds ratio</i> , intervalo de confiança (95%), Valor-p e interpretação dos resultados em porcentagem para o modelo de T-2 toxina	109
Tabela 10 -	Valores dos coeficientes β , erro padrão, <i>odds ratio</i> , intervalo de confiança (95%), Valor-p e interpretação dos resultados em porcentagem para o modelo de zearalenona	110

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Estruturas químicas dos principais tipos de aflatoxinas (B ₁ , B ₂ , G ₁ e G ₂)	17
Figura 2 -	Estruturas químicas dos dois principais tipos de fumonisinas (FB ₁ e FB ₂)	18
Figura 3 -	Estrutura química da ocratoxina A	19
Figura 4 -	Estrutura química da zearalenona	20
Figura 5 -	Estrutura química da toxina T-2	22
Figura 6 -	Estrutura química do deoxinivalenol	22
Figura 7 -	Conversão de aflatoxina B ₁ (AFB ₁) em aflatoxina M ₁ (AFM ₁)	29
Figura 8 -	Biotransformação de DON em DON-1	30
Figura 9 -	Estrutura química da OT α	31
Figura 10 -	Estrutura química da toxina HT-2	32
Figura 11 -	Biotransformação de ZEA em α -ZOL e β -ZOL	33
Figura 12 -	Diagrama de fluxo das etapas comuns envolvidas na análise de micotoxinas em alimentos	61
Figura 13 -	Exemplo de uma coluna MycoSep [®]	63
Figura 14 -	Componentes de um sistema de HPLC simples	66
Figura 15 -	Princípio do ELISA competitivo para análise de micotoxinas. (a) Amostra misturada com conjugado; (b) Conteúdo misto adicionado ao poço revestido com anticorpo; (c) A micotoxina se liga ao anticorpo na 1 ^a incubação; (d) Os materiais não ligados são lavados na etapa de lavagem; (e) Substrato é adicionado para desenvolver cor; (f) Solução de parada é adicionada para parar a reação	69
Figura 16 -	Principais componentes de um teste rápido. O extrato da amostra é adicionado ao <i>sample pad</i> e flui, por capilaridade, através do <i>conjugate pad</i> e da membrana em direção ao <i>absorbent pad</i> . A presença de toxina na amostra inibe a ligação do anticorpo marcado à linha "teste" (conjugado de micotoxina-proteína), mas não inibe a ligação do anticorpo marcado à linha "controle" (anticorpos secundários)	71
Figura 17 -	Número de amostras por estados brasileiros	76
Figura 18 -	Número total de amostras analisadas (barras pretas) e número de amostras contaminadas (barras cinzas) com AFLA, DON, FUMO, OTA, T-2 e ZEA em todas as amostras (Geral)	89

Figura 19 - Número total de amostras analisadas (barras pretas) e número de amostras contaminadas (barras cinzas) com AFLA, DON, FUMO, OTA, T-2 e ZEA em amostras de dieta total	89
Figura 20 - Número total de amostras analisadas (barras pretas) e número de amostras contaminadas (barras cinzas) com AFLA, DON, FUMO, OTA, T-2 e ZEA em amostras de silagens	90
Figura 21 - Número total de amostras analisadas (barras pretas) e número de amostras contaminadas (barras cinzas) com AFLA, DON, FUMO, OTA, T-2 e ZEA em amostras de milho / subprodutos	90
Figura 22 - Número total de amostras analisadas (barras pretas) e número de amostras contaminadas (barras cinzas) com AFLA, DON, FUMO, OTA, T-2 e ZEA em amostras de ração	91
Figura 23 - Número total de amostras analisadas (barras pretas) e número de amostras contaminadas (barras cinzas) com AFLA, DON, FUMO, OTA, T-2 e ZEA em outras amostras	91
Figura 24 - Porcentagem de amostras contaminadas e não contaminadas e mediana das amostras positivas para aflatoxinas entre 2017 e 2021	94
Figura 25 - Porcentagem de amostras contaminadas e não contaminadas e mediana das amostras positivas para deoxinivalenol entre 2017 e 2021	94
Figura 26 - Porcentagem de amostras contaminadas e não contaminadas e mediana das amostras positivas para fumonisinas entre 2017 e 2021	95
Figura 27 - Porcentagem de amostras contaminadas e não contaminadas e mediana das amostras positivas para ocratoxina A entre 2017 e 2021	95
Figura 28 - Porcentagem de amostras contaminadas e não contaminadas e mediana das amostras positivas para T-2 toxina entre 2017 e 2021	96
Figura 29 - Porcentagem de amostras contaminadas e não contaminadas e mediana das amostras positivas para zearalenona entre 2017 e 2021	96
Figura 30 - Frequência relativa de amostras contaminadas com zero, uma, duas, três, quatro, cinco ou seis micotoxinas ao mesmo tempo, para todas as amostras (geral), dieta total, milho / subprodutos e outras amostras	99
Figura 31 - Correlação entre micotoxinas em (a) Todas as amostras (geral), (b) Dieta total, (c) Milho / subprodutos, (d) Silagens, (e) Ração e (f) Outras amostras	101

Figura 32 - Ingestão diária estimada (EDI) de AFLA, DON, FUMO, OTA, T-2 e ZEA para gado de corte (barras pretas) e gado de leite (barras cinzas) 103

LISTA DE SÍMBOLOS E SIGLAS

°C	Graus Celsius
µg	Microgramas
µM	Micromolar
AFB ₁	Aflatoxina B ₁
AFB ₂	Aflatoxina B ₂
AFG ₁	Aflatoxina G ₁
AFG ₂	Aflatoxina G ₂
AFL	Aflatoxicol
AFLA	Aflatoxinas
AFM ₁	Aflatoxina M ₁
ALT	Alanina aminotransferase
AST	Aspartato aminotransferase
BEN	Nefropatia endêmica dos Balcãs
CCD	Cromatografia em camada delgada
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
Da	Daltons
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DOM-1	De-epóxi-DON
DON	Deoxinivalenol
EDI	Ingestão diária estimada
EFSA	<i>European Food Safety Authority</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
FAL	Fosfatase alcalina
FB ₁	Fumonisina B ₁
FB ₂	Fumonisina B ₂
FDA	<i>U.S. Food and Drug Administration</i>
FLD	Fluorescência
FUMO	Fumonisinias
GC-MS	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas
GGT	Gama glutamiltransferase
HPLC	<i>High-performance liquid chromatography</i>
IAC	Colunas de imunoafinidade
IARC	Agência Internacional de Pesquisa em Câncer

IBD	Doença infecciosa da Bursa de Fabricius
IC ₅₀	Concentração inibitória para 50% das células
IgA	Imunoglobulinas A
IgG	Imunoglobulinas G
IgM	Imunoglobulinas M
kg	Quilogramas
l	Litros
LAMICO	Laboratório de Micologia e Micotoxinas
LC-MS	Cromatografia líquida associada à espectrometria de massas
LMT	Limite máximo tolerado
LOAEL	<i>Lowest observed adverse effect level</i>
LoD	Limite de detecção
LoQ	Limite de quantificação
mg	Miligramas
ng	Nanogramas
nM	Nanomolar
NOAEL	<i>No observed adverse effect level</i>
OD	Densidade óptica
OTA	Ocratoxina A
OT α	Ocratoxina α
PIB	Produto interno bruto
ppb	Partes por bilhão
ROS	Espécies reativas de oxigênio
Sa	Esfinganina
So	Esfingosina
SPE	Extração em fase sólida
SRBC	Hemácias de ovelha
T-2	T-2 toxina
UHT	<i>Ultra High Temperature</i>
UV	Ultravioleta
ZEA	Zearalenona
α -ZOL	A-zearalenol
β -ZOL	B-zearalenol

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 OBJETIVOS	14
2.1 Objetivo Geral	14
2.2 Objetivos Específicos	14
3 REVISÃO DE LITERATURA	15
3.1 Panorama da Bovinocultura no Brasil	15
3.2 Micotoxinas	16
3.2.1 <i>Aflatoxinas</i>	17
3.2.2 <i>Fumonisinias</i>	18
3.2.3 <i>Ocratoxina A</i>	19
3.2.4 <i>Zearalenona</i>	20
3.2.5 <i>Tricotecenos</i>	21
3.3 Degradação das Micotoxinas pela Microbiota Ruminal	23
3.4 Efeitos das Micotoxinas em Bovinos	24
3.4.1 <i>Aflatoxinas</i>	25
3.4.2 <i>Deoxinivalenol</i>	25
3.4.3 <i>Fumonisinias</i>	26
3.4.4 <i>Ocratoxina A</i>	26
3.4.5 <i>T-2 Toxina</i>	27
3.4.6 <i>Zearalenona</i>	27
3.5 Metabolização e <i>Carry-over</i> de Micotoxinas para Leite e Produtos Lácteos	28
3.5.1 <i>Aflatoxinas</i>	28
3.5.2 <i>Deoxinivalenol</i>	30
3.5.3 <i>Fumonisinias</i>	30
3.5.4 <i>Ocratoxina A</i>	31
3.5.5 <i>T-2 toxina</i>	32
3.5.6 <i>Zearalenona</i>	33
3.6 Coocorrências de Micotoxinas	33
3.6.1 <i>Toxicidade In Vivo</i>	34
3.6.2 <i>Toxicidade In Vitro</i>	50
3.7 Impacto Econômico	56

3.8 Legislações	57
3.9 Análise de Micotoxinas em Amostras de Alimentos	61
3.10 Métodos de Detecção e / ou Quantificação de Micotoxinas	64
3.10.1 Cromatografia em camada delgada	64
3.10.2 Cromatografia líquida de alta eficiência	65
3.10.3 Espectrometria de massas	67
3.10.4 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)	68
3.10.5 Teste rápido	70
3.11 Abordagem Estatística para Análise de Dados	71
3.11.1 Regressão logística	72
4 MATERIAL E MÉTODOS	76
4.1 Amostras e Amostragem	76
4.2 Análise de Micotoxinas	77
4.3 Banco de Dados	79
4.4 Análises Descritivas	80
4.5 Análise de Coocorrências	80
4.6 Ingestão Diária Estimada	81
4.7 Modelagem Estatística	81
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	83
5.1 Ocorrência de Micotoxinas por Tipo de Amostra	83
5.2 Ocorrência de Micotoxinas por Ano	92
5.3 Coocorrências de Micotoxinas	97
5.4 Ingestão Diária Estimada e Avaliação de Risco	102
5.5 Modelagem Estatística	104
6 CONCLUSÕES	112
7 REFERÊNCIAS	113
APÊNDICE A - Interações entre AFLA e FUMO, AFLA e OTA, AFLA e T-2, AFLA e DON, FUMO e T-2, FUMO e DON, DON e T-2, DON e ZEA, OTA e T-2, OTA e DON e OTA e FUMO resultantes de experimentos <i>in vivo</i>	134
APÊNDICE B - Interações entre AFLA e FUMO, AFLA e OTA, AFLA e T-2, AFLA e DON, AFLA e ZEA, DON e T-2, DON e ZEA, OTA e FUMO e ZEA e T-2 resultantes de experimentos <i>in vitro</i>	141

1 INTRODUÇÃO

As micotoxinas são metabólitos secundários tóxicos produzidos por uma grande variedade de fungos que quando ingeridas podem causar diversos efeitos deletérios à saúde de seres humanos e animais. Estima-se que aproximadamente 25% a 50% de todas as *commodities* produzidas no mundo, principalmente os alimentos básicos, estão de alguma forma contaminadas com micotoxinas, sendo grande o impacto que estas apresentam sobre a segurança alimentar em todo o mundo.

Além disso, outro fator agravante da contaminação por micotoxinas em alimentos são as coocorrências. Considerando que muitos fungos micotoxigênicos são capazes de produzir mais de uma micotoxina e que várias espécies de fungos são encontradas ao mesmo tempo nas matérias-primas utilizadas na alimentação animal, o estudo da ocorrência de uma única micotoxina fornece informações incompletas sobre o risco associado ao respectivo alimento. Quando mais de uma micotoxina está presente no alimento podem ocorrer três tipos de interações: sinérgicas, aditivas ou antagônicas. As coocorrências são comuns na alimentação animal, e podem causar grandes perdas, pois efeitos sinérgicos são muito observados.

Com relação à bovinocultura, o país ocupa um papel de destaque mundial em relação à produção tanto de carne quanto de leite, sendo ambas atividades de grande importância por representarem significativo impacto na economia. A presença de micotoxinas na alimentação de bovinos pode trazer danos à saúde dos animais e consequentes perdas econômicas devido à diminuição da produção de leite e de carne e consequentemente da exportação e consumo.

Tendo em vista os grandes prejuízos que podem ser causados pela presença de micotoxinas na alimentação animal, o monitoramento destes metabólitos é essencial para que medidas de prevenção e controle possam ser instauradas evitando danos econômicos e à saúde animal.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Realizar análises de micotoxinas em amostras de alimentos destinados à bovinos coletadas no Brasil entre 2017 e 2021.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a ocorrência de contaminação por aflatoxinas, deoxinivalenol, fumonisinas, ocratoxina A, T-2 toxina e zearalenona em amostras de alimentos utilizadas na alimentação de bovinos;
- Realizar análises por ano e por tipo de amostra;
- Determinar as coocorrências mais frequentes;
- Determinar a ingestão diária estimada para cada micotoxina pelos bovinos;
- Criar modelos estatísticos explicativos utilizando regressão logística para a contaminação por cada micotoxina em amostras de dieta total.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Panorama da Bovinocultura no Brasil

No Brasil, a bovinocultura se faz presente desde os primórdios da colonização e ocupa um papel de destaque mundial em relação à produção tanto de carne quanto de leite, sendo ambas atividades de grande importância no país por representarem significativo impacto na economia (BATISTELLA et al., 2011).

O agronegócio tem grande importância no produto interno bruto (PIB) brasileiro e é reconhecido como um vetor crucial do crescimento econômico no país. Em 2019, a soma de bens e serviços gerados no agronegócio chegou a 21,4% do PIB brasileiro (R\$ 1,55 trilhão), e a pecuária foi responsável por 32% deste valor (R\$ 494,8 bilhões), o que demonstra a relevância do setor (CNA, 2020).

Com relação à produção de carne bovina, nos últimos 40 anos, o comércio e mercado desta carne no Brasil tiveram um grande crescimento. Quarenta anos atrás o rebanho bovino era menos da metade do rebanho atual e a produção não atendia completamente nem a demanda da população brasileira, desta forma, pode-se dizer que nas últimas décadas, a pecuária bovina sofreu uma modernização revolucionária, sustentada por avanços tecnológicos nos sistemas de produção e na organização da cadeia, levando também a um reflexo positivo na qualidade da carne bovina. Atualmente, o Brasil tem posição de destaque na produção e comércio de carne bovina no mundo. No ano de 2020 o país se posicionou como o maior rebanho bovino, o maior exportador e o 3º maior consumidor de carne bovina do mundo (GOMES et al., 2017; ABIEC, 2020).

A cadeia produtiva de leite também é de grande importância para o país, sendo considerada uma das principais atividades econômicas, com forte geração de renda e empregos. Em 2020, o valor bruto da produção primária de leite foi de aproximadamente R\$ 50 bilhões, sendo o sexto maior valor dentre os produtos agropecuários nacionais. Além disso, a produção de leite vem aumentando, sendo que nas últimas duas décadas o aumento foi de quase 80%, tornando o país o terceiro maior produtor de leite do mundo. Dentre as regiões do Brasil, sul e sudeste são as maiores produtoras de leite, e em 2018 foram responsáveis por produzir 68% do leite brasileiro. Já com relação aos estados brasileiros, Minas Gerais é, historicamente, o maior produtor de leite do país, e entre os anos de 1997 e 2018 a produção do estado cresceu 60%, demonstrando a importância da atividade não só para o estado, mas como para todo o país (ROCHA et al., 2020; BRASIL, 2021).

Portanto, a bovinocultura de corte e de leite são de extrema importância para o país, e devem estar em constante evolução, migrando para atividades cada vez mais profissionais, alinhadas com preceitos de bem-estar animal e segurança sanitária. Além disso, atenção também deve ser dada à nutrição dos animais, uma vez que valores elevados são gastos com a nutrição, e a contaminação dos alimentos por toxinas ou microrganismos pode ser muito prejudicial tanto para a saúde dos animais quanto financeiramente para os produtores, diminuindo a produção de leite e carne e, conseqüentemente, a exportação e o consumo (GOMES et al., 2017; ABIEC, 2020). Dentre as toxinas de importância na bovinocultura estão as micotoxinas, que serão abordadas a seguir.

3.2 Micotoxinas

As micotoxinas são metabólitos secundários tóxicos produzidos por uma grande variedade de fungos, especialmente por espécies dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*. São reconhecidos os efeitos deletérios desses compostos na indução de processos carcinogênicos, hepatotóxicos, nefrotóxicos, estrogênicos e mutagênicos. Até o momento, mais de 400 micotoxinas já foram identificadas mundialmente, porém apenas cerca de 30 têm sido detectadas em alimentos com maior frequência (HUSSEIN; BRASEL, 2001; CAST, 2003; FREIRE et al., 2007; ZHAO et al., 2015).

As micotoxinas são moléculas heterogêneas, com estruturas que variam de apenas um anel heterocíclico com peso molecular de até 50 Da, a grupos contendo vários anéis e peso molecular superior a 500 Da. As principais micotoxinas encontradas na alimentação animal são: aflatoxinas (AFLA), fumonisinas (FUMO), ocratoxina A (OTA), tricotecenos e zearalenona (ZEA) (HUSSEIN; BRASEL, 2001; ZHAO et al., 2015).

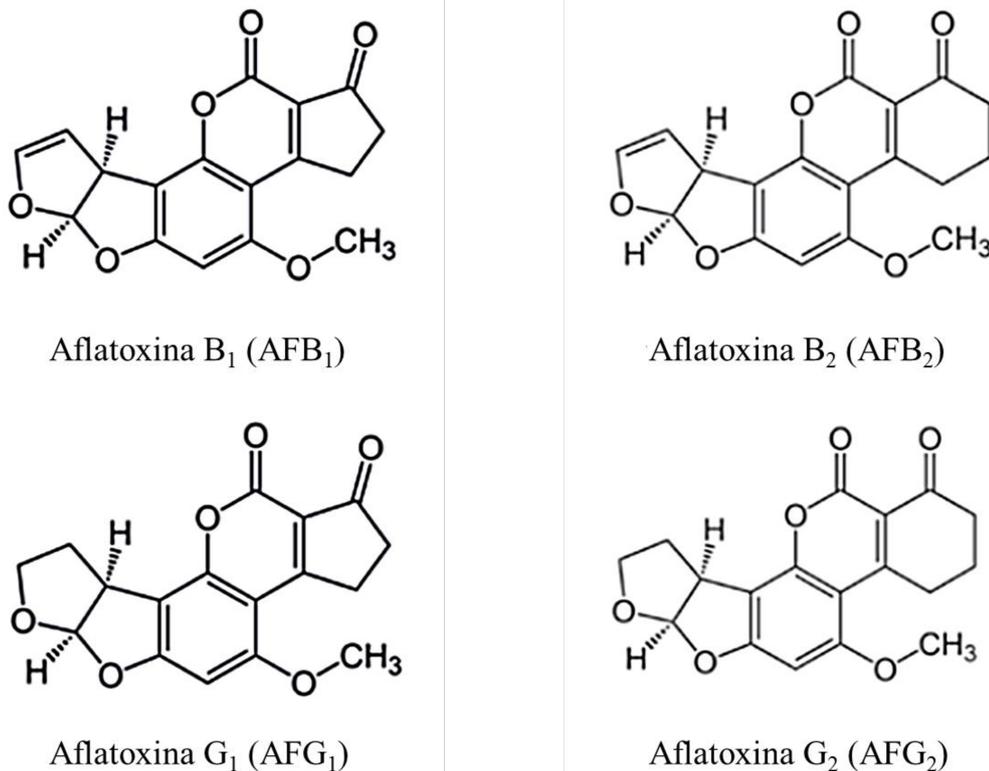
Devido a ampla gama agravos de saúde em humanos e animais, o consumo de alimentos contaminados com micotoxinas tornou-se um dos principais problemas de segurança dos alimentos em todo o mundo. A contaminação de culturas por micotoxinas é geralmente regulada por dois fatores principais: a suscetibilidade da planta hospedeira e as condições geográficas e climáticas do cultivo, além disso, a produção das micotoxinas pode se dar devido a contaminação do cultivo por fungos toxigênicos ainda no campo (pré-colheita) ou na fase pós-colheita, durante o armazenamento, processamento e / ou transporte dos alimentos (MORETTI; LOGRIECO; SUSCA, 2017).

As principais micotoxinas encontradas na alimentação animal serão descritas a seguir:

3.2.1 Aflatoxinas

As aflatoxinas (AFLA) são produzidas principalmente pelos fungos *Aspergillus flavus* e *A. parasiticus*. Existem quatro tipos principais de aflatoxinas, sendo eles denominados B₁, B₂, G₁ e G₂ (Figura 1), a classificação B ou G se refere à cor da fluorescência das moléculas sob luz ultravioleta (B = *Blue*, G = *Green*). Seus principais efeitos incluem hepatotoxicidade, carcinogênese, teratogênese, mutagênese, imunossupressão e hemorragia renal e do trato intestinal; além disso, intoxicações agudas podem levar à morte. Estas toxinas acometem principalmente grãos como, amendoim, milho e soja, principalmente durante o período de estocagem. De acordo com a Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC) as aflatoxinas estão classificadas no Grupo 1, isto é, existem evidências suficientes para concluir que estas toxinas são cancerígenas para humanos (PITT, 2000; CAST, 2003; MURPHY et al., 2006; IARC, 2012; OSTRY et al., 2016).

Figura 1 - Estruturas químicas dos principais tipos de aflatoxinas (B₁, B₂, G₁ e G₂).



Fonte: PITT et al. (2012)

A aflatoxina B₁ (AFB₁) é a mais tóxica dentre os tipos de aflatoxinas, e sua toxicidade está relacionada à sua biotransformação, que ocorre no fígado, através do sistema enzimático

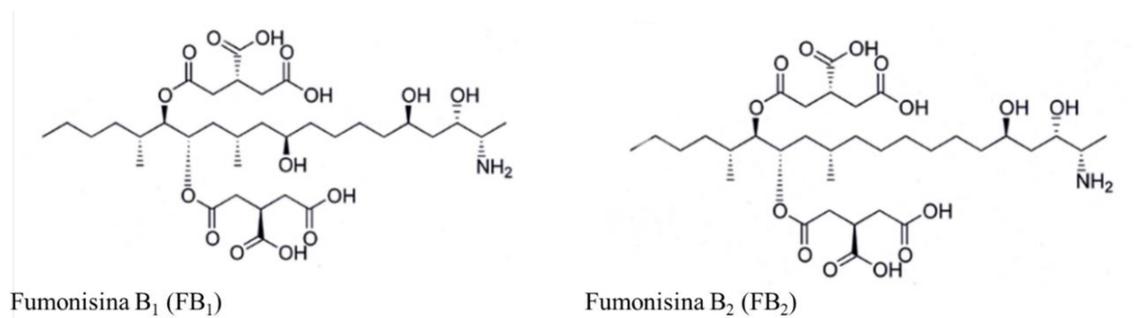
do citocromo P450. Os metabólitos gerados pela biotransformação podem se ligar a macromoléculas celulares, incluindo material genético (DNA - ácido desoxirribonucleico) ou proteínas para formar adutos. A formação de adutos de DNA leva à mutações genéticas e induzir câncer, já adutos com proteínas podem levar à toxicidade. Dentre os metabólitos formados, AFM₁ é o de maior importância por ser uma micotoxina de potencial carcinogênico, sendo classificada pela IARC no Grupo 2B (possível carcinógeno para seres humanos). Além disso, AFM₁ é excretada no leite, representando um risco para humanos e animais (IARC, 1993; CAST, 2003; MURPHY et al., 2006).

O primeiro relato de aflatoxicose ocorreu em 1960, quando mais de 100.000 perus morreram no Reino Unido após ingerirem uma ração contendo amendoim de origem brasileira. Até então a causa da morte era desconhecida, e o episódio ficou conhecido como “Doença X dos Perus”. Após diversos estudos, a morte dos animais foi atribuída à presença de aflatoxinas no amendoim, e marcou o início da micotoxicologia moderna (COLE, 1986; ROBENS; RICHARD, 1992).

3.2.2 Fumonisinias

As fumonisinias (FUMO) são produzidas principalmente pelos fungos *Fusarium verticillioides* e *F. proliferatum*, que são fitopatógenos e contaminam principalmente o milho, durante o período de pré-colheita. Os principais efeitos das fumonisinias são a leucoencefalomalácia equina, edema pulmonar em suínos, hepatotoxicidade e nefrotoxicidade, além de serem carcinogênicas. Existe um grande número de fumonisinias, que variam conforme o tipo A, B ou C e derivados 1, 2, 3 ou 4. As principais fumonisinias são as do tipo B derivados 1 e 2 (FB₁ e FB₂) (Figura 2), sendo a fumonisinina B₁ (FB₁) a mais tóxica, prevalente e estudada (KELLERMAN et al., 1990; CAST, 2003; MURPHY et al., 2006; VOSS et al., 2007).

Figura 2 - Estruturas químicas dos dois principais tipos de fumonisinias (FB₁ e FB₂).

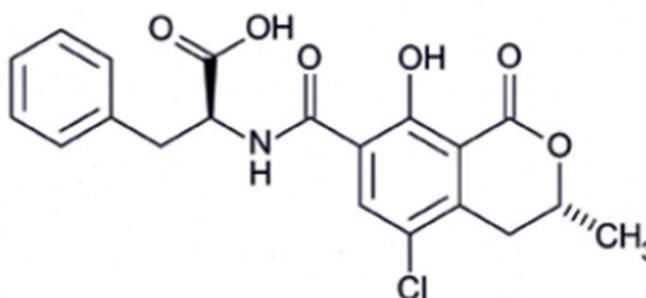


As fumonisinas são conhecidas por interromper a biossíntese de esfingolípídios, sendo este o seu principal mecanismo de toxicidade. A interrupção da biossíntese ocorre, pois, a estrutura química das fumonisinas é semelhante à estrutura dos precursores de esfingolípídios complexos (esfinganina - Sa e esfingosina - So). Devido às semelhanças estruturais, as fumonisinas (especialmente FB₁) competem com os precursores de esfingolípídios complexos por sítios de ligação na enzima ceramida sintetase, levando ao acúmulo de esfinganina e esfingosina. Essa inibição já foi bastante estudada e um aumento da razão Sa / So é considerada um bom indicador de exposição às FUMO (MERRILL et al., 2001; QUI; LIU, 2001; RILEY; VOSS, 2006; VOSS et al., 2007).

3.2.3 Ocratoxina A

A ocratoxina A (OTA) (Figura 3) é produzida principalmente por *Penicillium verrucosum*, *Aspergillus ochraceus*, *A. carbonarius* e *A. niger*. É encontrada principalmente em aveia, trigo, café e milho e tem efeitos tóxicos à saúde humana e de diversas espécies animais, sendo os suínos bastante sensíveis à pequenas quantidades de OTA. Dentre os efeitos tóxicos da ocratoxina A destacam-se nefrotoxicidade, hepatotoxicidade, teratogenicidade, enterites e carcinogênese, sendo esta micotoxina classificada no Grupo 2B pela IARC, ou seja, é possivelmente carcinogênica para seres humanos (IARC, 1993; CAST, 2003; MURPHY et al., 2006; OSTRY et al., 2016).

Figura 3 - Estrutura química da ocratoxina A.



Fonte: PITT et al. (2012)

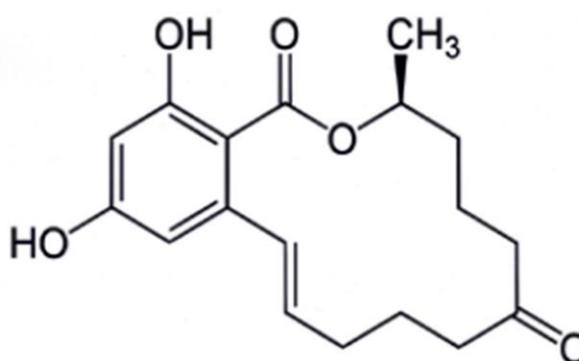
A nefropatia é o principal efeito tóxico de OTA, e esta micotoxina é potencialmente nefrotóxica para diversas espécies de mamíferos, incluindo humanos. Nos humanos, a OTA é suspeita de ser a causa de uma doença fatal conhecida como Nefropatia Endêmica dos Balcãs (BEN), uma doença crônica intersticial que afeta a população do sudeste da Europa (Croácia, Bósnia, Bulgária e Romênia) (RIBELIN; FUKUSHIMA; STILL, 1978; PFOHL-LESZKOWICZ et al., 2002; O'BRIEN; DIETRICH, 2005; PFOHL-LESZKOWICZ, 2009; EL KHOURY; ATOUI, 2010; PAVLOVI, 2013).

O modo de ação da OTA é bastante complexo e ainda não é completamente compreendido, porém sugere-se que inibição da síntese de proteínas, indução de estresse oxidativo, formação de adutos de DNA, indução de apoptose e necrose, e parada do ciclo celular estão possivelmente envolvidos em sua ação tóxica. Além disso, a ocratoxina A tem grande afinidade pela albumina (que é a proteína plasmática mais abundante no sistema circulatório), e ao se ligar à esta proteína, aumenta sua meia-vida nos tecidos e sistema circulatório (STUDER-ROHR; SCHLATTER; DIETRICH, 2000; KÓSZEGI; POÓR, 2016).

3.2.4 Zearalenona

A zearalenona (ZEA) (Figura 4) é produzida principalmente por *Fusarium graminearum* e *F. culmorum* e é geralmente encontrada em aveia, milho e outros cereais. É uma micotoxina não esteroidal com efeitos estrogênicos e pode influenciar a capacidade reprodutiva animal por meio de interferência na via de sinalização do estrogênio, levando a hiperestrogenismo, abortos e atrofia dos testículos (CAST, 2003; MINERVINI; DELL'AQUILA, 2008; PANG et al., 2016).

Figura 4 - Estrutura química da zearalenona.



Fonte: PITT et al. (2012)

Após ser ingerida, a zearalenona é rapidamente absorvida e metabolizada em α -zearalenol (α -ZOL) e β -zearalenol (β -ZOL), e cerca de 30 minutos após a ingestão, ZEA e seus derivados podem ser detectados no sangue. A ação de ZEA, α -ZOL e β -ZOL é sistêmica e ocorre através da competição com o hormônio 17- β -estradiol, por sítios de ligação aos receptores de estrógeno. Após a ligação de ZEA e seus derivados aos sítios de ligação, se inicia a estimulação estrogênica de órgãos alvo, como útero, tecido mamário e ovários, sendo os suínos os mais sensíveis à esta micotoxina (KUIPER-GOODMAN et al., 1987; PITT, 2000; MINERVINI; DELL'AQUILA, 2008; PITT et al., 2012).

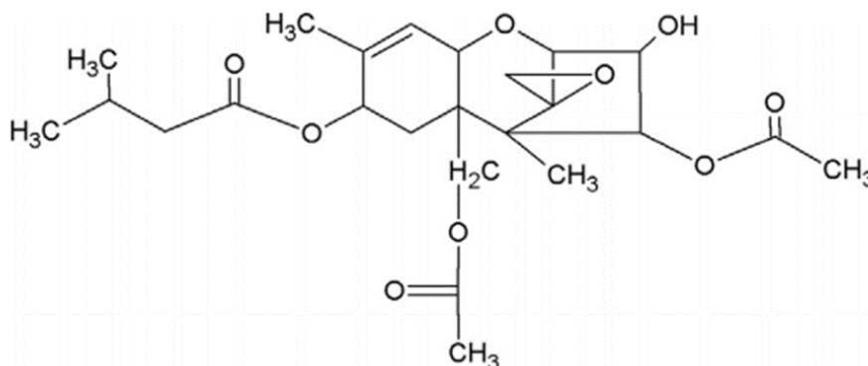
3.2.5 Tricotecenos

Os tricotecenos são um grupo de mais de 180 micotoxinas produzidas por vários gêneros de fungos, porém espécies dos gêneros *Fusarium* e *Strachybotrys* são as mais encontradas. São reconhecidos pela forte capacidade de inibição da síntese proteica nos eucariotos, interferindo nos estágios inicial, de alongamento e de término. Os principais substratos onde estas micotoxinas são encontradas são: cevada, centeio, trigo e milho (STAFFORD; McLAUGHLIN, 1973; BENNETT; KLICH, 2003; ROCHA; ANSARI; DOOHAN, 2005; FREIRE et al., 2007).

De forma geral, os tricotecenos são compostos muito estáveis, tanto durante o armazenamento e moagem, como no processamento e cozimento de alimentos, e não são degradados por altas temperaturas. Além disso, os tricotecenos são divididos em quatro grupos (A-D), porém, em medicina veterinária, dois grupos são os mais relevantes: os tricotecenos do tipo A, sendo a toxina T-2 a mais encontrada, e os tricotecenos do tipo B, sendo o deoxinivalenol o mais encontrado (ROCHA; ANSARI; DOOHAN, 2005; EFSA, 2011; MARIN et al., 2013).

A toxina T-2 (T-2) (Figura 5) é o membro mais tóxico da família dos tricotecenos, causando uma grande variedade de efeitos nos animais, como vômitos, diarreia, letargia, perda de peso, hemorragia e alterações patológicas no fígado e no estômago. T-2 também está associada a um aumento da taxa de infecção, danos ao DNA e indução de apoptose. Além disso, esta toxina é um potente inibidor da síntese proteica e da função mitocondrial tanto *in vivo* quanto *in vitro*, e apresenta efeitos imunossupressores e citotóxicos (VICONTI et al., 1991; ERIKSEN; PETTERSSON, 2004; ROCHA; ANSARI; DOOHAN, 2005; LI et al., 2011; MARIN et al., 2013; ADHIKARI et al., 2017).

Figura 5 - Estrutura química da toxina T-2.

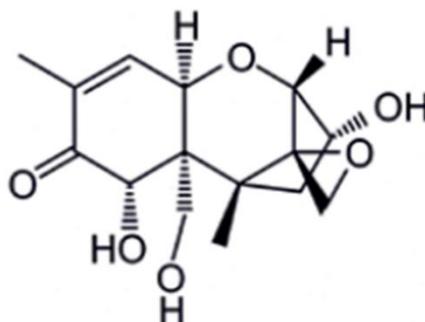


Fonte: MARIN et al. (2013)

A toxicidade de T-2 pode resultar de qualquer via de exposição, ou seja, dérmica, oral ou respiratória e varia dependendo da quantidade, tempo de exposição, idade e estado de saúde do animal, além da presença de outras micotoxinas no alimento ingerido (PLACINTA et al., 1999; HUSSEIN; BRASEL, 2001; AFSAH-HEJRI et al., 2013; MARIN et al., 2013).

O deoxinivalenol (DON) (Figura 6), comumente chamado de vomitoxina, é uma fusariotoxina produzida principalmente pelos fungos *Fusarium graminearum* e *F. culmorum*. Apesar de não ser tão tóxico quanto outros tricotecenos, DON é um dos contaminantes de cereais mais comuns em todo o mundo. A ingestão de DON está associada a alterações intestinais, do sistema imune e do sistema nervoso, casos de exposição aguda se caracterizam por vômito, diarreia, desnutrição e dor abdominal, já nos casos crônicos é possível observar recusa de alimento, imunossupressão, sialorreia e desuniformidade de lotes (ROTTER, 1996; CAST, 2003; FREIRE et al., 2007; MARIN et al., 2013).

Figura 6 - Estrutura química do deoxinivalenol.



Fonte: PITT et al. (2012)

Muitas espécies animais são suscetíveis ao deoxinivalenol, sendo os animais monogástricos, especialmente os suínos, os mais sensíveis à esta toxina, enquanto frangos e perus, seguidos por ruminantes, parecem ter maior tolerância. A sensibilidade diferencial observada nas diferentes espécies ocorre devido a diferenças no metabolismo, absorção, distribuição e eliminação de DON entre as espécies animais (ROTTER, 1996; PESTKA, 2007).

3.3 Degradação das Micotoxinas pela Microbiota Ruminal

Os ruminantes são, de forma geral, considerados mais resistentes aos efeitos adversos das micotoxinas do que os animais monogástricos. Isso se baseia na suposição de que a microbiota ruminal tem a capacidade de biotransformar as micotoxinas em outros compostos, considerados menos tóxicos. No entanto, isto não se aplica à todas as micotoxinas e o impacto das micotoxinas nos ruminantes também depende de outros fatores, como idade, raça, sexo, quantidade e tipo de micotoxina ingerida, além do estado imunológico do animal (FINK-GREMMELS, 2008; UPADHAYA; PARK; HA, 2010).

Além disso, a capacidade desintoxicante da microbiota ruminal é saturável e varia com as mudanças na dieta ou como consequência de doenças metabólicas, como a acidose ruminal. Portanto, um efeito secundário da microbiota ruminal incompetente é um aumento na fração de micotoxinas que escapam da degradação microbiana, o que faz com que essas toxinas cheguem intactas ao duodeno, onde são absorvidas da mesma forma que nos animais monogástricos e levam à efeitos adversos (FINK-GREMMELS, 2008; UPADHAYA; PARK; HA, 2010).

Desde os anos 80 já se sabe que a microbiota do rúmen fornece a primeira linha de defesa dos animais ruminantes, convertendo micotoxinas como aflatoxinas, ocratoxinas e tricotecenos, em seus metabólitos menos tóxicos aflatoxicol, ocratoxina-alfa e de-epóxi-tricotecenos, respectivamente. Porém, com a passar dos anos a estabilidade ruminal de muitas outras micotoxinas começou a ser investigada e foi descoberto que nem todas as micotoxinas estão sujeitas à biotransformação por microrganismos ruminais. Algumas micotoxinas, como por exemplo as fumonisinas, passam pelo rúmen sem serem afetadas, e a zearalenona é convertida no alfa-zearalenol que é ainda mais potente (KIESSLING et al., 1984; CALONI et al., 2000; DÄNICKE et al., 2005; FINK-GREMMELS, 2008).

Outro fator importante a ser considerado é a presença de mais de uma micotoxina no alimento ingerido, o que é bastante comum devido à presença de mais de uma micotoxina na mesma *commoditie* e / ou a presença de várias *commodities* diferentes em uma mesma dieta (como será descrito detalhadamente mais à frente). Estas coocorrências de micotoxinas na

alimentação animal são bastante comuns e podem causar riscos à saúde animal, mesmo nos ruminantes. As coocorrências podem explicar as diferenças encontradas em resultados de experimentos controlados e na realidade observada à campo. Em experimentos controlados, os animais são desafiados com apenas uma micotoxina ou com um grupo definido de micotoxinas e geralmente mostram uma alta tolerância aos alimentos contaminados. Em contraste, em condições de campo, os animais são expostos a misturas complexas de toxinas, e nestes casos a capacidade de desintoxicação da microbiota ruminal se esgota e as micotoxinas inalteradas são absorvidas pelo duodeno podendo causar efeitos adversos nestes animais (FINK-GREMMELS, 2008).

3.4 Efeitos das Micotoxinas em Bovinos

De forma geral, os ruminantes são menos afetados por algumas micotoxinas do que os animais monogástricos, uma vez que a atividade microbiana no rúmen pode modificar a estrutura química das micotoxinas em compostos menos tóxicos. Porém a ingestão de alimentos contaminados com micotoxinas ainda afeta tanto a saúde quanto a produtividade de bovinos, e os sinais clínicos observados variam dependendo da micotoxina presente no alimento, como observado na Tabela 1 (KEMBOI et al., 2020).

Tabela 1 - Principais efeitos das micotoxinas em bovinos.

Efeitos	AFLA	DON	FUMO	OTA	T-2	ZEA
Redução do consumo de alimentos	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Redução da produção de leite	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Efeitos reprodutivos	✓				✓	✓
Imunossupressão	✓				✓	
Hepatotoxicidade	✓		✓			
Nefrotoxicidade	✓		✓			
Gastroenterite				✓	✓	

Fonte: Adaptado de KEMBOI et al. (2020)

3.4.1 Aflatoxinas

Em vacas leiteiras, a exposição à dieta contaminada com AFLA, mesmo em baixos níveis, leva à redução da ingestão de alimentos, alteração da atividade hepática, imunossupressão, nefrotoxicidade e diminuição da produção de leite. Estudos *in vitro*, demonstraram que, apesar da proteção do rúmen, a presença de níveis crescentes de AFB₁ no fluido ruminal reduz a produção de gases e as concentrações de amônia e ácidos graxos voláteis, ou seja, AFB₁ exerce atividade antibacteriana no rúmen (MASOERO et al., 2007; JIANG; YANG; LUND, 2012; MOJTAHEDI et al., 2013; GALLO et al., 2015; TOLOSA et al., 2021).

Estudos *in vivo* também já foram desenvolvidos. Applebaum et al. (1982) relataram uma diminuição significativa na produção de leite em bovinos alimentados com 13 mg de AFB₁ por dia durante sete dias. Em outro estudo, vacas alimentadas com 100 µg AFB₁/kg de alimento apresentaram redução da produção de leite e da conversão alimentar (APPLEBAUM et al., 1982; SULZBERGER; MELNICHENKO; CARDOSO, 2017).

Além disso, também existem estudos de caso que relatam aflatoxicose aguda em bovinos. McKenzie et al. (1981) relataram a morte de 12 a 90 bezerros na Austrália. Os animais foram alimentados com feno de amendoim contaminado com 2.230 µg/kg de AFLA e apresentaram icterícia, fotossensibilização, diarreia, anorexia e depressão, além da elevação dos níveis séricos de enzimas de origem hepática e bilirrubinas. Após a morte também foi encontrada hemorragia, lesão de hepatócitos e proliferação de ductos biliares. Outro caso foi relatado no Paquistão, onde os bovinos foram alimentados com forragem rica em milho contaminada com 33.500 µg/kg de AFLA e apresentaram anorexia, depressão, fotossensibilização e diarreia, com óbito de 15 animais. Lesões *post mortem* incluíram hemorragias em vísceras, exsudação de sangue por orifícios naturais e prolapsos (MCKENZIE et al., 1981; UMAR et al., 2015).

3.4.2 Deoxinivalenol

O impacto da ingestão de DON em bovinos é controverso, existem autores que observaram problemas gastrointestinais, diarreia, imunossupressão e uma diminuição geral do desempenho dos animais após a ingestão. Outros relatam que os bovinos são mais resistentes aos efeitos de DON devido à capacidade dos microrganismos ruminiais de metabolizar esta micotoxina transformando-a em seu metabólito não tóxico DOM-1 antes de chegar ao intestino

delgado (KING et al., 1984; ROTTER, 1996; HUSSEIN; BRASEL, 2001; PESTKA, 2007; FINK-GREMMELS, 2008; MARESCA, 2013; GALLO et al., 2015; KEMBOI et al., 2020).

Prelusky et al. (1984) observaram que a administração de DON em uma dose oral única de 1,9 mg/kg de peso corporal resultou em menos de 1% de absorção sistêmica da toxina original, mostrando a grande capacidade de detoxificação do rúmen. Em outro experimento, vacas receberam dieta contaminada com 6,4 mg/kg de DON por 6 semanas, e não foram observados sinais de doença. De qualquer maneira, o monitoramento desta micotoxina deve ser feito devido a possíveis efeitos adversos ou interações sinérgicas com outras toxinas presentes no alimento (PRELUSKY et al., 1984; TRENHOLM et al., 1985; FINK-GREMMELS, 2008; GALLO et al., 2015; KEMBOI et al., 2020).

3.4.3 Fumonisin

Nos bovinos, em contraste com muitas outras micotoxinas, as fumonisin são pobremente degradadas pelo rúmen, e os principais sinais clínicos da exposição à estas toxinas são a diminuição do apetite acompanhada por danos nos rins e no fígado (CALONI et al., 2000; FINK-GREMMELS, 2008; GALLO et al., 2015).

Mathur et al. (2001) realizaram um experimento em bezerros que receberam 1 mg/kg de fumonisin B₁ por via intravenosa por 7 dias. Os animais tratados apresentaram letargia, redução do apetite, evidências bioquímicas de lesão grave ao fígado, além de função hepática prejudicada. Os animais também apresentaram concentrações aumentadas de esfinganina e esfingosina no fígado, rins, pulmões, coração e músculo esquelético (MATHUR et al., 2001).

3.4.4 Ocratoxina A

Em bovinos, a OTA é amplamente degradada em ocratoxina α (OT α) (que é menos tóxica) pela microbiota ruminal, devido principalmente à atividade de protozoários. A relevância da degradação da OTA no rúmen foi demonstrada em dois experimentos *in vivo* em bezerros. No primeiro experimento, OTA foi administrada na dose de 1,0 ou 4,0 mg/kg de peso corporal a bezerros alimentados com leite (pré-ruminantes); os animais morreram nas primeiras 24 horas após a dosagem, sem diferenças entre as doses (SREEMANNARAYANA et al., 1988). Já no segundo experimento, quando OTA foi administrada na dose de 2,0 mg/kg de peso corporal a bezerros com rúmen funcional, os animais não mostraram nenhum efeito negativo detectável (MOBASHAR et al., 2012). Portanto, a atividade microbiana no trato

gastrointestinal de bovinos pode ser considerada eficiente em reduzir drasticamente a absorção de OTA e, conseqüentemente, proteger os animais contra seus efeitos tóxicos. Porém, o acúmulo de OTA na corrente sanguínea, como consequência da ingestão crônica de alimentos contaminados, deve ser evitado, já que pode representar um risco potencial para estes animais (HULT; TEILING; GATENBECK, 1976; BATTACONE; NUDDA; PULINA, 2010; GALLO et al., 2015).

3.4.5 T-2 Toxina

Os efeitos de T-2 geralmente observados em bovinos são rejeição dos alimentos, baixa produção de leite, gastroenterites, sangramento intestinal, imunossupressão e, em alguns casos, morte. Além disso, já foram relatados casos de infertilidade e aborto no último trimestre da gestação (YOSHIZAWA et al., 1981; MANN et al., 1984; FINK-GREMMELS, 2008; AFSAH-HEJRI et al., 2013; OMAR, 2013; GALLO et al., 2015; ADHIKARI et al., 2017).

Um estudo foi realizado por Weaver et al. (1980) em bezerros que receberam 0,6 mg de T-2/kg de peso corporal por sete dias consecutivos. Após este período observou-se que os animais apresentavam depressão grave, apatia e anorexia (WEAVER et al., 1980).

3.4.6 Zearalenona

Os bovinos podem apresentar diversos problemas reprodutivos decorrentes da ingestão de alimentos contaminados com ZEA, sendo os principais efeitos desta toxina nestes animais a diminuição da sobrevivência dos embriões, edema, hipertrofia da genitália em fêmeas pré-púberes, diminuição da produção de hormônio luteinizante e progesterona, alterações na morfologia dos tecidos uterinos, feminização de machos jovens devido à diminuição da produção de testosterona e infertilidade. Em um experimento realizado em vacas que receberam 250 mg de ZEA por dia ao longo de três ciclos estrais foi observado infertilidade, redução da produção de leite e hiperestrogenismo. Além disso, a taxa de concepção foi reduzida de 87% (grupo controle) para 62% (animais que receberam ZEA) (WEAVER et al., 1986; D'MELLO et al., 1999; ZINEDINE et al., 2007; MINERVINI; DELL'AQUILA, 2008; GALLO et al., 2015).

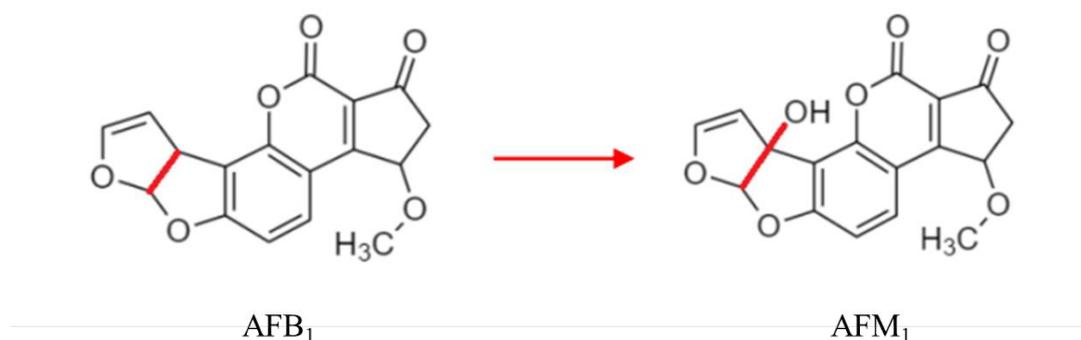
3.5 Metabolização e *Carry-over* de Micotoxinas para Leite e Produtos Lácteos

O termo *carry-over* indica a passagem de compostos indesejados de alimentos contaminados para tecidos animais comestíveis ou subprodutos. Quando os animais são alimentados com rações ou matérias-primas contaminadas com micotoxinas, estas são submetidas a transformações enzimáticas e microbianas que levam à formação de metabólitos no intestino. Os metabólitos resultantes podem então ser absorvidos pela corrente sanguínea do animal e posteriormente ser excretados pela urina e/ou fezes. Porém, as toxinas e seus metabólitos que não são excretadas do organismo permanecem como resíduos em órgãos, músculos e no leite, podendo ser, então, ingeridas pelos seres humanos (VÖLKEL; SCHRÖER-MERKER; CZERNY, 2011; ADEGBEYE et al., 2020; LI et al., 2020; TOLOSA et al., 2021).

3.5.1 Aflatoxinas

Com relação às aflatoxinas, a aflatoxina B₁ (AFB₁) é absorvida no intestino delgado, transferida para o sangue e transportada pelos glóbulos vermelhos e proteínas plasmáticas para o fígado. A molécula AFM₁ é o principal metabólito hidroxilado da AFB₁ (Figura 7) e é formada pelo sistema enzimático do citocromo P450 no fígado. AFM₁ pode ser encontrada em leite ou produtos lácteos obtidos de animais alimentados com ração contaminada com AFB₁. Em ruminantes, parte da AFB₁ dos alimentos contaminados é degradada pela microbiota do fluido ruminal e é transformada em aflatoxicol (AFL) - um metabólito 18 vezes menos tóxico que a AFB₁. A AFB₁ não metabolizada é absorvida no trato digestivo e é hidroxilada no fígado, formando AFM₁ que é excretada no leite. Os ruminantes são considerados menos suscetíveis aos efeitos das micotoxinas do que as espécies monogástricas, uma vez que as micotoxinas podem ser degradadas até certo ponto pela microbiota ruminal. No entanto, a capacidade de desintoxicação pelos microrganismos ruminais é saturável e, conseqüentemente, a AFM₁ se acumula no leite. A capacidade de transformar AFB₁ em AFM₁ no leite foi avaliada por Britzi et al. (2013), e os autores demonstraram que a extensão da transferência para o leite varia de 2,5% a 5,8% e está diretamente correlacionada à produção de leite em vacas (BRITZI et al., 2013; ALSHANNAQ; YU, 2017; KETNEY; SANTINI; OANCEA, 2017; PELES et al., 2019; TOLOSA et al., 2021).

Figura 7 - Conversão de aflatoxina B₁ (AFB₁) em aflatoxina M₁ (AFM₁).



Fonte: VAZ et al. (2020)

Dentre as diferentes micotoxinas encontradas em produtos derivados de animais, a AFM₁ em leite e produtos lácteos é a mais amplamente relatada e estudada no mundo. Esta toxina é legalmente monitorada em produtos alimentícios de origem animal em alguns países. No Brasil, o limite máximo tolerado (LMT) de AFM₁ é de 0,5 µg/kg em leite fluído, 5,0 µg/kg para leite em pó e 2,5 µg/kg em queijos. Destaca-se também a legislação da União Europeia que possui um LMT de 0,05 µg/kg de AFM₁ no leite e 0,025 µg/kg em fórmulas infantis (EU, 2006a; BRASIL, 2011; TOLOSA et al., 2021).

Diversos estudos avaliam a presença de AFM₁ em leite e produtos lácteos em diferentes países ao longo dos anos, e em alguns deles são relatados níveis de AFM₁ superiores ao LMT estabelecido pela União Europeia (0,05 µg/kg) (TOLOSA et al., 2021).

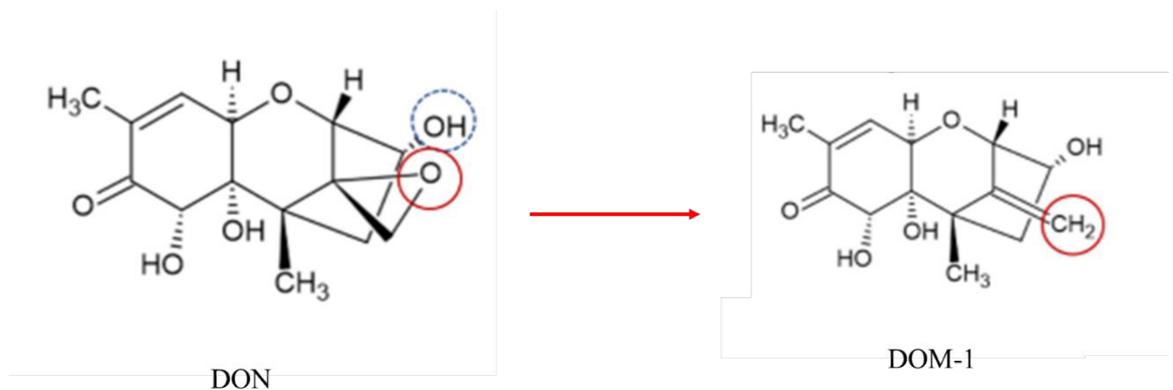
No Brasil já foram realizados estudos em amostras de leite e derivados. Iha et al. (2011) avaliaram a presença de AFM₁ em amostras de queijo, iogurte e bebidas lácteas. Foi observado que 67% das amostras de queijo continham AFM₁ em concentrações variando de 0,010 µg/kg a 0,304 µg/kg, já as amostras de iogurte e bebidas lácteas apresentaram 72% de contaminação variando de 0,010 µg/kg a 0,529 µg/kg. Outro estudo foi realizado por De Oliveira et al. (2013) em amostras de leite UHT (*Ultra High Temperature*) compradas em Minas Gerais, e 30,7% das amostras continham AFM₁ em concentrações variando de 1,0 µg/kg a 4,1 µg/kg, quantidades acima do LMT para AFM₁ em leite prevista na regulamentação brasileira. Amostras de queijo minas frescal e minas padrão foram analisadas por Oliveira et al. (2011), neste estudo, 27,1% das amostras continham AFM₁, e as concentrações médias foram de 0,142 ± 0,118 µg/kg e 0,118 ± 0,054 µg/kg nas amostras de queijo minas frescal e minas padrão, respectivamente (IHA et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2011; DE OLIVEIRA et al., 2013).

3.5.2 Deoxinivalenol

Em relação ao metabolismo de deoxinivalenol (DON), estudos *in vitro* usando microsomas hepáticos demonstraram que uma grande porcentagem desta toxina (> 75%) é metabolizada, sendo DON-3-glicuronídeo o metabólito predominante em peixes, ratos, suínos e bovinos. Além disso, DON é convertido em de-epóxi-DON (DOM-1) no rúmen, sendo este também um importante metabólito de DON em bovinos (DÄNICKE; BREZINA, 2013; VIDAL et al., 2018).

Devido à rápida biotransformação de DON em DOM-1 (menos tóxico) no rúmen (Figura 8), DOM-1 tem sido mais frequentemente relatado em amostras de leite do que DON, como observado por Winkler et al. (2015), que relatou níveis de DOM-1 de até 5,6 ng/ml e de DON de até 2,5 ng/ml em amostras de leite. Da mesma forma, Sørensen e Elbaek (2005) registraram até 0,3 µg/l de DOM-1 em cinco de 20 amostras de leite coletadas na Dinamarca (SØRENSEN; ELBAEK, 2005; WINKLER et al., 2015; TOLOSA et al., 2021).

Figura 8 - Biotransformação de DON em DON-1.



Fonte: Adaptado de PINTO et al. (2022)

3.5.3 Fumonisin

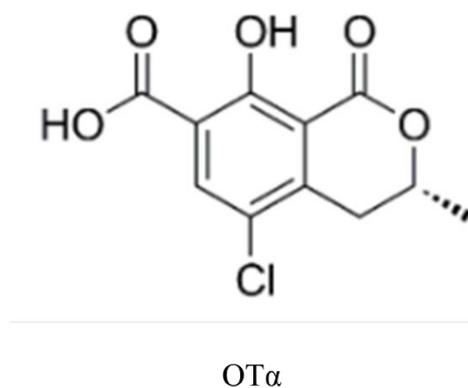
Poucas informações podem ser encontradas sobre a metabolização das fumonisinas (FUMO), mas estas toxinas parecem ser mais estáveis do que outras micotoxinas de *Fusarium*, e apresentam rápida eliminação após a ingestão. A fumonisina B₁ (FB₁) tem uma meia-vida curta e é excretada principalmente na bile (CAVRET; LECOEUR, 2006; TOLOSA et al., 2021).

Os estudos existentes demonstram baixa transferência de FUMO da ração para o leite em bovinos, mesmo em altas concentrações de FUMO na dieta. Gazzotti et al. (2009) relataram FB₁ em oito de 10 amostras de leite testadas com média de contaminação de 0,26 µg/kg. Outro estudo foi realizado por Zhao et al. (2015), os autores encontraram 10% das amostras de leite contaminadas com FB₁ e FB₂, atingindo níveis de até 3 µg/l e 2 µg/l, respectivamente (GAZZOTTI et al., 2009; ZHAO et al., 2015; TOLOSA et al., 2021).

3.5.4 Ocratoxina A

Com relação à ocratoxina A (OTA), esta toxina é amplamente convertida pelos microrganismos do rúmen em OT α que é menos tóxica (Figura 9), por esta razão existem poucos relatos da presença de resíduos de OTA em leite ou produtos lácteos. No entanto, já foi verificada a presença de OTA em amostras de leite e queijos. Pattono, Gallo e Civera (2011) relataram que três de 63 amostras de leite de fazendas orgânicas estavam contaminadas com OTA em quantidades que variaram de 0,07 a 0,11 µg/l. Os mesmos autores também constataram que aproximadamente 20% dos queijos feitos com leite cru analisados estavam contaminados com OTA, com diferenças nos níveis dependendo da parte analisada do queijo. As concentrações variaram de 18,4 µg/kg a 146,0 µg/kg na parte interna e de 1,0 µg/kg a 262,2 µg/kg na casca do queijo (PATTONO; GALLO; CIVERA, 2011; PATTONO et al., 2013; ZHANG et al., 2019; TOLOSA et al., 2021).

Figura 9 - Estrutura química da OT α .



Fonte: BEHRENS et al. (2021)

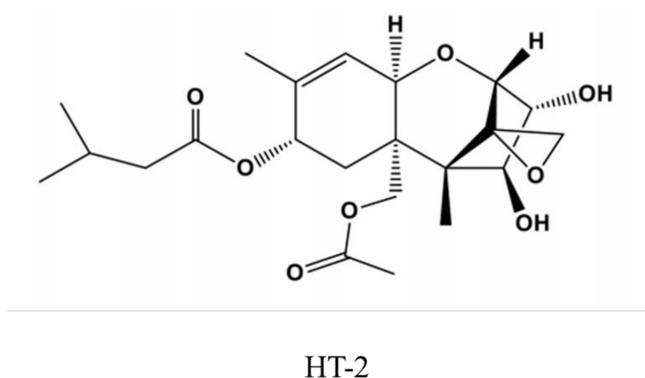
Além disso, estudos realizados na Itália, Suécia, Noruega, França e China encontraram OTA em amostras de leite em concentrações que variaram de 5 ng/l a 84,1 ng/l. Em outro estudo, Turkoglu e Keyvan (2019) detectaram OTA em leite cru, pasteurizado e UHT da Turquia com valores médios de 137 ± 57 ng/l, 135 ± 8 ng/l e 85 ± 4 ng/l, respectivamente (FLORES-FLORES et al., 2015; TURKOGLU; KEYVAN, 2019).

Embora apenas baixas concentrações de OTA foram detectadas em amostras de leite e derivados, essas pequenas quantidades podem ser importantes para consumidores de grandes quantidades desses produtos, principalmente crianças, que podem ter também outras fontes de ocratoxina na dieta. No entanto, a União Europeia ainda não estabeleceu regulamentos para a contaminação de leite e produtos lácteos por OTA (SKAUG, 1999; TOLOSA et al., 2021).

3.5.5 T-2 toxina

Os principais metabólitos da T-2 toxina (T-2) em mamíferos são HT-2 (Figura 10), neosolaniol (NEO), T-2 triol, T-2 tetraol, 3'-OH-T-2, e 3'-OH-HT-2, sendo a hidrólise o principal destino metabólico de T-2 no fígado. Um estudo determinou que 0,2% da dose de T-2 administrada em vacas foi transmitida para o leite na forma de T-2, HT-2, NEO, dentre outros metabólitos (YOSHIZAWA et al., 1981; TOLOSA et al., 2021).

Figura 10 - Estrutura química da toxina HT-2.

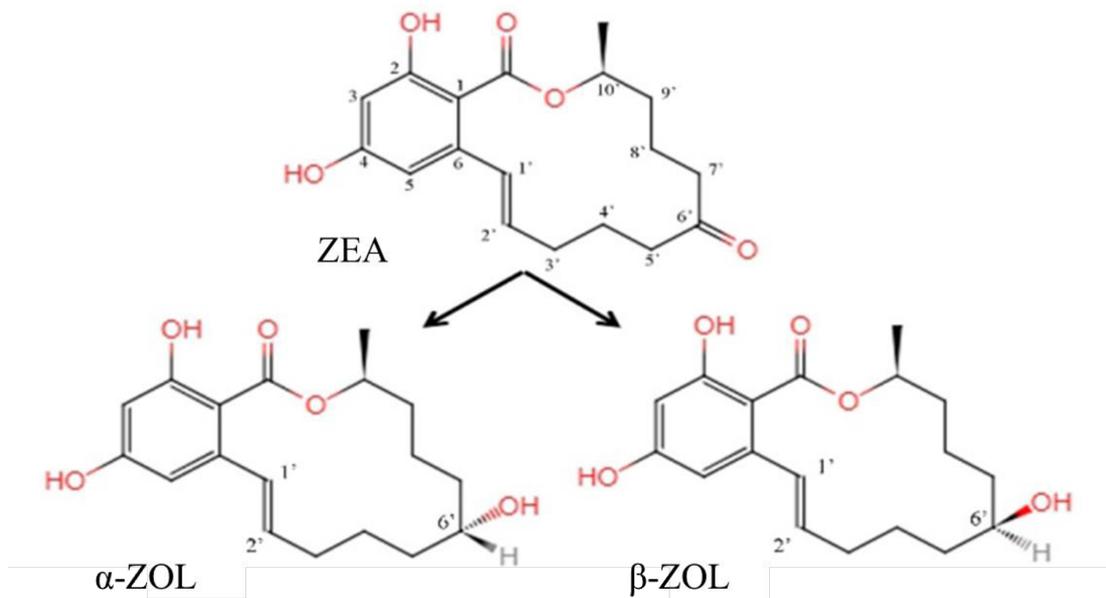


Fonte: ADHIKARI et al. (2017)

3.5.6 Zearalenona

A zearalenona (ZEA) é metabolizada em dois metabólitos principais α -zearalenol (α -ZOL) e β -zearalenol (β -ZOL) (Figura 11). ZEA e seus metabólitos já foram detectados em leite e derivados. Um estudo foi realizado em amostras de fórmulas de leite infantil na Itália, e ZEA foi detectada em 9% das amostras com contaminação máxima de 0,76 $\mu\text{g/l}$; α -ZOL e β -ZOL estavam presentes em 26% e 28% das amostras com valores máximos de 12,91 $\mu\text{g/l}$ e 73,24 $\mu\text{g/l}$, respectivamente. Outro estudo foi realizado por Huang et al. (2014), que encontraram ZEA em 23% das amostras de leite cru analisadas (média de 14,9 ng/l) e em 25% das amostras de leite em pó (média de 11,6 ng/l). Já Zhao et al. (2015) relataram presença de ZEA (3-10 $\mu\text{g/l}$) e β -ZOL (1,2 $\mu\text{g/l}$) em amostras de leite, com incidência de 40% e 10%, respectivamente (MEUCCI et al., 2011; HUANG et al., 2014; ZHAO et al., 2015; TOLOSA et al., 2021).

Figura 11 - Biotransformação de ZEA em α -ZOL e β -ZOL.



Fonte: WANG et al. (2019)

3.6 Coocorrências de Micotoxinas

Outro problema muito comum na alimentação animal é a coocorrência de micotoxinas. Considerando que muitos fungos micotoxigênicos são capazes de produzir simultaneamente mais de uma micotoxina, que as *commodities* podem ser contaminadas por vários fungos e que a alimentação completa dos animais é feita a partir de várias *commodities* diferentes, o estudo

da ocorrência de uma única micotoxina oferece informações incompletas sobre o risco associado ao respectivo alimento, pois coocorrências são muito comuns na alimentação animal, e a contaminação por uma única micotoxina não é a norma, mas sim a exceção (GRENIER; OSWALD, 2011; SMITH et al., 2016).

Quando mais de uma micotoxina está presente no alimento podem ocorrer interações, que podem ser de três tipos: aditivas, quando o efeito da combinação é calculado como a soma dos efeitos individuais das toxinas envolvidas; sinérgicas, quando o efeito da combinação das micotoxinas é superior ao esperado em comparação com a soma dos efeitos individuais das micotoxinas; ou antagônicas, quando o efeito da combinação das micotoxinas é inferior ao esperado a partir da soma dos efeitos individuais das micotoxinas. As coocorrências são comuns na alimentação animal, e podem causar grandes perdas, pois efeitos sinérgicos são muito observados (BINDER et al., 2007; STREIT et al., 2012; SMITH et al., 2016; KOVALSKY et al., 2016). A seguir os principais efeitos resultantes de coocorrências relatados na literatura serão descritos:

3.6.1 Toxicidade In Vivo

Embora a literatura científica ofereça uma ampla variedade de informações sobre os efeitos individuais das micotoxinas em várias espécies animais, os efeitos das coocorrências são menos estudados apesar de a exposição simultânea à múltiplas micotoxinas ser muito comum na pecuária, uma vez que no processo de fabricação de rações, vários lotes de diferentes matérias-primas são misturados, produzindo uma matriz totalmente nova e com um novo perfil de risco (CAST, 2003; BINDER et al., 2007).

As coocorrências podem ser uma explicação importante para as divergências observadas nos efeitos descritos na literatura científica e nos casos observados no campo. Na maior parte dos artigos científicos é utilizada apenas uma micotoxina (que geralmente é purificada), além disso, os estudos sobre os efeitos tóxicos combinados das micotoxinas *in vivo* são limitados e, portanto, o risco à saúde decorrente da exposição a uma combinação de micotoxinas é incompleto. Em surtos de campo, alimentos naturalmente contaminados podem conter múltiplas micotoxinas, e níveis de contaminação aparentemente mais baixos podem estar associados a efeitos mais graves devido a ação conjunta das micotoxinas (BINDER et al., 2007; GRENIER; OSWALD, 2011).

Diversas interações e suas implicações na saúde animal resultantes de estudos *in vivo* serão descritas a seguir:

Interações entre aflatoxinas e fumonisinas

Diversos artigos descrevem os efeitos e conseqüentes interações resultantes da contaminação dos alimentos por aflatoxinas (AFLA) e fumonisinas (FUMO) (Apêndice A). Pozzi et al. (2001) descreveram os efeitos observados em camundongos. Neste estudo os animais foram divididos em seis grupos: o grupo 1 não recebeu nenhuma micotoxina; o grupo 2 recebeu 72 µg AFLA + 0 mg FUMO/100 g de peso corporal; o grupo 3 recebeu 0 µg AFLA + 0,5 mg FB1/100 g de peso corporal; o grupo 4 recebeu 0 µg AFLA + 1,5 mg FUMO/100 g de peso corporal; o grupo 5 recebeu 72 µg AFLA + 0,5 mg FUMO/100g de peso corporal; e o grupo 6 recebeu 72 µg AFLA + 1,5 mg FUMO/100g de peso corporal. Os animais do grupo controle e os tratados com micotoxinas apresentaram aspecto normal durante todo o período experimental, exceto os animais do grupo 6, que estavam letárgicos, tinham pelos eriçados e ganharam menos peso. Foi observada uma relação antagônica no ganho de peso corporal nos animais do grupo 5, o ganho de peso destes animais foi maior do que o observado no grupo controle e não diferiu estatisticamente dos grupos que receberam apenas uma das toxinas, já nos animais do grupo 6 a interação foi do tipo sinérgica (POZZI et al., 2001; GRENIER; OSWALD, 2011).

Com relação aos pesos dos órgãos, o fígado foi o mais afetado pela associação das duas micotoxinas. Camundongos expostos à AFLA mais a maior dose de FUMO (grupo 6) apresentaram os menores pesos absolutos e relativos para o fígado, demonstrando uma ação hepatotóxica das duas toxinas em associação, e levando a uma interação sinérgica. Os rins também foram afetados pela ação conjunta das micotoxinas, e tiveram seu peso absoluto significativamente reduzido no grupo 6 (POZZI et al., 2001; GRENIER; OSWALD, 2011).

Também foram realizados experimentos para medir as concentrações de enzimas no soro de animais alimentados com dietas multi-contaminadas. Estes experimentos têm como objetivo investigar a presença de danos aos tecidos (principalmente ao fígado), já que estes danos são fisiologicamente traduzidos pelo aumento de biomarcadores. Foi observado um aumento nas atividades enzimáticas de aspartato aminotransferase (AST), fosfatase alcalina (FAL), alanina aminotransferase (ALT) e gama glutamiltransferase (GGT) em todos os camundongos tratados com AFLA + FUMO em comparação com os controles. Estes aumentos podem ser atribuídos à necrose celular, alterações na permeabilidade da membrana celular ou prejuízo da excreção biliar (POZZI et al., 2001; GRENIER; OSWALD, 2011).

Outro estudo foi realizado em perus por Kubena et al. (1995a), os animais receberam dietas contendo 0,75 mg/kg de AFLA, 200 mg/kg de FUMO ou uma combinação das duas toxinas. Quando comparados com os controles, os ganhos de peso corporal foram reduzidos em 39% por AFLA, 10% por FUMO e 47% pela combinação, resultando em uma interação aditiva. Com relação a mortalidade, foi observada interação antagônica entre as toxinas, os resultados encontrados foram de 4% de mortes no grupo controle, 17% para AFLA, 4% para FUMO e 8% para a combinação. Quando comparado com os controles o peso relativo do fígado diminuiu de forma significativa, sendo a interação classificada como sinérgica, já os pesos relativos dos rins, pâncreas e moela aumentaram nos perus alimentados com a dieta co-contaminada. O aumento do peso relativo dos rins está provavelmente associado a um leve dano renal. Animais alimentados com a dieta contendo a combinação também apresentaram concentrações séricas reduzidas de proteínas totais, albumina, colesterol, triglicerídeos, glicose, cálcio e fósforo inorgânico. A redução no colesterol provavelmente ocorreu devido à inibição da biossíntese do colesterol e a redução nos triglicerídeos séricos pode estar associada a um prejuízo no transporte de lipídios. Estes dados indicam que a combinação de AFLA + FUMO pode afetar a saúde e o desempenho de perus de forma mais grave do que estas micotoxinas individualmente. Além disso, nas condições experimentais utilizadas a interação entre AFLA e FUMO foi caracterizada de forma geral como aditiva (KUBENA et al., 1995a; GRENIER; OSWALD, 2011).

Em poedeiras, a redução da produção e do peso dos ovos é um dos efeitos da aflatoxicose. Um estudo relatou efeito antagônico de AFLA e FUMO na produção de ovos em codornas. De forma surpreendente, a produção de ovos foi reduzida em animais alimentados com dieta contaminada apenas com FUMO (10 mg/kg), e esse efeito foi parcialmente revertido quando os animais receberam dieta contaminada com 200 µg/kg AFLA + 10 mg/kg FUMO (OGIDO et al., 2004; GRENIER; OSWALD, 2011).

Com relação a síntese de lipídeos, a interrupção da biossíntese de esfingolipídios é o principal mecanismo envolvido na toxicidade de FUMO. Esta toxina leva a inibição da ceramida sintase causando o acúmulo de bases esfingoides (esfinganina - Sa e esfingosina - So). Essa inibição já foi bastante estudada e um aumento da razão Sa / So é considerado um bom indicador de exposição à FUMO (QUI; LIU, 2001; THEUMER et al., 2008). Alguns estudos analisaram o efeito da co-exposição à AFLA e FUMO em bases esfingoides em diferentes amostras biológicas, com o objetivo de investigar se AFLA poderia exacerbar a toxicidade de FUMO. Orsi et al. (2007) realizaram experimento em coelhos que receberam 1,5 mg/kg de peso corporal/dia de FUMO + 30 µg/kg de peso corporal/dia de AFLA, e demonstraram uma interação antagônica entre AFLA e FUMO na razão Sa / So no fígado de

animais expostos, já no soro a interação foi sinérgica e na urina foi observada interação aditiva. Por outro lado, Theumer et al. (2008) observaram um efeito sinérgico das duas toxinas ao observar a razão S_a / S_o nos rins, na urina e, em menor grau, no soro e no fígado de camundongos expostos à dieta contendo 0,04 mg/kg AFLA e 100 mg/kg FUMO. Este estudo também descreveu uma interação sinérgica na incidência e na gravidade das lesões renais e hepáticas (ORSI et al., 2007; THEUMER et al., 2008; GRENIER; OSWALD, 2011).

Tanto AFLA quanto FUMO têm efeitos cancerígenos. Em nível molecular, a toxicologia de AFLA envolve sua conversão metabólica pelo sistema do citocromo P450 em AF-exo-8,9-epóxido, que por sua vez se liga às bases guanina do ácido desoxirribonucleico (DNA) para formar adutos. É descrito que AFLA é um bom iniciador de câncer e comprovadamente um carcinógeno completo. Por outro lado, FUMO é descrito como um potente promotor de tumor, mas um iniciador fraco (GRENIER; OSWALD, 2011; BBOSA et al., 2013). Dois ensaios de longo prazo, um realizado em camundongos e o outro em trutas arco-íris, iniciaram a hepatocarcinogênese com AFLA e, em seguida, trataram os animais com altas doses de FUMO (CARLSON et al., 2001; GELDERBLOM et al., 2002). Carlson et al. (2001) realizaram estudos com as trutas arco-íris. As trutas são uma espécie com incidência de tumor espontâneo muito baixa, neste estudo, animais tratados apenas com FUMO (3,2; 23 ou 104 mg/kg) não desenvolveram tumores em nenhum dos tecidos analisados (fígado, rim, estômago e bexiga natatória), já nos animais tratados inicialmente com AFLA (0,1 mg/kg) e posteriormente com FUMO, FUMO promoveu câncer de fígado, mas não promoveu tumores em outros tecidos (CARLSON et al., 2001). Da mesma forma, no estudo realizado por Gelderblom et al. (2002) em camundongos, as toxinas (17 µg/kg de peso corporal/dia de AFLA + 250 mg/kg de FUMO) agiram sinérgicamente com relação à iniciação do câncer, conforme demonstrado pelo número de nódulos e focos de hepatócitos encontrados nos animais. Foi demonstrado que o pré-tratamento dos animais com AFLA aumentou a potência de iniciação de FUMO, e que quando as toxinas são administradas separadamente ambos os compostos exibem potência de iniciação de câncer lenta (GELDERBLOM et al., 2002).

Com relação aos efeitos imunogênicos, existem poucos estudos que investigam o efeito combinado de AFLA e FUMO na imunidade. Tessari et al. (2006) realizaram estudos em frangos, os animais receberam 50 ou 200 µg/kg de AFLA, 50 ou 200 mg/kg de FUMO ou uma combinação das duas toxinas. Todas as aves foram vacinadas contra a doença de Newcastle e foi observada uma diminuição sinérgica dos títulos de anticorpos contra esta doença nos animais que receberam dietas co-contaminadas. Este efeito imunossupressor pode estar relacionado à inibição da síntese de proteínas, incluindo uma diminuição nos títulos de

imunoglobulinas G (IgG) e imunoglobulinas A (IgA), redução no número de linfócitos e efeitos na Bursa de Fabricius (CAMPBELL et al., 1983; SUR; CELIK, 2003; TESSARI et al. 2006; GRENIER; OSWALD, 2011).

Interações entre aflatoxinas e ocratoxina A

Diversos artigos descrevem os efeitos e consequentes interações resultantes da contaminação dos alimentos por aflatoxinas (AFLA) e ocratoxina A (OTA) (Apêndice A). Huff e Doerr (1981) realizaram estudo em frangos que receberam dietas contaminadas com 2,5 mg/kg de AFLA, 2,0 mg/kg de OTA ou uma combinação das duas toxinas. Com relação ao peso relativo de diversos órgãos, foi observado aumento dos pesos do fígado, rins, baço, moela e proventrículo, porém o rim foi o órgão mais sensível à toxicidade combinada de AFLA e OTA, e a nefropatia foi a característica mais importante dessa interação. O sinergismo entre a aflatoxina e a ocratoxina A diminuiu significativamente a taxa de crescimento e aumentou numericamente a mortalidade, demonstrando o aumento da toxicidade dos alimentos co-contaminados. Com relação ao peso corporal cada micotoxina individualmente resultou em uma diminuição em 12% do peso corporal, já os animais que receberam a dieta co-contaminada tiveram uma diminuição de 40% no peso corporal, portanto a interação foi classificada como sinérgica. Os níveis de lipídios hepáticos foram significativamente aumentados por AFLA e diminuídos por OTA, a interação de ambas as toxinas neste parâmetro foi significativa e o efeito combinado demonstra que OTA inibiu o acúmulo de lipídios normalmente induzido por AFLA de forma antagônica. Por fim, este estudo torna evidente que existem efeitos sinérgicos entre AFLA e OTA (HUFF; DOERR, 1981; GRENIER; OSWALD, 2011).

Já Huff et al. (1983) observaram que mesmo quatro semanas após a interrupção da exposição à dieta co-contaminada com 2,5 mg/kg AFLA + 2 mg/kg OTA, os frangos não recuperaram seu peso corporal normal. Os autores também observaram que a ingestão de ração co-contaminada diminuiu o rendimento das carcaças e o peso do peito, das coxas e asas de forma sinérgica (HUFF et al., 1983; HUFF et al., 1984; GRENIER; OSWALD, 2011).

Raju e Devegowda (2000) também realizaram estudo com frangos, porém foram observadas interações antagônicas para a maioria das variáveis estudadas, como mortalidade e aumento dos pesos relativos do fígado e dos rins em animais que receberam dieta contaminada com 0,3 mg/kg de AFLA + 2,0 mg/kg de OTA (RAJU; DEVEGOWDA, 2000; GRENIER; OSWALD, 2011).

A aparição de lesões microscópicas após a ingestão de alimentos contaminados com AFLA e OTA foi avaliada principalmente no fígado e rins por serem os órgão-alvo destas micotoxinas (GRENIER; OSWALD, 2011). Sakhare et al. (2007) registraram lesões hepáticas mais graves em frangos que receberam dieta co-contaminada (0,2 mg/kg AFLA + 0,2 mg/kg OTA). Foram observadas alterações degenerativas granulares e vacuolares, necrose do parênquima hepático e áreas de hemorragia (SAKHARE et al., 2007). Já em suínos alimentados com dieta co-contaminada (0,375 mg/kg AFLA + 1 mg/kg OTA) foram observadas as mesmas lesões hepáticas que aqueles alimentados com dieta contaminada apenas com AFLA (0,375 mg/kg) (TAPIA; SEAWRIGHT, 1985).

A mesma discrepância foi observada para a histopatologia dos rins. Em suínos, Tapia e Seawright (1985) observaram lesões renais menos graves, com grau de fibrose cortical intersticial menos pronunciado nos animais alimentados com dieta co-contaminada (0,375 mg/kg AFLA + 1 mg/kg OTA) do que em animais que receberam dieta contaminada apenas com OTA (1 mg/kg) (TAPIA; SEAWRIGHT, 1985). Por outro lado, Sakhare et al. (2007) indicaram que as lesões renais apareceram mais cedo e foram mais desenvolvidas em frangos alimentados com dieta co-contaminada (0,2 mg/kg AFLA + 0,2 mg/kg OTA) do que em animais que receberam dieta mono-contaminada (0,2 mg/kg OTA) e isso levou à destruição do epitélio tubular, com descolamento das células tubulares da membrana basal (SAKHARE et al., 2007). Estas diferenças nos resultados podem ser devido aos experimentos serem realizados em espécies diferentes (GRENIER; OSWALD, 2011).

Um estudo realizado em bezerros observou falta de resposta para a maioria das variáveis estudadas. Este fato provavelmente se deve às baixas doses de micotoxinas utilizadas (12 a 13 µg/kg de AFLA + 320 a 500 µg/kg de OTA) e à ação desintoxicante da flora ruminal sobre OTA. Após 87 dias de experimento não foram observadas evidências de danos ao fígado ou aos rins. Também não foram observadas alterações hematológicas, nem nos níveis de imunoglobulinas A (IgA), imunoglobulinas M (IgM) e imunoglobulinas G (IgG) no soro dos animais (PATTERSON et al., 1981; GRENIER; OSWALD, 2011). Este foi o único estudo de coocorrência em bovinos encontrado.

Um estudo avaliou os efeitos de AFLA e OTA na produção e qualidade de ovos, já que estas toxinas sabidamente afetam estes parâmetros. Foram utilizadas galinhas poedeiras que receberam doses variadas de AFLA (0,5, 1,0 ou 2,0 mg/kg), OTA (1,0, 2,0 ou 4,0 mg/kg) ou combinações destas toxinas. Foi observado que os animais que receberam dietas mono ou co-contaminadas apresentaram uma diminuição da produção de ovos, e a interação foi classificada como aditiva. Além disso, os animais que receberam dietas contaminadas tiveram um aumento

da quantidade de alimento consumido para a produção de uma dúzia de ovos, esta interação foi classificada como sinérgica ou aditiva, dependendo da dose utilizada. Outro parâmetro avaliado foi a qualidade dos ovos (medida pela espessura da casca). Foi relatada uma diminuição na qualidade, porém AFLA e OTA em combinação agiram de forma antagônica para este parâmetro. Foi concluído que AFLA e OTA isoladamente ou em combinação podem diminuir o desempenho em termos de produção de ovos e eficiência alimentar de forma significativa (VERMA; JOHRI; SWAIN, 2003; GRENIER; OSWALD, 2011).

As interações de AFLA e OTA no sistema imune foram avaliadas por Verma et al. (2004). Neste estudo, frangos de corte receberam dietas contaminadas com 0,5, 1,0 ou 2,0 mg/kg de AFLA, 1,0, 2,0 ou 4,0 mg/kg de OTA ou combinações das duas toxinas. Os animais foram imunizados com hemácias de ovelha (SRBC), e em seguida foram medidos os títulos de anticorpos contra SRBC. Foi observada uma redução significativa nos títulos médios de anticorpos contra SRBC em todas as concentrações testadas de AFLA e OTA, individualmente ou combinadas. Nos animais que receberam 0,5 mg/kg de AFLA + 1,0 mg/kg de OTA a interação foi antagônica, já naqueles que receberam 1,0 mg/kg de AFLA + 2,0 mg/kg de OTA ou 2,0 mg/kg de AFLA + 4,0 mg/kg de OTA a interação foi aditiva (VERMA et al., 2004; GRENIER; OSWALD, 2011). Outro estudo foi realizado também em frangos por Kalorey et al. (2005), neste estudo foi observado que a alimentação com AFLA (0,2 mg/kg) e OTA (0,2 mg/kg) individualmente ou em combinação reduziu significativamente o desenvolvimento da resposta imune humoral contra a doença de Newcastle, porém a interação foi classificada como antagônica (KALOREY et al., 2005; GRENIER; OSWALD, 2011).

A ação teratogênica de AFLA e OTA também foi avaliada em alguns estudos. É descrito que tanto AFLA quanto OTA são capazes de cruzar a barreira placentária e por isso possuem propriedades teratogênicas em algumas espécies (WANGIKAR; DWIVEDI; SINHA, 2004a; WANGIKAR et al., 2005). Wangikar et al. (2004a; 2004b) realizaram estudos para determinar estes efeitos teratogênicos. As micotoxinas foram administradas individualmente ou em combinação por via oral a camundongas prenhas nos dias 6-15 de gestação. Diferentes doses de OTA (0,125, 0,25, 0,50 e 0,75 mg/kg), AFLA (0,125, 0,25, 0,50 e 1,0 mg/kg) e da combinação de OTA + AFLA (0,125 + 0,125; 0,25 + 0,50; 0,50 + 0,25 mg/kg) foram testadas. O número de fetos mortos aumentou significativamente no grupo que recebeu a combinação 0,50 mg/kg OTA + 0,25 mg/kg AFLA em comparação com as outras duas combinações e AFLA e OTA sozinhas. AFLA e OTA sozinhas e em combinação também causaram várias anomalias esqueléticas e viscerais, mas estas anomalias foram reduzidas nos grupos que receberam dieta co-contaminada, quando comparadas aos grupos que receberam apenas uma das toxinas.

Também foi observado que a incidência de defeitos cardíacos nos fetos aumentou devido ao tratamento combinado. Os estudos também indicam que as lesões cerebrais, renais e hepáticas foram menos graves nos fetos co-expostos do que naqueles que receberam apenas uma das toxinas. Além disso, ossificação defeituosa ou incompleta dos ossos cranianos, exposição do cérebro para o exterior e desenvolvimento deficiente do cerebelo, foram observados apenas nos tratamentos com OTA, não nos tratamentos combinados (WANGIKAR et al., 2004a; WANGIKAR et al., 2004b).

Resultados semelhantes foram encontrados em coelhos (WANGIKAR et al.; 2005). A avaliação comparativa dos resultados da combinação AFLA + OTA (0,05 + 0,05 e 0,1 + 0,1 mg/kg de peso corporal) *versus* tratamentos individuais revelou que certas anomalias observadas no tratamento individual de OTA (cauda rudimentar ou agenesia da cauda, costelas onduladas, hidrocefalia e agenesia do rim) e AFLA (cavidades oculares aumentadas e fígado aumentado) estavam ausentes no tratamento combinado. No entanto, algumas novas manifestações, como defeitos cardíacos e escoliose, foram observadas apenas nos animais que receberam AFLA + OTA (WANGIKAR et al.; 2005).

Já Edrington, Harvey e Kubena (1995) demonstraram que a mortalidade embrionária aumentou após a injeção de uma combinação de AFLA e OTA em ovos de galinhas (0,025 µg/ovo AFLA + 1,0 µg/ovo OTA ou 0,05 µg/ovo AFLA + 2,0 µg/ovo OTA), e levou à uma interação aditiva. Além disso, a exposição de embriões de galinha à combinação de toxinas resultou em uma interação sinérgica com relação ao número de anormalidades (EDRINGTON; HARVEY; KUBENA, 1995; GRENIER; OSWALD, 2011).

Interações entre aflatoxinas e T-2 toxina

Diversos artigos descrevem os efeitos e consequentes interações resultantes da contaminação dos alimentos por aflatoxinas (AFLA) e T-2 toxina (T-2) (Apêndice A). Huff et al. (1988) descreveram os efeitos da interação entre AFLA e T-2 em frangos. As concentrações utilizadas neste estudo foram de 2,5 mg/kg de AFLA e 4,0 mg/kg de T-2 (individualmente ou combinadas). Efeitos sinérgicos foram observados na diminuição do ganho de peso corporal e no aumento nos pesos relativos do coração e dos rins. Além disso, o peso relativo da moela, que não foi alterado por AFLA ou T-2 sozinhas, aumentou significativamente de maneira sinérgica pelo tratamento combinado. Os níveis séricos de proteínas, albumina e colesterol no tratamento combinado não foram apenas menores do que os valores de controle, mas menores também do que os observados em aves que receberam os tratamentos com uma única

micotoxina. De forma geral, a interação entre AFLA e T-2 foi classificada como sinérgica, e deve ser uma preocupação para a indústria avícola devido à sua toxicidade e à frequente ocorrência dessas micotoxinas em alimentos e ingredientes utilizados nas rações (HUFF et al., 1988).

Madheswaran, Balachandran e Manohar (2004) também avaliaram os efeitos na bioquímica do soro de codornas. As doses utilizadas neste estudo foram de 3,0 mg/kg de AFLA e 4,0 mg/kg de T-2 (incluídas individualmente ou combinadas na alimentação). Os resultados encontrados estão de acordo com os de Huff et al. (1988). A interação AFLA + T2 foi significativa e levou à diminuição nos níveis séricos de proteínas totais (de forma aditiva), albumina (de forma aditiva), glicose (de forma antagônica) e colesterol. A hipoproteinemia e hipoalbuminemia observadas em todos os grupos tratados com toxina podem ser atribuídas às propriedades de AFLA e T-2 de inibir a síntese de proteínas, durante a transcrição e tradução, respectivamente. Além disso, sendo o fígado o principal órgão de síntese proteica, o dano hepático observado poderia ser outro fator contribuinte para a hipoproteinemia e hipoalbuminemia, sendo a hipoglicemia e a hipocolesterolemia também atribuídas aos danos observados (BUNNER; MORRIS, 1988; HUFF et al., 1988; PIER, 1992; MADHESWARAN; BALACHANDRAN; MANOHAR, 2004).

Kubena et al. (1990) investigaram o efeito de AFLA e T-2 na cavidade oral, pois T-2 é um potente irritante da cavidade bucal. Foi observado que em frangos que receberam ração mono-contaminada, as lesões orais foram observadas apenas nas aves que receberam T-2 (8 mg/kg) e a combinação com AFLA (3,5 mg/kg AFLA + 8 mg/kg T-2) resultou em uma interação antagônica. Os autores sugerem que o menor efeito de T-2 na presença de AFLA ocorreu, pois, a ingestão de T-2 foi reduzida em aproximadamente 70% nos frangos que receberam a dieta contendo AFLA + T-2 em comparação aqueles que receberam a dieta contendo apenas T-2 (KUBENA et al., 1990).

Com relação ao sistema imunológico, dois artigos investigaram a interação entre AFLA e T-2 em frangos (RAJU; DEVEGOWDA, 2002; GIRISH; DEVEGOWDA, 2006). No estudo de Raju e Devegowda (2002) as doses utilizadas foram de 0,3 mg/kg de AFLA + 3,0 mg/kg de T-2, já Girish e Devegowda (2006) utilizaram 2,0 mg/kg de AFLA + 1,0 mg/kg de T-2. Os estudos foram concordantes em suas conclusões e mostraram diferentes tipos de interação das duas micotoxinas dependendo do parâmetro: foi observado efeito sinérgico ou aditivo no peso do timo; efeito aditivo no peso da Bursa de Fabricius; e efeito antagônico nos títulos de anticorpos contra a doença de Newcastle (RAJU; DEVEGOWDA, 2002; GIRISH; DEVEGOWDA, 2006; GRENIER; OSWALD, 2011).

Interações entre aflatoxinas e deoxinivalenol

Um estudo avaliou os efeitos da co-contaminação por aflatoxinas (AFLA) e deoxinivalenol (DON) (Apêndice A). Huff et al. (1986) realizaram experimentos em frangos, os animais receberam dietas contaminadas com 2,5 mg/kg AFLA, 16 mg/kg DON ou uma combinação das duas toxinas. Os frangos que receberam dieta co-contaminada apresentaram diminuição do peso corporal e do ganho de peso, e esta interação foi classificada como aditiva. Foram observados aumentos sinérgicos nos pesos relativos do proventrículo, da moela e do fígado. Os níveis séricos de proteínas, albumina, ácido úrico e colesterol foram diminuídos for AFLA + DON, mas parecem refletir apenas o efeito de AFLA (HUFF et al., 1986).

Esses dados demonstram que a combinação de AFLA e DON pode limitar o desempenho dos frangos e afetar adversamente sua saúde. Foi observado que os efeitos da combinação foram mais graves do que os efeitos individuais dessas micotoxinas, no entanto, a interação não foi severa o suficiente para ser caracterizada como sinérgica, mas sim como aditiva (HUFF et al., 1986).

Interações entre fumonisinas e T-2 toxina

A interação entre fumonisinas (FUMO) e T-2 toxina (T-2) foi relatada em perus e em galinhas (Apêndice A) (KUBENA et al., 1995b, KUBENA et al., 1997a).

Kubena et al. (1995b) realizaram experimentos com perus. Os animais receberam dietas contaminadas com 300mg/kg FUMO e 5 mg/kg T-2 (sozinhas ou em combinação). Quando comparados com os controles, o ganho de peso corporal dos animais foi reduzido em 21% por FUMO, 26% por T-2 e 47% pela combinação, resultando em uma interação aditiva, esta diminuição está provavelmente associada à inibição da síntese de proteínas por T-2 e a interrupção da biossíntese de esfingolipídios por FUMO (TUNG et al., 1975; WANG et al., 1991). Lesões orais estavam presentes tanto nos perus que receberam dieta apenas com T-2 quanto nos que receberam dieta co-contaminada, sem diferenças significativas entre os grupos (KUBENA et al., 1995b; GRENIER; OSWALD, 2011).

Os pesos relativos do fígado e da moela também aumentaram significativamente em perus alimentados com dietas contaminadas com FUMO e aumentaram ainda mais em perus alimentados com a combinação FUMO + T-2, levando a interações sinérgicas. O aumento do peso relativo do fígado provavelmente está associado a alterações no metabolismo lipídico,

principalmente como resultado de um prejuízo no transporte de lipídeos. Já o aumento do peso relativo da moela pode ser atribuído às propriedades irritantes das micotoxinas de forma geral (HOERR et al., 1982; KUBENA et al., 1995b; GRENIER; OSWALD, 2011).

Resultados semelhantes foram obtidos por Kubena et al., (1997a) em frangos. Os animais receberam a mesma quantidade de micotoxinas do estudo anterior (300mg/kg FUMO e 5 mg/kg T-2, sozinhas ou em combinação). Também foi observado diminuição do ganho de peso corporal, a redução foi de 18% para FUMO, 18% para T-2 e 32% para a combinação, sendo a interação classificada com aditiva. A mortalidade também foi aumentada de forma aditiva em frangos alimentados com a dieta contendo FUMO + T-2, quando comparados aos controles. Os pesos relativos do fígado e dos rins foram aumentados nos animais alimentados com dieta contendo FUMO com ou sem T-2, enquanto os pesos relativos do pâncreas e moela foram aumentados apenas nos frangos alimentados com dieta contendo FUMO e T-2 em combinação. Já com relação ao peso relativo do baço foi observada interação antagônica significativa entre FUMO e T-2, uma vez que, T-2 interferiu na ação de FUMO para aumento do peso do baço. Além disso, também foi observada interação antagônica com relação aos escores de lesão oral, animais que receberam dieta co-contaminada apresentaram menos lesões orais do que aqueles que receberam dieta contaminada apenas com T-2, isto se deve a uma redução no consumo de ração no grupo que recebeu FUMO + T-2, conseqüentemente diminuindo a ingestão de T-2 neste grupo (KUBENA et al., 1997a; GRENIER; OSWALD, 2011).

De forma geral, os resultados indicaram que os efeitos de FUMO e T-2 em combinação podem ser mais graves do que as micotoxinas individuais para várias variáveis, e a interação foi classificada de modo geral como aditiva. Os autores também ressaltam que a probabilidade de encontrar 300mg/kg de FUMO em uma ração final é bastante pequena, no entanto, em condições de campo com fatores de estresse adicionais, a toxicidade dessas micotoxinas pode ser alterada para afetar adversamente a saúde e o desempenho das aves (KUBENA et al., 1995b; KUBENA et al., 1997a).

Interações entre fumonisinas e deoxinivalenol

A interação entre fumonisinas (FUMO) e deoxinivalenol (DON) foi relatada em frangos e em suínos (Apêndice A) (KUBENA et al., 1997a; GRENIER et al., 2011; BRACARENSE et al., 2012).

No experimento com frangos, os animais receberam 300 mg/kg de FUMO e 15 mg/kg de DON (sozinhas ou em combinação). Quando comparado aos controles o ganho de peso corporal foi reduzido em 20% por FUMO, 2% por DON e 19% por FUMO + DON. A mortalidade aumentou de forma sinérgica nos animais que receberam dieta co-contaminada, assim como o peso relativo do proventrículo. Já o peso relativo da moela aumentou de forma aditiva. Também foi observado aumento dos pesos relativos do fígado e dos rins. Com relação ao peso relativo do coração, foi observada interação antagônica entre as toxinas, uma vez que o FUMO interferiu na ação de DON para pesos cardíacos aumentados. Houve interação sinérgica significativa para a concentração sérica de colesterol e atividade sérica da AST, uma vez que os aumentos nesses dois parâmetros foram significativamente maiores do que seria previsto a partir dos aumentos combinados das toxinas individuais. De forma geral, o artigo sugere que a interação entre FUMO e DON está entre aditiva e antagônica (KUBENA et al., 1997a; GRENIER; OSWALD, 2011).

Outro experimento foi realizado em suínos por Grenier et al. (2011). Os animais receberam dieta contaminada com 6 mg/kg de FUMO, 3 mg/kg DON ou uma combinação das duas toxinas. As diferentes dietas não afetaram o ganho de peso corporal e o desempenho dos animais e tiveram efeito mínimo nos parâmetros hematológicos e bioquímicos do sangue, isto provavelmente ocorreu, pois, as quantidades de FUMO e DON utilizadas foram baixas. Em contraste, as toxinas induziram lesões histopatológicas no fígado e nos pulmões dos animais expostos de forma aditiva, sendo que o fígado foi significativamente mais afetado quando as duas micotoxinas estavam presentes simultaneamente, sugerindo que DON, conhecido por alterar a permeabilidade intestinal, aumentou a absorção intestinal de FUMO, que é sabidamente mal absorvida (VOSS; SMITH; HASCHEK, 2007; PINTON et al., 2009; GRENIER et al., 2011; GRENIER; OSWALD, 2011).

As dietas co-contaminadas também alteraram a resposta imunológica específica após vacinação com ovalbumina, este parâmetro foi medido pelos níveis de IgG e IgA específicos no plasma. Foi observada uma redução de forma aditiva nos níveis de IgG, isso pode ter ocorrido devido a uma apresentação de antígeno defeituosa resultante da ingestão de FUMO + DON, o que levou a uma ativação prejudicada de linfócitos e consequente diminuição da resposta de IgG. Em contraste, uma interação antagônica foi observada nos níveis de IgA, mostrando um efeito poupador de FUMO na elevação de IgA induzida por DON. Isto possivelmente ocorre devido à ação de FUMO sobre os esfingolipídios, uma vez que esta toxina é conhecida por interromper o metabolismo dos esfingolipídios, levando à depleção da ceramida e de todos os esfingolipídios complexos derivados da ceramida, como a

esfingomiéline, que controla a quantidade de IgA no intestino grosso (SORIANO; GONZALEZ; CATALA, 2005; LOISEAU et al., 2007; FURUYA et al., 2008; GRENIER et al., 2011; GRENIER; OSWALD, 2011).

Os autores também destacam a complexidade das interações entre micotoxinas; alguns parâmetros não são afetados pela combinação, enquanto outros são. Além disso, os resultados obtidos podem ter impacto na regulamentação / recomendação atual que leva em consideração apenas micotoxinas individuais e não a contaminação por multimicotoxinas (GRENIER et al., 2011).

Bracarense et al. (2012) também realizaram experimentos em suínos, os animais receberam dieta contaminada com 6 mg/kg de FUMO, 3 mg/kg de DON ou uma combinação das duas toxinas. Assim como descrito por Grenier et al. (2011), neste estudo também não foram observadas diferenças nos pesos dos animais tratados com FUMO e DON (sozinhas ou combinadas) quando comparado ao grupo controle. Foram observadas lesões intestinais leves a moderadas, e as principais alterações histológicas foram o achatamento das vilosidades, necrose apical das vilosidades e edema da lâmina própria, isto pode ter acontecido pois DON inibe a síntese de proteínas, afetando principalmente as células que se dividem mais rapidamente (como as células epiteliais), portanto o achatamento das vilosidades provavelmente se deve ao comprometimento da proliferação celular nesta região (BRACARENSE et al., 2012).

Interações entre deoxinivalenol e T-2 toxina

A interação entre deoxinivalenol (DON) e T-2 toxina (T-2) foi relatada em dois artigos, um deles em frangos e o outro em suínos (Apêndice A) (KUBENA et al., 1989a; FRIEND et al., 1992).

Os efeitos da ingestão de DON e T-2 foram avaliados em frangos por Kubena et al. (1989a). Os animais receberam dietas contaminadas com 16 mg/kg de DON e 4 mg/kg de T-2 (sozinhos ou em combinação). Quando comparados com os controles, os ganhos de peso corporal foram significativamente reduzidos por DON e por T-2 isoladamente, e essa redução foi caracterizada como aditiva para a combinação. Houve um aumento significativo no peso relativo da moela nos animais alimentados com DON isoladamente ou em combinação com a T-2. Os pesos relativos da Bursa de Fabricius foram maiores em todos os tratamentos. A incidência e gravidade das lesões orais induzidas por T-2 foram aumentadas na combinação de DON + T-2. Outro efeito da interação foi a diminuição do colesterol de forma aditiva, isso

possivelmente ocorreu devido a danos no fígado e consequente diminuição na biossíntese do colesterol. Por fim, o estudo indica que embora não tenham sido observadas interações sinérgicas significativas, DON + T-2 podem produzir efeitos adversos mais graves do que os efeitos individuais das micotoxinas e representam um problema potencial para a indústria avícola (KUBENA et al., 1989a; GRENIER; OSWALD, 2011).

Friend et al. (1992) realizaram estudo em suínos. Os animais receberam dietas contaminadas apenas com DON (2,5 mg/kg), apenas com T-2 (0,4, 0,8, 1,6 ou 3,2 mg/kg) ou uma combinação de DON e T-2. A redução do peso corporal e do ganho de peso foram associados ao aumento do conteúdo de T-2 na dieta, sendo a relação entre a diminuição do ganho de peso considerada sinérgica quando a maior dose de T-2 foi utilizada. Em contraste, foram encontradas poucas evidências de que T-2 afetou os principais órgãos examinados ou os parâmetros bioquímicos e hematológicos. Os autores concluem que T-2 não foi tóxica para os suínos nas doses utilizadas no trabalho, e os principais efeitos observados foram atribuídos a DON ou a sua interação com T-2, mas não apenas a T-2 (FRIEND et al., 1992; GRENIER; OSWALD, 2011).

Interações entre deoxinivalenol e zearalenona

Dois artigos avaliaram as interações entre deoxinivalenol (DON) e zearalenona (ZEA) no sistema imune de camundongos (Apêndice A) (FORSELL et al., 1986; PESTKA et al., 1987). No estudo realizado por Forsell et al. (1986) os camundongos receberam dietas contaminadas com 5 mg/kg de DON, 10 mg/kg ZEA ou uma combinação das duas toxinas. É sabido que DON aumenta os títulos de IgA no soro, este aumento é causado pois DON pode alterar a permeabilidade intestinal, aumentando a exposição a antígenos alimentares. Neste estudo DON aumentou significativamente os níveis de IgA, mas ZEA atuou de forma antagônica na elevação induzida por DON. Já os níveis de IgG e IgM não foram alterados por nenhum dos tratamentos (FORSELL et al., 1986; GRENIER; OSWALD, 2011).

Pestka et al. (1987) realizaram experimentos para avaliar a resistência dos camundongos a *Listeria monocytogenes*, esta bactéria provoca uma resposta imunológica precoce, permitindo uma avaliação quantitativa rápida do curso da infecção. Foi observado um aumento no número de bactérias presentes no baço dos animais que receberam DON + ZEA (25 mg/kg DON + 10 mg/kg ZEA), e a interação foi classificada como aditiva. Outro parâmetro avaliado foi a resposta de hipersensibilidade tardia, que é uma resposta inflamatória de evolução lenta que pode servir como modelo para a resposta imune mediada por células. Foi observada uma

inibição da resposta de hipersensibilidade tardia, e DON e ZEA atuaram neste parâmetro de forma antagônica. A inibição provavelmente ocorreu como resultado direto da imunotoxicidade de DON, uma vez que os tricotecenos inibem a síntese de proteínas em células eucarióticas interferindo nas etapas de iniciação, alongamento ou terminação dos peptídeos, portanto DON potencialmente exerceu os efeitos imunotóxicos observados por meio de ação direta na diminuição de linfócitos e macrófagos e este efeito foi de alguma forma reduzido por ZEA (PESTKA et al., 1987; ROCHA; ANSARI; DOOHAN, 2005; GRENIER; OSWALD, 2011).

Interações entre ocratoxina A e T-2 toxina

Três artigos descrevem as interações entre ocratoxina A (OTA) e T-2 toxina (T-2) (Apêndice A). Garcia et al. (2003) realizaram experimentos em frangos. Os animais receberam 567 partes por bilhão (ppb) de OTA, 927 ppb de T-2 ou uma combinação das duas toxinas. O ganho de peso corporal e o consumo de ração foram reduzidos tanto pelas toxinas individualmente quanto pela combinação, e o efeito foi caracterizado como aditivo para ambos os parâmetros. Também foram realizadas análises histopatológicas dos rins e foi observado um aumento significativo na porcentagem de células renais tubulares necróticas em aves alimentadas tanto com OTA sozinha quanto em combinação com T-2, o peso relativo dos rins também aumentou nos frangos alimentados com OTA ou com OTA + T-2, porém ambos os efeitos foram mais acentuados no grupo que recebeu apenas OTA, e as interações foram caracterizadas como antagônicas (GARCIA et al., 2003; GRENIER; OSWALD, 2011).

Kubena et al. (1989b) também realizaram experimentos com frangos, neste estudo as doses utilizadas foram de 2 mg/kg de OTA, 4 mg/kg de T-2 ou uma combinação das duas toxinas. Foi observado aumento no peso relativo dos rins, aumento do ácido úrico sérico e dos níveis de creatinina, todos estes parâmetros indicam prejuízo da função renal devido a ingestão de OTA, também foram observadas alterações tubulares renais degenerativas nos frangos alimentados com OTA e com a combinação de OTA + T-2. Além disso, os pesos relativos da moela e do proventrículo foram significativamente maiores no grupo que recebeu dieta co-contaminada do que nos outros grupos, isso se deve às propriedades irritantes das micotoxinas. Os efeitos de OTA e T-2 foram aditivos para a redução do ganho de peso corporal e dos níveis séricos de proteínas totais. Além disso, 70% dos animais que receberam T-2 isoladamente ou em combinação com OTA apresentaram lesões orais. Esses dados indicam que OTA e T-2 em combinação podem ser mais tóxicos para alguns parâmetros do que as micotoxinas individuais

e podem representar um problema maior para a indústria avícola do que qualquer uma das micotoxinas individualmente (KUBENA et al., 1989b; GRENIER; OSWALD, 2011).

Também em frangos, Raju e Devegowda (2002) realizaram experimentos para avaliar os efeitos de OTA e T-2 no sistema imune. As aves receberam 2 mg/kg de OTA, 3 mg/kg de T-2 ou uma dieta contendo OTA + T-2. Foi observada interação aditiva entre OTA e T-2 com relação à diminuição do peso do timo, para o peso da Bursa de Fabricius a interação foi antagônica. A redução de tamanho observada nestes órgãos provavelmente ocorreu devido à necrose e depleção celular causadas pelas micotoxinas. Os títulos de anticorpos contra a doença de Newcastle e doença infecciosa da Bursa de Fabricius (IBD) foram significativamente reduzidos em todos os grupos alimentados com OTA e T-2 (individualmente ou combinados), a interação foi classificada como antagônica para os dois parâmetros (RAJU; DEVEGOWDA, 2002; GRENIER; OSWALD, 2011).

Interações entre ocratoxina A e deoxinivalenol

Um estudo avaliou as interações entre ocratoxina A (OTA) e deoxinivalenol (DON) em frangos (Apêndice A). As doses utilizadas foram de 2 mg/kg de OTA, 16 mg/kg de DON ou uma combinação das duas toxinas. O ganho de peso corporal foi significativamente reduzido por OTA, DON e pela combinação. A eficiência alimentar foi reduzida em 12% por OTA, 20% por DON e 33% pela combinação, indicando um efeito aditivo neste parâmetro. Os pesos relativos do fígado, dos rins, do proventrículo e da moela aumentaram nos animais que receberam OTA isoladamente ou a combinação OTA + DON. Com relação às lesões microscópicas apenas foram observadas degeneração hepatocelular leve, com lipidose difusa leve no fígado e edema no epitélio tubular renal leve nos grupos que receberam OTA e OTA + DON, porém não houve indícios de que esses efeitos fossem de natureza aditiva ou sinérgica. Os níveis de ácido úrico no soro foram significativamente aumentados por OTA, porém estes níveis tiveram uma redução nos animais que receberam OTA + DON, indicando um efeito de DON na redução do comprometimento renal causado por OTA (KUBENA et al., 1988).

Interações entre ocratoxina A e fumonisinas

As interações entre ocratoxina A (OTA) e fumonisinas (FUMO) foram avaliadas em perus por Kubena et al. (1997b) (Apêndice A), os animais receberam 3 mg/kg de OTA e 300 mg/kg de FUMO, individualmente ou combinados. A combinação de OTA + FUMO causou

reduções no ganho de peso corporal (37%) de forma sinérgica, esta redução está provavelmente associada à inibição da síntese de proteínas causada pelas toxinas. Foi observado um aumento do peso relativo do fígado (associado a alterações no metabolismo lipídico) e uma diminuição do peso relativo do baço nos animais que receberam dietas contaminadas com OTA, FUMO ou a combinação dos dois. Os pesos relativos do coração e dos rins diminuíram apenas animais alimentados com a dieta co-contaminada de forma sinérgica (para o coração) ou aditiva (para os rins). Os perus alimentados com dietas contendo FUMO com ou sem OTA apresentaram contagens de eritrócitos significativamente maiores do que os controles ou animais alimentados com a dieta contendo apenas OTA. Além disso, foi observada interação antagônica significativa em relação a concentração sérica de triglicerídeos, uma vez que FUMO interferiu no potencial de OTA de causar redução da concentração de triglicerídeos. Por fim, os autores ressaltam que a probabilidade de encontrar 300 mg/kg de FUMO em rações é pequena. No entanto, em condições de campo, FUMO pode interagir com outras micotoxinas aumentando a toxicidade dos alimentos co-contaminados (KUBENA et al., 1997b; GRENIER; OSWALD, 2011).

3.6.2 Toxicidade In Vitro

Os estudos *in vitro* têm sido incentivados como um método de substituição aos estudos *in vivo*, pois diversos estudos fazem uso de um grande número de animais e podem causar algum tipo de sofrimento durante os experimentos. Por esta razão, a redução dos experimentos *in vivo* é uma tendência mundial que teve início a partir do surgimento de um programa denominado de 3Rs (*Reduction, Refinement, Replacement* – redução, refinamento e substituição), que objetiva diminuir o número de animais utilizados na pesquisa (redução), minimizar a dor e o desconforto destes animais (refinamento) e buscar alternativas para a substituição dos testes *in vivo* (substituição) (SCHECHTMAN, 2002; MEYER, 2003; CAZARIN; CORRÊA; ZAMBRONE, 2004; SMITH et al., 2016).

Os bioensaios *in vitro* apresentam algumas limitações, como a imortalização de diversas linhagens, tempo de sobrevivência limitado e desequilíbrio metabólico, porém estes modelos são cada vez mais utilizados para entender os mecanismos de ação das micotoxinas, uma vez que são menos restritivos no número de grupos de teste, o que torna mais fácil a avaliação de misturas complexas de micotoxinas (SMITH et al., 2016; ALASSANE-KPEMBI et al., 2017).

Diversas interações descritas em modelos *in vitro* serão apresentadas a seguir:

Interações entre aflatoxinas e fumonisinas

McKean et al. (2006a) avaliaram os efeitos de AFLA e FUMO em células de carcinoma hepatocelular humano (HepG₂) e em células epiteliais brônquicas humanas (BEAS-2B). Concentrações variáveis de AFLA + FUMO (1 + 399,2; 0,75 + 299,4; 0,5 + 199,6; 0,38 + 149,7; 0,25 + 99,8; 0,13 + 49,9 μ M) foram adicionadas a células HepG₂ por 24 horas. Após a exposição, a viabilidade das células foi medida. Concentrações mais baixas da combinação não tiveram efeito inibitório sobre a viabilidade celular, no entanto, concentrações mais altas (1 + 399,2; 0,75 + 299,4; 0,5 + 199,6) mostraram viabilidade celular de 32-69%, porém, quando comparados com o efeito individual das micotoxinas, a viabilidade foi menos reduzida por AFLA + FUMO do que por AFLA ou FUMO individualmente, e o efeito nestas células foi caracterizado como antagônico. Já nas células BEAS-2B as concentrações testadas foram de 100 μ M de AFLA + 355,1, 266,3, 177,5, 133,2, 88,8 ou 44,4 μ M de FUMO, nesta linhagem a viabilidade celular foi muito afetada mesmo nos grupos tratados com doses baixas. O efeito máximo ocorreu no grupo de maior dose (100 + 355,1 μ M), e a viabilidade celular foi de 26%, nestas células a interação foi classificada como aditiva (Apêndice B) (MCKEAN et al., 2006a).

Clarke et al. (2014) também demonstraram interação aditiva para a citotoxicidade de AFLA e FUMO em células de rim bovino (MDBK), as concentrações utilizadas foram 1,28 μ g/ml de AFLA + 8,0 μ g/ml de FUMO, e foi observada diminuição da viabilidade celular em 19% (Apêndice B) (CLARKE et al., 2014).

Interações entre aflatoxinas e ocratoxina A

El Golli-Bennour et al. (2010), realizaram experimentos em células de rim de macaco (Vero), para determinar a citotoxicidade de AFLA, OTA e AFLA + OTA. Após 24 horas de exposição o valor de IC₅₀ (Concentração Inibitória para 50% das células) para AFLA foi de 30 μ M, para OTA foi de 35 μ M e para AFLA + OTA foi de 27 μ M, e a interação foi classificada como aditiva. Também foram realizados experimentos para determinar a genotoxicidade de AFLA + OTA a partir da análise quantitativa de fragmentação de DNA. Para este experimento foram utilizadas quantidades crescentes de AFLA ou OTA (de 0 a 40 μ M). AFLA induziu um aumento significativo nos níveis de ácido desoxirribonucleico (DNA) fragmentado, variando de 3,0% a 78,5%. OTA também induziu a fragmentação do DNA com níveis variando de 5,0% a 52,6%. Para avaliar o efeito combinado das duas micotoxinas, OTA foi adicionada em uma concentração fixa de 1 μ M, a uma concentração variável de AFLA (1, 5, 10 ou 20 μ M), a

fragmentação de DNA foi de 35%, 58%, 70% e 81%, respectivamente, para cada concentração de AFLA. Além disso, também foi testada uma concentração fixa de AFLA (1 μM) e concentrações variáveis de OTA (1, 5, 10 e 20 μM), neste caso os níveis de fragmentação observados foram de 29%, 29%, 38% e 52% respectivamente para as doses crescentes de OTA (Apêndice B) (EL GOLLI-BENNOUR et al., 2010).

Corcuera et al. (2011) também realizaram ensaios para avaliar a genotoxicidade das micotoxinas, foi utilizada a linhagem HepG₂ (carcinoma hepatocelular humano), porém os resultados obtidos estão em discordância com os encontrados por El Golli-Bennour et al. (2010). Foi observada uma diminuição significativa nos danos ao DNA quando AFLA (1,2 a 150 μM) e OTA (50 μM) foram utilizadas em combinação quando comparado às toxinas isoladas, levando a uma interação antagônica. Os autores sugerem que esta diminuição da genotoxicidade está relacionada às enzimas do citocromo P450 (CYP), estas enzimas estão relacionadas com o metabolismo de toxinas, e segundo os autores pode ser que AFLA e OTA competem pelas mesmas enzimas CYP, que fazem parte da rota de ativação de AFLA. Se a afinidade de OTA pelas CYPs for grande, ela ocuparia estas moléculas impedindo a ligação de AFLA, conseqüentemente haveria menos moléculas de AFLA bioativas para atacar e danificar o DNA, porém mais experimentos precisam ser feitos para conformar esta hipótese (Apêndice B) (CORCUERA et al., 2011).

Interações entre aflatoxinas e T-2 toxina

McKean et al. (2006b) avaliaram a interação entre AFLA e T-2 em células das linhagens HepG₂ (carcinoma hepatocelular humano) e BEAS-2B (células epiteliais brônquicas humanas). As concentrações de AFLA + T-2 testadas na linhagem HepG₂ foram: 750 + 735 μM , 500 + 490 μM , 375 + 368 μM , 250 + 245 μM e 125 + 123 μM . A administração de AFLA + T-2 nesta linhagem resultou em uma viabilidade celular de 46,25% no grupo que recebeu a dose mais alta (750 + 735 μM) e 68,72% no grupo que recebeu 125 + 123 μM , e a interação foi classificada como aditiva nestas células. Já nas células BEAS-2B as concentrações testadas foram 100 μM de AFLA + 24, 16, 12, 8, 4 ou 2 μM de T-2. Nestas células a viabilidade celular variou de 20,44% no grupo que recebeu 100 + 24 μM a 61,57% no grupo que recebeu a menor dose (100 + 2 μM), sendo nesta linhagem a interação classificada como sinérgica. Este resultado é bastante interessante pois AFLA não foi citotóxica sozinha nesta linhagem, e mesmo na maior dose testada (100 μM) a viabilidade celular ainda foi de aproximadamente 90%, no entanto, AFLA potencializou a citotoxicidade de T-2 em BEAS-2B (Apêndice B) (MCKEAN et al., 2006b).

Interações entre aflatoxinas e deoxinivalenol

He et al. (2010) avaliaram os efeitos da combinação de AFLA e DON em hepatócitos primários de carpa (*Cyprinus carpio*). Com relação à citotoxicidade, células tratadas com 0,02 µg/ml de AFLA + 0,5 µg/ml de DON apresentaram taxa de inibição celular de 87,67%. Também foram testados a atividade enzimática de AST, ALT e lactato desidrogenase (LDH), foi observado que após quatro horas de exposição às micotoxinas a atividade enzimática de todas as células que receberam AFLA + OTA estava aumentada com relação ao controle sem micotoxinas, isto ocorreu pois AST, ALT e LDH são secretados quando ocorre morte celular. Os resultados indicam que a ingestão combinada destas micotoxinas leva a um aumento dos efeitos adversos observados, e a interação entre AFLA e DON foi classificada como aditiva (Apêndice B) (HE et al., 2010).

Células de fígado de rato (BRL 3A) foram utilizadas por Sun et al. (2015) para avaliar a viabilidade celular. Foi observado que AFLA e DON interagem de forma sinérgica na redução da viabilidade celular após 12, 24 e 48 horas de tratamento, para este experimento foram utilizados 29 µM de AFLA + 3 µM de DON. Além disso, os mecanismos de citotoxicidade também foram avaliados e foi observado que as toxinas diminuíram a viabilidade das células induzindo a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e promovendo apoptose nas células BRL 3A. Este efeito foi mediado por uma regulação positiva dos genes apoptóticos Hsp70, p53, Bax, Caspase-3 e Caspase-8, juntamente com uma regulação negativa do gene antiapoptótico Bcl-2. O tratamento combinado de AFLA e DON exibiu maiores efeitos sobre esses genes do que aqueles dos tratamentos individuais, o que foi interpretado como um efeito sinérgico (Apêndice B) (SUN et al., 2015).

Interações entre aflatoxinas e zearalenona

Sun et al. (2015) realizaram experimento em células de fígado de rato (BRL 3A) e observaram interação sinérgica na diminuição da viabilidade celular entre AFLA e ZEA após 48 horas de exposição quando as células foram tratadas com 29 µM de AFLA + 92 µM de ZEA (Apêndice B) (SUN et al., 2015).

Interação sinérgica também foi descrita para a viabilidade celular em células de rim de porco (PK-15). As células foram tratadas com diversas concentrações de AFLA (de 20 a 34 µM) + ZEA (de 71 a 99 µM) e a viabilidade das células PK-15 foi reduzida pela presença das

duas micotoxinas em conjunto. A produção de ROS também foi avaliada e foi observado que diferentes doses de ZEA (10, 20 e 40 μM) reduzem a produção de ROS induzida por 1 μM de AFLA de forma antagonista, no entanto, 10 μM de ZEA aumenta o dano oxidativo causado por 5 e 10 μM de AFLA, resultando em interação sinérgica. A indução de apoptose também foi avaliada, 10 e 20 μM de ZEA reduzem a apoptose induzida por 1 μM de AFLA, no entanto, 40 μM ZEA + 1 μM AFLA tem efeito aditivo na indução de apoptose (Apêndice B) (LEI; ZHANG; QI, 2013).

Interações entre deoxinivalenol e T-2 toxina

Thuvander, Wikman e Gadhasson (1999), realizaram estudo da toxicidade de DON + T-2 na proliferação de linfócitos humanos. As células foram tratadas com 25 μM de DON + 1000 μM de T-2. A combinação de DON e T-2 resultou em uma diminuição da toxicidade causada pelas toxinas separadamente, e a interação foi classificada como antagonista. Uma possível explicação para esta interação é que DON impede a ação de T-2 ao interagir com sítios de ligação comuns nas membranas celulares, reduzindo, desta forma, a toxicidade de T-2 e levando ao efeito antagonista observado (Apêndice B) (THUVANDER; WIKMAN; GADHASSON, 1999).

Interações antagonistas também foram descritas para a citotoxicidade em células de rim de macaco (Vero) e em células de ovário de hamster imortalizadas (CHO-K1). Nestes estudos as concentrações correspondentes ao IC_{50} , IC_{75} e IC_{90} foram testadas após 24, 48 e 72 horas de exposição. Nas células da linhagem Vero todas as concentrações e tempos de exposição resultaram em interações antagonistas, já nas células CHO-K1 a interação foi antagonista após 24 e 48 horas e sinérgica após 72 horas (Apêndice B) (RUIZ et al., 2011a, RUIZ et al., 2011b).

Interações entre deoxinivalenol e zearalenona

Malekinejad et al. (2007) realizaram experimento em oócitos de porco e avaliaram os efeitos de DON + ZEA nestas células. Foi observado que o tratamento com DON + ZEA (0,156 μM de cada) resultou em uma maior porcentagem de oócitos com morfologia nuclear aberrante do que nos grupos controle e grupos tratados com as micotoxinas separadamente. Além disso, os oócitos que foram expostos a DON + ZEA (1,56 μM de cada) durante a maturação foram fertilizados, e os blastocistos em desenvolvimento foram analisados quanto à ploidia. Estes blastocistos exibiram menos células com ploidia normal, e uma proporção significativa destas

células continham mais de duas cópias dos cromossomos 7 ou 14, com algumas contendo de 9 a 11 cópias destes cromossomos. Isto ocorreu, pois, DON e ZEA alteram a formação do fuso durante a meiose dos oócitos, e a malformação do fuso leva a embriões aneuploides. Os autores concluem que as interações observadas são aditivas (Apêndice B) (MALEKINEJAD et al., 2007).

Interações entre ocratoxina A e fumonisinas

Creppy et al. (2004) realizaram um estudo de viabilidade celular e observaram interação sinérgica entre OTA e FUMO nas linhagens celulares estudadas. Em células de glioma de cérebro de rato (C6 glioma) OTA (10 μ M) + FUMO (5 a 50 μ M) levaram a uma diminuição da viabilidade celular que variou de 53-55%, sendo que a redução da viabilidade causada por OTA foi de 18% e por FUMO variou de 10% a 24% dependendo da dose utilizada. A combinação também foi testada em células de rim de macaco (Vero), nestas células 50 μ M de FUMO e 10 μ M de OTA individualmente causaram uma diminuição de viabilidade de 5,4% e 50% respectivamente, porém quando a combinação de OTA + FUMO foi utilizada a diminuição da viabilidade ficou em 86%. Com este experimento os autores comprovam a existência de interação entre estas micotoxinas, e destacam que o sinergismo observado está provavelmente relacionado à capacidade de ambas as toxinas em produzir espécies reativas de oxigênio. Os autores também ressaltam que experimentos ainda precisam ser feitos para verificar se estes dados se reproduzem em modelos *in vivo* (Apêndice B) (CREPPY et al., 2004).

Já Clarke et al. (2014) observaram interação aditiva para a citotoxicidade de OTA + FUMO. Os experimentos foram realizados em células de rim bovino (MDBK), e a combinação de 2 μ g/ml de OTA + 8 μ g/ml de FUMO levou a uma redução da viabilidade celular de 25% (Apêndice B) (CLARKE et al., 2014).

Interações entre ocratoxina A e zearalenona

Wang et al. (2014) avaliaram a citotoxicidade de OTA e ZEA em células da linhagem HepG₂ (carcinoma hepatocelular humano). Os valores de IC₅₀ para OTA, ZEA e OTA + ZEA foram determinados após 24, 48 e 72 horas de exposição e a interação foi classificada como antagonista em todos os tempos, porém os mecanismos envolvidos na interação entre estas toxinas ainda não está esclarecido (Apêndice B) (WANG et al., 2014).

Interações entre zearalenona e T-2 toxina

Bouaziz et al. (2013) avaliaram a citotoxicidade de ZEA e T-2 em células de rim de macaco (Vero). Foram testadas concentrações variando de 5 a 100 nM de ZEA e T-2 para a determinação do IC₅₀ de cada uma das micotoxinas separadamente. Para T-2 o valor de IC₅₀ encontrado foi de 60 nM, para ZEA nem a concentração mais alta causou a inibição de 50% das células, e o valor de IC₅₀ não foi determinado. Para a combinação de ZEA + T-2 o valor de IC₅₀ encontrado foi de 20 nM, portanto, a combinação das duas toxinas levou a um aumento da citotoxicidade em comparação com os efeitos individuais, e a interação foi classificada como sinérgica (Apêndice B) (BOUAZIZ et al., 2013).

O dano oxidativo causado pelas toxinas pode ser um dos mecanismos envolvidos nas lesões e morte celular, e por esta razão os autores também avaliaram a produção de espécies reativas de oxigênio e os níveis da proteína Hsp 70. Com relação às espécies reativas de oxigênio, seus níveis foram aumentados cerca de quatro vezes no tratamento combinado, enquanto nos tratamentos individuais o aumento foi de aproximadamente 1,5 vezes. Os níveis da proteína Hsp 70 também foram medidos pois a liberação desta proteína é uma das principais respostas à exposição das células a substâncias tóxicas, foi observado que o tratamento das células com 10nM de cada uma das toxinas resultou em um aumento significativo dos níveis de Hsp 70. Ambas as interações foram descritas como sinérgicas (Apêndice B) (BOUAZIZ et al., 2013).

3.7 Impacto Econômico

Como citado anteriormente, o comércio internacional de *commodities* agrícolas atinge centenas de milhões de toneladas por ano, e estima-se que aproximadamente 25% a 50% destas *commodities*, principalmente os alimentos básicos, estejam de alguma forma contaminados com micotoxinas, sendo grande o impacto que estas apresentam sobre a saúde humana e animal, além de representarem uma grande perda econômica (BHAT; MILLER, 1991; MORETTI; LOGRIECO; SUSCA, 2017).

O impacto econômico global das micotoxinas na agropecuária é algo difícil de ser mensurado, uma vez que envolve gastos com a perda de animais, cuidados veterinários, redução da produtividade dos plantéis e diminuição da oferta de grãos. Para os países em desenvolvimento, onde geralmente as *commodities* representam uma grande parte das exportações nacionais, a importância econômica das micotoxinas é considerável, uma vez que

esta contaminação é a principal causa, por exemplo, da rejeição das *commodities* alimentares por autoridades internacionais. Além disso, o impacto das perdas de exportação é agravado pelo fato desses países serem forçados a exportar as *commodities* de mais alta qualidade e reter os grãos mais pobres para uso doméstico, muitas vezes com alto risco de exposição à contaminação por micotoxinas (CAST, 2003; MORETTI; LOGRIECO; SUSCA, 2017; SOARES et al., 2018).

Por ser algo difícil de ser mensurado, as análises de perdas econômicas geradas pela contaminação por micotoxinas têm sido feitas de forma individualizada para cada cadeia envolvida. O FDA (*U.S. Food and Drug Administration*), estima que as perdas anuais nos Estados Unidos nas safras de milho, soja e amendoim cheguem a US\$932 milhões e outros US\$500 milhões são investidos em pesquisas e no monitoramento desses metabólitos fúngicos, resultando em uma perda total de aproximadamente US\$1,5 bilhão anualmente. Já em um estudo realizado por Mitchell e colaboradores (2016), foi estimado que a contaminação por aflatoxinas poderia causar um prejuízo à indústria de milho na faixa de US\$ 52 milhões a US\$ 1,7 bilhão anualmente somente aos EUA, ressaltando a importância do monitoramento e de medidas de prevenção e controle de micotoxinas para evitar prejuízos decorrentes da contaminação (CAST, 2003; MITCHELL; BOWERS; HURBURGH, 2016).

3.8 Legislações

Diversos países possuem legislações que estabelecem limites máximos tolerados (LMT) para diversas micotoxinas, estes limites estimam a quantidade de uma determinada micotoxina que uma espécie pode ser exposta sem representar um risco significativo para a sua saúde. Estas legislações visam controlar a contaminação dos alimentos e rações e reduzir as perdas econômicas resultantes da contaminação (MORETTI; LOGRIECO; SUSCA, 2017; SOARES et al., 2018).

O Brasil não possui regulamentação para micotoxinas em alimentação animal, e por isso a legislação da União Europeia é muito utilizada como parâmetro, por ser bastante completa. As micotoxinas legisladas pela União Europeia são aflatoxina B₁, deoxinivalenol, fumonisinas B₁ + B₂, ocratoxina A, T-2 toxina e zearalenona, e um resumo dos LMT estabelecidos nesta legislação está na Tabela 2 (EU, 2003; EU, 2006b; EU, 2013; MORETTI; LOGRIECO; SUSCA, 2017; SOARES et al., 2018).

Tabela 2 - Resumo dos limites máximos tolerados (LMT) estabelecidos pela legislação da União Europeia para aflatoxina B₁, deoxinivalenol, fumonisinas B₁ + B₂, ocratoxina A, T-2 toxina e zearalenona na alimentação animal.

continua

Micotoxina	Produto destinado à alimentação animal	Teor máximo em µg/kg (ppb) de alimento para um teor de umidade de 12%
Aflatoxina B ₁	Todas as matérias-primas para a alimentação animal	20
	Alimentos completos para bovinos, ovinos e caprinos, com exceção de:	20
	— Alimentos completos para gado leiteiro	5
	— Alimentos completos para ovinos e caprinos jovens	10
	Alimentos completos para suínos e aves (exceto animais jovens)	20
	Outros alimentos completos	10
	Alimentos complementares para bovinos, ovinos e caprinos (exceto alimentos complementares para animais jovens)	20
	Alimentos complementares para suínos e aves (exceto animais jovens)	20
Deoxinivalenol	Outros alimentos complementares	5
	Matérias-primas para alimentação animal:	
	— Cereais e produtos à base de cereais com exceção de subprodutos de milho	8.000
	— Subprodutos de milho	12.000

Tabela 2 - Resumo dos limites máximos tolerados (LMT) estabelecidos pela legislação da União Europeia para aflatoxina B₁, deoxinivalenol, fumonisinas B₁ + B₂, ocratoxina A, T-2 toxina e zearalenona na alimentação animal.

continuação

Micotoxina	Produto destinado à alimentação animal	Teor máximo em µg/kg (ppb) de alimento para um teor de umidade de 12%
Deoxinivalenol	Alimentos complementares e alimentos completos para animais, com exceção de:	5.000
	— Alimentos complementares e alimentos completos para suínos	900
	— Alimentos complementares e alimentos completos para bezerros(as) (< 4 meses), ovinos e caprinos jovens	2.000
Fumonisinas B ₁ + B ₂	Matérias-primas para alimentação animal: — Milho e produtos à base de milho	60.000
	Alimentos complementares e alimentos completos para: — Suínos, equídeos, coelhos, animais de companhia	5.000
	— Peixes	10.000
	— Aves, bezerros(as) (< 4 meses), ovinos e caprinos jovens — Ruminantes (> 4 meses) e martas	20.000 50.000
Ocratoxina A	Matérias-primas para alimentação animal: — Cereais e produtos à base de cereais	250
	Alimentos complementares e alimentos completos para animais: — Alimentos complementares e alimentos completos para suínos	50

Tabela 2 - Resumo dos limites máximos tolerados (LMT) estabelecidos pela legislação da União Europeia para aflatoxina B₁, deoxinivalenol, fumonisinas B₁ + B₂, ocratoxina A, T-2 toxina e zearalenona na alimentação animal. Fonte: EU, 2003; EU, 2006b; EU, 2013.

conclusão

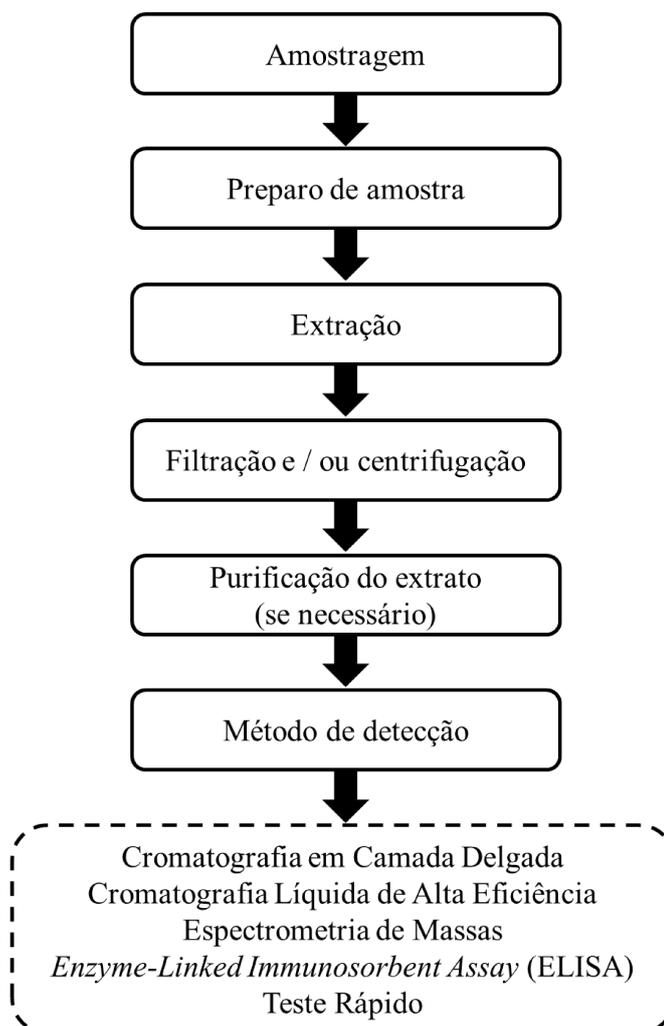
Micotoxina	Produto destinado à alimentação animal	Teor máximo em µg/kg (ppb) de alimento para um teor de umidade de 12%
Ocratoxina A	— Alimentos complementares e alimentos completos para aves	100
T-2 toxina	Produtos à base de cereais para a alimentação animal e alimentos compostos para animais:	
	— Produtos da moagem da aveia (cascas)	2.000
	— Outros produtos à base de cereais	500
	— Alimentos compostos para animais, com exceção de alimentos para gatos	250
Zearalenona	Matérias-primas para alimentação animal:	
	— Cereais e produtos à base de cereais com exceção dos subprodutos de milho	2.000
	— Subprodutos de milho	3.000
	Alimentos complementares e alimentos completos para animais:	
	— Alimentos complementares e alimentos completos para suínos jovens	100
	— Alimentos complementares e alimentos completos para suínos de engorda	250
	— Alimentos complementares e alimentos completos para bezerros(as), gado de leite, ovinos (incluindo animais jovens), caprinos (incluindo animais jovens)	500

Fonte: Adaptado de EU, 2003; EU, 2006; EU, 2013.

3.9 Análise de Micotoxinas em Amostras de Alimentos

A análise dos níveis de micotoxinas em amostras de alimentos é muito importante para determinar se o alimento é seguro para consumo ou não. Esta determinação é geralmente realizada por métodos que incluem etapas comuns (Figura 12), sendo elas: amostragem, preparo de amostra, extração, filtração e / ou centrifugação, purificação do extrato (se necessário) e, por fim, a detecção e quantificação das micotoxinas, que pode ser realizada por diversas técnicas. A escolha dos métodos de amostragem, extração, purificação e determinação analítica a serem utilizados são de extrema importância, uma vez que cada uma destas etapas pode afetar a confiabilidade do resultado analítico (ALSHANNAQ; YU, 2017; MORETTI; LOGRIECO; SUSCA, 2017; SOARES et al., 2018).

Figura 12 - Diagrama de fluxo das etapas comuns envolvidas na análise de micotoxinas em alimentos.



Fonte: Adaptado de ALSHANNAQ e YU (2017)

A primeira etapa para a análise de micotoxinas é a amostragem, esta etapa é fundamental e contribui para a confiabilidade dos resultados e a decisão final de conformidade ou não conformidade de um lote inteiro de alimentos. Devido à distribuição heterogênea das micotoxinas nos alimentos, é muito difícil obter uma amostra representativa do todo, por isso, um plano de amostragem bem projetado deve ser implementado para garantir que a amostra testada seja representativa de todo o volume assim como a veracidade dos resultados. Se a concentração da amostra não refletir com precisão a concentração do lote, o lote inteiro pode ser classificado incorretamente levando a consequências econômicas e / ou de saúde (RICHARD et al., 1993; KRŠKA et al., 2008; TURNER et al., 2015; SHEPHARD, 2016; ALSHANNAQ; YU, 2017; SOARES et al., 2018).

Os próximos passos são o preparo da amostra, que inclui moagem e homogeneização, seguida da extração. O principal objetivo da extração é separar as micotoxinas da matriz (alimento), o que pode ser feito utilizando diversos métodos. A escolha de um método de extração leva em consideração três fatores principais: as propriedades químicas das micotoxinas, a natureza da matriz alimentar e o método de detecção que será usado posteriormente. De forma geral, as micotoxinas são solúveis em solventes orgânicos (como metanol e acetonitrila) e uma mistura de um solvente orgânico com água ou solução tampão é geralmente utilizada para realizar a extração. A escolha dos solventes contribui significativamente para o sucesso da extração, sendo um solvente de extração adequado aquele que remove apenas as micotoxinas da amostra com a maior eficiência. A amostra deve ser misturada com o solvente de extração escolhido em agitador orbital ou liquidificador, em seguida, a mistura deve ser filtrada e / ou centrifugada (para remover partículas interferentes) e estará pronta para procedimentos de purificação subsequentes, se necessário (RAHMANI; JINAP; SOLEIMANY, 2009; TURNER; SUBRAHMANYAM; PILETSKY, 2009; RIDGWAY, 2012; ALSHANNAQ; YU, 2017; AGRIOPOULOU; STAMATELOPOULOU; VARZAKAS, 2020).

A purificação do extrato é um processo para a eliminação de substâncias que podem interferir na detecção das micotoxinas. Existem diversos métodos de purificação, sendo a extração em fase sólida (SPE) e as colunas de imunoafinidade (IAC) os mais utilizados para a análise de micotoxinas, pois são rápidos, eficientes, reprodutíveis e seguros. SPE é uma técnica baseada na partição de analitos e compostos interferentes entre uma fase móvel (extrato) e uma fase estacionária (cartucho), ou seja, a coluna de SPE retém a micotoxina e permite que as impurezas passem pela coluna, em seguida a micotoxina é eluída utilizando um solvente orgânico, ou, de forma contrária, a micotoxina passa livremente pelo cartucho, enquanto os

interferentes ficam retidos. Uma coluna de SPE muito utilizada é a MycoSep[®], que foi desenvolvida especialmente para a purificação de extratos e contém uma variedade de adsorventes, por exemplo, carvão, celite, polímeros, resinas de troca iônica, entre outros. O material adsorvente é embalado em um tubo de plástico com uma borda de borracha na extremidade inferior. Para a purificação a coluna é inserida em um tubo de vidro que contém o extrato, a borracha veda o tubo e faz com que o extrato passe pelo material adsorvente embalado na coluna. O processo demora de 20 a 30 segundos e o extrato purificado fica no topo do tubo de plástico, enquanto moléculas grandes, proteínas, gorduras, carboidratos e pigmentos são adsorvidos na fase sólida (Figura 13) (KRSKA et al., 2005; KRSKA et al., 2008; RAHMANI; JINAP; SOLEIMANY, 2009; TURNER; SUBRAHMANYAM; PILETSKY, 2009; PEREIRA; FERNANDES; CUNHA, 2014; ALSHANNAQ; YU, 2017; SOARES et al., 2018).

Figura 13 - Exemplo de uma coluna MycoSep[®].



Fonte: Arquivo pessoal (2020)

Já nas colunas de imunoafinidade (IAC) a fase estacionária contém anticorpos específicos contra determinada micotoxina, por isso, quando o extrato passa pela coluna, a micotoxina se liga seletivamente aos anticorpos, enquanto outros componentes da matriz são removidos por uma etapa de lavagem. A micotoxina é então eluída com um solvente orgânico (KRSKA et al., 2008; RAHMANI; JINAP; SOLEIMANY, 2009; TURNER;

SUBRAHMANYAM; PILETSKY, 2009; PEREIRA; FERNANDES; CUNHA, 2014; ALSHANNAQ; YU, 2017).

Por fim, o extrato pode ser testado quanto a presença de micotoxinas utilizando diversos métodos analíticos que serão descritos a seguir.

3.10 Métodos de Detecção e / ou Quantificação de Micotoxinas

A vigilância de alimentos quanto a contaminação por micotoxinas, visando a segurança dos alimentos, vem se tornando cada vez mais comum, uma vez que os métodos analíticos para detectar e quantificar estas toxinas estão se tornando bastante difundidos (RAHMANI; JINAP; SOLEIMANY, 2009; TURNER; SUBRAHMANYAM; PILETSKY, 2009).

Devido aos baixos níveis em que as micotoxinas geralmente estão presentes nos alimentos, bem como diretrizes restritivas sobre os limites máximos tolerados estabelecidos por diversos países, um método de análise de micotoxinas deve ser simples, rápido, robusto, preciso, seletivo e sensível. A detecção das micotoxinas de interesse pode ser realizada por técnicas cromatográficas seguidas por vários métodos de detecção ou por métodos imunoquímicos. Enquanto os métodos imunoquímicos dependem de anticorpos específicos para cada micotoxina, as técnicas cromatográficas podem separar um grande número de analitos de uma só vez (RAHMANI; JINAP; SOLEIMANY, 2009; TURNER; SUBRAHMANYAM; PILETSKY, 2009; PEREIRA; FERNANDES; CUNHA, 2014; AGRIOPOULOU; STAMATELOPOULOU; VARZAKAS, 2020).

Os principais métodos utilizados para a detecção e quantificação de micotoxinas serão descritos a seguir:

3.10.1 Cromatografia em camada delgada

A cromatografia em camada delgada (CCD ou *Thin Layer Chromatography* - TLC) é considerada a técnica cromatográfica mais antiga. É uma técnica de baixo custo, que ainda é bastante utilizada em alguns laboratórios analíticos, principalmente em países em desenvolvimento. A CCD oferece a possibilidade de testar várias amostras simultaneamente, sendo muito utilizada como um teste de triagem anterior a realização de outros métodos mais sofisticados, porém esta técnica não é muito precisa ou sensível (LIN et al., 1998; SHEPHARD, 2008; TURNER; SUBRAHMANYAM; PILETSKY, 2009; AGRIOPOULOU; STAMATELOPOULOU; VARZAKAS, 2020).

A CCD consiste em uma fase estacionária (como sílica, alumina ou celulose) imobilizada em uma placa de vidro, plástico ou alumínio e uma fase móvel. O extrato da amostra e padrões são depositados cada um em um ponto da fase estacionária. Em seguida a placa é colocada verticalmente em uma cuba com solventes, estes solventes, então, migram pela placa por capilaridade. Por fim, quando os solventes atingem a borda superior da placa esta é removida da cuba e as bandas resultantes são observadas, a formação de bandas em alturas diferentes da fase estacionária se dá devido a migração diferencial das moléculas ao longo da fase estacionária. Os constituintes da amostra podem ser identificados a partir da comparação das bandas resultantes das amostras com as bandas dos padrões utilizados. A quantificação de micotoxinas por CCD se dá por comparação visual das intensidades das bandas dos padrões (com concentração conhecida) com as bandas das amostras (com concentrações desconhecidas) (SHEPHARD, 2008; RAHMANI; JINAP; SOLEIMANY, 2009).

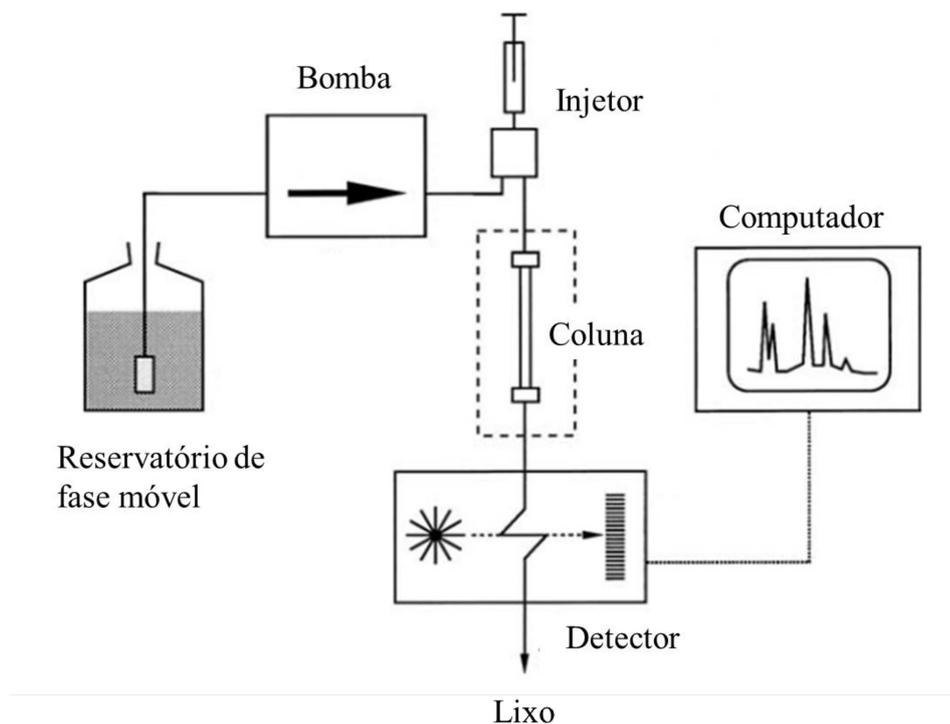
3.10.2 Cromatografia líquida de alta eficiência

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE ou *High-performance liquid chromatography* - HPLC) vem sendo utilizada desde o final dos anos 1960. Este método se baseia em uma fase estacionária (coluna) e uma fase móvel (solventes que circulam pelo sistema), e a separação de compostos de uma amostra se dá pela afinidade diferencial das moléculas pelas fases móvel e estacionária. Um sistema de HPLC simples necessita dos seguintes componentes para funcionar: um reservatório de fase móvel; uma bomba que faz com que a fase móvel se movimente pelo sistema; um injetor para introduzir as amostras no sistema; uma coluna (fase estacionária); um ou mais detectores; um lixo para o descarte da fase móvel que sai dos detectores; e um computador para a análise dos dados e cromatogramas (Figura 14) (MEYER, 2010; SINGH; MEHTA, 2020)

De forma geral, a bomba faz com que a fase móvel circule pelo sistema com um fluxo determinado (ml/min); após a introdução da amostra no sistema pelo injetor, ela passa a circular junto com a fase móvel. Ao chegar na coluna os componentes da amostra são separados e passam para o detector, que contém uma célula que detecta cada composto da amostra e envia seu sinal elétrico correspondente para um sistema de aquisição de dados no computador. Como resultado é gerado um cromatograma, que é uma representação da separação que ocorreu quimicamente na coluna do HPLC. No cromatograma são observadas uma série de picos subindo a partir de uma linha de base desenhada em um eixo de tempo, onde cada pico representa a resposta do detector à um composto diferente. Por fim, os compostos podem ser

identificados a partir da comparação dos tempos de retenção (tempo que o composto demora para passar pela coluna e chegar ao detector) dos picos desconhecidos obtidos na amostra, com o tempo de retenção de padrões de substâncias conhecidas. Esta técnica possibilita a utilização de diversos detectores, sendo os mais utilizados o ultravioleta (UV) e de fluorescência (FLD). Os detectores UV são usados para identificar os analitos a partir da absorção de luz da amostra em diferentes comprimentos de onda. No caso dos detectores de fluorescência, a identificação dos analitos depende da ocorrência de um cromóforo nas partículas. Diversas toxinas possuem fluorescência natural (como por exemplo as aflatoxinas e a ocratoxina A) e podem ser detectadas diretamente por HPLC-FLD. No entanto, para outros tipos de micotoxinas (como as fumonisinas), a derivatização é uma etapa obrigatória, pois estas toxinas não possuem cromóforos em sua estrutura química (VAIL; HOMANN, 1990; MEYER, 2010; MA et al., 2013; SINGH; MEHTA, 2020; AGRIOPOULOU; STAMATELOPOULOU; VARZAKAS, 2020).

Figura 14 - Componentes de um sistema de HPLC simples.



Fonte: Adaptado de MEYER (2010)

3.10.3 Espectrometria de massas

A espectrometria de massas é uma técnica analítica que ioniza as espécies químicas presentes em uma amostra e separa os íons de acordo com sua relação massa / carga. Para a detecção de micotoxinas pode-se utilizar a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS) ou a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS) (SINGH; MEHTA, 2020).

A técnica de Cromatografia Líquida associada à Espectrometria de Massas (LC-MS) possibilita análises de múltiplos resíduos em um mesmo método, em pequenas concentrações (ppb), apresentando alta seletividade e sensibilidade, além de baixo tempo de análise. Em comparação com as técnicas de detecção convencionais, como UV ou fluorescência, a espectrometria de massas oferece maior seletividade e sensibilidade, sendo possível a detecção de quantidades traço de micotoxinas. Esta técnica possibilita a confirmação inequívoca da identidade molecular do analito, além de possuir a opção de uso de padrões internos (KRSKA et al., 2008).

Já na cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS) é realizada a detecção de compostos voláteis, após um processo de separação destes compostos. Este método é pouco utilizado para a análise de micotoxinas, pois a maioria das micotoxinas são substâncias não voláteis, sendo necessária uma etapa de derivatização para sua conversão em derivados voláteis. Porém, quando utilizada, a técnica tem alta especificidade e sensibilidade. Os principais problemas associados à análise de micotoxinas por GC-MS são a não linearidade das curvas de calibração, a possibilidade de remanescência de amostras anteriores, bloqueio da coluna e o risco de contaminação em comparação com os métodos de HPLC e LC-MS (PEREIRA; FERNANDES; CUNHA, 2014; ALSHANNAQ; YU, 2017; AGRIOPOULOU; STAMATELOPOULOU; VARZAKAS, 2020; SINGH; MEHTA, 2020).

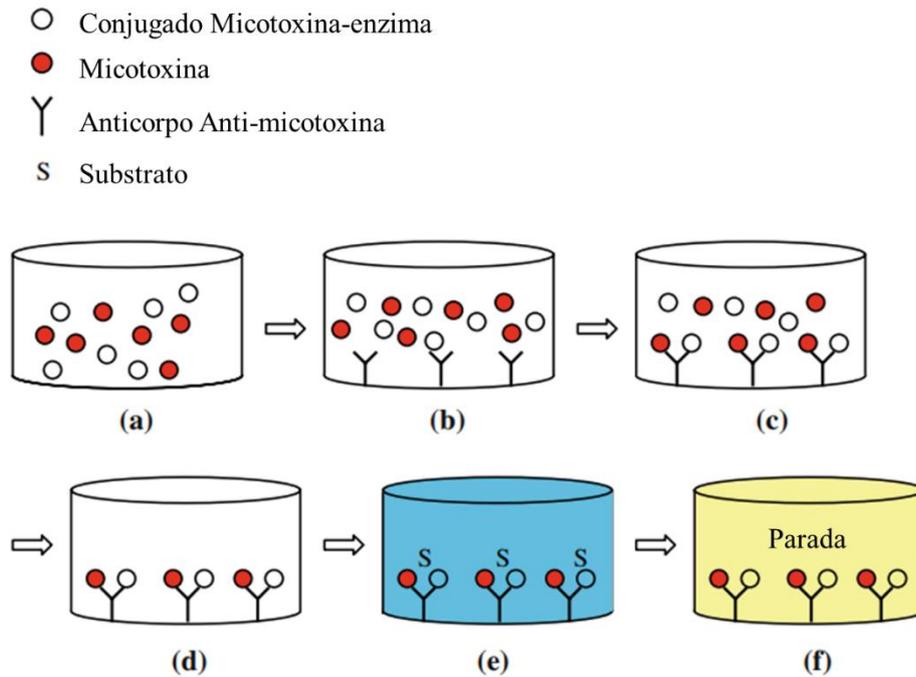
Em geral, GC-MS e LC-MS são comumente aceitos como ferramentas de confirmação de analitos sendo altamente confiáveis na análise de resíduos. No entanto, essas técnicas também apresentam algumas desvantagens: devido à complexidade e diversidade das amostras de alimentos, efeitos de matriz são bastante observados; esforços extensivos de validação são necessários; e, além disso, as técnicas baseadas em cromatografia também requerem longos tempos de execução, instrumentos caros e técnicos qualificados, resultando em altos custos de análise (RIVIER, 2003; ZÖLLNER; MAYER-HELM, 2006; SOARES et al., 2018).

3.10.4 *Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)*

O método de ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) para análise de micotoxinas está disponível há mais de uma década, e atualmente, é o imunoensaio mais comumente utilizado na determinação de micotoxinas. ELISA é uma técnica imunoquímica considerada de rápida e fácil execução e que não demanda um preparo de amostras laborioso, por estas razões, é muito utilizada para a detecção e quantificação de micotoxinas em diversas matrizes. Nesse sentido, já se encontram no mercado diversos kits de ELISA específicos para várias micotoxinas. A tecnologia é baseada na capacidade de um anticorpo específico de distinguir a estrutura tridimensional de uma micotoxina específica (ZHENG; RICHARD; BINDER, 2006; KRŠKA et al., 2008; IQBAL et al., 2014; PEREIRA; FERNANDES; CUNHA, 2014; ALSHANNAQ; YU, 2017; SINGH; MEHTA, 2020).

Existem diversos tipos de ELISA, porém o mais utilizado para a análise de micotoxinas é o ELISA competitivo direto. Para a realização do teste de ELISA, primeiramente, as micotoxinas precisam ser extraídas da amostra utilizando solventes, então uma porção deste extrato da amostra e um conjugado da micotoxina a ser pesquisada acoplada à uma enzima são misturados e, em seguida, adicionados aos poços de microtitulação revestidos com anticorpo. Qualquer micotoxina no extrato da amostra ou nos padrões de controle pode competir com a micotoxina conjugada com enzima pelos sítios de ligação do anticorpo. Após a lavagem, um substrato enzimático é adicionado e a cor azul se desenvolve. A intensidade da cor é inversamente proporcional à concentração de micotoxinas na amostra ou padrão. Uma solução de parada é então adicionada para interromper a reação enzimática. A intensidade da cor da solução nos poços de microtitulação é medida opticamente usando um leitor de ELISA. As densidades ópticas (OD) das amostras são comparadas com as OD dos padrões possibilitando uma interpretação quantitativa dos resultados. O princípio de um ELISA competitivo direto é mostrado na Figura 15 (ZHENG; RICHARD; BINDER, 2006; SOARES et al., 2018; NOLAN et al., 2019).

Figura 15 - Princípio do ELISA competitivo para análise de micotoxinas. (a) Amostra misturada com conjugado; (b) Conteúdo misto adicionado ao poço revestido com anticorpo; (c) A micotoxina se liga ao anticorpo na 1ª incubação; (d) Os materiais não ligados são lavados na etapa de lavagem; (e) Substrato é adicionado para desenvolver cor; (f) Solução de parada é adicionada para parar a reação.



Fonte: Adaptado de ZHENG et al. (2006)

Os kits ELISA são considerados ensaios de alto rendimento, que utilizam pequeno volume de amostra e frequentemente necessitam de menos procedimentos de purificação dos extratos em comparação com outros métodos convencionais, como CCD e HPLC. Além disso, o método de ELISA pode ser totalmente quantitativo, é rápido, simples, específico e sensível podendo ser utilizado para a detecção de micotoxinas em diversos alimentos e rações (ZHENG; RICHARD; BINDER, 2006; KRŠKA et al., 2008).

Uma desvantagem da utilização do ELISA é que alguns compostos com grupos químicos semelhantes à micotoxina pesquisada também podem interagir com os anticorpos anti-micotoxina, causando o chamado efeito matriz, resultando em uma superestimação das concentrações de micotoxinas em amostras de rações e *commodities*. Porém métodos de purificação dos extratos podem ser utilizados para evitar estas reações cruzadas e resultados falso positivos (ZHENG; RICHARD; BINDER, 2006; ZACHARIASOVA; CUHRA; HAJŠLOVA, 2014; NOLAN et al., 2019).

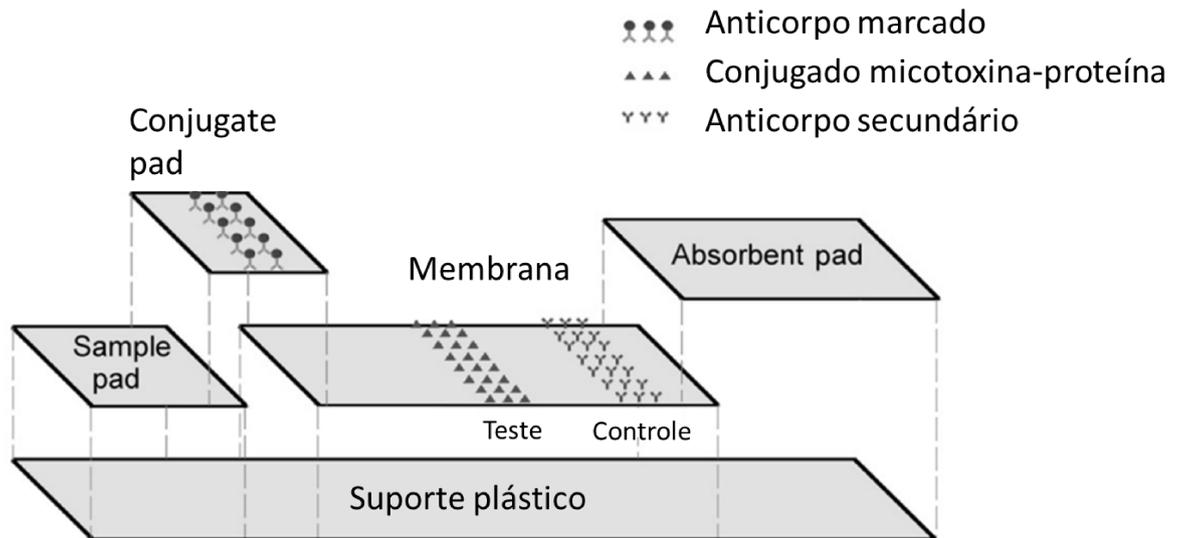
3.10.5 Teste rápido

A tecnologia do teste imunocromatográfico rápido, também chamado de teste de fluxo lateral ou teste rápido, é usada há muitos anos, no entanto, sua aplicação em segurança dos alimentos, especialmente os testes de micotoxinas, é bastante recente. Esta técnica é baseada no uso de reações antígeno-anticorpo para a análise rápida de analitos com alta sensibilidade e especificidade (ZHENG; RICHARD; BINDER, 2006; GORYACHEVA et al., 2007; ALSHANNAQ; YU, 2017; SINGH; MEHTA, 2020).

Estes testes são fabricados em formato de tiras, e um anticorpo marcado é usado como um reagente de sinal. A tira consiste em quatro partes principais, o *sample pad* (onde o extrato da amostra é depositado), o *conjugate pad* (onde estão os anticorpos marcados), uma membrana de nitrocelulose e, ao final, o *absorbent pad* (que é feito com um material absorvente para possibilitar a movimentação da amostra ao longo da tira por capilaridade). Um extrato da amostra é adicionado no *sample pad*, e migra para o *conjugate pad*, onde ocorre a ligação aos anticorpos marcados que estão imobilizados nessa região, em seguida a amostra e os anticorpos marcados migram para a membrana de nitrocelulose, que contém uma linha de teste e uma linha de controle. A linha de teste contém um conjugado de micotoxina-proteína e a linha de controle contém anticorpos secundários. A linha de controle deve ser sempre visível, independentemente da presença ou ausência de micotoxinas na amostra, porque o anticorpo secundário sempre se liga aos anticorpos marcados que migram junto com a amostra. Esta etapa é importante, pois garante que a amostra tenha de fato fluído pelo dispositivo. Em uma amostra negativa, o anticorpo marcado fica livre e liga-se ao conjugado de micotoxina-proteína na linha de teste, formando uma linha visível. Em uma amostra positiva, o anticorpo marcado não se ligará ao conjugado de micotoxina-proteína na linha de teste, pois os sítios de ligação do anticorpo estarão saturados com as micotoxinas presentes na amostra, e como resultado nenhuma linha visível se formará na linha de teste (Figura 16) (KRSKA; MOLINELLI, 2009; MARAGOS; BUSMAN, 2010; TRIPATHI; UPADHYAY; NARA, 2017; NOLAN et al., 2019).

Os testes rápidos apresentam vários benefícios, como etapas simples, detecção rápida (5 a 15 minutos), baixo custo e menor interferência devido à separação cromatográfica, além disso, a presença ou ausência de analitos alvo pode ser inferida a olho nu, sem a necessidade de equipamentos (SINGH; MEHTA, 2020).

Figura 16 - Principais componentes de um teste rápido. O extrato da amostra é adicionado ao *sample pad* e flui, por capilaridade, através do *conjugate pad* e da membrana em direção ao *absorbent pad*. A presença de toxina na amostra inibe a ligação do anticorpo marcado à linha “teste” (conjugado de micotoxina-proteína), mas não inibe a ligação do anticorpo marcado à linha “controle” (anticorpos secundários).



Fonte: Adaptado de MARAGOS e BUSMAN (2010)

3.11 Abordagem Estatística para Análise de Dados

As análises estatísticas estão muito presentes na biologia moderna, e muitas hipóteses biológicas, mesmo as aparentemente simples, são comparadas por modelos estatísticos complexos. Com o advento de poderosos computadores podemos fazer análises complexas que no passado não estavam disponíveis com tanta facilidade para todas as áreas do conhecimento (QUINN; KEOUGH, 2002).

A estatística compreende diversas áreas, e dentre elas, pode-se destacar os testes de hipóteses, as estimativas e as previsões, que são utilizadas por várias áreas do conhecimento. Os modelos estatísticos, por exemplo, são usados extensivamente na medicina, epidemiologia, bioestatística, pesquisa de serviços de saúde, pesquisa farmacêutica, dentre outros campos (HARRELL, 2001).

As análises de regressão são muito utilizadas para a construção de modelos estatísticos, e permitem três coisas: (I) descrição: as relações entre as variáveis dependentes e as variáveis independentes podem ser descritas estatisticamente por meio de análise de regressão; (II) estimativa: os valores das variáveis dependentes podem ser estimados a partir dos valores

observados das variáveis independentes; e (III) prognóstico: os fatores de risco que influenciam o resultado podem ser identificados e os prognósticos individuais podem ser determinados (SCHNEIDER; HOMMEL; BLETTNER, 2010).

3.11.1 Regressão logística

A regressão logística é uma das aplicações dos chamados modelos lineares generalizados (GLM). Essa técnica foi introduzida por Nelder e Wedderburn (1972) e posteriormente desenvolvida por McCullough e Nelder (1989) e permite a análise de dados que possuam outros tipos de distribuições, além da normal (NELDER; WEDDERBURN, 1972; MCCULLOUGH; NELDER, 1989; QUINN; KEOUGH, 2002).

A utilização da regressão logística tem os mesmos objetivos de uma análise usando qualquer técnica de construção de modelo usada em estatística: encontrar o modelo mais adequado e mais parcimonioso para descrever a relação entre uma variável resposta (dependente, Y) e um conjunto de variáveis independentes (preditoras ou explicativas, X). Estes modelos são usados para estudar os efeitos das variáveis preditoras nos resultados categóricos. Normalmente, o resultado é binário, como presença ou ausência de doença, e neste caso o modelo é chamado de modelo logístico binário, e as respostas são representados como 0 (ausência da característica, doença...) ou 1 (presença da característica, doença...). Os modelos de regressão logística podem incluir apenas uma ou várias variáveis independentes, quando há apenas uma variável o modelo é referido como uma regressão logística simples, e segue a equação 1 (HOSMER; LEMESHOW, 2000; QUINN; KEOUGH, 2002; NICK; CAMPBELL, 2007; STOLTZFUS, 2011):

$$\mu(x) = \frac{e^{\beta_0 + \beta_1 X}}{1 + e^{\beta_0 + \beta_1 X}} \quad (1)$$

Quando há vários preditores, incluindo variáveis categóricas e contínuas, o modelo é referido como uma regressão logística múltipla ou multivariável, e segue a equação 2 (HOSMER; LEMESHOW, 2000; QUINN; KEOUGH, 2002; NICK; CAMPBELL, 2007; STOLTZFUS, 2011):

$$\mu(x) = \frac{e^{\beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \dots + \beta_p X_p}}{1 + e^{\beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \dots + \beta_p X_p}} \quad (2)$$

Sendo: $\mu(x) = P(Y = 1|X)$, ou seja, é a probabilidade de Y ser igual a 1 para determinado valor de X; $e^{\beta_0 + \beta_1 X}$ e $e^{\beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \dots + \beta_i X_i}$ representam as equações de regressão linear para variáveis independentes expressas na escala logit, em vez de no formato linear original. A razão para essa transformação da escala logit reside nos parâmetros básicos do modelo de regressão logística. Especificamente, um resultado binário expresso como uma probabilidade deve estar entre 0 e 1, em contraste, as variáveis independentes na equação de regressão linear podem assumir qualquer número. Sem retificar esta discrepância, os valores previstos do modelo de regressão poderiam ficar fora do intervalo 0-1 (HOSMER; LEMESHOW, 2000; QUINN; KEOUGH, 2002; STOLTZFUS, 2011).

Dentro deste contexto, a regressão logística identifica a combinação linear mais forte de variáveis independentes que aumenta a probabilidade de detectar o resultado observado - um processo conhecido como estimativa de máxima verossimilhança. De forma geral, o método de máxima verossimilhança atribui valores para os parâmetros desconhecidos (β) que maximizam a probabilidade de obter o conjunto de dados observado (HOSMER; LEMESHOW, 2000; STOLTZFUS, 2011).

Além disso, os modelos logísticos utilizam o *odds ratio* (ou razão de chances) para determinar o efeito de uma variável preditora sobre a variável de resultado. As chances são geralmente expressas em termos de probabilidade de um evento, se a probabilidade de um evento for p, então a chance pode ser definida como $p / (1 - p)$. Como a probabilidade vai de 0 a 1, as chances variam de 0 a ∞ (NICK; CAMPBELL, 2007).

Um exemplo de aplicação da regressão logística é a tragédia do Titanic. Neste exemplo a variável resposta é a morte ou sobrevivência de um passageiro, e as variáveis explicativas são idade, sexo e a classe no navio (1ª, 2ª ou 3ª) em que o passageiro navegava. Foi desenvolvido um modelo seguindo as equações 3 e 4 (OPER, 2017):

$$E(Y) = \frac{e^{g(X)}}{1 + e^{g(X)}} \quad (3)$$

Sendo E(Y) a probabilidade de sobrevivência de um indivíduo e:

$$g(X) = -1,33 + 2,55 * (I_{feminino}) + 1,27 * (I_{2classe}) + 2,58 * (I_{1classe}) - 0,04 * (idade) \quad (4)$$

Neste caso, I_{feminino} recebe 1 se o indivíduo for do sexo feminino e 0 se for do sexo masculino; $I_{2\text{classe}}$ recebe 1 se o indivíduo navegava na 2ª classe e 0 se estivesse em outra classe; $I_{1\text{classe}}$ recebe 1 se o indivíduo navegava na 1ª classe e 0 caso contrário (OPER, 2017).

Foi observado que a chance de sobrevivência de um indivíduo do sexo feminino foi $12,81(e^{2,55})$ vezes maior do que de um indivíduo do sexo masculino. Com relação à classe do navio, a chance de sobrevivência de um indivíduo que estava na 2ª classe foi $3,56 (e^{1,27})$ vezes maior do que de um indivíduo da 3ª classe, e para quem estava na 1ª classe a chance de sobreviver foi $13,20 (e^{2,58})$ vezes maior do que dos indivíduos da 3ª classe. Com relação a idade, a cada ano acrescido a idade a chance de sobrevivência foi $0,96$ vezes menor. Desta forma, uma mulher de 42 anos que estava na 1ª classe tem probabilidade de sobrevivência de $0,90 \left(\frac{e^{-1,33 + 2,55 + 2,58 - 0,04 \cdot 42}}{1 + e^{-1,33 + 2,55 + 2,58 - 0,04 \cdot 42}} \right)$, enquanto se esta mesma mulher estivesse na 3ª classe sua probabilidade de sobrevivência cai para $0,39 \left(\frac{e^{-1,33 + 2,55 - 0,04 \cdot 42}}{1 + e^{-1,33 + 2,55 - 0,04 \cdot 42}} \right)$. Já um homem de 30 anos na 1ª classe tem probabilidade de $0,42$ de sobreviver, e se estiver na 2ª classe a probabilidade é de $0,16$ (OPER, 2017).

Com relação às micotoxinas, Battilani et al. (2008) desenvolveram um modelo utilizando regressão logística para prever a contaminação por fumonisinas (FUMO) em milho. Quatrocentos e trinta e oito amostras de milho foram coletadas em diferentes regiões da Itália entre 2002 e 2007 e a quantidade de FUMO em cada uma delas foi medida, além disso, também foram coletados dados agronômicos das regiões avaliadas. A regressão logística desenvolvida explicou cerca de 60% da variabilidade, sendo 9% da variabilidade explicada pela longitude, 24% pela maturidade do milho, 10% pela semana de semeadura e 17% pelas semanas de crescimento. Além disso, 58% das amostras foram classificadas corretamente pelo modelo, 14% das amostras foram subestimadas e 28% dos casos estimados incorretamente foram falsos positivos (BATTILANI et al., 2008).

Outro estudo desenvolveu um modelo de regressão logística para a prever a presença de aflatoxinas (AFLA) em milho. Foram coletados dados agronômicos das amostras e a contaminação foi classificada como $\leq 5\mu\text{g}$ de AFLA por kg de milho ou $> 5 \text{ mg/kg}$, esta concentração de AFLA foi estabelecida por ser o limite legal determinado pela legislação da União Europeia. Dentre as amostras utilizadas para a validação do método, 75% foram classificadas como não contaminadas ($\leq 5\mu\text{g}$ de AFLA por kg de milho), e os 25% restantes foram classificadas como contaminadas, utilizando a regressão logística desenvolvida, 87% das amostras foram previstas como não contaminadas e 13% como contaminadas. Dentre as amostras que foram preditas corretamente, 65% foram classificadas corretamente como não

contaminadas (observado 0 e previsto 0) e 3% como contaminadas (observado 1 e previsto 1). 10% das amostras foram superestimadas (observado 0 e previsto 1) e 22% foram subestimadas (observado 1 e previsto 0). Portanto a precisão global do modelo foi de 68% (BATTILANI et al., 2013).

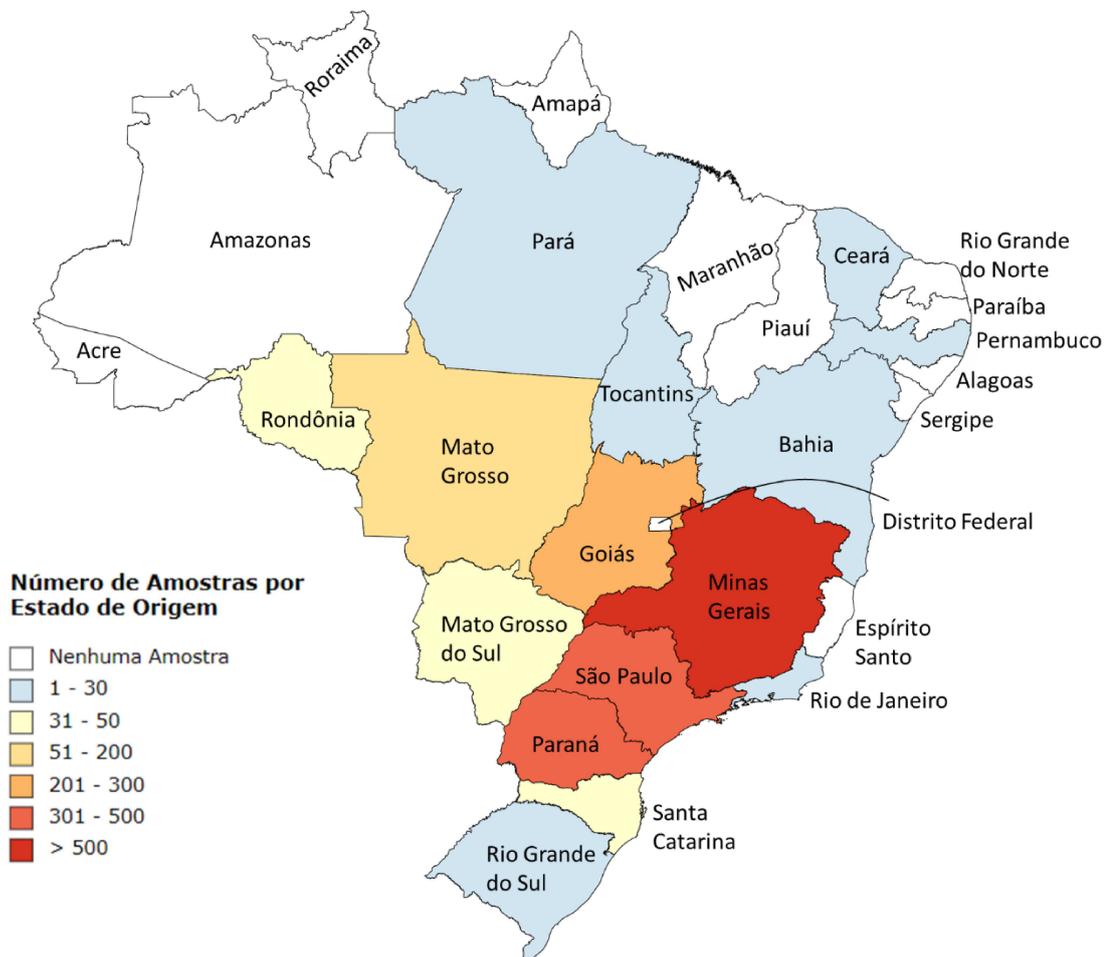
4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Amostras e Amostragem

Foram analisadas 1.749 amostras de alimentos e *commodities* destinadas à bovinos oriundas de diferentes estados brasileiros (Figura 17) entre janeiro de 2017 e dezembro de 2021. As amostras foram classificadas em cinco grupos, sendo eles: dieta total (639 amostras), silagens (252 amostras), milho / subprodutos (244 amostras), ração (166 amostras) e outros (que incluem soja, caroço de algodão, amendoim, polpa cítrica, cevada, trigo e sorgo) (405 amostras). Para 43 amostras o tipo de amostra não foi informado.

As amostras foram enviadas pelos produtores ao laboratório, e, portanto, a amostragem não foi avaliada. Porém, os produtores foram instruídos quanto a forma correta de amostragem (RICHARD, 2006).

Figura 17 - Número de amostras por estados brasileiros.



4.2 Análise de Micotoxinas

Todas as análises foram realizadas por meio da técnica de ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*), esta técnica foi escolhida por ser considerada de alto rendimento e por necessitar de menos procedimentos de purificação dos extratos, em comparação com outros métodos convencionais, além de não necessitar de equipamentos caros que muitas vezes não estão disponíveis. As seguintes micotoxinas foram pesquisadas: aflatoxinas totais (B₁, B₂, G₁ e G₂) (AFLA), deoxinivalenol (DON), fumonisinas (B₁, B₂ e B₃) (FUMO), ocratoxina A (OTA), T-2 toxina (T-2) e zearalenona (ZEA). Foram utilizados kits ELISA AgraQuant[®] produzidos pela Romer Labs Inc. (Áustria). Estes kits utilizam o método de ELISA competitivo direto para a análise das micotoxinas, sendo um kit específico para cada toxina estudada. Os seguintes kits foram utilizados: *AgraQuant[®] Total Aflatoxin 1/20*, *AgraQuant[®] Deoxynivalenol 0.25/0.5*, *AgraQuant[®] Fumonisin 0.25/5.0*, *AgraQuant[®] Ochratoxin 2/40*, *AgraQuant[®] T-2 Toxin 20/500* e *AgraQuant[®] Zearalenone Plus 25/1000* (Romer Labs Inc., Áustria). Estes kits foram validados pelo fabricante em mais de 50 matrizes, incluindo matrizes complexas como silagem de milho, DDGS (*Distiller's dried grains with solubles* – grãos secos de destilaria com solúveis), rações, amendoim, etc.

Os kits utilizados apresentavam os limites de detecção (LoD) e limites de quantificação (LoQ) especificados na Tabela 3. Amostras com resultados menores do que o LoD foram consideradas não contaminadas, já para as amostras com resultados entre o LoD e o LoQ foram atribuídos os valores de LoQ.

Tabela 3 - Limites de detecção (LoD) e quantificação (LoQ) em $\mu\text{g}/\text{kg}$ para aflatoxinas, deoxinivalenol, fumonisinas, ocratoxina A, T-2 toxina e zearalenona.

Micotoxinas	Limite de Detecção - LoD ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Limite de Quantificação - LoQ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
Aflatoxinas	1,0	1,0
Deoxinivalenol	200,0	250,0
Fumonisinias	200,0	250,0
Ocratoxina A	1,9	2,0
T-2 toxina	10,0	20,0
Zearalenona	20,0	25,0

Anteriormente à realização dos testes ELISA é necessário que a amostra passe por um processo de extração, que visa a solubilização das micotoxinas em meio líquido. Foram preparados dois extratos: um para a quantificação de deoxinivalenol e outro para as demais toxinas. Para a preparação destes extratos as amostras foram trituradas e duas frações de 20 g foram pesadas. Em uma das frações foram adicionados 100 ml de água destilada (para quantificação de deoxinivalenol) e na outra 100 ml de uma solução metanol:água (70:30 v/v) (para a quantificação das demais toxinas). Esta diferença no processo de extração se dá pois deoxinivalenol é mais hidrossolúvel, e, portanto, tem maior afinidade pela água do que por solventes orgânicos, já as demais micotoxinas apresentam maior afinidade pelo metanol. Em seguida, as amostras pesadas e acrescidas de água destilada ou metanol/água foram submetidas à agitação a 150 rpm (rotações por minuto) em agitador orbital por uma hora, após este tempo as amostras foram filtradas em papel de filtro tipo Whatman #1, e o pH foi ajustado para que estivesse entre 6,0 e 8,0. O filtrado foi diretamente utilizado para a quantificação de AFLA, OTA e T-2. Para DON, FUMO e ZEA uma diluição adicional foi necessária. As diluições foram de 1:4 em água destilada para DON, 1:20 em água destilada para FUMO e 1:5 em metanol 70% para ZEA. Os filtrados e filtrados diluídos foram então utilizados para a quantificação de micotoxinas por ELISA.

Alguns tipos de amostra necessitam de uma purificação adicional, que visa a eliminação de interferentes que podem estar presentes na matriz e levam a resultados falsos positivos se não forem removidos. Os extratos de amostras que necessitam de purificação são feitos a partir de 20 g de amostra e 100 ml de uma solução acetonitrila:água (84:16 v/v), e o restante do

processo de extração ocorre como descrito anteriormente. Para as purificações foram utilizadas colunas MycoSep[®] produzidas pela Romer Labs Inc. (Áustria). Oito ml do extrato foram transferidos para um tubo de vidro e filtrados utilizando as colunas MycoSep[®], e o extrato purificado foi então utilizado para as análises por ELISA.

Para a realização dos testes, primeiramente, os padrões com quantidades conhecidas de micotoxinas e as amostras foram misturadas a um conjugado de micotoxina-enzima. Em seguida, a mistura de padrão ou amostra + conjugado foi transferida para micropoços contendo anticorpos aderidos ao fundo, sendo um poço para cada amostra ou padrão. Esta mistura foi incubada por 15 minutos (para os kits de AFLA e DON) ou 10 minutos (para as demais micotoxinas), durante este tempo a toxina presente na amostra compete com o conjugado micotoxina-enzima pela ligação à um número limitado de anticorpos presentes nos poços. Após o período de incubação, todo o conteúdo dos poços foi descartado e eles foram lavados para a remoção de qualquer conjugado, micotoxina ou outros componentes presentes na amostra que não tenham se ligado aos anticorpos.

Em seguida um substrato enzimático foi adicionado aos poços, a enzima presente no conjugado micotoxina-enzima quebra o substrato adicionado e este muda de cor, adquirindo coloração azul, esta etapa requer uma incubação de cinco minutos. Ao final da incubação, a intensidade da cor é inversamente proporcional à concentração de micotoxina na amostra ou padrão. A reação foi então interrompida com uma solução de parada, que muda a coloração de azul para amarelo. Por fim, a intensidade da cor de cada poço foi mensurada opticamente usando um leitor de ELISA com um filtro de absorvância de 450 nm e um filtro diferencial de 630 nm. As densidades ópticas (OD) das amostras foram comparadas às OD dos padrões através de uma regressão linear, obtendo assim a concentração de micotoxina presente em cada amostra. Foram consideradas apenas curvas de calibração em que o R^2 fosse maior do que 0,97. Todas as análises foram realizadas em duplicata.

Também é importante destacar que para checar e garantir a eficiência das análises realizadas, o laboratório participa de forma regular dos Ensaio de Proficiência Interlaboratoriais desenvolvidos pela Romer Labs[®] (Romer Labs[®] *Check-Sample-Survey Programme*) utilizando a técnica de ELISA e obtendo resultados satisfatórios.

4.3 Banco de Dados

Foi criado um banco de dados no programa Microsoft 365[®] Excel (2021) com os resultados das análises de micotoxinas por ELISA em amostras destinadas à alimentação de

bovinos encaminhadas ao LAMICO (Laboratório de Micologia e Micotoxinas da Escola de Veterinária da UFMG) entre os anos de 2017 e 2021.

As seguintes informações estão contidas no banco de dados: ano e mês da análise, tipo de amostra dividido nas seguintes categorias: dieta total, silagens, milho / subprodutos, ração e outras amostras (que incluem soja, caroço de algodão, amendoim, polpa cítrica, cevada, trigo e sorgo), estado e município de origem da amostra, região de origem (Norte, Sul, Nordeste, Sudeste ou Centro-Oeste), estação do ano no recebimento da amostra, condições climáticas no município de origem no mês de recebimento da amostra (precipitação total (mm), temperatura máxima (°C), temperatura mínima (°C), amplitude térmica (°C) e umidade relativa do ar (%)), além dos resultados quantitativos para as micotoxinas analisadas.

Todos os dados climáticos utilizados foram obtidos no site do Instituto Nacional de Meteorologia (INMET) (<https://portal.inmet.gov.br/>). Para os municípios que não possuíam dados climáticos no INMET foi foram utilizados os dados da capital mais próxima.

4.4 Análises Descritivas

As análises descritivas dos dados foram feitas utilizando o programa Microsoft 365[®] Excel (2021). Foi calculado o número total de amostras analisadas para cada micotoxina, além da frequência absoluta e da frequência relativa de amostras contaminadas. Também foram calculados os valores de mediana e 1^o e 3^o quartis das amostras positivas, e valor máximo para cada micotoxina. Amostras positivas são aquelas com resultados maiores do que o LoD (limite de detecção). Foram realizadas análises por tipo de amostra e por ano.

Além disso, os valores quantitativos de cada micotoxina foram comparados com os menores valores de limite máximo tolerado (LMT) recomendados pela legislação da União Europeia para a alimentação de bovinos (EU, 2003; EU, 2006b). Para AFLA o LMT utilizado foi de 5 µg/kg, para DON de 2.000 µg/kg, para FUMO de 20.000 µg/kg e ZEA de 500 µg/kg. Esta análise não foi realizada para OTA e T-2 pois a legislação da União Europeia não possui limites máximos tolerados estabelecidos especificamente para bovinos para estas toxinas.

4.5 Análise de Coocorrências

Para as coocorrências, o número e a frequência relativa de amostras contaminadas com zero, uma, duas, três, quatro, cinco ou seis micotoxinas ao mesmo tempo foram determinados.

Além disso, também foram calculados o número de amostras que continham cada uma das combinações de micotoxinas duas a duas e as frequências relativas das combinações.

Também foi feito o teste de Shapiro-Wilk para verificar se os dados seguem distribuição normal e correlação de Spearman para verificar se havia correlação entre as toxinas em todas as amostras de forma conjunta e em cada tipo de amostra separadamente. Para estas análises foi utilizado o software R v. 3.5.1 (R CORE TEAM, 2018).

4.6 Ingestão Diária Estimada

A ingestão diária estimada (EDI) foi calculada para gado de corte e gado de leite. Foi considerado que uma vaca de leite consome em média 50 kg de dieta total por dia e pesa 700 kg. Já para gado de corte foi considerado que um animal pesa 600 kg e consome 30 kg de dieta total por dia. O EDI (em μg de micotoxinas/kg peso corporal/dia) foi calculado para cada micotoxina utilizando a equação 5 (JUAN et al., 2017; TWARUZEK et al., 2021):

$$EDI = \frac{T_c \times F_i}{M} \quad (5)$$

Onde:

Tc: concentração de micotoxina (foi utilizado o valor de mediana para dieta total - μg de micotoxina/kg de alimento)

Fi: ingestão de alimento (30 kg para gado de corte e 50 kg para gado de leite)

M: peso corporal (600 kg para gado de corte e 700 kg para gado de leite)

4.7 Modelagem Estatística

Foram criados modelos explicativos utilizando regressão logística para avaliar fatores que influenciam na contaminação por cada micotoxina em amostras de dieta total. Os modelos foram criados utilizando software R v. 3.5.1 (R CORE TEAM, 2018).

Foram criados modelos para cada toxina (AFLA, DON, FUMO, OTA, T-2 e ZEA), incluindo diversos parâmetros como estação do ano (verão, inverno, primavera ou verão), região do país (Norte, Sul, Nordeste, Sudeste ou Centro-Oeste), e dados climáticos do município de origem das amostras (precipitação, umidade relativa do ar, temperatura máxima,

temperatura mínima, amplitude térmica). Diversos modelos foram testados para cada toxina com o objetivo de encontrar o modelo com melhor ajuste.

Para cada modelo criado foi verificada a existência de multicolinearidade utilizando o VIF (*variance inflation factor*) (MONTGOMERY; RUNGER, 2010). A multicolinearidade ocorre quando existe alta correlação entre as variáveis de previsão, o que leva a estimativas não confiáveis dos coeficientes de regressão. O VIF é uma medida que representa o quanto as variáveis estão correlacionadas uma com as outras, sendo que quanto maior o VIF, maior a correlação. Variáveis com o VIF maior que 10 apresentam indícios de alta correlação e por esse motivo, os modelos que apresentaram VIF maior do que 10 não foram utilizados.

Outro parâmetro importante no desenvolvimento de modelos estatísticos é o ajuste. Para verificar o ajuste dos modelos criados foi utilizado o teste de *Hosmer and Lemeshow goodness of fit* (HOSMER; LEMESHOW; STURDIVANT, 2013). Este teste mede a adequação de modelos de regressão logística e informa o quão bem os dados se ajustam ao modelo, sendo que para Valor-p < 0,050 considera-se que o ajuste é inadequado. O teste de Hosmer-Lemeshow foi feito para todos os modelos criados, e aqueles que foram considerados inadequados não foram utilizados.

Como método de seleção de variáveis para o modelo, utilizou-se o *stepwise backward* no qual em cada passo eliminou-se a variável cujo teste de razão de verossimilhança entre um modelo mais completo e o modelo sem a covariável resultou em valor-p > 0,05. Neste teste, os modelos foram comparados dois a dois sendo um o modelo completo (por exemplo: modelo contendo região do país, estação do ano e precipitação) e outro o modelo reduzido (contendo apenas região do país, estação do ano). Um Valor-p < 0,050 indica que o modelo com mais variáveis (completo) é o mais adequado, já se o Valor-p > 0,050 o modelo reduzido (com menos variáveis) deve ser utilizado. Por fim, o modelo final para cada toxina apresentou VIF menor do que 10 e Valor-p > 0,050 no teste de Hosmer-Lemeshow.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Ocorrência de Micotoxinas por Tipo de Amostra

Os valores de mediana das amostras positivas, 1° e 3° quartis das amostras positivas e valor máximo (Tabela 4), além de número de amostras analisadas e positivas para cada toxina (AFLA, DON, FUMO, OTA, T-2 e ZEA) (Figuras 18 a 23) foram determinados para todas as amostras de forma conjunta e para alguns tipos de amostra de forma individual, sendo eles dieta total, silagens, milho / subprodutos, ração e outras amostras.

Na análise de todas as amostras, foi observado que 97% das amostras estavam contaminadas com pelo menos uma das micotoxinas estudadas. A micotoxina mais frequentemente encontrada foi DON, com uma frequência de contaminação de 68%, seguida por ZEA e AFLA (com 62% e 59% de amostras contaminadas, respectivamente), já para FUMO, OTA e T-2 os níveis de contaminação ficaram em 41%, 39% e 29%, respectivamente (Figura 18). Estes resultados sugerem a alta frequência de contaminação por micotoxinas na alimentação animal no Brasil, assim como já foi observado por outros autores em várias partes do mundo (BINDER et al., 2007; STREIT et al., 2013; GRUBER-DORNINGER; JENKINS; SCHATZMAYR, 2018; GRUBER-DORNINGER; JENKINS; SCHATZMAYR, 2019).

Ainda considerando todas as amostras, os valores de mediana calculados para as amostras que apresentaram resultado positivo (resultados maiores do que os valores de LoD) foram: 4,0 µg/kg, 446,74 µg/kg, 940,0 µg/kg, 8,94 µg/kg, 27,12 µg/kg, 53,30 µg/kg para AFLA, DON, FUMO, OTA, T-2 e ZEA, respectivamente (Tabela 4).

O valor máximo encontrado para AFLA foi de 266,60 µg/kg em uma amostra de farelo de amendoim oriunda do estado de São Paulo; o valor máximo de DON foi de 4.969,06 µg/kg em uma amostra de dieta total oriunda do estado de Goiás; para FUMO o maior valor encontrado foi de 31.420,00 µg/kg em uma amostra de milho do Paraná; a maior contaminação de OTA foi de 95,15 µg/kg em uma amostra de silagem de milho oriunda do estado de Minas Gerais; 2.959,06 µg/kg foi o máximo encontrado para T-2 em uma amostra de polpa cítrica de Minas Gerais; já para ZEA o valor máximo encontrado foi de 2.503,86 µg/kg em dieta total oriunda também de Minas Gerais.

Além disso, para as amostras positivas para AFLA, DON, FUMO e ZEA foi calculado o número e porcentagem de amostras cuja contaminação excedeu o menor valor de limite máximo tolerado recomendado pela União Europeia para bovinos (5 µg/kg para AFLA; 2.000 µg/kg para DON; 20.000 µg/kg para FUMO e 500 µg/kg para ZEA) (EU, 2003; EU, 2006b).

Um total de 36,5% das amostras estavam contaminadas com mais de 5 µg/kg de AFLA (360 amostras), 5,6% (59 amostras) continham mais do que 2.000 µg/kg de DON, 2,1% (22 amostras) estavam contaminadas com mais do que 500 µg/kg de ZEA, já para FUMO apenas duas amostras apresentaram valores de contaminação acima de 20.000 µg/kg (0,3%).

Estes resultados indicam que a maior parte das amostras estão contaminadas com quantidades de micotoxinas abaixo dos limites máximos tolerados recomendados pela União Europeia, porém, na análise global de um alimento vários outros fatores precisam ser levados em consideração, como a raça, o sexo, o ambiente, o estado nutricional e imunológico dos animais (BINDER et al., 2007), além da presença de múltiplas micotoxinas no mesmo alimentos, que pode agravar os efeitos observados devido a interações sinérgicas. Outros trabalhos obtiveram resultados semelhantes, com altas porcentagens de contaminação, mas poucas amostras com contaminação acima dos limites máximos recomendados pela União Europeia (STREIT et al., 2013; GRUBER-DORNINGER; JENKINS; SCHATZMAYR, 2019).

Nas amostras de dieta total foram observadas altas porcentagens de contaminação por ZEA, DON e AFLA (78%, 70% e 66%, respectivamente) (Figura 19), porcentagens maiores do que as observadas para as amostras como um todo. Como as dietas totais são preparadas a partir de diversas *commodities* diferentes, uma mesma amostra contém várias fontes de contaminação por micotoxinas diferentes, resultando nas altas taxas de contaminação observadas. Ainda para as amostras de dieta total, os valores de mediana das amostras positivas encontrados foram de 3,86 µg/kg para AFLA, 430,00 µg/kg para DON, 613,84 µg/kg para FUMO, 8,31 µg/kg para OTA, 23,40 µg/kg para T-2 e 55,23 µg/kg para ZEA (Tabela 4). Twaruzek et al. (2021) realizaram um estudo na Polônia e todas as amostras de dieta total analisadas continham ZEA e DON, porém AFLA não estava presente em nenhuma das amostras (TWARUZEK et al., 2021).

Nas amostras de silagens, as micotoxinas mais encontradas foram ZEA, OTA, AFLA e DON (61%, 61%, 55% e 53%, respectivamente) (Figura 20), as medianas das amostras positivas foram de 4,00 µg/kg, 300,00 µg/kg, 820,00 µg/kg, 23,30 µg/kg, 35,98 µg/kg e 43,86 µg/kg para AFLA, DON, FUMO, OTA, T-2 e ZEA, respectivamente (Tabela 4). Como o processo de ensilagem é realizado, principalmente pelos agricultores, são observadas grandes diferenças na qualidade de preservação destas silagens, levando a presença de diferentes fungos e a um espectro variado de toxinas (CHELI; CAMPAGNOLI; DELL'ORTO, 2013).

Publicações científicas sobre a contaminação de silagens por micotoxinas são bastante escassas quando comparadas às que avaliam a contaminação em *commodities* (como grãos e cereais). No entanto, a contribuição das silagens para a ingestão total de micotoxinas pode ser

significativa, pois as forragens são o principal componente de matéria seca das dietas totais de bovinos (CHELI; CAMPAGNOLI; DELL'ORTO, 2013; GALLO et al., 2015). Em um estudo realizado por Driehuis et al. (2008) na Holanda, foi observada alta prevalência de DON (72%) e ZEA (49%) em amostras de silagem de milho. Já as silagens de trigo e de feno estavam menos contaminadas, ZEA estava presente em 6% das amostras de silagem de feno e 10% das silagens de trigo continham DON. AFLA e OTA não foram detectadas em nenhuma das silagens (DRIEHUIS et al., 2008).

A produção de silagens bem conservadas e de alta qualidade depende principalmente da aplicação de práticas de ensilagem adequadas. A silagem feita e gerenciada adequadamente é um excelente alimento que não apresenta riscos à saúde do gado. No entanto, diferentes microrganismos indesejáveis podem se desenvolver na silagem quando o pH é insuficientemente reduzido ou quando o oxigênio está disponível, permitindo o crescimento de fungos que podem produzir micotoxinas (DRIEHUIS et al., 2008).

Já nas amostras de milho, FUMO foi a micotoxina predominante, com 86% das amostras contaminadas, seguido por DON que foi encontrado em 62% das amostras de milho analisadas (Figura 21). Estes resultados estão de acordo com Streit et al., (2013), que também observaram alta prevalência de FUMO e DON em amostras de milho vindas de todo o mundo (STREIT et al., 2013). Os valores de 1º quartil, mediana e 3º quartil das amostras positivas encontrados para FUMO nas amostras de milho foram de 955,00 µg/kg, 1.695,02 µg/kg e 3.245,99 µg/kg, respectivamente, sendo estes os maiores valores encontrados para FUMO entre todos os tipos de amostra analisados (Tabela 4). Sabe-se que FUMO é uma micotoxina muito presente em milho, já que seu principal produtor (*Fusarium verticillioides*) é conhecido por ser um fitopatógeno de milho (BLACUTT et al., 2018), e diversos outros estudos já demonstraram a alta frequência de contaminação de amostras de milho por FUMO em alimentos utilizados tanto para alimentação animal quanto humana no Brasil (VAN DER WESTHUIZEN et al., 2003; MORENO et al., 2009; MARTINS et al., 2012; RODRIGUES; NAEHRER, 2012; FRANCO et al., 2019; GRUBER-DORNINGER; JENKINS; SCHATZMAYR, 2019).

Nas amostras de ração as micotoxinas mais frequentes foram DON (88% de contaminação), FUMO (74%) e ZEA (56%) (Figura 22). Para este tipo de amostra os valores de mediana das amostras positivas foram de 6,22 µg/kg para AFLA, 690,00 µg/kg para DON, 970,00 µg/kg para FUMO, 6,34 µg/kg para OTA, 24,11 µg/kg para T-2 e 43,40 µg/kg para ZEA (Tabela 4). A grande quantidade de amostras de ração contaminadas com micotoxinas não é surpreendente, uma vez que as rações, assim como as amostras de dieta total, são uma mistura de diferentes *commodities*, e por isso, apresentam também uma mistura de micotoxinas vindas

destas *commodities*. Milho e subprodutos de milho são frequentemente adicionados em grandes quantidades às rações, e conseqüentemente, tanto o milho quanto as rações apresentaram alta prevalência de fumonisinas. A alta prevalência de FUMO em amostras de milho e rações também foi observada em outros estudos (RODRIGUES; NAEHRER, 2012; STREIT et al., 2013; GRUBER-DORNINGER; JENKINS; SCHATZMAYR, 2018; GRUBER-DORNINGER; JENKINS; SCHATZMAYR, 2019).

Já entre as outras amostras, que incluem soja, caroço de algodão, farelo de amendoim, polpa cítrica, cevada, trigo e sorgo, as principais micotoxinas encontradas foram DON (presente em 70% das amostras), AFLA (presente em 65% das amostras) e ZEA (presente em 59% das amostras) (Figura 23). Além disso, para estas amostras os valores de mediana das amostras positivas foram 8,37 µg/kg, 688,07 µg/kg, 540,00 µg/kg, 4,15 µg/kg, 27,12 µg/kg e 66,41 µg/kg para AFLA, DON, FUMO OTA, T-2 e ZEA, respectivamente (Tabela 4).

Dentre as outras amostras destacam-se as amostras de farelo de amendoim. A presença de AFLA em amendoim e derivados é um grande problema no Brasil (RODRÍGUEZ-AMAYA; SABINO, 2002), e neste estudo foi observado que todas as 37 amostras de farelo de amendoim analisadas estavam contaminadas com AFLA, com mediana de 73,38 µg/kg, valor superior ao permitido pela legislação da União Europeia para qualquer espécie animal (Tabela 2) (EU, 2003). A alta contaminação por AFLA em amendoim e em outras matrizes é um grande problema uma vez que esta toxina é biotransformada em AFM₁ que é excretada no leite, e pode ser ingerida por seres humanos (TOLOSA et al., 2021).

Tabela 4 - Níveis de contaminação em diferentes tipos de amostra.

continua

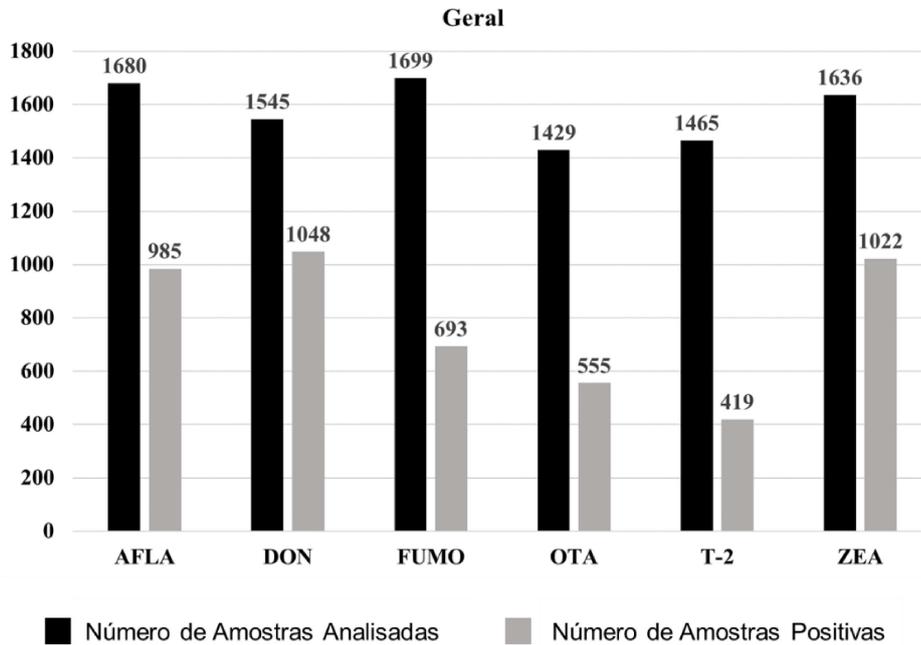
Micotoxinas	1° quartil ($\mu\text{g/kg}$) ¹	Mediana ($\mu\text{g/kg}$) ²	3° quartil ($\mu\text{g/kg}$) ³	Máximo ($\mu\text{g/kg}$) ⁴
Todas as amostras				
AFLA	2,55	4,00	7,08	266,60
DON	291,67	446,74	960,00	4.969,06
FUMO	460,00	940,00	1860,00	31.420,00
OTA	4,00	8,94	20,75	95,15
T-2	20,00	27,12	52,19	2.959,06
ZEA	33,94	53,30	89,92	2.503,86
Dieta Total				
AFLA	2,43	3,86	4,92	61,54
DON	290,00	430,00	1.086,22	4.969,06
FUMO	370,00	613,84	1.190,26	17.490,00
OTA	4,09	8,31	15,75	87,82
T-2	20,00	23,40	54,00	86,32
ZEA	36,84	55,23	86,32	2.503,86
Silagens				
AFLA	2,51	4,00	4,59	14,62
DON	250,00	300,00	415,58	2.747,80
FUMO	380,00	820,00	1.710,00	17.732,00
OTA	9,75	23,30	45,69	95,15
T-2	20,00	35,98	62,55	132,23
ZEA	30,93	43,86	67,07	1.900,52

Tabela 4 - Níveis de contaminação em diferentes tipos de amostra.

Micotoxinas	conclusão			
	1° quartil ($\mu\text{g}/\text{kg}$) ¹	Mediana ($\mu\text{g}/\text{kg}$) ²	3° quartil ($\mu\text{g}/\text{kg}$) ³	Máximo ($\mu\text{g}/\text{kg}$) ⁴
Milho / Subprodutos				
AFLA	2,32	4,00	5,43	82,13
DON	260,00	323,14	450,18	1.390,00
FUMO	955,00	1.695,02	3.245,99	31.420,00
OTA	4,09	13,52	31,16	86,79
T-2	20,00	41,10	57,15	106,58
ZEA	26,53	45,75	102,27	1.430,07
Ração				
AFLA	2,80	6,22	10,54	66,66
DON	415,51	690,00	1.025,00	1.980,26
FUMO	580,00	970,00	1.574,69	7.997,78
OTA	3,40	6,34	22,36	81,35
T-2	20,00	24,11	46,46	135,23
ZEA	29,32	43,40	69,78	365,80
Outros				
AFLA	3,82	8,37	17,80	266,60
DON	378,49	688,07	1.255,00	4.828,98
FUMO	359,59	540,00	1.412,00	6.791,16
OTA	3,24	4,15	8,94	78,00
T-2	20,00	27,12	46,38	2.959,06
ZEA	39,14	66,41	106,48	1.450,13

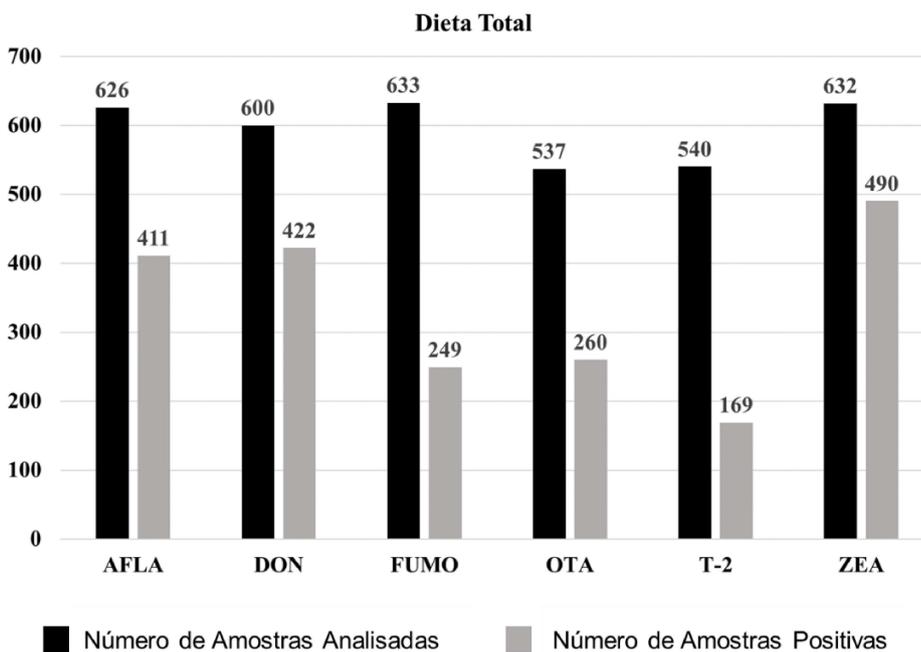
¹ 1° quartil das amostras positivas. ² Mediana das amostras positivas. ³ 3° quartil das amostras positivas. ⁴ Valor máximo detectado para cada micotoxina.

Figura 18 - Número total de amostras analisadas (barras pretas) e número de amostras contaminadas (barras cinzas) com AFLA, DON, FUMO, OTA, T-2 e ZEA em todas as amostras (Geral).



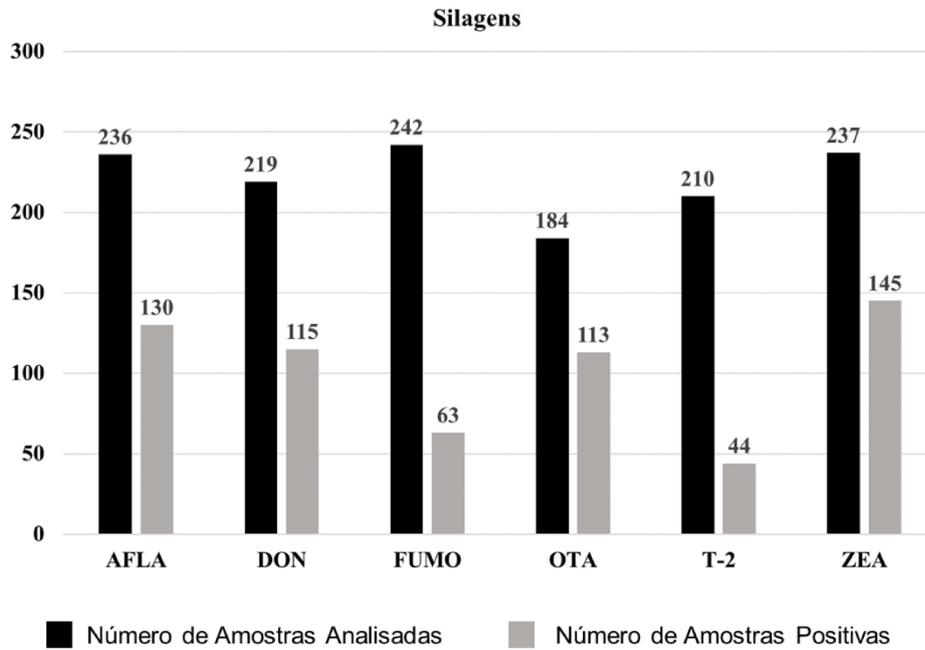
Fonte: A autora (2022)

Figura 19 - Número total de amostras analisadas (barras pretas) e número de amostras contaminadas (barras cinzas) com AFLA, DON, FUMO, OTA, T-2 e ZEA em amostras de dieta total.



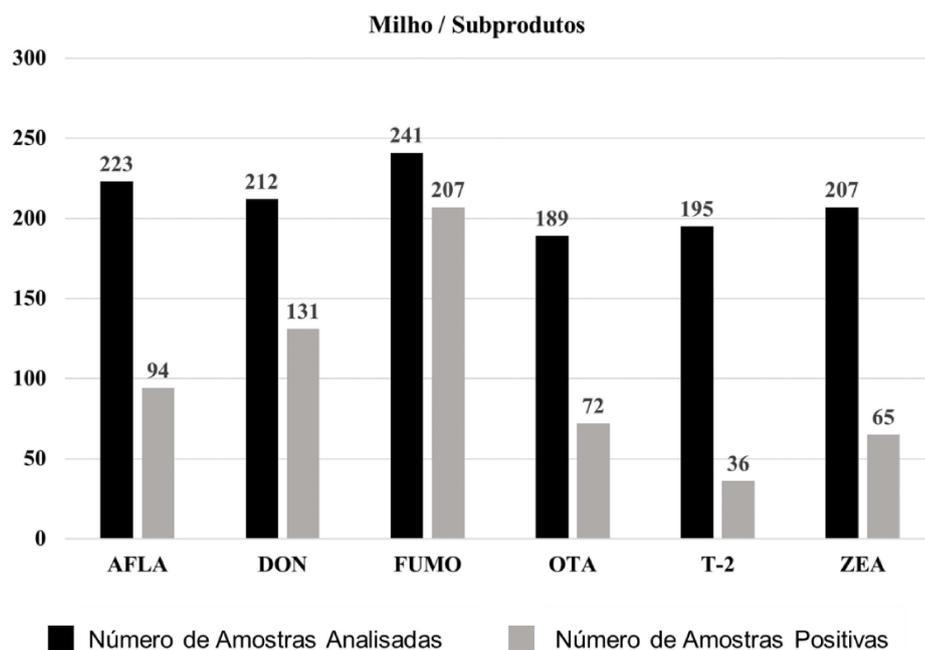
Fonte: A autora (2022)

Figura 20 - Número total de amostras analisadas (barras pretas) e número de amostras contaminadas (barras cinzas) com AFLA, DON, FUMO, OTA, T-2 e ZEA em amostras de silagens.



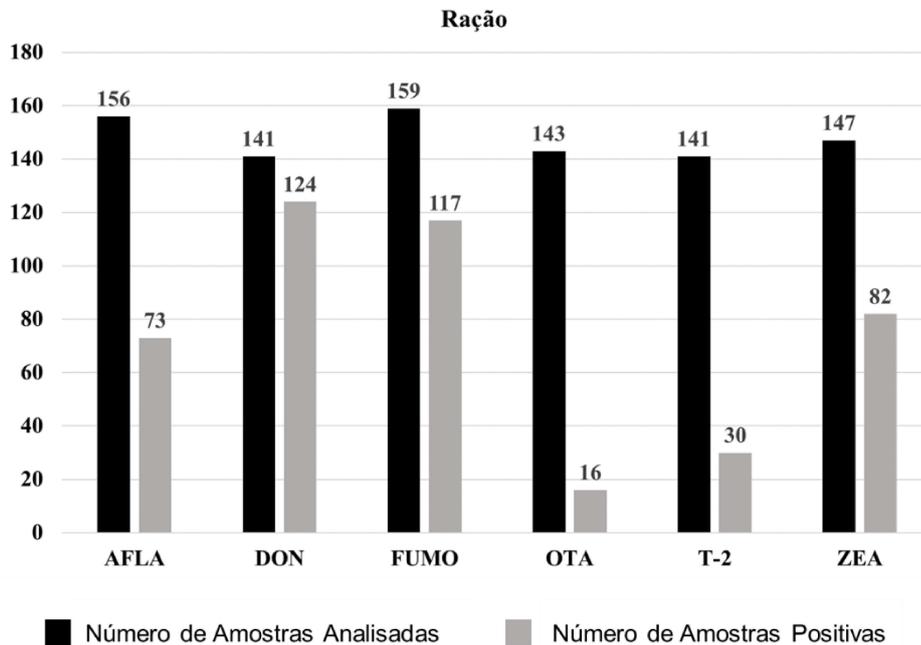
Fonte: A autora (2022)

Figura 21 - Número total de amostras analisadas (barras pretas) e número de amostras contaminadas (barras cinzas) com AFLA, DON, FUMO, OTA, T-2 e ZEA em amostras de milho / subprodutos.



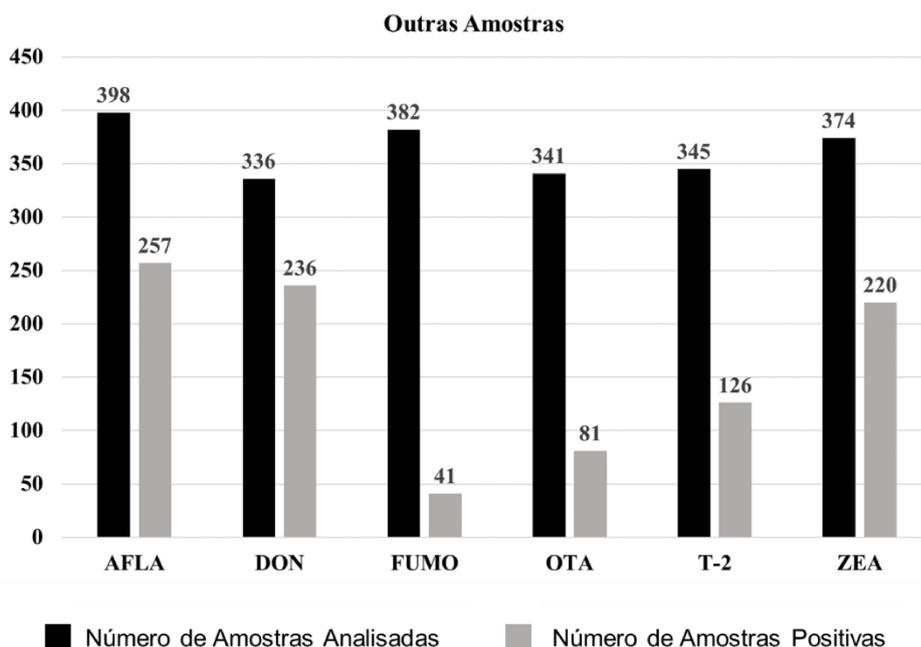
Fonte: A autora (2022)

Figura 22 - Número total de amostras analisadas (barras pretas) e número de amostras contaminadas (barras cinzas) com AFLA, DON, FUMO, OTA, T-2 e ZEA em amostras de ração.



Fonte: A autora (2022)

Figura 23 - Número total de amostras analisadas (barras pretas) e número de amostras contaminadas (barras cinzas) com AFLA, DON, FUMO, OTA, T-2 e ZEA em outras amostras.



Fonte: A autora (2022)

Os estudos que avaliam a presença de micotoxinas em alimentos destinados a bovinos no Brasil são escassos, e a alta frequência de contaminação observada neste estudo evidencia a necessidade de monitoramento frequente destes alimentos para garantir a segurança e bem-estar dos animais. Outro fator agravante no Brasil é a falta de legislações específicas para a contaminação por micotoxinas na alimentação animal, o que coloca em risco a saúde dos animais.

5.2 Ocorrência de Micotoxinas por Ano

A porcentagem de amostras contaminadas e não contaminadas e a mediana das amostras positivas foram determinadas para cada toxina em cada um dos anos estudados (2017 a 2021) (Figuras 24 a 29).

Para aflatoxinas a maior porcentagem de contaminação ocorreu no ano de 2017 (81,2%) e a menor em 2020 (35,1%). Com relação aos valores de mediana houve pouca variação ao longo dos anos, e os valores encontrados foram 3,7 µg/kg, 5,06 µg/kg, 4,44 µg/kg, 4,18 µg/kg e 3,05 µg/kg para os anos de 2017, 2018, 2019, 2020 e 2021, respectivamente (Figura 24). As aflatoxinas estão muito presentes em *commodities* de origem brasileira, uma vez que o país possui condições climáticas favoráveis para o crescimento dos principais fungos produtores desta toxina (*Aspergillus flavus* e *A. parasiticus*), estes fungos apresentam distribuição mundial, mas ocupam principalmente regiões de clima tropical e subtropical, crescendo em altas temperaturas e baixa atividade de água (PERRONE et al., 2020).

Para deoxinivalenol, todos os anos apresentaram porcentagem de contaminação acima de 50%, sendo 2019 o ano com maior contaminação de DON (81,1%) e 2017 o ano com menor porcentagem de amostras contaminadas (55,4%). Com relação a mediana, houve pouca variação entre os anos de 2017, 2019, 2020 e 2021, apenas em 2018 foi observado um aumento do valor deste parâmetro (656,67 µg/kg) (Figura 25).

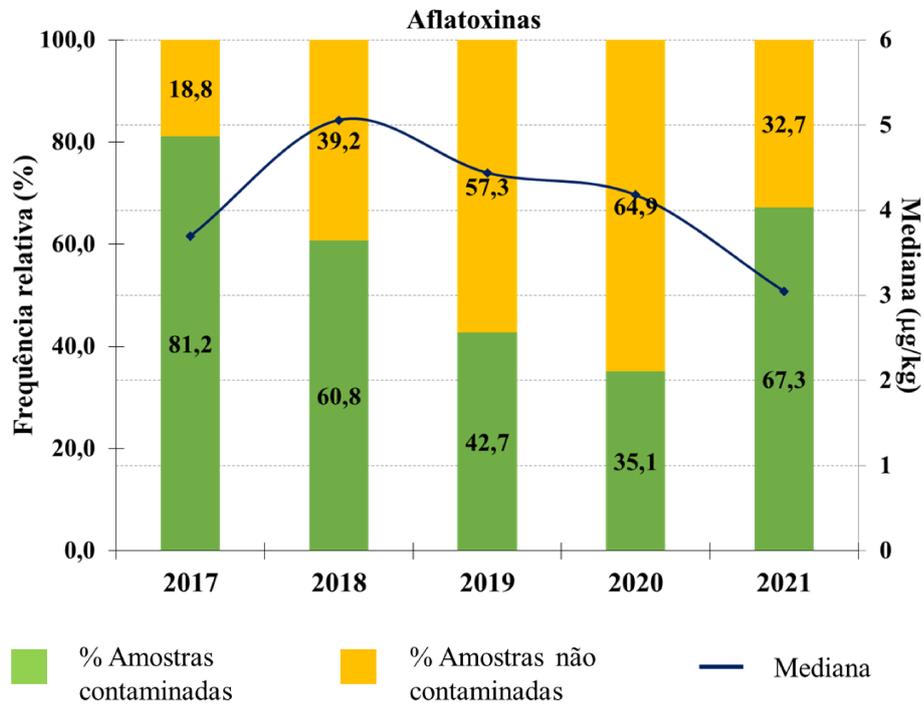
Já para fumonisinas, em todos os anos a porcentagem de contaminação foi menor do que 50%, com pouca variação entre os anos. Por outro lado, a mediana variou entre 640,0 µg/kg em 2020 e 1.129,66 µg/kg em 2018 (Figura 26).

Para ocratoxina A, a maior porcentagem de contaminação foi observada em 2021 (67,5%) e a menor em 2019 (24,7%), com relação a mediana também houve grande variação com o maior valor observado de 15,59 µg/kg em 2017 e o menor de 4,11 µg/kg em 2018 (Figura 27).

Com relação a T-2 toxina, o ano com maior porcentagem de amostras contaminadas foi 2021 com 44,8% de contaminação, já o ano com menor porcentagem de amostras contaminadas foi 2019 com apenas 10,2% de contaminação. A mediana desta toxina ficou entre 20,0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (em 2019) e 46,0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (em 2018) (Figura 28). Dentre as micotoxinas analisadas neste estudo, T-2 foi a menos prevalente, porém a prevalência de T-2 é bastante variável com países apresentando altas frequências de contaminação por T-2 enquanto em outros a contaminação é baixa. Um estudo realizado na Polônia entre 2015 e 2020 observou que 88,4% das amostras analisadas continham T-2, com valor máximo encontrado de 898 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (TWARUZEK et al., 2021). Em outro estudo realizado na Eslováquia, T-2 foi a micotoxina mais frequentemente encontrada, presente em 90% das amostras analisadas, porém em baixas concentrações (média de 13 $\mu\text{g}/\text{kg}$) (LABUDA et al., 2005). Já Drakopoulos et al. (2021) analisaram 253 amostras de cevada originárias da Suíça e encontraram apenas 8% de contaminação por T-2, com mediana de 5,1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (DRAKOPOULOS et al., 2021).

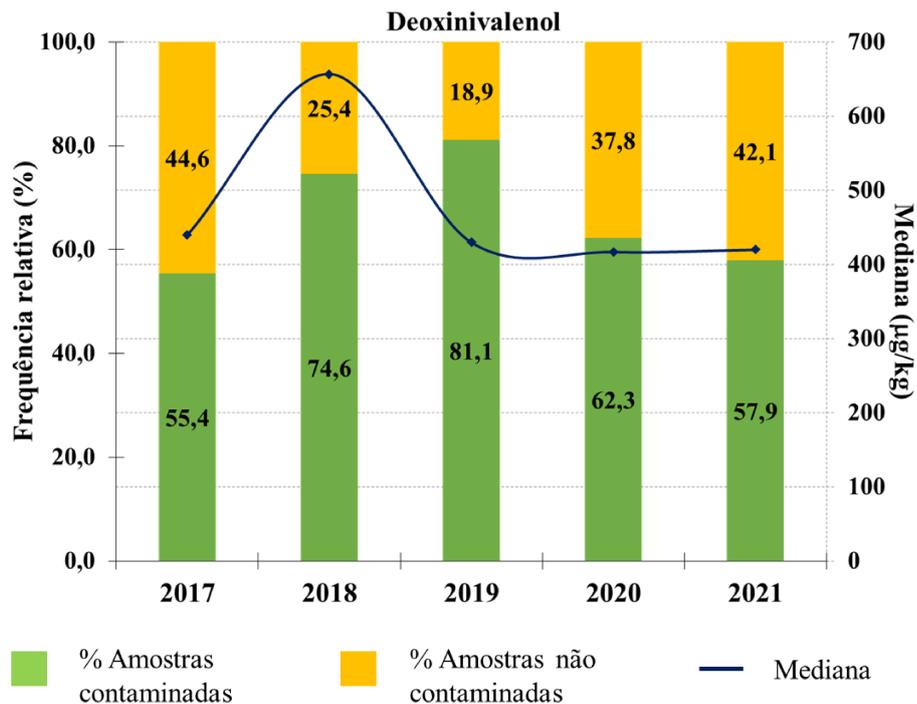
Para zearalenona, assim como para DON, todos os anos apresentaram contaminação acima de 50%, com 71,6% das amostras contaminadas em 2021. Já a mediana variou pouco entre os anos, ficando entre 41,97 $\mu\text{g}/\text{kg}$ em 2020 e 66,74 $\mu\text{g}/\text{kg}$ em 2017 (Figura 29).

Figura 24 - Porcentagem de amostras contaminadas e não contaminadas e mediana das amostras positivas para aflatoxinas entre 2017 e 2021.



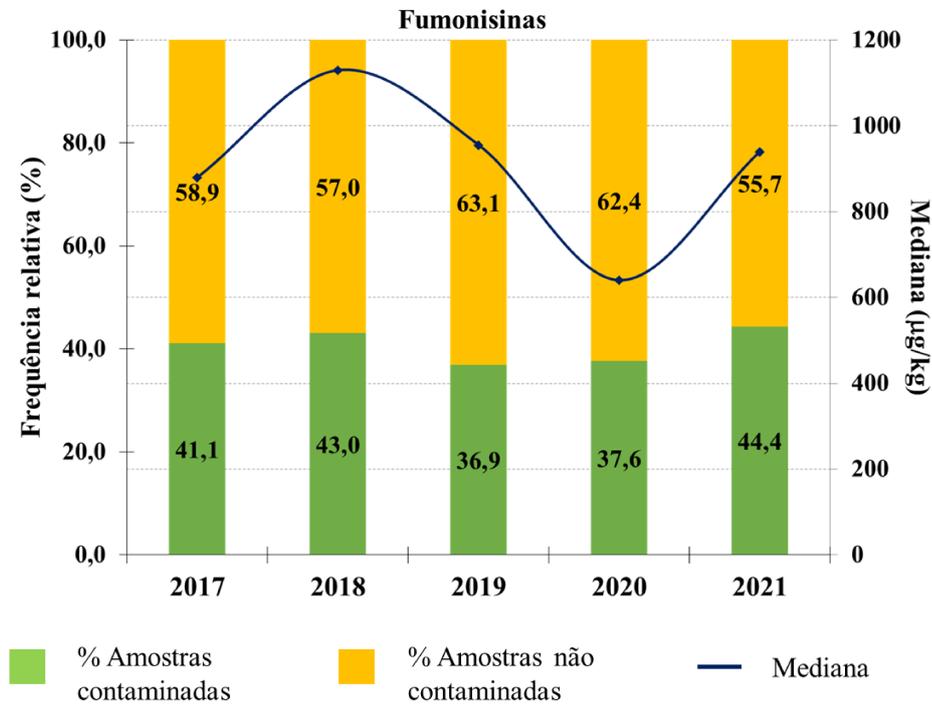
Fonte: A autora (2022)

Figura 25 - Porcentagem de amostras contaminadas e não contaminadas e mediana das amostras positivas para deoxinivalenol entre 2017 e 2021.



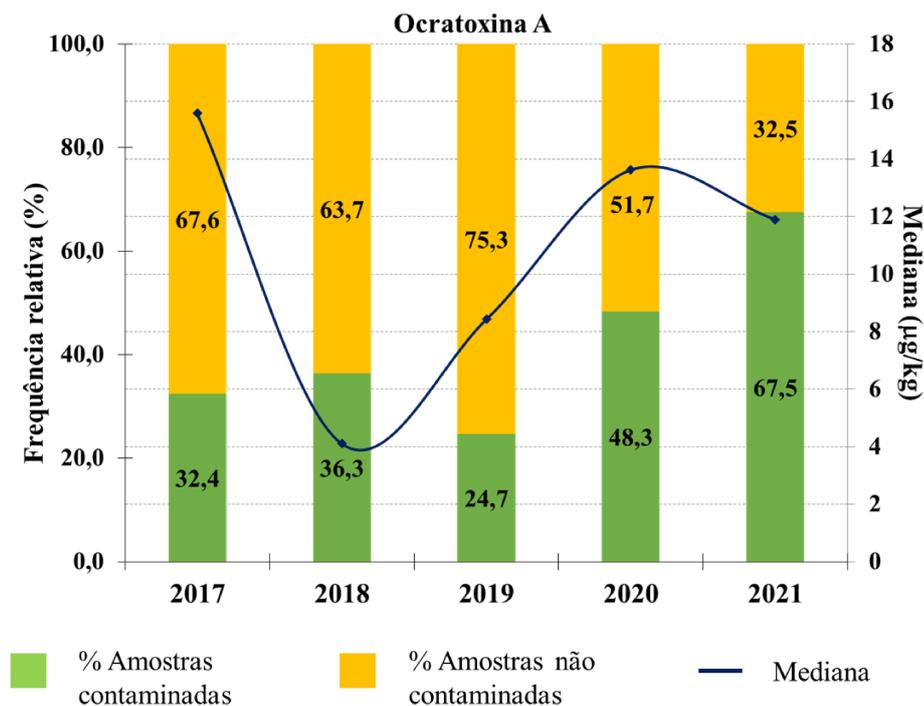
Fonte: A autora (2022)

Figura 26 - Porcentagem de amostras contaminadas e não contaminadas e mediana das amostras positivas para fumonisinas entre 2017 e 2021.



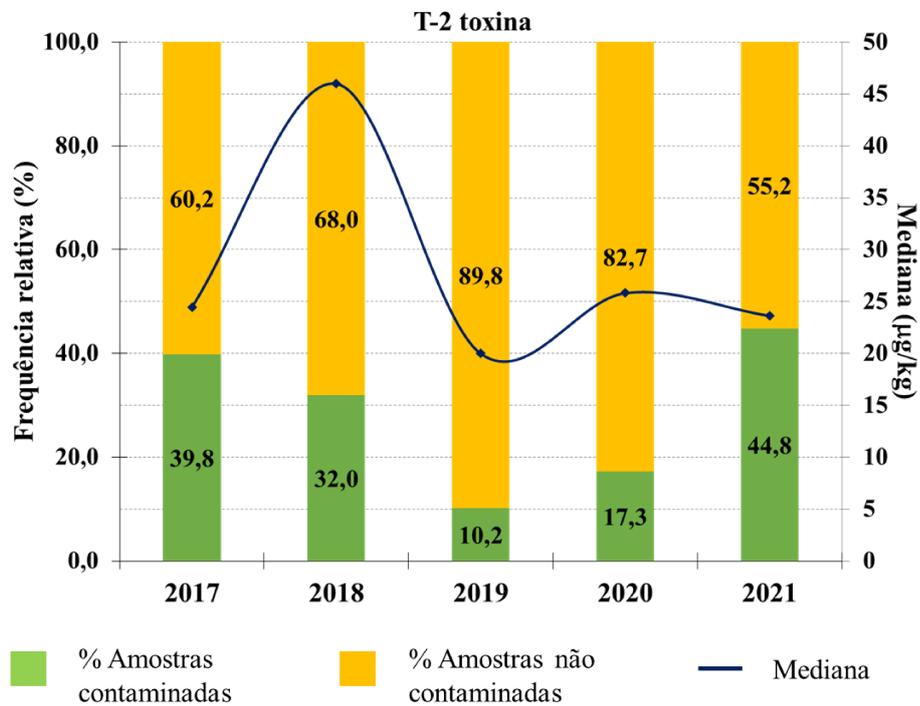
Fonte: A autora (2022)

Figura 27 - Porcentagem de amostras contaminadas e não contaminadas e mediana das amostras positivas para ocratoxina A entre 2017 e 2021.



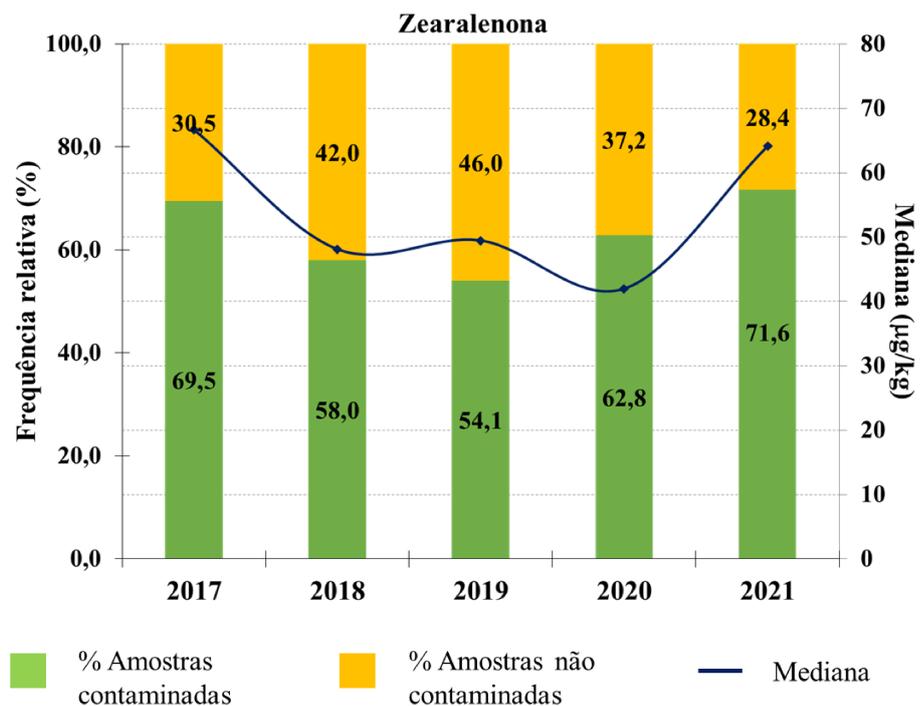
Fonte: A autora (2022)

Figura 28 - Porcentagem de amostras contaminadas e não contaminadas e mediana das amostras positivas para T-2 toxina entre 2017 e 2021.



Fonte: A autora (2022)

Figura 29 - Porcentagem de amostras contaminadas e não contaminadas e mediana das amostras positivas para zearalenona entre 2017 e 2021.



Fonte: A autora (2022)

Existem muitos fatores que podem influenciar a contaminação por micotoxinas, sendo o clima um fator muito importante para esta contaminação (MAGAN et al., 2003; PATERSON; LIMA, 2010). Desta forma, mudanças de temperatura, precipitação, umidade relativa e concentração atmosférica de CO₂ podem alterar a capacidade dos fungos de produzir micotoxinas causando aumentos ou reduções anuais no risco relativo de contaminação por micotoxinas tanto no campo quanto pós-colheita (PATERSON; LIMA, 2010; PERRONE et al., 2020).

Os fungos do gênero *Fusarium* spp. (produtores de DON, FUMO, T-2 e ZEA) adaptam-se facilmente a uma grande variedade de habitats, tendo distribuição mundial. Estes fungos são importantes patógenos de plantas e a ocorrência de diferentes micotoxinas no campo está relacionada à localização geográfica da cultura e às condições meteorológicas encontradas. Portanto, técnicas de prevenção e controle de micotoxinas, como boas práticas agrícolas e boas práticas durante a fabricação, manuseio, armazenamento, processamento, transporte e distribuição dos alimentos e rações desempenham um papel importante na minimização da contaminação por micotoxinas (PERRONE et al., 2020). Um estudo realizado por Champeil et al. (2004) demonstrou que o nível de contaminação de micotoxinas de *Fusarium* (deoxinivalenol, nivalenol e zearalenona) em culturas de trigo depende do clima (que varia anualmente) e do sistema de cultivo utilizado (CHAMPEIL et al., 2004).

Além das variações climáticas, as variações anuais observadas nas figuras 19 a 24 podem ocorrer por outros fatores, como: o momento da colheita e o armazenamento pós-colheita; além disso, as variações anuais também podem ser atribuídas às variações nos tipos de amostras analisados em cada ano, ou seja, a proporção de cada tipo de amostra (dieta total, silagens, milho / subprodutos, ração e outras amostras) analisada em cada ano foi variável, e como descrito na sessão anterior (5.1) as contaminações são diferentes em tipos de amostras diferentes.

5.3 Coocorrências de Micotoxinas

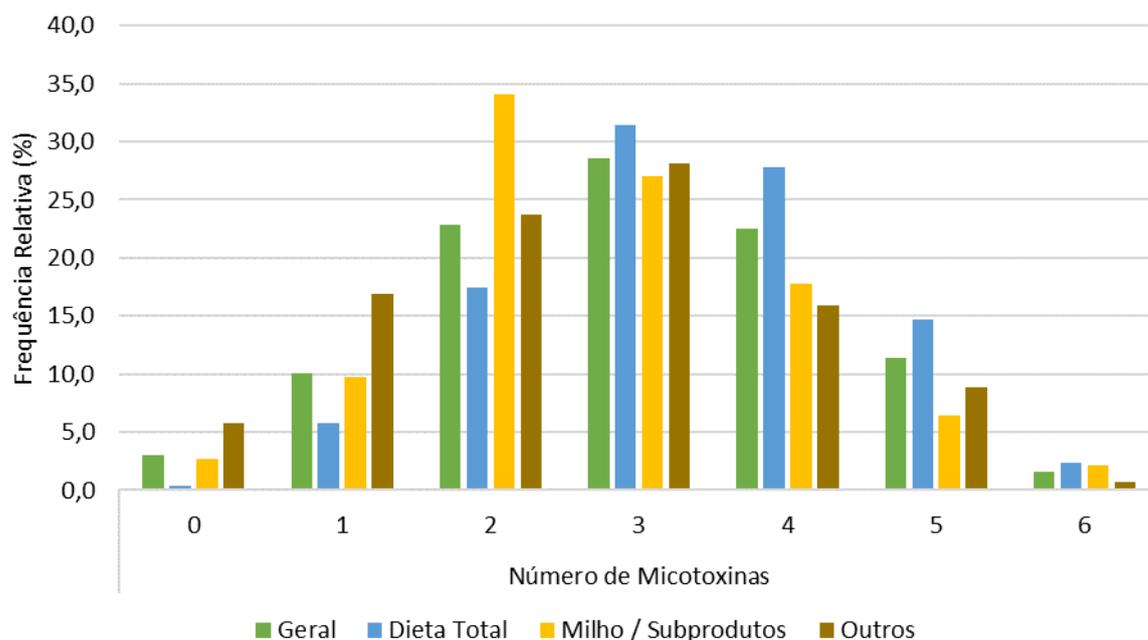
Para as análises das coocorrências foram utilizadas 1.329 amostras em que foram realizadas análises para as seis micotoxinas estudadas (AFLA, DON, FUMO, OTA, T-2 e ZEA). Na análise utilizando todas as amostras (geral), 87% estavam contaminadas com duas ou mais micotoxinas ao mesmo tempo, sendo que 22,9% estavam contaminadas com duas micotoxinas, 28,6% com três, 22,5% com quatro, 11,4% com cinco e 1,6% continham as seis micotoxinas estudadas ao mesmo tempo (Figura 30). Para os diferentes tipos de amostras

estudados (dieta total, silagens, milho / subprodutos, ração e outras amostras) foi realizada uma análise de qui-quadrado para verificar se o número de amostras contaminadas com zero, uma, duas, três, quatro, cinco ou seis micotoxinas ao mesmo tempo diferiam daqueles observados para todas as amostras em conjunto. Para as amostras de dieta total e milho / subprodutos o valor de p encontrado foi $p < 0,0001$; já para a categoria outras amostras foi obtido $p = 0,0008$, portanto para estes três tipos de amostras foi considerado que o número de amostras contaminadas com zero, uma, duas, três, quatro, cinco ou seis micotoxinas ao mesmo tempo foi diferente ao do banco de dados como um todo e por isso estes tipos de amostra estão representados separadamente na Figura 30. Para estes tipos de amostra, 17,5%, 34,1% e 23,7% estavam contaminadas com duas micotoxinas, 31,4%, 27,0% e 28,1% com três, 27,8%, 17,8% e 15,9% com quatro, 14,7%, 6,5% e 8,8% com cinco e 2,4%, 2,2% e 0,7% continham as seis micotoxinas ao mesmo tempo para dieta total, milho / subprodutos e outros, respectivamente.

Já para as amostras de silagens ($p = 0,8221$) e ração ($p = 0,5373$) não foi observada diferença estatística entre o número de micotoxinas presentes ao mesmo tempo nestas amostras e nas amostras em geral, e por isso estes tipos de amostra não estão representados de forma individual na Figura 30.

As coocorrências são muito comuns na alimentação animal, e foram relatadas em diversos estudos por todo o mundo (KOSICKI et al., 2016; GRUBER-DORNINGER; JENKINS; SCHATZMAYR, 2018; GRUBER-DORNINGER; JENKINS; SCHATZMAYR, 2019; YANG et al., 2019).

Figura 30 - Frequência relativa de amostras contaminadas com zero, uma, duas, três, quatro, cinco ou seis micotoxinas ao mesmo tempo, para todas as amostras (geral), dieta total, milho / subprodutos e outras amostras.



Fonte: A autora (2022)

Também foi calculada a porcentagem de amostras contaminadas com qualquer combinação possível de duas micotoxinas em todos os tipos de amostra (Tabela 5). De forma geral, as combinações mais frequentes refletem as micotoxinas mais presentes em cada tipo de amostra. Milho / subprodutos e rações, por exemplo, apresentaram alta frequência de contaminação por FUMO e DON (Figuras 21 e 22), sendo essa a coocorrência mais observada nestes tipos de amostra.

Dentre as amostras em geral e as amostras de dieta total, a combinação mais frequente foi DON + ZEA, que estava presente em 45,2% das amostras de forma geral e 54,7% das amostras de dieta total. A co-contaminação de alimentos com DON e ZEA é bastante comum, já que estas toxinas são principalmente produzidas pelos mesmos fungos (*Fusarium graminearum* e *Fusarium culmorum*), e já foi relatada por diversos autores (DRIEHUIS et al., 2008, TWARUZEK et al., 2021, GRUBER-DORNINGER; JENKINS; SCHATZMAYR, 2018, GRUBER-DORNINGER; JENKINS; SCHATZMAYR., 2019).

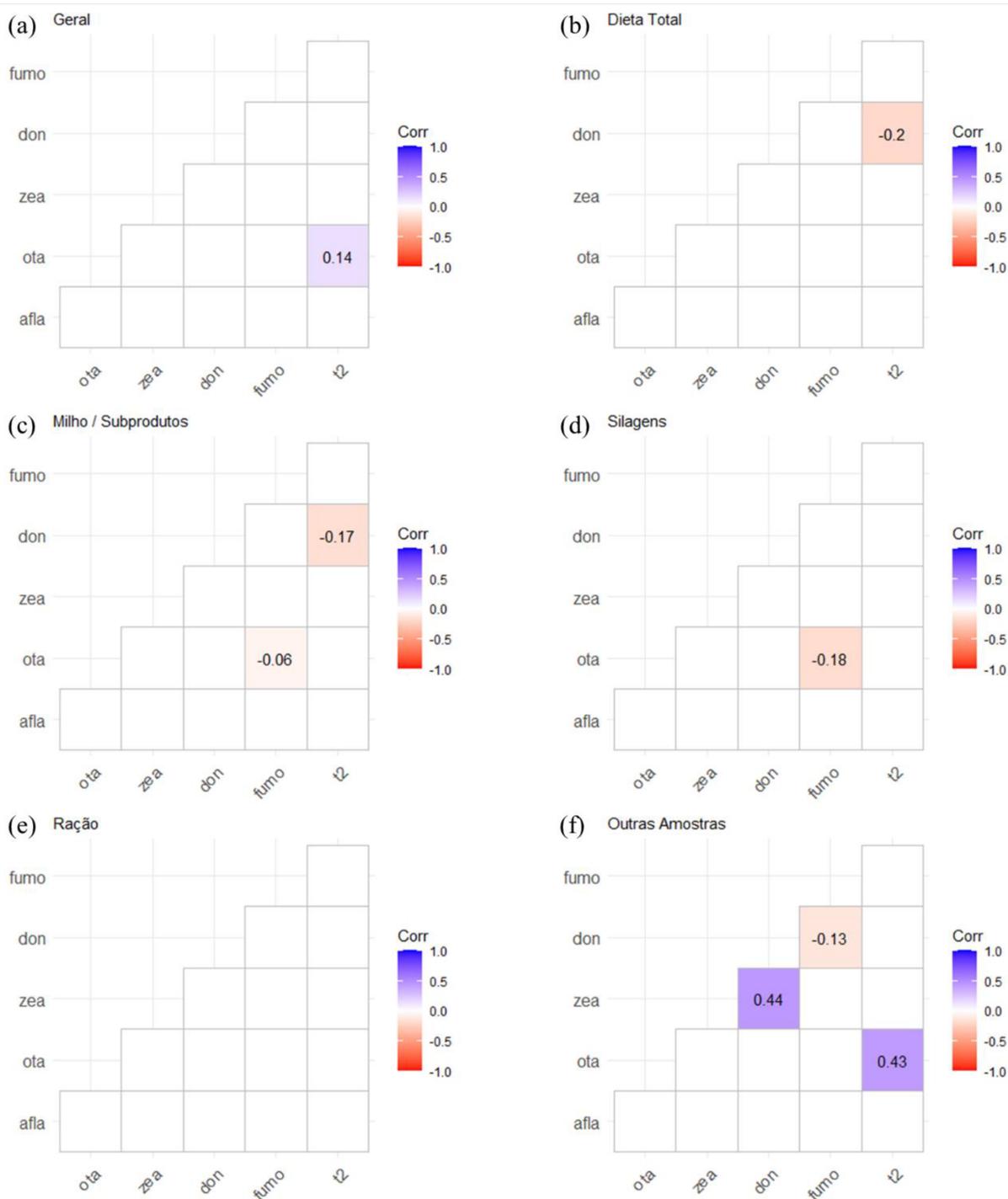
Tabela 5 - Porcentagem de amostras contaminadas com cada combinação possível de micotoxinas duas a duas.

Combinação de Micotoxinas	Frequência de Contaminação (%)					
	Geral	Dieta Total	Milho / Sub	Silagens	Ração	Outros
AFLA + DON	42,1	46,9	25,9	37,6	42,6	47,5
AFLA + FUMO	24,5	29,0	36,8	15,7	36,0	9,2
AFLA + OTA	20,9	34,4	24,3	42,7	6,6	14,9
AFLA + T-2	20,5	24,5	10,8	14,0	11,8	27,8
AFLA + ZEA	41,5	52,7	13,5	41,6	30,9	45,1
DON + FUMO	30,7	30,2	54,6	14,6	68,4	8,8
DON + OTA	23,5	31,6	17,8	34,3	8,1	13,2
DON + T-2	16,6	17,7	7,6	12,4	19,1	22,0
DON + ZEA	45,2	54,7	22,2	37,6	50,0	46,1
FUMO + OTA	14,1	16,5	30,3	12,9	6,6	3,4
FUMO + T-2	11,3	12,9	16,2	2,8	19,9	6,1
FUMO + ZEA	22,9	28,0	27,0	13,5	41,9	8,5
OTA + T-2	14,4	18,5	11,9	13,5	2,2	14,6
OTA + ZEA	26,7	38,0	14,1	47,2	8,8	11,5
T-2 + ZEA	20,2	26,0	6,5	16,3	16,2	23,4

Retângulos: Maior frequência de contaminação para cada tipo de amostra.

Também foi feita análise de correlação de Spearman para verificar a presença de correlação entre as toxinas em todas as amostras de forma conjunta e em cada tipo de amostra separadamente. Foi utilizada correlação de Spearman pois os dados não seguem distribuição normal. Em todas as amostras e nas amostras de dieta total, milho / subprodutos e silagens foram observadas apenas correlações fracas (menores que 0,3), nas outras amostras foram observadas correlações moderadas (entre 0,3 e 0,7) entre DON e ZEA e entre OTA e T-2. Já nas amostras de ração não foi observada nenhuma correlação (Figura 31).

Figura 31 - Correlação entre micotoxinas em (a) Todas as amostras (geral), (b) Dieta total, (c) Milho / subprodutos, (d) Silagens, (e) Ração e (f) Outras amostras.



Fonte: A autora (2022)

Embora a literatura científica ofereça uma ampla variedade de informações sobre os efeitos individuais das micotoxinas em várias espécies animais, os estudos sobre os efeitos

tóxicos combinados das micotoxinas *in vivo* são limitados e, portanto, o risco à saúde decorrente da exposição a uma combinação de micotoxinas é incompleto. Em surtos de campo, alimentos naturalmente contaminados podem conter múltiplas micotoxinas, e níveis de contaminação aparentemente mais baixos podem estar associados a efeitos mais graves devido a ação conjunta das micotoxinas, o que explica as divergências observadas nos efeitos descritos na literatura científica e nos casos observados à campo (BINDER et al., 2007; GRENIER; OSWALD, 2011; ALASSANE-KPEMBI et al. 2017). Além disso, o risco de exposição a multi-micotoxinas em ruminantes é ainda maior do que em outros animais (como suínos e aves), uma vez que a dieta destes animais é mais variada, contendo várias possíveis fontes de contaminação (GALLO et al., 2015).

As legislações existentes também foram estabelecidas com base em estudos toxicológicos que levam em consideração a exposição a apenas uma micotoxina, e não às misturas de micotoxinas (SMITH et al., 2016). Porém, os resultados deste estudo indicam que a coocorrência de micotoxinas nos alimentos utilizados para a alimentação de bovinos no Brasil e a consequente exposição dos animais à várias micotoxinas ao mesmo tempo é a regra e não a exceção, sendo muito importante considerar os efeitos tóxicos combinados das micotoxinas, e não apenas os efeitos individuais.

5.4 Ingestão Diária Estimada e Avaliação de Risco

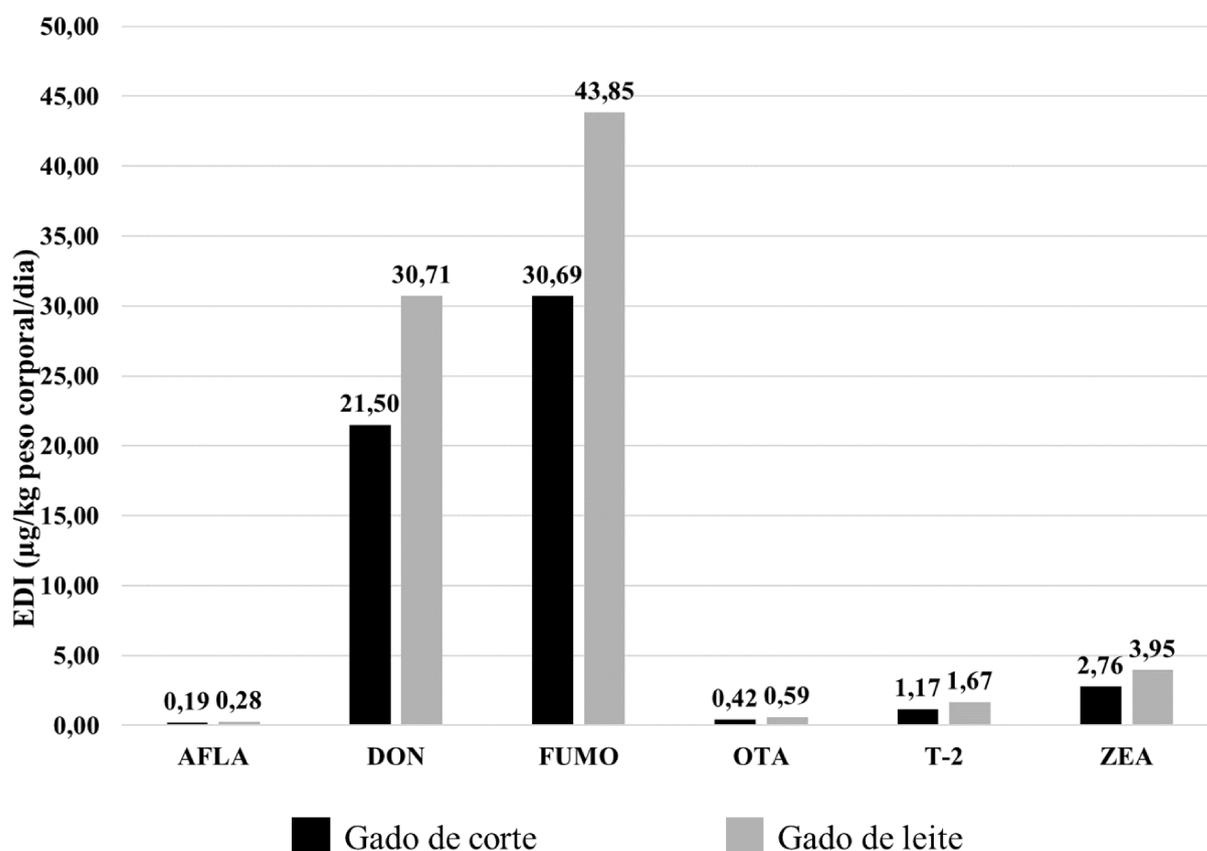
Ao realizar uma avaliação de risco deve-se levar em consideração não apenas as concentrações absolutas de micotoxinas nos alimentos (expressas em μg de micotoxina/kg de alimento), mas também a ingestão diária destas toxinas pelos animais (expressas em μg de micotoxina/kg peso corporal/dia) (ZACHARIASOVA; CUHRA; HAJLSLOVA, 2014). Para esta estimativa da exposição diária dos animais às micotoxinas foram utilizadas apenas as amostras de dieta total, e considerados o peso corporal de 600 kg para gado de corte e 700 kg para gado de leite. A ingestão de alimentos utilizada foi de 30kg/dia para gado de corte e 50 kg/dia para gado de leite.

O mais alto valor de ingestão diária estimada (EDI) foi encontrado para FUMO (30,69 μg /kg peso corporal/dia para gado de corte e 43,85 μg /kg peso corporal/dia para gado de leite) seguido de DON com EDI de 21,50 μg /kg peso corporal/dia para gado de corte e 30,71 μg /kg peso corporal/dia para gado de leite. Para todas as outras micotoxinas os EDIs encontrados foram baixos, sendo o menor observado para AFLA (0,19 μg /kg peso corporal/dia para gado de corte e 0,28 μg /kg peso corporal/dia para gado de leite) (Figura 32).

Para determinar se os valores de EDI encontrados podem trazer algum risco para a saúde animal foram utilizados valores de NOAEL (*no observed adverse effect level* - nível sem efeitos adversos observáveis) ou LOAEL (*lowest observed adverse effect level* - nível com menor efeito observável) determinados pela *European Food Safety Authority* (EFSA) para bovinos, porém estes valores só foram estabelecidos para DON, FUMO e T-2 até o momento. Os valores determinados são de 300 µg/kg peso corporal/dia, 600 µg/kg peso corporal/dia e 300 µg/kg peso corporal/dia para DON, FUMO e T-2, respectivamente (EFSA, 2011; EFSA et al., 2017; EFSA et al., 2018; TWARUZEK et al., 2021).

Pode-se observar que os valores de EDI encontrados neste trabalho são bem menores do que os valores de NOAEL e LOAEL estabelecidos, portanto, os valores encontrados não representam risco para os animais, porém atenção deve ser dada às amostras co-contaminadas, pois nestes casos, o EDI aumenta devido à presença de várias micotoxinas no mesmo alimento, podendo trazer efeitos adversos aos animais.

Figura 32 - Ingestão diária estimada (EDI) de AFLA, DON, FUMO, OTA, T-2 e ZEA para gado de corte (barras pretas) e gado de leite (barras cinzas).



Fonte: A autora (2022)

5.5 Modelagem Estatística

Para cada micotoxina foram criados vários modelos logísticos utilizando amostras de dieta total. O modelo mais adequado para cada toxina foi selecionado utilizando o teste de razão de verossimilhança e se verificando colinearidade pelo VIF e o ajuste do modelo pelo teste de *Hosmer and Lemeshow goodness of fit* (como descrito na seção 4.7).

Para aflatoxinas o modelo escolhido continha as variáveis estação do ano e região do país. Os valores dos coeficientes β , erro padrão, *odds ratio*, intervalo de confiança (95%), Valor-p e interpretação dos resultados em porcentagem para este modelo estão na Tabela 6. Para a variável região do país a região Sudeste foi utilizada como referência, e para as estações do ano o verão foi a referência. Cabe ressaltar que as comparações são feitas entre as categorias de referência e as demais categorias de cada variável.

Utilizando o modelo foi possível dizer que a primavera reduz em 11,57% a chance de contaminação por AFLA quando comparado ao verão, e as regiões Centro-Oeste e Sul reduzem em 16,89% e 10,42%, respectivamente a chance de contaminação por AFLA nas amostras de dieta total quando comparadas ao Sudeste.

Para as fumonisinas o modelo mais adequado possui as variáveis estação do ano, região do país e amplitude térmica no município de origem da amostra (Tabela 7). Com esse modelo foi observado que a chance de contaminação por FUMO é 10,95% menor na primavera do que no verão, a chance de uma amostra de dieta total da região Norte estar contaminada com FUMO é 61,77% maior do que uma amostra vinda da região Sudeste, já para amostras vindas do Sul a chance de contaminação é 16,89% menor do que para amostras do Sudeste. Com relação a amplitude térmica o aumento de 1 °C neste parâmetro resulta em uma redução de 16,31% da chance de contaminação por FUMO.

O modelo para a ocratoxina A levou em consideração a estação do ano e a região do país (Tabela 8). Foi observado que no inverno e no outono a chance de contaminação por OTA é 31,41% e 25,99% menor do que durante o verão, respectivamente. Além disso, amostras de dieta total vindas da região Sul têm 13,31% mais chance de estarem contaminadas com OTA do que amostras vindas do Sudeste.

O modelo desenvolvido para T-2 toxina também leva em consideração estação do ano e região do país (Tabela 9). Segundo este modelo, no inverno a chance de contaminação por T-2 em amostras de dieta total é 27,89% maior do que durante o verão. Já as regiões Centro-Oeste e Sul apresentaram chance de contaminação 12,54% e 9,61% menores, respectivamente do que a região Sudeste.

Para a zearalenona o modelo desenvolvido levou em consideração as variáveis região do país, umidade relativa do ar e precipitação no município de origem (Tabela 10). Para as regiões Centro-Oeste, Nordeste e Norte foi observada diminuição da chance de contaminação por ZEA quando comparado à região Sudeste (reduções de 19,99%, 33,17% e 42,02%, respectivamente). Para a região Sul foi observado aumento de 26,11% na chance de contaminação por ZEA nesta região quando comparado à região Sudeste. Com relação à precipitação, o aumento em 1 mm na precipitação aumenta em 32,05% a chance de contaminação por ZEA, por outro lado o aumento de 1% na umidade relativa do ar resulta em uma diminuição de 0,70% da chance de contaminação por esta toxina.

Para deoxinivalenol nenhum dos modelos testados foi adequado para explicar a contaminação por esta toxina nas amostras de dieta total.

Tabela 6 - Valores dos coeficientes β , erro padrão, *odds ratio*, intervalo de confiança (95%), Valor-p e interpretação dos resultados em porcentagem para o modelo de aflatoxinas.

Variável	Coeficientes (β)	Erro padrão	<i>Odds Ratio</i>	Intervalo de confiança (95%)	Valor-p	Interpretação em %
Intercepto	0,754	0,053	-	-	-	-
Inverno ¹	-0,028	0,059	0,97	0,87 - 1,09	0,634	-
Outono ¹	0,108	0,062	1,11	0,99 - 1,26	0,060	-
Primavera ¹	-0,123	0,060	0,88	0,79 - 0,99	0,048	-11,57
Centro-Oeste ²	-0,185	0,051	0,83	0,75 - 0,92	0,0003	-16,89
Nordeste ²	-0,254	0,144	0,78	0,58 - 1,03	0,063	-
Norte ²	-0,351	0,192	0,70	0,48 - 1,03	0,085	-
Sul ²	-0,110	0,047	0,90	0,82 - 0,98	0,016	-10,42

¹ categoria de referência: verão. ² categoria de referência: Sudeste. As demais categorias foram comparadas com as categorias de referência.

Tabela 7 - Valores dos coeficientes β , erro padrão, *odds ratio*, intervalo de confiança (95%), Valor-p e interpretação dos resultados em porcentagem para o modelo de fumonisinas.

Variável	Coeficientes (β)	Erro padrão	<i>Odds Ratio</i>	Intervalo de confiança (95%)	Valor-p	Interpretação em %
Intercepto	0,662	0,119	-	-	-	-
Inverno ¹	0,031	0,061	1,03	0,91 - 1,16	0,601	-
Outono ¹	0,030	0,063	1,03	0,91 - 1,17	0,641	-
Primavera ¹	-0,116	0,061	0,89	0,79 - 1,00	0,046	-10,95
Centro-Oeste ²	0,093	0,052	1,10	0,99 - 1,21	0,081	-
Nordeste ²	-0,058	0,148	0,94	0,71 - 1,26	0,690	-
Norte ²	0,481	0,196	1,62	1,10 - 2,38	0,039	61,77
Sul ²	-0,185	0,049	0,83	0,75 - 0,91	0,0002	-16,89
Amplitude Térmica	-0,178	0,083	0,84	0,71 - 0,98	0,032	-16,31

¹ categoria de referência: verão. ² categoria de referência: Sudeste. As demais categorias foram comparadas com as categorias de referência.

Tabela 8 - Valores dos coeficientes β , erro padrão, *odds ratio*, intervalo de confiança (95%), Valor-p e interpretação dos resultados em porcentagem para o modelo de ocratoxina A.

Variável	Coeficientes (β)	Erro padrão	<i>Odds Ratio</i>	Intervalo de confiança (95%)	Valor-p	Interpretação em %
Intercepto	0,625	0,057	-	-	-	-
Inverno ¹	-0,377	0,064	0,69	0,60 - 0,78	4,66e-08	-31,41
Outono ¹	-0,301	0,067	0,74	0,65 - 0,84	2,96e-05	-25,99
Primavera ¹	-0,045	0,066	0,96	0,84 - 1,09	0,494	-
Centro-Oeste ²	0,098	0,056	1,10	0,99 - 1,23	0,078	-
Nordeste ²	0,099	0,171	1,10	0,79 - 1,54	0,549	-
Norte ²	0,071	0,215	1,07	0,70 - 1,64	0,742	-
Sul ²	0,125	0,050	1,13	1,03 - 1,25	0,012	13,31

¹ categoria de referência: verão. ² categoria de referência: Sudeste. As demais categorias foram comparadas com as categorias de referência.

Tabela 9 - Valores dos coeficientes β , erro padrão, *odds ratio*, intervalo de confiança (95%), Valor-p e interpretação dos resultados em porcentagem para o modelo de T-2 toxina.

Variável	Coeficientes (β)	Erro padrão	<i>Odds Ratio</i>	Intervalo de confiança (95%)	Valor-p	Interpretação em %
Intercepto	0,251	0,056	-	-	-	-
Inverno ¹	0,246	0,063	1,28	1,13 - 1,45	0,0003	27,89
Outono ¹	0,039	0,066	1,04	0,91 - 1,18	0,534	-
Primavera ¹	0,110	0,065	1,12	0,98 - 1,27	0,081	-
Centro-Oeste ²	-0,134	0,053	0,87	0,79 - 0,97	0,013	-12,54
Nordeste ²	-0,348	0,140	0,68	0,52 - 0,90	0,981	-
Norte ²	0,129	0,186	1,14	0,79 - 1,64	0,528	-
Sul ²	-0,101	0,048	0,90	0,82 - 0,99	0,039	-9,61

¹ categoria de referência: verão. ² categoria de referência: Sudeste. As demais categorias foram comparadas com as categorias de referência.

Tabela 10 - Valores dos coeficientes β , erro padrão, *odds ratio*, intervalo de confiança (95%), Valor-p e interpretação dos resultados em porcentagem para o modelo de zearalenona.

Variável	Coeficientes (β)	Erro padrão	<i>Odds Ratio</i>	Intervalo de confiança (95%)	Valor-p	Interpretação em %
Intercepto	1,204	0,124	-	-	-	-
Centro-Oeste ¹	-0,223	0,042	0,80	0,74 - 0,87	6,97e-06	-19,99
Nordeste ¹	-0,403	0,120	0,67	0,53 - 0,85	0,006	-33,17
Norte ¹	-0,545	0,177	0,58	0,41 - 0,82	0,028	-42,02
Sul ¹	0,232	0,040	1,26	1,17 - 1,36	7,00e-07	26,11
Precipitação	0,278	0,121	1,32	1,04 - 1,67	0,029	32,05
Umidade	-0,007	0,002	0,99	0,99 - 1,00	0,0005	-0,70

¹ categoria de referência: Sudeste. As demais categorias foram comparadas com as categorias de referência.

Alguns modelos estatísticos já foram desenvolvidos com o objetivo de fazer estimativas e previsões com relação a presença e os níveis de contaminação de alimentos por micotoxinas. Porém, a micologia preditiva tem se concentrado principalmente no crescimento de fungos, enquanto os estudos sobre a previsão de micotoxinas em alimentos são escassos. A modelagem da produção de micotoxinas é um desafio devido à alta variabilidade no potencial micotoxigênico entre espécies e isolados. Além disso, as vias de biossíntese de micotoxinas e os fatores que as influenciam ainda são pouco compreendidos (ALDARS-GARCÍA et al., 2016). Por estas razões os modelos desenvolvidos foram explicativos (e não preditivos) da presença de micotoxinas em amostras de dieta total analisadas neste estudo. Porém, todas as variáveis utilizadas são de fácil obtenção e podem ser utilizadas para o desenvolvimento de modelos preditivos no futuro.

Apesar de não serem preditivos, os modelos desenvolvidos apresentam informações importantes sobre as amostras de dieta total analisadas entre 2017 e 2021. Estes modelos auxiliam na compreensão dos fatores que aumentam ou diminuem a chance de contaminação por micotoxinas nas amostras de dieta total analisadas, e conhecer sobre o problema de contaminação por micotoxinas é importante para que medidas de prevenção e controle possam ser implementadas de forma efetiva, minimizando as contaminações e prevenindo prejuízos econômicos e impactos na saúde dos animais.

Além disso, mudanças climáticas globais vêm alterando a ecologia dos fungos produtores de micotoxinas. Fungos que eram típicos de determinada região vêm se espalhando pelo mundo, enquanto outros têm seu crescimento e dispersão prejudicados pelas mudanças climáticas. Portanto, é evidente que tanto a biodiversidade quanto a ecologia de fungos toxigênicos podem ser profundamente influenciadas pelas mudanças climáticas (PERRONE et al., 2020). Estes fatores tornam a predição da contaminação por micotoxinas ainda mais difícil e os modelos explicativos criados podem ser uma boa ferramenta para o monitoramento de aflatoxinas, fumonisinas, ocratoxina A, T-2 toxina e zearalenona em amostras de dieta total.

6 CONCLUSÕES

Poucos estudos avaliam a contaminação por micotoxinas na alimentação animal no Brasil, e as altas frequências de contaminação observadas neste estudo enfatizam a importância de se melhorar o controle de micotoxinas no país, bem como a necessidade de adoção de regulamentações para micotoxinas na alimentação animal no Brasil. Neste estudo a maioria das amostras analisadas apresentaram contaminações abaixo dos limites máximos estabelecidos pela União Europeia e baixos valores de EDI, porém as coocorrências são muito observadas, e o conhecimento sobre estas coocorrências ainda é escasso e são necessários mais dados sobre estas interações e seus possíveis efeitos nos bovinos.

7 REFERÊNCIAS

ABIEC. **Beef Report, perfil da pecuária no Brasil**. 2020.

ADEGBEYE, M. J.; REDDY, P. R. K.; CHILAKA, C. A.; BALOGUN, O. B.; ELGHANDOUR, M. M. M. Y.; RIVAS-CACERES, R. R.; SALEM, A. Z. M. Mycotoxin toxicity and residue in animal products: Prevalence, consumer exposure and reduction strategies - A review. **Toxicon**, v. 177, p. 96-108, 2020.

ADHIKARI, M.; NEGI, B.; KAUSHIK, N.; ADHIKARI, A.; AL-KHEDHAIRY, A. A.; KAUSHIK, N. K.; CHOI, E. H. T-2 mycotoxin: toxicological effects and decontamination strategies. **Oncotarget**, v. 8, n. 20, p. 33933-33952, 2017.

AFSAH-HEJRI, L.; JINAP, S.; HAJEB, P.; RADU, S.; SHAKIBAZADEH, Sh. A review on mycotoxins in food and feed: Malaysia case study. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 12, n. 6, p. 629-651, 2013.

AGRIOPOULOU, S.; STAMATELOPOULOU, E.; VARZAKAS, T. Advances in Analysis and Detection of Major Mycotoxins in Foods. **Foods**, v. 9, n. 4, 2020.

ALASSANE-KPEMBI, I.; SCHATZMAYR, G.; TARANU, I.; MARIN, D.; PUEL, O.; OSWALD, I. P. Mycotoxins co-contamination: Methodological aspects and biological relevance of combined toxicity studies. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 57, n. 16, p. 3489-3507, 2017.

ALDARS-GARCÍA, L.; RAMOS, A. J.; SANCHIS, V.; MARÍN, S. Modeling postharvest mycotoxins in foods: recent research. **Current Opinion in Food Science**, v. 11, p. 46-50, 2016.

ALSHANNAQ, A.; YU, J. Occurrence, toxicity, and analysis of major mycotoxins in food. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 14, n. 6, p. 632, 2017.

APPLEBAUM, R. S.; BRACKETT, R. E.; WISEMAN, D. W.; MARTH, E. H. Responses of dairy cows to dietary aflatoxin: feed intake and yield, toxin content, and quality of milk of cows treated with pure and impure aflatoxin. **Journal of Dairy Science**, v. 65, n. 8, p. 1503-1508, 1982.

BATISTELLA, M.; ANDRADE, R. G.; BOLFE, E. L.; VICTORIA, D. C.; SILVA, G. B. S. Geotecnologias e gestão territorial da bovinocultura no Brasil. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 40, p. 251-260, 2011.

BATTACONE, G.; NUDDA, A.; PULINA, G. Effects of ochratoxin a on livestock production. **Toxins**, v. 2, n. 7, p. 1796-1824, 2010.

BATTILANI, P.; CAMARDO LEGGIERI, M.; ROSSI, V.; GIORNI, P. AFLA-maize, a mechanistic model for *Aspergillus flavus* infection and aflatoxin B₁ contamination in maize. **Computers and Electronics in Agriculture**, v. 94, p. 38-46, 2013.

BATTILANI, P.; PIETRI, A.; BARBANO, C.; SCANDOLARA, A.; BERTUZZI, T.; MAROCCO, A. Logistic Regression Modeling of Cropping Systems to Predict Fumonisin

Contamination in Maize, **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 21, p. 10433-10438, 2008.

BBOSA, G. S.; KITYA, D.; ODDA, J.; OGWAL-OKENG, J. Aflatoxins metabolism, effects on epigenetic mechanisms and their role in carcinogenesis. **Health**, v. 5, n. 10A, p. 14-34, 2013.

BEHRENS, M.; HÜWEL, S.; GALLA, H.; HUMPF, H. Efflux at the blood-brain barrier reduces the cerebral exposure to ochratoxin A, ochratoxin α , citrinin and dihydrocitrinone. **Toxins**, v. 13, n. 5, p. 327, 2021.

BENNETT, J. W.; KLICH, M. Mycotoxins. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 16, n. 3, p. 497-516, 2003.

BHAT, R. V.; MILLER, J. D. Mycotoxins and food supply. In: Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Food, Nutrition and Agriculture**, n. 1. Rome: FAO, n.d., 1991. 27-31.

BINDER, E. M.; TAN, L. M.; CHIN, L. J.; HANDL, J.; RICHARD, J. Worldwide occurrence of mycotoxins in commodities, feeds and feed ingredients. **Animal Feed Science and Technology**, v. 137, n. 3-4, p. 265–282, 2007.

BLACUTT, A. A.; GOLD, S. E.; VOSS, K. A.; GAO, M.; GLENN, A. E. *Fusarium verticillioides*: Advancements in understanding the toxicity, virulence, and niche adaptations of a model mycotoxigenic pathogen of maize. **Phytopathology**, v. 108, n. 3, p. 312-326, 2018.

BOUAZIZ, C.; BOUSLIMI, A.; KADRI, R.; ZAIED, C.; BACHA, H.; ABID-ESSEFI, S. The *in vitro* effects of zearalenone and T-2 toxins on Vero cells. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 65, n. 5, p. 497-501, 2013.

BRACARENSE, A. P. F. L.; LUCIOLI, J.; GRENIER, B.; PACHECO, G. D.; MOLL, W.; SCHATZMAYR, G.; OSWALD, I. P. Chronic ingestion of deoxynivalenol and fumonisin, alone or in interaction, induces morphological and immunological changes in the intestine of piglets. **British Journal of Nutrition**, v. 107, n. 12, p. 1776-1786, 2012.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Agropecuária Brasileira em Números: Valor Bruto da Produção - Lavouras e Pecuária**. 2021.

BRASIL. Ministério da Saúde. Resolução N° 7, de 18 de fevereiro de 2011. Dispõe sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, 09 de março de 2011.

BRITZI, M.; FRIEDMAN, S.; MIRON, J.; SOLOMON, R.; CUNEAH, O.; SHIMSHONI, J. A.; SOBACK, S.; ASHKENAZI, R.; ARMER, S.; SHLOSBERG, A. Carry-over of aflatoxin B₁ to aflatoxin M₁ in high yielding Israeli cows in mid- and late-lactation. **Toxins**, v. 5, n. 1, p. 173–183, 2013.

BUNNER, D. L.; MORRIS, E. R. Alteration of multiple cell membrane functions in L-6 myoblasts by T2 toxin: An important mechanism of action. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 92, n. 1, p. 113-121, 1988.

CALONI, F.; SPOTTI, M.; AUERBACH, H.; OP DEN CAMP, H.; GREMMELS, J. F.; POMPA, G. *In vitro* metabolism of fumonisin B₁ by ruminal microbiota. **Veterinary Research Communications**, v. 24, n. 6, p. 379–387, 2000.

CAMPBELL, M. L.; MAY, J. D.; HUFF, W. E.; DOERR, J. A. Evaluation of immunity of young broiler chickens during simultaneous aflatoxicosis and ochratoxicosis. **Poultry Science**, v. 62, n. 11, p. 2138-2144, 1983.

CARLSON, D. B.; WILLIAMS, D. E.; SPITSBERGEN, J. M.; ROSS, P. F.; BACON, C. W.; MEREDITH, F. I.; RILEY, R. T. Fumonisin B₁ promotes aflatoxin B₁ and N-methyl-N'-nitro-nitrosoguanidine initiated liver tumors in rainbow trout. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 172, n. 1, p. 29-36, 2001.

CAST - Council for Agricultural Science and Technology. **Mycotoxins: risks in plant, animal and human systems**. USA, Iowa: Task Force Report n° 139, 2003.

CAVRET, S.; LECOEUR, S. Fusariotoxin transfer in animal. **Food and Chemical Toxicology**, v. 44, n. 3, p. 444-453, 2006.

CAZARIN, K. C. C.; CORRÊA, C. R.; ZAMBRONE, F. A. D. Redução, refinamento e substituição do uso de animais em estudos toxicológicos: uma abordagem atual. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 40, n. 3, p. 289-299, 2004.

CHAMPEIL, A.; FOURBET, J. F.; DORÉ, T.; ROSSIGNOL, L. Influence of cropping system on *Fusarium* head blight and mycotoxin levels in winter wheat. **Crop Protection**, v. 23, n. 6, p. 531–537, 2004.

CHELI, F.; CAMPAGNOLI, A.; DELL'ORTO, V. Fungal populations and mycotoxins in silages: From occurrence to analysis. **Animal Feed Science and Technology**, v. 183, n. 1-2, p. 1-16, 2013.

CLARKE, R.; CONNOLLY, L.; FRIZZELL, C.; ELLIOTT, C. T. Cytotoxic assessment of the regulated, co-existing mycotoxins aflatoxin B₁, fumonisin B₁ and ochratoxin, in single, binary and tertiary mixtures. **Toxicon**, v. 90, p. 70-81, 2014.

CNA. **Panorama do Agro**. 2020. Disponível em: <https://www.cnabrazil.org.br/cna/panorama-do-agro#_ftn1>. Acesso em: 27 out 2021.

COLE, R. J. Etiology of Turkey "X" Disease in Retrospect: A Case for the Involvement of Cyclopiazonic Acid. **Mycotoxin Research**, v. 2, p. 3-7, 1986.

CORCUERA, L. A.; ARBILLAGA, L.; VETTORAZZI, A.; AZQUETA, A.; DE CERAIN, A. L. Ochratoxin A reduces aflatoxin B₁ induced DNA damage detected by the comet assay in HepG2 cells. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, n. 11, p. 2883-2889, 2011.

CREPPY, E. E.; CHIARAPPA, P.; BAUDRIMONT, I.; BORRACCI, P.; MOUKHA, S.; CARRATÙ, M. R. Synergistic effects of fumonisin B₁ and ochratoxin A: are *in vitro* cytotoxicity data predictive of *in vivo* acute toxicity? **Toxicology**, v. 201, n. 1-3, p. 115-123, 2004.

D'MELLO, J. P. F.; PLACINTA, C. M.; MACDONALD, A. M. C. *Fusarium* mycotoxins: a review of global implications for animal health, welfare and productivity. **Animal Feed Science and Technology**, v. 80, n. 3-4, p. 183–205, 1999.

DÄNICKE, S.; BREZINA, U. 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**, v. 60, p. 58-75, 2013.

DÄNICKE, S.; MATTHÄUS, K.; LEBZIEN, P.; VALENTA, H.; STEMME, K.; UEBERSCHÄR, K-H; RAZZAZI-FAZELI, E.; BÖHM, J.; FLACHOWSKY, G. Effects of *Fusarium* toxin-contaminated wheat grain on nutrient turnover, microbial protein synthesis and metabolism of deoxynivalenol and zearalenone in the rumen of dairy cows. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 89, n. 9-10, p. 303-315, 2005.

DE OLIVEIRA, C. P.; SOARES, N. F. F.; OLIVEIRA, T. V.; BAFFA JÚNIOR, J. C.; SILVA, W. A. Aflatoxin M₁ occurrence in ultra high temperature (UHT) treated fluid milk from Minas Gerais/Brazil. **Food Control**, v. 30, n. 1, p. 90-92, 2013.

DRAKOPOULOS, D.; SULYOK, M.; KRŠKA, R.; LOGRIECO, A. F.; VOGELGSANG, S. Raised concerns about the safety of barley grains and straw: A Swiss survey reveals a high diversity of mycotoxins and other fungal metabolites. **Food Control**, v. 125, n. 107919, p. 107919, 2021.

DRIEHUIS, F.; SPANJER, M. C.; SCHOLTEN, J. M.; TE GIFFEL, M. C. Occurrence of mycotoxins in maize, grass and wheat silage for dairy cattle in the Netherlands. **Food Additives & Contaminants**, v. 1, n. 1, p. 41-50, 2008.

EDRINGTON, T. S.; HARVEY, R. B.; KUBENA, L. F. Toxic effects of aflatoxin B₁ and ochratoxin A, alone and in combination, on chicken embryos. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 54, n. 3, p. 331-336, 1995.

EFSA PANEL ON CONTAMINANTS IN THE FOOD CHAIN (CONTAM). 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: T-2 and HT-2 toxins in food and feed. **EFSA Journal**, v. 9, n. 12, p. 2481, 2011.

EFSA PANEL ON CONTAMINANTS IN THE FOOD CHAIN (CONTAM); KNUTSEN, H. K.; ALEXANDER, J.; BARREGÅRD, L.; BIGNAMI, M.; BRÜSCHWEILER, B.; CECCATELLI, S.; COTTRILL, B.; DINOVI, M.; GRASL-KRAUPP, B.; HOGSTRAND, C.; HOOGENBOOM, L. R.; NEBBIA, C. S.; OSWALD, I. P.; PETERSEN, A.; ROSE, M.; ROUDOT, A.; SCHWERDTLE, T.; VLEMINCKX, C.; VOLLMER, G.; WALLACE, H.; DE SAEGER, S.; ERIKSEN, G. S.; FARMER, P.; FREMY, J.; GONG, Y.; MEYER, K.; NAEGELI, H.; PARENT-MASSIN, D.; RIETJENS, I.; EGMOND, H.; ALTIERI, A.; ESKOLA, M.; GERGLOVA, P.; BORDAJANDI, L. R.; BENKOVA, B.; DORR, B.; GKRIILLAS, A.; GUSTAVSSON, N.; MANEN, M.; EDLER, L. Risks to human and animal health related to the presence of deoxynivalenol and its acetylated and modified forms in food and feed. **EFSA Journal**, v. 15, n. 9, p. e04718, 2017.

EFSA PANEL ON CONTAMINANTS IN THE FOOD CHAIN (CONTAM); KNUTSEN, H.; ALEXANDER, J.; BARREGÅRD, L.; BIGNAMI, M.; BRÜSCHWEILER, B.;

CECCATELLI, S.; COTTRILL, B.; DINOVI, M.; EDLER, L.; GRASL-KRAUPP, B.; HOGSTRAND, C.; HOOGENBOOM, L. R.; NEBBIA, C. S.; PETERSEN, A.; ROSE, M.; ROUDOT, A.; SCHWERDTLE, T.; VLEMINCKX, C.; VOLLMER, G.; WALLACE, H.; DALL'ASTA, C.; ERIKSEN, G.; TARANU, I.; ALTIERI, A.; ROLDAN-TORRES, R.; OSWALD, I. P. Risks for animal health related to the presence of fumonisins, their modified forms and hidden forms in feed. **EFSA Journal**, v. 16, n. 5, p. e05242, 2018.

EL GOLLI-BENNOUR, E.; KOUIDHI, B.; BOUSLIMI, A.; ABID-ESSEFI, S.; HASSEN, W.; BACHA, H. Cytotoxicity and genotoxicity induced by aflatoxin B₁, ochratoxin A and their combination in cultured vero cells. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology**, v. 24, n. 1, p. 42-50, 2010.

EL KHOURY, A.; ATOUI, A. Ochratoxin a: general overview and actual molecular status. **Toxins**, v. 2, n. 4, p. 461-493, 2010.

ERIKSEN, G. S.; PETTERSSON, H. Toxicological evaluation of trichothecenes in animal feed. **Animal Feed Science and Technology**, v. 114, n. 1-4, p. 205-239, 2004.

EUROPEAN UNION (EU). Commission Regulation (EC) n° 100 of 31 October 2003. **Official Journal of the European Union**. L. 285, p. 33-37, 31 October 2003.

EUROPEAN UNION (EU). Commission Regulation (EC) n° 165 of 03 April 2013. **Official Journal of the European Union**. L. 91, p. 12-14, 03 April 2013.

EUROPEAN UNION (EU). Commission Regulation (EC) n° 1881 of 19 December 2006. **Official Journal of the European Union**. L. 364, p. 5-24, 19 December 2006a.

EUROPEAN UNION (EU). Commission Regulation (EC) n° 576 of 16 August 2006. **Official Journal of the European Union**. L. 229, p. 7-9, 16 August 2006b.

FINK-GREMMELS, J. The role of mycotoxins in the health and performance of dairy cows. **Veterinary Journal**, v. 176, n. 1, p. 84-92, 2008.

FLORES-FLORES, M. E.; LIZARRAGA, E.; LÓPEZ DE CERAIN, A.; GONZÁLEZ-PEÑAS, E. Presence of mycotoxins in animal milk: A review. **Food Control**, v. 53, p. 163-176, 2015.

FORSELL, J. H.; WITT, M. F.; TAI, J. H.; JENSEN, R.; PESTKA, J. J. Effects of 8-week exposure of the B6c3f1 mouse to dietary deoxynivalenol (vomitoxin) and zearalenone. **Food and Chemical Toxicology**, v. 24, n. 3, p. 213-219, 1986.

FRANCO, L. T.; PETTA, T.; ROTTINGHAUS, G. E.; BORDIN, K.; GOMES, G. A.; OLIVEIRA, C. A. F. Co-occurrence of mycotoxins in maize food and maize-based feed from small-scale farms in Brazil: a pilot study. **Mycotoxin Research**, v. 35, n. 1, p. 65-73, 2019.

FREIRE, F. C. O.; VIEIRA, I. G. P.; GUEDES, M. I. F.; MENDES, F. N. P. Micotoxinas: importância na alimentação e na saúde humana e animal. **Embrapa Agroindústria Tropical**, (Documentos, 110). Fortaleza, 48 p, 2007.

FRIEND, D. W.; THOMPSON, B. K.; TRENHOLM, H. L.; BOERMANS, H. J.; HARTIN, K. E.; PANICH, P. L. Toxicity of T-2 toxin and its interaction with deoxynivalenol when fed to young pigs. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 72, n. 3, p. 703-711, 1992.

FURUYA, H.; OHKAWARA, S.; NAGASHIMA, K.; ASANUMA, N.; HINO, T. Dietary sphingomyelin alleviates experimental inflammatory bowel disease in mice. **International Journal for Vitamin and Nutrition Research**, v. 78, n. 1, p. 41-49, 2008.

GALLO, A.; GIUBERTI, G.; FRISVAD, J. C.; BERTUZZI, T.; NIELSEN, K. F. Review on mycotoxin issues in ruminants: Occurrence in forages, effects of mycotoxin ingestion on health status and animal performance and practical strategies to counteract their negative effects. **Toxins**, v. 7, n. 8, p. 3057-3111, 2015.

GARCIA, A. R.; AVILA, E.; ROSILES, R.; PETRONE, V. M. Evaluation of two mycotoxin binders to reduce toxicity of broiler diets containing ochratoxin A and T-2 toxin contaminated grain. **Avian Diseases**, v. 47, n. 3, p. 691-699, 2003.

GAZZOTTI, T.; LUGOBONI, B.; ZIRONI, E.; BARBAROSSA, A.; SERRAINO, A.; PAGLIUCA, G. Determination of fumonisin B₁ in bovine milk by LC-MS/MS. **Food Control**, v. 20, n. 12, p. 1171-1174, 2009.

GELDERBLOM, W. C. A.; MARASAS, W. F. O.; LEBEPE-MAZUR, S.; SWANEVELDER, S.; VESSEY, C. J.; HALL, P. D. Interaction of fumonisin B₁ and aflatoxin B₁ in a short-term carcinogenesis model in rat liver. **Toxicology**, v. 171, n. 2-3, p. 161-173, 2002.

GIRISH, C. K.; DEVEGOWDA, C. Efficacy of glucomannancontaining yeast product (Mycosorb[®]) and hydrated sodium calcium aluminosilicate in preventing the individual and combined toxicity of aflatoxin and T-2 toxin in commercial broilers. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 19, n. 6, p. 877-883, 2006.

GOMES, R. C.; FEIJÓ, G. L. D.; CHIARI, L. **Evolução e Qualidade da Pecuária Brasileira**. Campo Grande: EMBRAPA Gado de Corte, 2017. Nota técnica.

GORYACHEVA, I. Y.; DE SAEGER, S.; EREMIN, S. A.; VAN PETEGHEM, C. Immunochemical methods for rapid mycotoxin detection: evolution from single to multiple analyte screening: a review. **Food Additives and Contaminants**, v. 24, n. 10, p. 1169-1183, 2007.

GRENIER, B.; LOUREIRO-BRACARENSE, A. P.; LUCIOLI, J.; PACHECO, G.; COSSALTER, A. M.; MOLL, W. D.; SCHATZMAYR, G.; OSWALD, I. P. Individual and combined effects of subclinical doses of deoxynivalenol and fumonisins in piglets. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 55, n. 5, p. 761-771, 2011.

GRENIER, B.; OSWALD, I. P. Mycotoxin co-contamination of food and feed: meta-analysis of publications describing toxicological interactions. **World Mycotoxin Journal**, v. 4, n. 3, p. 285-313, 2011.

GRUBER-DORNINGER, C.; JENKINS, T.; SCHATZMAYR, G. Global mycotoxin occurrence in feed: A ten-year survey. **Toxins**, v. 11, n. 7, p. 375, 2019.

GRUBER-DORNINGER, C.; JENKINS, T.; SCHATZMAYR, G. Multi-mycotoxin screening of feed and feed raw materials from Africa. **World Mycotoxin Journal**, v. 11, no. 3, p. 369-383, 2018.

HARRELL, F. E. JR. **Regression Modeling Strategies: With Applications to Linear Models, Logistic Regression, and Survival Analysis**. 2nd edition. New York: Springer, 2001.

HE, C. H.; FAN, Y. H.; WANG, Y.; HUANG, C. Y.; WANG, X. C.; ZHANG, H. B. The individual and combined effects of deoxynivalenol and aflatoxin B-1 on primary hepatocytes of *Cyprinus carpio*. **International Journal of Molecular Science**, v. 11, n. 10, p. 3760-3768, 2010.

HOERR, F. J.; CARLTON, W. W.; YAGEN, B.; JOFFE, A. Z. Mycotoxicosis produced in broiler chickens by multiple doses of either T-2 toxin or diacetoxyscirpenol. **Avian Pathology**, v. 11, n. 3, p. 369-383, 1982.

HOSMER, D. W, Jr.; LEMESHOW, S. A.; STURDIVANT, R. X. **Regressão Logística Aplicada**. 3 ed. Hoboken, NJ: Wiley, 2013.

HOSMER, D. W.; LEMESHOW, S. **Applied Logistic Regression**. 2nd edition. USA: Wiley Series in Probability and Statistics, 2000.

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. Simultaneous determination of aflatoxin M₁, ochratoxin A, zearalenone and α -zearalenol in milk by UHPLC-MS/MS. **Food Chemistry**, v. 146, p. 242-249, 2014.

HUFF, W. E.; DOERR, J. A. Synergism between aflatoxin and ochratoxin A in broiler chickens. **Poultry Science**, v. 60, n. 3, p. 550-555, 1981.

HUFF, W. E.; DOERR, J. A.; WABECK, C. J.; CHALOUPKA, G. W.; MAY, J. D.; MERKLEY, J. W. Individual and combined effects of aflatoxin and ochratoxin A on bruising in broiler chickens. **Poultry Science**, v. 62, n. 9, p. 1764-1771, 1983.

HUFF, W. E.; DOERR, J. A.; WABECK, C. J.; CHALOUPKA, G. W.; MAY, J. D.; MERKLEY, J. W. The individual and combined effects of aflatoxin and ochratoxin A on various processing parameters of broiler chickens. **Poultry Science**, v. 63, n. 11, p. 2153-2161, 1984.

HUFF, W. E.; HARVEY, R. B.; KUBENA, L. F.; ROTTINGHAUS, G. E. Toxic synergism between aflatoxin and T-2 toxin in broiler chickens. **Poultry Science**, v. 67, n. 10, p. 1418-1423, 1988.

HUFF, W. E.; KUBENA, L. F.; HARVEY, R. B.; HAGLER, W. M.; SWANSON, S. P.; PHILLIPS, T. D.; CREGER, C. R. Individual and combined effects of aflatoxin and deoxynivalenol (DON, vomitoxin) in broiler chickens. **Poultry Science**, v. 65, n. 7, p. 1291-1298, 1986.

HULT, K.; TEILING, A.; GATENBECK, S. Degradation of ochratoxin A by a ruminant. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 32, n. 3, p. 443-444, 1976.

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

IARC - INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. **Chemical Agents and Related Occupations**. Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, v. 100F (A review of human carcinogens). Lyon: IARC, 2012. p. 225-244.

IARC - INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. **Some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins**. Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, v. 56. Lyon: IARC, 1993. p. 1-599.

IHA, M. H.; BARBOSA, C. B.; OKADA, I. A.; TRUCKSESS, M. W. Occurrence of aflatoxin M₁ in dairy products in Brazil. **Food Control**, v. 22, n. 12, p. 1971-1974, 2011.

IQBAL, J.; ASGHAR, M. A.; AHMED, A.; KHAN, M. A.; JAMIL, K. Aflatoxins contamination in Pakistani brown rice: a comparison of TLC, HPLC, LC-MS/MS and ELISA techniques. **Toxicology Mechanisms and Methods**, v. 20, n. 8, p. 544-551, 2014.

JIANG, Y. H.; YANG, H. J.; LUND, P. Effect of aflatoxin B₁ on *in vitro* ruminal fermentation of rations high in alfalfa hay or ryegrass hay. **Animal Feed Science and Technology**, v. 175, n. 1-2, p. 85-89, 2012.

JUAN, C.; BERRADA, H.; MAÑES, J.; OUESLATI, S. Multi-mycotoxin determination in barley and derived products from Tunisia and estimation of their dietary intake. **Food and Chemical Toxicology**, v. 103, p. 148-156, 2017.

KALOREY, D. R.; KURKURE, N. V.; RAMGAONKAR, J. S.; SAKHARE, P. S.; WARKE, S.; NIGOT, N. K. Effect of polyherbal feed supplement 'Growell' during induced aflatoxicosis, ochratoxicosis and combined mycotoxicoses in broilers. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 18, n. 3, p. 375-383, 2005.

KELLERMAN, T. S.; MARASAS, W. F. O.; THIEL, P. G.; GELDERBLUM, W. C.; CAWOOD, M.; COETZER, J. A. Leukoencephalomalacia in two horses induced by oral dosing of fumonisin B₁. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v. 57, n. 4, p. 269-275, 1990.

KEMBOI, D. C.; ANTONISSEN, G.; OCHIENG, P. E.; CROUBELS, S.; OKOTH, S.; KANGETHE, E. K.; FAAS, J.; LINDAHL, J. F.; GATHUMBI, J. K. A review of the impact of mycotoxins on dairy cattle health: Challenges for food safety and dairy production in Sub-Saharan Africa. **Toxins**, v. 12, n. 4, p. 222, 2020.

KETNEY, O.; SANTINI, A.; OANCEA, S. Recent aflatoxin survey data in milk and milk products: A review. **International Journal of Dairy Technology**, v. 70, n. 3, p. 320-331, 2017.

KIESSLING, K. H.; PETTERSSON, H.; SANDHOLM, K.; OLSEN, M. Metabolism of aflatoxin, ochratoxin, zearalenone, and three trichothecenes by intact rumen fluid, rumen protozoa, and rumen bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 47, n. 5, p. 1070-1073, 1984.

KING, R. R.; MCQUEEN, R. E.; LEVESQUE, D.; GREENHALGH, R. Transformation of deoxynivalenol (vomitoxin) by rumen microorganisms. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 32, n. 5, p. 1181–1183, 1984.

KOSICKI, R.; BŁAJET-KOSICKA, A.; GRAJEWSKI, J.; TWARUŻEK, M. Multiannual mycotoxin survey in feed materials and feedingstuffs. **Animal Feed Science and Technology**, v. 215, p. 165-180, 2016.

KŐSZEGI, T.; POÓR, M. Ochratoxin A: Molecular interactions, mechanisms of toxicity and prevention at the molecular level. **Toxins**, v. 8, n. 4, p. 111, 2016.

KOVALSKY, P.; KOS, G.; NAHER, K.; SCHWAB, C.; JENKINS, T.; SCHATZMAYR, G.; SULYOK, M.; KRKA, R. Co-Occurrence of Regulated, Masked and Emerging Mycotoxins and Secondary Metabolites in Finished Feed and Maize - An Extensive Survey. **Toxins**, v.8, n.12, p. 1-29, 2016.

KRKA, R.; MOLINELLI, A. Rapid test strips for analysis of mycotoxins in food and feed. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 393, n. 1, p. 67-71, 2009.

KRKA, R.; SCHUBERT-ULLRICH, P.; MOLINELLI, A.; SULYOK, M.; MACDONALD, S.; CREWS, C. Mycotoxin analysis: An update. **Food Additives and Contaminants**, v. 25, p. 152-163, 2008.

KRKA, R.; WELZIG, E.; BERTHILLER, F.; MOLINELLI, A.; MIZAIKOFF, B. Advances in the analysis of mycotoxins and its quality assurance. **Food Additives and Contaminants**, v. 22, n. 4, p. 345-353, 2005.

KUBENA, L. F.; EDRINGTON, T. S.; HARVEY, R. B.; BUCKLEY, S. A.; PHILLIPS, T. D.; ROTTINGHAUS, G. E.; CASPER, H. H. Individual and combined effects of fumonisin B₁ present in *Fusarium moniliforme* culture material and T-2 toxin or deoxynivalenol in broiler chicks. **Poultry Science**, v. 76, n. 9, p. 1239-1247, 1997a.

KUBENA, L. F.; EDRINGTON, T. S.; HARVEY, R. B.; PHILLIPS, T. D.; SARR, A. B.; ROTTINGHAUS, G. E. Individual and combined effects of fumonisin B₁ present in *Fusarium moniliforme* culture material and diacetoxyscirpenol or ochratoxin A in turkey poults. **Poultry Science**, v. 76, n. 2, p. 256-264, 1997b.

KUBENA, L. F.; EDRINGTON, T. S.; KAMPSHOLTZAPPLE, C.; HARVEY, R. B.; ELISSALDE, M. H.; ROTTINGHAUS, G. E. Effects of feeding fumonisin B₁ present in *Fusarium moniliforme* culture material and aflatoxin singly and in combination to turkey poults. **Poultry Science**, v. 74, n. 8, p. 1295-1303, 1995a.

KUBENA, L. F.; EDRINGTON, T. S.; KAMPS-HOLTZAPPLE, C.; HARVEY, R. B.; ELISSALDE, M. H.; ROTTINGHAUS, G. E. Influence of fumonisin B₁, present in *Fusarium moniliforme* culture material, and T-2 toxin on turkey poults. **Poultry Science**, v. 74, n. 2, p. 306-313, 1995b.

KUBENA, L. F.; HARVEY, R. B.; HUFF, W. E.; CORRIER, D. E.; PHILLIPS, T. D.; ROTTINGHAUS, G. E. Influence of ochratoxin A and T-2 toxin singly and in combination on broiler chickens. **Poultry Science**, v. 68, n. 7, p. 867-872, 1989b.

KUBENA, L. F.; HARVEY, R. B.; HUFF, W. E.; CORRIER, D. E.; PHILLIPS, T. D.; ROTTINGHAUS, G. E. Efficacy of a hydrated sodium calcium aluminosilicate to reduce the toxicity of aflatoxin and T-2 toxin. **Poultry Science**, v. 69, n. 7, p. 1078-1086, 1990.

KUBENA, L. F.; HUFF, W. E.; HARVEY, R. B.; CORRIER, D. E.; PHILLIPS, T. D.; CREGER, C. R. Influence of ochratoxin A and deoxynivalenol on growing broiler chicks. **Poultry Science**, v. 67, n. 2, p. 253-260, 1988.

KUBENA, L. F.; HUFF, W. E.; HARVEY, R. B.; PHILLIPS, T. D.; ROTTINGHAUS, G. E. Individual and combined toxicity of deoxynivalenol and T-2 toxin in broiler chicks. **Poultry Science**, v. 68, n. 5, p. 622-626, 1989a.

KUIPER-GOODMAN, T.; SCOTT, P. M.; WATANABE, H. Risk assessment of the mycotoxin zearalenone. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 7, n. 3, p. 253-306, 1987.

LABUDA, R.; PARICH, A.; BERTHILLER, F.; TANČINOVÁ, D. Incidence of trichothecenes and zearalenone in poultry feed mixtures from Slovakia. **International Journal of Food Microbiology**, v. 105, n. 1, p. 19-25, 2005.

LEI, M. Y.; ZHANG, N. Y.; QI, D. S. *In vitro* investigation of individual and combined cytotoxic effects of aflatoxin B₁ and other selected mycotoxins on the cell line Porcine Kidney 15. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 65, n. 7-8, p. 1149-1157, 2013.

LI, Y.; WANG, Z.; BEIER, R. C.; SHEN, J.; DE SMET, D.; DE SAEGER, S.; ZHANG, S. T-2 Toxin, a Trichothecene Mycotoxin: Review of Toxicity, Metabolism, and Analytical Methods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 8 p. 3441-3453, 2011.

LIN, L.; ZHANG, J.; WANG, P.; WANG, Y.; CHEN, J. Thin-layer chromatography of mycotoxins and comparison with other chromatographic methods. **Journal of Chromatography A**, v. 815, n. 1, p. 3-20, 1998.

LOISEAU, N.; DEBRAUWER, L.; SAMBOU, T.; BOUHET, S.; MILLER, J. D.; MARTIN, P. G.; VIADÈRE, J.; PINTON, P.; PUEL, O.; PINEAU, T.; TULLIEZ, J.; GALTIER, P.; OSWALD, I. P. Fumonisin B-1 exposure and its selective effect on porcine jejunal segment: sphingolipids, glycolipids and transepithelial passage disturbance. **Biochemical Pharmacology**, v.74, n. 1, p. 144-152, 2007.

MA, L.; XU, W.; HE, X.; HUANG, K.; WANG, Y.; LUO, Y. Determination of fumonisins B1 and B2 in Chinese rice wine by HPLC using AQC precolumn derivatisation. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 93, n. 5, p. 1128-1133, 2013.

MADHESWARAN, R.; BALACHANDRAN, C.; MANOHAR, B. M. Influence of dietary culture material containing aflatoxin and T-2 toxin on certain serum biochemical constituents in Japanese quail. **Mycopathologia**, v. 158, n. 3, p. 337-341, 2004.

MAGAN, N.; HOPE, R.; CAIRNS, V.; ALDRED, D. Post-harvest fungal ecology: Impact of fungal growth and mycotoxin accumulation in stored grain. **Epidemiology of Mycotoxin Producing Fungi**. Dordrecht: Springer Netherlands, 2003. p. 723-730.

MALEKINEJAD, H.; SCHOEVERS, E. J.; DAEMEN, I. J. J. M.; ZIJISTRA, C.; COLENBRANDER, B.; FINK-GREMMELS, J.; ROELEN, B. A. J. Exposure of oocytes to the *Fusarium* toxins zearalenone and deoxynivalenol causes aneuploidy and abnormal embryo development in pigs. **Biology of Reproduction**, v. 77, n. 5, p. 840-847, 2007.

MANN, D. D.; BUENING, G. M.; OSWEILER, G. D.; HOOK, B. S. Effect of subclinical levels of T-2 toxin on the bovine cellular immune system. **Canadian Journal of Comparative Medicine**, v. 48, n. 3, p. 308-312, 1984.

MARAGOS, C. M.; BUSMAN, M. Rapid and advanced tools for mycotoxin analysis: a review. **Food Additives & Contaminants**, v. 27, n. 5, p. 688-700, 2010.

MARESCA, M. From the gut to the brain: journey and pathophysiological effects of the food-associated trichothecene mycotoxin deoxynivalenol. **Toxins**, v. 5, n. 4, p. 784-820, 2013.

MARIN, S.; RAMOS, A. J.; CANO-SANCHO, G.; SANCHIS, V. Mycotoxins: occurrence, toxicology, and exposure assessment. **Food and Chemical Toxicology**, v. 60, p. 218-237, 2013.

MARTINS, F. A.; FERREIRA, F. M. D.; FERREIRA, F. D.; BANDO, E.; NERILO, S. B.; HIROOKA, E. Y.; MACHINSKI, M., Jr. Daily intake estimates of fumonisins in corn-based food products in the population of Parana, Brazil. **Food Control**, v. 26, n. 2, p. 614-618, 2012.

MASOERO, F.; GALLO, A.; MOSCHINI, M.; PIVA, G.; DIAZ, D. Carryover of aflatoxin from feed to milk in dairy cows with low or high somatic cell counts. **Animal: An International Journal of Animal Bioscience**, v. 1, n. 9, p. 1344-1350, 2007.

MATHUR, S.; CONSTABLE, P. D.; EPPLEY, R. M.; WAGGONER, A. L.; TUMBLESON, M. E.; HASCHEK, W. M. Fumonisin B(1) is hepatotoxic and nephrotoxic in milk-fed calves. **Toxicological Sciences**, v. 60, n. 2, p. 385-396, 2001.

MCCULLOUGH, P.; NELDER, J. A. **Generalized Linear Models**. Vol. 37 of Monographs on Statistics and Applied Probability. 2nd edition. New York: Chapman & Hall/CRC, 1989.

MCKEAN, C.; TANG, L.; BILLAM, M.; TANG, M.; THEODORAKIS, C. W.; KENDALL, R. J.; WANG, J. S. Comparative acute and combinative toxicity of aflatoxin B₁ and T-2 toxin in animals and immortalized human cell lines. **Journal of Applied Toxicology**, v. 26, n. 2, p. 139-147, 2006b.

MCKEAN, C.; TANG, L.; TANG, M.; BILLAM, M.; WANG, Z.; THEODORAKIS, C. W.; KENDALL, R. J.; WANG, J. S. Comparative acute and combinative toxicity of aflatoxin B₁ and fumonisin B₁ in animals and human cells. **Food and Chemical Toxicology**, v. 44, n. 6, p. 868-876, 2006a.

MCKENZIE, R. A.; BLANEY, B. J.; CONNOLE, M. D.; FITZPATRICK, L. A. Acute aflatoxicosis in calves fed peanut hay. **Australian Veterinary Journal**, v. 57, n. 6, p. 284-286, 1981.

MERRILL, A. H.; SULLARDS, M. C.; WANG, E.; VOSS, K. A.; RILEY, R. T. Sphingolipid metabolism: roles in signal transduction and disruption by fumonisins. **Environmental Health Perspectives**, v. 109, suppl. 2, p. 283-289, 2001.

MEUCCI, V.; SOLDANI, G.; RAZZUOLI, E.; SAGGESE, G.; MASSART, F. Mycoestrogen pollution of Italian infant food. **The Journal of Pediatrics**, v. 159, n. 2, p. 278-283, 2011.

MEYER, O. Testing and assessment strategies, including alternative and new approaches. **Toxicology Letters**, v. 140-141, p. 21-30, 2003.

MEYER, V. R. **Practical High-Performance Liquid Chromatography**. 5th ed. United Kingdom: Wiley, 2010.

MINERVINI, F.; DELL'AQUILA, M. E. Zearalenone and Reproductive Function in Farm Animals. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 9, n. 12, p. 2570-2584, 2008.

MITCHELL, N. J.; BOWERS, E.; HURBURGH, C.; WU, F. Potential economic losses to the US corn industry from aflatoxin contamination. **Food Additives & Contaminants. Part A, Chemistry, Analysis, Control, Exposure & Risk Assessment**, v. 33, n. 3, p. 540-550, 2016.

MOBASHAR, M.; BLANK, R.; HUMMEL, J.; WESTPHAL, A.; THOLEN, E.; SÜDEKUM, K-H. Ruminal ochratoxin A degradation - Contribution of the different microbial populations and influence of diet. **Animal Feed Science and Technology**, v. 171, n. 2-4, p. 85-97, 2012.

MOJTAHEDI, M.; MESGARAN, M. D.; VAKILI, S. A.; HAYATI-ASHTIANI, M. Effect of Aflatoxin B₁ on *in vitro* Rumen Microbial Fermentation Responses Using Batch Culture. **Annual Research & Review in Biology**, v. 3, v. 4, p. 686-693, 2013.

MONTGOMERY, D. C.; RUNGER, G. C. **Applied Statistics and Probability for Engineers**. 5 ed. New York: John Wiley & Sons, 2010.

MORENO, E. C.; GARCIA, G. T.; ONO, M. A.; VIZONI, E.; KAWAMURA, O.; HIROOKA, E. Y.; ONO, E. Y. S. Co-occurrence of mycotoxins in corn samples from the Northern region of Paraná State, Brazil. **Food Chemistry**, v. 116, n. 1, p. 220-226, 2009.

MORETTI, A.; LOGRIECO, A. F.; SUSCA, A. Mycotoxins: An Underhand Food Problem. In: MORETTI, A.; SUSCA, A. **Mycotoxigenic Fungi**. v. 1542., New York: Humana Press, 2017. p. 3-12.

MURPHY, P. A.; HENDRICH, S.; LANDGREN, C.; BRYANT, C. M. Food Mycotoxins: An Update. **Journal of Food Science**, v. 71, n. 5, p. R51-R65, 2006.

NELDER, J.; WEDDERBURN, R. W. M. Generalized linear models. **Journal of the Royal Statistical Society**, v. 135, n. 3, p. 370-384, 1972.

NICK, T. G.; CAMPBELL, K. M. Logistic Regression. In: AMBROSIUS, W.T. **Topics in Biostatistics**. Vol. 404: Methods in Molecular Biology. Totowa, NJ: Humana Press, 2007. p. 273-301.

NOLAN, P.; AUER, S.; SPEHAR, A.; ELLIOTT, C. T.; CAMPBELL, K. Current trends in rapid tests for mycotoxins. **Food Additives & Contaminants: Part A**, v. 36, n. 5, p. 800-814, 2019.

O'BRIEN, E.; DIETRICH, D. R. Ochratoxin A: the continuing enigma. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 35, n. 1, p. 33-60, 2005.

OGIDO, R.; OLIVEIRA, C. A. F.; LEDOUX, D. R.; ROTTINGHAUS, G. E.; CORREA, B.; BUTKERAITIS, P.; REIS, T. A.; GONCALES, E.; ALBUQUERQUE, R. Effects of prolonged administration of aflatoxin B₁ and fumonisin B₁ in laying Japanese quail. **Poultry Science**, v. 83, n. 12, p. 1953-1958, 2004.

OLIVEIRA, C. A. F.; FRANCO, R. C.; ROSIM, R. E.; FERNANDES, A. M. Survey of aflatoxin M₁ in cheese from the North-east region of São Paulo, Brazil. **Food Additives & Contaminants. Part B, Surveillance**, v. 4, n. 1, p. 57-60, 2011.

OMAR, H. E. M. Mycotoxins-Induced Oxidative Stress and Disease. **Mycotoxin and Food Safety in Developing Countries**. London: InTechOpen, 2013.

OPER. **Você sobreviveria no Titanic? Um exemplo de Regressão Logística**. 2017. Disponível em: <<https://www.abgconsultoria.com.br/blog/voce-sobreviveria-no-titanic-um-exemplo-de-regressao-logistica/>>. Acesso em: 10 fev 2021.

ORSI, R. B.; OLIVEIRA, C. A. F.; DILKIN, P.; XAVIER, J. G.; DIREITO, G. M.; CORREA, B. Effects of oral administration of aflatoxin B₁ and fumonisin B₁ in rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). **Chemico-Biological Interactions**, v. 170, n. 3, p. 201-208, 2007.

OSTRY, V.; MALIR, F.; TOMAN, J.; GROSSE, Y. Mycotoxins as human carcinogens - the IARC Monographs classification. **Mycotoxin Research**, v. 33, n. 1, p. 65-73, 2016.

PANG, J.; ZHOU, Q.; SUN, X.; LI, L.; ZHOU, B.; ZENG, F.; ZHAO, Y.; SHEN, W.; SUN, Z. Effect of low-dose zearalenone exposure on reproductive capacity of male mice. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 333, p. 60-67, 2016.

PATERSON, R. R. M.; LIMA, N. How will climate change affect mycotoxins in food? **Food Research International**, v. 43, n. 7, p. 1902-1914, 2010.

PATTERSON, D. S. P.; SHREEVE, B. J.; ROBERTS, B. A.; BERRETT, S.; BRUSH, P. J.; GLANCY, E. M.; KROGH, P. Effect on calves of barley naturally contaminated with ochratoxin A and groundnut meal contaminated with low concentrations of aflatoxin B₁. **Research in Veterinary Science**, v. 31, n. 2, p. 213-218, 1981.

PATTONO, D.; GALLO, P. F.; CIVERA, T. Detection and quantification of Ochratoxin A in milk produced in organic farms. **Food Chemistry**, v. 127, n. 1, p. 374-377, 2011.

PATTONO, D.; GROSSO, A.; STOCCO, P. P.; PAZZI, M.; ZEPPA, G. Survey of the presence of patulin and ochratoxin A in traditional semi-hard cheeses. **Food Control**, v. 33, n. 1, p. 54-57, 2013.

PAVLOVI, N. M. Balkan endemic nephropathy--current status and future perspectives. **Clinical Kidney Journal**, v. 6, n. 3, p. 257-265, 2013.

PELES, F.; SIPOS, P.; GYŐRI, Z.; PFLIEGLER, W. P.; GIACOMETTI, F.; SERRAINO, A.; PAGLIUCA, G.; GAZZOTTI, T.; PÓCSI, I. Adverse effects, transformation and channeling of aflatoxins into food raw materials in livestock. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, p. 2861, 2019.

PEREIRA, V. L.; FERNANDES, J. O.; CUNHA, S. C. Mycotoxins in cereals and related foodstuffs: A review on occurrence and recent methods of analysis. **Trends in Food Science & Technology**, v. 36, n. 2, p. 96-136, 2014.

PERRONE, G.; FERRARA, M.; MEDINA, A.; PASCALE, M.; MAGAN, N. Toxicogenic fungi and mycotoxins in a climate change scenario: Ecology, genomics, distribution, prediction and prevention of the risk. **Microorganisms**, v. 8, n. 10, p. 1496, 2020.

PESTKA, J. J. Deoxynivalenol: Toxicity, mechanisms and animal health risks. **Animal Feed Science and Technology**, v. 137, n. 3-4, p. 283-298, 2007.

PESTKA, J. J.; TAI, J. H.; WITT, M. F.; DIXON, D. E.; FORSELL, J. H. Suppression of immune-response in the B6c3f1 mouse after dietary exposure to the *Fusarium* mycotoxins deoxynivalenol (vomitoxin) and zearalenone. **Food and Chemical Toxicology**, v. 25, n. 4, p. 297-304, 1987.

PFOHL-LESZKOWICZ, A. Ochratoxin A and aristolochic acid involvement in nephropathies and associated urothelial tract tumours. **Arhiv Za Higijenu Rada i Toksikologiju**, v. 60, n. 4, p. 465-483, 2009.

PFOHL-LESZKOWICZ, A.; PETKOVA-BOCHAROVA, T.; CHERNOZEMSKY, I. N.; CASTEGNARO, M. Balkan endemic nephropathy and associated urinary tract tumours: a review on aetiological causes and the potential role of mycotoxins. **Food Additives and Contaminants**, v. 19, n. 3, p. 282-302, 2002.

PIER, A. C. Major biological consequences of aflatoxicosis in animal production. **Journal of Animal Science**, v. 70, n. 12, p. 3964-3967, 1992.

PINTO, A. C. S. M.; DE PIERRI, C. R.; EVANGELISTA, A. G.; GOMES, A. S. L. P. B.; LUCIANO, F. B. Deoxynivalenol: Toxicology, degradation by bacteria, and phylogenetic analysis. **Toxins**, v. 14, n. 2, p. 90, 2022.

PINTON, P.; NOUGAYREDE, J. P.; DEL RIO, J. C.; MORENO, C.; MARIN, D. E.; FERRIER, L.; BRACARENSE, A. P.; KOLF-CLAUW, M.; OSWALD, I. P. The food contaminant deoxynivalenol, decreases intestinal barrier permeability and reduces claudin expression. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 237, n. 1, p. 41-48, 2009.

PITT, J. I. Toxigenic fungi and mycotoxins. **Food Science Australia**, v. 56, n. 1, p. 184-192, 2000.

PITT, J. I.; WILD, C. P.; BAAN, R. A.; GELDERBLUM, W. C. A.; MILLER, J. D.; RILEY, R. T.; WU, F. **Improving Public Health Through Mycotoxin Control**. Lyon - France: International Agency for Research on Cancer, 2012.

PLACINTA, C. M.; D'MELLO, J. P. F.; MACDONALD, A. M. C. A review of worldwide contamination of cereal grains and animal feed with *Fusarium* mycotoxins. **Animal Feed Science and Technology**, v. 78, n. 1-2, p. 21-37, 1999.

POZZI, C. R.; CORREA, B.; XAVIER, J. G.; DIREITO, G. M.; ORSI, R. B.; MATARAZZO, S. V. Effects of prolonged oral administration of fumonisin B₁ and aflatoxin B₁ in rats. **Mycopathologia**, v. 151, n. 1, p. 21-27, 2001.

PRELUSKY, D. B.; TRENHOLM, H. L.; LAWRENCE, G. A.; SCOTT, P. M. Nontransmission of deoxynivalenol (vomitoxin) to milk following oral administration to dairy cows. **Journal of Environmental Science and Health. Part. B, Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes**, v. 19, n. 7, p. 593-609, 1984.

QUI, M.; LIU, X. Determination of sphinganine, sphingosine and Sa/So ratio in urine of humans exposed to dietary fumonisin B₁. **Food Additives and Contaminants**, v. 18, n. 3, p. 263-269, 2001.

QUINN, G. P.; KEOUGH, M. J. **Experimental Design and Data Analysis for Biologists**. New York: Cambridge University Press, 2002.

R CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. 2018. Disponível em: <https://www.R-project.org/>

RAHMANI, A.; JINAP, S.; SOLEIMANY, F. Qualitative and quantitative analysis of mycotoxins. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 8, n. 3, p. 202-251, 2009.

RAJU, M.; DEVEGOWDA, G. Esterified-glucomannan in broiler chicken diets-contaminated with aflatoxin, ochratoxin and T-2 toxin: evaluation of its binding ability (*in vitro*) and efficacy as immunomodulator. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 15, n. 7, p. 1051-1056, 2002.

RAJU, M.; DEVEGOWDA, G. Influence of esterified-glucomannan on performance and organ morphology, serum biochemistry and haematology in broilers exposed to individual and combined mycotoxicosis (aflatoxin, ochratoxin and T-2 toxin). **British Poultry Science**, v. 41, n. 5, p. 640-650, 2000.

RIBELIN, W. E.; FUKUSHIMA, K.; STILL, P. E. The toxicity of ochratoxin to ruminants. **Canadian Journal of Comparative Medicine**, v. 42, n. 2, p. 172-176, 1978.

RIBELIN, W. E.; FUKUSHIMA, K.; STILL, P. E. The toxicity of ochratoxin to ruminants. **Canadian Journal of Comparative Medicine. Revue Canadienne de Medecine Comparee**, v. 42, n. 2, p. 172-176, 1978.

RICHARD, J. L.; BENNETT, G. A.; ROSS, P. F.; NELSON, P. E. Analysis of naturally occurring mycotoxins in feedstuffs and food. **Journal of Animal Science**, v. 71, n. 9, p. 2563-2574, 1993.

RICHARD, J. Sampling and Sample Preparation for Mycotoxin Analysis. **Romer Labs® Guide to Mycotoxins**, v. 2, 2006.

RIDGWAY, K. Sample Preparation for Food Contaminant Analysis. **LCGC Europe**, v. 25, n. 2, p. 61-71, 2012.

RILEY, R. T.; VOSS, K. A. Differential Sensitivity of Rat Kidney and Liver to Fumonisin Toxicity: Organ-Specific Differences in Toxin Accumulation and Sphingoid Base Metabolism. **Toxicological Sciences**, v. 92, n. 1, p. 335-345, 2006.

RIVIER, L. Criteria for the identification of compounds by liquid chromatography–mass spectrometry and liquid chromatography–multiple mass spectrometry in forensic toxicology and doping analysis. **Analytica Chimica Acta**, v. 492, n. 1-2, p. 69-82, 2003.

ROBENS, J. F.; RICHARD, J. L. Aflatoxins in Animal and Human Health. **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 127, p. 69-94, 1992.

ROCHA, D. T.; CARVALHO, G. R.; RESENDE, J. C. **Cadeia produtiva do leite o Brasil: produção primária**. Juiz de Fora: EMBRAPA, 2020. Circular técnica 123.

ROCHA, O.; ANSARI, K.; DOOHAN, F. M. Effects of trichothecene mycotoxins on eukaryotic cells: A review. **Food Additives & Contaminants**, v. 22, n. 4, p. 369-378, 2005.

RODRIGUES, I.; NAEHRER, K. A three-year survey on the worldwide occurrence of mycotoxins in feedstuffs and feed. **Toxins**, v. 4, n. 9, p. 663-675, 2012.

RODRÍGUEZ-AMAYA, D. B.; SABINO, M. Mycotoxin research in Brazil: the last decade in review. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 33, n. 1, 2002.

ROTTER, B. A. Invited review: Toxicology of Deoxynivalenol (Vomitoxin). **Journal of Toxicology and Environmental Health**, v. 48, n. 1, p. 1-34, 1996.

RUIZ, M. J.; FRANZOVA, P.; JUAN-GARCIA, A.; FONT, G. Toxicological interactions between the mycotoxins beauvericin, deoxynivalenol and T-2 toxin in CHO-K1 cells *in vitro*. **Toxicon**, v. 58, n. 4, p. 315-326, 2011a.

RUIZ, M. J.; MACAKOVA, P.; JUAN-GARCIA, A.; FONT, G. Cytotoxic effects of mycotoxin combinations in mammalian kidney cells. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, n. 10, p. 2718-2724, 2011b.

SAKHARE, P. S.; HARNE, S. D.; KALOREY, D. R.; WARKE, S. R.; BHANDARKAR, A. G.; KURKURE, N. V. Effect of Toxiroak® polyherbal feed supplement during induced aflatoxicosis, ochratoxicosis and combined mycotoxicoses in broilers. **Veterinarski Arhiv**, v. 77, n. 2, p. 129-146, 2007.

SCHECHTMAN, L. M. Implementation of the 3Rs (Refinement, reduction, and replacement): Validation and regulatory acceptance considerations for alternative toxicological test methods. **ILAR Journal**, v. 43, n. Suppl_1., p. S85-S94, 2002.

SCHNEIDER, A.; HOMMEL, G.; BLETTNER, M. Linear regression analysis - part 14 of a series on evaluation of scientific publications. **Deutsches Ärzteblatt International**, v. 107, n. 44, p. 776–782, 2010.

SHEPHARD, G. S. Current status of mycotoxin analysis: A critical review. **Journal of AOAC International**, v. 99, n. 4, p. 842-848, 2016.

SHEPHARD, G. S. Determination of mycotoxins in human foods. **Chemical Society Reviews**, v. 37, n. 11, p. 2468-2477, 2008.

SINGH, J.; MEHTA, A. Rapid and sensitive detection of mycotoxins by advanced and emerging analytical methods: A review. **Food Science Nutrition**, v. 00, p. 1-22, 2020.

SKAUG, M. A. Analysis of Norwegian milk and infant formulas for ochratoxin A. **Food Additives and Contaminants**, v. 16, n. 2, p. 75-78, 1999.

SMITH, M. C.; MADEC, S.; COTON, E.; HYMERY, N. Natural Co-Occurrence of Mycotoxins in Foods and Feeds and Their *in vitro* Combined Toxicological Effects. **Toxins**, v.8, n.4, p.94, 2016.

SOARES, R. R. G.; RICELLI, A.; FANELLI, C.; CAPUTO, D.; DE CESARE, G.; CHU, V.; AIRES-BARROS, M. R.; CONDE, J. P. Advances, challenges and opportunities for point-of-need screening of mycotoxins in foods and feeds. **The Analyst**, v. 143, n. 5, p. 1015-1035, 2018.

SØRENSEN, L. K.; ELBAEK, T. H. Determination of mycotoxins in bovine milk by liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B, Analytical Technologies in The Biomedical and Life Sciences**, v. 820, n. 2, p. 183-196, 2005.

SORIANO, J. M.; GONZALEZ, L.; CATALA, A. I. Mechanism of action of sphingolipids and their metabolites in the toxicity of fumonisin B1. **Progress in Lipid Research**, v. 44, n. 6, p. 345-356, 2005.

SREEMANNARAYANA, O.; FROHLICH, A. A.; VITTI, T. G.; MARQUARDT, R. R.; ABRAMSON, D. Studies of the tolerance and disposition of ochratoxin a in young calves. **Journal of Animal Science**, v. 66, n. 7, p. 1703, 1988.

STAFFORD, M. E.; McLAUGHLIN, C. S. Trichodermin, a possible inhibitor of the termination process of protein synthesis. **Journal of Cell Physiology**, v. 82, n. 1, p. 121-128, 1973.

STOLTZFUS, J. C. Logistic Regression: A Brief Primer. **Academic Emergency Medicine**, v. 18, p. 1099–1104, 2011.

STREIT, E.; NAEHRER, K.; RODRIGUES, I.; SCHATZMAYR, G. Mycotoxin occurrence in feed and feed raw materials worldwide: long-term analysis with special focus on Europe and Asia. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 93, n. 12, p. 2892-2899, 2013.

STREIT, E.; SCHATZMAYR, G.; TASSIS, P.; TZIKA, E.; MARIN, D.; TARANU, I.; TABUC, C.; NICOLAU, A.; APRODU, I.; PUEL, O.; OSWALD, I. P. Current Situation of Mycotoxin Contamination and Co-occurrence in Animal Feed - Focus on Europe. **Toxins**, v. 4, n. 10, p. 788-809, 2012.

STUDER-ROHR, I.; SCHLATTER, J.; DIETRICH, D. R. Kinetic parameters and intraindividual fluctuations of ochratoxin A plasma levels in humans. **Archives of Toxicology**, v. 74, n. 9, p. 499-510, 2000.

SULZBERGER, S. A.; MELNICHENKO, S.; CARDOSO, F. C. Effects of clay after an aflatoxin challenge on aflatoxin clearance, milk production, and metabolism of Holstein cows. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 3, p. 1856-1869, 2017.

SUN, L. H.; LEI, M. Y.; ZHANG, N. Y.; GAO, X.; LI, C.; KRUMM, C. S.; QI, D. S. Individual and combined cytotoxic effects of aflatoxin B₁, zearalenone, deoxynivalenol and fumonisin B₁ on BRL 3A rat liver cells. **Toxicon**, v. 95, p. 6-12, 2015.

SUR, E.; CELIK, I. Effects of aflatoxin B₁ on the development of the bursa of Fabricius and blood lymphocyte acid phosphatase of the chicken. **British Poultry Science**, v. 44, n. 4 p. 558-566, 2003.

TAPIA, M. O.; SEAWRIGHT, A. A. Experimental combined aflatoxin B₁ and ochratoxin A intoxication in pigs. **Australian Veterinary Journal**, v. 62, n. 2, p. 33-37, 1985.

TESSARI, E. N. C.; OLIVEIRA, C. A. F.; CARDOSO, A.; LEDOUX, D. R.; ROTTINGHAUS, G. E. Effects of aflatoxin B₁ and fumonisin B₁ on body weight, antibody titres and histology of broiler chicks. **British Poultry Science**, v. 47, n. 3, p. 357-364, 2006.

THEUMER, M. G.; LOPEZ, A. G.; AOKI, M. P.; CANEPA, M. C.; RUBINSTEIN, H. R. Subchronic mycotoxicoses in rats. Histopathological changes and modulation of the sphinganine to sphingosine (Sa/So) ratio imbalance induced by *Fusarium verticillioides* culture material, due to the coexistence of aflatoxin B₁ in the diet. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 3, p. 967-977, 2008.

THUVANDER, A.; WIKMAN, C.; GADHASSON, I. *In vitro* exposure of human lymphocytes to trichothecenes: Individual variation in sensitivity and effects of combined exposure on lymphocyte function. **Food and Chemical Toxicology**, v. 37, n. 6, p. 639-648, 1999.

TOLOSA, J.; RODRÍGUEZ-CARRASCO, Y.; RUIZ, M. J.; VILA-DONAT, P. Multi-mycotoxin occurrence in feed, metabolism and carry-over to animal-derived food products: A review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 158, n. 112661, p. 112661, 2021.

TRENHOLM, H. L.; THOMPSON, B. K.; HARTIN, K. E.; GREENHALGH, R.; MCALLISTER, A. J. Ingestion of vomitoxin (deoxynivalenol)-contaminated wheat by nonlactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 68, n. 4, p. 1000-1005, 1985.

TRIPATHI, P.; UPADHYAY, N.; NARA, S. Recent advancements in lateral flow immunoassays: A journey for toxin detection in food. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 58, n. 10, p. 1715-1734, 2017.

TUNG, H. T.; WYATT, R. D.; THAXTON, P.; HAMILTON, P. B. Concentrations of serum proteins during aflatoxicosis. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 34, n. 2, p. 320-326, 1975.

TURKOGLU, C.; KEYVAN, E. Determination of Aflatoxin M₁ and Ochratoxin A in raw, pasteurized and UHT milk in turkey. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 47, n. 1, 2019.

TURNER, N. W.; BRAMHMBHATT, H.; SZABO-VEZSE, M.; POMA, A.; COKER, R.; PILETSKY, S. A. Analytical methods for determination of mycotoxins: An update (2009-2014). **Analytica Chimica Acta**, v. 901, p. 12–33, 2015.

TURNER, N. W.; SUBRAHMANYAM, S.; PILETSKY, S. A. Analytical methods for determination of mycotoxins: a review. **Analytica Chimica Acta**, v. 632, n. 2, p. 168–180, 2009.

TWARUŻEK, M.; SKRZYDLEWSKI, P.; KOSICKI, R.; GRAJEWSKI, J. Mycotoxins survey in feed materials and feedingstuffs in years 2015-2020. **Toxicon**, v. 202, p. 27-39, 2021.

UMAR, S.; MUNIR, M. T.; SHAH, M. A. A.; SHAHZAD, M.; SOHOO, M. U. R.; KHAN, R. A.; KHAN, A. U.; AMEEN, K.; RAFIA-MUNIR, A.; SALEEM, F. Outbreak of aflatoxicosis in local cattle farm in Pakistan. **Veterinaria**, v. 3, n. 1, p. 13-17, 2015.

UPADHAYA, S. D.; PARK, M. A.; HA, J. K. Mycotoxins and their biotransformation in the Rumen: A review. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 23, n. 9, p. 1250-1260, 2010.

VAIL, R. B.; HOMANN, M. J. Rapid and sensitive detection of citrinin production during fungal fermentation using high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 535, p. 317-323, 1990.

VAN DER WESTHUIZEN, L.; SHEPHARD, G. S.; SCUSSEL, V. M.; COSTA, L. L. F.; VISMER, H. F.; RHEEDER, J. P.; MARASAS, W. F. O. Fumonisin contamination and *Fusarium* incidence in corn from Santa Catarina, Brazil. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 18, p. 5574-5578, 2003.

VAZ, A.; CABRAL S. A. C.; RODRIGUES, P.; VENÂNCIO, Armando. Detection methods for aflatoxin M₁ in dairy products. **Microorganisms**, v. 8, n. 2, p. 246, 2020.

VERMA, J.; JOHRI, T. S.; SWAIN, B. K. Effect of varying levels of aflatoxin, ochratoxin and their combinations on the performance and egg quality characteristics in laying hens. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 16, n. 7, p. 1015-1019, 2003.

VERMA, J.; JOHRI, T. S.; SWAIN, B. K.; AMEENA, S. Effect of graded levels of aflatoxin, ochratoxin and their combinations on the performance and immune response of broilers. **British Poultry Science**, v. 45, n. 4, p. 512-518, 2004.

VIDAL, A.; MENGELERS, M.; YANG, S.; DE SAEGER, S.; DE BOEVRE, M. Mycotoxin biomarkers of exposure: A comprehensive review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 17, n. 5, p. 1127-1155, 2018.

VISCONTI, A.; MINERVINI, F.; LUCIVERO, G.; GAMBATESA, V. Cytotoxic and immunotoxic effects of *Fusarium* mycotoxins using a rapid colorimetric bioassay. **Mycopathologia**, v. 113, n. 3, p. 181-186, 1991.

VÖLKEL, I.; SCHRÖER-MERKER, E.; CZERNY, C. The carry-over of mycotoxins in products of animal origin with special regard to its implications for the European food safety legislation. **Food and Nutrition Sciences**, v. 02, n. 08, p. 852-867, 2011.

VOSS, K. A.; SMITH, G. W.; HASCHEK, W. M. Fumonisin: toxicokinetics, mechanism of action and toxicity. **Animal Feed Science and Technology**, v. 137, n. 3-4, p. 299-325, 2007.

WANG, E.; NORRED, W. P.; BACON, C. W.; RILEY, R. T.; MERRILL, A. H. Inhibition of sphingolipid biosynthesis by fumonisins: Implications for diseases associated with *Fusarium moniliforme*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 266, n. 22, p. 14486-14490, 1991.

WANG, H. W.; WANG, J. Q.; ZHENG, B. Q.; LI, S. L.; ZHANG, Y. D.; LI, F. D.; ZHENG, N. Cytotoxicity induced by ochratoxin A, zearalenone, and alpha-zearalenol: Effects of individual and combined treatment. **Food and Chemical Toxicology**, v. 71, p. 217-224, 2014.

WANG, N.; WU, W.; PAN, J.; LONG, M. Detoxification strategies for zearalenone using microorganisms: A review. **Microorganisms**, v. 7, n. 7, p. 208, 2019.

WANGIKAR, P. B.; DWIVEDI, P.; SHARMA, A. K.; SINHA, N. Effect in rats of simultaneous prenatal exposure to ochratoxin A and aflatoxin B₁. II. Histopathological features of teratological anomalies induced in fetuses. **Birth Defects Research Part B**, v. 71, n. 6, p. 352-358, 2004b.

WANGIKAR, P. B.; DWIVEDI, P.; SINHA, N. Effect in rats of simultaneous prenatal exposure to ochratoxin A and aflatoxin B₁. I. Maternal toxicity and fetal malformations. **Birth Defects Research Part B**, v. 71, n. 6, p. 343-351, 2004a.

WANGIKAR, P. B.; DWIVEDI, P.; SINHA, N.; SHARMA, A. K.; TELANG, A. G. Teratogenic effects in rabbits of simultaneous exposure to ochratoxin A and aflatoxin B₁ with special reference to microscopic effects. **Toxicology**, v. 215, n. 1-2, p. 37-47, 2005.

WEAVER, G. A.; KURTZ, H. J.; BEHRENS, J. C.; ROBISON, T. S.; SEGUIN, B. E.; BATES, F. Y.; MIROCHA, C. J. Effect of zearalenone on the fertility of virgin dairy heifers. **American Journal of Veterinary Research**, v. 47, n. 6, p. 1395-1397, 1986.

WEAVER, G. A.; KURTZ, H. J.; MIROCHA, C. J.; BATES, F. Y.; BEHRENS, J. C.; ROBISON, T. S.; SWANSON, S. P. The failure of purified T-2 mycotoxin to produce hemorrhaging in dairy cattle. **The Canadian Veterinary Journal**, v. 21, n. 7, p. 210-213, 1980.

WINKLER, J.; KERSTEN, S.; VALENTA, H.; MEYER, U.; ENGELHARDT, U. H.; DÄNICKE, S. Development of a multi-toxin method for investigating the carryover of zearalenone, deoxynivalenol and their metabolites into milk of dairy cows. **Food Additives &**

Contaminants. Part A, Chemistry, Analysis, Control, Exposure & Risk Assessment, v. 32, n. 3, p. 371-380, 2015.

YANG, C.; CHENG, Y.; TSAI, W.; LIAO, R.; CHANG, C.; CHIEN, W.; JHANG, J.; YU, Y. Prevalence of mycotoxins in feed and feed ingredients between 2015 and 2017 in Taiwan. **Environmental Science and Pollution Research International**, v. 26, n. 23, p. 23798-23806, 2019.

YOSHIZAWA, T.; MIROCHA, C. J.; BEHRENS, J. C.; SWANSON, S. P. Metabolic fate of T-2 toxin in a lactating cow. **Food and Cosmetics Toxicology**, v. 19, n. 1, p. 31-39, 1981.

ZACHARIASOVA, M.; CUHRA, P.; HAJŠLOVA, J. Cross-reactivity of rapid immunochemical methods for mycotoxins detection towards metabolites and masked mycotoxins: the current state of knowledge. **World Mycotoxin Journal**, v. 7, n. 4, p. 449-464, 2014.

ZHANG, Z.; FAN, Z.; NIE, D.; ZHAO, Z.; HAN, Z. Analysis of the carry-over of ochratoxin A from feed to milk, blood, urine, and different tissues of dairy cows based on the establishment of a reliable LC-MS/MS method. **Molecules**, v. 24, n. 15, p. 2823, 2019.

ZHAO, Z.; LIU, N.; YANG, L.; DENG, Y.; WANG, J.; SONG, S.; LIN, S.; WU, A.; ZHOU, Z.; HOU, J. Multi-mycotoxin analysis of animal feed and animal-derived food using LC-MS/MS system with timed and highly selective reaction monitoring. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 407, n. 24, p. 7359-7368, 2015.

ZHENG, M. Z.; RICHARD, J. L.; BINDER, J. A review of rapid methods for the analysis of mycotoxins. **Mycopathologia**, v. 161, p. 261-273, 2006.

ZINEDINE, A.; SORIANO, J. M.; MOLTÓ, J. C.; MAÑES, J. Review on the toxicity, occurrence, metabolism, detoxification, regulations and intake of zearalenone: an oestrogenic mycotoxin. **Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association**, v. 45, n. 1, p. 1-18, 2007.

ZÖLLNER, P.; MAYER-HELM, B. Trace mycotoxin analysis in complex biological and food matrices by liquid chromatography-atmospheric pressure ionisation mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1136, n. 2, p. 123-169, 2006.

APÊNDICES

Apêndice A - Interações entre AFLA e FUMO, AFLA e OTA, AFLA e T-2, AFLA e DON, FUMO e T-2, FUMO e DON, DON e T-2, DON e ZEA, OTA e T-2, OTA e DON e OTA e FUMO resultantes de experimentos *in vivo*.

continua

Micotoxinas	Referência	Espécie estudada	Tempo de exposição	Dose utilizada	Tipos de interação		
					Sinérgica	Aditiva	Antagônica
AFLA + FUMO	Pozzi et al., 2001	Camundongos	21 dias	72 µg/100g bw + 0,5 mg/100g bw			↑ Ganho de peso corporal
				72 µg /100g bw + 1,5 mg/100g bw	↓ Ganho de peso corporal		↓ Peso relativo do fígado
AFLA + FUMO	Kubena et al., 1995a	Perus	21 dias	0,75 + 200 mg/kg	↓ Peso relativo do fígado	↓ Ganho de peso corporal	↑ Mortalidade
AFLA + FUMO	Ogido et al., 2004	Codornas	140 dias	0,2 + 10 mg/kg			↓ Produção de ovos
AFLA + FUMO	Orsi et al., 2007	Coelhos	21 dias	30 µg/kg bw + 1,5 mg/kg bw	↑ Sa/So soro	↑ Sa/So urina	↑ Sa/So fígado
AFLA + FUMO	Theumer et al., 2008	Camundongos	90 dias	0,04 + 100 mg/kg	↑ Sa/So rins, urina, soro e fígado		↑ Severidade lesões fígado e rins

Apêndice A - Interações entre AFLA e FUMO, AFLA e OTA, AFLA e T-2, AFLA e DON, FUMO e T-2, FUMO e DON, DON e T-2, DON e ZEA, OTA e T-2, OTA e DON e OTA e FUMO resultantes de experimentos *in vivo*.

continuação

Micotoxinas	Referência	Espécie estudada	Tempo de exposição	Dose utilizada	Tipos de interação		
					Sinérgica	Aditiva	Antagônica
AFLA + FUMO	Gelderblom et al., 2002	Camundongos	56 dias	17 µg/kg bw + 250 mg/kg	↑ Iniciação do câncer		
				0,05 + 50 mg/kg	↓ Anticorpos doença Newcastle		
AFLA + FUMO	Tessari et al., 2006	Frangos	33 dias	0,05 + 200 mg/kg	↓ Anticorpos doença Newcastle		
				0,2 + 50 mg/kg	↓ Anticorpos doença Newcastle		
				0,2 + 200 mg/kg	↓ Anticorpos doença Newcastle		
AFLA + OTA	Huff; Doerr, 1981	Frangos	21 dias	2,5 + 2,0 mg/kg	↓ Taxa de crescimento ↑ Mortalidade ↓ Peso corporal		→ Nível de lipídeos no fígado
AFLA + OTA	Huff et al., 1984	Frangos	42 dias	2,5 + 2,0 mg/kg	↓ Rendimento das carcaças ↓ Peso do peito, coxas e asas		
AFLA + OTA	Raju; Devegowda, 2000	Frangos	35 dias	0,3 + 2,0 mg/kg			↑ Peso relativo fígado e rins ↑ Mortalidade

Apêndice A - Interações entre AFLA e FUMO, AFLA e OTA, AFLA e T-2, AFLA e DON, FUMO e T-2, FUMO e DON, DON e T-2, DON e ZEA, OTA e T-2, OTA e DON e OTA e FUMO resultantes de experimentos *in vivo*.

continuação

Micotoxinas	Referência	Espécie estudada	Tempo de exposição	Dose utilizada	Tipos de interação		
					Sinérgica	Aditiva	Antagônica
				0,5 + 1,0 mg/kg	↑ Alimento consumido para produção 1 dúzia ovos	↓ Produção de ovos	→ Espessura da casca dos ovos
AFLA + OTA	Verma et al., 2003	Galinhas poedeiras	50 dias	1,0 + 2,0 mg/kg		↓ Produção de ovos ↑ Alimento consumido para produção 1 dúzia ovos	↓ Espessura da casca dos ovos
				2,0 + 4,0 mg/kg		↓ Produção de ovos ↑ Alimento consumido para produção 1 dúzia ovos	→ Espessura da casca dos ovos
				0,5 + 1,0 mg/kg			↓ Anticorpos contra SRBC
AFLA + OTA	Verma et al., 2004	Frangos	49 dias	1,0 + 2,0 mg/kg		↓ Anticorpos contra SRBC	
				2,0 + 4,0 mg/kg		↓ Anticorpos contra SRBC	
AFLA + OTA	Kalorey et al., 2005	Frangos	42 dias	0,2 + 0,2 mg/kg			↓ Anticorpos doença Newcastle

Apêndice A - Interações entre AFLA e FUMO, AFLA e OTA, AFLA e T-2, AFLA e DON, FUMO e T-2, FUMO e DON, DON e T-2, DON e ZEA, OTA e T-2, OTA e DON e OTA e FUMO resultantes de experimentos *in vivo*.

continuação

Micotoxinas	Referência	Espécie estudada	Tempo de exposição	Dose utilizada	Tipos de interação		
					Sinérgica	Aditiva	Antagônica
AFLA + OTA	Edrington; Harvey; Kubena, 1995, 1995	Ovos de galinha	18 dias	0,025 + 1,0 µg/ ovo	↑ N° anormalidades	↑ Mortalidade	
				0,05 + 2,0 µg/ ovo	↑ N° anormalidades	↑ Mortalidade	
AFLA + T-2	Huff et al., 1988	Frangos	21 dias	2,5 + 4,0 mg/kg	↓ Ganho de peso corporal ↑ Peso relativo moela ↑ Peso relativo coração e rins		
AFLA + T-2	Madheswaran; Balachandran; Manohar, 2004	Codornas	35 dias	3,0 + 4,0 mg/kg		↓ Proteínas totais, albumina	↓ Glicose
AFLA + T-2	Kubena et al., 1990	Frangos	21 dias	3,5 + 8,0 mg/kg			↑ Lesões orais
AFLA + T-2	Raju; Devegowda, 2002	Frangos	35 dias	0,3 + 3,0 mg/kg	↓ Peso relativo timo	↓ Peso relativo Bursa de Fabricius	↓ Anticorpos doença Newcastle
AFLA + T-2	Girish; Devegowda, 2006	Frangos	35 dias	2,0 + 1,0 mg/kg		↓ Peso relativo timo ↓ Peso relativo Bursa de Fabricius	↓ Anticorpos doença Newcastle

Apêndice A - Interações entre AFLA e FUMO, AFLA e OTA, AFLA e T-2, AFLA e DON, FUMO e T-2, FUMO e DON, DON e T-2, DON e ZEA, OTA e T-2, OTA e DON e OTA e FUMO resultantes de experimentos *in vivo*.

continuação

Micotoxinas	Referência	Espécie estudada	Tempo de exposição	Dose utilizada	Tipos de interação		
					Sinérgica	Aditiva	Antagônica
AFLA + DON	Huff et al., 1986	Frangos	21 dias	2,5 + 16 mg/kg	↑ Peso relativo proventrículo ↑ Peso relativo moela ↑ Peso relativo fígado	↓ Ganho de peso corporal	
FUMO + T-2	Kubena et al., 1995b	Perus	21 dias	300 + 5,0 mg/kg	↑ Peso relativo moela ↑ Peso relativo fígado	↓ Ganho de peso corporal	
FUMO + T-2	Kubena et al., 1997a	Frangos	19 dias	300 + 5,0 mg/kg		↓ Ganho de peso corporal ↑ Mortalidade	↑ Lesões orais → Peso relativo baço
FUMO + DON	Kubena et al., 1997a	Frangos	21 dias	300 + 15 mg/kg	↑ Mortalidade ↑ Peso relativo proventrículo ↑ Colesterol, AST	↑ Peso relativo moela	→ Peso relativo coração
FUMO + DON	Grenier et al., 2011	Suínos	35 dias	6,0 + 3,0 mg/kg		↑ Gravidade lesões fígado ↑ Gravidade lesões pulmões ↓ Anticorpos IgG específicos	→ Anticorpos IgA específicos

Apêndice A - Interações entre AFLA e FUMO, AFLA e OTA, AFLA e T-2, AFLA e DON, FUMO e T-2, FUMO e DON, DON e T-2, DON e ZEA, OTA e T-2, OTA e DON e OTA e FUMO resultantes de experimentos *in vivo*.

continuação

Micotoxinas	Referência	Espécie estudada	Tempo de exposição	Dose utilizada	Tipos de interação		
					Sinérgica	Aditiva	Antagônica
DON + T-2	Kubena et al., 1989a	Frangos	21 dias	16 + 4,0 mg/kg		↓ Ganho de peso corporal ↓ Colesterol	
DON + T-2	Friend et al., 1992	Suínos	35 dias	2,5 + 3,2 mg/kg	↓ Ganho de peso corporal		
DON + ZEA	Forsell et al., 1986	Camundongos	56 dias	5,0 + 10 mg/kg			↑ IgA
DON + ZEA	Pestka et al., 1987	Camundongos	14-21 dias	25 + 10 mg/kg		↑ Bactérias no baço	↓ Hipersensibilidade tardia
OTA + T-2	Garcia et al., 2003	Frangos	21 dias	0,567 + 0,927 mg/kg		↓ Ganho de peso corporal ↓ Consumo de ração	↑ % células renais tubulares necróticas ↑ Peso relativo rins
OTA + T-2	Kubena et al., 1989b	Frangos	21 dias	2,0 + 4,0 mg/kg		↓ Ganho de peso corporal ↓ Proteínas totais	↓ Peso relativo Bursa de Fabricius
OTA + T-2	Raju e Devegowda, 2002	Frangos	35 dias	2,0 + 3,0 mg/kg		↓ Peso relativo timo	↓ Anticorpos doença Newcastle ↓ Anticorpos IBD
OTA + DON	Kubena et al., 1988	Frangos	21 dias	2,0 + 16 mg/kg		↓ Eficiência alimentar	

Apêndice A - Interações entre AFLA e FUMO, AFLA e OTA, AFLA e T-2, AFLA e DON, FUMO e T-2, FUMO e DON, DON e T-2, DON e ZEA, OTA e T-2, OTA e DON e OTA e FUMO resultantes de experimentos *in vivo*.

conclusão

Micotoxinas	Referência	Espécie estudada	Tempo de exposição	Dose utilizada	Tipos de interação		
					Sinérgica	Aditiva	Antagônica
OTA + FUMO	Kubena et al., 1997b	Perus	21 dias	3,0 + 300 mg/kg	↓ Ganho de peso corporal ↓ Peso relativo coração	↓ Peso relativo rins	→ Triglicerídeos

↑ ↓ →: Avaliação do efeito do tratamento co-contaminado em relação ao tratamento controle; ↑ = aumento do parâmetro com relação ao grupo controle; ↓ = diminuição do parâmetro com relação ao grupo controle; → parâmetro se manteve no mesmo nível do grupo controle.

bw = peso corporal; Sa = esfinganina; So = esfingosina; SRBC = hemácias de ovelha; IBD = doença infecciosa da Bursa de Fabricius; AST = aspartato aminotransferase.

Apêndice B - Interações entre AFLA e FUMO, AFLA e OTA, AFLA e T-2, AFLA e DON, AFLA e ZEA, DON e T-2, DON e ZEA, OTA e FUMO e ZEA e T-2 resultantes de experimentos *in vitro*.

continua

Micotoxinas	Referência	Linhagem celular	Tempo de exposição	Quantidade utilizada	Tipos de interação		
					Sinérgica	Aditiva	Antagônica
AFLA + FUMO	McKean et al., 2006a	HepG ₂	24 horas	1 + 399,2 µM			↓ Viabilidade celular
				0,75 + 299,4 µM			↓ Viabilidade celular
				0,5 + 199,6 µM			↓ Viabilidade celular
		BEAS-2B	24 horas	100 + 355,1 µM			↓ Viabilidade celular
AFLA + FUMO	Clarke et al., 2014	MDBK	48 horas	1,28 + 8,0 µg/ml			↓ Viabilidade celular
AFLA + OTA	El Golli-Bennour et al., 2010	Vero	24 horas	5 a 50 + 5 a 50 µM			↑ Citotoxicidade
AFLA + OTA	Corcuera et al., 2011	HepG ₂	24 horas	1,2 a 150 + 50 µM			↓ Danos ao DNA
AFLA + T-2	McKean et al., 2006b	HepG ₂	24 horas	750 + 735 ou 500 + 490 ou 375 + 368 ou 250 + 245 ou 125 + 123 µM			↓ Viabilidade celular
				BEAS-2B	24 horas	100 + 24, 16, 12, 8, 4 ou 2 µM	

Apêndice B - Interações entre AFLA e FUMO, AFLA e OTA, AFLA e T-2, AFLA e DON, AFLA e ZEA, DON e T-2, DON e ZEA, OTA e FUMO e ZEA e T-2 resultantes de experimentos *in vitro*.

continuação

Micotoxinas	Referência	Linhagem celular	Tempo de exposição	Quantidade utilizada	Tipos de interação		
					Sinérgica	Aditiva	Antagônica
AFLA + DON	He et al., 2010	Hepatócitos primários de carpa	4 horas	0,02 + 0,5 µg/ml		↑ AST, ALT, LDH	
AFLA + DON	Sun et al., 2015	BRL 3A	12, 24 ou 48 horas	29 + 3 µM	↓ Viabilidade celular ↑ Hsp70, p53, Bax ↑ Caspase-3 e Caspase-8 ↓ Bcl-2		
AFLA + ZEA	Sun et al., 2015	BRL 3A	48 horas	29 + 92 µM	↓ Viabilidade celular		
AFLA + ZEA	Lei et al., 2013	PK-15	24 horas	1 + 10, 20 ou 40 µM 5 ou 10 + 10 µM 1 + 40 µM	↓ Viabilidade celular	↑ Produção ROS	↓ Produção ROS
DON + T-2	Thuvander; Wikman; Gadhasson, 1999	Linfócitos humanos	72 horas	25 + 1000 µM		↑ Apoptose	↓ Citotoxicidade

Apêndice B - Interações entre AFLA e FUMO, AFLA e OTA, AFLA e T-2, AFLA e DON, AFLA e ZEA, DON e T-2, DON e ZEA, OTA e FUMO e ZEA e T-2 resultantes de experimentos *in vitro*.

continuação

Micotoxinas	Referência	Linhagem celular	Tempo de exposição	Quantidade utilizada	Tipos de interação		
					Sinérgica	Aditiva	Antagônica
DON + T-2	Ruiz et al., 2011b	Vero	24, 48 ou 72 horas	IC ₅₀ , IC ₇₅ e IC ₉₀			↓ Citotoxicidade
DON + T-2	Ruiz et al., 2011a	CHO-K1	24 ou 48 horas 72 horas	IC ₅₀ , IC ₇₅ e IC ₉₀ IC ₅₀ , IC ₇₅ e IC ₉₀			↓ Citotoxicidade ↑ Citotoxicidade
DON + ZEA	Malekinejad et al., 2007	Oócitos de porco	30 ou 40 horas	0,156 + 0,156 µM 1,56 + 1,56 µM		↑ Núcleos com morfologia aberrante ↑ N° células ploidia anormal	
OTA + FUMO	Creppy et al., 2004	C6 glioma Vero	48 horas 48 horas	10 + 5 a 50 µM 10 + 50 µM	↓ Viabilidade celular ↓ Viabilidade celular		
OTA + FUMO	Clarke et al., 2014	MDBK	48 horas	2,0 + 8,0 µg/ml		↓ Viabilidade celular	
OTA + ZEA	Wang et al., 2014	HepG ₂	24, 48 ou 72 horas	0,2 a 20 + 1 a 100 µM			↓ Citotoxicidade

Apêndice B - Interações entre AFLA e FUMO, AFLA e OTA, AFLA e T-2, AFLA e DON, AFLA e ZEA, DON e T-2, DON e ZEA, OTA e FUMO e ZEA e T-2 resultantes de experimentos *in vitro*.

conclusão

Micotoxinas	Referência	Linhagem celular	Tempo de exposição	Quantidade utilizada	Tipos de interação		
					Sinérgica	Aditiva	Antagônica
ZEA + T-2	Bouaziz et al., 2013	Vero	24 horas	5 a 100 + 5 a 100 nM	↑ Citotoxicidade		
				50 a 100 + 50 a 100 nM	↑ Produção ROS		
				10 + 10 nM	↑ Hsp 70		

↑ ↓: Avaliação do efeito do tratamento co-contaminado em relação ao tratamento mono-contaminado; ↑ = aumento do parâmetro com relação aos grupos tratados com apenas uma das toxinas; ↓ = diminuição do parâmetro com relação aos grupos tratados com apenas uma das toxinas.

IC₅₀ = Concentração Inibitória para 50% das células; IC₇₅ = Concentração Inibitória para 75% das células; IC₉₀ = Concentração Inibitória para 90% das células; AST = aspartato aminotransferase; ALT = alanina transaminase; LDH = lactato desidrogenase; ROS = espécies reativas de oxigênio; Hsp70, p53, Bax, Caspase-3 e Caspase-8 = genes apoptóticos; Bcl-2 = gene antiapoptótico.