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

EFEITO DA BENTONITA NA SAÚDE E PRODUÇÃO LEITEIRA DE VACAS EM LACTAÇÃO SUBMETIDAS À DIETA NATURALMENTE CONTAMINADA POR MICOTOXINAS

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

MIRODION SANTOS OLIVEIRA

GUARAPUAVA-PR

MIRODION SANTOS OLIVEIRA

EFEITO DA BENTONITA NA SAÚDE E PRODUÇÃO LEITEIRA DE VACAS EM LACTAÇÃO SUBMETIDAS À DIETA NATURALMENTE CONTAMINADA POR MICOTOXINAS

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

Prof. Dr^a. Heloísa Godoi Bertagnon Orientadora

GUARAPUAVA-PR

Catalogação na Publicação Rede de Bibliotecas da Unicentro

Oliveira, Mirodion Santos

O48e

Efeito da bentonita na saúde e produção leiteira de vacas em lactação submetidas à dieta naturalmente contaminada por micotoxinas / Mirodion Santos Oliveira. — Guarapuava, 2021.

x, 41 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: Ana Paula Frederico R. Loureiro Bracarense, Kate Aparecida Buzi, Robson Kyoshi Ueno

Bibliografia

1. Adsorvente. 2. Aflatoxina. 3. Bovinos. 4. Imunidade. 5. Leite. I. Título. II. Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.

CDD 636

Mirodion Santos Oliveira

EFEITO DO USO DA BENTONITA NA SAÚDE E PRODUÇÃO LEITEIRA DE VACAS EM LACTAÇÃO SUBMETIDAS À DIETA NATURALMENTE CONTAMINADA POR MICOTOXINAS

> 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.

Aprovado em 25 de fevereiro de 2021.

Heloisa Bertagnon Prof^a. Dr^a. Heloísa Godoi Bertagnon

(UNICENTRO)

Kote Agoreide Bry Prof^a. Dr^a. Kate Aparecida Buzi

Kosson Kyoshi Ueno

(UNIGUA) Jue Jaule to Jaure

Profa. Dra. Ana Paula Frederico R. Loureiro Bracarense

(UEL)

GUARAPUAVA-PR 2021

PROTOCOLO DE APROVAÇÃO DO CEUA

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA/UNICENTRO

Ofício nº 010/2020 - CEUA/UNICENTRO

Guarapuava, 08/05/2020

Senhora Pesquisadora,

- 1. Comunicamos que seu projeto de pesquisa intitulado: "Influência de aluminiosilicato na imunidade inata e função hepática de bovinos de leite alimentados com dieta contendo micotoxinas naturalmente produzidas." protocolo número 005/2020, com início em 01/06/2020 e término em 31/07/2021, utilizando-se de "20 Bovinos", foi analisado e considerado **APROVADO**, pela Comissão de Ética no Uso de Animais de nossa Instituição, em Reunião Ordinária do dia 08/05/2020.
- 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 Bertagnon Atenciosamente.

Ivo Ilvan Kerppers Presidente da Ceua/Unicentro Port. n° 411- GR/Unicentro-2019

Eggens

A Senhora, Heloisa Bertagnon UNICENTRO-CEDETEG

A minha esposa Nádia, aos meus pais e minhas irmãs,

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

Primeiro gostaria de agradecer a Deus que meu o dom a vida e com ele me concedeu vontade e forças para caminhar e cada vez mais ir além, na busca de novas conquistas. Sem a vontade Dele nada seria possível.

Aos meus pais, José Noir de Oliveira e Rosa dos Santos Oliveira, que sempre me apoairam desde pequeno e me ampararam em todos os aspectos. Sempre estiveram comigo independente das adversidade e sempre vibraram com minhas vitórias.

A minha esposa Nádia Cristine Weinert, que no decorrer destes 12 anos sempre se mostrou uma pessoa inigualável. Me apoiando nos momentos mais difíceis, me conduzindo pelos caminhos mais brandos e me dando forças e vontade de lutar e jamais desisitir, essa conquista é nossa.

Às minhas irmãs, Claudia Santos Oliveira Hartmann e Daiana Rosa Santos Oliveira, que nunca mediram esforços para me apoiar, principalmente nas situções adversas e complexas que a vida em algumas ocasiões demonstra.

Aos demais familiares que sempre vibraram nas conquistas e se compaderam nos momentos difíceis.

Agradeço à professora Heloísa G. Bertagnon, minha orientadora, pelo tempo utilizado para me orientar, que, mesmo de longe, em virtude das reviravoltas da vida, sempre se mostrou muito solícita e gentil.

Às colegas Dalvane Domenico, Gabriela Garbossa, Gabriela Tomaz, Caroline Depaoli e Ana Abreu que no decorrer deste experimento foram fundamentais para o desenvolvimento das atividades práticas.

Aos demais professores, que desde começo do trilhar de minha vida acadêmica, foram de certa forma me moldando para que eu pudesse me transformar no profissional que sou hoje.

Ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), em especial ao Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal (DIPOA) e ao 8º Serviço de Inspeção de Produtos de Origem Animal (SIPOA) que, dentro da grande demanda que o órgão possui, encontraram alternativas para que eu pudesse estar ingressando na pós-graduação sem comprometer os serviços de fiscalização.

RESUMO

OLIVEIRA, M.S. Efeito da bentonita na saúde e produção leiteira de vacas em lactação submetidas à dieta naturalmente contaminada por micotoxinas. 2021. 52f. Universidade Estadual do Centro-Oeste — UNICENTRO. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias). Guarapuava.

Micotoxinas frequentemente contaminam alimentos de bovinos, podendo causar quadros de lesão hepática, imunodepressão e redução da produção, e em aves e suínos, os adsorventes como bentonita atenuam tais perdas, porém para bovinos há poucos estudos sobre seu uso especialmente quando a intoxicação ocorre por dietas naturalmente contaminadas. Assim, foram escolhidas 18 vacas leiteiras, multíparas no meio do estágio da lactação, consumindo dieta contendo na ração total fumonisina B1 (683,7 µg/Kg) e B2 (306,6 µg/Kg), zearalenona (503,9 µg/Kg). Os animais foram divididos em dois grupos: tratamento (GT, n=9) e controle (GC, n=9), e submetidos às avaliações hematológicas, metabolismo oxidativo de neutrófilos pela técnica do nitroazul de tetrazolium (NBT) e análise físico química do leite, a cada semana, durante dois meses, totalizando oito análises. Foi também realizada a pesquisa para aflatoxina M1 no leite em três momentos. Objetivou-se avaliar se a administração oral diária do adsorvente de micotoxinas, argila bentonita a base de aluminossilicato durante 56 dias atenuaria as alterações causadas pelas micotoxinas. Observou-se que o uso do adsorvente reduziu a excreção láctea de aflatoxina M1 (AFM₁), aumento de proteína (p = 0.03) e albumina séricas (p = 0.0001) e aumento do metabolismo oxidativo leucocitário a partir do dia 24 (p = 0,05), e elevou a produção leiteira a partir do 16º dia (p= 0,08). Não foi observado melhora nos índices físicoquímicos do leite. Conclui-se que o uso do adsorvente a base de aluminossilicato foi capaz de atenuar os efeitos das micotoxinas na função de leucócitos e de elevar a produção leiteira.

Palavras-chave: Adsorvente; aflatoxina; bovinos; imunidade; leite

ABSTRACT

OLIVEIRA, M. S. Effect of the use of bentonite on the health and milk production of lactating cows submitted to a diet naturally contaminated by mycotoxins 2020. 52p. State University of Midwest - UNICENTRO, Dissertation (Master of Veterinary Science). Guarapuava.

Mycotoxins often contaminate cattle feed, which can cause liver damage, immunosuppression and reduced production, and in birds and pigs, adsorbents such as bentonite mitigate such losses, however for cattle there are few studies on their use, especially when intoxication occurs due to naturally contaminated diets. So, 18 dairy cows were chosen, they were multiparous in the middle of the lactation stage, consuming a diet containing fumonisin B1 (683,7 µg/Kg) e B2 (306,6 µg/Kg) and zearalenona (503,9 $\mu g/Kg$) on total animal feed. The animals were divided into treatment (TG, n = 9) and control (CG, n = 9) groups, and subjected to hematological assessments, oxidative neutrophil metabolism by the tetrazolium nitroazul (NBT) technique and physical chemical analysis of milk, every week for two months, totaling eight analyzes. A search for aflatoxin M1 in milk was also carried out in three moments. This study aimed to assess whether the daily oral administration of mycotoxin adsorbent, bentonite clay based on aluminosilicate for 56 days would attenuate these changes It was observed that the use of the adsorbent promoted a reduction in the milk excretion of aflatoxin M1 (AFM1), an increase in serum protein (p = 0.03) and albumin (p = 0.0001), an increase in leukocyte oxidative metabolism from the day 24 (p = 0.05), and increased milk production from the 16th day of treatment (p = 0.08). There was no improvement in the physical-chemical indexes of the animals' milk. It is concluded that the use of aluminosilicate-based adsorbent was able to attenuate the effects of mycotoxins on the function of leukocytes and to increase milk production.

Keywords: adsorbent; aflatoxina; cattle; Immunity; milk

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

3-AcDON – 3-Acetildeoxinivalenol

15-AcDON – 15-Acetildeoxinivalenol

AF – Aflatoxinas

AFB1 – Aflatoxina B1

AFB2 – Aflatoxina B2

AFG1 – Aflatoxina G1

AFG2 – Aflatoxina G2

AFM1 – Aflatoxina M1

ALT – Alanina aminotranferase

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

APCBRH/PARLPR – Associação Paranaense de Criadores de Bovinos da Raça Holandesa

AST – Aspartato aminotransferase

CCS – Contagem de células sompaticas

DON – Desoxinivalenol

ESD – Extrato seco desengordurado

FB1 – Fumonisina B1

FB2- Fumonisina B2

FB3 – Fumonisina B3

FB4 – Fumonisina B4

FM – Fumonisinas

GC – Grupo controle

GGT – Gama glutamil transferase

GT - Grupo tratado

LDH – Lactato desidrogenase

LOD – Limite de detecção

LOQ – Limite de quantificação

NBT – Nitroazul de tetrazólio

NET – Artifícios extracelulares de neutrófilos

NIV – Nivalenol

OT – Ocratoxinas

OTA – Ocratoxina A

OTB – Ocratoxina B

PNCRC – Programa Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes

RDC – Resolução da Diretoria Colegiada

TRC – Tricotecenos

UFPR - Universidade Federal do Paraná

ZEA – Zearalenona

SUMÁRIO

P	ROTOCOLO DE APROVAÇÃO DO CEUA	iv
A	GRADECIMENTOS	vi
R	ESUMO	vii
A	BSTRACT	01
L	ISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS	02
1.	. INTRODUÇÃO	04
2	REFERENCIAL TEÓRICO	
	2.1 MICOTOXINAS	06
	2.1.1 AFLATOXINAS	
	2.1.2 FUMONISINAS	
	2.1.3 OCRATOXINAS	
	2.1.4 TRICOTECENOS	
	2.1.5 ZEARALENONA	
	2.2 EFEITO DAS MICOTOXINAS NOS BOVINOS	
	2.3 IMPORTÂNCIA ECONÔMICA E COMERCIAL DAS MICOTOXINAS	10
	2.3.1 RELAÇÃO DAS MICOTOXINAS NA ALIMENTAÇÃO DE BOVINOS	
	LEITEIROS	
	2.4 USO DE ADSORVENTES NA ALIMENTAÇÃO DE BOVINOS LEITEIROS	
	2.5 IMUNIDADE SISTÊMICA	15
	2.5.1 IMUNIDADE DA GLÂNDULA MAMÁRIA	
	2.5.2 SISTEMA IMUNE E AS MICOTOXINAS	
3	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	
4	REFERÊNCIAS	
	Capitulo 1- Artigo	
5	•	
6	Effect of bentonite on health and dairy production of cows in lactation submitted the diet naturally contaminated by mycotoxins	
	Highlights	
	Abstract	
	Resumo	
	Introdução	
	Material e Métodos	
	Resultados e discussão	33
	Conclusão.	38
	Referências	38
	Anexos	42

1 INTRODUÇÃO

A crescente necessidade de estratégias eficientes de produção leiteira torna o leite um produto de extrema importância em escala mundial, sendo um dos alimentos mais consumidos entre as populações (ZOCCAL, 2012). Ele fornece vários nutrientes que são essenciais para os seres humanos, e por isso é muito importante que o leite esteja livre de contaminações e compostos tóxicos (FLORES *et al.* 2015).

Uma das causas da contaminação são os microrganismos causadores de mastite, a inflamação da glândula mamária, onde há diversas alterações físico-químicas no leite, como mudança na coloração, coágulos e o aumento na contagem de leucócitos. Esse quadro pode ocorrer por má higiene da ordenha, quando há inoculação direta de grandes quantidades de agentes bacterianos na glândula mamária, como também quando há diminuição da imunidade da glândula mamária, tornando a região pouco responsiva à ação de microrganismos patogênicos, permitindo que multipliquem e colonizem o tecido (RADOSTITS *et al.* 2002).

Outro fator impactante na produção leiteira é a presença de micotoxinas na alimentação, fato este que gera grande preocupação relacionada à saúde animal e humana (DAWSON *et al.* 2006). Estes compostos são de grande toxicidade, produzidos por alguns fungos e leveduras em ambientes de baixa oferta de água e inadequados à proliferação bacteriana (NEWMAN, 2000).

Os fungos e leveduras produtores de micotoxinas, normalmente, são encontrados em alimentos usados tanto para animais quanto para humanos (BENNETT e KLICH, 2003). As mais preocupantes são aflatoxinas (AF), fumonisinas (FM), ocratoxinas (OT), tricotecenos (TRC) e zearalenona (ZEA) (SIRHAN *et al.* 2013). De uma maneira geral, o fígado é o principal órgão envolvido, e os sinais da intoxicação são relacionados ao aumento das enzimas hepáticas, seguido de alterações gastrointestinais, reprodutivas, diminuição da imunidade e queda de produção (CUSTODIO *et al.* 2017).

Em bovinos, a micotoxina mais estudada é a AF, a única micotoxina que produz metabólitos ativos excretados pelo leite com poder carcinogênico (BENNETT e KLICH, 2003; MURPHY *et al.* 2006; KUTZ *et al.* 2009). Em estudo conduzido por Motta *et al.* (2015), detectou-se prevalência de aflatoxina M1 (AFM1) em 31,44% das amostras, com valores que variaram de 1,68 a 194,51μg/kg, no leite de animais de fazendas leiteiras do estado de São Paulo, valores estes acima dos limites estabelecidos pela legislação brasileira, que é de 0,5 μg L-1 (BRASIL, 2011).

Desta maneira, o impacto das micotoxinas na saúde humana e animal, motiva o desenvolvimento de substâncias que sejam capazes de neutralizar essas toxinas que transitam pelo trato intestinal, os chamados adsorventes (DAWSON *et al.* 2006). Tais adsorventes pertencem principalmente a três grupos: materiais de silicato ou minerais argilosos (PHILLIPS *et al.* 1991; RAMOS *et al.* 1996), carvão ativado (GALVANO *et al.* 1998) e produtos orgânicos como parede celular de levedura, vitaminas, aminoácidos e fitoterápicos (KARAMAN *et al.* 2005). Enquanto os dois primeiros atuam como esponjas químicas, adsorvendo as micotoxinas no trato gastrointestinal e eliminando-as pelas fezes, o terceiro degradam-nas no ambiente ruminal e intestinal e ainda parecem auxiliar o fígado a transformá-las em metabólitos menos tóxicos (KOLOSOVA; STROKA, 2011, ECKHARDT *et al.* 2014).

Há poucos estudos sobre os efeitos de diferentes adsorventes de micotoxinas na saúde e produção de bovinos, especialmente em relação à imunidade. A maioria dos estudos foca os efeitos dos adsorventes inorgânicos isolados ou em associação com os orgânicos na função hepática e produção de leite, verificando também que estas substâncias promoveram melhoria das funções das enzimas hepáticas e aumento da produção de leite (MIGLIORATI *et al.* 2007; JOVAISIENE *et al.* 2016; XIONG *et al.* 2018).

Quanto aos padrões físico-químicos do leite, principalmente em relação ao teor de gordura e de CCS, os resultados envolvendo o uso de adsorventes divergem entre alguns autores. Para Jovaisiene *et al.* (2016) o uso de adsorvente à base de bentonita implicou numa menor porcentagem de gordura no leite, ao passo que para Mikolaichik e Morozova (2009) os índices de gordura aumentaram.

Em relação a imunidade, Naseer *et al.* (2016) conduziram este tipo de estudo, avaliando apenas o hemograma de bezerros e não a função destas células. Os pesquisadores verificaram que bezerros experimentalmente intoxicados com dose oral diária de 1,0 mg/kg de AFB₁ durante dez dias apresentaram elevação nos índices séricos de alanina aminotranferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), ureia e creatinina, além de anemia e leucopenia por linfopenia, neutropenia e monocitopenia. E o uso de adsorventes orgânicos (silimarina ou cloreto de colina) reduziu a atividade das enzimas hepáticas e melhorou os parâmetros hematológicos, no qual o grupo que recebeu silimarina mostrou-se mais significativo.

As bentonitas, minérios argilosos da família das esmectitas, são largamente empregadas na avicultura devido ao seu custo financeiro acessível e sua eficácia na adsorção à micotoxinas (SCHNEIDER, 2017). Em razão dessa vantagem econômica, associado ao seu efeito, optou-se por testar tal substância em bovinos leiteiros neste presente estudo. A argila natural está

disponível em abundância, é uma fonte barata e não é tóxica para o ecossistema (MOUSSA *et al.* 2020).

Com isso, o presente trabalho buscou verificar se a utilização do adsorvente inorgânico argila bentonita a base de aluminossilicato, na alimentação dos animais é capaz de melhorar a sanidade de vacas leiteiras alimentadas com dieta naturalmente contaminada por micotoxina. Acredita-se também que este incremento sanitário possa melhorar a função de leucócitos sanguíneos, e a qualidade e quantidade da produção leiteira dos animais.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. Micotoxinas

As micotoxinas constituem um grupo relativamente extenso e de grande diversidade química em seus metabólitos tóxicos. Tais substâncias são produzidas em situações de baixa umidade e altas temperaturas por fungos filamentosos, principalmente aos pertencentes ao gênero *Penicillium, Alternaria, Fusarium, Aspergillus, Claviceps e Stachybotrys*. Há aproximadamente cerca de 300 a 400 micotoxinas conhecidas até o momento (PINOTTI *et al.* 2016).

Somente alguns tipos de micotoxinas são preocupantes para a segurança alimentar humana e animal, como as AF, FM, OT, TRC e ZEA (SIRHAN *et al.* 2013). Tais toxinas podem atuar no sistema imunológico, causando imunossupressão em virtude da vulnerabilidade dessas células que estão em constante proliferação e diferenciação. Essa supressão no sistema imune pode manifestar-se com diminuição na atividade dos linfócitos T ou B, supressão de imunoglobulinas e produção de anticorpos, queda na função do sistema complemento ou do interferon e ainda na falha da função dos macrófagos efetores. Apesar da base molecular celular para muitos dos efeitos imunossupressores das micotoxinas não estar clara, a inibição da síntese de DNA, RNA e proteínas por meio de diversos mecanismos distintos parece ser responsável pela ação dessas micotoxinas (CORRIER, 1991).

2.1.1. Aflatoxinas

As principais espécies de fungos produtores de aflatoxina são o *Aspergillus flavus* e *A. parasiticus*. Este grupo engloba diversos tipos de toxinas, todavia, somente quatro são as mais

abundantes, sendo: aflatoxina B₁ (AFB₁), B₂ (AFB₂), G₁ (AFG₁) e G₂ (AFG₂) (BORDIN, *et al.* 2014).

As AF são as toxinas que possuem a maior importância para a espécie humana, e as intoxicações podem ocorrer por duas maneiras. Primeiramente pela exposição a alimentos contaminados naturalmente ou mesmo por produtos processados, uma vez que são toxinas extremamente estáveis e podem permanecer viáveis mesmo após operações industriais nos alimentos. Também, a AF pode apresentar-se de forma indireta nos tecidos, ovos, leite e demais produtos de origem animal, os quais acabam por excretar seus derivados, ou seja, a AFB₁ passar por hidrólise no organismo, e é liberada na forma de AFM₁. Ambas toxinas são carcinogênicas, porém a AFB₁ é a mais frequentemente encontrada nos alimentos e também de maior efeito hepatocarcinogênico (STREIT *et al.* 2012). Nos ovos, tal micotoxina transfere-se gradualmente de acordo com sua presença na dieta das poedeiras, compondo em grande risco para o homem (SLEPCHENKO *et al.* 2018). Em bovinos leiteiros, mesmo que as concentrações presentes nas dietas comumente sejam baixas, ainda assim esta quantidade diária permite que o metabólito da AFM₁ seja secretada no leite (KUTZ *et al.* 2009).

Níveis pequenos de micotoxinas na carne bovina, como 100 ppb, podem representar toxicidade cumulativa para o ser-humano, ainda que, conforme Shase e Stone (2003), níveis tóxicos aprestam-se entre 300 e 700 ppb.

Em animais, a AF promove disfunção gastrointestinal, icterícia, anemia, hemorragia e queda geral nos índices zootécnicos, tais como a diminuição do ganho de peso, conversão alimentar, produção de leite e de ovos, além de uma maior susceptibilidade às doenças em virtude do estresse ambiental e microbiano (MARIN *et al.* 2013).

Outra questão é que o contato prolongado à uma pequena dose de AF pode culminar com grandes lesões estruturais e funcionais no fígado, causando inclusive neoplasias (KOVALSKY *et al.* 2016).

2.1.2. Fumonisinas

As fumonisinas são toxinas produzidas pelo gênero *Fusarium* e espécies *Fusarium* verticillioides e *F. proliferatum* (DA ROCHA et al. 2014). Os análogos mais conhecidos são as fumonisinas B₁ (FB₁), B₂ (FB₂), B₃ (FB₃) e B₄ (FB₄) (ANUKUL et al. 2014). A FB₁ é a mais tóxica, sendo reconhecida como possível agente causadora de câncer em humanos (MARROQUÍN-CARDONA et al. 2014).

A FB₂ também possui significância toxicológica. Em animais, a ingestão de alimentos contaminados pode causar doenças em equinos, suínos e coelhos, espécies estas mais sensíveis em comparação aos bovinos e às aves (MARIN *et al.* 2013).

Nos equinos, há relatos de leucoencefalomalácia, síndrome que desencadeia sinais como letargia, cegueira, anorexia, convulsão e até morte. Nos suínos, por sua vez, a fumonisina está relacionada à problemas pulmonares, como edema, dispneia, cianose e morte. Além disso, as fumonisinas também podem causar hepatotoxicidade (GROOPMAN *et al.* 2013).

Para Osweiler *et al.* (1993), a espécie bovina parece ser menos susceptível aos efeitos da FB₁. Em seu estudo, foram observadas apenas aumento nas atividades das enzimas hepáticas AST, gama glutamil transferase (GGT) e lactato desidrogenase (LDH), mas nenhuma alteração em bezerros intoxicados com 15, 31, 148 mg/kg FB₁ durante o período de 30 dias. Ressalta-se que estes teores são considerados tóxicos a equinos e suínos (POZZI *et al.* 2002).

2.1.3. Ocratoxinas (OT)

A produção das ocratoxina do tipo A (OTA) e ocratoxina B (OTB), ocorrem essencialmente por fungos pertencentes ao gênero *Aspergillus* e *Penicillium*, especificamente pelas espécies *A. ochraceus*, *A. carbonarius*, *P. verrucosum* e *P. nordicum* (MILANI, 2013).

As OT estão ligadas a efeitos nefrotóxicos potentes em animais, como consequência da exposição a níveis de ocorrência natural na ração, uma vez que os rins são o principal órgão alvo (MARROQUIN-CARDONA et al. 2014). Com isso, as OT foram associadas à nefropatia endêmica em suínos (DA ROCHA et al. 2014). Altas doses dietéticas dessa toxina podem causar danos ao fígado e necrose do tecido intestinal e linfoide (GROOPMAN et al. 2013). Quanto à toxicidade humana, as OT têm sido implicadas em uma doença renal fatal típica nos países dos Balcãs e foram classificadas como possivelmente cancerígenas (MARIN et al. 2013). Há relatos de problemas de saúde pública com relação à transferência de OT para alimentos de origem animal (STREIT et al. 2012).

2.1.4. Tricotecenos

Tricotecenos são produzidos por várias espécies de *Fusarium*, e algumas espécies *Cephalosporium* e *Trichoderma*. Esta classe de metabólitos fúngicos com mais de 150 compostos estruturalmente relacionados, são quimicamente divididos em quatro tipos A, B, C e D (CAST, 2003). As do tipo A e B são os mais importantes, sendo que o tipo A compreendem

principalmente as toxinas HT-2 e T-2, enquanto o tipo B são frequentemente representados pelo desoxinivalenol (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 grupos mais tóxicos do tipo A, as quais 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 tricotecenos menos tóxicos. No entanto, por ser altamente incidente, é considerado muito importante na pecuária (CAST, 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 (CAST, 2003).

2.1.5. Zearalenona (ZEA)

A zearalenona é uma micotoxina produzida pelo fungo *Fusarium* principalmente pela espécie *F. graminearum*, mas também pelos *F. culmorum*, *F. cerealis*, *F. equiseti*, entre outros. Esta toxina possui como derivados os compostos α-zearalenol e β-zearalenol (DA ROCHA *et al.* 2014).

Tendo em vista que a ZEA possui semelhanças estruturais com o estradiol, hormônio sexual feminino, esta toxina é classificada geralmente como um estrogênio não esteroide. Tal particularidade química oferece a capacidade de ligação aos receptores de estrogênio, levando a efeitos adversos associados a distúrbios reprodutivos e hiperestrogenismo, tanto em humanos quanto em animais reprodutores (STREIT *et al.* 2012; PIOTROWSKA *et al.* 2013).

2.2. Efeito das micotoxinas nos bovinos

Intoxicações experimentais e acidentais foram descritas em vacas leiteiras. Van Halderen *et al.* (1989) relataram uma mortalidade de 7 animais de um grupo de 25 bezerros que se alimentaram com rações contendo milho com presença de 11.790 µg /kg de AF. Os sinais clínicos incluíram perda de massa corporal, pelagem áspera, diarreia e prolapso retal.

Ainda Umar *et al.* (2015) relataram 45 casos de campo de aflatoxicose em uma fazenda em Okara (Paquistão). Os animais se alimentaram com forragem a base de milho com quantidades aproximadas de 33.500 μg/kg de AF. Os quadro clínicos apresentados foram de anorexia, depressão, fotossensibilização e diarreia, sendo que quinze animais vieram a óbito.

Sulzberger *et al.* (2017) relataram queda na produção de leite e conversão alimentar usando 100 µg/kg de AFB1.

A ingestão de AF também pode afetar a fermentação ruminal, reduzindo a disponibilidade de nutrientes e, eventualmente, pode afetar os animais produtividade (MESGARAN *et al.* 2013).

Quanto ao DON, esta micotoxina pode afetar a fermentação ruminal e reduzir a produção leiteira (WHITLOW e HAGLER, 2008). Seeling *et al.* (2006) não relataram efeito sobre o consumo de ração de vacas leiteiras utilizando aproximadamente 3,4 mg/Kg de DON por kg de matéria seca. Trabalhando com bezerros, Valgaeren *et al.* (2019) relataram insuficiência hepática grave em animais de 2 a 3 meses de idade, com atonia ruminal induzida pelo uso de 1,13 mg de DON/kg de ração.

Sobre as FB, a administração oral em bezerros com uma dieta contendo FB1 com índices de 2,36 mg/ kg por dia aumentando para 3,54 mg/kg por dia num período de 239 a 253 dias mostrou razões de esfinganina/esfingosina elevadas com alterações leves da morfologia hepatocelular acompanhadas por pequenas alterações epiteliais do ducto biliar (BAKER e ROTTINGHAUS, 1999). Gonçalves *et al.* (2015), observaram que a FB pode causar redução da produção de leite, queda do consumo de alimento, hepatotoxicidade, nefrotoxicidade e problemas reprodutivos quando a administração oral encontra-se com níveis acima de 75 mg/kg é tóxica para bovinos.

Por sua vez, a ZEA está mais ligada à problemas reprodutivos em bovinos, que pode culminar com abortos e disfunções, por alterações da resposta estrogênica (KEMBOI *et al.* 2020). Coppock *et al.* (2012), relataram ciclo estral anormal, vaginite, estro em animais prenhes, desenvolvimento mamário em novilhas na pré-puberes e esterilidade, em bovinos alimentados com dieta contendo 1,5 mg de ZEN/kg de alimento.

2.3. Importância econômica e comercial das micotoxinas

Os insumos usados na produção de alimentos destinados aos animais, como concentrados e volumosos, são naturalmente susceptíveis às atividades de fungos de várias espécies,

conforme a matéria orgânica, umidade, temperatura e quantidade apropriadas de oxigênio presente no alimento (WHITLOW *et al.* 1999).

O consumo animal de culturas contaminadas por micotoxinas pode causar desde alterações subclínicas (retardo de crescimento, imunidade prejudicada e diminuição da resistência às doenças), a alterações crônicas e agudas culminando com a morte do animal. Basicamente, esses riscos afetam o desempenho animal, representando uma preocupação global para a indústria pecuária (PINOTTI *et al.* 2016).

Portanto, as micotoxinas são uma ameaça à segurança da cadeia de suprimentos de ração para os animais dos sistemas de produção (GRENIER; APPLEGATE, 2013). Tais toxinas causam entraves na indústria de concentrados animal devido ao decréscimo da qualidade dos produtos, o que pode culminar com a rejeição e até mesmo o descarte de matérias-primas contaminadas (MARROQUÍN-CARDONA *et al.* 2014).

Assim, as empresas demandam grandes custos para tentar conter a contaminação por micotoxinas, buscando por fontes alternativas de alimentação, estratégias de prevenção e investimentos nos métodos de teste de detecção (CAST, 2003). Como é impossível garantir alimentos totalmente livres de micotoxinas, várias organizações restringiram os níveis aceitos de certas micotoxinas em animais e alimentos por meio de legislações que variam de acordo com o país, uma vez que diferentes aspectos científicos, econômicos e fatores políticos influenciam nestes alinhamentos (KOVALSKY *et al.* 2016).

2.3.1. Relação das micotoxinas na alimentação de bovinos leiteiros

Uma das maiores preocupações com a segurança alimentar e saúde humana é a passagem de micotoxinas ao leite. Considerando o alto consumo de leite e produtos lácteos por seres humanos, principalmente crianças, é de extrema importância garantir a segurança deste alimento (RODRIGUES, 2014).

Em especial as AFM₁ são substâncias de alto potencial carcinogênico, sendo secretada no leite quando o animal consome alimento contaminado com AFB₁ (HUSSEIN; BRASEL, 2001).

Num estudo de âmbito nacional conduzido por Pereira e Antunes (2007), foi detectado AFM₁ em 38% das amostras de leite pasteurizado com média de 0,059 μg /L, contudo as concentrações encontradas estavam dentro dos limites máximos previstos na legislação, que é de 0,5 μg /L, de acordo com a resolução da diretoria colegiada (RDC) nº 7 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA (BRASIL, 2011). Todavia, resultados obtidos por Oliveira

et al. (2013) foram bastante alarmantes, considerando que 31% das amostras de leite ultra alta temperatura (UHT) apresentaram níveis extremamente altos de AFM₁, variando de 1,0 a 4,1 μg /L, extrapolando o limite máximo tolerável. Em pesquisa realizada no estado do Paraná, Brasil, foram analisadas 40 amostras de leites comercializados no estado, sendo que todas estavam dentro do limite de até de 0,5 μg/L, valor máximo permitido pela legislação brasileira, e apenas oito dessas apresentaram resultado acima dos 0,05 μg/L, limite máximo exigido pela a União Europeia (BAGGIO, 2006).

Sobre o controle das AFs, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento-MAPA, faz o monitoramento do leite por meio do Plano Nacional de Resíduos e Contaminantes (PNCRC), instituído por meio da Instrução Normativa nº 42 de 20 de dezembro de 1999 (BRASIL, 1999).

Ainda, no Brasil, as AF são as únicas micotoxinas cujos níveis máximos em alimentos estão previstos na legislação. Na Portaria nº 07/1988 do MAPA (BRASIL, 1988), há expresso como limite máximo 50 μg/Kg de AF para matérias-primas e rações, todavia não aponta quais metabólitos desta micotoxina compõe esse valor, porém infere-se que se trata da somatória de AFB₁, AFB₂, AFG₁ e AFG₂.

Quanto à OT, a toxicidade na espécie bovina está relacionada ao funcionamento do rúmen, devido à hidrólise enzimática da OT em OTα e fenilalanina pelos micro-organismos presentes no rúmen (KIESSLING *et al.* 1984). Alguns estudos demonstram que esta micotoxina é excretada por meio do leite. Estudos norte-americanos observaram que 14% do leite analisado estavam contaminadas com OTA (EMANUELSON *et al.* 1993).

Sobre a ZEA em bovinos leiteiros, a intoxicação pode levar à infertilidade, queda na produção leiteira e hiperestrogenismo (D'MELLO *et al.*, 1999). Tais efeitos podem impactar principalmente em problemas de ordem reprodutiva, como estro prolongado e diminuição na taxa de concepção (SCHUH, 1997).

Toledo (2018) encontrou nas amostras silagens de milho da região norte do estado do Paraná uma incidência de 74,4% de ZEA (média de 546,30 μg/kg), 85,1% de DON (média de 1440,80 μg/Kg) e 48,9% de AF (média de 50,60 μg/kg). Para os níveis das micotoxinas ZEA e DON, estes foram considerados como elevados no estudo realizado, o qual tomou como base as recomendações do Centro de Pesquisas em Forragicultura da Universidade Federal do Paraná (UFPR, 2011), que descreve que os limites devem ser inferiores de 285 μg/Kg para ZEA, 930 μg/Kg para DON e 1.000 μg/Kg para AF.

Em estudo conduzido por Aragón e Rodrigues (2009), verificou-se a presença de micotoxinas em 538 amostras de silagem de milho derivadas de diferentes países da Europa e da Ásia, nos anos de 2005 a 2008. Destas, 23% foram positivas na Europa e 48% na Ásia para ZEA, nas quais os valores médios foram de 129 μg/Kg e 1.058 μg/Kg, respectivamente. Para DON encontraram índices de 92,5% de contaminação, com resultado máximo de 5.815 μg/Kg.

2.4. Uso de adsorventes na alimentação de bovinos leiteiros

Um dos métodos mais eficazes e práticos para evitar os efeitos das micotoxinas é o uso de adsorventes. Eles sequestram as micotoxinas, durante a passagem pelo trato digestório (KUTZ *et al.* 2009).

Trata-se de substâncias com larga capacidade de ligação podendo garantir que uma parcela das micotoxinas se torne indisponível ao organismo, e àquelas biodisponíveis ficarão aquém do limite de atividade biológica. A aptidão do adsorvente ligar-se à micotoxina irá tornar mínima a potencialidade de incremento toxicológico entre as diferentes micotoxinas (CAVALLARIM *et al.* 2011).

A quantidade dos adsorventes na dieta vai estar sujeita à capacidade de ligação do adsorvente à micotoxina bem como do grau de contaminação do alimento. Um grande potencial de ligação consequentemente dispenderá de uma menor quantidade. Elevados níveis de inserção de adsorventes também podem modificar as propriedades físicas do alimento, o que poderia alterar ou dificultar o processamento e mistura nas fábricas de alimentos para animais. O sequestro da micotoxina é obtido por meio da adsorção física, o qual envolve as interações de Van der Waals e pontes de hidrogênio, e a adsorção química, a qual é uma interação mais forte, que ocorre por ligação iônica ou covalente (YIANNIKOURIS *et al.* 2004).

Os adsorventes são divididos em inorgânicos e orgânicos, com base em sua composição química (VILA-DONAT *et al.* 2018). Os adsorventes inorgânicos são suplementos alimentares relativamente acessíveis e nutricionalmente inertes, contudo demonstram baixa proteção contra micotoxinas (VAN KESSEL; HIANG-CHEK, 2001). Dentro dessa classificação temos dois grupos, sendo as argilas (classes: filossilicatos e silicatos pseudo-laminares) e os tectossilicatos (classe: zeolitas) (SANTURIO, 2007). Ainda nos produtos inorgânicos enquadram-se os aluminossilicatos (bentonitas), sílicas e carvão ativado (PIVA *et al.* 1993).

Os filossilicatos são agentes estabilizantes adsorventes para metais pesados, usados como ligantes em processos de peletização nos ingredientes de concentrados animais (BROWN *et al.* 1992). Argilas de origem vulcânica como os aluminossilicatos e as montmorilonitas,

demonstraram ter uma alta afinidade *in vitro* por AFB₁ (SANTURIO *et al.* 1995). Tais produtos são misturados juntamente à concentrados. O investimento financeiro é baixo, contudo demandam uma alta taxa de inclusão na dieta, considerando que a maioria adsorve apenas micotoxinas específicas, o que pode se tornar dispendioso para o uso em larga escala em ambientes industriais. Além do mais, não são biodegradáveis o que podem acarretar transtornos no descarte quando usados em altas quantidades (YIANNIKOURIS *et al.* 2004).

As moléculas das argilas podem ser eletricamente neutras, não diferindo no número de cargas negativas e positivas. Considerando que a AFB₁ é adsorvida por aluminossilicatos e montmorilonitas, os quais possuem um número elevado de cargas negativas, entende-se que a partícula de AF possui cargas positivas ou tem a capacidade de absorver carga positiva. Várias argilas detêm exclusivamente AF e não outras micotoxinas. Tal fato pode ser acarretado pela polaridade das cargas elétricas nas moléculas da argila, a localização destas cargas elétricas ou a localização sequencial na superfície da argila (SANTURIO, 2007).

Os adsorventes orgânicos são polímeros à base de carbono. Incluem-se as fontes vegetais de fibras, a exemplo do farelo de trigo, casca de aveia, pectina e extratos celulares de leveduras. Tais substâncias são biodegradáveis e tem a vantagem adsorver muitas micotoxinas com baixa inclusão, devido a sua grande área de superfície (MALLMANN; DILKIN, 2007).

Já extratos obtidos de leveduras *Saccharomyces cerevisae*, também classificadas como adsorventes orgânicos, as quais possuem capacidade de adsorver várias micotoxinas. Nesta categoria, as glucanas possuem significativo poder ligante às AF e ZEA por meio de pontes de hidrogênio entre a micotoxina e as glucanas (YIANNIKOURIS *et al.* 2002).

Contudo, como as estruturas das micotoxinas são diferentes, a eficácia do adsorvente não é igual para todas toxinas (BROWN *et al.* 1992). Em testes *in vivo*, a AF é adsorvida com sucesso por produtos orgânicos e inorgânicos (SABATER-VILAR *et al.* 2007), contudo quanto ao DON e a FB, estas são de mais difícil adsorção, por sofrerem altamente com influências de fatores tais como pH do meio e presença de demais micotoxinas num mesmo alimento (CABRAL, 2019).

Gallo *et al*, (2020) verificaram que o uso combinado de argila bentonita, cepas de leveduras e enzimas específicas na adsorção de DON e FB neutralizaram os efeitos negativos das micotoxinas na digestibilidade da dieta, qualidade do leite (principalmente características de coagulação) e respostas imunometabólicas em animais leiteiros em lactação.

2.5. Imunidade sistêmica

O sistema imunológico é uma rede interativa de órgãos linfoides, células e fatores humorais, organizados para reconhecer, resistir e eliminar contaminantes que penetram nas membranas corporais. Este sistema pode ser dividido em dois componentes, sendo inato e adaptativo, com base nas velocidades e especificidades das reações, todavia ambos estão altamente integrados (DAHA, 2011).

A imunidade inata é ampla em escopo, com a capacidade de responder a qualquer lesão tecidual ou neutralizar uma grande variedade de possíveis patógenos de forma imediata. Por sua vez, o sistema imunológico adaptativo pode levar vários dias para elaborar uma resposta frente a um desafio. Contudo é um método mais personalizado ou específico contra patógenos infecciosos e pode ser exacerbado pela exposição repetida ao mesmo agente. Coletivamente, o sistema imunológico, inato e adaptativo, devem trabalhar sinergicamente para fornecer proteção ideal contra ameaças externas e sobrevivência do animal (SORDILLO; STREICHER, 2002; AITKEN *et al.* 2011).

O sistema imunológico inato é o mecanismo dominante de defesa do hospedeiro na maioria dos organismos. Ele inclui componentes não específicos como fatores físicos e barreiras mecânicas, fagócitos, endotélio vascular e, vários mediadores solúveis derivados de populações de células imunes e não imunes dentro dos tecidos, que respondem a agente infecciosos de maneira genérica, representando a primeira linha de defesa contra patógenos invasores (KUMAR *et al.* 2011).

Como os componentes deste sistema já estão presentes ou são ativados rapidamente no local de exposição a patógenos, os agentes infecciosos podem ser eliminados em minutos a horas após a invasão de maneira tão eficiente, que muitas vezes não há alterações visíveis em suas funções fisiológicas do hospedeiro, embora tenha ocorrido a tentativa de invasão microbiana (SORDILLO, 2015).

Por sua vez, a resposta imune adaptativa é desencadeada quando mecanismos imunes inatos não conseguem eliminar um patógeno. Ela é caracterizada pela geração de linfócitos para antígenos exclusivos e memória celular com a capacidade de reconhecer determinados antigênicos específicos de um patógeno. Quando células e tecidos hospedeiros são reexpostos ao mesmo antígeno, um estado elevado de reatividade do sistema imune ocorre como consequência da memória imunológica e expansão clonal de antígenos específicos de células efetoras (SORDILLO, 2015).

2.5.1- Imunidade da glândula mamária

Em relação a glândula mamaria, sabe-se que a primeira barreira de defesa é o teto, o qual impede a entrada de patógenos por meio de seu canal, agregando-se ao esfíncter e ao tampão queratinizado que mantém o canal fechado entre uma ordenha e outra, colaborando com o impedimento da penetração de patógenos (CARNEIRO *et al.* 2009).

Como resultado da eficiência usual da barreira do canal do teto, o lúmen intramamário é um meio asséptico, assim, ao contrário de outros epitélios, como epitélios intestinais, bucais ou respiratórios superiores, o mamário é raramente estimulada por componentes bacterianos e qualquer bactéria deve ser interpretada como uma intrusa (RAINARD e RIOLLET, 2006).

Quando ocorre uma invasão, enzimas microbicidas, e fagócitos residentes começam o combate, liberando mediadores inflamatórios que promovem aumento de permeabilidade vascular e quimiotaxia permitindo que várias substâncias presentes no sangue atravessam juntamente com os leucócitos para a glândula mamária. Algumas dessas substâncias são os íons de cloro e sódio e enzimas que acarretam desvios na proteína e na gordura. Em razão das lesões na glândula mamária, as células secretoras acabam diminuindo sua eficiência, levando à uma menor produção e secreção de leite, e consequentemente, há perda de qualidade do leite. Além do mais, a queda na produção vai estar sujeita ao agravamento da inflamação (BRITO; BRITO, 1999).

As CCS presentes no leite, na sua maioria, são provenientes do sangue do animal (leucócitos), que são carreadas da corrente sanguínea para os alvéolos do teto (responsáveis pela secreção láctea) quando há um desafio imunológico. Quando há a presença de bactérias dentro da glândula mamária há a formação da mastite, o que consequentemente eleva a contagem de células somáticas demasiadamente. Em animais sadios é comum encontrar até 100.000 células somáticas por mililitro (mL) de leite, todavia, a partir de 200.000 células somáticas por mL de leite é considerado que a glândula mamária está desafiada com algum tipo de micro-organismo (MACHADO *et al.* 2009). Por isso a contagem de CCS é frequentemente usada como parâmetro considerável na qualidade do leite, mas não é a única alteração encontrada (BRITO; BRITO, 2014)

A inflamação também interfere nas proteínas do leite, causando redução na porcentagem de caseína, uma vez que há diminuição de sua síntese e de sua proteólise pela redução da plasmina, a principal protease do leite. Em contrapartida há migração das proteínas do soro, como imunoglobulinas, citocinas e demais moléculas imunológicas para a glândula

mamaria, de uma maneira que não ocorra alteração do teor total de proteína láctea (ZANELA et al. 2006).

O percentual de gordura também sofre decréscimo, pelo fato da mastite intervir na função da glândula mamária em produzir gordura, assim como a lactose, que decresce próximo aos 10% (SANTOS, 2003).

2.5.2. Sistema imune e as micotoxinas

Vacas leiteiras expostas a dietas contaminadas com AFs apresentaram alteração como imunossupressão em níveis relativamente baixos de ingestão micotoxinas (MASOERO *et al*, 2007). Animais que ingeriram DON sem qualquer tipo de adsorvente associado à dieta, tiveram os parâmetros imunológicos afetados (SEELING *et al*. 2006).

O amplo efeito imunossupressor das micotoxinas na imunidade celular e humoral as respostas demonstraram diminuição da resistência do animal a doenças à infecciosas (OSWALD *et al*, 2005).

2.6. Função e lesão hepática

Em ruminantes os carboidratos são extensivamente fermentados no rúmen como ácido graxo volátil e ao serem absorvidos, chegam ao fígado, que desempenha um papel crucial no metabolismo da glicose. Além disso, tal órgão é o produtor fundamental das proteínas totais, como a albumina, globulinas e o fibrinogênio, que estão envolvidas com uma variedade de funções, como manutenção da pressão osmótica, transporte de nutrientes, regulação do pH, coagulação, entre outras (GONZÁLEZ; SILVA, 2006). Cita-se ainda que o órgão é responsável pelo metabolismos de substâncias tóxicas, biotransformando em metabolitos menos tóxicos para que possam causar menos danos ao hospedeiro quando forem eliminados. Neste sentido tem-se que o fígado é considerado o principal órgão alvo das micotoxinas (DONKIN, 2012; UPADHAYA *et al.* 2010)

Desta maneira, a manutenção da função hepática é de extrema importância para manter os bovinos produtivos. Essa monitoração pode ser realizada por exames laboratoriais hepáticos que podem ser divididos em testes que avaliam a lesão nos hepatócitos, os quais detectam colestase e por fim os que aferem a função hepática. Lesões nos hepatócitos são detectadas por meio da avaliação de enzimas séricas liberadas após o rompimento da célula hepática,

fornecendo elementos da extensão, magnitude e curso (aguda ou crônica) da lesão (THRALL *et al.* 2015).

As análises convencionais para avaliação hepática dão informações sobre a integridade do hepatócito (ALT, AST e sorbitol-desidrogenase) e integridade do sistema biliar (fosfatase alcalina e GGT). A função hepática pode ser avaliada testando a capacidade excretora do fígado (ácidos biliares e bilirrubina) e função de síntese (NH3/ureia, albumina, fibrinogênio, protrombina entre outros) (KANEKO et *al.* 2008).

Quanto a ALT, é uma enzima localizada livre no plasma dos hepatócitos, na eventualidade de rompimento celular tal enzima é liberada na corrente circulatória (THRALL et al. 2015). A concentração de ALT não é tão expressiva no citoplasma dos hepatócitos de equinos e ruminantes. A ALT é uma enzima que tem fluxo de ascensão agudo, contudo sua elevação é condizente à lesão encontrada, tendo seu pico de liberação encontrado de 3 a 4 dias após a lesão, mas com retorno para a normalidade em até 14 dias (GONZALEZ e SILVA, 2006). Segundo Thrall *et al.* (2015), em casos de lesões crônicas pode haver um discreto acréscimo desta enzima, o que pode ser quase insignificante.

Em relação às enzimas não específicas do fígado são a AST e LDH não devendo ser usadas isoladamente para estudo de doenças hepáticas, porém são úteis quando empregadas juntamente com as enzimas específicas, (KERR, 2003).

Quanto às proteínas totais no plasma, sua diminuição está relacionada à problemas hepáticos, renais e intestinas, além de hemorragias ou nutrição deficitária. Rações com proteína bruta abaixo de 10%, por exemplo, podem acarretar na diminuição dos níveis séricos de proteína no sangue em ruminantes (KANEKO *et al.* 2008).

De acordo com Contreras (2000), a albumina é a proteína do plasma sanguíneo mais abundante, chegando a próximo de 50% das proteínas circulantes. Ainda, colaboram com aproximadamente 80% da osmolaridade do plasma. A albumina é produzida no fígado e sua concentração pode ser influenciada pela quantidade de proteína presente na ração.

A principal função da albumina está ligada ao transporte de substância no plasma, podendo também ser vista como uma reserva de aminoácidos para o metabolismo proteico (COLES, 1984).

A maioria dos sinais clínicos de intoxicação por FBs em animais são diminuição do apetite acompanhada por evidências bioquímicas e histológicas de dano hepático (RICHARD *et al*, 1996). Em um experimento com novilhos holandeses em que estes foram alimentados com dieta com nível contendo 94 mg FB1/kg de alimento durante 253 dias, verificou-se aumento

de AST e GGT, além de lesão hepatocelular e células epiteliais biliares hiperplásicas (BAKER e ROTTINGHAUS, 1999).

Alterações hepáticas ligadas à ingestão de AFs também foram verificadas MASOERO *et al*, 2007).

Sinais inespecíficos de insuficiência hepática, baixa produção láctea e pouco ganho de peso podem estar correlacionados à micotoxicoses (RIET-CORREA *et al.*2013).

3 OBJETIVOS

O objetivo geral foi avaliar se o uso do adsorvente de micotoxina, uma bentonita a base de aluminossilicato, na dieta de vacas leiteiras em lactação adsorve as micotoxinas contidas na dieta. A partir disso, avaliar qual o impacto na imunidade sistêmica inata, se há aumento na eficiência do metabolismo oxidativo leucocitário, o que refletiria em menores frequências de afecções infecciosas como a mastite. Desta forma alcançar aumento na produção leiteira e melhoria na qualidade do leite, observados indiretamente por menores quantidades de CCS, maiores volumes e incremento nos índices de proteína e gordura lácteas.

4. REFERÊNCIAS

- AITKEN, S. L.; CORL, C. M.; SORDILLO, L. M., Immunopathology of mastitis: Insights into disease recognition and resolution. **Journal of Mammary Gland Biology**, v.16, p.291–304, 2011.
- ANUKUL, N.; MANEEBOON, T.; ROOPKHAM, C.; CHUAYSRINULE, C.; MAHAKARNCHANAKUL,W., Fumonisin and T-2 toxin production of *Fusarium* spp. isolated from complete feed and individual agricultural commodities used in shrimp farming. **Mycotoxin Res.**, v.30, p.9–16, 2014.
- ARAGÓN, Y.A.; RODRIGUES, I., The occurrence of mycotoxins in 670 silages. In: INTERNATIONAL SILAGE CONFERENCE, Madison, 2009. 671 **Proceeding, Madison**: ISC, p.201-202, 2009.
- BAGGIO, E. C. R., Determinação de aflatoxina M1 em leite pasteurizado pelos métodos de CCD e CLAE utilizando coluna de imunoafinidade. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) **Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Paraná**, Curitiba, 95 f., 2006.
- BAKER, D.C.; ROTTINGHAUS, G.E. Chronic Experimental Fumonisin Intoxication of Calves. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.11, p.289–292, 1999.
- BENNETT, J. W.; KLICH, M., Mycotoxins. Clinical Microbiology Review, v.16, n.3, p. 497–516, 2003.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria MAPA/SDA/ nº 07, de 755, 09 de novembro de 1988 **Diário Oficial da União**, Brasília, 1988.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa SDA N.º 42, de 20 de dezembro de 1999 **Diário Oficial da União**, Brasília, 1999.
- 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.
- BRITO, M. A. V. P.; BRITO, R. F. O efeito da mastite no leite. **Revista Glória Rural**. Ano 3, n. 28, p. 18-24, 1999.
- BRITO, J. R. F.; BRITO, M. A. V. P., Controle da mastite como reduzir a contagem de células somáticas do rebanho bovino leiteiro. **Embrapa Gado de Leite**, Disponível em :http://www.cnpgl.embrapa.br/nova/laboratorios/qualidade_leite/arquivos/controlarmastite.doc. Acesso em: 22 jun. 2020, 2014.
- BROWN, T. P., ROTTINGHAUSGE, G. L., WILLIAMS, M.E. Fumonisin mycotoxicosis in broilers: Performance and pathology. **Avian Disease**, v.36, p.450-454, 1992.
- 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 Engineering Review**. v.6, p.20–28, 2014.

CABRAL, S. M. Adsorção multi-micotoxinas: revisão e estudo de carvões ativados. 2019. **Dissertação** (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, University of São Paulo, Piracicaba, 2019. doi:10.11606/D.11.2019.tde-13092019-113701. Acesso em: 02-02-2021.

CARNEIRO, D. M. V. F.; DOMINGUES, P. F.; VAZ, A. K., Imunidade da glândula mamária bovina: resposta à infecção. **Ciência Rural**, v.39, n.6, p.1934-1943, 2009.

CAST. Mycotoxins: Risks in Plant, Animal, and Human Systems; CAST: Ames, IA, USA, 2003.

CAVALLARIM, L.; TABACCO, E.; ANTONIAZZI, S.; BORREANI, G.; Aflatoxin accumulation in whole crop maize silage as result of aerobic exposure. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, New York, v. 91. p. 2419 – 2425, 2011.

COPPOCK, R.W.; CHRISTIAN, R.G.; JACOBSEN, B.J. Aflatoxins. In Veterinary Toxicology: **Basic and Clinical Principles**; Gupta, R.C., Ed.; Elsevier Inc.: San Diego, CA, USA, 2012

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

COLES, E.H., Patologia clínica veterinária. 3 ed. São Paulo: Manole, 566p., 1984.

CONTRERAS, P. A. Indicadores do metabolismo proteico utilizados nos perfis metabólicos de rebanhos. In: GONZÁLES, F. H. D.; BARCELLOS, J.; PATIÑO, H. O.; RIBERIO, L. A. **Perfil metabólico em ruminantes: seu uso em nutrição e doenças nutricionais.** Porto Alegre: Gráfica UFRGS, p. 23-30, 2000.

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. **Journal of Animal Science**, v.95, p.19, 2017.

DAHA, M.R., Grand challenges in molecular innate immunity. **Frontiers in Immunology 2**, p.16–17, 2011.

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

DAWSON, K.A.; EVANS, J.; KUDUPOJE, M., Understanding the adsorption characteristics of yeast cell wall preparations associated with mycotoxin binding. Nutritional Biotechnology in the feed and food industries, Lexington: **Alltech**, v.22, p.169-181, 2006.

DONKIN, S.S., The role of liver metabolism during transition on postpartum health and performance, **Ruminant Nutrition Symposium** Proceedings, University of Florida, Gainesville, p. 97-106, 2012.

- D'MELLO, J.P.F.; PLACINTA, C.M.; MACDONALD, A.M.C., *Fusarium* mycotoxins: A review of global implications for animal health, welfare and productivity. **Animal Feed Science Technology**, v.80, p.183–205, 1999.
- ECKHARDT, J. C.; SANTURIO, J.; ZANETTE, R. A.; ROSA, P. A., Efficacy of a Brazilian calcium montmorillonite against toxic effects of dietary aflatoxins on broilers reared to market weight. **British poultry science**, v. 55, n. 2, p. 215-220, 2014.
- EMANUELSON, A.B.; OLSEN, M.; OKARSSON, A.; PALMIN, G. I.; HULT, K. Ochratoxin A in cow's milk and in human milk with corresponding human blood samples. **Journal of AOAC International.**v.76, n. 4, p.842-46, 1993.
- FLORES, M. E.; LIZARRAGA, E.; LÓPEZ DE CERAIN, A.; GONZÁLEZ-PEÑAS, Presence of mycotoxins in animal milk: review. **Food Control**, v. 53, p.163–176., 2015. GALVANO, F.; PIETRI, A.; BERTUZZI, T., Activated carbons: *in vitro* affinity for ochratoxin A and deoxynivalenol and relation of adsorption ability to physicochemical parameters. **Journal of Food Protection**, v.61, p. 469 475, 1998.
- GONÇALVES, B.; CORASSIN, C.; OLIVEIRA, C. Mycotoxicoses in Dairy Cattle: A Review. **Asian Journal of Animal and Veterinary Advances**, v.10, p.752–760, 2015.
- GONZÁLEZ, F. H. D.; SILVA, S. C. **Introdução à bioquímica clínica veterinária**. Porto Alegre: Gráfica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, p.357, 2006.
- GRENIER, B.; APPLEGATE, T.J. Modulation of intestinal functions following mycotoxin ingestion: Meta-analysis of published experiments in animals. **Toxins**, v.5, p.396–430, 2013.
- GROOPMAN, J.D.; KENSLER, T.W.; WU, F., Mycotoxins Occurrence and Toxic Efects. **Encyclopedia Human Nutrition**, v.2, p.337–341, 2013.
- HUSSEIN, S.H.; BRASEL, J.M., Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. **Toxicology**, v.167, p.101-134, 2001.
- 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.
- KANEKO, J. J.; HARVEY, J.; BRUSS, M.L. Clinical biochemistry of domestic animals. San Diego: Elsevier, 6 ed. 896 p., 2008.
- KARAMAN, M.; BASMACIOGLU, H.; ORTATATLI, M.; OGUZ, H., Evaluation of the detoxifying effect of yeast glucomannan on aflatoxicosis in broilers as assessed by gross examination and histopathology. **British Poultry Science**, v.46, n.3, p.394-400, 2005.
- KEMBOI, D. C.; ANTONISSEN G, ;OCHIENG, P. E.; CROUBELS, S.; OKOTH, S.; KANGETHE, E.K.; FAAS, J.; LINDAHL, J.F.; GATHUMBI, J. K., A Review of the Impact of Mycotoxins on Dairy Cattle Health: Challenges for Food Safety and Dairy Production in Sub-Saharan Africa. **Toxins**, v.12 (4) p.222 -247, 2020.

KERR, G. M. Exames laboratoriais em Medicina Veterinária. 2. ed., 436 p. São Paulo: Roca, 2003.

KIESSLING, K.H.; PETTERSON, H.; SANDHOLM, K.; OLSEN, M., Metabolism of aflatoxin, ochratoxin, zearalenone and three trichothecenes by intact rumen fluid, rumen protozoa and rumen bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**. v.47, n. 5, p.1070-73, 1984.

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.

KOVALSKY, P.; KOS, G.; NÄHRER, K.; SCHWAB, C.; JENKINS, T.; SCHATZMAYR, G.; SULYOK, M.; KRSKA, R. Co-Occurrence of Regulated, Masked and Emerging Mycotoxins and Secondary Metabolites in Finished Feed and Maize - An Extensive Survey. **Toxins**, v.8, p.363, 2016.

KUMAR, H.; KAWAI, T.; AKIRA, S., Pathogen recognition by the innate immune system. **International Reviews of Immunology**. v.30, p.16–34, 2011.

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, p.59–63, 2009.

MACHADO, P. F.; CASSOLI, L. D.; SILVA, A. L. O que é leite de qualidade. **Revista Mundo do Leite**. Ano 7, n. 35, p. 22-26, 2009.

MALLMANN, C. A.; DILKIN, P. **Micotoxinas e Micotoxicoses em Suínos**. 1° ed. Santa Maria: Ed. Do Autor, p. 240, 2007.

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

MARROQUÍN-CARDONA, A.G.; JOHNSON, N.M.; PHILLIPS, T.D.; HAYES, A.W. Mycotoxins in a changing global environment - A review. **Food Chemical Toxicology**., v. 69, p.220–230, 2014.

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

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

MIGLIORATI, L.; ABENI, F.; CATTANEO, M. P.; TORNIELLI, C.; PIRLO, G., Effects of adsorbents in dairy cow diet on milk quality and cheese-making properties. **Italian Journal of Animal Science**, v.6 (1), p.460-462, 2007.

- MIKOLAICHIK, I. N.; MOROZOVA, L. A., Biological Basis of Using Bentonite-Based Mineral-Vitamin Premix when Increasing the Milk Yield of Cows, **Animal husbandry**, Vol. 35, n. 3, p.199–201, 2009,
- MILANI, J.M., Ecological conditions affecting mycotoxin production in cereals: A review. **Veterinary Medicine**, v.58, p.405–411, 2013.
- MOTTA, T. P.; FRIZZARIN, A.; MARTINS, T.; MIRANDA, M. S.; ARCARO, J. R. P.; AMBRÓSIO, L. A.; POZZI, C. R. Estudo sobre a ocorrência de fungos e aflatoxina B1 na dieta de bovinos leiteiros em São Paulo. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.35 (1), p.23-28, 2015.
- MOUSSA,A. I.; SOBEIH, A.M.K.; AL-HAWARY, I. I.; ELKASSAS, W. M.; BARAKAT, R., Efficacy of kaolin and bentonite clay to reduce aflatoxin m1 content in contaminated milk and effects on milk quality. **Pakistan Veterinary Journal.** v.40 (2), p.181-186, 2020.
- MURPHY, P.A.; HENDRICH, S.; LANDGREN, C.; BRYANT, C.M., Food Mycotoxins: An Update. **Journal of Food Science.** v.71, n.5, p.51-65, 2006.
- NEWMAN, K., The biochemistry behind esterified glucomannans –titrating mycotoxins out of the diet. In: **Alltech's 16th Annual Symposium**, Proceedings, p.369-382, 2000.
- OLIVEIRA, C.P.; SOARES, N.F.F.; OLIVEIRA, T.V.; JÚNIOR, J.C.B., Aflatoxin M1 occurrence in ultra high temperature (UHT) treated fluid milk from Minas Gerais/Brazil. **Food Control**, v.30, p.90–92, 2013.
- OSWALD, I.P., MARIN, D.E., BOUHET, S., PINTON, P., TARANU, I., ACCENSI, F., Immunotoxicological risk of mycotoxins for domestic animals. **Food Additives Contaminantes**, v.22 (4), p.354-360, 2005.
- OSWEILER, G. D.; KEHRLI, M. E.; STABEL, J. R.; THURSTON, J. R.; ROSS, P. F.; WILSON, T. M., Effects of fumonisin-contaminated corn screenings on growth and health of feeder calves. **Journal of Animal Science**. v.71, p.459–466, 1993.
- 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, p. 49-70, 2007.
- PHILLIPS, T.D.; SARR, B.A.; CLEMENT, B.A.; KUBENA, L.F.; HARVEY, R.B., Prevention of aflatoxicosis in farm animals via selective chemisorption of aflatoxin. In: **Mycotoxins, Cancer and Health**, (Bray, G.A., and D.H. Ryan, eds.), Louisiana State University Press, Baton Rouge p. 223-237. 1991.
- PIOTROWSKA, M.; SLI 'ZEWSKA, K.; BIERNASIAK, J., Soybean pest resistance; **Elshemy**, H.A., Ed.; In Tech: Rijeka, Croatia, 2013.
- PINOTTI, L.; OTTOBONI, M.; GIROMINI, C.; DELL'ORTO, V.; CHELI, F. Mycotoxin Contamination in the EU Feed Supply Chain: A Focus on Cereal Byproducts. **Toxins**, v.8, p.45, 2016.

PIVA, G.; BELLADONA, S.; FUSCONI, G., Effects of yeast on dairy cow performance, ruminal fermentation, blood components, and milk manufacturing properties. **Journal of Dairy Science**, v.76, p.2717-2722, 1993.

POZZI, C.R.; ARCARO, J.R.P.; JÚNIOR, I.A.; FAGUNDES, H.; CORRÊA, B. Aspectos relacionados à ocorrência e mecanismo de ação de fumonisinas. **Ciência Rural**, v.32(5), p.901-907, 2002.

RADOSTITS, O. M.; BLOOD D.C.; GAY, C.C., Clínica Veterinária. Um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e equinos. 9. Ed, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1737 p., 2002.

RAINARD, P.; RIOLLET, C. Innate immunity of the bovine mammary gland **Vet. Res.**, v.37, p. 369-400, 2006.

RAMOS, A. J.; HERNÁNDEZ, E.; PLÁ-DELFINA, M.; MERINO, M., Intestinal absorption of zearalenone and *in vitro* study of non-nutritive sorbent materials. **Int. J. Pharm**. v.137, p.128-129, 1996.

RICHARD, J.L.; MEERDINK, G.; MARAGOS, C.M.; TUMBLESON, M.; BORDSON, G.; RICE, L.G.; ROSS, P.F. Absence of detectable fumonisins in the milk of cows fed Fusarium proliferatum (Matsushima) Nirenberg culture material. **Mycopathologia**, v.133, p.123–126, 1996.

RIET-CORREA, F.; RIVERO, R.; ODRIOZOLA, E.; ADRIEN MDE, L.; MEDEIROS, R.M.;, SCHILD, A.L. Mycotoxicoses of ruminants and horses. **Journal of Veterinary Diagnostic Investighation**, v.25(6), p.692-708, 2013.

RODRIGUES, I.; A review on the effects of mycotoxins in dairy ruminants. **Animal Production Science**, Singapura, 2014.

RODRÍGUEZ-CARRASCO, Y.; RUIZ, M.J.; FONT, G.; BERRADA, H. Exposure estimates to *Fusarium* mycotoxins through cereals intake. **Chemosphere**, v.93, p. 2297–2303, 2013.

SABATER-VILAR, M.; MALEKINEJAD, H.; SELMAN, M. H. J.; VAN DER DOELEN, M.A.M, *In vitro* assessment of adsorbents aiming to prevent deoxynivalenol and zearalenone mycotoxicoses. **Mycopathologia**, v. 163, n. 2, p. 81, 2007.

SANTOS, J. A. Importância da CCS para produtores e laticínios. **Revista leite e derivados**, 05 de novembro de 2003.

SANTURIO, J. M., Antifúngicos e adsorventes de aflatoxinas em grãos: quando usá-los? In: **Simpósio internacional sobre micotoxinas e micotoxicoses em aves**. Campinas. Anais. Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria, p. 97-108, 1995.

SANTURIO, J. M., Micotoxinas e micotoxicoses nos Suínos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.35, p. 51-58, 2007.

SCHUH, M., Clinical and Subclinical Events Related to the Presence of Mycotoxins in Cattle Feed. **Israel Journal of Veterinary Medicine**, v.52, p. 93-97, 1997.

- SCHNEIDER, A. F., Interações de adsorvente de micotoxinas com minerais em dietas de frangos de corte. Tese de doutorado, **Programa de Pós-graduação da Universidade do Estado de Santa Catarina UDESC**, 2017.
- SEELING, K.; DANICKE, S.; VALENTA, H.; VAN EGMOND, H.P.; SCHOTHORST, R.C.; JEKEL, A.A.; LEBZIEN, P.; SCHOLLENBERGER, M.; RAZZAZI-FAZELI, E.; FLACHOWSKY, G., Effects of Fusarium Toxin-Contaminated Wheat and Feed Intake Level on the Biotransformation and Carry-over of Deoxynivalenol in Dairy Cows. **Food Additives and Contaminants**, v.23, p.1008–1020, 2006.
- SHASE, L.; STONE, W. Feeding wheat containing vomitoxin to dairy and beef cattle. **Dairy Nutrition Fact Sheet**, v.27, n.1, p.1-5, 2003.
- 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, p.35–44, 2013.
- SORDILLO, L. M.; STREICHER, K. L., Mammary gland immunity and mastitis susceptibility. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, v. 7, p.135–146, 2002.
- SORDILLO, L., Nutritional strategies to optimize dairy cattle immunity. **Journal of Dairy Science**, v.99, p.4967-4982, 2015.
- SLEPCHENKO, G. B.; GINDULLINA, T. M.; GAVRILOVA, M. A.; AUELBEKOVA, A. Z. The Simultaneous Voltammetric Determination of Aflatoxins C1 and N1 on a Glassy-Carbon Electrode. **Journal of Analytical Methods in Chemistry**, ID6285623, p.1- 6, 2018.
- SULZBERGER, S.A.; MELNICHENKO, S.; CARDOSO, F.C. Effects of Clay after an Aflatoxin Challenge on Aflatoxin Clearance, Milk Production, and Metabolism of Holstein Cows. **Journal of Dairy Science**, v.100, p.1856–1869, 2017.
- STREIT, E.; SCHATZMAYR, G.; TASSIS, P.; TZIKA, E.; MARIN, D.; TARANU, I.; TABUC, C.; NICOLAU, A.; APRODU, I.; PUEL, O., Current Situation of Mycotoxin Contamination and Co-occurrence in Animal Feed Focus on Europe. **Toxins**, v.4, p. 788–809, 2012.
- THRALL M.A.; WEISER, G.; ALLISON, R.W.; CAMPBEL, T.W., **Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária**, 2ª ed., Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, p. 349 a 360, 2015.
- TOLEDO, E. A., Quantificação de micotoxinas e análise bromatológica de silagens de milho na microrregião geográfica Apucarana, no norte do Paraná. Dissertação de Mestrado, **Programa de pós-graduação UNOPAR**, 73p., 2018.
- UPADHAYA, S. D.; PARK, M. A.; HA, J. K. Mycotoxins and their biotransformation in the rumen: a review. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, Suweon, v. 23, n. 9, p. 1250-1260, 2010.

UMAR, S.; MUNIR, M.T.; SHAH, M.A.A.; SHAHZAD, M.; KHAN, R.A.; KHAN, A.U.; AMEEN, K.; RAFIA-MUNIR, A.; SALEEM, F. Outbreak of Aflatoxicosis on a Local Cattle Farm in Pakistan. **Veterinaria**, v. 3, p.13–17, 2015.

VALGAEREN, B.; THERON, L.; CROUBELS, S.; DEVREESE, M.; DE BAERE, S.; VAN PAMEL, E.; DAESELEIRE, E.; DE BOEVRE, M.; DE SAEGER, S.; VIDAL, A., The Role of Roughage Provision on the Absorption and Disposition of the Mycotoxin Deoxynivalenol and Its Acetylated Derivatives in Calves: From Field Observations to Toxicokinetics. **Archive Toxicology**, v.93, p.293–310, 2019.

VAN KESSEL, T.F.M.; HIANG-CHEK, N. Aflatoxin binders – how to get the best value for money. **International Poultry Production**, Driffield, v.12, n.4, p.33-35. 2001.

VAN HALDEREN, A.; GREEN, J.R.; MARASAS, W.F.; THIEL, P.G.; STOCKENSTROM, S. A Field Outbreak of Chronic Aflatoxicosis in Dairy Calves in the Western Cape Province. **Journal South African of Vetereinary Association**, v.60, p.210–211, 1989.

VILA-DONAT, P.; MARÍN, S.; SANCHIS, V.; RAMOS, A., A review of the mycotoxin adsorbing agents, with an emphasis on their multi-binding capacity, for animal feed decontamination. **Food Chemical Toxicology**, v.114, p.246–259, 2018.

XIONG, L.; WANG, Y. M.; ZHOU, H. L.; LIU, J. X., Effects of dietary adsorbent on milk aflatoxin M1 content and the health of lactating dairy cows exposed to long-term aflatoxin B1 challenge, **Journal of Dairy Science**. v.101, p.8944–8953, 2018.

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

WHITLOW, L.; HAGLER, W. Mold and Mycotoxin Issues in Dairy Cattle: Effects, Prevention and Treatment. **Advanced. Dairy Science and Technology**, v.20, p.195–209, 2008.

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

YIANNIKOURIS, A.; FRANÇOIS, J.; POUGHON, L.; DUSSAP, C.G.; BERTIN, G.; JEMINET, G.; JOUANY, J. P., Adsorption of zearalenone by β-D-glucans in the *S. cerevisiae* cell wall. **J. Food Prot**. V.67(6), p.1195-1200, 2004.

ZANELA, M. B.; FISHER, V.; RIBEIRO, M. E. R.; STUMPF, J. W.; ZANELA, C.; MARQUES, L. T.; MARTINS, P. R. G., Qualidade do leite em sistemas de produção na região Sul do Rio Grande do Sul. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. Brasília, v.41, n.1, p.153-159, 2006.

ZOCCAL, R., Conjuntura do Mercado Lácteo. Centro de Inteligência do Leite. Juiz de Fora: **Embrapa Gado de Leite**, 2012. Disponível em: http://www.cileite.com.br/content/conjuntura-do-mercado-lácteo. Acesso em: 19 jun. 2020.

Effect of bentonite on health and dairy production of cows submitted to the diet naturally contaminated by mycotoxins

Efeito da bentonita na saúde e produção leiteira de vacas submetidas à dieta naturalmente contaminada por micotoxinas

Mirodion Santos Oliveira¹, Dalvane Di Domenico¹, Gabriela Thomaz¹, Gabriela Garbossa¹, Carolina Depaoli¹, Ana Carolina Abreu¹, Heloísa Godoi Bertagnon²

Highligths

Brazilian climate predisposes the contamination of the bovine diet by mycotoxins. Bentonites improved innate immunity of cattle fed a diet containing naturally produced mycotoxins. Bentonites increased milk production of cattle fed diets containing ZEA, FB and DON.

Abstract

Mycotoxins often contaminate cattle food, which can cause liver damage, immunosuppression and reduced production. Although there are studies showing the benefits of adsorbents in farm animals, here is limited knowledge about its action, especially when intoxication occurs due to naturally contaminated diets. The present study aimed to assess whether the daily oral administration of mycotoxin adsorbent, bentonite clay based on aluminosilicate for 56 days would attenuate these changes in 18 dairy cows, multiparous in the middle of the lactation stage, consuming a diet containing fumonisin B1 and B2, zearalenone and desoxynivalenol. The animals were divided into treatment (TG, n=9) and control (CG, n=9) groups, and subjected to liver functions, hematological assessments, oxidative leucocytes metabolism by the tetrazolium nitroazul (NBT) technique and physical chemical analysis of milk, every week for two months, totaling eight analyzes. It was observed that the use of the adsorbent promoted a reduction in the milk excretion of aflatoxin M1 (AFM1), an increase in serum protein (p=0.03) and albumin (p=0.0001), an increase in leukocyte oxidative metabolism from the day 24 (p=0.05), and increased milk production from the 16th day of treatment (p=0.08). There was no improvement in the physical-chemical indexes of the animals' milk. It is concluded that the use of aluminosilicate-based adsorbent was able to attenuate the effects of mycotoxins on the function of leukocytes and to increase milk production.

Keys words: Adsorbent. Aflatoxin. Cattle. Immunity. Milk.

Resumo

Micotoxinas podem contaminar alimentos de bovinos, levando a distúrbios hepáticos, imunodepressão e redução da produção. Embora existam estudos mostrando os benefícios de adsorventes em animais de produção, há limitado conhecimento sobre sua ação quando a intoxicação de bovinos ocorre por dietas naturalmente contaminadas. O presente estudo objetivou avaliar se a administração oral diária do adsorvente de micotoxinas, argila bentonita a base de aluminossilicato durante 56 dias atenuaria alterações promovidas pelas micotoxinas em 18 vacas leiteiras, multíparas no meio do estágio da lactação, consumindo dieta contendo fumonisina B1 e B2, zearalenona (ZEA) e desoxinivalenol (DON). Os animais foram divididos, grupos

tratamento (GT, n=9) e controle (GC, n=9), e submetidos às avaliações de enzimas e função hepática, hematológicas, metabolismo oxidativo de leucócitos pela técnica do nitroazul de tetrazolium (NBT) e análise físico química do leite, a cada semana, durante dois meses, totalizando oito análises. Observou-se que o uso do adsorvente promoveu redução da excreção láctea de aflatoxina M1 (AFM₁), aumento de proteína (p = 0,03) e albumina séricas (p=0,0001), e aumento do metabolismo oxidativo leucocitário a partir do dia 24 (p = 0,05). Houve também elevação da produção leiteira a partir do 16° dia de tratamento (p=0,008). Não foi observado melhora nos índices físico-químicos do leite dos animais e houve pouca influência na atividade das enzimas hepáticas. Conclui-se que o uso do adsorvente a base de aluminossilicato foi capaz de atenuar os efeitos das micotoxinas na função de leucócitos e de elevar a produção leiteira.

Palavras-chave: Adsorvente. Aflatoxinas. Bovinos. Imunidade. Leite.

Introdução

Um dos fatores impactantes na produção leiteira é a presença de micotoxinas, contaminação que gera grande preocupação relacionada à saúde pública e animal (DAWSON, EVANS & KUDUPOJ, 2006). Elas são produzidas por fungos e leveduras; microrganismos normalmente encontrados em produtos destinados a alimentação animal e humana (BENNETT & KLICH, 2003). Em bovinos, a micotoxina mais estudada é a aflatoxina (AF), a única que produz metabólitos ativos termoestáveis excretado pelo leite com poder carcinogênico (MURPHY, HENDRICH, LANDGREN & BRYANT, 2006; KUTZ et al., 2009). No entanto outras micotoxinas como fumonisina (FB), zearalenona (ZEA) e desoxinivalenol (DON) também já foram relatas como causadoras de lesões hepáticas, efeitos imunossupressores e responsáveis pela menor produtividade de bovinos (OSWALD et al., 2005).

No Brasil, a contaminação de substratos por fungos produtores de micotoxinas é comum, especialmente devido as condições climáticas, resultando na contaminação por ZEA e FB no grão de milho, e por AF, ZEA, FB e DON em silagem de milho entre 2018 e 2020 (DADALT & PRIMIERI, 2020; TISKA et al., 2021). Desta maneira, o impacto das micotoxinas na saúde humana e animal, motiva o desenvolvimento de adsorventes, produtos capazes de neutralizar essas toxinas que transitam pelo trato gastrintestinal (DAWSON et al. 2006). Como não existe um adsorvente ideal para todas as micotoxinas, a maioria dos trabalhos foca nos efeitos dos adsorventes inorgânicos isolados ou em associação com os orgânicos com o intuito de verificar melhorias na função hepática e produção de leite de bovinos intoxicados experimentalmente com micotoxinas. (KUTZ et al., 2009; KIYOTHONG, ROWLINSON, WANAPAT & KHAMPA, 2012; JOVAISIENE, BAKUTIS, BALIUKONIENE & GERULIS, 2016).

Nestes estudos, os animais são intoxicados com doses altas de apenas uma micotoxina, o que pode não refletir uma intoxicação natural, em que há diversas micotoxinas em baixas doses agindo de modo sinérgico (CUSTODIO et al., 2019). Além disso poucos estudos analisam os efeitos de adsorventes de micotoxinas na função imune inata dos bovinos (MIGLIORATI, ABENI, CATTANEO, TORNIELLI & PIRLO, 2007; JOVAISIENE et al., 2016; XIONG, WANG, ZHOU & LIU, 2018).

Dentre os adsorventes inorgânicos, as bentonitas, minérios argilosos da família das esmectitas, são adsorventes largamente empregadas devido ao seu custo financeiro acessível e sua eficácia na adsorção à micotoxinas, tendo bom efeito g, principalmente em relação às AF (SCHNEIDER, MAYER, VOLPATO & GEWEHR, 2019) e questionável em relação a ZEA e a DON (SABATER-VILAR, MALEKINEJAD, SELMAN & VAN DER DOELEN, 2007).

Em razão dessa vantagem econômica, o presente trabalho buscou verificar se a utilização do adsorvente inorgânico bentonita a base de aluminossilicato na alimentação dos animais é capaz de melhorar a saúde hepática, o metabolismo oxidativo leucocitário e a qualidade e quantidade da produção leiteira de vacas leiteiras alimentadas com dieta naturalmente contaminada por micotoxinas.

Material e métodos

O experimento foi aprovado pelo comitê de ética e experimentação animal da UNICENTRO (005/2020), para utilização dos animais. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, realizado em modelo de estudo cego nas avaliações em relação ao tratamento, durante dois meses.

Utilizou-se neste experimento, 18 vacas e novilhas leiteiras (raça Holandesa) sadias, no meio do estágio da lactação, com média produtiva diária de 29 litros de leite, oriundos de duas ordenhas mecânicas. As vacas eram procedentes de propriedade leiteira, localizada no distrito do Jordão em Guarapuava – PR, contendo 60 animais em lactação, confinadas em sistema do tipo *g Barn*. Estas eram alimentadas três vezes ao dia com 14,8 kg ração total composta por 60% silagem de milho, 23% de concentrado comercial (Leite Max Avant® 20T GP, Cooperativa AGRÁRIA), 2% de farelo de soja, 14% de pré-secado de aveia e 1% de núcleo mineral. O alimento estava armazenado na propriedade e era pertencente ao mesmo lote durante rodo o experimento. O arraçoamento era realizado em sala de trato localizado ao lado do galpão de descanso dos animais em sistema de canzil aberto.

Estes animais foram divididos em dois grupos homogêneos, considerando volume leiteiro e contagem de células somáticas (CCS); sendo grupo controle (GC/n=9) dieta sem adsorvente de micotoxinas e grupo tratamento (GT/n=9) dieta acrescida de adsorvente. Cada grupo possuía quatro vacas multíparas, com produção média de 24L dia⁻¹, sendo uma destas vacas com alta CCS (acima de 500 mil g mL⁻¹) e 5 vacas com produção média acima de 30 L dia⁻¹, com baixa CCS.

O GT, recebeu 30g animal⁻¹ ao dia do produto a base de argila bentonita- (aluminiosilicato- 900g Kg⁻¹ - Biobond RM, Pegmatech®, São Paulo, SP. Brasil) durante 56 dias, diretamente adicionado no cocho sobre a ração total juntamente com uma pequena porção de concentrado (aproximadamente 50 gramas), no período da manhã, garantindo que as vacas ingerissem o produto, momento em que o canzil era fechado. Posteriormente o canzil era aberto e o resto da ração total era administrada. Os animais do GC receberam manejo similar do GT, todavia sem o aditivo na alimentação ou alguma substância placebo.

Em intervalos semanais, durante dois meses nos dias: D0, D8, D16, D24, D32, D40, D48 e D56, os animais foram submetidos às colheitas de sangue e de leite. As amostras de sangue foram colhidas por venopunção mamária epigástrica superficial, e acondicionadas em tubos plásticos a vácuo contendo heparina,

EDTA e sem anticoagulante para avaliação do metabolismo oxidativo de leucócitos, realização do hemograma e análise de lesão e função hepática, respectivamente.

Para a avaliação da função hepática, o soro foi extraído do sangue total após centrifugação a 3000/rpm por 15 minutos em temperatura ambiente. Posteriormente mensurou-se proteína sérica total, albumina, e atividade das enzimas: aspartato aminotransferase (AST), gama glutamil transferase (GGT) e lactato desidrogenase (LDH) por meio de exames bioquímicos utilizando a metodologia de reação cinética e colorimétrica continuada decrescente, em aparelho semiautomático Bioplus®, utilizando kits comerciais (proteínas totais, albumina, AST/GOT Liquiform, GAMA GT Liquiform e LDH Liquiform, Labtest® Diagnóstica S.A., Lagoa Santa, MG, Brasil).

O metabolismo oxidativo foi verificado pela técnica colorimétrica da redução do nitroazul de tetrazólio (NBT), de acordo com Choi, Kim, Cha e Kim (2006), adaptado por Flores et al. (2019). Para tanto, o sangue foi mantido em refrigeração até seu processamento em no máximo 3 horas após a colheita. De maneira resumida, 100μL do sangue total foi incubado com partes iguais com solução de NBT (Sigma®, São Paulo, Brasil) a 1% e 5 μL de 12-miristato-13-acetato de forbo (PMA a 300 ng mL¹, Sigma®, São Paulo, Brasil) por 30 minutos a 37°C. Após a incubação, a reação foi interrompida pela adição de 2000μL de EDTA (3mM) gelado, e as hemácias foram rompidas por duas lises osmótica. Então o NBT externo foi removido por lavagem e centrifugação (1200 rpm x 8 min a 4°.C), sendo o sobrenadante descartado, e o pellet de leucócitos foi fixado por metanol (1 mL Synth®, São Paulo, Brasil). As células foram então dissolvidas com KOH (Synth® São Paulo, Brasil) (3M, 120μL) e DMSO (Dimesol® - MarcoLab, São Paulo, Brasil), (99%, 140μL), sendo a suspensão lida em espectrofotometria 630nm (Thermo Plate®, São Paulo, Brasil) em duplicata, com confiança de intravariabilidade menor que 0,05%.

O hemograma foi realizado em contador automático de hematologia (SDH3 VET, Labtest® São Paulo, Brasil) e a contagem diferencial de leucócitos foi feita por meio de esfregaços sanguíneos, levando em conta as características morfológicas e métricas em microscopia óptica.

A coleta de leite foi realizada diretamente na linha de ordenha (sistema fechado), em tubos contendo bronopol. Para cada animal coletou-se uma amostra individual de leite dos quatro tetos em cada momento, e enviou para a dosagem da lactose, gordura, proteína, extrato seco desengordurado (ESD) e CCS no laboratório da Associação Paranaense de Criadores de Bovinos da Raça Holandesa (APCBRH PARLPR, Curitiba, Brasil).

Nos momentos D0, D24 e D56, coletou-se cerca de 55 mL de leite de cada animal de cada grupo para compor o pool de leite de cada grupo, para mensurar aflatoxina no leite. Para tanto, amostras de 500 ml de leite de cada grupo, foram congeladas a -8°C até o processamento.

As amostras das silagens de milho, pré-secado de aveia, farelo de soja, do concentrado foram colhidas em sacos plásticos em três pontos distintos, de maneira que a coleta totalizasse 500 gramas no mínimo, em dois momentos distintos, no início e no meio do experimento. Então os alimentos e o *pool* de leite de cada grupo foram encaminhados em gelo ao laboratório Lamic SAMITEC (Santa Maria, RS, Brasil) para detecção e quantificação das micotoxinas. No leite mensurou-se a AFM, limite de quantificação 0,0025 µg L⁻¹ e nos alimentos mensurou-se AF, fumonisinas (FB), desoxinivalenol (DON) e zearalenona (ZEA) por cromatografia líquida-espectrometria de massas sequencial (LC-MS/MS), com os seguintes limites de detecção (LOD) e de

quantificação (LOQ) 1,4 e 5,0; 200 e 500; 100 e 500 e 10 e 25 µg Kg⁻¹, para AF, FB, DON e ZEA, respectivamente. Os resultados do alimento foram expressos em média dos momentos experimentais.

Análise estatística. Os dados foram analisados utilizando o *software* estatístico *Instat Graphpad*. Esses foram submetidos à análise estatística e representados como média \pm erro padrão. Para a avaliação da interação tempo, as médias dos resultados obtidos foram analisadas pelo teste de análise de variância ANOVA *One-way* (*Unstacked*) paramétrico para amostras repetidas, seguidas pelo teste de *Tukey*. Quanto à interação do tratamento, as médias dos resultados foram analisadas pelo teste T paramétrico para amostras não pareadas. A variável CCS teve distribuição não normal e por isso foi transformada em *log* 10 e analisada pelos testes paramétricos descritos acima. Para cada análise, considerou-se significância estatística de 5% ($p \le 0,05$) (SAMPAIO, 2002).

Resultados e discussão

Nossos resultados mostram que os bovinos foram alimentados com dieta contendo as micotoxinas FB, ZEA, DON e AF naturalmente produzida, e que o uso de bentonita diariamente foi capaz de diminuir a excreção láctea de AFM1, e de trazer benefícios a sanidade animal e a produção leiteira, conforme a discussão a seguir.

Na tabela 1 há os resultados referentes às análises dos alimentos e das micotoxinas encontradas. Observou-se que a ração total utilizada apresentava contaminação com várias micotoxinas sendo considerada desafiadora com base nos limites recomendados pelo Centro de Pesquisas em Forragicultura da UFPR, que preconiza como ideal, índices na dieta inferiores de 1.000 ppb para FB, 930 ppb para DON e 285 ppb para ZEA, para silagem de milho. E apesar de apenas a ZEA estar acima dos limites preconizados, a FB a estavam muito próximas ao limite recomendado. Além disso os limites preconizados como ideais são apenas para a silagem de milho e não dieta total. Cabe ainda ressaltar, que as micotoxinas podem agir de forma sinérgica podendo potencializar o efeito tóxico desta dieta (CUSTÓDIO et al., 2019, DADALT & PRIMIERI, 2021).

A AF não foi detectada no alimento ou ração total, porém houve excreção do seu metabólito, AFM1, no *pool* do leite das vacas (Tabela 2). Como a AFM1 deriva diretamente da hidrólise da AFB1 pelo fígado, e assim é liberada pelo leite, conclui-se que o alimento possuía AFB1 (CANO-SANCHO, MARIN, RAMOS, PERIS-VICENTE & SANCHIS, 2010). Tal situação já foi relatada por Pereira et al. (2005), quando em seu experimento, nenhuma das 33 amostras de alimento animal analisadas apontou AF, no entanto houve detecção no leite. Estudos indicam que a taxa de passagem de AFB1 para AFM1 é de 0,3 a 6,2%, e que seus teores não são afetados pela pasteurização ou esterilização (PRANDINI et al., 2009). Por se tratar de *pool* de leite, não foi feita análise estatística desta variável, mas numericamente foi possível evidenciar que a bentonita reduziu sua excreção.

O maior índice de AFM₁ encontrado no leite do presente estudo foi de 0,009 ug/kg, o que pode representar até 6,2% do total de AFB₁ ingerida, diante disso haveria em torno de 0,15 ug/kg AFB₁ consumidos, ou seja, o valor de AFB₁ presente no alimento está bem abaixo do limite de detecção do método utilizado, que foi de 1,4 ug/kg.

Esta é a única micotoxina mensurada no leite dos animais, portanto sua diminuição neste produto dos indivíduos do GT indica que o adsorvente foi capaz de sequestrar pelo menos esta toxina oriunda da dieta,

mostrando sua eficácia. O mecanismo de ação dos adsorventes inorgânicos consiste no fato das toxinas se unirem a estes produtos por meio de cargas elétricas, impedindo que as micotoxinas sejam absorvidas pelos animais, e consequentemente são eliminadas pelas fezes (FRANCISCATO et al., 2006). Em testes *in vivo*, a AF é adsorvida com sucesso por produtos orgânicos e inorgânicos contudo quanto ao DON e a FB, estas são de mais difícil adsorção, por sofrerem altamente com influências de fatores tais como pH do meio e presença de demais micotoxinas num mesmo alimento (SABATER-VILAR et al., 2007).

Na tabela 3 encontram-se os valores médios das atividades das enzimas hepáticas (AST, GGT e LDH) séricas. As atividades enzimáticas sofreram influência pontualmente apenas no D32 para o GT. Enquanto a atividade enzimática de AST aumentou apenas na interação tempo (p=0,04), as atividades de GGT (p=0,001) e LDH (p=0,04) diminuíram na interação tempo e na interação tratamento (GGT=0,01; LDH=0,05). Não houve interação tempo para estas atividades no GC.

Em relação à atividade enzimática da AST notou-se que a maioria dos valores mensurados estavam dentro dos valores de referência para a espécie, inclusive para o GT, no qual verificou-se aumento pontual desta enzima em D32 (KANEKO, HARVEY & BRUSS, 2008). Como esta enzima está localizada no citosol dos hepatócitos, pode-se afirmar que a maioria dos animais não apresentava lesões que causaram ruptura dos hepatócitos, tais como degeneração ou necrose, demonstrando que embora a dieta tenha sido desafiadora, não foi capaz de causar lesões hepáticas tal qual observadas por D'Angelo et al. (2017), em bovinos intoxicados acidentalmente com altas doses de AF, acima de 1.250 ppb de AFB1 por dia. Ademais, não haviam qualquer tipo de queixa clínica em relação aos animais utilizados no experimento.

A atividade enzimática de GGT estava dentro dos valores de referência para a maioria dos animais em ambos os grupos (THRALL, 2007). Alguns animais, tanto do GC quanto do GT, apresentaram aumento da atividade de GGT, sendo acima da referência para a espécie nos primeiros momentos, mas posteriormente estes teores se normalizaram. Esta enzima é sintetizada em diversos tecidos corporais, no entanto a maior parte desta enzima sérica é oriunda do fígado, e seu aumento em alguns animais poderia indicar colestase, lipidose hepática e fasciolose (THRALL, 2007). Sua diminuição não perpetuou ao longo do tempo e sua análise individual não permite uma conclusão.

Similarmente, Custodio et al. (2017) notaram que bovinos alimentados com dietas contendo baixa taxa de micotoxinas, como 69,5µg Kg⁻¹ de DON e 0,7 µg Kg⁻¹ de AF, também apresentaram atividade das enzimas AST e GGT dentro dos valores de referência para a espécie, o que poderia indicar ausência de lesão hepática, mas não inocuidade da dieta.

Em se tratando da enzima lactato desidrogenase (LDH), sua atividade estava acima dos valores de referência para a espécie em todos os momentos e em todos os grupos (KANEKO et al. 2008). Esta enzima é produzida em diversos tecidos corporais como músculo cardíaco, esquelético e fígado, sendo altamente inespecífica, porém o aumento da sua atividade é indicativo de insuficiência hepática aguda em equinos (GARCIA et al., 1999). Num estudo conduzido por Guo et al. (2019), foi notado o aumento significativo de LDH em vacas intoxicadas com AF com níveis acima de 63µg/Kg de, e que leveduras foram capazes de diminuir significativamente seus teores. Desta maneira, acredita-se que a diminuição das atividades

enzimáticas da GGT e LDH no GT no D32, indica que o adsorvente promoveu algum efeito hepático, mesmo que pontual.

Em relação à função hepática, os dados podem ser observados na Tabela 4. Observou-se um aumento pontual dos teores de proteína sérica em ambos os grupos no D8 em relação ao D0 e D24 ($p \le 0.05$) na interação tempo. Em relação à interação tratamento, notou-se aumento dos teores de proteína sérica a partir do D24 no GT em comparação ao GC ($p \le 0.05$), e aumento da albumina sérica a partir do D32 para o GT na interação tempo ($p \le 0.05$) e a partir de D40 na interação tratamento ($p \le 0.05$).

Embora os valores de referência para estas variáveis em bovinos tenham uma variação na literatura (LOPES, BIONDO & DOS SANTOS, 2007; KANEKO et al., 2008), a maioria dos animais de ambos os grupos apresentava baixos teores de proteína e albumina séricas nos primeiros momentos. Enquanto os teores de proteína sérica atingiram os parâmetros de referência em ambos os grupos, e ficaram acima dos valores de referência para o GT em D16, D40 e D56, os teores de albumina sérica permaneceram abaixo dos valores de referência para a maioria dos animais em todos os tempos do GC. Em GT, estes teores atingiram os valores de referência a partir de D24, e ficaram acima apenas em D48.

Proteínas séricas e albuminas, são sintetizadas pelo fígado a partir de substratos absorvidos da dieta, assim situações de baixa proteína dietética, falha na ingestão, absorção, ou perda proteica por alterações gastrointestinais, desidratações, alterações urinárias, perdas sanguíneas ou ainda disfunções de sua síntese por alterações hepáticas poderiam ser a causa da hipoproteinemia e hipoalbuminemia relatada (LOPES et al., 2007). O fígado é o principal órgão-alvo das micotoxinas, e a intoxicação crônica induz lesões que são caracterizadas por proliferação e fibrose dos ductos biliares acompanhada por megalocitose de hepatócitos (KELLERMAN, COETZER, NAUDÉ & BOTHA, 2005).

Como não houve mudança dietética, nem foram observadas diarreias, ou hiporexias, acredita-se que estas alterações podem estar correlacionadas a disfunções hepáticas.

Sabe-se que hipoalbuminemia e hipoproteinemia por disfunção hepática só ocorrem quando 70% da função hepática está comprometida (KANEKO et al., 2008). Desta forma, acredita-se a metabolização hepática das micotoxinas pode ter contribuído para que o aproveitamento de nutrientes e a função de anabolismo proteico não ocorresse em sua máxima eficiência. De acordo com GUO et al. (2019), o aumento de LDH associado à diminuição de síntese proteica e albumina sérica seria o suficiente para indicar alteração hepática e assim pode-se supor que os animais já apresentavam algum desafio hepático no início do experimento e o adsorvente foi capaz de atenuar esta lesão.

Como houve aumento da proteína e albumina sérica acima dos valores de referência em alguns momentos para GT, outra hipótese possível é uma desidratação relativa que o adsorvente estaria gerando, em razão do seu poder hidrofílico (VIOTTI, 2006), o que poderia estar carreando mais água para o lúmen intestinal e consequentemente impactando em tais índices, fato verificado também no eritrograma (Figura 1).

Sobre tal análise, o tratamento promoveu aumento estatístico do número de hemácias, hemoglobina e do hematócrito na interação tratamento em comparação ao GC entre D8 a D32 (p<0,05) contudo não houve diferença em relação à interação tempo.

Assim a hipótese de desidratação relativa pode ser reforçada pelos achados do eritrograma, no qual verificou-se aumento do número de hemácias, hemoglobina e do hematócrito entre D8 e D32 para o GT, fato que também ocorre em desidratações (Stockham & Scott, 2011).

No entanto, Nasser et al. (2016) verificaram que micotoxinas, como AF, promovem redução do número de eritrócitos e hematócrito em bezerros, possivelmente devido à supressão da hematopoiese ou ainda por haver diminuição na capacidade de ligação com o ferro. Deste modo permanece a dúvida se os efeitos encontrados no GT em relação a eritropoeise e as proteínas e albuminas séricas seriam em decorrência a desidratação relativa causada pelo adsorvente ou por menor exposição da medula óssea e do fígado as micotoxinas que foram adsorvidas pelo produto.

Quanto aos valores médios dos leucócitos e a razão neutrófilo linfócito (razão N/L) (Figura 2), no GC, um animal apresentou leucocitose por neutrofilia e linfocitose no D32 e um apresentou leucocitose por neutrofilia em D48 e D56, nestes momentos, dois animais apresentavam secreção nasal mucopurulenta, indicando uma infecção bacteriana, provavelmente em trato respiratório anterior, já que não foi encontrada nenhuma outra alteração clínica evidente como apatia, diminuição da produção do leite, hiporexia ou febre, o que poderia indicar um quadro mais grave. No GT, nenhum animal apresentou leucocitose. Em relação aos valores médios, não houve influência do uso do adsorvente na interação tempo ou tratamento para os leucócitos totais e suas populações. O GC apresentou menor relação N/L tanto na interação tempo, como na interação tratamento em D8, e posteriormente o GC apresentou maior proporção de neutrófilos/linfócito tanto na interação tempo, como na interação tratamento em D48 e D56 (p<0,05).

Sobre o leucograma, verificamos que não houve influência do uso do adsorvente na contagem média total de leucócitos e nas suas populações. Porém a menor razão neutrófilo/linfócito em GC no D8 indica redução global do número de neutrófilos em detrimento dos linfócitos caracterizando um desafio viral ou bacteriano, que foi combatido, tendo em vista que nenhum animal demonstrou manifestação clínica de doença neste período. Com o passar do tempo houve inversão desta razão em D48 e D56, momento em que alguns animais do GC também apresentavam leucocitose por neutrofilia e secreção nasal mucopurulenta, indicando que nestes momentos pelos menos dois animais deste grupo estavam doentes.

Observou-se aumento do metabolismo oxidativo leucocitário (Tabela 5) nos animais tratados a partir do D16 em relação aos momentos iniciais para o GT na interação tempo (p=0,004) e tratamento (p≤0,05), com exceção no D40, quando esta função foi igual entre os grupos

Quando analisamos os dados do leucograma junto com o metabolismo oxidativo, pode-se verificar que o adsorvente melhorou a capacidade imunológica dos animais. Enquanto o GC não teve alteração no metabolismo oxidativo leucocitário ao longo do tempo, foi observado aumento desta função a partir do D16 para o GT. O metabolismo oxidativo é a explosão respiratória realizada por fagócitos, como neutrófilos e monócitos. Neste processo, durante a fagocitose são formados compostos oxidantes denominados espécies reativas de oxigênio (ERO) com a função de eliminar patógenos internalizados (TIZARD, 2014). O ensaio colorimétrico de NBT mimetiza uma infecção, onde fagócitos sanguíneos estimulados com PMA, fagocitam o reagente 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 (CHOI et al., 2006).

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, diferentemente do GC (TIZARD, 2014). Como é sabido, as micotoxinas diminuem a imunidade e a resistência a doenças infecciosas (OSWALD et al., 2005) e os adsorventes podem mitigar os impactos de tais toxinas permitindo maior eficiência do sistema imunológico (QUEIROZ, HAN, STAPLES & ADESOGAN, 2011).

Os dados das análises químico-físicas do leite estão na tabela 6. Pode-se notar que os animais do GT aumentaram a produção de leite a partir do D16 em relação aos momentos iniciais (p=0,008), porém não houve interação tratamento. Quanto à gordura, mesmo com o aumento do volume produzido, esta variável se manteve estável, não havendo significância nem no tratamento nem na interação tempo. Similarmente as demais variáveis também não apresentaram diferenças significativas. Em relação aos teores de proteína e lactose não houve influência do tempo ou do tratamento.

Sobre a CCS, verificou-se que houve não houve influência desta variável em relação ao tratamento, contudo, houve diferenças em função do tempo. A CCS aumentou pontualmente em D24 em comparação com D0 e D40 em ambos os grupos ($p \le 0.05$). Até o D8, havia um animal com mastite subclínica em cada grupo (acima de 200 mil células somáticas), com o passar do tempo, o GC deixou de ter mastite subclínica a partir do D16 e o GT a partir do D40, não havendo diferença estatística para incidência de mastite entre os grupos ou entre os tratamentos.

Sobre a produção leiteira, Kiyothong et al. (2012) verificaram que adsorventes de micotoxinas compostos (bentonita, diatomita, levedura inativa e substâncias fitogênicas e ficolíticas) promoveram aumento da produção de leite e da ingestão de alimento de vacas leiteira submetidas a dieta naturalmente contaminada com micotoxinas (DON, FB₁, ZEA e OTA). Tal fato poderia ser a razão do aumento da produção láctea neste experimento, pois, de acordo com os autores mencionados, os animais tratados possivelmente podem ter elevado o consumo alimentar, o que refletiria tanto nos índices produtivos como também numa maior capacidade de produção de proteína e albumina séricas.

Pourmahmoud, Pirmohammadi & Khalilvandi Behroozyar (2019) também verificaram que o complexo adsorvente formado por vários silicatos e extratos das paredes celulares de levedura (*Saccharomyces cerevisae*) promoveu aumento em 18,30% na produção de leite de cabras alimentadas com dietas contendo micotoxinas incluídas na dieta, ficando-se na dúvida se este aumento ocorreu por melhorias do figado, que forneceu mais nutrientes a glândula mamária, ou devido a melhorias na fermentação ruminal, o que também propicia maior fornecimento de nutrientes a glândula mamária .

Independente do mecanismo, o adsorvente promoveu aumento da produção leiteira em 17,12% (6,2 litros de leite a mais por dia) em nosso estudo. Tendo em vista que custo do produto comercial é estimado em R\$ 0,18 por animal por dia, justifica-se o aumento no investimento dentro do sistema produtivo, devido ao maior retorno financeiro para o produtor, ressaltando-se que o suplemento utilizado consistiu de apenas um ingrediente, argila bentonitas, ao contrário da pesquisa conduzida por Pourmahmoud et al. (2019).

Não se observou influência do adsorvente na CCS. Similarmente Xiong et al. (2018), utilizando

adsorvente à base de aluminossilicato em vacas leiteiras submetidos por longos períodos às dietas contaminadas com AFB₁ não encontraram variação na contagem de CCS, em animais com média de 4 mil cél/ mL^{-1} ($\pm 0,089$). Possivelmente isso ocorreu porque os animais em sua maioria já possuem baixa CCS em virtude do manejo, alimentação e sanidades dentro dos padrões desejáveis.

Mesmo com o aumento da produção leiteira no GT, o fato das variáveis físico-químicas do leite não sofrerem alterações, provavelmente se deve pelo motivo de que, na propriedade na qual foi realizado o experimento, tais parâmetros já possuíam níveis desejáveis dentro de um sistema produtivo.

Conclusão

O uso de 30 gramas do adsorvente argila bentonita a base de aluminossilicato melhorou a sanidade de vacas leiteiras alimentadas com dieta contendo as micotoxinas naturalmente produzidas: ZEA, DON, AF e FB. O aumento da produção leiteira não foi acompanhado por melhorar nos parâmetros de qualidade do leite, contudo seu uso se justifica em virtude do retorno econômico decorrente do incremento imune e do aumento produtivo dos animais.

Agradecimentos

Apoio financeiro Capes 0001.

Referências

- Bennett, J. W., & Klich, M. (2003). Clinical Microbiology Review, Mycotoxins, 16(1): 497–516.
- Cano-Sancho, G., Marin, S., Ramos, A.J., Peris-Vicente, J. & Sanchis, V. (2010). Occurrence of aflatoxin M1 and exposure assessment in Catalonia (Spain). *Revista Iberoamericana de Micología*, 27(1):130-135. doi:10.1016/j.riam.2010.05.003.
- Choi, H.S., Kim, J.W., Cha, Y.N. & Kim, C. (2006). A Quantitative Nitroblue Tetrazolium Assay for Determining Intracellular Superoxide Anion Production in Phagocytic Cells. *Journal of Immunoassay and Immunochemistry*, 27:31-44. doi: 10.1080/15321810500403722
- Custódio, L., Figueira, D.N., Gloria, E.M., Holder, V.B., Yiannikouris, A., Pettigrew, J.E., Kuritza, L.N., Resende, F.D. & Siqueira, G. R. (2017). Survey of mycotoxin contamination in feedlot diets in Brazil. *Journal of Animal Science*, 95:19-19. doi: 10.2527/asasann.2017.038.
- Custódio L., Prados, L.F., Yiannikouris, J., Holder, V.B., Pettigrew, J.E, Kuritza, L.N., Resende, F.D. & Siqueira, G.R. (2019). Mycotoxin contamination of diets for beef cattle finishing in feedlot. Brazilian *Journal of Animal Science*, 48:e20190079. doi: 10.1590/rbz4820190079.
- D'Angelo, A., Bellino, C., Alborali, G.L., Biancardi, A., Borrelli, A., Capucchio, M.T., Catalano, D., Dellaferrera, G., Maurella, C. & Cagnasso, A. (2007). Neurological signs associated with flatoxicosis in Piedmontese calves. *Veterinary Record*, 160: 698-700. doi: 10.1136/vr.160.20.698.

- Dadalt, A.L.L. & Primieri, C. (2021). Níveis de micotoxinas na silagem de milho na região oeste do Paraná, Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária 3(1):30-38. Retrieved from http://www.themaetscientia.fag.edu.br/index.php/ABMVFAG/article/view/1150.
- Dawson, K.A., Evans, J. & Kudupoj E, M.(2006). Understanding the adsorption characteristics of yeast cell wall preparations associated with mycotoxin binding. *Nutritional Biotechnology In The Feed And Food Industries*, 22: 169-181.
- Flores, G.V.B., Thomaz, G.R., Netto, W.H., Rossi, O.S., Strickle, F. & Bertagnon, H.G. (2019). Efeito do Enterococcus faecium e Saccharomyces cerevisiae na resposta imunológica, parâmetros hematológicos e ganho de peso de bezerros alimentados com silagem de milho. *Veterinária e Zootecnia*, 26: 001-011. doi: 10.35172/rvz. 2019.v26.353
- Franciscato, C., Lopes, S.T.A., Santurio, J.M., Wolkmer, P., Maciel, R.M., Paula, M.T., Garmatz, B.C. & Costa, M.M. (2006). Concentrações séricas de minerais e funções hepática e renal de frangos intoxicados com aflatoxina e tratados com montmorilonita sódica. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 41(11) 1573-1577. doi: 10.1590/S0100-204X2006001100001
- Garcia, M., Guzman, I., Cabezas, V., Merino, B.Q., Palma, C. & Perez, R., (1999). Evaluación del entrenamiento tradicional del caballo criollo chileno de rodeo mediante el análisis de variables fisiológicas y bioquímicas sanguíneas. *Archivos de Medicina Veterinaria*, 31(2): 167-176. Doi: 10.4067/S0301-732X1999000200003.
- Guo, X., Wen, F., Qiao, Q., Zheng, N., Saive, M. & Fauconnier, M. L., (2019). A novel graphene oxide-based aptasensor for amplified fluorescent detection of aflatoxin M1 in milk powder. *Sensors*, 19: 38-40.doi: 10.3390/s19183840.
 - Jovaisiene, J., Bakutis, B., Baliukoniene, V. & Gerulis, G., (2016) Fusarium and Aspergillus mycotoxins effects on dairy cow health, performance and the efficacy of Anti-Mycotoxin Additive. *Polish Journal of Veterinary Sciences*. 19: 79-87. doi: 10.1515/pjvs-2016-0011.
 - Kaneko, J.J., Harvey, J. & Bruss, M.L., (2008). *Clinical biochemistry of domestic animals*. San Diego Elsevier.
 - Kellerman T.S., Coetzer J.A.W., Naudé T.W. & Botha C.J. (2005). *Plant Poisonings and Mycotoxicoses of Livestock in Southern Africa*., Cape Town, Oxford University Press.
 - Kiyothong, K., Rowlinson, P., Wanapat, M. & Khampa, S. (2012). Effect of mycotoxin deactivator product supplementation on dairy cows. *Animal Production Science*, 52: 832–841. doi: 10.1071/AN11205.
 - Kutz, R.E., Sampson, J.D., Pompeu, L.B., Ledoux, D.R., Spain, J.N., Vázquez-Añón, M. & Rottinghaus, G.E. (2009). 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*, 92: 59–63. doi: 10.3168/jds.2009-2031.
 - Lopes, S.T.A., Biondo, A.W. & dos Santos, A.P. (2007). *Manual de Patologia Clínica Veterinária*. UFSM, Santa Maria.

- Migliorati, L., Abeni, F., Cattaneo, M. P., Tornielli, C. & Pirlo, G. (2007). Effects of adsorbents in dairy cow diet on milk quality and cheese-making properties. *Italian Journal of Animal Science*, 6(1): 460-462.doi: 10.4081/ijas.2007.1s.460
- Murphy, P.A., Hendrich, S., Landgren, C. & Bryant, C.M. (2006). Food Mycotoxins: An Update. *Journal of Food Science*, 71(5): 51-65. doi: 10.1111/j.1750-3841.2006.00052.x
- Nasser, O., Khan, J.A., Khan, M.S., Omer, M.O., Chishti, G.A., Sohail, M.L. & Saleem, M.U. (2016). Comparative efficacy of silymarin and choline chloride (liver tonics) in preventing the effects of aflatoxin B1 in bovine calves. *Polish Journal Of Veterinary Sciences*, 19(3):545-551. doi: 10.1515/pjvs-2016-0068
- Oswald, I.P., Marin, D.E., Bouhet, S., Pinton, P., Taranu, I. & Accensi, F. (2005). Immunotoxicological risk of mycotoxins for domestic animals. *Food Additives Contaminantes*, 22(4):354-360. doi: 10.1080/02652030500058320
- Pereira, M. M. G., Carvalho, E.P., Prado, G., Rosa C.A.R., Veloso, T., Souza, L.A.F. & Ribeiro J.M.M. (2005). Aflatoxinas em alimentos destinados a bovinos e em amostras de leite da região de Lavras, Minas Gerais —Brasil. *Ciência e Agrotecnologia*, 29(1):106-112. doi: 10.1590/S1413-70542005000100013.
- Pourmahmoud, B., Pirmohammadi, R. & Khalilvandi Behroozyar, H. (2019). Effects of Different Toxin Adsorbents on the Amount of Diazinon Residue in White Grape Pomace and Milk Production and Composition and Toxin Residues in Mohabadi Lactating Goats. *Iranian Journal of Applied Animal Science*, 9(4): 677-685.
- Prandini A., Tansini G., Sigolo S., Filippi L., Laporta M. & Piva G. (2009). On the occurrence of aflatoxin M1 in milk and dairy products. *Food and Chemical Toxicology*, 47:984–991. doi: 10.1016/j.fct.2007.10.005.
- Queiroz, O.C., Han, J.H., Staples, C.R. & Adesogan, A.T. (2012). Effect of adding a mycotoxin-sequestering agent on milk aflatoxin M₁ concentration and the performance and immune response of dairy cattle fed an aflatoxin B₁-contaminated diet. *Journal of Dairy Science*, 95(10):5901-5908. doi: 10.3168/jds.2011-5287.
- Sabater-vilar, M., Malekinejad, H., Selman, M.H.J. & Van der Doelen, M.A.M. (2007) *In vitro* assessment of adsorbents aiming to prevent deoxynivalenol and zearalenone mycotoxicoses. *Mycopathologia*, 163(2): 81. doi: 10.1007/s11046-007-0093-6.
- Sampaio, I. B. M. (2002). Estatística Aplicada à Experimentação Animal. Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, Belo Horizonte, MG, Embrapa gado de leite.
- Schneider, A.F., Mayer, J.K., Volpato, J., & Gewehr, C.E. (2019). Minerais séricos, características morfométricas ósseas e deposição de minerais ósseos de frangos de corte alimentados com dieta com inclusão de bentonita. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 71(2), 594-602. doi: 10.1590/1678-4162-9968.
- Stockham, S.L. & Scott, M.A. (2011). Fundamentos de Patologia Clínica Veterinária. 2.ed. Guanabara Koogan.

- Thrall, M.A., 2007. Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária, São Paulo, SP, Roca.
- Tyska, D., Mallmann, A.O., Vidal, J.K., Almeida, C.A.A., Gressler, L.T. & Mallmann, C.A. (2020). Multivariate method for prediction of fumonisins B₁ and B₂ and zearalenone in Brazilian maize using Near Infrared Spectroscopy (NIR. PLoS ONE 16(1): e0244957. doi:10.1371/journal.pone.0244957
- Tizard, I.R., (2014). Imunidade inata: neutrófilos e fagocitose. In: *Imunologia Veterinária*. (pp.30-40). Rio de Janeiro- RJ, Elsevier.
- Viotti, G.C.A. (2006) Desenvolvimento e Caracterização de Argilas Organofílicas para uso em Alimentação Animal como Adsorvente Inativador de Micotoxinas: Aflatoxina B1 e Fumonisina B1. Tese de doutorado, Programa de Pós-graduação da Universidade Federal de Santa Catarina-UFSC. Disponível em: https://repositorio.ufsc.br/handle/123456789/89509.
- Xiong, L., Wang, Y. M., Zhou, H.L. & Liu, J.X. (2018). Effects of dietary adsorbent on milk aflatoxin M1 content and the health of lactating dairy cows exposed to long-term aflatoxin B1 challenge. *Journal of Dairy Science*. 101:8944–8953. doi: 10.3168/jds.2018-14645.

Anexos

Tabela 1 - Composição química dos alimentos utilizados na alimentação dos animais e quantidade de micotoxinas detectada.

Parâmetro	Silagem de milho	Concentrado	Farelo de soja	Pré-secado de aveia	Mistura
MS %	42	87,5	89	53,7	68,51
MM % MS	3,49	8	6,84	6,5	7,05
PB % MS	7,98	20	49,72	9,2	16,7
EE% MS	3,57	4,8	4,51	5,0	4,7
FDN % MS	35,01		9,28	64,2	-
FDA % MS	21,03	12	7,76	38,9	19,86
NDT % MS	76,39	84	4,45	60,61	67,79
FB1 µg Kg ⁻¹	435,4	400,1	125	ND	683,7
FB2 µg Kg ⁻¹	158,9	125	ND	ND	306,6
ZEA μg Kg ⁻¹	514,9	ND	36,1	ND	503,9
DON µg Kg ⁻¹	260,3	1773,4	ND	ND	724,61
AF μg Kg ⁻¹	ND	ND	ND	ND	ND

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; ppb = partes por bilhão; ND = não detectado.FB- fumonisina, ZEA- zearalenona, AF-aflatoxina

Tabela 2 - Teores de aflatoxina M_1 no *pool* de leite de vacas não tratadas (GC) e tratadas com adsorvente de micotoxinas (GT).

Aflatoxina M ₁ μ g Kg ⁻¹ (ppm)		Momentos	
	D0	D24	D56
GC	0,009	0,009	0,008
GT	0,009	0,004	0,003

ppm = partes por milhão

Tabela 3 – Atividade de enzimas hepáticas séricas (AST, GGT e LDH) de vacas em lactação não tratadas (GC) e tratadas com adsorvente para micotoxinas (GT).

		Momen	tos								
Variá	veis		D 0	D8	D16	D24	D32	D40	D48	D56	$\mathbf{P}^{\mathbf{x}}$
AST U L ⁻¹		Média	96,67a	100,11a	89,22ª	79,67a	100,78a	94,56a	106,11ª	100,33a	0.20
	GC	EPM	9,37	15,12	8,27	10,04	15,86	9,55	20,15	14,17	0,38
		Malia	90,44a		103,11a						
	GT	Média	b	84,44a	b	82,33a	102,22b	97,89a	99,56ª	127,00a	0,04
		EPM	12,75	8,12	9,87	10,55	14,99	12,06	11,28	23,47	
	$\mathbf{P}^{\mathbf{y}}$		0,83	0,24	0,06	0,97	0,24	0,27	0,30	0,11	
	GC	Média	47,11a	41,89a	38,56 ^a	45,22a	33,44a	42,00a	40,33a	45,56a	0,56
GGT	GT	EPM	5,41	5,46	1,94	5,99	3,85	6,49	4,40	6,40	
U L-1		Média	61,44a	28,44ab	41,00a	44,56a	20,00b	46,44a	$48,56^{a}$	40,33a	0,001
UL		EPM	12,09	4,37	4,60	5,66	4,40	4,40	9,61	9,61	
	$\mathbf{P}^{\mathbf{y}}$		0,21	0,09	0,45	0,50	0,01	0,19	0,19	0,21	
	CC	GC Média	3206,0	2536,67	2609,44	2579,8	2668,77	3349,2	2839,11	2855,2	
	GC	Micuia	a	a	a	9a	a	2a	a	2a	
LDII		EPM	230,94	285,34	264,18	206,03	262,51	290,98	303,32	216,77	0,15
LDH U L ⁻¹	СТ	Média	3009,0	2283,00	2266,78	2596,0	1956,22	2812,8	2487,77	2596,0	
	GT	Media	a	ab	ab	0a	b	9a	ab	0a	0,04
		EPM	276,29	329,53	294,35	219,47	230,36	289,89	317,18	352,00	
	$\mathbf{P}^{\mathbf{y}}$		0,83	0,77	0,22	0,40	0,05	0,08	0,42	0,54	

EPM = Erro padrão da média. P^x interação tempo. P^y interação tratamento. GC= grupo controle. GT= grupo tratamento. Letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença estatística na interação tempo. Teste de Tukey (p \leq 0,05). 1- Valores de Referência: AST= 78- 142 U L⁻¹, GGT=6,1-17,4 U L⁻¹, LDH- 692-1445 U L⁻¹ (KANEKO et al., 2008, THRALL, 2007).

Tabela 4 - Proteína e albumina séricas de vacas não tratadas (GC) e tratadas com adsorvente para micotoxinas (GT).

	Momentos										
Variáveis			D 0	D8	D16	D24	D32	D40	D48	D56	P ^x
	GC	Média	6,48a	7,31b	7,22ab	6,04a	6,80ab	6,69ab	7,02ab	7,06ab	0.01
Proteína	GC	EPM	0,38	0,39	0,32	0,22	0,23	0,32	0,35	0,34	0,01
sérica	GT	Média	6,70a	8,13b	7,62ab	7,21a	7,30ab	7,82ab	8,03ab	8,16ab	0,03
$g dL^{-1}$	GI	EPM	0,35	0,42	0,21	0,23	0,26	0,22	0,16	0,32	
	$\mathbf{P}^{\mathbf{Y}}$		0,28	0,15	0,20	0,01	0,03	0,01	0,01	0,02	
	\mathbf{GC}	Média	2,73a	2,78a	2,84a	2,77a	$3,11^{a}$	2,75a	3,15a	2,84a	0,20
		EPM	0,06	0,09	0,10	0,16	0,14	0,20	0,14	0,21	
Albumina	\mathbf{GT}	Média	2,86a	2,78a	2,85a	3,19a	3,42b	3,35b	3,58b	3,53b	0,0001
g dL ⁻¹		EPM	0,09	0,08	0,13	0,17	0,13	0,09	0,12	0,11	
	$\mathbf{p}^{\mathbf{Y}}$										
-	Р		0,20	0,20	0,12	0,21	0,24	0,02	0,05	0,01	

EPM = Erro padrão da média. P^x interação tempo. P^y interação tratamento. GC= grupo controle. GT= grupo tratamento. Letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença estatística na interação tempo, teste de *Tukey* (p \leq 0,05). 1- Valor de Referência: Proteína sérica 6,74-7,46 g dL⁻¹; albumina sérica 3,03-3,55 g dL⁻¹ (KANEKO et al., 2008).

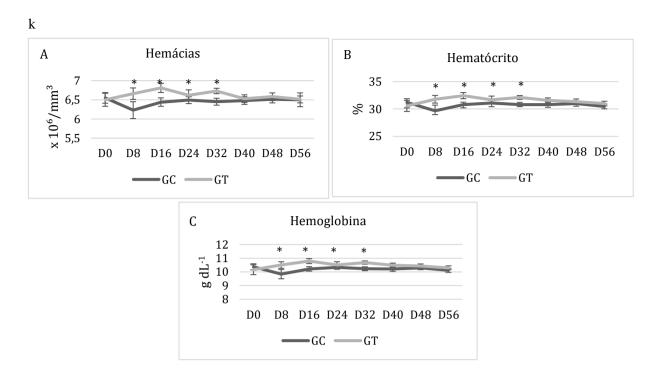


Figura 1 - Representação gráfica das avaliações hematológicas referente às hemácias (A), hematócrito (B) e hemoglobina (C), realizadas em vacas lactantes não tratadas (GC) e tratadas com adsorvente para micotoxinas (GT). * indica diferença estatística na interação tratamento, teste de *Tukey* (p≤0,05).

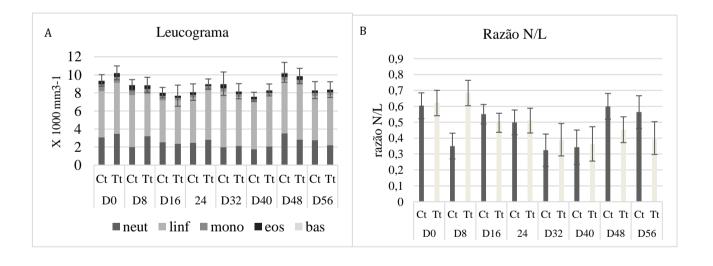


Figura 2- Representação gráfica do leucograma de vacas lactantes não tratadas (GC) e tratadas com adsorvente para micotoxinas (GT). Prancha A- Leucograma. Prancha B- Razão neutrófilo linfócito (razão N/L) Neut. = Neutrófilos; Linf = Linfócitos; Mon = monócitos; Eos = Eosinófilos; Bas = Basófilos. * Diferença estatística para a razão N/L interação tempo (p < 0.05 teste de Tukey ($p \le 0.05$).

Tabela 5 - Metabolismo oxidativo de leucócitos sanguíneos de vacas lactantes não tratadas (GC) e tratadas com complexo de adsorvente para micotoxinas (GT).

MO	DO	D0	D8	D16	D24	D32	D40	D48	D56	P ^x
GC	Média	0,421a	0,411a	0,451a	0,419a	0,379a	0,490a	0,395a	0,504a	0,06
	EPM	0,021	0,018	0,036	0,036	0,03	0,026	0,039	0,028	
GT	Média	0,421a	0,427a	0,555b	0,613b	0,537b	0,550b	0,497b	0,602b	0,004
	EPM	0,021	0,025	0,038	0,062	0,037	0,026	0,032	0,034	
P^{Y}		0,42	0,6	0,05	0,01	0,004	0,52	0,05	0,04	

DO = Densidade óptica. EPM = Erro padrão da média. GC = Grupo controle. GT = grupo tratamento, a ou b Letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença estatística na interação tempo, teste de Tukey (p \leq 0,05).

Tabela 6 - Análise físico-química do leite de vacas lactantes não tratadas (GC) e de vacas tratadas com o complexo de adsorvente para micotoxina (GT).

Dados	do		D 0	D8	D16	D24	D32	D40	D48	D56	$\mathbf{P}^{\mathbf{x}}$
Leite			Du	Do	DIU	D24	D32	D40	D40	DSU	1
	GC	Média	29,88a	29,58a	32,42a	30,78a	29,14a	31,72a	31,78a	32,44a	
	GC	EPM	1,3	0,98	1,24	1,01	1,31	1,33	1,23	1,44	0,07
Produção (Kg dia ⁻¹)	GT	Média	28,86a	31,96a	34,44b	33,14b	33,64b	34,76b	35,40b	35,06b	
(8)	01	EPM	0,7	0,85	1,08	1,27	1,11	1,33	0,94	1,06	0,008
	$\mathbf{P}^{\mathbf{Y}}$		0,68	0,38	0,55	0,38	0,18	0,43	0,26	0,48	0,000
CCS	GC	Média	3,73a	4,04a	3,91a	4,08b	4,07ab	3,92a	3,82ª	4,29b	0,03
Log 10	GC	EPM	0,19	0,22	0,13	0,07	0,16	0,13	0,11	0,11	
$(x10^3 \text{ ml}^{-1})$	GT	Média	3,78a	3,93ab	3,71a	3,97b	3,79a	3,55a	$3,73^{a}$	3,68a	0,01
(X10 IIII ¹)		EPM	0,17	0,16	0,18	0,18	0,22	0,17	0,19	0,19	0,01
	P^{Y}		0,88	0,59	0,43	0,96	0,36	0,63	0,94	0,16	
	GC	Média	4,18a	4,05a	4,17a	4,27a	4,24a	4,05a	$3,95^{a}$	3,83a	0,94
Gordura		EPM	0,15	0,31	0,34	0,22	0,23	0,35	0,24	0,37	
(g 100g ⁻¹)	GT	Média	3,89a	4,08a	3,37a	3,55a	3,50a	3,49a	$3,16^{a}$	3,55a	0,54
(g 100g)		EPM	0,3	0,35	0,34	0,39	0,36	0,43	0,35	0,47	
	$\mathbf{P}^{\mathbf{Y}}$		0,95	0,15	0,36	0,24	0,53	0,16	0,49	0,66	
	GC	Média	3,40a	3,49a	3,48a	3,30a	3,50a	3,32a	$3,52^{a}$	3,66a	0,95
Proteína		EPM	0,199	0,23	0,18	0,20	0,17	0,26	0,22	0,23	
(g 100g ⁻¹)	GT	Média	4,36a	4,61a	4,56a	4,58a	4,56a	4,65a	$4,63^{a}$	4,55a	0,56
(g 100g)		EPM	0,44	0,21	0,24	0,14	0,26	0,23	0,27	0,29	
	$\mathbf{P}^{\mathbf{Y}}$		0,28	0,55	0,35	0,77	0,09	0,36	0,34	0,39	
	GC	Média	4,62a	4,71a	4,71a	4,61a	4,70a	4,72a	4,78a	4,72a	0,41
Lactose		EPM	0,08	0,03	0,05	0,02	0,05	0,05	0,05	0,05	
$(g\ 100g^{-1})$	GT	Média	4,36a	4,61a	4,57a	4,59a	4,57a	4,66a	4,63 ^a	$4,57^{a}$	0,57
		EPM	0,17	0,07	0,08	0,05	0,09	0,08	0,09	0,13	
	$\mathbf{P}^{\mathbf{Y}}$		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. P^x interação tempo. P^y interação tratamento, a ou b Letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença estatística na interação tempo, teste de Tukey (p \le 0,05).