

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CENTRO-OESTE, UNICENTRO-PR  
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS  
- PPGCV MESTRADO**

**INFLUÊNCIA DA ASSOCIAÇÃO DE ADSORVENTE BENTONITA E  
ANTIOXIDANTES NO FÍGADO, METABOLISMO OXIDATIVO LEUCOCITÁRIO  
E PRODUÇÃO LEITEIRA DE BOVINOS ALIMENTADOS COM DIETAS  
CONTENDO MICOTOXINAS NATURALMENTE PRODUZIDAS.**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**DALVANE DI DOMENICO**

**GUARAPUAVA-PR**

**2021**

**DALVANE DI DOMENICO**

**INFLUÊNCIA DA ASSOCIAÇÃO DE ADSORVENTE BENTONITA E  
ANTIOXIDANTES NO FÍGADO, METABOLISMO OXIDATIVO LEUCOCITÁRIO  
E PRODUÇÃO LEITEIRA DE BOVINOS ALIMENTADOS COM DIETAS  
CONTENDO MICOTOXINAS NATURALMENTE PRODUZIDAS.**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual do Centro-Oeste, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Saúde e Produção Animal Sustentável, para a obtenção do título de Mestre.

Prof<sup>a</sup>. Dra. Heloísa Godoi Bertagnon

Orientadora

**GUARAPUAVA-PR**

**2021**

Catálogo na Publicação  
Rede de Bibliotecas da Unicentro

D557i Di Domenico, Dalvane  
Influência da associação de adsorvente bentonita e antioxidantes no fígado, metabolismo oxidativo leucocitário e produção leiteira de bovinos alimentados com dietas contendo micotoxinas naturalmente produzidas / Dalvane Di Domenico. -- Guarapuava, 2021.  
xii, 45 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual do Centro-Oeste, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. Área de Concentração: Saúde e Produção Animal Sustentável, 2021.

Orientadora: Heloísa Godoi Bertagnon  
Banca examinadora: Júlio Cesar Heker Junior, Nádia Cristine Weinert, Moana Rodrigues França

Bibliografia

1. Aditivo. 2. Fungo. 3. Imunidade. 4. Produção de leite. I. Título. II. Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.

CDD 636

**DALVANE DI DOMENICO**

**INFLUÊNCIA DA ASSOCIAÇÃO DE ADSORVENTE BENTONITA E ANTIOXIDANTES NO FÍGADO, METABOLISMO OXIDATIVO LEUCOCITÁRIO E PRODUÇÃO LEITEIRA DE BOVINOS ALIMENTADOS COM DIETAS CONTENDO MICOTOXINAS NATURALMENTE PRODUZIDAS.**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual do Centro-Oeste, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Saúde e Produção Animal Sustentável, para a obtenção do título de Mestre.

Aprovada em 26 de fevereiro de 2021.



Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Heloísa Godoi Bertagnon  
(UNICENTRO)



Prof. Dr. Julio Cezar Heker Junior  
(UNICENTRO)



Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Nádia Cristine Weinert  
(UNICENTRO)



Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Moana Rodrigues França  
(C.U.CAMPO REAL)

GUARAPUAVA-PR  
2021

## TERMO DE APROVAÇÃO CEUA

### COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA/UNICENTRO

Ofício nº 023/2019 – CEUA/UNICENTRO

Guarapuava, 25 de junho de 2019.

Senhora Pesquisadora,

1. Comunicamos que seu projeto de pesquisa intitulado: "A Influência de adsorvente de micotoxinas na imunidade inata e função hepática de bovinos de leite", protocolo número 020/2019, com início em 01/06/2019 e término em 28/02/2021, utilizando-se 20 bovinos, foi analisado e considerado **APROVADO**, pela Comissão de Ética no Uso de Animais de nossa Instituição, na reunião do dia 14 de Junho de 2019.
2. Deverá ser encaminhado à CEUA o relatório final da pesquisa e a publicação de seus resultados, para acompanhamento do mesmo.
3. Observamos ainda que se mantenha a devida atenção aos Relatórios Parciais e Finais na seguinte ordem:
  - Os **Relatórios Parciais** deverão ser encaminhados à CEUA assim que tenha **transcorrido um ano da pesquisa**.
  - Os **Relatórios Finais** deverão ser encaminhados à CEUA em até **30 dias após a conclusão da pesquisa**.
  - **Qualquer alteração na pesquisa** que foi aprovada, como por exemplo, números de sujeitos, local, período, etc. deverá ser necessariamente enviada uma carta justificativa para a análise da CEUA.

Pesquisadora: Heloisa Godoi Bertagnon  
Atenciosamente,

  
Ivo Ilvan Kerppers  
Presidente da Ceua/Unicentro  
Port. nº 411- GR/Unicentro-2019

A Senhora  
Heloisa Godoi Bertagnon  
UNICENTRO-CEDETEG

*Dedico esse trabalho a minha filha, Anna  
Laura, luz da minha vida.  
Dedico ao meu marido Leandro, grande  
incentivador e colaborador, minha base.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus, pelo dom da vida e, por me permitir realizar mais essa conquista.

Agradeço aos meus pais, Elizeo e Lucí, por darem todo apoio que precisei durante esta caminhada e que nunca mediram esforços para me ajudar.

Agradeço ao meu marido Leandro R. M. Xavier, por sempre me apoiar, me incentivando todos os dias.

À minha filha Anna Laura que mesmo pequenina me dá força todos os dias para meu crescimento pessoal e profissional.

Agradeço também, meus amigos e colegas, os quais tiveram importante participação para que este trabalho pudesse ser concluído da melhor maneira possível.

Aos meus colegas de mestrado Mirodion Oliveira e Gabriela Garbossa, as graduandas de iniciação científica Gabriela Thomaz, Ana Carolina Abreu e Carolina Depaoli os quais tiveram importante participação para que este trabalho pudesse ser concluído da melhor maneira possível.

Aos professores, a minha orientadora Dra. Heloísa Godoi Bertagnon, agradeço também aos professores Dra. Meire Cristina Seki, Dr. Adriano de Oliveira Carrasco e Dra. Margarete Kimie Falbo os quais contribuíram com seus conhecimentos, disponibilizaram tempo e dedicação, ou mesmo, cederam seus laboratórios/equipamentos para que esta pesquisa fosse concluída.

À empresa Safeeds Nutrição Animal®, Cascavel, Brasil pela parceria, disponibilização de produto e apoio financeiro à pesquisa.

À fazenda de propriedade dos Srs. Anton e Neuza Gora, pela disponibilização dos animais, equipamentos, funcionários e tempo para que o experimento fosse realizado.

## RESUMO

DI DOMENICO, Dalvane. **Influência da associação de adsorvente bentonita e antioxidantes no fígado, metabolismo oxidativo leucocitário e produção leiteira de bovinos alimentados com dietas contendo micotoxinas naturalmente produzidas.** 2021. 56f. Universidade Estadual do centro-oeste – UNICENTRO. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias). Guarapuava.

Estima-se que quase 100% da dieta ofertadas aos bovinos de leite esteja contaminada por fungos produtores de micotoxinas, o que pode interferir no desempenho e saúde dos animais. Desta forma, o presente experimento verificou se a utilização de um aditivo adsorvente de micotoxinas e antioxidantes hepáticos promovem melhora hepática, interfere no metabolismo oxidativo leucocitário e potencializa a produção leiteira de 18 bovinos da raça holandesa alimentados com dieta contendo baixos teores de micotoxinas naturalmente produzidas. Realizou-se um estudo não observacional longitudinal, inteiramente casualizado, dividido os animais em grupo tratamento (GT) (n=9), que receberam o adsorvente oral durante 56 dias, e o grupo controle (GC) (n=9) não tratado. Em intervalos semanais, colheu-se sangue para avaliações de função e lesão hepática, colestase, imunidade inata sistêmica, hemograma, análise química e física do leite e volume de leite. O aditivo promoveu efeitos a partir do dia D24, observando-se diminuição da atividade de GGT ( $p \leq 0,05$ ) e LDH ( $p \leq 0,05$ ), aumento de PT e albumina séricas ( $p \leq 0,05$ ), aumento do metabolismo oxidativo de leucócitos ( $p \leq 0,05$ ), menor razão N/L ( $p \leq 0,05$ ) e ainda promoveu aumento do volume de produção de leite em 19%. Concluiu-se que o aditivo adsorvente foi capaz de melhorar a saúde hepática, aumentar o metabolismo oxidativo de leucócitos e promover aumento significativo da produção de leite de bovinos.

**Palavras-chave:** aditivo, fungo, imunidade, produção de leite.

## ABSTRACT

DI DOMENICO, Dalvane. **Influence of the association of bentonite adsorbent and antioxidants on the liver, leukocyte oxidative metabolism and dairy production of cattle fed diets containing naturally produced mycotoxins.** 2021. 56p. State University of Midwest - UNICENTRO, Dissertation (Master of Veterinary Science). Guarapuava.

It is estimated that almost 100% of the diet offered to dairy cattle is contaminated by mycotoxin-producing fungi, which can interfere with the performance and health of the animals. Thus, the present experiment verified whether the use of an mycotoxin adsorbent additive and hepatic antioxidants promote liver regeneration, interfere with leukocyte oxidative metabolism and enhance the milk production of 18 Holstein cattle fed with a diet containing low levels of naturally produced mycotoxins. A non-observational, longitudinal, completely randomized study was carried out, dividing the animals into a treatment group (GT) (n=9), which received the oral adsorbent for 56 days, and the control group (CG) (n=9) untreated. At weekly intervals, blood was collected for assessments of liver function and injury, cholestasis, systemic innate immunity, blood count, chemical and physical analysis of milk and volume of milk. The additive promoted effects from day D24, observing a decrease in the activity of GGT ( $p \leq 0,05$ ) and LDH ( $p \leq 0,05$ ), increase in serum PT and albumin ( $p \leq 0,05$ ), increase leukocyte oxidative metabolism ( $p < 0,05$ ), lower N/L ratio ( $p \leq 0,05$ ) and also increased the milk production volume by 19%. It was concluded that the adsorbent additive was able to regenerate liver health, improve leukocyte oxidative metabolism and promote a significant increase in bovine milk production.

**Key-words:** additive, fungus, immunity, milk production.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1.</b> Razão N/L sanguíneo de vacas lactantes não tratadas (GC) e tratadas com adsorvente bentonita e antioxidantes hepáticos para micotoxinas (GT).....	51
--	----

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Enzimas hepáticas séricas (AST, LDH e GGT) de vacas não tratadas (GC) ou tratadas com adsorvente bentonita e antioxidantes hepáticos para micotoxinas (GT)..... 47
- Tabela 2.** Proteína total, albumina e globulinas séricas de vacas não tratadas (GC) e tratadas com adsorvente bentonita e antioxidantes hepáticos para micotoxinas (GT). ..... 49
- Tabela 3.** Metabolismo oxidativo de leucócitos sanguíneos de vacas não tratadas (GC) e tratadas com adsorvente bentonita e antioxidantes hepáticos para micotoxinas (GT)..... 50
- Tabela 4.** Análise física e química do leite de vacas não tratadas (GC) e tratadas com adsorvente bentonita e antioxidantes hepáticos para micotoxinas (GT). ..... 53

**LISTA DE ABREVIATURAS**

AF	Aflatoxinas
ALT	Alanina aminotransferase
APCBRH	Associação Paranaense de Criadores de Bovinos da Raça Holandesa
AST	Aspartato aminotransferase
BHV-1	Herpesvírus bovino tipo 1
BRSV	Vírus sincicial respiratório bovino
BVDV	Vírus da diarreia viral bovina
CCS	Contagem de células somáticas
Cel/ mm <sup>3</sup>	Células por milímetro cúbico
DMSO	Dimetilsulfóxido
Don	Desoxinivalenol
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EE	Extrato etéreo
EPM	Erro padrão da média
ERO	Espécies reativas de oxigênio
ESD	Extrato seco desengordurado
Fb	Fumonisina B
FDA	Fibra de detergente ácido
FDN	Fibra de detergente neutro
GGT	Gama glutamiltransferase
Hb	Hemoglobina
HGB	Concentração de Hemoglobina
HSCAS	Aluminossilicato sódio-cálcio hidratado
Ht	Hematócrito
IBR	Rinotraqueíte bovina infecciosa
IMDR	Ingestão média diária de ração
LDH	Lactato Desidrogenase
MM	Matéria Mineral
MS	Matéria Seca
N/L	Relação neutrófilo linfócito

NBT	Nitroazul de tetrazólio
NDT	Nutrientes digestíveis totais
OT	Ocratoxinas
PB	Proteína Bruta
PIV-3	Vírus da parainfluenza bovina tipo 3
S.A	Sociedade Anônima
TRC	Tricotenos
<i>UHT</i>	<i>Ultra High Temperature</i>
Zea	Zearalenona

## SUMÁRIO

<b>RESUMO .....</b>	<b>viii</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>ix</b>
<b>LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....</b>	<b>x</b>
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>xi</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS .....</b>	<b>xii</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>15</b>
<b>4. OBJETIVOS .....</b>	<b>18</b>
4.1 Objetivo geral:.....	18
4.2 Objetivos específicos: .....	18
<b>2. REFERENCIAL TEÓRICO.....</b>	<b>19</b>
2.1 Micotoxinas na pecuária.....	19
2.1.1 Legislação para presença de micotoxinas em alimentos e rações de animais.....	20
2.1.2 Principais micotoxinas .....	21
2.1.2.1 Aflatoxina - AF .....	21
2.1.2.2 Fumonisinias - Fb.....	22
2.1.2.3 Tricotecenos -TRC .....	23
2.1.2.4 Zearalenona - Zea.....	24
2.2 Micotoxinas e a imunidade inata.....	24
2.3 Micotoxinas e glândula mamária .....	25
2.4 Métodos corretivos com a utilização de adsorvente de micotoxinas .....	26
2.4.1 Adsorventes inorgânicos .....	27
2.4.2 Adsorventes orgânicos .....	28
2.4.3 Absorvente bentonita e antioxidantes hepáticos .....	28
<b>3. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>30</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>32</b>
<b>CAPÍTULO I.....</b>	<b>41</b>
<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>42</b>
<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>43</b>
<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>45</b>
<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>54</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>54</b>
<b>Dados suplementares.....</b>	<b>56</b>

## 1. INTRODUÇÃO

De acordo com o Anuário de Leite da Embrapa (2018) nas últimas décadas, a atividade leiteira brasileira evoluiu de forma contínua, resultando no crescimento consistente da produção, que colocou o país como um dos principais do setor no mundo. De 1974 a 2014, a produção nacional quase quintuplicou, passando de 7,1 bilhões para mais de 35,1 bilhões de litros de leite. Segundo a Pesquisa Pecuária Municipal do IBGE (2017) a produção brasileira de leite em 2017, foi de 33,5 bilhões de litros, sendo a região Sul a maior produtora nacional, com 35,7% da produção total, liderando também o índice de produtividade, com uma média de 3.284 litros/vaca/ano em 2017, enquanto a média nacional foi de 1.963 litros/vaca no mesmo ano. A expectativa é que até 2027, a região Sul produza 77% a mais de leite do que é produzido atualmente (MEZZADRI, 2017). Para tal, paralelamente ao melhoramento animal e dos sistemas de produção, exige-se cada vez mais um adequado manejo alimentar (COSTA *et al.*, 2002).

A utilização de pastagens é a principal fonte alimentar para ruminantes no Brasil (BRÂNCIO *et al.*, 2003). No entanto, vacas de melhor produção não conseguem obter somente da forragem toda energia para alcançar seu melhor potencial produtivo (CARVALHO *et al.*, 2010). Para potencializar a produtividade é fundamental que se recorra à suplementação com concentrados (MARTINEZ *et al.*, 1980). Segundo dados da ASSOCON (2013) o principal componente destas dietas enérgicas dos ruminantes é o milho, seja fornecido *in natura*, processado como silagem ou como principal ingrediente das rações. Embora seja um alimento de excelente valor nutricional, as condições ambientais da plantação no campo, bem como durante o seu armazenamento, podem levar à contaminação indesejável por fungos e a produção de micotoxinas (KELLER *et al.*, 2013).

Custodio *et al.* (2017) observou em seu experimento que 100% da ração total utilizada possuía algum grau de contaminação por micotoxinas, nas quais 65,5% das amostras foram classificadas como baixa contaminação, 27,6% com média contaminação e 6,9% apresentou alta contaminação, sendo a fumonisinas (Fb), as micotoxinas mais abundantes. Sassahara *et al.* (2003) analisaram 272 amostras de alimentos fornecidos a bovinos leiteiros na região Norte do Estado do Paraná, encontrando 13,6% de amostras positivas para aflatoxina (AF), sendo 7,3% acima do limite de 20µg/Kg determinado pela ANVISA. Das 189 amostras analisadas para zearalenona (Zea), 16,9% foram positivas, e todas acima de 200µg/Kg. Além disso foi encontrada maior contaminação por Af em alimentos concentrados e por Zea em alimentos volumosos.

A silagem de milho possui condições favoráveis para o crescimento de fungos (teor de umidade > 63%, umidade relativa de 55 a 93% e temperatura > 11°C), mais evidente principalmente em silagens mal vedadas e com baixa compactação. Foi evidenciado que 39% das silagens de milho destinada ao gado leiteiro da região sul do Brasil apresentaram contaminação por AF e 75% por Zea, em um total de 1080 amostras de silagem, considerando-se os limites máximos toleráveis internacionais para identificar a contaminação (HORN *et al.*, 2014).

Destaca-se que as micotoxinas podem ser as causadoras primárias de problemas sanitários e produtivo na bovinocultura leiteira, no entanto, contribuem mais para problemas crônicos, aumentando a incidência de doenças e diminuindo o desempenho reprodutivo e leiteiro. Sua patogenia pode atuar cursando em hiporexia ou anorexia; diminuição da absorção de nutrientes e interferência no seu metabolismo; alteração nos sistemas endócrino e exócrino; e imunossupressão. Dentre as micotoxinas, as mais frequentemente estudadas e implicadas nas intoxicações de bovinos são AF, Zea e o desoxinivalenol (Don) (WHITLOW, 2005).

A Zea e o Don são micotoxinas pertencentes ao grupo dos tricotecenos. A Zea é produzida por fungos das espécies *Fusarium graminearum* e *culmorum*, enquanto o Don é produzido, principalmente, pelas espécies *F. graminearum* e *F. sporotrichoide*, que é um contaminante importante na Europa, hemisfério norte e no Brasil, sendo parte das principais micotoxinas presentes em componentes alimentares (MELO *et al.*, 1999). A Zea tem grande importância na suinocultura pois tem ação direta sobre o sistema reprodutivo, podendo ocasionar vários problemas relacionados a reprodução. Em bovinos tem pouco efeito, pois é degradada no rúmen (NONES; SCUSSEL, 2013). O Don produz efeitos gastrointestinais, estando associada a perda de peso e redução da funcionalidade do sistema imune. Os bovinos também são mais tolerantes que os suínos, possivelmente devido à degradação da toxina em metabólitos secundários no rúmen. Os efeitos nos bovinos incluem redução no consumo da ração e taxa de concepção. Os grãos naturalmente contaminados com Don podem também afetar a produção de leite (IAMANAKA *et al.*, 2010).

As AF promovem alterações em diversos sistemas e órgãos corporais, sendo o fígado o principal órgão afetado. Porém pode haver lesão também em rim, baço e nos sistemas gastrointestinal, imunológico, reprodutor e cardiovascular, pois a micotoxina tem um potencial carcinogênico, devido à infiltração no DNA das células (MORAES, 2004). Além disso, as AF podem ser biotransformadas em subprodutos (AF tipo M<sub>1</sub>) que podem ser transferidas para o leite, sendo um fator preocupante para seres humanos. Em relação à contaminação de carcaças em bovinos intoxicados, os estudos são inconclusivos

(RUANGWISES; RUANGWISES, 2010). Desta maneira, como o principal órgão envolvido nas micotoxicoses é o fígado, um dos primeiros sinais da intoxicação são relacionados ao aumento da atividade das enzimas hepáticas (CUSTODIO *et al.*, 2017).

As micotoxinas também atuam no sistema imunológico, gerando uma imunossupressão decorrente da vulnerabilidade dessas células em contínua proliferação e diferenciação. Essa imunossupressão pode se manifestar como depressão da atividade dos linfócitos T ou B, supressão de imunoglobulinas e produção de anticorpos, redução da atividade do sistema complemento ou de citocinas e comprometimento da função dos macrófagos. Embora a base molecular celular para muitos dos efeitos imunossupressores específicos das micotoxinas não esteja clara, há inibição da síntese de DNA, RNA e proteínas por meio de uma variedade de mecanismos diferentes, o que parece ser direta ou indiretamente responsável pela ação imunossupressora de muitas micotoxinas (CORRIER, 1991).

Para atenuar tal entrave, os adsorventes de micotoxinas são aliados importantes para a prevenção das intoxicações, bem como minimizam as contaminações dos produtos de origem animal. Os principais tipos existentes no mercado são os inorgânicos (derivados de cálcio, zeolitas aluminossilicato e carvão), os orgânicos (levedura, celulase, hemicelulose e pectina) ou os compostos, contendo ambos tipos. Enquanto os compostos inorgânicos são bons sequestrantes de AF, (RAMOS; HERNANDEZ, 1997) os orgânicos, especialmente os compostos derivados de levedura, possuem melhor ação sequestrante de Don e Zea em testes *in vitro* (SABATER-VILAR *et al.*, 2007).

Os compostos podem conter ainda vitaminas, aminoácidos e enzimas que podem auxiliar na degradação e ou metabolização das micotoxinas, atuando como antioxidantes hepáticos, diminuindo a atividade de enzimas séricas indicadoras de lesão hepática em bovinos (NASSER *et al.*, 2016; GUO *et al.*, 2019). Como a colina que participa na síntese de lipoproteínas responsáveis por mobilizar ácidos graxos para fora do fígado, sendo fundamental para o metabolismo da gordura (LEBLANC, 2010; OETZEL, 2010). Enquanto que a silimarina possui inúmeras atividades biológicas, como efeitos antioxidantes, antiinflamatórios e de regeneração celular, que estão relacionados às suas propriedades hepatoprotetoras (CHAMBERS *et al.*, 2017).

De acordo com Nasser *et al.* (2016), a inclusão de 1,0 mg/Kg de AF B1 por 10 dias em bezerros foi capaz de aumentar a atividade sérica de alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), e os teores de nitrogênio ureico e creatinina no sangue,

além de reduzir o número de leucócitos (linfócitos, neutrófilos e monócitos) e dos eritrócitos totais, e também do hematócrito e a concentração de hemoglobina.

Nestes prévios experimentos, os animais foram intoxicados com apenas uma micotoxina, com doses diferentes das que normalmente estão contidas na ingesta, podendo não refletir uma situação real de exposição aos agentes. Além disto, estas pesquisas estudaram apenas uma micotoxina e não várias delas, o que poderia potencializar sua ação.

Atualmente existe uma formulação no mercado contendo extrato de cardo mariano (silimarina), parede celular de levedura, bentonita, carvão vegetal, vitamina E e cloreto de colina que além de funcionarem como adsorvente de micotoxinas ainda prometem uma regeneração hepática e melhorias no aproveitamento de nutrientes, o que já demonstrou promover maior saúde e desempenho de frango de corte (GONZALEZ, 2013), acreditando-se que possa causar efeitos semelhantes em bovinos de leite.

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1 Objetivo geral:**

Avaliar se a associação de adsorvente bentonita e antioxidantes hepáticos melhoram a função hepática, metabolismo oxidativo leucocitário e produção de leite de bovinos alimentados com dietas contendo micotoxinas naturalmente produzidas.

### **4.2 Objetivos específicos:**

- Verificar se a associação de adsorvente bentonita e antioxidantes hepáticos influenciam na regeneração hepática por meio de enzimas que indicam lesão (AST e LDH), colestase (GGT) e função hepática (proteína e albumina).
- Avaliar se a associação de adsorvente bentonita e antioxidantes hepáticos interferem no hemograma e no metabolismo oxidativo de leucócitos sanguíneos dos bovinos.
- Avaliar a qualidade (análise físico-química) e quantidade (volume) do leite produzido por vacas leiteiras alimentados com dietas contaminadas com baixos teores de micotoxinas naturalmente produzidas.

## 2. REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Micotoxinas na pecuária

A alimentação do bovino de leite exige elevados níveis energéticos e fibras suficientes para manter o bom funcionamento do rúmen. Por isso a dieta deve ter fontes de amido como o milho, responsável por fornecer grande valor energético ao animal, que quando utilizado de forma correta, contribui para o rendimento, melhorando as características na fermentação ruminal e assim incrementa a produção leiteira (PEREIRA; ANTUNES, 2007).

Assim para a produção de leite ser em grande escala e com qualidade, fatores como a nutrição e a sanidade devem garantir que a vaca consiga produzir leite nas condições satisfatórias de higiene e sanidade. No entanto a maioria dos alimentos fornecidos aos ruminantes tem algum grau de contaminação por micotoxinas, principalmente porque a alta umidade e temperatura do clima brasileiro são condições propícias para o crescimento e o desenvolvimento de fungos toxigênicos na maioria dos alimentos, seja durante sua produção, processamento, transporte ou armazenamento (KELLER *et al.*, 2013; CUSTODIO *et al.*, 2017).

Desta maneira ocorre a contaminação indireta, quando um ingrediente é previamente contaminado por um fungo toxigênico, ou direta, quando o alimento se torna contaminado por um fungo também toxigênico, com posterior formação de micotoxinas. Independente do tipo de contaminação, cabe ressaltar que as micotoxinas ainda permanecerão no produto final, já que são termoestáveis, gerando danos à saúde animal, diminuição na produção leiteira, aumentando a incidência de doenças e diminuição no desempenho reprodutivo dos bovinos (FREIRE *et al.*, 2007; CUSTODIO *et al.*, 2017).

As micotoxinas são metabólitos secundários produzidos por diversas cepas de fungos filamentosos principalmente aos pertencentes dos gêneros *Penicillium*, *Alternaria*, *Fusarium*, *Aspergillus*, *Claviceps* e *Stachybotrys*. São moléculas um tanto quanto diferentes, com estruturas que variam de simples anéis heterocíclicos apresentando peso molecular de até 50 Dalton, a grupos de 6 a 8 anéis heterocíclicos irregularmente dispostos e com peso molecular total maior que 500 Dalton, e que não apresentam imunogenicidade (PINTO; VAAMONDE, 1996).

Mais de quatrocentas micotoxinas são conhecidas atualmente, mas somente algumas são de fato preocupantes para a segurança alimentar humana e animal, como AF, Fb ocratoxinas (OT), tricotecenos (TRC) e Zea (SIRHAN *et al.*, 2013).

Segundo Becker-Algeri *et al.* (2016) a preocupação com a contaminação por micotoxinas em laticínios teve início na década de 1960, com os primeiros casos relatados de contaminação pela AFM<sub>1</sub>, que é um metabólito da AFB<sub>1</sub> consumido pelo animal e metabolizado pelo rúmen, absorvido e secretado no leite dos bovinos.

No Brasil, Pereira e Antunes (2007) detectaram AFM<sub>1</sub> em 38% das amostras de leite pasteurizado com nível médio de 0,059 µg/L, mas as concentrações obtidas estavam dentro dos limites máximos estabelecidos pela legislação brasileira (0,5 µg/L). No entanto, resultados recentes obtidos por Oliveira (2013) são bastante alarmantes, uma vez que 31% das amostras de leite UHT (*Ultra High Temperature*) apresentaram níveis extremamente altos de AFM<sub>1</sub>, variando de 1,0 a 4,1 µg/L, o que equivale a duas vezes ou mais do valor máximo limite tolerável pelas regulamentações brasileiras. Outros estudos realizados no Brasil encontraram a presença de AFM<sub>1</sub> em amostras de leite coletadas nos estados de São Paulo, Pirassununga, Lavras e norte do Paraná, respectivamente: 95% (0,01 a 0,2 µg/L) (SHUNDO *et al.*, 2009); 40% (0,009 a 0,069 µg/L) (JAGER *et al.*, 2013); 53% (nível médio de 0,074 µg/L) (PEREIRA *et al.*, 2005) e 24% (nível médio 0,680 µg/L) (SASSAHARA *et al.*, 2005).

### **2.1.1 Legislação para presença de micotoxinas em alimentos e rações de animais**

Para evitar os efeitos nocivos das micotoxinas em alimentos e em rações para animais, várias legislações têm sido adotadas mundialmente. No Brasil, as AF são as únicas micotoxinas cujos níveis máximos em alimentos estão previstos na legislação (CASTRO *et al.*, 2015).

Os órgãos brasileiros de fiscalização de micotoxinas são: o Ministério da Saúde e o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento- MAPA (BRASIL, 1988). Para qualquer matéria prima a ser utilizada diretamente ou como ingrediente para rações destinadas ao consumo animal, o limite máximo de AF presente pode ser de 50 µg/Kg. O MAPA não especifica quais metabólitos porém acredita-se que seja a somatória das AFB<sub>1</sub> B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub>. O limite é válido para toda e qualquer produto, seja para alimentação direta ou como ingrediente para rações.

No entanto o Lamic - Laboratório de Análises Micotoxicológicas (2020), recomenda que os limites máximos toleráveis de micotoxinas em alimentos para a espécie bovina, na categoria fêmeas em lactação seja de: AF:0 µg/kg, Fb:3000 µg/kg, Ot:2000 µg/kg, Don:2000 µg/kg, TRC HT-2: 800 µg/kg, TRC T-2: 400 µg/kg e Zea: 250 µg/kg.

A União Européia possui a legislação mais restrita para micotoxinas em alimentos e contempla um maior número de micotoxinas. O limite de AFB<sub>1</sub> é de 10 µg/kg para ração pronta para animais. Todos os cereais e produtos derivados de cereais, incluindo produtos derivados da sua transformação estão limitados a apresentar no máximo 2 e 4 µg/kg de AFB<sub>1</sub> e AF. Já a legislação dos Estados Unidos determina que o limite das AFB<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub> em alimentos seja de 20 µg/kg, respectivamente, abaixo dos limites recomendados na Proposta de Resolução Brasileira (LAMIC, 2020).

## 2.1.2 Principais micotoxinas

### 2.1.2.1 Aflatoxina - AF

As AF são metabólitos produzidos pelos fungos *Aspergillus flavus* e *A. parasiticus*, embora também as espécies *A. nomius*, *A. bombycis*, *A. pseudotamari* e *A. ochraceoroseus* tenham também se mostrado aflatoxigênicas, mas são de ocorrência pouco frequente na natureza (KURTZ-MAN *et al.*, 1978; MOSS, 2002; PETERSON *et al.*, 2001). As principais aflatoxinas conhecidas são denominadas de AFB<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub>, classificadas de acordo com a cor da fluorescência B (*blue*) G (*green*) (BORDIN *et al.*, 2014). Dentre elas, a que apresenta maior poder toxigênico é a AFB<sub>1</sub>, seguida das AFG<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub> e AFG<sub>2</sub> (ARAUJO, 2006; CORREA, 2000). Seus efeitos nos animais podem variar de acordo com a dose, a duração da exposição, espécie, raça e dieta, na qual, geralmente, os animais jovens são mais suscetíveis que os mais velhos (RICHARD *et al.*, 2003).

Geralmente as concentrações de aflatoxinas encontrada nas dietas não é grande o suficiente para impactar na redução do consumo de alimentos e na produção leiteira. Todavia, esta baixa concentração diária, permite que os metabólitos AF M<sub>1</sub> e B<sub>1</sub> sejam secretados no leite (KUTZ *et al.*, 2009).

De acordo com Cruz (2012), a estrutura das AF praticamente não é alterada pela microbiota ruminal. Somente uma parcela inferior a 10% do total de AF ingerida pode ser biotransformada em aflatoxicol. No entanto, o aflatoxicol ainda mantém o mesmo poder tóxico da molécula original. Portanto, em relação as AF, o rúmen não oferece qualquer mecanismo de bioproteção. Logo, as AF ingeridas serão absorvidas no intestino por difusão passiva (SÁVIO, 2018). Uma vez na circulação sistêmica, elas são distribuídas para o organismo ligadas a componentes sanguíneos, tais como proteínas e eritrócitos plasmáticos

(GAL TIER, 1998). Após absorção, são metabolizadas principalmente no fígado. Todavia, esse processo pode ocorrer no próprio local de absorção, no sangue e em outros órgãos extra-hepáticos (CASTRO *et al.*, 2015).

A forma ativada da AFB<sub>1</sub> é o composto identificado como 8,9 - óxido de AFB<sub>1</sub>. Altamente eletrofílico, este composto é capaz de ligações covalentes com sítios nucleofílicos do ácido desoxirribonucleico (DNA) e ácido ribonucleico (RNA) (BIEHL; BUCK 1987). Essas ligações determinam a reação rapidamente, por meio de de macromoléculas, como RNA e proteínas, os quais representam a lesão bioquímica primária produzida pelas AF (HSIEH; ATKINSON, 1991). Em ruminantes, o efeito primário das AF é a redução no ganho de peso e produção de leite, além de danos ao fígado e rim (IAMANAKA; OLIVEIRA; TANIWAKI, 2010). Outra questão é que um efeito prolongado à uma pequena dose de AF pode culminar com grandes lesões estruturais e funcionais no fígado, inclusive neoplasia (KOVALSKY *et al.*, 2016)

#### **2.1.2.2 Fumonisinias - Fb**

As Fb são toxinas produzidas principalmente pelas espécies *Fusarium verticillioides* e *F. proliferatum* (DA ROCHA *et al.*, 2014). Atualmente, já foram identificados quinze análogos de Fb, sendo as formas mais importantes e presentes em quantidades significativas as B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> e B<sub>3</sub>) (VISCANTI *et al.*, 1995).

Estudos mostram que é possível haver um pequeno acúmulo de Fb no fígado e rim, contudo, essas micotoxinas são muito pouco absorvidas no trato gastrintestinal (BACON *et al.*, 1996). As informações disponíveis na literatura sobre ruminantes indicam que a Fb<sub>1</sub> passa pelo rúmen praticamente sem sofrer alterações (CRUZ, 2012).

O principal efeito das Fb é a indução da apoptose, um processo especializado de morte celular, sendo parte do desenvolvimento normal dos órgãos e manutenção tecidual, que também ocorre em resposta a estímulos ambientais. Diversos constituintes celulares estão envolvidos nos processos apoptóticos e sua regulação, entre eles, os esfingolipídeos (DRAGAN *et al.*, 2001).

As Fb são estruturalmente semelhantes aos precursores dos esfingolipídeos, especialmente a esfinganina e enfiingosina (FINK- GREMMELS, 1999). Quando há presença de Fb nos organismos, ocorre um bloqueio da biossíntese dos esfingolipídeos, devido inibição da ceramida sintase, uma enzima essencial no processo. Em longo prazo, a inibição

prolongada pode promover a morte celular induzida pelas bases esfingoides livres, pois se acumulam em concentrações tóxicas (RILEY *et al.*, 1998).

As Fb causam lesões profundas no fígado, no trato gastrointestinal, no sistema nervoso e nos pulmões (UPADHAYA *et al.* 2010). Doses agudas de Fb em suínos podem inibir a atividade de macrófagos pulmonares responsáveis pela eliminação de patógenos, levando ao edema pulmonar (HARRISON *et al.*, 1990). Em cavalos a contaminação se manifesta como lesões neurológicas graves que levam a problemas locomotores e ataxia (YIANNIKOURIS; JOUANY, 2002). Porém, pode se dizer que o efeito primário das Fb em ruminantes é a redução no ganho de peso e produção de leite, além de danos provocados em fígado e rins (IAMANAKA *et al.*, 2010).

### 2.1.2.3 Tricotecenos -TRC

Tricotecenos são produzidos por várias espécies de *Fusarium*, todavia não exclusivamente, uma vez que algumas espécies do gênero *Cephalosporium* e *Trichoderma* também produzem essas micotoxinas. Esta classe de metabólitos fúngicos com mais de 150 compostos estruturalmente relacionados, são quimicamente divididos em quatro tipos A,B, C e D (BRUEGEL, 2003). Os do tipo A e B são os mais importantes, onde os do tipo A compreendem principalmente as toxinas HT-2 e T-2, enquanto os do tipo B são frequentemente representados pelo Don e seus derivados 3-acetildeoxinivalenol (3-AcDON), 15-acetildeoxinivalenol (15-AcDON) e nivalenol (NIV) (RODRÍGUEZ-CARRASCO *et al.*, 2013).

As toxinas HT-2 e T-2, embora não sejam muito prevalentes, são os membros mais tóxicos. São capazes de inibir a síntese de proteínas e DNA e com isso enfraquecer a resposta imune em animais. Os sintomas incluem diminuição da ingestão de alimentos e ganho de peso, diarreia com sangue, hemorragia, lesões orais, baixa produção de ovos e leite, aborto e até a morte (GROOPMAN *et al.*, 2013).

Por sua vez, o Don é um dos TRC menos tóxicos, no entanto por ser altamente incidente, é considerado muito importante na pecuária (BRUEGEL, 2003). A exposição ao Don afeta mais os animais monogástricos, principalmente suínos, e pode causar diminuição no consumo de alimentos, vômitos e anorexia (MARIN *et al.*, 2013). No geral, a ingestão de níveis baixos a moderados dessa micotoxina pelos animais leva ao aumento da suscetibilidade a patógenos e a um baixo desempenho (BRUEGEL, 2003).

#### **2.1.2.4 Zearalenona - Zea**

De acordo Zinedine (2007), a Zea é uma lactona que pode ser produzida por espécies de fungos, como *Fusarium culmorum*, *F. graminearum* e *F. sporotrichioides*. A Zea é um composto fitoestrogênico (DIEKMAN; GREEN, 1992), promovendo efeito estrogênico em animais domésticos e sua produção é dependente das condições climáticas sazonais, sendo mais prevalentes nas estações frias e úmidas (DOKO *et al.*, 1996; WHITLOW *et al.*, 1999). A Zea é termicamente estável, mas pode ser destruída parcialmente durante a extrusão de cereais (CASTELLS *et al.*, 2005).

O principal alvo da toxicidade da Zea é o sistema reprodutivo (BOEIRA, 2012). No qual gera problemas reprodutivos como alterações físicas nos órgãos genitais semelhantes aos induzidos pelo estradiol, edemas e hipertrofia dos órgãos genitais de fêmeas pré-púberes, diminuição na taxa de sobrevivência de embriões em fêmeas gestantes, alteração na morfologia dos tecidos uterinos devido a redução nas quantidades de hormônio luteinizante e progesterona, diminuição na produção de leite, feminização de machos jovens devido à diminuição da produção de testosterona, infertilidade e morbidade perinatal (UPADHAYA *et al.*, 2010).

Apesar de Guerre *et al.* (2000) ressaltar que a Zea é produzida em quantidades muito pequenas em condições naturais e, provavelmente em quantidades insuficientes para causar problemas nos ruminantes, foi demonstrado que a Zea causou infertilidade em ovelhas em pastoreio na Nova Zelândia (TOWERS *et al.*, 1993). Também é comum em casos de toxicoses, o animal apresentar aspecto saudável e escore corporal normal, porém com baixo desempenho reprodutivo (WHITLOW *et al.*, 1999).

Estudos mostram que a Zea, quando passa pelo rúmen é convertida em alfa-zearalenol, se tornando ainda mais potente (DANICKE *et al.*, 2005).

#### **2.2 Micotoxinas e a imunidade inata**

De acordo com Corrier (1991), o consumo de pequenas quantidades de toxinas fúngicas pode resultar em imunidade prejudicada e diminuição da resistência a doenças infecciosas.

As micotoxinas promovem depressão da atividade de linfócitos T ou B e da produção de imunoglobulina, atividade de complemento reduzida e função prejudicada de células efectoras como os macrófagos.

Embora as características celulares e moleculares destes efeitos imunossupressores não estejam claramente compreendidas, sabe-se que as micotoxinas agem nas células de rápida proliferação e diferenciação contínuas do sistema imunológico, e comprometem também a complexa rede de comunicação entre componentes celulares e humorais (CORRIER, 1991).

Em estudo Naseer *et al.* (2016) e Donmez *et al.* (2012) revelaram que AFB<sub>1</sub> afetou bezerros e carneiros respectivamente, diminuindo tanto as contagens totais de leucócitos e de suas populações como as variáveis do eritrograma. Esses resultados foram de acordo com os resultados de outros estudos, que verificaram supressão da hematopoiese após intoxicação por AF (OGUZ *et al.*, 2003). Esta redução nos valores hematológicos pode ser devido a muitas causas, incluindo desde a diminuição na ligação do ferro até defeitos hematopoiéticos nas células sanguíneas (ABDÉL-WAHHAB *et al.*, 2002).

Os ruminantes apresentam uma distinta capacidade de desintoxicar e degradar micotoxinas presentes em ração na forma de microbiota ruminal no entanto, esta habilidade é saturável (KHATOON, 2012). Esses efeitos adversos na saúde são inesperados e comumente associado à dose dependência e uma longa exposição. Bovino de alto rendimento, especialmente durante um período de transição, são propensos a serem mais sensíveis as micotoxinas do que bovino de engorda, no entanto diferentes fatores como distúrbios metabólicos (acidose ruminal, febre do leite, cetose), mudança abrupta na dieta, uma dieta rica em proteínas, balanço energético negativo e atividade antimicrobiana de algumas micotoxinas podem diminuir a capacidade desintoxicante da microbiota ruminal afetando os animais de maneira diferente (CHAIYOTWITTAYAKUN, 2010; KHATOON 2012).

Jovaisiene *et al.* (2016) constataram que a alimentação naturalmente contaminada com baixa concentração de micotoxinas produzido por *Fusarium* e *Aspergillus* spp na dieta de vacas leiteiras podem ter influência na imunidade de vacas leiteiras, interferindo na CCS das vacas. Korosteleva *et al.* (2007) demonstraram o efeito imunossupressor das micotoxinas, com a redução nas concentrações séricas de IgA em vacas alimentadas com uma dieta contaminada por *Fusarium*.

### **2.3 Micotoxinas e glândula mamária**

As micotoxinas prejudicam a microbiota ruminal, promovendo enchimento reduzido do rúmen, má conversão alimentar e diarreia leve em vacas leiteiras alimentadas com silagem naturalmente contaminada. Estas manifestações levam a redução da produção de leite (perdas

> 15%) e aumento da incidência de mastite subclínica (HADLEY *et al.*, 2006; WENZ *et al.*, 2007).

Em um estudo realizado por Queiroz *et al.* (2017), AF na dieta provocou redução na concentração da proteína do leite e no percentual de gordura, seja por sua ligação direta nas frações proteicas do leite ou por inibição diretamente da síntese proteica (BARBIROLI *et al.*, 2007).

Jovaisiene *et al.* (2016) notaram que vacas alimentadas com dieta contendo Don, Zea e AF naturalmente produzidas tiveram redução da produção de leite e na porcentagem de gordura.

## **2.4 Métodos corretivos com a utilização de adsorvente de micotoxinas**

Existem inúmeras formas de prevenir a contaminação por fungos e micotoxinas, porém nem todas são viáveis. A maneira mais prática de impedir a contaminação dos animais por micotoxinas, é inibir o desenvolvimento de fungos nos alimentos que são fornecidos, controlando a umidade no armazenamento de feno e grãos, utilizando aditivos que controlam a proliferação de fungos e utilização de plantas geneticamente resistentes ao ataque desses microrganismos (MALLMANN *et al.*, 2006).

De acordo com Galvano *et al.* (2001) a abordagem dietética mais eficaz é a adição de adsorventes de micotoxinas em dietas contaminadas. O efeito é relativo, pois dependem da especificidade e do mecanismo do processo de adsorção. Além disso, as características das micotoxinas, como forma, tamanho e solubilidade, também influenciam na eficácia dos adsorventes (HUWING *et al.*, 2001).

Um adsorvente de micotoxinas é um material inerte, com capacidade de se fixar na superfície da micotoxina e sair do organismo junto com as fezes, evitando que a micotoxina seja absorvida pelo animal (ARELLANO; ROSAS, 2008). O uso de adsorventes é um recurso mediador para a utilização de rações com cargas de micotoxinas elevadas para o consumo animal, a fim de cobrir possíveis falhas que ocorrem no controle de qualidade das fábricas de rações (MENEGAZZO, 2008). Existem alguns outros processos de descontaminação de rações como inativação térmica, luz ultravioleta, radiação ionizante ou extração com solventes (Bovo *et al.*, 2010) mas o processo físico, com adsorventes misturados às rações é o mais utilizado (SEKIYAMA *et al.*, 2006). De acordo com Diaz e Smith (2010), é ideal que o adsorvente seja efetivo contra diversas micotoxinas, no entanto, quando utilizado deve ser

efetivo para as micotoxinas que deseja-se combater, pois normalmente as rações estão contaminadas por mais de um composto.

Para serem usuais, os adsorventes devem ter preços acessíveis, ocupar uma pequena parcela da dieta, não devem ter sabor, odor e impurezas. Entre as micotoxinas existe uma grande complexidade química, por isso, a seleção de um adsorvente deve ser baseada na análise de qual o tipo de micotoxina encontrada nos alimentos com posterior acesso as informações obtidas de estudos científicos confiáveis, já que não existe um adsorvente ideal para todas as micotoxinas (CASTRO *et al.*, 2015).

A redução da bioacessibilidade de micotoxinas é a estratégia mais utilizada e tem sido estudada desde o início dos anos 80, empregando compostos adsorventes que complexam as moléculas de micotoxinas (que chegam ao trato gastrointestinal a partir dos ingredientes contaminados), a fim de evitar que as mesmas possam causar danos durante a passagem pelo trato gastrointestinal. Os compostos usados como adsorventes de micotoxinas podem variar amplamente quanto a sua natureza, podem ser minerais de argila natural ou modificada, fibras vegetais, leveduras, bactérias ou constituintes da parede celular ou citoplasmática destes microrganismos, polímeros sintéticos e carvão ativado (PENG *et al.*, 2018).

#### **2.4.1 Adsorventes inorgânicos**

Os ligantes de micotoxinas inorgânicos são polímeros à base de silicatos, como por exemplo, zeólitos, bentonitas, argilas utilizadas para clarificação no refinamento do óleo de canola, aluminossilicato sódio-cálcio hidratado (HSCAS), terra diatomácea e vários tipos de argila. Tais materiais costumam ser baratos e de fácil manuseio. Tradicionalmente são incluídos na formulação da ração durante o processamento. Seu custo é baixo, mas a taxa de inclusão para os animais normalmente é elevada (CASTRO *et al.*, 2015).

A grande maioria desses produtos adsorve apenas algumas micotoxinas específicas, ligando-se também a minerais e vitaminas, o que pode causar complicações para a saúde, ou em virtude das altas taxas de inclusão tornam-se demasiadamente caros para a aplicação industrial. Não são biodegradáveis e podem representar problemas quanto ao destino dos resíduos quando acrescentados em níveis altos nas dietas dos animais (CASTRO *et al.*, 2015).

O carvão ativado é utilizado como adsorvente em casos de envenenamento. Há alguns benefícios da utilização de carvão ativado como adsorventes, prevenindo a absorção e, especialmente, a recirculação enterohepática das micotoxinas (RAMOS *et al.*, 1996). Para Solfrizzo *et al.* (2001), a capacidade do carvão ativado de adsorver Fb<sub>1</sub> em soluções aquosas

foi demonstrada *in vitro*. Contudo, em experimento *in vivo*, não foi efetiva. Huwing *et al.* (2001) afirmaram que o carvão ativado demonstrou pouco ou até nenhum efeito contra as micotoxinas.

As argilas caulínicas também podem ser usadas como adsorventes. Devido as suas características estruturais, apresentam maior espectro de adsorção de micotoxinas, tais como a TRC T2, Don, Fb e Zea, que são bipolares. A AF pode ser mais eficientemente adsorvida por argila polar devido a sua carga positiva, bem como bentonitas, montmorilonitas e zeólitas (FASSANI; BRITO, 2004).

De acordo com Mikolaichik e Morozova (2009), a adição de bentonita como premix mineral-vitamínico para rações de vacas leiteiras promoveu melhora na digestibilidade da matéria seca, matéria orgânica, proteína bruta, celulose, extrato livre de gordura e nitrogênio, além de promover aumento da produção leiteira.

#### **2.4.2 Adsorventes orgânicos**

Dentre os adsorventes orgânicos de micotoxinas incluem-se aqueles originários de vegetais fibrosos como casca de aveia, farelo de trigo, fibra de alfafa, extratos de parede celular de leveduras, celulose, hemicelulose e pectina. Por serem materiais biodegradáveis são vantajosos, no entanto em alguns casos podem ser também a fonte de contaminação por micotoxinas (CASTRO *et al.*, 2015).

Os adsorventes orgânicos a base de leveduras são os mais eficiente, pois não são tóxicos, possuem boa área de superfície, boa especificidade e necessitam de uma baixa inclusão na dieta (SÁVIO, 2018). Seus efeitos estão ligados a degradação de micotoxinas e ainda na metabolização delas em produtos menos tóxicos (KOLOSOVA; STROKA, 2011).

As interações estabelecidas entre adsorvente a base de parede celular de *S. cerevisiae* e as micotoxinas foram descritas há quase duas décadas, sendo as frações de B-D-glucano as principais implicadas no processo de adsorção. Nestas frações ocorrem ligações não covalentes (ligações de hidrogênio e forças de Van der Waals) entre os grupos hidroxila das leveduras com os grupos hidroxilo, cetona e lactona das micotoxinas, sendo este complexo altamente estável para a Zea (YIANNIKOURIS *et al.*, 2004; JOUANY, 2007; DIAZ; SMITH, 2010).

#### **2.4.3 Adsorvente bentonita e antioxidantes hepáticos**

A argila bentonita é um adsorvente barato, orgânico e não tóxico. As argilas quando estão organofílicas elas tem afinidade com moléculas orgânicas e por isso as aplicações mais importantes para estes compostos são como adsorventes de moléculas orgânicas, porque possuem o mesmo tipo de propriedades reológicas. As argilas organofílicas funcionam de forma eficaz no reconhecimento de micotoxinas e na captura das mesmas através de troca iônica e do processo de adsorção (VIOTTI, 2006).

De acordo com Tamares (2000) as bentonitas tem cargas negativas, por isso são polares. Micotoxinas com carga positiva podem ser absorvidas por argila polar. A adsorção das micotoxinas ocorrem no intestino delgado ou intestino grosso antes que a micotoxina chegue a corrente sanguínea.

A colina presente no composto atua na formação da estrutura celular, acetilcolina e metionina, tendo importante papel na transmissão de impulsos nervosos (LEWIS *et al.*, 2014). Por sua demanda elevada em comparação a outras vitaminas e por não atuar na formação de complexos enzimáticos, a colina não é classificada de forma obrigatória como vitamina hidrossolúvel (BERTECHINI, 2012). A deficiência de colina pode afetar a capacidade das células hepáticas em secretar a gordura acumulada no fígado, por prejudicar a formação de fosfolídeos estruturais de lipoproteínas transportadoras (BERCHIELLI *et al.*, 2011).

A colina participa na síntese de lipoproteínas responsáveis por mobilizar ácidos graxos para fora do fígado, sendo fundamental para o metabolismo da gordura (LEBLANC, 2010; OETZEL, 2010).

O extrato vegetal da *Cardus marianus* possui a silimarina como o principal componente químico, a qual é composta por uma mistura de compostos secundários da classe dos polifenóis (flavonoides e lignanos) (ABENAVOLI *et al.*, 2018). A silimarina possui inúmeras atividades biológicas, como efeitos antioxidantes, antiinflamatórios e de regeneração celular, que estão relacionados às suas propriedades hepatoprotetoras (CHAMBERS *et al.*, 2017).

De modo geral, os mecanismos de ação antioxidante da silimarina consistem na prevenção da formação de radicais livres, eliminação de espécies reativas através da doação de elétrons e ativação de enzimas antioxidantes, como superóxido dismutase (SURAI, 2015).

A parede celular de levedura, principalmente *Saccharomyces cerevisiae*, usadas na alimentação animal há várias décadas, são fontes de proteínas de alta qualidade, vitaminas do complexo B e minerais, especialmente selênio e zinco. Seu uso na alimentação de ruminantes também tem sido cogitado em pequena quantidade, como aditivo, consistindo em fator de crescimento para bactérias do rúmen, principalmente celulolíticas. O emprego de levedura nas

dietas de ruminantes pode provocar alterações na razão acetato/propionato e ainda aumentar o fluxo de proteína microbiana para o intestino delgado (ZEOULA, 2008).

A parede celular de levedura *Saccharomyces cerevisiae* é apontada como provável responsável pela melhoria no desempenho animal, por proporcionar estabilização do pH ruminal, maior digestão de frações fibrosas da dieta, maior consumo e aumento na síntese microbiana (SANTOS, 2006).

De acordo com Bertagnon *et al.*, (2014) a suplementação com vitamina E contribui de forma positiva para a imunidade dos animais, podendo aumentar o metabolismo oxidativo leucocitário quando existe algum desafio ambiental.

### 3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diante do exposto, os bovinos leiteiros são desafiados a produzir mais com dieta potencialmente contaminadas, que embora mantenham os teores de micotoxinas abaixo do limite considerado tóxico pela ANVISA, não os mantem em relação ao LAMIC ou a legislação de alguns países europeus (CASTRO, 2015; BRASIL, 1988; LAMIC, 2020).

Pesquisadores demonstraram que a intoxicação com doses altas de micotoxinas isoladas causaram lesão hepáticas, comprometendo a função do órgão, o que pode refletir em menor regulação do metabolismo de carboidratos, lipídeos e proteínas, refletindo diretamente em menor expressão do potencial produtivo do animal (CUSTODIO *et al.*, 2017; WHITLOW, 2005).

Ressalta-se também que estes contaminantes afetam a imunidade do animal, aumentando a susceptibilidade destas a doenças seja por este menor aporte nutricional ou diretamente pelo efeito das micotoxinas no material genético das células de alta proliferação, como as do sistema imune (CORRIER, 1991).

Já foi demonstrado que a maioria da dieta brasileira destinada a bovinos, normalmente composta por silagem de milho e concentrado, contém várias micotoxinas em pequenas doses, que podem agir crônica e sinergicamente nos bovinos, não se mensurando qual o real impacto na produção e saúde dos animais (WHITLOW, 2005).

Embora existam produtos comerciais que prometem minimizar os efeitos das micotoxinas nos animais, não há um adsorvente ideal para todas as micotoxinas (GUO *et al.*, 2019; NASSER *et al.*, 2016).

Desta maneira acredita-se que complexos de adsorventes possam ser uma boa alternativa pois, além de diminuir a absorção de micotoxinas no trato gastrointestinal ainda podem ter efeito no fígado, o principal órgão afetado pelas micotoxinas, auxiliando na sua regeneração, com possibilidades de permitir melhorias no metabolismo de nutrientes refletindo em maior produtividade e imunidade (NASSER *et al.*, 2016).

Diante de inúmeros novos produtos comerciais lançados no Brasil e mundo, faz-se necessárias pesquisas evidenciando se de fato os efeitos das micotoxinas naturalmente produzidas na dieta, podem ser atenuados pelo uso destes adsorventes.

## REFERÊNCIAS

ABDEL-WAHHAB, M. A.; NADA, S. A.; KHALIL, F. A. Physiological and toxicological responses in rats fed aflatoxin-contaminated diet with or without sorbent materials. **Animal Feed Science and Technology**, v. 97, n. 3-4, p. 209-219, 2002.

ABENAVOLI, Ludovico et al. Milk thistle (*Silybum marianum*): A concise overview on its chemistry, pharmacological, and nutraceutical uses in liver diseases. **Phytotherapy Research**, v. 32, n. 11, p. 2202-2213, 2018.

ANUÁRIO, LEITE 2018 EMBRAPA. Edição Digital Embrapa Gado de Leite: Texto Comunicação Corporativa, 2018. Anual. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1094149/anuario-leite-2018-indicadores-tendencias-e-oportunidades-para-quem-vive-no-setor-leiteiro>. Acesso em: 04 agosto 2020.

ASSOCON. **Associação Nacional dos Confinadores**, 2013. Disponível em: <http://ruralcentro.uol.com.br/analises/criacao-de-gado-de-corte-em-confinamento-assocon-realiza-levantamento-3165#y=0>. Acesso em: 04 agosto 2020.

ARAUJO, M.A. **Química de Alimentos: teoria e prática**. 32 ed. Vicosa: UFV, 2006. 596p.

ARELLANO, J. L.; ROSAS, I. G. Uso de Organoaluminossilicato para reducir El efecto tóxico de mezcla de Aflatoxinas y Zearalenona em la Producción de Huevo. **Atualidades em Micotoxinas e Armazenagem Qualitativa de Grãos II**. Florianópolis, Santa Catarina, 2008, p. 351-355.

BACON, C. W; PORTER, J. K; NORRED, W. P; LESLIE, J. F. Production of fusaric acid by *Fusarium* species. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n. 11, p. 4039-4043, 1996.

BARBIROLI, A.; BONOMI, F.; BENEDETTI, S.; MANNINO, S.; MONTI, L.; CATTANEO, T.; IAMETTI, S. Binding of Aflatoxin M1 to Different Protein Fractions in Ovine and Caprine Milk. **Journal Of Dairy Science**, v. 90, n. 2, p. 532-540, 2007.

BECKER-ALGERI, T. A. *et al.* Mycotoxins in bovine milk and dairy products: a review. **Journal of food science**, v. 81, n.3, p. 544-552, 2016.

BERCHIELLI, T.T.; VEGA-GARCIA, A.; OLIVEIRA, S.G. Principais técnicas de avaliação aplicadas em estudo de nutrição. In: BERCHIELLI, T.T.; PIRES, A.V.; OLIVEIRA, S.G. (Eds). *Nutrição de Ruminantes*. 2.ed. Jaboticabal: Funep, 2011. p.565-600.

BERTAGNON, H.G.; DA SILVA, E.B.; CONNEGLIAN, M.M.; NEUMANN, M., ESPER, G. V. Z., BASTOS, G. P., PEREIRA, J.R. Ação imunomoduladora da vitamina E na imunidade sistêmica e da glândula mamária de bovinos leiteiros alimentados com silagem. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 35, n. 2, p. 857-865, 2014.

BERTECHINI, A.G. *Nutrição de monogástricos*. 2ª Edição Lavras: Editora UFLA, 2012. 373 p.

BIEHL, M. L.; BUCK, W. B. Chemical Contaminants: their metabolism and their residues. **Journal Of Food Protection**, v. 50, n. 12, p. 1058-1073, 1987.

BOEIRA, S. P. **Caracterização de efeitos tóxicos decorrentes da exposição aguda micotoxina zearalenona em camundongos**. 2012. 101 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-graduação em Bioquímica, Universidade Federal do Pampa, Itaquí, 2012.

BORDIN, K.; SAWADA, M. M.; DA COSTA RODRIGUES, C. E.; DA FONSECA, C. R.; OLIVEIRA, C. A. F. Incidence of Aflatoxins in Oil Seeds and Possible Transfer to Oil: A Review. **Food Eng. Ver.**, v. 6, p. 20–28, 2014.

BOVO, F., CORASSIN, C. H., de OLIVEIRA, C. A. F. Descontaminação de aflatoxinas em alimentos por bactérias ácido-láticas. **Journal of Health Sciences**, v. 12, n. 2, p. 15-21, 2010.

BRÂNCIO, P. A.; EUCLIDES, V. P. B.; NASCIMENTO JÚNIOR, D.; FONSECA, D. M.; ALMEIDA, R. G.; MACEDO, M. C. M.; BARBOSA, R. A. Avaliação de três cultivares de *Panicum maximum* Jacq. sob pastejo: disponibilidade de forragem, altura do resíduo pós-pastejo e participação de folhas, colmos e material morto. **Revista Brasileira de Zootecnia, Viçosa, MG**, v. 32, n. 1, p. 55-63, 2003.

BRASIL, **Ministério da Agricultura**. Portaria MASNAD/SFA n. 7, 9 de Novembro de 1988.

BRUEGEL, P. Council for agricultural science and technology Mycotoxins: Risks in Plant, Animal, and Human Systems; **CAST**: Ames, LA, USA, 2003. p. 217.

CARVALHO, P. C. F.; DEWULF, A. K. M. Y.; MORAES, A.; BREMM, C.; TRINDADE, J. K.; LANG, C. R. Potencial do capim-quicuío em manter a produção e a qualidade do leite de vacas recebendo níveis decrescentes de suplementação. **Revista Brasileira de Zootecnia, Champaign**, v. 39, n. 9, p. 1866-1874, 2010.

CASTELLS, M.; MARIN, S; SANCHIS, V.; RAMOS, A. J. Fate of in cereals during extrusion cooking: a review. **Food Additives and Contaminants**, v. 22, n. 2, p. 150—157, 2005.

CASTRO, I. C. D; OLIVEIRA, H. F; MELLO, H. H. C.; MASCARENHAS, A. G. Micotoxinas na produção de suínos: mycotoxins in swine production. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias, Goiania**, v. 2, n. 1, p. 6-13, 2015.

CHAIYOTWITTAYAKUN, A. Mycotoxins and health in dairy cattle. In Globalization of tropical animal diseases and public health concerns. **Proceedings** of the 13th Association of Institutions for Tropical Veterinary Medicine (AITVM) Conference, Bangkok, Thailand, 2010. p 221-223.

CHAMBERS, Christopher Steven et al. The silymarin composition... and why does it matter???. **Food Research International**, v. 100, p. 339-353, 2017.

CORREA, B. Fungos toxigênicos: panorama nacional. **Encontro nacional de micotoxinas e simpósio de armazenamento qualitativas de grãos do Mercosul, 90**. Florianópolis, 2000. p. 162-168.

CORRIER, D. E. Mycotoxicosis: mechanisms of immunosuppression. **Veterinary immunology and immunopathology**, v. 30, n. 1, p. 73-87, 1991.

CRUZ, L. C. H. Da. **Micotoxinas na criação de ruminantes**. 2012. Ergomix. Disponível em: <https://pt.engormix.com/micotoxinas/artigos/micotoxinas-criacao-ruminantes-t37615.htm>. Acesso em: 12 ago. 2020.

CUSTODIO, L., FIGUEIRA, D. N., GLORIA, E. M., HOLDER, V.B., YIANNIKOURIS, A., PETTIGREW, J. E., KURITZA, L. N., RESENDE, F. D., SIQUEIRA, G. R. Survey of mycotoxin contamination in feedlot diets in Brazil. **J. Anim. Sci.**, v. 95, n. 4, p. 19, 2017.

DANICKE, S.; MATTHAUS, K.; LEBZIEN, P.; VALENTA, H.; STEMME, K.; UEBERSCHAR, K.-H.; RAZZAZI-FAZELI, E.; BOHM, 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.

DA ROCHA, M. E. B.; FREIRE, F. C. O.; MAIA, F. E. F.; GUEDES, M. I. F.; RONDINA, D. Mycotoxins and their effects on human and animal health. **Food Control**, v. 36, n. 1, p. 159-165, 2014.

DIAZ E. D.; SMITH, K. T. Mycotoxin sequestrating agents: practical tools for the neutralization of mycotoxins. In: Diaz D. (Ed.) **The Mycotoxin Blue Book**. 30 ed. Nottingham University Press. Nottingham, 2010. p. 323-339.

DIEKMAN, M. A.; GREEN, M. L. Mycotoxins and reproduction in domestic livestock. **Journal of Animal Science**, v. 70, n. 5, p. 1615-1627, 1992.

DOKO, M. B.; CANET, C; BROWN, N.; SYDENHAM, E. W.; MPUCHANE, S.; SAME, B. A. Natural Occurrence of fumonisins and zearalenone in cereals and cereal-based foods from Eastern and Southern Africa. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, n. 10, p. 3240-3243, 1996.

DÖNMEZ, N.; DÖNMEZ, H. H.; KESKIN, E.; KISADERE, İ. Effects of Aflatoxin on Some Haematological Parameters and Protective Effectiveness of Esterified Glucomannan in Merino Rams. **The Scientific World Journal**, v. 2012, p. 1-4, 2012.

DRAGAN, Y. P. Implications of Apoptosis for Toxicity, Carcinogenicity, and Risk Assessment: fumonisin b1 as an example. **Toxicological Sciences**, v. 61, n. 1, p. 6-17, 2001.

FASSANI, E. J.; BRITO, J. A. G de. **Utilização de argilas na alimentação animal**. CaO do Brasil LTDA, 2004. Disponível em: <https://www.caodobrasil.com.br/dicas-e-artigos/visualizar/utilizacao-de-argilas-na-alimentacao-animal>. Acesso em: 01 agosto 2020.

FINK-GREMMELS, J. Mycotoxins: Their implications for human and animal health. **Journal Veterinary Quarterly**, v. 21, n. 4, p. 115-120, 1999.

FREIRE, F. DAS C. O.; VIEIRA, I. G. P.; GUEDES, M. I. F.; MENDES, F. N. P. **Micotoxinas: Importância na alimentação e na saúde humana e animal**- Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2007. 48p.

GALTIER, P. Biological fate of mycotoxins in animals. **Revue de Medecine Veterinaire**, v. 146, n. 6, p. 549-554, 1998.

GALVANO, F.; PIVA, A.; RITIENI, A.; GALVANO, G. Dietary Strategies to Counteract the Effects of Mycotoxins: a review. **Journal Of Food Protection**, v. 64, n. 1, p. 120-131, 2001.

GONZALEZ, N. F. G. **Eficiência do aditivo antimicotoxinas na diminuição dos efeitos tóxicos das fumolisinas adicionas a dieta de frango de corte. 2013.** 73 f. Dissertação de mestrado, em produção e nutrição de não ruminantes, Universidade Federal de Lavras, 2013.

GROOPMAN, J. D.; KENSLER, T. W.; WU, F. Mycotoxins Occurrence and Toxic Effects. **Enciclopédia de Nutrição Humana**, v. 2-4, n. 5, p. 337–341, 2013.

GUERRE, P.; BAILLY, J. D.; BERNARD, G.; BURGAT, V. Biological fate of mycotoxins in animals. **Rev Med Vet**, v. 1998, n. 149, p. 549-554. 2000.

GUO, Y.; ZHANG, Y., WEI, C.; MA, Q.; JI, C.; ZHANG, J.; ZHAO, L. Efficacy of *Bacillus subtilis* ANSB060 biodegradation product for the reduction of the milk aflatoxin M1 content of dairy cows exposed to aflatoxin B1. **Toxins**, v. 11, n. 3, p. 161, 2019.

HADLEY, G., WOLF, C., HARSH, S. Dairy cattle culling patterns, explanations, and implications. **Journal of Dairy Science**, v. 89, n. 6, p. 2286– 2296, 2006.

HARRISON, L. R., COLVIN, B. M., GREENE, J. T., *et al.* Pulmonary edema and hydrothorax in swine produced by fumonisin B1 a toxic metabolite of *Fusarium moniliforme*. **J Vet Diagn Invest**, v. 2, n. 3, p. 217-221, 1990.

HORN, M. B.; LUCHTENBERG, R.; ASSUNÇÃO, M. A.; SANTOS, S. A.; SCUSSEL, V. M. Qualidade de silagens de milho para gado leiteiro produzidas na Região Sul do Brasil quanto às micotoxinas. **PUBVET**, Londrina, v. 8, n. 2, p. 0084-0229, 2014. Disponível em <http://www.pubvet.com.br/artigo/294/qualidade-de-silagens-de-milho-para-gado-leiteiro-produzidas-na-regiao-sul-do-brasil-quanto-as-micotoxinas>. Acesso em: 05 agosto 2020.

HSIEH, D. P. H.; ATKINSON, D. N. Bisfuranoid mycotoxins: their genotoxicity and carcinogenicity. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 283, p. 525- 32, 1991.

HUWING, A. *et al.* Mycotoxin detoxication of animal feed by different adsorbents. **Toxicology Letters**, Wurzburg, n. 122, p. 179-188, 2001.

IAMANAKA, B. T.; OLIVEIRA, I. S.; TANIWAKI, M. H. Micotoxinas em alimentos. In: **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agrônômica**, Recife, v. 7, p. 138-161, 2010.

IBGE. **Diretoria de Pesquisas, Coordenação de Agropecuária, Pesquisa da Pecuária Municipal 2017**. Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br/home/pimpfbr/brasil>. Acesso em 05 agosto 2020.

JAGER, A. V.; TEDESCO, M. P.; SOUTO, P. C. M. C.; OLIVEIRA, C. A. F. Assessment of aflatoxin intake in São Paulo, Brazil. **Food Control**, v. 33, n. 1, p. 87-92, 2013.

JOUANY, J. P. Methods for preventing, decontaminating and minimizing the toxicity of mycotoxins in feeds. **Animal Feed Science and Technology**, v. 137, n. 3, p. 342-362, 2007.

JOVAISIENE, J.; BAKUTIS, B.; BALIUKONIENE, V.; GERULIS, G. *Fusarium* and *Aspergillus* mycotoxins effects on dairy cow health, performance and the efficacy of Anti-Mycotoxin Additive. **Polish Journal of Veterinary Sciences**, v. 19, n. 1 p.79–87, 2016.

KELLER, L. A. M.; GONZÁLEZ PEREYRA, M. L.; KELLER, K. M.; ALONSO, V. A.; OLIVEIRA, A. A.; ALMEIDA, T. X.; BARBOSA, T. S.; NUNES, L. M. T.; CAVAGLIERI, L. R.; ROSA, C. A. R. Fungal and mycotoxins contamination in corn silage: Monitoring risk before and after fermentation. **J. Stored Products Res.**, v. 52, p. 42-47, 2013.

KHATOON, A. Ruminant microflora, mycotoxin inactivation by ruminal microflora and conditions favouring mycotoxicosis in ruminants: a review. **Inter J Vet Sci**, v. 1, n. 1, p. 37-44, 2012.

KOLOSOVA, A.; STROKA, J. Substances for reduction of the contamination of feed by mycotoxins: a review. **World Mycotoxin Journal**, v. 4, n. 3, p. 225-256, 2011.

KOROSTELEVA, S. N.; SMITH, T. K.; BOERMANS, H. J. Effects of Feedborne *Fusarium* Mycotoxins on the Performance, Metabolism, and Immunity of Dairy Cows. **Journal Of Dairy Science**, v. 90, n. 8, p. 3867-3873, 2007.

KOVALSKY, P.; KOS, G.; NÄHRER, K.; SCHWAB, C.; JENKINS, T.; SCHATZMAYR, G.; SULYOK, M.; KRŠKA, 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. 363, 2016.

KUTZ, R. E.; SAMPSON, J. D.; POMPEU, L. B.; LEDOUX, D. R.; SPAIN, J. N.; VÁZQUEZ-AÑÓN, M.; ROTTINGHAUS, G.E. Efficacy of Solis, NovasilPlus, and MTB-100 to reduce aflatoxin M1 levels in milk of early to mid lactation dairy cows fed aflatoxin B1. **Journal Of Dairy Science**, v. 92, n. 8, p. 3959-3963, 2009.

KURTZ-MAN, H. J.; MIROCHA, J. Zearalenone (F2) induced estrogenic syndrome in swine. In: WILLIE, T. D.; MOREHOI\_JSE, L. G. (Ed.). **Mycotoxic fungi, mycotoxins, mycotoxicoses**, New York: Marcel Dekker, v. 2, p. 1256-1 264, 1978.

LAMIC - LABORATÓRIO DE ANÁLISES MICOTOXICOLÓGICAS (Santa Maria Rs). Ufsm - Universidade Federal de Santa Maria. **Legislação**. 2020. Disponível em: <https://www.lamic.ufsm.br/site/legislacoes/legislacao-brasil>. Acesso em: 12 ago. 2020.

LEBLANC, Stephen. Monitoring metabolic health of dairy cattle in the transition period. **Journal of reproduction and Development**, v. 56, n. S, p. S29-S35, 2010.

LEWIS, Erin D. et al. Estimation of choline intake from 24 h dietary intake recalls and contribution of egg and milk consumption to intake among pregnant and lactating women in Alberta. **British journal of nutrition**, v. 112, n. 1, p. 112-121, 2014.

MALLMANN, C. A. *et al.* Critérios para seleção de um bom sequestrante para micotoxinas. In: **Conferência APINCO**. 2006. p. 213-224.

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.

MARTINEZ, R.O.; RUIZ, R.; HERRERA, R. Milk production of cows grazing Coast-cross N° 1 bermuda grass (*Cynodon dactylon*). I. Different concentrate supplementation levels. **Cuban Journal of Agricultural Science**, La Habana, v.14, n.2, p.225-232, 1980.

MELO, M. M.; NASCIMENTO, E. F.; OLIVEIRA, N. J. F. Intoxicação de bovinos por aflatoxina B1 presente em polpa cítrica: relato de um surto. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 51, n. 6, p. 555-558, 1999.

MENEGAZZO, R. Qualidade de Razões para Zootécnicos. **Atualidades em Micotoxinas e Armazenagem Qualitativa de Grãos II**, Florianópolis, Santa Catarina, 2008, p. 93- 100.

MEZZADRI, F. P. **LEITE: Análise da Conjuntura Agropecuária**, Ano 2017/18. DERAL, 2018.[http://www.agricultura.pr.gov.br/arquivos/File/deral/Prognosticos/2017/leite\\_2016\\_17.pdf](http://www.agricultura.pr.gov.br/arquivos/File/deral/Prognosticos/2017/leite_2016_17.pdf). Acesso em: 03 maio 2019.

MIKOLAICHIK, I. N.; MOROZOVA, L. A. Biological basis of using bentonite-based mineral-vitamin premix when increasing the milk yield of cows. **Russian Agricultural Sciences**, v. 35, n. 3, p. 199-201, 2009.

MORAES, L.B. **Estabelecimento de escores histopatológicos de lesão hepática e determinação de valores normais das enzimas aspartato aminotransferase e creatina quinase em frangos de corte**. 2004. 44 f. Dissertação de Mestrado em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2004.

MOSS, M. O. Mycotoxin review – 1. Aspergillus and Penicillium. **Mycologist**, v. 16, n. 3, p.116-119, 2002.

NASEER, O.; KHAN, J. A.; KHAN, M. S.; OMER, M. O.; CHISHTI, G. A.; SOHAIL, M. L.; SALEEM, M. U. Comparative efficacy of silymarin and choline chloride (liver tonics) in preventing the effects of aflatoxin B1 in bovine calves. **Polish journal of veterinary sciences**, v. 19, n. 3, p. 545-551, 2016.

NONES, J.; SCUSSEL, V.M. Zearalenone and its metabolites: Effect on Swine Reproductive Performance. **Pubvet in press**, v.7, n. 9, p. 536, 2013.

OGUZ, H.; HADIMLI, H. H.; KURTOGLU, V.; ERGANIS, O. Evaluation of humoral immunity of broilers during chronic aflatoxin (50 and 100 ppb) and clinoptilolite exposure. **Revue Med Vet**, v. 154, n. 7, p. 483-486, 2003.

OLIVEIRA, C.P. *et al.* 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.

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.

PENG, W. X.; MARCHAL, J. L. M.; POEL, A. F. B. van Der. Strategies to prevent and reduce mycotoxins for compound feed manufacturing. **Animal Feed Science And Technology**, v. 237, p. 129-153, 2018.

- PEREIRA, L. G. R.; ANTUNES, R. C. **O milho na alimentação de gado de leite**. IV Simpósio Mineiro de Nutrição de Gado de Leite. Belo Horizonte, MG: Escola de Veterinária, UFMG, 2007. p. 49-70.
- PEREIRA, M. M. G.; CARVALHO, E. P.; PRADO, G.; ROSA, C. A. R.; VELOSO, T.; SOUZA, L. A. F.; RIBEIRO, J. M. M. Aflatoxinas em alimentos destinados a bovinos e em amostras de leite da região de Lavras, Minas Gerais - Brasil. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 29, n. 1, p. 106-112, 2005.
- PETERSON, S. W.; ITO, Y.; HORN, B. W.; GOTO, T. *Aspergillus bombycis*, a new aflatoxigenic species and genetic variation in its sibling species, *A. nomius*. **Mycologia**, v. 93, n. 4 p. 689-703, 2001.
- PIER, A. C. Effects of aflatoxin on immunity. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 163, n. 11, p. 1268 – 1269, 1973.
- PIER, A. C., Richard. J. L, and Cyseuiski, S. J. Implication of mycotoxicosis in animal disease. **J. Am. Vet. Med. Assoc**, v. 176, n. 8, p. 719 – 724, 1980.
- PINTO, V. E. F.; VAAMONDE, G. Hongos productores de micotoxinas em alimentos, **Revista Argentina de Microbiologia**, v. 28, n. 3, p. 147-162, 1996.
- RAMOS, A. J.; FINK-GREMMELS, J.; HERNANDEZ, E. Prevention of toxic effects of mycotoxins by means of nonnutritive adsorbent compounds. **Journal of Food Protection**, v. 59, n. 6, p. 631-641, 1996.
- RAMOS A. J.; HERNANDEZ, E. Prevention of aflatoxicosis in farm animals by means of hydrated sodium calcium aluminosilicate addition to feedstuffs: A review. **Anim Feed Sci Technol**, v. 65, n. 1-4, p.197–206, 1997.
- RICHARD, J. L. Mycotoxins: risks in plant, animal, and human systems. *In: Iowa: Council for Agricultural Science and Technology*. Ames Iowa, 2003. p 217.
- RILEY, R. T. Mechanistic interactions of mycotoxins: theoretical considerations. *In: Mycotoxins in Agriculture and Food Safety* (Ed. K. K. Sinha and D. Bhatnagar) Marcel Dekker Inc., New York, 1998. p. 227-253.
- RODRÍGUEZ-CARRASCO, Y.; RUIZ, M.J.; FONT, G.; BERRADA, H. Exposure estimates to Fusarium mycotoxins through cereals intake. **Chemosphere**, v. 93, n.10, p. 2297–2303, 2013.
- RUANGWISES, N.; RUANGWISES, S. Aflatoxin M<sub>1</sub> contamination in raw milk within the central region of Thailand. **Bull. Environ. Cont. Toxicol.**, v. 85, n. 2, p. 195-198, 2010.
- SABATER-VILAR, M.; MALEKINEJAD, H.; SELMAN, M.H.J, VAN DER DOELEN, M.A.M. & FINK-GREMMELS, J. *In vitro* assessment of adsorbents aiming to prevent deoxynivalenol and zearalenone mycotoxicoses. **Mycopathologia**, v. 163, n. 2, p. 81–90, 2007.
- SANTOS, Flávio Augusto Portela et al. Desempenho de vacas em lactação recebendo dietas com diferentes teores de amido total, acrescidas ou não de levedura (*Saccharomyces cerevisiae*). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 35, n. 4, p. 1568-1575, 2006.

SASSAHARA, M.; YANAKA, E. K.; PONTES NETTO, D. Ocorrência de aflatoxina e zearalenona em alimentos destinados ao gado leiteiro na região norte do estado do Paraná. **Ciênc. Agrár.**, v. 24, p. 63-72, 2003.

SASSAHARA, M.; NETTO, D. P.; YANAKA, E. K. Aflatoxin occurrence in foodstuff supplied to dairy cattle and aflatoxina M1 in raw milk in the North of Paraná state. **Food Chem. Toxicol.**, v. 43, n. 6, p. 981-984, 2005.

SÁVIO, PEDRO LEONARDO L. OLSZEWSKIO. **Viabilidade do uso de adsorventes de micotoxina na terminação de cordeiros texel em confinamento.** 2018. 50 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Medicina Veterinária, Unopar, Arapongas, 2018.

SEKIYAMA, B. L.; FERRARI, G.; MACHINSKI JUNIOR, M. Processo de descontaminação de rações contendo micotoxinas. **Revista Analytica**, v. 26, p. 64-67, 2006.

SHUNDO, L.; NAVAS, S. A.; LAMARDO, L. C. A.; RUVIERI, V.; SABINO, M. Estimate of aflatoxin M1 exposure in milk and occurrence in Brazil. **Food Control**, v. 20, n. 7, p. 655-657, 2009.

SIRHAN, A. Y.; TAN, G. H.; WONG, R. C. S. Determination of aflatoxins in food using liquid chromatography coupled with electrospray ionization quadrupole time of flight mass spectrometry (LC-ESI-QTOF-MS/MS). **Food Control**, v. 31, n. 1, p. 35-44, 2013.

SOLFRIZZO, M. *et al.* Ineffectiveness of activated carbon in reducing the alteration of sphingolipid metabolism in rats exposed to fumonisin-contaminated diets. **Food and chemical toxicology**, v. 39, n. 5, p. 507-511, 2001.

SURAI, Peter F. Silymarin as a natural antioxidant: an overview of the current evidence and perspectives. **Antioxidants**, v. 4, n. 1, p. 204-247, 2015.

TAMARES, F. Química de las arcillas. *Indústria Avícola*, Córdoba, v. 32, p. 20-22, 2000.

THURSTON, J. R., RICHARD, J. L.; PEDEN, W. M. Immunomodulation in mycotoxicosis other than aflatoxicosis. In: THURSTON, J. R., RICHARD, J. R.; PEDEN, W. M. **Diagnosis of mycotoxicosis.** Martinus Nijhoff, Boston, MA, 1986. p. 149-161.

TOWERS, N. R.; SPOSEN, J. M. Zearalenone-induced infertility in sheep and cattle in New Zealand. **N.Z. Vet**, v. 41, p. 223-224, 1993.

UPADHAYA, S. D.; PARK, M. A.; HA, J. K. Mycotoxins and their biotransformation in the rumen: A review. *Asian-austnlasian J. Anim. Sci.*, 23, n. 9, 1250-1260, 2010.

WENZ, J.; JENSEN, S., LOMBARD, J.; WAGNER, B., DINSMORE, R. Herd management practices and their association with bulk tank somatic cell count on United States dairy operations. **Journal of Dairy Science**, v. 90, n. 8, p. 3652-3659, 2007.

WHITLOW, L.W. Molds and Mycotoxins in Feedstuffs – Prevention and Treatment. **In: Ruminant Nutrition Symposium.** 2005. p.123-142. Disponível em: <http://dairy.ifas.ufl.edu/rns/2005/Whitlow.pdf>. Acesso em 04 set 2020.

WHITLOW, L. W., HAGLER JUNIOR, W. M. Mycotoxins in dairy cattle. In: MOLIN, R; VALENTINI, M. L. Editor: **Simpósio Sobre Micotoxinas em Grãos**. São Paulo: Fundacao Cargil, 1999. p. 151-181.

YIANNIKOURIS, A.; JOUANY, J. P. Mycotoxins in feeds and their fate in animals: a review. **Animal Research**, v. 51, n. 2 p.81-99, 2002.

YIANNIKOURIS, A. *et al.* Influence of pH on complexing of model  $\beta$ -D-glucans th zearalenona. **Journal of Food Protection. Milwaukee**, v. 67, n. 12, p. 2741-2746, 2004.

VIOTTI, Glêdes Cabral de Albuquerque et al. Desenvolvimento e caracterização de argilas organofílicas para uso em alimentação animal como adsorvente inativador de micotoxinas: aflatoxina B1 e fumonisina B1. 2006.

VISCONTI, A.; BOENKE, A.; DOKO, M. B.; SOLFRIZZO, M.; PASCALE, M. Occurrence of fumonisin in Europe and BCR: measurements and testing projects. **Natural Toxins**, v. 3, n. 4, p. 269-274, 1995.

ZEOULA, Lucia Maria et al. Digestibilidade parcial e total de rações com a inclusão de ionóforo ou probiótico para bubalinos e bovinos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 37, n. 3, p. 563-571, 2008.

ZINEDINE, A.; SORIANO, J. M.; MOLTÖ, J. C.; MANES, J. Review on the toxicity, occurrence, metabolism, detoxification, regulations and intake of zearalenone: An oestrogenic mycotoxin. **Food Chem. Toxicol**, v. 45, n. 1, p. 1-18, 2007.

## CAPÍTULO I

### **Influência do adsorvente bentonita associado a antioxidantes hepáticos na saúde e produção de vacas leiteiras alimentadas com dietas contendo micotoxinas naturalmente produzidas.**

D. Domenico<sup>1</sup>, M.S. Oliveira<sup>1</sup>, G. Garbossa<sup>1</sup>, G.R. Thomaz<sup>2</sup>, A.C.A. Abreu<sup>2</sup>, C.R. Depaoli<sup>2</sup>,  
M.G. Ornaghi<sup>3</sup>, H.G. Bertagnon<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Alunos de pós graduação - Universidade Estadual do Centro-Oeste - Guarapuava, PR.

<sup>2</sup> Alunas de graduação - Universidade Estadual do Centro-Oeste - Guarapuava, PR.

<sup>3</sup> Safeeds Nutrição Animal S.A - Cascavel, PR.

<sup>4</sup> Universidade Estadual do Centro-Oeste - Guarapuava, PR.

### **ABSTRACT**

As mycotoxins are constant contaminants in the cattle diet, the use of adsorbents is recommended, although there is no ideal. And although there are studies on the subject, few have been directed to chronic natural intoxications. In this way, this experiment evaluated the effect of bentonite adsorbent associated with liver antioxidants on health and the milk production of dairy cows fed a diet containing naturally produced fumonisin, zearalenone and deoxynivalenol. Of the 18 dairy cows in the middle of lactation consuming this diet, half of the animals (n=9) received daily oral supplementation with additive (GT). For 56 days, at weekly intervals, a physical examination was performed, blood was collected for liver and immune assessments; and milk was harvested to evaluate milk production and chemical analysis. The additive promoted beneficial effects on the liver from the 24th, due to a decrease in the enzymatic activities of GGT ( $p \leq 0,05$ ) and LDH ( $p \leq 0,05$ ); and increased serum protein and albumin ( $p \leq 0,05$ ). There were increases in health, observed by fewer clinical manifestations of the disease, greater leukocyte oxidative metabolism capacity ( $p \leq 0,05$ ) and lower N/L ratio ( $p \leq 0,05$ ). The treatment also promoted a 19% increase in the volume of milk ( $p \leq 0,05$ ). It was concluded that the additive promoted health benefits and milk production in cattle.

Key-words: immunity, CCS, reactive oxygen species, albumin, zearalenone

### **RESUMO**

Como micotoxinas são contaminantes constante da dieta de bovinos, recomenda-se uso de adsorventes, apesar de não existir um ideal. E embora existam estudos sobre o assunto, poucos foram direcionados a intoxicações crônicas naturais. Desta maneira este experimento avaliou o efeito do adsorvente bentonita associado a antioxidantes hepáticos na saúde e a produção leiteiras de vacas leiteiras alimentadas com dieta contendo fumonisina, zearalenona e desoxinivalenol naturalmente produzidas. Das 18 vacas leiteiras no meio da lactação

consumindo esta dieta, metade dos animais (n=9) recebeu a suplementação oral diária com aditivo (GT). Durante 56 dias, em intervalos semanais, realizou-se exame físico, colheu-se sangue para avaliações hepática e imunitárias; e colheu-se leite para avaliação da produção e análise química do leite. O aditivo promoveu efeitos benéficos no fígado a partir do dia 24, devido diminuição das atividades enzimáticas de GGT ( $p \leq 0,05$ ) e LDH ( $p \leq 0,05$ ); e aumento de proteína e albumina séricas ( $p \leq 0,05$ ). Houve incrementos na saúde, observado por menos manifestações clínicas de doença, maior capacidade de metabolismo oxidativo leucocitário ( $p \leq 0,05$ ) e menor razão N/L ( $p \leq 0,05$ ). O tratamento ainda promoveu aumento de 19% do volume de leite ( $p \leq 0,05$ ). Concluiu-se que o aditivo promoveu benefícios na saúde e na produção de leite em bovinos.

Palavras-chave: imunidade, CCS, espécie reativa de oxigênio, albumina, zearelenona

## INTRODUÇÃO

O uso de alimentos mais energéticos tornou-se uma rotina na bovinocultura leiteira, e embora seja vantajosa para a produtividade, traz desafios relacionados a constante contaminação por fungos produtores de micotoxinas, especialmente no Brasil, em que as condições climáticas são favoráveis para esta contaminação no plantio, colheita ou armazenagem (KELLER et al., 2013; CUSTODIO et al., 2017). Desta maneira acredita-se que cerca de 90 a 100% da alimentação animal brasileira apresente algum tipo de contaminação por micotoxinas, especialmente por fumonisina (FB), zearalenona (ZEA), e desoxinivalenol (DON) e aflatoxina (AF) (CUSTODIO et al., 2017; DALT; PRIMIERI, 2020).

Fink-Gremmels (2008a) e Custodio et al. (2017) verificaram que intoxicação com doses altas destas micotoxinas causam desde de insuficiência hepáticas a lesões cancerígenas. Além disso a alteram o material genético das células de alta proliferação como as do sistema imune, aumentando a susceptibilidade a doenças (CORRIER, 1991). Embora não existam muitos trabalhos sobre o efeito crônico das micotoxinas, sabe-se que há um efeito sinérgico entre elas, mesmo que em baixas doses. O mecanismo não está completamente elucidado, mas sabe-se que elas interferem na função hepática desregulando o metabolismo de carboidratos, lipídeos e proteínas, refletindo em menor expressão do potencial produtivo do animal e menor imunidade (CUSTODIO et al., 2017).

Para atenuar tal entrave, os adsorventes de micotoxinas são aliados importantes para a prevenção das intoxicações, embora não exista um ideal para todas as micotoxinas. Enquanto as bentonitas são eficazes para absorção de aflatoxinas, as leveduras são mais efetivas contra ZEA e a DON (SABATER-VILAR et al., 2007). Há ainda compostos antioxidantes como vitaminas, aminoácidos e enzimas que podem auxiliar tanto na degradação e metabolização

das micotoxinas, como na regeneração hepática (NASEER et al., 20016; GUO et al., 2019).

Tendo em vista que a maioria das pesquisas realizadas com adsorventes de micotoxinas em bovinos foram realizadas com intoxicação experimental de apenas uma micotoxina (NASEER et al., 20016; CUSTODIO et al., 2017, GUO et al., 2019) faz-se necessário verificar se adsorventes compostos atenuaram os efeitos deletérios de dietas naturalmente contaminada por micotoxinas, permitindo o animal expressar seu máximo potencial produtivo.

Atualmente existe uma formulação no mercado contendo extrato de cardo mariano (silimarina), parede celular de levedura, bentonita, carvão vegetal, vitamina E e cloreto de colina, que além de funcionarem como adsorvente de micotoxinas ainda prometem uma regeneração hepática e melhorias no aproveitamento de nutrientes, acreditando-se que possa causar efeitos semelhantes em bovinos de leite.

Levando em consideração os fatores supramencionados, o objetivo desse experimento foi verificar se esse aditivo adsorvente de micotoxinas melhora a saúde e a produção de vacas alimentadas com dieta contendo micotoxinas naturalmente produzida.

## MATERIAL E MÉTODOS

Os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Conduta Ética no Uso de Animais em Experimentação (023/2019 CEUA/UNICENTRO; 25/06/2019).

O experimento foi realizado em uma propriedade criatória comercial, contendo 60 animais em lactação em sistema de *Compost Barns*, localizada no município de Guarapuava – PR. Como manejo adotado, os animais eram alimentados duas vezes ao dia com dieta contendo F (Fb<sub>1</sub>- 683,7 ppb; Fb<sub>2</sub>- 306,6 ppp); Zea-503,0 ppb e Don-724,61 ppb naturalmente produzida.

A alimentação era realizada no galpão com o auxílio de um misturador unificado, com 30,8 kg/animal/dia aproximadamente de ração total, com base na matéria seca, composta por 13,46% de silagem de milho; 40,86% de concentrado comercial (Leite Max Avant 20T GP, Cooperativa AGRÁRIA, Entre Rios, PR, Brasil); 8,65% de farelo de soja; 23,24% de pré-secado de aveia e 0,98% de núcleo mineral (Bovigold<sup>®</sup>, DSM). Para detecção das micotoxinas, amostras de 500 gramas da dieta foram coletadas em dois momentos distintos, no início e no meio do experimento, e encaminhadas ao laboratório Lamic SAMITEC (Santa Maria, RS, Brasil). Nos alimentos mensurou-se AF, Fb, Don e Zea por cromatografia líquida-espectrometria de massas sequencial (LC-MS/MS). Os resultados do alimento foram expressos em média dos momentos experimentais (dado suplementar).

Do total de animais, selecionou-se 18 vacas da raça Holandesa, sadias com idade entre três a sete anos, entre o 3º ao 5º mês de lactação e com produção média de 30 litros de leite por dia, obtidos em duas ordenhas mecânicas, com peso médio de 600 kg e ECC entre 3,5 e 4,0. A Sanidade dos animais foi verificada por exame físico e hemograma antes da inclusão no experimento.

O delineamento experimental foi não observacional longitudinal, inteiramente casualizado, realizado por modelo de estudo cego em relação ao tratamento, no qual o grupo controle (GC) (n=9) recebeu dieta sem adsorvente e grupo tratamento (GT) (n=9) recebeu complexo adsorvente comercial a base de Bentonita (Mín 650 g/kg), Beta Glucanas (Mín 54 g/kg), Colina (Mín 2600 mg/kg), Mananoligossacarídeo (Mín 59,4 g/kg), Matéria mineral (Máx 720 g/kg), Vitamina E (Mín 27,5 UI/kg) (Safetox *plus* R®, Safeeds S.A., Cascavel, Brasil, registro no MAPA nº 21034.016243/2019-61, SEI nº 9706806), na dose total de 22 gramas por animal por dia, conforme recomendação do fabricante, durante 56 dias.

A suplementação ocorreu logo após os animais saírem da ordenha, e serem presos em canzil. O complexo adsorvente era adicionado em cima de 1 kg da ração total uma vez ao dia no período da manhã, e após a observação da ingestão do alimento, o restante da dieta era fornecido e os canzils eram abertos.

Em intervalos semanais, durante dois meses nos dias: D0, D8, D16, D24, D32, D40, D48 e D56 os animais foram submetidos ao exame físico constituído por inspeção, ausculta cardíaca, pulmonar e aferição de temperatura retal. Nas mesmas datas, amostras de sangue e leite foram colhidas.

Para as amostras de sangue, realizou-se venopunção epigástrica superficial com agulhas (25 x 0,8 mm) acopladas a tubos plásticos a vácuo contendo heparina (capacidade de 4mL) para avaliação do metabolismo oxidativo de leucócitos; em tubos contendo EDTA, para realização do hemograma (capacidade de 4mL) e tubos secos para dosagens bioquímicas hepáticas (capacidade de 8 mL).

Para a função dos leucócitos, o sangue heparinizado foi mantido resfriado com gelo e processado em até 3 horas após a colheita pela técnica colorimétrica do NBT, conforme Flores et al. (2019). Resumidamente, 100µL do sangue total foi incubado com partes iguais com solução de NBT (Sigma®, SP, Brasil) a 1% estimulada com 5µL de 12-miristato-13-acetato de forbo (PMA a 300 ng/mL, Sigma®, SP, Brasil) a 37°C em banho maria. Após 30 minutos, a reação de fagocitose e oxidação do NBT internalizado foi interrompida pela da adição de 2000µL de EDTA (3mM) gelado, as hemácias foram rompidas por duas lise osmótica. O NBT extracelular foi então removido por lavagem com PBS (Tampão fosfato-

salino). As amostras foram centrifugadas (1200 rpm X 8 min a 4°C), sendo o sobrenadante descartado e o *pellet* de leucócitos foi fixado com metanol (Synth®, SP, Brasil). Os leucócitos foram então dissolvidos com KOH (Synth®, SP, Brasil, (3M, 120µL) e DMSO (Dimesol® - MarcoLab, RJ, Brasil, 99%, 140µL), sendo a suspensão lida em espectrofotometria 630 nm (Thermo Plate®, MG, Brasil) em duplicata, com confiança de intravariabilidade menor que 0,05%.

O hemograma foi analisado em contador automático de hematologia (SDH-3 VET, Labtest®, MG, Brasil) e a contagem diferencial de leucócitos foi realizada em esfregaços sanguíneos, baseando-se nas características morfológicas e métricas em microscopia óptica.

Para as análises hepáticas, o soro foi extraído do sangue total após centrifugação (3000 rpm X 15 min em temperatura ambiente), no qual mensurou-se proteína sérica total, albumina e atividade das enzimas: AST, GGT e LDH por meio de exames bioquímicos utilizando a metodologia de reação cinética e colorimétrica continuada decrescente, em aparelho semi-automático Bioplus®, utilizando kits comerciais (proteínas totais, albumina, AST/GOT Liquiform, GAMA-GT Liquiform e LDH Liquiform, Labtest® Diagnóstica S.A., Lagoa Santa, MG, Brasil).

A colheita de leite foi realizada diretamente na linha de ordenha (sistema fechado), em tubos contendo bronopol, conservante para amostra de leite (Broad Spectrum Microtabs® II, Advanced Instruments®, Norwood, Massachusetts, EUA). Para cada animal coletou-se uma amostra individual de leite dos quatro quartos em cada momento. As amostras de leite foram submetidas a análises química como contagem de células somáticas (CCS), lactose, gordura, proteína, em laboratório terceirizado pelos métodos de FTIR e Citometria de Fluxo (APCBRH/PARLEITE, Curitiba, Brasil). O volume de leite produzido foi aferido por um medidor de fluxo dosador de leite automático digital individual, após a ordenha de cada animal.

Os dados coletados para cada variável foram submetidos à análise de variância com comparação das médias a 5% de significância, por meio do *software* estatístico *Instat Graphpad*. Para a avaliação do efeito tempo, as médias dos resultados obtidos foram analisadas pelo teste de análise de variância ANOVA *One-way* paramétrico para amostras repetidas e após teste de Tukey. Para comparação entre tratamento, as médias dos resultados foram analisadas pelo teste t paramétrico para amostras não pareadas. Foram considerados como significativos, os dados que apresentaram valores menores ou igual à 5% ( $p \leq 0,05$ ).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nossos resultados mostram que os bovinos foram alimentados com dieta contendo as micotoxinas Fb, Zea e Don naturalmente produzida, e que o uso da associação de bentonita e antioxidantes hepáticos foi capaz de trazer benefícios a sanidade animal e a produção leiteira, conforme a discussão a seguir.

A respeito da dieta podemos considerá-la desafiadora. Apesar da AF ser a única micotoxina cujo nível máximo em alimentos está previsto na legislação brasileira, com o limite máximo de 50 µg/kg para qualquer produto, seja de alimentação direta ou como ingrediente para rações (BRASIL, 2011). No entanto o Lamic - Laboratório de Análises Micotoxicológicas (2020) recomenda que os limites máximos toleráveis de micotoxinas em alimentos para fêmeas em lactação da espécie bovina seja de: AF 0 ppb, Don 2000 ppb, Zea 250 ppb. Já o Centro de Pesquisas em Forragicultura da UFPR (SOUZA et al., 2011), preconiza como limites máximos, para forragem/silagem índices inferiores Fb: 1.000 ppb, Don: 930 ppb e Zea: 285 ppb. Desta feita, podemos verificar que a dieta utilizada em nosso experimento foi desafiadora de acordo com os órgãos regionais brasileiros, tendo uma quantidade maior de Zea e próximo aos limites superiores para Fb e Don, e somando os valores, temos uma contaminação na dieta de 2.218 ppb de micotoxinas. Cabe ressaltar que as micotoxinas agem de forma sinérgica podendo potencializar o efeito tóxico desta dieta (CUSTODIO et al., 2017).

A contaminação da dieta por estas micotoxinas podem ocasionar diversos problemas nos animais, especialmente hepáticos, tendo em vista que embora a microbiota ruminal possa degradar algumas das micotoxinas como a Don, AFB<sub>1</sub> e Zea, Winkler et al. (2014) detectaram a presença destas micotoxinas no plasma de vacas leiteiras. Ainda, a Fb passa pela microbiota ruminal inalterada (FINK-GREMMELS, 2008b).

Diante desta dieta, o presente estudo demonstrou benefícios do tratamento na saúde hepática dos bovinos a partir do D24 (Tabela 1). Embora a atividade de AST estivesse dentro do parâmetro de normalidade, a atividade de GGT e LDH estavam acima dos valores de referência em ambos os grupos (KANEKO et al., 2008). Enquanto a AST não sofreu influência do tratamento ou tempo, a GGT e a LDH diminuíram estatisticamente para o GT tanto na interação tempo, como tratamento em D24 e D32 ( $p \leq 0,05$ ).

A AST é uma enzima que determina a integridade do hepatócito, porém só se encontra elevada na fase aguda da lesão hepática, logo retornando aos limites de referência (KANEKO et al., 2008), o que pode explicar sua atividade enzimática dentro da normalidade em ambos os grupos em todos os momentos, tendo em vista que a intoxicação observada no nosso

experimento provavelmente é crônica, devido aos teos de micotoxinas contidos na dieta serem mais baixos que os utilizados em prévios experimentos de intoxicação experimental (NASEER et al., 20016; GUO et al., 2019), porem não inócua, já que outras enzimas hepáticas, proteína e albumina séricas estavam alteradas.

De acordo com Stockham; Scott (2008) o aumento da atividade da enzima GGT ocorre em afecções hepatobiliares com colestase, associadas ou não à hiperplasia biliar. Já a LDH é uma enzima que catalisa a oxidação reversível do lactato a piruvato, em presença da coenzima NAD<sup>+</sup> que atua como doador ou receptor de hidrogênio (STOCKHAM: SCOTT, 2008). Esta enzima está presente em diversos tecidos corporais como músculo cardíaco, esquelético e fígado, sendo altamente inespecífica, porém em conjunto com demais enzimas hepáticas, pode sinalizar lesão hepática (KANEKO et al., 2008).

Assim o aumento da atividade das enzimas GGT e LDH reflete alterações hepáticas principalmente referente a colestase em função das micotoxinas, com possibilidade de alterações no metabolismo hepático, resultando em menor anabolismo proteico, o que interfere na produção animal e na imunidade, fato já relatado por Jovaisiene et al. (2016); Naseer et al. (2016); Custodio et al. (2017).

Como estas enzimas diminuíram no GT mesmo que momentaneamente, acredita-se que o aditivo adsorvente de micotoxinas e antioxidantes hepáticos foi capaz de regenerar a saúde hepática. Tais achados já foram relatados por Jovaisiene et al. (2016); Naseer et al. (2016); Guo et al. (2019) ao utilizarem diferentes compostos adsorventes em animais intoxicados experimentalmente com micotoxinas.

**Tabela 1.** Enzimas hepáticas séricas (AST, LDH e GGT) de vacas não tratadas (GC) ou tratadas com adsorvente bentonita e antioxidantes hepáticos para micotoxinas (GT).

Variáveis		Momentos									
		D0	D8	D16	D24	D32	D40	D48	D56	P <sup>x</sup>	
AST U/L	GC	Média	96,67	100,11	89,22	79,67	100,78	94,56	106,11	100,33	0,38
		EPM	9,37	15,12	8,27	10,04	15,86	9,55	20,15	14,17	
	GT	Média	86,78	74,44	73,89	82,78	73,44	76,33	76,89	77,00	0,81
		EPM	11,92	5,80	5,64	9,43	6,19	7,56	5,39	4,39	
	P <sup>y</sup>		0,83	0,24	0,06	0,97	0,24	0,27	0,30	0,11	
GGT U/L	GC	Média	47,11	41,89	38,56	45,22A	33,44A	42,00	40,33	45,56	0,56
		EPM	5,41	5,46	1,94	5,99	3,85	6,49	4,40	6,40	
	GT	Média	41,78a	27,56a	35,00ab	29,22aB	16,44aB	34,22ab	30,89ab	33,44ab	0,01
		EPM	3,41	4,78	2,83	4,13	2,45	6,10	5,35	6,73	
	P <sup>y</sup>		0,21	0,09	0,45	0,04	0,01	0,19	0,19	0,21	

LDH	GC	Média	3206,00	2536,67	2609,44	2579,89A	2668,77 <sup>a</sup>	3349,22	2839,11	2855,22	0,15
		EPM	230,94	285,34	264,18	206,03	262,51	290,98	303,32	216,77	
U/L	GT	Média	2963,11a	2272,22ab	2183,22ab	1610,78bB	1791,78bB	2630,00ab	1902,56ab	2273,11ab	0,01
		EPM	332,57	247,95	167,35	302,27	273,18	285,58	318,97	189,92	
	P <sup>y</sup>		0,83	0,77	0,46	0,02	0,03	0,09	0,05	0,05	

EPM = Erro padrão da média. letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença estatística efeito tempo (P<sup>x</sup>), Letras manisculas diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística no efeito tratamento (P<sup>y</sup>); nível de significância  $p \leq 0,05$ . Valores de Referência= AST- aspartato amino transferase 78-132 U/L, GGT - gama glutamil transferase 6,1-17,4 U/L, LDH- lactato desidrogenase 692-1445 U/L (KANEKO et al., 2008).

A Tabela 2 representa-se os teores de albumina, proteína total séricas e globulina sérica. Embora os valores de referência para estas variáveis em bovinos apresentem variações na literatura (LOPES et al., 2007; KANEKO et al., 2008), nota-se que no D0, os valores de proteína e de albumina da maioria dos animais estavam abaixo do valor de referência para a espécie em ambos os grupos, mas ao longo dos momentos estas duas variáveis atingiram os parâmetros de referência ou posicionaram-se ligeiramente acima para o grupo tratamento (GT) (KANEKO et al., 2008).

Ainda, houve um aumento pontual dos teores de proteína sérica nos dois grupos no D8 em relação ao D0 e D24 ( $p=0,05$ ). Nos demais momentos, os teores de proteína se mantiveram estáveis nos dois grupos, sem efeito do tempo. Em relação ao efeito tratamento, notou-se que a partir do D24 houve aumento da concentração de proteína sérica no grupo tratamento em comparação ao grupo controle ( $p \leq 0,05$ ). Similarmente, os teores de albumina sérica aumentaram a partir do D24 para o GT no efeito tempo ( $p \leq 0,05$ ), e a partir do D40, no efeito tratamento ( $p \leq 0,05$ ) o que pode indicar uma maior efetividade de síntese proteica do GT em relação ao GC (GONZÁLEZ; SILVA, 2006). Em relação as globulinas séricas podemos observar aumento significativo nos animais tratados em D8, D16, D48 e D56 em relação aos momentos iniciais (efeito tempo  $p = 0,0017$ ), e em D8, D16 e D48 em relação ao GC ( $p \leq 0,05$ ), o que pode indicar uma maior efetividade imune (KANEKO et al., 2008).

O estado nutricional do animal, bem como falha na ingestão, absorção, ou perda proteica por alterações gastrointestinais; urinárias; dérmicas ou perdas sanguíneas também poderiam ser a causa da diminuição dos valores séricos de proteína e albumina como relatadas por Lopes et al. (2007), no entanto, ao longo do experimento não houve mudanças na dieta e nenhum dos animais apresentou condições de doenças visíveis como hemorragias. Poucos foram os animais com quadros de fezes amolecidas e não houve tratamentos com vermífugos, por isso acredita-se que o motivo dos valores de proteína e albumina séricas diminuídas esteja relacionando a um menor anabolismo proteico devido a alterações ou sobrecarga hepáticas

causada pela metabolização das micotoxinas circulantes nos momentos iniciais de ambos os grupos, e ao longo de todo experimento para os animais pertencentes ao GC (KANEKO et al., 2008). Infelizmente a dosagem sérica de micotoxinas é uma técnica onerosa e necessita de equipamentos específicos, sendo realizada em pouquíssimos estudos (WINKLER et al., 2014), e como não foi realizada neste experimento, não podemos comprovar esta hipótese.

Outra possível explicação refere-se aos agentes oxidantes hepáticos contidos no composto adsorvente como vitaminas, aminoácidos e enzimas que podem auxiliar na degradação e ou metabolização das micotoxinas, e atuam como antioxidantes hepáticos, resultando em um maior anabolismo proteico, o que sugere uma melhora da função hepática (NASEER et al., 2016; GUO et al., 2019).

**Tabela 2.** Proteína total, albumina e globulinas séricas de vacas não tratadas (GC) e tratadas com adsorvente bentonita e antioxidantes hepáticos para micotoxinas (GT).

Variáveis			Momentos								P <sup>x</sup>
			D0	D8	D16	D24	D32	D40	D48	D56	
Proteína sérica g/dL	GC	Média	6,48a	7,31b	7,22ab	6,04aA	6,80abA	6,69abA	7,02abA	7,06abA	0,01
		EPM	0,38	0,39	0,32	0,22	0,23	0,32	0,35	0,34	
	GT	Média	6,89a	8,32b	7,94ab	7,19abB	7,73abB	7,64abB	8,08abB	8,14abB	0,01
		EPM	0,26	0,30	0,28	0,32	0,31	0,22	0,15	0,15	
		P <sup>Y</sup>		0,28	0,15	0,20	0,01	0,03	0,01	0,01	0,02
	Albumina sérica g/dL	GC	Média	2,73	2,78	2,84	2,77	3,11	2,75A	3,15A	2,84A
EPM			0,06	0,09	0,10	0,16	0,14	0,20	0,14	0,21	
GT		Média	2,66a	2,50a	2,54 <sup>a</sup>	3,01b	3,23b	3,21bB	3,37bB	3,27bB	0,0001
		EPM	0,09	0,08	0,13	0,17	0,13	0,09	0,12	0,11	
		P <sup>Y</sup>		0,20	0,04	0,12	0,21	0,24	0,02	0,05	0,01
Globulinas sérica g/dL		GC	Média	3,74	4,53A	4,38A	3,28	3,71	3,94	3,87A	4,23
	EPM		0,37	0,40	0,35	0,22	0,20	0,43	0,35	0,52	
	GT	Média	4,20a	5,82bB	5,40bB	3,18ab	4,51ab	4,39ab	4,71bB	4,87b	0,0017
		EPM	0,32	0,29	0,32	0,39	0,37	0,25	0,21	0,22	
		P <sup>Y</sup>		0,37	0,02	0,05	0,06	0,08	0,37	0,05	0,27

EPM = Erro padrão da média. letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença estatística efeito tempo (P<sup>x</sup>), Letras manisculas diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística no efeito tratamento (P<sup>y</sup>), nível de significância  $p \leq 0,05$ . Valores de Referência = Proteína sérica- 6,74 -7,76 g/dL, Albumina sérica- 3,03 - 3,55 g/dL. Globulina sérica- 3,0 - 3,5g/dL (KANEKO et al., 2008).

Em relação a imunidade, observou-se aumento significativo do metabolismo oxidativo leucocitário nos animais tratados a partir do D24 em relação aos momentos iniciais (efeito tempo,  $p=0,0001$ ), enquanto que o GC não apresentou alteração neste parâmetro. Em relação o efeito tratamento, notou-se aumento do metabolismo oxidativo leucocitário a partir do D24 até o D48 ( $p \leq 0,05$ ) para o GT em relação ao GC (Tabela 3).

**Tabela 3.** Metabolismo oxidativo de leucócitos sanguíneos de vacas não tratadas (GC) e tratadas com adsorvente bentonita e antioxidantes hepáticos para micotoxinas (GT).

D.O. 630		D0	D8	D16	D24	D32	D40	D48	D56	P <sup>x</sup>
GC	Média	0,421	0,411	0,451	0,419A	0,379A	0,490A	0,395A	0,504	0,06
	EPM	0,021	0,018	0,036	0,036	0,03	0,026	0,039	0,028	
GT	Média	0,380a	0,436a	0,413ab	0,580bB	0,574bB	0,597bB	0,528bB	0,601b	0,0001
	EPM	0,013	0,034	0,029	0,067	0,033	0,031	0,048	0,041	
P <sup>y</sup>		0,11	0,56	0,44	0,05	0,0009	0,03	0,05	0,09	

D.O.- densidade ótica, EPM erro padrão da média, P<sup>x</sup> efeito tempo, P<sup>y</sup> efeito tratamento. GC- controle, GT- tratamento. letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença estatística efeito tempo (P<sup>x</sup>), Letras manisculas diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística no efeito tratamento (P<sup>y</sup>), ( $p \leq 0,05$ ), teste de Tukey.

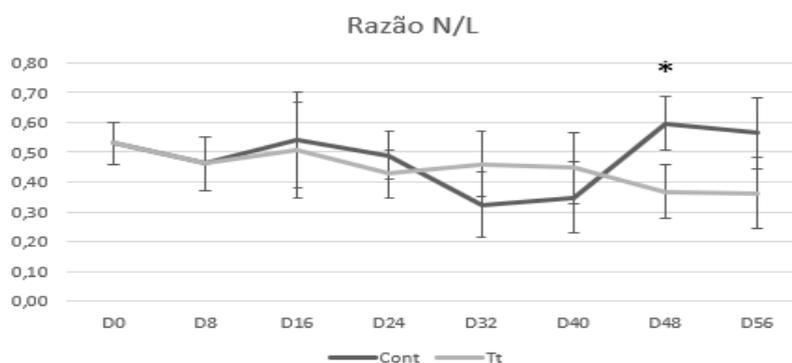
Metabolismo oxidativo é “explosão respiratória” leucocitária, realizada por fagócitos sanguíneos, como neutrófilos e monócitos, que ocorre principalmente durante a fagocitose, onde são formados compostos altamente oxidantes denominados espécies reativas de oxigênio (ERO) tendo como principal função, a eliminação de patógenos internalizados (TIZARD, 2017). O ensaio colorimétrico de NBT mimetiza uma infecção, onde fagócitos sanguíneos estimulados com PMA, fagocitam o reagente NBT de cor amarela e o oxidam formando um composto azulado chamado de Formazan. Ao fim da reação, os leucócitos são dissolvidos e o composto é liberado na solução tingindo-a de azul, proporcional a magnitude do metabolismo oxidativo (FLORES et al, 2019).

Desta maneira, o metabolismo oxidativo leucocitário aumentado no GT indica que o tratamento aumentou a capacidade dos animais a combater agentes patogênicos, ficando, portanto, menos susceptível a doenças infecciosas (SCHALM et al., 2010). Reforçando este achado, verificou-se que mais animais do GC apresentaram alterações em exame físico do que os animais do GT. No D24 vários animais começaram a apresentar secreção mucosa nas narinas, a partir de então três vacas do GT permaneceram com a secreção mucosa por uma semana e duas vacas do GC apresentaram secreção mucopurulenta até o término do experimento, embora nenhum animal tenha apresentado febre, alteração na ausculta pulmonar ou redução da produção de leite.

Em relação ao hemograma, os animais não apresentaram alteração destas variáveis ao longo do experimento. Notou-se apenas influência do tempo e tratamento na razão neutrófilo/linfócito, onde o GC apresentou maior proporção de neutrófilos/linfócitos que o GT, tanto no efeito tempo como efeito tratamento ( $p=0,05$ ) em D48 e D56.

Associando com os dados do leucograma e os sinais clínicos de secreção nasal mucosa acredita-se as secreções nasais encontradas nos animais no D24 refere-se a uma infecção viral no trato respiratório durante o experimento, causada por agentes endêmicos no Brasil como vírus sincicial respiratório bovino (BRSV); vírus da parainfluenza bovina tipo 3 (PIV-3); herpesvírus bovino tipo 1 (BHV-1); responsável pela rinotraqueíte bovina infecciosa (IBR) e vírus da diarreia viral bovina (BVDV). Estes agentes são capazes de causar uma infecção do trato respiratório anterior leve, cuja principal sintomatologia é secreção nasal mucosa e mucosas congestionadas. Com o agravamento da doença, pode haver contaminação bacteriana secundária evoluindo para pneumonia com secreção nasal mucopurulenta e febre (GRIFFIN et al., 2010; REZENDE, 2015).

Desta maneira, acredita-se que no GT, a maior eficiência dos fagócitos e maior capacidade de produção de globulinas evitou que a doença viral se agravasse. No entanto, o GC apresentou aumento neutrofílico e secreção nasal mucopurulenta, indicando que nestes animais houve contaminação bacteriana secundária. Como não houve alterações no leucograma, nos animais de ambos os grupos além da razão N/L e não havia outro sinal clínico além da secreção nasal que fossem características de pneumonia como febre, apatia, hiporexia, alteração de ausculta pulmonar ou diminuição repentina de produção de leite, acredita-se que os bovinos passaram por uma infecção leve de trato respiratório anterior (GRIFFIN et al., 2010).



\* indica diferença estatística N:L/  $p \leq 0,05$ .

**Figura 1.** Razão N/L sanguíneo de vacas lactantes não tratadas (GC) e tratadas com adsorvente bentonita e antioxidantes hepáticos para micotoxinas (GT).

Em relação a análise do leite, notou-se que nenhum animal apresentou mastite clínica ao longo do experimento, conforme a análise diária do teste da caneca de fundo escuro. No dia 0, havia um animal com mastite subclínica em cada grupo, considerando CCS acima de

300.000 cel/mL de leite (FONSECA; SANTOS, 2000). Com o passar do tempo, em D32 não havia mais animais com mastite subclínica nos grupos analisados.

Na Tabela 4 está representada a análise física e química do leite dos animais. Pode-se notar que apenas os animais do GT aumentaram a produção de leite a partir de D24 em relação aos momentos iniciais ( $p=0,0002$ ). Em relação ao efeito tratamento, esta produção foi mais expressiva para o GT que o GC nos dias D24, D32, D40 e D48 ( $p= 0,02, 0,01, 0,01$  e  $0,03$  respectivamente).

Como o aumento da produção de leite se perpetuou ao longo do tempo, acredita-se que ocorreu devido a utilização do aditivo adsorvente com antioxidantes hepáticos, responsável por minimizar a colestase hepática o que pode aumentar o anabolismo de carboidratos, lipídeos e proteínas que são os principais precursores do leite (CUSTODIO et al., 2017; FONSECA; SANTOS, 2000).

No nosso experimento, não foi mensurado o consumo alimentar, e apesar dos animais receberem a mesma quantidade de dieta ao longo do experimento, o manejo foi realizado com o canzil aberto após o consumo do aditivo, o que permitia que o animal regulasse o próprio consumo. Fink-Gremmels (2008a) relata que a contaminação principalmente crônica por micotoxinas, implica em distúrbios ocultos como a redução da ingestão voluntária do alimento pelos animais.

Sabe-se que tanto a colina como a silimarina, presentes no adsorvente são capazes de diminuir as enzimas hepáticas de bezerros intoxicados com AF (NASEER et al., 2016), indicando que estes compostos melhoram a saúde hepática o que reflete em aumento da produção de leite. Aliado a isso, cita-se que leveduras também são capazes de promoverem incremento na produção de leite, pois melhoram digestibilidade da dieta, aumentam o fluxo de proteína microbiana para o intestino delgado (BITENCOURT et al., 2011) e aumentam o consumo de matéria seca (OLIVEIRA et al., 2010).

Em relação a CCS, os dados não passaram no teste de normalidade e por isso foram transformados em Log de 10. Observou-se que o tratamento não influenciou nesta variável, e apenas o GC apresentou aumento pontual da CCS no D24 em relação ao D0 e D40. As demais variáveis não sofreram influência do tempo nem do tratamento.

O composto adsorvente não interferiu na CCS provavelmente porque este parâmetro já era baixo para a maioria dos animais em ambos os grupos (abaixo de 300.000 cel/mL de leite), indicando que o manejo realizado na propriedade evitou a inoculação de agentes infecciosos na glândula mamária. Desta maneira não havia necessidade de aumentar células de defesa na região uma vez que não havia insulto (SORDILLO, 2016).

Em contrapartida os sólidos do leite se mantiveram praticamente estáveis mesmo com aumento do volume de leite produzido. As proteínas do leite são sintetizadas nas células alveolares a partir de aminoácidos do sangue, exceto a albumina e imunoglobulinas que são sintetizadas fora da glândula mamária e transportadas até as células secretoras pela corrente sanguínea. Assim o aumento sérico da albumina não seria capaz de refletir no aumento da proteína do leite, por representar uma fração muito pequena da composição láctea, cerca de 9,2% (300mg/L). O fato da glândula mamária da maioria dos animais estar saudável também contribui para que os teores de proteínas se mantenham estáveis ao longo do experimento, tendo em vista que a caseína e imunoglobulinas que correspondem a 78% da proteína total do leite, só aumentam em casos de infecção (FONSECA; SANTOS, 2000).

**Tabela 4.** Análise física e química do leite de vacas não tratadas (GC) e tratadas com adsorvente bentonita e antioxidantes hepáticos para micotoxinas (GT).

Dados do Leite			D0	D8	D16	D24	D32	D40	D48	D56	P <sup>x</sup>
Produção (Kg/dia)	GC	Média	29,88	29,56	32,42	30,76A	29,12A	31,70A	31,76A	32,44	0,07
		EPM	2,06	1,96	2,16	2,54	2,22	2,66	2,44	2,88	
	GT	Média	33,84 <sup>a</sup>	33,90 <sup>a</sup>	37,06 <sup>ab</sup>	38,56 <sup>bB</sup>	36,42 <sup>abB</sup>	40,34 <sup>bB</sup>	38,72 <sup>bB</sup>	38,10 <sup>b</sup>	0,0002
		EPM	1,96	1,36	1,58	1,60	1,54	1,90	1,64	1,90	
	P <sup>Y</sup>		0,18	0,09	0,1	0,02	0,01	0,01	0,03	0,10	
CCS Log (x10 <sup>3</sup> /mL)	GC	Média	3,73 <sup>a</sup>	4,04 <sup>ab</sup>	3,91 <sup>ab</sup>	4,08 <sup>b</sup>	4,07 <sup>ab</sup>	3,92 <sup>a</sup>	3,82 <sup>ab</sup>	4,29 <sup>ab</sup>	0,03
		EPM	0,19	0,22	0,13	0,07	0,16	0,13	0,11	0,11	
	GT	Média	3,93	4,04	3,94	4,13	4,06	3,88	3,84	4,16	0,67
		EPM	0,29	0,3	0,18	0,31	0,28	0,28	0,16	0,4	
	P <sup>Y</sup>		0,88	0,59	0,43	0,96	0,36	0,63	0,94	0,16	
Gordura (%)	GC	Média	4,18	4,05	4,17	4,27	4,24	4,05	3,95	3,83	0,94
		EPM	0,15	0,31	0,34	0,22	0,23	0,35	0,2400	0,37	
	GT	Média	3,89	3,93	3,27	3,8	3,97	3,95	3,28	3,86	0,49
		EPM	0,20	0,23	0,28	0,26	0,23	0,32	0,27	0,4	
	P <sup>Y</sup>		0,95	0,15	0,36	0,24	0,53	0,16	0,49	0,66	
Proteína (%)	GC	Média	3,40	3,49	3,48	3,30	3,50	3,32	3,52	3,66	0,95
		EPM	0,199	0,23	0,18	0,20	0,17	0,26	0,22	0,23	
	GT	Média	3,21	3,25	3,27	3,20	3,18	3,34	3,22	3,37	0,92
		EPM	0,12	0,12	0,14	0,14	0,09	0,09	0,06	0,11	
	P <sup>Y</sup>		0,28	0,55	0,35	0,77	0,09	0,36	0,34	0,39	
Lactose (%)	GC	Média	4,62	4,71	4,71	4,61	4,70	4,72	4,78	4,72	0,41
		EPM	0,08	0,03	0,05	0,02	0,05	0,05	0,05	0,05	
	GT	Média	4,40	4,56	4,59	4,50	4,57	4,58	4,60	4,47	0,84
		EPM	0,14	0,08	0,05	0,11	0,08	0,09	0,08	0,13	
	P <sup>Y</sup>		0,35	0,34	0,28	0,58	0,40	0,43	0,25	0,24	

CCS- contagem de células somáticas, EPM erro padrão da média, efeito tempo, efeito tratamento.

\* letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença estatística no efeito tempo ( $P^x$ ), e letras maiúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística no efeito tratamento ( $P^y$ ) ( $p \leq 0,05$ ) pelo teste de Tukey.

Desta maneira, juntando todos os dados foi possível verificar que o complexo adsorvente de micotoxinas e antioxidantes hepáticos trouxeram benefícios aos animais partir do 24º dia de uso. Neste período, o tratamento contribuiu para a saúde hepática, tendo em vista a diminuição da colestase e aumento de síntese de proteína e albumina séricas seja por maior eficiência hepática ou por maior ingestão de alimentos. Este maior aporte nutricional aumentou a eficiência dos fagócitos sanguíneos, o que promoveu a redução dos neutrófilos circulantes, que apesar de estarem em menor contagem, eram mais eficientes, garantindo que os animais debelassem mais rapidamente afecções respiratórias leves. Nestes mesmos períodos o GT tinha aumento de glubulinas, responsável pela fração de anticorpos, o que auxiliou na recuperação e prevenção de infecções contagiosas. Todos estes fatores contribuíram para um maior aporte nutricional para a glândula mamária resultando em aumento do volume de leite produzido, perpetuando-se os teores de proteína e gordura.

Desta maneira, o aumento da produção leiteira em 19,9% (6,16 litros de leite a mais por dia), compensa economicamente o uso do produto, cujo o custo do produto comercial é estimado em R\$ 0,22 centavos por animal por dia para o produtor.

## CONCLUSÃO

Conclui-se que o complexo de adsorvente e antioxidantes hepáticos melhorou a sanidade e a produção de vacas leiteiras alimentadas com dietas contendo Fb, Zea e Don naturalmente produzidas, pois melhoraram os marcadores de lesão e função hepática a partir de 24 dias de utilização. Direta ou indiretamente tal efeito melhorou a imunidade animal e reduziu índice de afecções respiratórias e ainda promoveu aumento de produção de leite, embora não tenha interferido na qualidade do leite.

## REFERÊNCIAS

- BITENCOURT, L. L.; et al. Diet digestibility and performance of dairy cows supplemented with live yeast. **Scientia Agricola.**, v. 68, n. 3, p. 301-307, 2011.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC n.07 de 18 de fevereiro de 2011. Diário Oficial da União, Brasília, (2011). Disponível em:

<[http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2011/res0007\\_18\\_02\\_2011\\_rep.html](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2011/res0007_18_02_2011_rep.html)>.

Acessado em: 12 ago. 2020.

CORRIER, D. E. Mycotoxicosis: mechanisms of immunosuppression. **Veterinary immunology and immunopathology.**, v.30, n.1, p.73-87, 1991.

CUSTODIO, L. et al. Survey of mycotoxin contamination in feedlot diets in Brazil., **Journal Animal Science.**, v. 95, n. 4, p. 19, 2017.

DADALT, A. L. L.; PRIMIERI, C. Níveis de micotoxinas na silagem de milho na região oeste do Paraná, **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária**, v. 3, n. 1, p. 30-38, 2021.

FINK-GREMMELS, J. The role of mycotoxins in the health and performance of dairy cows. **The Veterinary Journal.** v. 176, n. 1, p. 84-92, 200a

FINK-GREMMELS, J. Mycotoxins in cattle feeds and carry-over to dairy milk: A review. **Food Additives and Contaminants**, v. 25, n. 2, p. 172-180, 2008n.

FLORES, G. V. B. et al. Efeito do *Enterococcus faecium* e *Saccharomyces cerevisiae* na resposta imunológica, parâmetros hematológicos e ganho de peso de bezerros alimentados com silagem de milho. **Veterinaria e Zootecnia.** v. 26, p.1-11, 2019.

FONSECA, L.F.L.; SANTOS, M.V. **Qualidade do leite e controle de mastite.** 1 ed. São Paulo: Lemos editorial & gráficos Ltda, 2000, 175p.

GONZÁLEZ, F.H.D; DA SILVA, S.C. *Introdução à Bioquímica Clínica Veterinária.* 2 est. Porto Alegre: UFRGS, 2006, 360p.

GRIFFIN, D. et al. Bacterial pathogens of the bovine respiratory disease complex. **Veterinary Clinics: Food Animal Practice.** v. 26, n. 2, p. 381-394, 2010.

GUO, Y. et al. Efficacy of *Bacillus subtilis* ANSB060 biodegradation product for the reduction of the milk aflatoxin M1 content of dairy cows exposed to aflatoxin B1. **Toxins.**, v. 11, n. 3, p. 161, 2019.

JOVAISIENE, J et al. *Fusarium* and *Aspergillus* mycotoxins effects on dairy cow health, performance and the efficacy of Anti-Mycotoxin Additive. **Polish Journal of Veterinary Sciences**, v. 19, n. 1 p. 79–87, 2016.

KANEKO, J.J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, M.L. *Clinical biochemistry of domestic animals.* 6est ed. Academic press, 2008. p.358.

KELLER, L. A. M. et al. Fungal and mycotoxins contamination in corn silage: Monitoring risk before and after fermentation. **J. Stored Products Res.**, v. 52, p. 42-47, 2013.

LAMIC - LABORATÓRIO DE ANÁLISES MICOTOXICOLÓGICAS (Santa Maria Rs). Ufsm - Universidade Federal de Santa Maria. *Legislação.* 2020. Disponível em: <<https://www.lamic.ufsm.br/site/legislacoes/legislacao-brasil>>. Acessado em: 12 ago. 2020.

LOPES, S. T. A.; BIONDO, A.W.; SANTO, A. P. **Manual de Patologia Clínica Veterinária.** ed. UFSM, Santa Maria, 2007. p.107.

NASEER, O. et al. Comparative efficacy of silymarin and choline chloride (liver tonics) in preventing the effects of aflatoxin B1 in bovine calves. **Polish journal of veterinary sciences.**, v. 19, n. 3, p. 545-551, 2016.

OLIVEIRA, B. D. et al. Suplementação de vacas leiteiras com *Saccharomyces cerevisiae* cepa KA500. **Arquivo brasileiro de medicina veterinária e zootecnia.** v. 62, n. 5, p. 1174-1182, 2010.

REZENDE, A.L. et al. Prevalência do complexo respiratório bovino em animais confinados no estado de Minas Gerais. **Veterinária Notícia.** v.20, n.1, p.52, 2015.

SABATER-VILAR, M. et al. *In vitro* assessment of adsorbents aiming to prevent deoxynivalenol and zearalenone mycotoxins. **Mycopathologia**, v. 163, n. 2, p.69- 81, 2007.

SCHALM, O.W.; WEISS, D.J.; WARDROP, J.K. **Schalm's Veterinary Hematology.** 6 ed. Iowa: Blackwell, 2010. p.1206.

SORDILLO, L. M. Nutritional strategies to optimize dairy cattle immunity. **Journal of dairy science**, v. 99, n. 6, p. 4967-4982, 2016.

SOUZA, C.M. et al. Níveis de micotoxinas em cinco bacias leiteiras do Brasil. Centro de Pesquisas em Forragicultura (CPFOR/UFPR). 2011. Disponível em: <<http://www.ensilagem.com.br/wp-content/uploads/2013/04/Materia-micotoxinas-Silagem-Milho.pdf>>. Acessado em: 20 Nov. 2020.

TIZARD, I. R. **Veterinary Immunology-E-Book.** 10. Ed. Elsevier Health Sciences, 2017.

STOCKHAM, S. L.; SCOTT, M. A. **Fundamental of veterinary clinical pathology.** 2. Ed. Ames Iowa: Blackwell, Publishing, 2008. p.908.

WINKLER, J. et al. Residues of zearalenone (ZEN), deoxynivalenol (DON) and their metabolites in plasma of dairy cows fed *Fusarium* contaminated maize and their relationships to performance parameters. **Food and Chemical Toxicology**, v. 65, p. 196-204, 2014.

### Dados suplementares

**Tabela.** Composição química dos alimentos utilizados na ração total dos animais, com base na matéria seca.

PARÂMETRO	SILAGEM DE MILHO 13,46%	CONCENTRA DO 40,86%	FARELO DE SOJA 8,65%	PRÉ-SECADO DE AVEIA 23,14%	RAÇÃO TOTAL
MS %	42	89,98	89	53,7	68,5
MM % MS	3,49	9,16	6,84	6,5	7,05
PB % MS	7,98	22,23	49,72	9,2	16,7
EE% MS	3,57	4,73	4,51	5,0	4,7
FDN % MS	35,01	20,82	9,28	64,2	37,15
FDA % MS	21,03	8,39	7,76	38,9	19,86
NDT % MS	76,39	83,99	4,45	60,61	67,79

MS= matéria seca; MM= matéria mineral; PB= proteína bruta; EE= extrato etéreo; FDN= fibra em detergente neutro; FDA= fibra em detergente ácido; NDT= nutrientes digestíveis totais.