

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta tese/dissertação será disponibilizado somente a partir de
01/09/2027

At the author's request, the full text of this thesis/dissertation will not be available online until
September 1, 2027

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CAMPUS DE BOTUCATU

DETECÇÃO SIMULTÂNEA DE MULTI-MICOTOXINAS EM MATÉRIAS-
PRIMAS UTILIZADAS EM DIETAS PARA ANIMAL

VANESSA RAIKELLY MARQUES JACOB

Tese apresentada ao Programa de Pós-
graduação em Zootecnia como parte
das exigências para obtenção do título
de Doutor em Zootecnia.

BOTUCATU – SP
Sreembro de 2025

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CAMPUS DE BOTUCATU

DETECÇÃO SIMULTÂNEA DE MULTI-MICOTOXINAS EM MATÉRIAS-
PRIMAS UTILIZADAS EM DIETAS PARA ANIMAL

VANESSA RAIKELLY MARQUES JACOB

Orientador: Prof. Dr. Mário De Beni Arrigoni

Co-orientador: Prof^a Cyntia Ludovico Martins

Dra. Laudicéia Alves de Oliveira

Tese apresentada ao Programa de Pós-
graduação em Zootecnia como parte
das exigências para obtenção do título
de Doutor em Zootecnia.

BOTUCATU – SP
Setembro de 2025

J15d

Jacob, Vanessa Raikelly Marques

Detecção simultânea de multi-micotoxinas em matérias-primas utilizadas em dietas para animal. / Vanessa Raikelly Marques Jacob. -- Botucatu, 2025

73 p.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu

Orientador: Mário De Beni Arrigoni

Coorientadora: Cyntia Ludovico Martins

1. Micotoxinas. 2. QuEChERS. 3. LC/MS. I. Título.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Botucatu



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: DETECÇÃO SIMULTÂNEA DE MULTI-MICOTOXINAS EM MATÉRIAS-PRIMAS UTILIZADAS EM DIETAS PARA ANIMAL

AUTORA: VANESSA RAIKELLY MARQUES JACOB

ORIENTADOR: MARIO DE BENI ARRIGONI

COORDINADORA: CYNTHIA LUDOVICO MARTINS

COORDINADORA: LAUDICÉIA ALVES DE OLIVEIRA

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em Zootecnia, área: Nutrição e Produção Animal pela Comissão Examinadora:

Profa. Assistente Dra. CYNTHIA LUDOVICO MARTINS (Participação Presencial)

Departamento de Produção Animal e Medicina Veterinária Preventiva / Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - FMVZ, Unesp - Campus de Botucatu

Prof. Dr. EDIVALDO DOMINGUES VELINI (Participação Presencial)

Departamento de Proteção Vegetal / Faculdade de Ciências Agrônômicas de Botucatu - Unesp

Prof. Dr. MURILLO CEOLA STEFANO PEREIRA (Participação Virtual)

Departamento de Produção Animal - DPA / Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas de Dracena - FCAT - Unesp - Câmpus de Dracena



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Botucatu



Prof.Assoc. LUIZ EDIVALDO PEZZATO (Participação Presencial)
Departamento de Melhoramento e Nutrição Animal / FMVZ, UNESP, Câmpus de Botucatu

Doutor ALEXANDRE PERDIGÃO (Participação Virtual)
Departamento de Inovação e Ciência Aplicada / DSM Produtos Nutricionais

Botucatu, 01 de setembro de 2025

Documento assinado digitalmente
 MARIANNA LAURA ELIS CHOCOBAR
Data: 01/09/2025 16:50:11 -0300
Verifique em <https://validar.jf.gov.br>

BIOGRAFIA DO AUTOR

VANESSA RAIKELLY MARQUES JACOB, nascida em 15 de maio de 1993, na cidade de Itaituba, no estado do Pará, é filha de Rosinete Marques e Maikel Jackson Sena Jacob. No mês de março de 2013, foi admitida no curso de Bacharelado Interdisciplinar em Ciências Agrárias, com ênfase em produção animal, na Universidade Federal do Oeste do Pará (UFOPA), Campus de Santarém, tendo concluído o curso em 18 de janeiro de 2018. No mês de março de 2013, foi admitida no curso de Zootecnia na Universidade Federal do Oeste do Pará (UFOPA), no Campus de Santarém, no Pará, onde foi bolsista de Iniciação Científica, pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), foi bolsista de extensão universitária pelo programa de bolsas da UFOPA e monitora voluntária na disciplina de Bioquímica. Tendo-se graduado em 21 de junho de 2018. No mês de março de 2019, deu-se o início no curso de Mestrado em Zootecnia na Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" - UNESP - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Câmpus de Botucatu-SP. A orientação do estudo na área de produção animal esteve a cargo do Prof. Dr. André Mendes Jorge, contando ainda com a coorientação da Dra. Caroline de Lima Francisco e do Dr. André Michel de Castilhos. No decurso do curso de mestrado, foi bolsista da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), tendo participado no Projeto Temático (processo 2014/05473-7) intitulado "Exigência nutricional, comportamento alimentar, temperamento animal, eficiência alimentar, parâmetros metabólicos, qualidade da carcaça e da carne de bubalinos em condições tropicais", financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP). Obteve o título de mestre em 29 de abril de 2021. No dia 3 de abril de 2022, foi iniciado o curso de doutoramento em Zootecnia na área de produção animal na Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (UNESP) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Câmpus de Botucatu, no estado de São Paulo, sob a orientação do Prof^o. Dr. Mário De Beni Arrigoni e coorientação da Prof^a. Dra. Cyntia Ludovico Martins e da Dra. Laudicéia Alves de Oliveira, tendo em 01 de setembro de 2025, submetendo a banca de defesa a presente tese.

“Dedico a Deus, a minha mãe Rosinete Marques e a minha avó Maria Senhorinha Marques (*in memoriam*) que com simplicidade e amor, moldaram meu caráter.”

Com muito amor e gratidão,

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus- A minha gratidão mais profunda e reverente é a Deus. A Ele, que me sustentou quando minhas forças já não bastavam. Que me deu esperança quando os dias pareciam escuros demais. Que me mostrou, com amor, que mesmo diante das minhas falhas e incertezas, eu era capaz. Obrigada, Senhor, por me amar incondicionalmente. Por ouvir minhas orações sussurradas no silêncio da madrugada. Por me devolver a coragem quando eu mesma já não via mais sentido. Cada passo dado, cada vitória conquistada, cada desafio superado, foram guiados por Ti.

À minha família- Rosinete Marques Oliveira, minha mãe. Você é a mulher mais forte que conheço. Cada conquista minha tem as suas mãos. Seu amor me formou. Seu sacrifício me ensinou o que é resiliência. Você nunca desistiu de mim, nem nos meus piores momentos. Obrigada por ser o meu chão, minha fortaleza, meu maior exemplo. Maria Senhorinha Marques, minha avó (*in memoriam*). A saudade aperta, mas a sua presença ainda me guia. Você foi colo, abrigo, sabedoria. Guardo sua voz, seu cheiro, suas orações. Esta conquista é também sua, e sei que, de onde estiver, está sorrindo por mim.

Isaison Caio Marques e Samuel Marques Oliveira, meus irmãos. Com vocês aprendi sobre cumplicidade, sobre partilhar vitórias e derrotas. Vocês são meu elo com a infância, minha alegria constante. Mesmo em silêncio, vocês sempre estiveram comigo, e isso me deu forças. Daniel da Conceição de Oliveira, meu padasto. Obrigada por ser presença, apoio e equilíbrio. Seu carinho silencioso e sua firmeza foram fundamentais nos bastidores desta jornada. Você é parte importante da minha história. Rebeca Marques Pires, minha prima. Mais que prima, você é uma irmã que a vida me deu. Esteve comigo nos momentos mais difíceis, me ouviu, me acolheu. Com você, o caminho foi menos solitário.

Ao meu noivo, Federico Grigolo- Você chegou na minha vida como calmaria. Com seu amor, aprendi que é possível ser forte sem deixar de ser sensível. Obrigada por segurar minha mão nos dias em que tudo parecia desabar, por suportar minhas ausências, por me lembrar do meu valor quando eu esquecia. Seu amor incondicional, sua paciência infinita e sua leveza, tudo isso me sustentou. Ter você ao meu lado foi o que me permitiu seguir.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Mário De Beni Arrigoni- Sua orientação ultrapassou os limites da academia. Foi mestre, conselheiro, parceiro de caminhada. A sua confiança em mim, mesmo quando eu mesma fraquejava, foi a âncora que me manteve firme. Obrigada por me acolher com respeito, por me guiar com sabedoria, e por ser humano, antes de ser professor. O senhor foi essencial para que esta pesquisa se tornasse possível.

À Profa. Dra. Cyntia Ludovico Martins e à Dra. Laudicéia Alves de Oliveira- Duas mulheres incríveis que me ensinaram com generosidade. A paciência de vocês, as palavras certas, os gestos de cuidado, tudo isso me tocou profundamente. Obrigada por acreditarem em mim, mesmo nos momentos em que a minha autoconfiança oscilava. Vocês foram fonte de apoio emocional e intelectual, e deixaram uma marca linda nesta trajetória.

Às professoras e amigas: Profa. Dra. Alanna do Socorro Lima da Silva, Profa. Dra. Isadora Karoline de Freitas e Profa. Dra. Fabrizia Sauyre Otani- A vocês, minha eterna admiração. Vocês me mostraram que é possível ser brilhante e sensível ao mesmo tempo. Que é possível abrir caminhos para outras mulheres com leveza e firmeza. Obrigada por estarem por perto, por me inspirarem com os próprios passos e por acreditarem no meu potencial. Serei eternamente grata por cada gesto de apoio e acolhimento.

Aos meus líderes espirituais- Aos pastores Cezar Ricardo e Márcia Ricardo, e à Igreja Presbiteriana de Ilha Solteira, representada pelos pastores Claudinei Santana e Sônia Santana, obrigada por serem um refúgio espiritual em minha vida. Suas orações e conselhos foram bálsamo para minha alma. Em vocês encontrei paz, direção e fé renovada.

Aos meus amigos, minha família escolhida- Pedro Henrique de Melo Garcia, Leonardo Guimarães, Camila Brassaloti e família, Pedro Henrique Ribeiro, Fábio Silva, Renato Oliveira (*in memoriam*), Natalina Alves e família, Carlos Henrique Nogueira e Ryan Yoshihara, cada um de vocês tem um lugar especial no meu coração. Obrigada por me ouvirem, por me arrancarem sorrisos nos momentos mais pesados, por me lembrarem de que a vida também pode ser leve, mesmo durante o doutorado. A amizade de vocês foi abrigo.

Aos professores Luiz Edivaldo Pezzato e Edivaldo Domingues Velini- Obrigada pela inspiração, pela sabedoria compartilhada, e por cada conversa que me fez crescer. Vocês foram mais do que referências acadêmicas, foram exemplos humanos, generosos e presentes. Levarei comigo tudo o que aprendi com vocês.

À equipe técnica e administrativa- Cláudia Moreci, sua competência, carinho e dedicação fizeram toda diferença. Você me ajudou a manter a ordem no caos, sempre com empatia e prontidão. Marcelo Moraes, obrigada por sua disponibilidade e apoio técnico. Sua contribuição foi fundamental para a execução deste trabalho. Que vocês saibam o quanto foram importantes nesta jornada.

Às instituições parceiras- À Bioativa- Pesquisas Estratégicas em Biociências e à Shimadzu Brasil, minha sincera gratidão pelo apoio financeiro e pela confiança em meu trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)- Código de Financiamento 001, meu profundo agradecimento pela concessão da bolsa, que viabilizou a continuidade deste sonho.

Por fim, esta tese é mais do que um projeto acadêmico. Ela é a materialização de um sonho que nasceu na infância: contribuir, mesmo que em pequena escala, para um mundo melhor. A ciência, para mim, é um ato de esperança. A educação foi o caminho que me permitiu romper limites, ampliar horizontes e acreditar que, sim, eu poderia transformar a minha história. Mais do que títulos, encontrei propósito. Acredito, com toda a minha alma, que a academia precisa ser instrumento de mudança, um lugar onde o saber transforma realidades e alcança vidas.

Encerrar essa etapa é, para mim, como contemplar o nascer do sol depois de uma longa noite. É olhar para trás com o coração cheio, os olhos marejados e a certeza tranquila: valeu a pena. Todo esforço, cada lágrima, cada noite sem dormir... tudo valeu. Hoje, sinto o doce e poderoso sentimento de dever cumprido e de gratidão eterna por cada pessoa que fez parte dessa trajetória.

Obrigada. De todo o meu coração.

“A fé é a certeza de que vamos receber as coisas que esperamos e a prova de que existem coisas que não podemos ver” (Hebreus-11: 1).

RESUMO GERAL

As micotoxinas são metabólitos secundários tóxicos produzidos por fungos micotoxigênicos. A ingestão destas substâncias pode ter consequências prejudiciais para a saúde humana e animal. O consumo de alimentos contaminados por estas toxinas representam um grave problema em todo o mundo, tornando-se essencial o controle destes metabólitos para garantir a segurança alimentar global. O presente estudo teve como objetivo determinar um método de extração que permita a detecção simultânea de múltiplas toxinas legisladas (aflatoxinas - AFLA, deoxinivalenol - DON, fumonisinas - FUMO, ocratoxina A - OTA e zearalenona - ZEA) em ingredientes destinados à produção de rações animal. Para tal, foi utilizado um procedimento de preparação de amostras simples e único para diferentes matrizes, recorrendo à cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC/MS) como método analítico. A avaliação da eficiência do método foi realizada através da utilização de parâmetros específicos, tais como: a curva analítica, o limite de detecção e recuperação. O método demonstrou ser eficiente, ao reduzir os efeitos de matriz, e os componentes-alvo apresentaram boa linearidade nas respectivas faixas lineares ($R^2 > 0,99$). Os limites de detecção do método apresentaram uma variação entre 0,0653 e 1045,4634 µg/kg, demonstrando uma sensibilidade adequada para a detecção. Verificou-se que as recuperações de todos os analitos foram superiores a 70%, valor que se encontra dentro do esperado pelas normas regulamentares. Das sete micotoxinas submetidas a análise, apenas DON e FUMO estiveram presentes em quatro dos cinco ingredientes. A OTA não foi detectada em nenhum dos ingredientes. O método demonstrou eficácia na detecção de sete micotoxinas em diversos ingredientes, mediante a um processo único e simplificado de preparação de amostras reais, com resultados satisfatórios de sensibilidade e robustez via LC/MS. Este método disponibiliza uma ferramenta poderosa e eficaz no monitoramento de ingredientes utilizados no balanceamento de dietas para animais, permitindo avaliar com precisão a qualidade da ração e auxiliar na tomada de decisões mais assertivas no controle desses contaminantes, visando garantir a sustentabilidade dos sistemas de produção e a segurança alimentar.

Palavras-chave: micotoxina; quechers; lc/ms.

ABSTRACT

Mycotoxins are toxic secondary metabolites produced by mycotoxigenic fungi. Ingestion of these substances can have harmful consequences for human and animal health. The consumption of food contaminated with these toxins is a serious problem worldwide, making it essential to control these metabolites to ensure global food safety. The aim of this study was to determine an extraction method that allows the simultaneous detection of multiple regulated toxins (aflatoxins - AFLA, deoxynivalenol - DON, fumonisins - FUMO, ochratoxin A - OTA and zearalenone - ZEA) in ingredients intended for animal feed production. To this end, a simple and unique sample preparation procedure was used for different matrices, using liquid chromatography coupled with mass spectrometry (LC/MS) as the analytical method. The efficiency of the method was evaluated using specific parameters, such as the analytical curve, detection limit and recovery. The method proved to be efficient in reducing matrix effects, and the target components showed good linearity in their respective linear ranges ($R^2 > 0.99$). The detection limits of the method varied between 0.0653 and 1045.4634 $\mu\text{g/kg}$, demonstrating adequate sensitivity for detection. The recoveries of all analytes were found to be above 70%, which is within the range expected by regulatory standards. Of the seven mycotoxins analysed, only DON and FUMO were present in four of the five ingredients. OTA was not detected in any of the ingredients. The method proved effective in detecting seven mycotoxins in various ingredients through a single, simplified process of preparing real samples, with satisfactory results in terms of sensitivity and robustness via LC/MS. This method provides a powerful and effective tool for monitoring ingredients used in animal feed balancing, allowing for accurate assessment of feed quality and assisting in more assertive decision-making in the control of these contaminants, with a view to ensuring the sustainability of production systems and food safety.

Keywords: mycotoxin; quechers; lc/ms.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

CAPÍTULO 2

Figura 1. Curvas de calibração AFB1.....	52
Figura 2. Curvas de calibração AFB2.....	52
Figura 3. Curvas de calibração FB1.....	52
Figura 4. Curvas de calibração FB2.....	52
Figura 5. Curvas de calibração DON.....	52
Figura 6. Curvas de calibração OTA.....	52
Figura 7. Curvas de calibração ZEA.....	53
Figura 8. Cromatograma em LC-MS, Aflatoxina B1, padrão de referência de 50ppb.....	56
Figura 9. Cromatograma em LC-MS, Aflatoxina B1, concentração mínima bagaço de cana.....	56
Figura 10. Cromatograma em LC-MS, Aflatoxina B1, concentração máxima bagaço de cana.....	57
Figura 11. Cromatograma em LC-MS, Aflatoxina B2, padrão de referência 50ppb.....	57
Figura 12. Cromatograma em LC-MS, Aflatoxina B2, concentração mínima farelo de soja.....	58
Figura 13. Cromatograma em LC-MS, Aflatoxina B2, concentração máxima silagem de milho.....	58
Figura 14. Cromatograma em LC-MS, Fumonisina B1, padrão de referência 50ppb.....	59
Figura 15. Cromatograma em LC-MS, Fumonisina B1, concentração mínima caroço de algodão.....	59
Figura 16. Cromatograma em LC-MS, Fumonisina B1, concentração máxima milho triturado.....	60
Figura 17. Cromatograma em LC-MS, Fumonisina B2, padrão de referência 50ppb.....	60
Figura 18. Cromatograma em LC-MS, Fumonisina B2, concentração mínima bagaço de cana.....	61

Figura 19. Cromatograma em LC-MS, Fumonisina B2, concentração máxima milho triturado.....	61
Figura 20. Cromatograma em LC-MS, Desoxinivalenol, padrão de referência 50ppb.....	62
Figura 21. Cromatograma em LC-MS, Desoxinivalenol, concentração mínima caroço de algodão.....	62
Figura 22. Cromatograma em LC-MS, Desoxinivalenol, concentração máxima bagaço de cana.....	63
Figura 23. Cromatograma em LC-MS, Zearalenona, padrão de referência de 50ppb.....	63
Figura 24. Cromatograma em LC-MS, Zearalenona, concentração mínima farelo milho triturado.....	64
Figura 25. Cromatograma em LC-MS, Zearalenona, concentração máxima farelo de soja.....	64

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1. Limites Máximos de tolerância (LMT) para ingredientes destinados a alimentação animal.....	22
Tabela 2. Limites Máximos de Tolerância (LMT) para rações destinadas a alimentação animal.....	23
Tabela 3. Níveis regulatórios de micotoxinas comuns em rações para ruminantes e alimentos humanos.....	24
Tabela 4. Principais efeitos das micotoxinas em ruminantes.....	26

CAPÍTULO 2

Tabela 1. Perfil de contaminação por micotoxinas nos ingredientes.....	54
Tabela 2. Parâmetros LC-MS para cada analito	54

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AFLA	Aflatoxina
BEN	Nefropatia endêmica de balcãs
°C	Grau Celsius
CMS	Consumo de matéria seca
Da	Dalton
DON	Desoxinevalenol
ESI	Eletrospray
EUA	Estados Unidos
FMVZ	Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
FUMO	Fumonisina
GDP	Ganho diário de peso
GC	Cromatografia gasosa
g	Grama
IARC	Agência Internacional de Pesquisa em Câncer
LC	Cromatografia Líquida
Kg	Quilograma
MAPA	Ministério da Agricultura e Pecuária
MgSO ₄	Sulfato de magnésio
mL	Mililitro
MS	Massa
NaCl	Cloreto de sódio
OTA	Ocratoxina
pH	Potencial hidrogeniônico
ppb	Partes por bilhão
QuEChERS	rápido, fácil, barato, eficaz, robusto e seguro
TLC	Cromatografia de camada delgada
ToF	Tempo de voo

TR	Tempo de retenção
µg	Micrograma
UHPLC	Ultra-High Performance Liquid Chromatography
µL	Microlitro
ZEA	Zearalenona

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1

	15
1. Considerações iniciais.....	16
2. Revisão de Literatura.....	17
2.1.Micotoxinas.....	17
2.1.1Aflatoxina (AFLA).....	18
2.1.2. Desoxivalenol (DON).....	19
2.1.3. Fumonisina (FUMO).....	19
2.1.4. Ocrotoxina (OCRA).....	19
2.1.5. Zearalenona (ZEA).....	20
2.2.Impacto das micotoxinas na saúde dos bovinos.....	25
2.3.Gestão do risco de contaminação por micotoxinas em alimentos para animais.....	27
2.3.1 Pré-colheita e colheita.....	28
2.3.2. Armazenamento.....	28
2.3.3. Técnicas de detecção.....	28
2.4.Determinação de micotoxinas.....	29
2.4.1. Amostragem.....	29
2.4.2. Preparo da amostra.....	30
2.5.Método de detecção de micotoxinas.....	31
2.5.1. Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas.....	31
Referências.....	33

CAPÍTULO 2. “Método de extração e quantificação simultânea de multi micotoxinas regulamentadas em diferentes ingredientes utilizados na alimentação animal”	44
Resumo.....	45
1. Introdução.....	45
2. Materiais e Métodos.....	47
2.1. Amostra e procedimento de amostragem.....	47
2.2. Instrumentos e equipamentos.....	48
2.3. Produtos químicos e reagentes.....	48
2.4. Extração de amostras.....	48
2.5. Condições de LC/MS.....	49

2.6. Análise dos dados.....	49
3. Resultados e Discussão.....	49
3.1. Pré-tratamento da amostra.....	49
3.2. Volume de hidratação.....	49
3.3. Solvente de extração.....	50
3.4. Sais de extração.....	51
3.5. Aplicação do método em diferentes ingredientes.....	53
4. Conclusões.....	68
Referências.....	73
IMPLICAÇÕES.....	72

CAPÍTULO 1

Considerações Iniciais

A existência de micotoxinas nos alimentos é uma ameaça à segurança alimentar global, afetando a saúde humana e animal (Cinar, Onbaşı., 2019; Gurikar., *et al* 2023). As micotoxinas podem infectar quase todos os cereais, além do mais, pode ocorrer a acumulação desses contaminantes entre o campo, colheita e a fase de armazenamento (Moretti *et al.*, 2017). A contaminação de alimentos para animais com micotoxinas é uma grande preocupação na produção da pecuária mundial, por se tratar de um contaminante de natureza imperecível e tóxica (Song *et al.*, 2024).

Estudos realizados por Streit (2013), utilizando 17.300 amostras de ração de várias partes do mundo no período de oito anos constatou que 72% das amostras continham micotoxinas. Valor aproximado também foi encontrado por Kovalsky (2016), em 2.000 amostras de alimentos destinados a animais de 52 países, na qual, 79% das amostras estavam contaminadas. Ademais, pesquisas revelam que uma elevada porcentagem de amostras de alimentos para animais está contaminada com mais de uma micotoxina (Kosicki *et al.*, 2012; Streit *et al.*, 2014).

Na maioria dos casos, as concentrações encontradas eram suficientemente baixas para garantir o cumprimento das normas de fiscalização ou dos níveis máximos permitidos. No entanto, foi demonstrado que os animais de produção apresentam sintomas como micotoxicose crônicos quando expostos a alimentos contaminados mesmo que a níveis baixos permitidos (Wielogórska *et al.*, 2016). Além disso, produtores observam frequentemente efeitos adversos agudos no desempenho dos animais, tais como: baixo ganho de peso, distúrbios reprodutivos e metabólicos, com as consequentes perdas econômicas (Vila-donat *et al.*, 2018).

Relatórios da Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura, revelam que cerca de 25% dos cereais no mundo estão infectados com micotoxinas (Sankaranarayanan *et al.*, 2021; LIU *et al.*, 2024), gerando perdas econômicas expressivas alcançando o valor de US\$ 932 milhões por ano, além de mortalidade humana e animal (Hamad *et al.*, 2023).

Diante dos vários efeitos ocasionados por fungos micotoxigênicos, é essencial identificar a ocorrência de multi-micotoxinas em alimentos destinados a dietas de animais de produção, com a finalidade de desenvolver metodologias analíticas precisas e sólidas para sua detecção, a fim de rastrear a presença de micotoxinas em matérias-primas usadas

Frisando que o estudo da ocorrência de cada micotoxina isoladamente fornece informações incompletas sobre o risco associado ao alimento em questão, uma vez que os fungos micotoxigênicos são geralmente capazes de produzir mais do que uma micotoxina, tornando os alimentos para os animais vulneráveis à contaminação múltipla (Streit *et al.*, 2012; Vila-Donat *et al.*, 2018).

Diante dos vários efeitos ocasionados por fungos micotoxigênicos, é essencial identificar a ocorrência de multi-micotoxinas em alimentos destinados a dietas de bovinos, com a finalidade de desenvolver metodologias analíticas precisas e sólidas para sua detecção, a fim de rastrear a presença de micotoxinas em matérias-primas usadas na fabricação de rações e dessa forma reduzir os danos à saúde dos animais (Gonçalves *et al.*, 2015; Rosim *et al.*, 2018; Gonçalves *et al.*, 2020).

2.3. Gestão do risco de contaminação por micotoxinas em alimentos para animais

A garantia da segurança dos alimentos destinados a animais está intrinsecamente associada à segurança e ao bom estado de saúde humana (European Commission, 2006). No entanto, o risco de contaminação por fungos pode ocorrer em vários estágios, incluindo plantio, processamento, armazenamento, logística etc. (Priesterjahn *et al.*, 2020).

Considerando a extrema dificuldade em remover micotoxinas de alimentos/rações contaminadas, a estratégia mais eficaz de mitigação do acúmulo de micotoxinas em *commodities* agrícolas consiste na implementação de medidas de caráter preventivo (Schatzmayr; Streit, 2013; Xu *et al.*, 2021; Stoev, 2024).

Embora inúmeras publicações tenham abordado o tema das micotoxinas na alimentação animal, apenas um número reduzido se refere a um sistema integrado para o seu manejo (Fumagalli *et al.*, 2021). A mitigação de micotoxinas é um processo que deve ser implementado ao longo de toda a cadeia de suprimentos, de modo a assegurar que os níveis de micotoxinas na ração estejam em conformidade com os níveis máximos tolerados ou de tolerância, de acordo com a legislação em vigor (Xu *et al.*, 2022).

Desta forma, é necessário controlar uma série de parâmetros nos produtos sujeitos a processamento e suscetíveis de contaminação por micotoxinas. O manejo de micotoxinas apresenta um caráter sistêmico, abrangendo todas as etapas da cadeia de fornecimento de rações. Esta abordagem integra a produção de matérias-primas e a alimentação no campo, bem como todas as fases do processo (Fumagalli *et al.*, 2021).

níveis considerados seguros, pode desencadear micotoxicoses e afetar significativamente a saúde e a produtividade dos bovinos (Vila-Donat et al., 2018).

O monitoramento de multi-toxinas em ingredientes utilizados na produção de ração animal permite uma análise abrangente e simultânea de múltiplas micotoxinas. Deste modo, é possível obter uma visão mais completa do risco associado aos alimentos, uma vez que, os fungos micotoxigenicos geralmente produzem mais de uma toxina, tornando os ingredientes vulneráveis a contaminação múltipla.

Além disso, o controle regular permite a detecção precoce de contaminações, possibilitando a implementação de estratégias de mitigação antes que ocorram impactos negativos na saúde e produtividade dos animais. E por fim, a tomada de decisão é baseada em dados e informações precisas sobre os níveis de contaminação, permitindo assim decisões mais assertivas no controle desses contaminantes, auxiliando na formulação de dietas mais seguras e na seleção de ingredientes de melhor qualidade.

Conforme demonstrado nos cromatogramas acima, o método demonstrou uma sensibilidade satisfatória na análise de micotoxinas por LC/MS, atingindo limites baixos de detecção, sem a necessidade de um processo de preparação de amostra extenso. O método em questão apresenta as seguintes vantagens: simplicidade na extração com adaptação do QuEChERS, com uma preparação de amostra simples e rápida; alta sensibilidade, com limites de detecção muito inferiores aos exigidos pelas normas regulatórias; método sustentável, com um uso reduzido de solventes e reagentes e abrangência, detecção simultânea de multi-micotoxinas em diferentes matrizes com um único método de preparação de amostras.

Em termos práticos, esta possibilidade pode ser aplicada em laboratórios de controle de qualidade de fábricas de ração, em instalações de criação de animais de produção e em instituições de pesquisa. A sua simplicidade e eficiência permitem monitorar regularmente dos ingredientes utilizados na alimentação animal, contribuindo para a produção de alimentos mais seguros e para a melhoria do desempenho produtivo animal.

4. Conclusão

Pode-se concluir que o método apresenta sensibilidade, exatidão e precisão adequadas para a triagem diária de multi-micotoxinas em ingredientes utilizados na alimentação animal. Sua aplicação amplia a capacidade de detecção de fatores de risco, possibilita a implementação de medidas preventivas e promove maior qualidade e

segurança dos ingredientes das rações, contribuindo para uma maior segurança alimentar na nutrição animal. Além disso, o presente método de extração e quantificação pode ser utilizado em diferentes ingredientes usados na produção de ração independente da espécie animal.

Referências

- Anastassiades, M., Scherbaum, E., Lange, W., 2003. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and dispersive solid-phase extraction for the determination of pesticide residues in produce. *J. AOAC Int.* 86(2), 412–431.
- Batista, L.H.C., Silva, L.F.P., Pereira, M.E.V., Costa, J.B., Silva, J.A.F., Souza, J.C., Daniel, J.L.P., 2024. Effects of feeding mycotoxin-contaminated diets and the use of an adsorbent on the intake, digestibility, rumen fermentation, nitrogen balance and physiological parameters in the blood of Nellore steers. *Anim. Feed Sci. Technol.* 307, 115835. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2024.115835>
- Biscoto, G.L., Salvato, L.A., Alvarenga, É.R., Dias, R.R.S., Pinheiro, G.R.G., Rodrigues, M.P., Pinto, P.N., Freitas, R.P., Keller, K.M., 2022. Mycotoxins in cattle feed and feed ingredients in Brazil: a five-year survey. *Toxins* 14(8), 552. <https://doi.org/10.3390/toxins14080552>
- Bulgaru, C.V., Gorgan, D.L., Solcan, C., 2021. Zearalenone and the immune response. *Toxins* 13(4), 248. <https://doi.org/10.3390/toxins13040248>
- Bystrom, C.E., Sheng, S., Clarke, N.J., 2011. Narrow mass extraction of time-of-flight data for quantitative analysis of proteins: determination of insulin-like growth factor-1. *Anal. Chem.* 83(23), 9005–9010. <https://doi.org/10.1021/ac202303g>
- CAST, 2003. Mycotoxins: Risks in plant, animal, and human systems. Task Force Report. Council for Agricultural Science and Technology.
- Chen, J., Geng, J., Zhu, Y., Li, S., Zhang, S., Li, Y., Tang, Z., 2021. Fumonisin B1: Mechanisms of toxicity and biological detoxification progress in animals. *Food Chem. Toxicol.* 149, 111977. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2021.111977>
- Dänicke, S., Ueberschär, K.H., Ganter, M., Schwerin, M., Valenta, H., 2005. Effects of Fusarium toxin-contaminated wheat grain on nutrient turnover, microbial protein synthesis and metabolism of deoxynivalenol and zearalenone in the rumen of dairy cows. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 89(9-10), 303–315.
- Debevere, S., Van Pamel, E., De Gelder, R., Smet, C., De Saeger, S., De Boever, J., 2020. In vitro rumen simulations show a reduced disappearance of deoxynivalenol, nivalenol and enniatin B at conditions of rumen acidosis and lower microbial activity. *Toxins* 12(2), 101. <https://doi.org/10.3390/toxins12020101>
- De Saeger, S. (Ed.), 2011. Determining mycotoxins and mycotoxigenic fungi in food and feed. Elsevier.
- Dhakal, A., Hashmi, M.F., Sbar, E., 2020. Aflatoxin toxicity. *StatPearls*.

Directive EU, 2003. Commission Directive 2003/100/EC of 31 October 2003 amending Annex I of Directive 2002/32/EC of the European Parliament and of the Council on undesirable substances in animal feed. Off. J. Eur. Union 50.

Dzuman, Z., Cajthaml, T., Fenclová, M., 2015. High-efficiency multi-analyte liquid chromatography coupled with high-resolution tandem mass spectrometry for control of pesticide residues, mycotoxins and pyrrolizidine alkaloids. *Anal. Chim. Acta* 863, 29–40.

European Commission, 2006. Commission Recommendation of 17 August 2006 on the presence of deoxynivalenol, zearalenone, ochratoxin A, T-2 and HT-2 and fumonisins in products intended for animal feeding. Off. J. Eur. Union 229, 7–9.

European Commission, 2013. Commission recommendation of 27 March 2013 on the presence of T-2 and HT-2 toxin in cereals and cereal products. Off. J. Eur. Union L91, 12–15.

Fink-Gremmels, J., 2008. The role of mycotoxins in health and performance of dairy cows. *Vet. J.* 176(1), 84–92.

Gonçalves, B.L., Corassin, C.H., Oliveira, C.A.F., 2015. Mycotoxicoses in dairy cattle: a review. *Asian J. Anim. Vet. Adv.* 10(11), 752–760.

Gonçalves, B.L., Rosim, R.E., Pires, R.D., Oliveira, C.A.F., 2020. Aflatoxin M1 absorption by non-viable cells of lactic acid bacteria and *Saccharomyces cerevisiae* strains in Frescal cheese. *Food Res. Int.* 136, 109604.

González-Curbelo, M.Á., Varela-Martínez, D.A., Riaño-Herrera, D.A., 2022. Pesticide-residue analysis in soils by the QuEChERS method: A review. *Molecules* 27(13), 4323.

Groopman, J.D., Croy, R.G., Wogan, G.N., 1981. In vitro reactions of aflatoxin B1-adducted DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*

Groopman, J.D., Wang, J.S., School, P., 1996. Molecular biomarkers for aflatoxins: from adducts to gene mutations to human liver cancer. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*

Hamad, G.M., Aboelenin, S.M., Mansour, A.M., 2023. A review of recent innovative strategies for controlling mycotoxins in foods. *Food Control* 144, 109350.

IARC, 2012. Agents classified by the International Agency for Research on Cancer Monographs.

Ismail, A., Riaz, M., Hassan, S.T.S., 2018. Aflatoxin in foodstuffs: Occurrence and recent advances in decontamination. *Food Res. Int.* 113, 74–85.

Kemboi, D.C., Gachuri, C.K., Gathumbi, J.K., 2020. A review of the impact of mycotoxins on dairy cattle health: Challenges for food safety and dairy production in sub-Saharan Africa. *Toxins* 12(4), 222.

- Kiessling, K.H., Pettersson, H., Sandholm, M., 1984. Metabolism of aflatoxin, ochratoxin, zearalenone and three trichothecenes by intact rumen fluid, rumen protozoa and rumen bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 47(5), 1070–1073.
- Kovalsky, P., Sulyok, M., Schatzmayr, G., 2016. Co-occurrence of regulated, masked and emerging mycotoxins and secondary metabolites in finished feed and maize—An extensive survey. *Toxins* 8(12), 363.
- Křížová, L., Hradecká, E., Kroupová, H., 2021. Feedborne mycotoxins beauvericin and enniatins and livestock animals. *Toxins* 13(1), 32.
- Lattanzio, V.M.T., Sulyok, M., Galletti, S., 2011. Development and in-house validation of a robust and sensitive solid-phase extraction liquid chromatography/tandem mass spectrometry method for the quantitative determination of aflatoxins B1, B2, G1, G2, ochratoxin A, deoxynivalenol, zearalenone, T-2 and HT-2 toxins in cereal-based foods. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 25(13), 1869–1880.
- Lee, H.-J., Oh, S.-Y., Jo, I., 2021. Zearalenone induces endothelial cell apoptosis through activation of a cytosolic Ca²⁺/ERK1/2/p53/Caspase 3 signaling pathway. *Toxins* 13(3), 187.
- Liao, Y., Zhou, C., Li, C., 2018. Deoxynivalenol, gut microbiota and immunotoxicity: A potential approach? *Food Chem. Toxicol.* 112, 342–354.
- Liu, M., Li, Y., Wu, H., Wei, J., Liu, Q., 2024. Recent advances in efficacy and mechanisms of mycotoxin degradation in food by cold atmospheric plasma. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 270, 115944.
- Mao, X., Han, R., Ma, C., Liu, C., Dong, F., 2020. Analysis of organophosphorus and pyrethroid pesticides in organic and conventional vegetables using QuEChERS combined with dispersive liquid-liquid microextraction based on the solidification of floating organic droplet. *Food Chem.* 309, 125755.
- Marin, S., Ramos, A.J., Sanchis, V., 2013. Mycotoxins: Occurrence, toxicology, and exposure assessment. *Food Chem. Toxicol.* 60, 218–237.
- Martins, D., Martins, S., Oliveira, R., 2024. Mycotoxins evaluation of total mixed ration (TMR) in bovine dairy farms: An update. *Heliyon*.
- Mostrom, M.S., Jacobsen, B.J., 2020. Ruminant mycotoxicosis: an update. *Vet. Clin. Food Anim. Pract.* 36(3), 745–774.
- Musarurwa, H., Tsabendo, A.S., Nindi, M.M., 2019. Recent developments and applications of QuEChERS based techniques on food samples during pesticide analysis. *J. Food Compos. Anal.* 84, 103314.
- Perestrelo, R., Calhau, C., Lopes, R., 2019. QuEChERS-Fundamentals, relevant improvements, applications and future trends. *Anal. Chim. Acta* 1070, 1–28.

- Pinotti, L., Dell'Orto, V., Cheli, F., 2016. Mycotoxin contamination in the EU feed supply chain: A focus on cereal byproducts. *Toxins* 8(2), 45.
- Renaud, J.B., Gauthier, D.M., Krouglov, D.G., 2021. Structure activity relationship for fumonisin phytotoxicity. *Chem. Res. Toxicol.* 34(6), 1604–1611.
- Rosim, R.E., Oliveira, C.A.F., Corassin, C.H., 2018. Aflatoxina M1 e Aflatoxina B1-Lisina como biomarcadores de avaliação da eficiência de adsorventes para aflatoxinas: artigo de revisão. *Ensaio Ciênc. C Biológicas Agrárias Saúde* 22(3), 171–178.
- Streit, E., Naehrer, K., Rodrigues, I., Schatzmayr, G., 2013. Mycotoxin occurrence in feed and feed raw materials worldwide: long-term analysis with special focus on Europe and Asia. *J. Sci. Food Agric.* 93(12), 2892–2899.
- Tao, Y., Tang, Y., Gao, J., 2018. Ochratoxin A: Toxicity, oxidative stress and metabolism. *Food Chem. Toxicol.* 112, 320–331.
- Tang, R., Ding, H., Du, Y., 2020. Determination of multi-class mycotoxins in apples and tomatoes by combined use of QuEChERS method and ultra-high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Food Anal. Methods* 13, 1381–1390.
- Trucksess, M.W., Pohland, A.E., 2001. *Mycotoxin Protocols*. Humana Press, vol. 157, p. 221.
- Turner, N.W., Subrahmanyam, S., Piletsky, S.A., 2009. Analytical methods for determination of mycotoxins: a review. *Anal. Chim. Acta* 632(2), 168–180.
- Vila-Donat, P., Marín, S., Sanchis, V., 2018. A review of the mycotoxin adsorbing agents, with an emphasis on their multi-binding capacity, for animal feed decontamination. *Food Chem. Toxicol.* 114, 246–259.
- Wang, D., Sun, J., Guo, T., 2025. A modified QuEChERS method for the generic and rapid determination of pesticides and mycotoxins in raw coffee beans by liquid chromatography-quadrupole-time-of-flight mass spectrometry. *J. Food Compos. Anal.* 137, 106928.
- You, L., Li, B., Zhang, Y., 2021. Hypoxia, oxidative stress, and immune evasion: a trinity of the trichothecenes T-2 toxin and deoxynivalenol (DON). *Arch. Toxicol.* 95, 1899–1915.