



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
Programa de Pós-Graduação em Ciência de
Alimentos

OCORRÊNCIA E TRANSFERÊNCIA DE RESÍDUOS DE MICOTOXINAS DA SILAGEM E RAÇÃO BOVINA PARA SUBPRODUTOS ALIMENTÍCIOS POR UPLC-MS/MS

JULIANA PEREIRA TONINI

Maringá
2022

JULIANA PEREIRA TONINI

**“OCORRÊNCIA DE MICOTOXINAS EM ALIMENTOS BOVINOS E
SUBPRODUTOS ALIMENTÍCIOS”.**

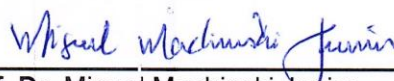
Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Maringá, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Ciência de Alimentos, para obtenção do grau de Mestre em Ciência de Alimentos.



Prof. Dr. Oscar de Oliveira Santos Junior



Profa. Dra. Andréia Vieira Pereira



Prof. Dr. Miguel Machinski Junior
Orientador

Maringá – 2022

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá - PR, Brasil)

T665o

Tonini, Juliana Pereira

Ocorrência e transferência de resíduos de micotoxinas da silagem e ração bovina para subprodutos alimentícios por UPLC-MS/MS / Juliana Pereira Tonini. -- Maringá, PR, 2022.
26 f.: il. color., figs., tabs.

Orientador: Prof. Dr. Miguel Machinski Junior.

Coorientadora: Profa. Dra. Juliana Cristina Castro.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, 2022.

1. Micotoxinas. 2. Segurança alimentar. 3. Alimentação animal. 4. Subprodutos. I. Machinski Junior, Miguel, orient. II. Cristina Castro, Juliana, coorient. III. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos. IV. Título.

CDD 23.ed. 615.954

Rosana de Souza Costa de Oliveira - 9/1366

Orientador

Miguel Machinski Junior

Co-Orientadora

Juliana Cristina Castro

BIOGRAFIA

Juliana Pereira Tonini, nasceu em 26 de novembro de 1991, na cidade de Maringá-Paraná. Possui graduação em Medicina Veterinária pelo Centro Universitário Ingá. Tem experiência nas áreas de qualidade e segurança alimentar, atuando principalmente nos seguintes temas: Micotoxinas em produtos de origem vegetal e animal.

Dedico

Primeiramente a Deus, meu filho Antônio Neto, meu esposo Marco Antônio, meu irmão
Samoel e meus pais Silvana e Edemilson.

AGRADECIMENTOS

A Deus por permitir que eu chegasse até aqui.

Ao meu filho Antônio Neto, esposo Marco Antônio, meu irmão Samoel e meus pais Edemilson e Silvana, minha madrastra Simone, meus sogros Nadir e Antônio e cunhados Maick e Camila, as tias Aparecida e Alvina e, prima Shirley, que me apoiaram e me ajudaram cuidando do meu filho para que pudesse se dedicar a este trabalho.

Ao professor Dr. Miguel Machinski Junior pela oportunidade e orientação.

A professora Dra. Juliana Castro pelos ensinamentos e paciência em sua orientação.

Aos tios Alvina e Luiz Carlos e esposo Marco Antônio que forneceram o leite, o queijo, a ração e a silagem para as análises.

Ao graduando em farmácia Gabriel Antônio Matos pela colaboração nas coletas, extrações e análises das amostras.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciência de Alimentos da Universidade Estadual de Maringá, pela oportunidade.

Ao Laboratório de Toxicologia (LATOX) da Universidade Estadual de Maringá.

Ao Laboratório de Química da Universidade Estadual de Maringá, em especial aos professores Dr. Oscar de Oliveira Santos Junior e Dr. Lucas Ulisses Rovigatti Chiavelli pela disponibilidade dos equipamentos HPLC-MS e parceria.

Ao Laboratório Interdisciplinar de Análises Biológicas e Químicas (LIABQ) da Unicesumar, Campus Maringá-PR, em especial ao professor José Eduardo Gonçalves.

,

APRESENTAÇÃO

Esta dissertação de mestrado está apresentada na forma de um artigo científico.

1 JULIANA PEREIRA TONINI, GABRIEL ANTÔNIO DE MATOS DIOGO, JOSÉ EDUARDO GONÇALVES, LUCAS ULISSES ROVIGATTI CHIAVELLI, OSCAR DE OLIVEIRA SANTOS JUNIOR, JULIANA CRISTINA CASTRO, MIGUEL MACHINSKI JUNIOR. OCORRÊNCIA E TRANSFERÊNCIA DE RESÍDUOS DE MICOTOXINAS DA SILAGEM E RAÇÃO BOVINA PARA SUBPRODUTOS ALIMENTÍCIOS POR UPLC-MS/MS.

SERÁ SUBMETIDO PARA: **FOOD ADDITIVES & CONTAMINANTS: PART A**

GENERAL ABSTRACT

INTRODUCTION. Mycotoxins are toxic secondary metabolites produced by filamentous fungi, which contaminate various foods, becoming a risk to human and animal health. Among the main mycotoxins we have the aflatoxins (AFB₁, AFB₂, AFG₁ and AFG₂) considered carcinogenic produced mainly by *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. Ochratoxins are secondary metabolites produced by fungi of the *Aspergillus* and *Penicillium* genera. The most common is ochratoxin A (OCRA A) which is associated with renal cell carcinoma and has studies of OCRA present in human blood, plasma and urine. Zearalenone (ZEA) produced by fungi of the *Fusarium* genus, has low toxicity, but has estrogenic effects, such as infertility in animals, especially in pre-pubertal pigs. Fumonisin produced by fungi of the genus *Fusarium* affect several species of animals, being leukoencephalomalacia in horses and cardiotoxicity in swine the most common. Alternariol monomethyl ether produced by *Alternaria*, which is a variety grown on fruits and mycotoxin, which can be grown on fruits and mycotoxin, recorded in agricultural crops. The mycotoxins mentioned are mainly present in corn, one of the most consumed crops in the world, which highlights the importance of good practices in pre-harvest and post-harvest, in order to minimize the proliferation of these microorganisms and possible risks to human health.

OBJECTIVE. To investigate the prevalence of mycotoxins in food for animals and humans during the winter of 2022 in a rural property located in the state of Paraná, Brazil. The present work will aim to evaluate the presence of aflatoxins, ochratoxins, zearalenone and fumonisins in feed, silage, in natura corn, raw milk and fresh cheese in a family dairy farm in the State of Paraná, Brazil.

MATERIAL AND METHODS. To determine the presence of Aflatoxins (AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂ and AFM₁), FB₁, OCRA A, ZEA and AME, samples were collected in triplicate on a family farm. Fungal metabolites were identified in an ultra-performance liquid chromatograph coupled to a triple quadrupole mass spectrometer with an electrospray ionization source operated in positive mode (ESI+). The MS was operated in positive ionization mode (ESI+) and the parameters used were: capillary voltage = 3.5 kV; cone voltage = 25.0 V, ionization source temperature = 130 °C; N₂ gas desolvation temperature = 100°C; cone gas flow = 10 L h⁻¹; desolvation gas flow = 300 L h⁻¹. MS spectra were acquired in the MS Scan mode (*m/z* 100-800), while the ions of interest and the fragment ions were obtained through the MRM (Multiple Reaction Monitoring) mode, using argon as collision gas at a pressure of 4 × 10⁵ Pa.

RESULTS AND DISCUSSION. The determination of the presence of Aflatoxins (AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂ and AFM₁), FB₁, OCRA A, ZEA and AME was investigated in dairy foods and dairy products such as milk and fresh cheese. ZEA was the most common mycotoxin, present in all samples. OCRA A was detected in silage, feed and raw milk. Aflatoxin G₁ and G₂ were found in silage and fumonisin B₁ found only in corn. Ochratoxin and zearalenone have also been identified in milk and dairy products, although it has not been studied as extensively as AFM₁.

CONCLUSION: The identification method proved to be efficient in the identification of fungal metabolites. Despite few studies, the presence of OCRA and ZEA in dairy products is of great importance to identify these in terms of food security.

Keywords: Mycotoxins; Food safety, Animal feed; By-products.

RESUMO GERAL

INTRODUÇÃO: As micotoxinas são metabólitos secundários tóxicos produzidos por fungos filamentosos, que contaminam diversos alimentos, se tornando um risco a saúde humana e animal. Dentre as principais micotoxinas temos as aflatoxinas (AFB₁, AFB₂, AFG₁ e AFG₂), consideradas cancerígenas e produzidas principalmente por *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*. As ocratoxinas são metabólitos secundários produzidas por fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*. A mais comum é a ocratoxina A (OCRA A) que está associada a carcinoma de células renais e possui estudos desta micotoxina presente em sangue, plasma e urina de humanos. A zearalenona (ZEA) produzida por fungos do gênero *Fusarium*, possui baixa toxicidade, porém tem efeitos estrogênicos, como infertilidade em animais, principalmente em suínos pré-púberes. As fumonisinas (FB) produzidas por fungos do gênero *Fusarium* acomete diversas espécies de animais, sendo a leucoencefalomalacia em equinos e a cardiotoxicidade em suínos mais comum. A alternariol monometil éter (AME) é uma micotoxina produzida por fungos do gênero *Alternaria*, que pode estar presente em frutas e cereais, causando prejuízos econômicos à agricultura. As micotoxinas mencionadas estão presentes principalmente no milho, uma das culturas mais consumidas no mundo o que ressalta a importância de boas práticas na pré-colheita e pós-colheita, afim de minimizar a proliferação desses microrganismos e possíveis riscos à saúde humana.

OBJETIVO: Investigar a prevalência de micotoxinas em alimentos destinados aos animais e humanos durante o inverno do ano de 2022 em uma propriedade rural localizada no estado do Paraná, Brasil. Entre as micotoxinas, a presença de aflatoxinas, ocratoxinas, zearalenona, fumonisinas e alternariol monometil éter em ração, silagem, milho seco, leite cru e queijo fresco em uma propriedade leiteira de produção familiar, no Estado do Paraná, Brasil foi investigada.

MATERIAL E MÉTODOS: Para a determinação da presença de aflatoxinas (AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂ e AFM₁), Fumonisina B₁ (FB₁), OCRA A, ZEA e AME, foram coletadas amostras em triplicata em uma propriedade rural de agricultura familiar. Os metabólitos fúngicos foram identificados em um cromatógrafo líquido de ultra-eficiência acoplado a um espectrômetro de massas triplo quadrupolo com fonte de ionização *electrospray* operado em modo de ionização positivo (ESI+). Os parâmetros utilizados foram: voltagem do capilar = 3,5 kV; voltagem do cone = 25,0 V, temperatura da fonte de ionização = 130 °C; temperatura de dessolvatação do gás N₂ = 100 °C; vazão do gás do cone = 10 L h⁻¹; vazão de gás de dessolvatação = 300 L h⁻¹. Espectros de MS foram adquiridos no modo MS Scan (*m/z* 100-800), enquanto os íons de interesse e os íons fragmentos foram obtidos através do modo MRM (Monitoramento de Reações Múltiplas), utilizando argônio como gás de colisão a uma pressão de 4 × 10⁵ Pa.

RESULTADOS E DISCUSSÃO. A determinação da presença de Aflatoxinas (AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂ e AFM₁), FB₁, OCRA A, ZEA e AME foi investigada em alimentos para gado leiteiro e produtos lácteos, como leite e queijo frescal. A ZEA foi a micotoxina mais comum, presente em todas as amostras. A OCRA A foi detectada na silagem, na ração e no leite cru. A aflatoxina G₁ e G₂ foi encontrada na silagem e fumonisina B₁ encontrada apenas no milho. A ocratoxina e a zearalenona também foram identificadas no leite e produtos lácteos, embora não tenha sido tão extensivamente estudado como AFM₁.

CONCLUSÃO: O método de identificação se mostrou eficiente na identificação dos metabólitos fúngicos. Apesar de poucos estudos da presença de OCRA e ZEA em laticínios, é de grande importância a identificação destes frente a segurança alimentar.

Palavras-chave: Micotoxinas; Segurança alimentar, Alimentação animal; Subprodutos.

Artigo 1

Food Additives and Contaminants: Part A

**OCORRÊNCIA E TRANSFERÊNCIA DE RESÍDUOS DE MICOTOXINAS DA
SILAGEM E RAÇÃO BOVINA PARA SUBPRODUTOS ALIMENTÍCIOS POR
UPLC-MS/MS**

1 OCORRÊNCIA E TRANSFERÊNCIA DE RESÍDUOS DE MICOTOXINAS DA SILAGEM
2 E RAÇÃO BOVINA PARA SUBPRODUTOS ALIMENTÍCIOS POR UPLC-MS/MS
3

4 Juliana Pereira Tonini^a, Gabriel Antônio de Matos Diogo^b, José Eduardo Gonçalves^c, Lucas
5 Ulisses Rovigatti Chiavelli^d, Oscar de Oliveira Santos Junior^d, Juliana Cristina Castro^e,
6 Miguel Machinski Junior^{e*}
7

8 ^aPós-graduanda em Ciência de Alimentos, Universidade Estadual de Maringá, Av. Colombo,
9 5790, Maringá, 87020-900, Paraná, Brasil;

10 ^bGraduando em Farmácia, Universidade Estadual de Maringá, Av. Colombo, 5790, Maringá,
11 87020-900, Paraná, Brasil;

12 ^cPrograma de Mestrado em Tecnologias Limpas e Instituto Cesumar de Ciência, Tecnologia e
13 Inovação – ICETI. Universidade Cesumar - Unicesumar, Av. Guedner 1610, Maringá,
14 87.050-900, Brasil;

15 ^dDepartamento de Química, Universidade Estadual de Maringá, Av. Colombo, 5790,
16 Maringá, 87020-900, Paraná, Brasil;

17 ^eDepartamento de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, Av.
18 Colombo, 5790, Maringá, 87020-900, Paraná, Brasil;
19
20

21 **E-mails:**

22 Juliana Pereira Tonini: juliana.tonini2@gmail.com

23 Gabriel Antônio de Matos Diogo: gabrielmatosdiogo@gmail.com

24 José Eduardo Gonçalves: jose.goncalves@unicesumar.edu.br

25 Lucas Ulisses Rovigatti Chiavelli: lucasulisses@hotmail.com

26 Oscar de Oliveira Santos Junior: oosjunior@uem.br

27 Juliana Cristina Castro: jccastro2@uem.br

28 Miguel Machinski Junior: mmjunior@uem.br
29

30 *Autor correspondente: Laboratório de Toxicologia, Departamento de Ciências Básicas de
31 Saúde, Universidade Estadual de Maringá (UEM). Avenida Colombo, 5790 CEP 87020-900,
32 Maringa, Parana, Brasil. Telefone: +55 44 3011 4854
33
34
35

Resumo

Micotoxinas são metabólitos secundários produzidos por fungos toxigênicos que podem apresentar riscos à saúde humana e dos animais como carcinogenicidade, nefrotoxicidade, hepatotoxicidade, Imunotoxicidade e desequilíbrios hormonais em relação as funções reprodutivas. As práticas inadequadas de pré-colheita estão relacionadas com o aumento da contaminação dos grãos em lavouras por fungos micotoxigênicos. Com isso, os grãos como o milho, quando utilizado na produção de alimentos destinados ao gado leiteiro expõe os animais e os humanos frente a esta substância tóxica, e ainda, presença de metabólitos ativos secretados no leite por esses animais, como as micotoxinas, ocorrente ainda em seus subprodutos, como o queijo fresco. Este estudo visa investigar a prevalência de micotoxinas em alimentos destinados aos animais e humanos durante o inverno do ano de 2022 em uma propriedade rural localizada no estado do Paraná, Brasil. Para isso, a determinação da presença de aflatoxinas (AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂ e AFM₁), FB₁, OCRA A, ZEA e AME foi investigada em alimentos para gado leiteiro e produtos lácteos, como leite e queijo frescal por UPLC-MS/MS. A presença de micotoxinas em alimentos destinados ao gado e subprodutos alimentícios foi identificada, como a ZEA, que esteve presente em todas as amostras demonstrando sua resistência a temperatura, umidade, acidez, tempo de armazenamento e processamento, o que sugere a importância de mais estudos em relação as micotoxinas apresentadas.

Palavras-chave: Fungos micotoxigênicos; Alimentos bovinos; Qualidade alimentar; Subprodutos alimentar.

1. Introdução

Nos últimos anos, o interesse por compostos de baixo peso molecular produzidos por fungos filamentosos em produtos alimentícios tem aumentado significativamente (Rogowska et al., 2019), devido a ocorrência de micotoxinas produzidos por alguns fungos toxigênicos que causam respostas tóxicas quando ingeridos por humanos e animais. Países em desenvolvimento, com deficiências de controle de qualidade e clima quente, há maiores riscos de exposição aos humanos e animais frente as micotoxinas, principalmente através da ingestão de alimentos contaminados.

O aparecimento de micotoxinas na cadeia alimentar deve-se à contaminação por fungos nas culturas antes e após a colheita (Ganesan et al., 2020; Juan et al., 2020; Samie et al., 2020). Além disso, as culturas podem estar contaminadas com múltiplas estirpes de fungos micotoxigênicos que podem produzir mais de um tipo de micotoxina (Tarazona et al., 2020). A contaminação das culturas agrícolas e insumos agropecuários por fungos patogênicos e micotoxigênicos, leva a uma grande preocupação em relação à segurança alimentar (Meerpoel et al., 2018; El-Sayed et al., 2022).

Entre os alimentos susceptíveis a esta contaminação, a ensilagem é produzida em condições anaeróbicas e baixo pH de forragem para a alimentação animal durante o inverno. Porém, quando a silagem é manuseada ou armazenada de forma incorreta pode ocorrer a contaminação por micotoxinas, sendo a silagem de milho uma fonte importante de desoxinivalenol e zearalenona (Kalac, 2011). O milho (*Zea mays*), é cultivado em todo o

79 mundo (Leite et al., 2020; Tarazona et al., 2020), sendo utilizado na produção de alimentos
80 destinados aos animais, tornando assim uma fonte de exposição de micotoxinas em gado
81 leiteiro e humanos (Tarazona et al., 2020).

82 Temperatura, umidade e insetos podem aumentar a disseminação e o crescimento de
83 fungos micotoxigênicos (Magnoli et al., 2019; Rogowska et al., 2019; Tarazona et al., 2020).
84 De acordo com Rogowska et al., (2019), quando a umidade da matéria-prima vegetal
85 ultrapassa 15%, a umidade relativa do ar está acima de 70% e o substrato é rico em
86 microelementos como zinco, magnésio e cobalto, favorecem a síntese de micotoxinas.

87 Além dos grãos, concentrados e silagem, outro meio de exposição do gado a
88 micotoxinas é o pastejo. Estudos encontraram ZEA em gramíneas naturais destinadas ao
89 pastoreio e AFM₁, metabolito ativo de AFB₁, no leite de vacas em pastejo livre (Adegbeye et
90 al., 2020). Os alimentos fornecidos aos animais quando contaminados podem alterar o sabor,
91 com isso reduz o consumo de alimento, decorrente na redução da produção de leite (Magnoli
92 et al., 2019). Além disso, as micotoxinas estão associadas à anorexia, liberação de citocinas
93 pró inflamatórias e altos níveis séricos de aminotransferases em gado e supressão do sistema
94 imunológico (Adegbeye et al., 2020).

95 O aumento de micotoxinas em produtos de origem animal causa perdas econômicas
96 através da rejeição de fronteiras no mercado global e local. Outra preocupação é que elas não
97 são facilmente destruídas por temperatura, tratamentos químicos ou físicos, podendo estar
98 presente no leite cru, processado e ovo cozido (Adegbeye et al., 2020).

99 Para a segurança alimentar é necessário que seja realizado prevenções acerca da
100 contaminação das commodities agrícolas por micotoxinas, como boas práticas agrícolas e de
101 armazenamento, agentes antifúngicos químicos e naturais que afetam o crescimento dos
102 fungos e a produção de micotoxinas. Porém, tem se observado que doses subinibitórias de
103 agentes químicos antifúngicos podem resultar no aumento na produção de micotoxinas,
104 devido ao desenvolvimento de resistência (Bondy et al., 2021), o tempo de aplicação,
105 dosagem inadequada, manejo integrado de pragas (MIP) deficiente, uso de praguicidas
106 ineficazes (Tran et al., 2021), rotação de culturas, secagem adequada, limpeza e desempenho
107 correto dos equipamentos agrícolas, teor de umidade ideal da colheita da planta e evitar a
108 mistura de produtos de baixa qualidade com outras commodities. Na fase pós-colheita
109 incluem condições de armazenamento adequadas, armazém deve estar bem limpo, bem como
110 o transporte (Kumar et al., 2020).

111 Visando a saúde animal e humana, e redução de riscos frente ao consumo de alimentos
112 contaminados, a avaliação de alimentos industrializados ou minimamente processados é de
113 extrema importância. A presença das micotoxinas em alimentos implica em qualidade

reduzida e riscos a saúdes. Diante do exposto, este trabalho tem como objetivo avaliar a ocorrência de micotoxinas em alimentos destinados ao consumo animal, assim como, transferência dessas micotoxinas para produtos destinados ao consumo humano como o leite e o queijo fresco.

2. Material e métodos

2.1. Reagentes

Os padrões de aflatoxina (AFB₁, AFB₂, ABG₁, AFG₂ e AFM₁), ocratoxina A (OCRA A), zearalenona (ZEA), fumonisina B₁ (FB₁) e Alternariol monometil éter (AME) (Sigma-Aldrich® - Saint Louis, MO, EUA) foram utilizados a partir de uma solução estoque em acetonitrila (grau HPLC) para identificação e confirmação das micotoxinas nas amostras. Os reagentes para extração de micotoxinas foram todos de grau analítico, assim como para os ensaios cromatográficos foram todos de grau HPLC. A água ultrapura foi obtido pelo sistema Milli-Q® em 18,2 MΩ/cm (Millipore, Billerica, MA, EUA) para extração e análise cromatográfica.

2.2. Amostras

As amostras de silagem de milho, ração bovina, milho, leite cru bovino e queijo fresco foram coletadas em maio de 2022, em uma propriedade leiteira localizada na cidade de Maringá-Paraná, Brasil (23°28'29.3"S 51°59'27.4"W). Foram coletadas uma média de 3 kg de silagem aleatórias em diversos pontos da silagem, 3 kg de ração coletada diretamente da embalagem comercial, 5 espigas de milho foram colhidas diretamente da lavoura de forma aleatória, 3 litros de leite cru e 3 unidades de queijo fresco de forma homogênea. As amostras foram enviadas ao laboratório em caixas térmicas e armazenadas a -18°C.

2.3. Extração de micotoxinas

2.3.1. Extração de micotoxinas da ração, silagem e milho

A técnica de extração foi conduzida conforme Romera et al., (2017), com algumas modificações. Para a extração de micotoxinas das amostras de ração, silagem e milho, 5 g de cada amostra, previamente moídas em *Blender* até consistência homogênea, foi adicionada em erlenmeyer de 250 mL com 20 mL de acetonitrila/água/ácido fórmico (84:16:1 v/v/v), exceto para a silagem que foram adicionados 40 mL da solução de extração. Em seguida, as amostras foram homogeneizadas em incubadora com agitação (185 rpm) por 1 hr (Modelo 430, Ethiktechnology), após foram sonicadas por 1 hora (Lavadora ultra-Sônica, Unique, modelo

USC 1450). O extrato foi centrifugado (Centrifuga Universal 320 R, Hettich Zentrifugan) a 3000 rpm por 10 minutos, recuperado 3 mL do sobrenadante, concentrados e armazenados a temperatura de -20°C para análise em UPLC-MS/MS. Para análise cromatográfica, as amostras obtidas foram filtradas através de uma membrana filtrante de PTFE modificada de 0,45 µm x 13 mm (Millex -LCR, Millipore, Billerica, MA, EUA) acoplado a uma seringa.

2.3.2. Extração de AFM₁ do leite cru bovino e queijo fresco

A extração de micotoxinas das amostras de leite cru e queijo fresco foram conduzidas conforme Gonzales-Jartin et al., (2021) com algumas modificações. O queijo foi homogeneizado em Blender, em seguida foram pesados 1 g de queijo e 1 mL de leite cru, e adicionados à 1 mL de acetonitrila/água/ácido fórmico (84:16:1 v/v/v) no leite e 2 mL para o queijo, empregando agitação por 1 hora em incubadora com agitação (Modelo 430, Ethiktechnology) e 1 hora de sonicação (Lavadora ultra-Sônica, Unique, modelo USC 1450). Finalmente, as amostras foram centrifugadas em centrífuga (Universal 320 R, Hettich Zentrifugan) a 4500 rpm por 10 minutos. Foi recuperado o sobrenadante e armazenados a -20°C. Para análise cromatográfica, as amostras obtidas foram filtradas através de uma membrana filtrante de PTFE modificada de 0,45 µm x 13 mm (Millex -LCR, Millipore, Billerica, MA, EUA) acoplado a uma seringa.

2.4. Identificação de metabólitos fúngicos em alimentos para animais e subprodutos alimentícios por UPLC-MS/MS

A identificação dos metabólitos fúngicos foi realizada em um cromatógrafo líquido de ultra-eficiência (ACQUITY UPLC H-Class) acoplado a um espectrômetro de massas triplo quadrupolo com fonte de ionização electrospray (Xevo™ TQD) da marca Waters (Milford, EUA). Esta técnica, cromatografia líquida acoplada ao espectrômetro de massas, é um método utilizado na análise de micotoxinas, que apresenta alta sensibilidade analítica quando comparados a outras técnicas de separação e detecção (Leite et al., 2020).

A análise cromatográfica foi realizada em uma coluna Waters Symmetry® C18 (50 mm × 4,6 mm × 3,0 µm). A composição da fase móvel foi: Água com 0,1% de ácido fórmico (v/v) (A) e acetonitrila (B), na proporção 25:75 (v/v), respectivamente. A vazão foi de 0,15 mL/min, com eluição isocrática.

O MS foi operado em modo de ionização positivo (ESI+) e os parâmetros utilizados foram: voltagem do capilar = 3,5 kV; voltagem do cone = 25,0 V, temperatura da fonte de ionização = 130 °C; temperatura de dessolvatação do gás N₂= 100°C; vazão do gás do cone = 10 L/h; vazão de gás de dessolvatação = 300 L/h. Espectros de MS foram adquiridos no modo

MS Scan (m/z 100-800), enquanto os íons de interesse e os íons fragmentos foram obtidos através do modo MRM (Monitoramento de Reações Múltiplas), utilizando argônio como gás de colisão a uma pressão de 4×10^5 Pa. Os íons precursores e os íons produtos selecionados no modo MRM, assim como a energia de colisão, estão informados na Tabela 01. A aquisição dos dados espectrais foi feita com o *software MassLynx* (Waters, Milford, EUA).

Tabela 01. Energia de Colisão, íons precursores e fragmentos empregados para determinação das micotoxinas.

Composto	Íon precursor [m/z] ⁺	Íon fragmento [m/z] ⁺	Energia de Colisão (eV)
AFB1	313	313.1; 285; 269	35
AFB2	315	315; 287; 258.8	35
AFG1	329	329; 283; 243	35
AFG2	331	331; 285; 245	35
AFM1	329	329; 301; 287	35
FB1	722	722,4; 704,6; 686,6	35
AME	273	241.1; 226.1	30
OCRA	404	404.4; 358; 332	25
ZEA	319	319.3; 301.1; 188.7	19

3. Resultados e Discussão

A determinação da presença micotoxinas, como Aflatoxinas (AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂ e AFM₁), FB₁, OCRA A, ZEA e AME foram investigadas em alimentos para gado leiteiro e produtos lácteos, como leite e queijo fresco. Os resultados encontrados em diferentes matrizes não biológicas estão demonstrados na Figura 01 e Tabela 02.

Os resultados mostram que ZEA foi a micotoxina mais comum, presente em todas as amostras. A OCRA A foi detectada na silagem, na ração e no leite cru. A aflatoxina G₁ e G₂ foi encontrada na silagem e fumonisina B₁ encontrada apenas no milho. A ocratoxina e a zearalenona também foram identificadas no leite e produtos lácteos, embora não tenha sido tão extensivamente estudado como AFM₁ (Mao et al., 2017).

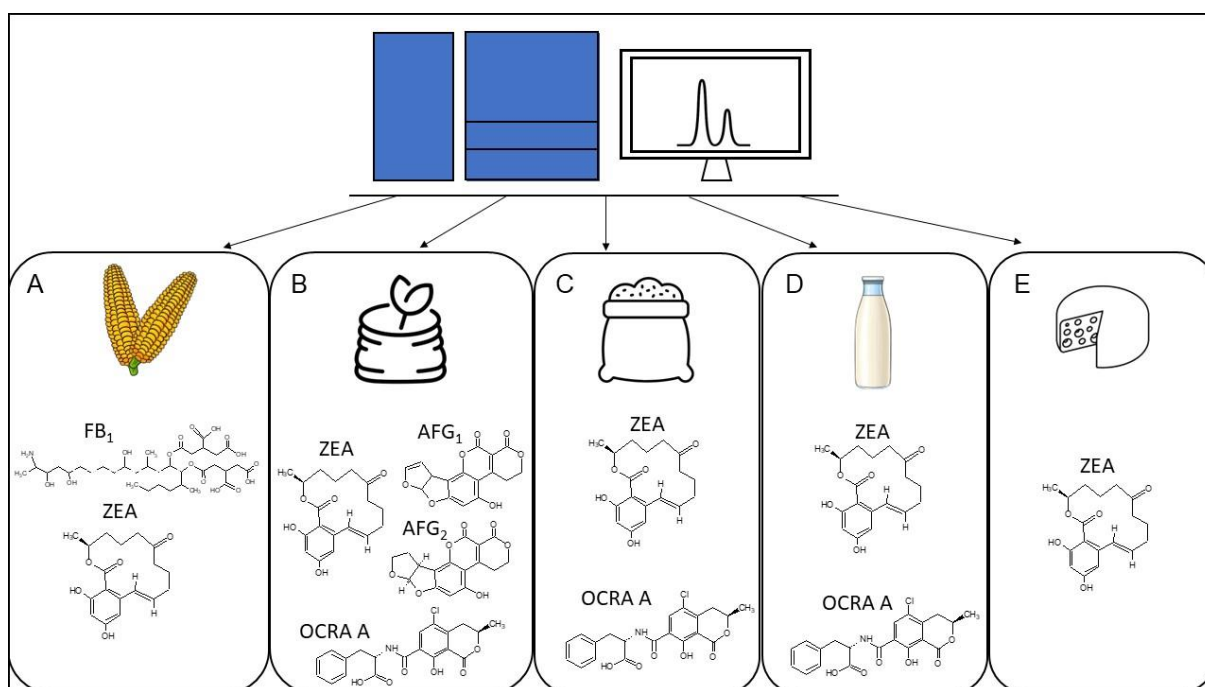


Figura 01. Ocorrência de micotoxinas em alimentos para destino animal e subprodutos alimentícios identificados por UPLC-MS/MS. Amostras de Milho (A), Silagem (B), Ração cru bovina (C), leite bovino (D) e queijo fresco (E). Legenda: Fumonisina B₁ (FB₁), Zearalenona (ZEA), Aflatoxina G₁ e G₂ (AFG₁ e AFG₂) e Ocratoxina A (OCRA A).

Tabela 01. Metabólitos secundários encontrados em alimentos bovinos e subprodutos alimentares, seguidos de seu tempo de retenção (min) (TR), [M+H]⁺ experimental e transições (fragmentos m/z).

Amostras	Micotoxina	TR (min)	[M+H] ⁺	Transições
Milho	FB ₁	1.64	722.4	722,4>704,6; 722,4>686,6
	ZEA	4.19	319	319.3>301.1; 319.3>188.7
	ZEA	5.92	319	319.3>301.1; 319.3>188.7
Silagem	OCRA A	4.08	404.4	404.4>358; 404.4> 332
	AFG ₁	3.88	329	329>243; 329>283
	AFG ₂	4.17	331	331>245; 331>285
Ração cru bovina	ZEA	8.43	319	319.3>301.1; 319.3>188.7
	OCRA A	4.2	404.4	404.4>358; 404.4> 332
Leite bovino	ZEA	6.39	319	319.3>301.1; 319.3>188.7
Queijo fresco	OCRA A	10.79	404.4	404.4>358; 404.4> 332
	ZEA	1.87	319	319.3>301.1; 319.3>188.7

Legenda: Fumonisina B₁ (FB₁), Zearalenona (ZEA), Aflatoxina G₁ e G₂ (AFG₁ e AFG₂) e Ocratoxina A (OCRA A).

Entre os principais fungos produtores de micotoxinas estão os gêneros *Fusarium*, *Aspergillus* e *Penicillium* (Zhao et al., 2019). O gênero *Fusarium* é produtor de fumonisinas,

tricotecenos e zearalenona (Al-jaal., 2019) e responsável por perdas significativas em culturas de milho no Vietnã, com rendimento de cerca de 4,7 toneladas por hectare, o que é inferior ao rendimento médio mundial de 5,9 toneladas por hectare (Tran et al., 2021). Leite (2020), confirma em seu estudo que *Fusarium graminearum* causa doenças em plantas e *F. verticillioides* e *A. flavus* produzem micotoxinas em plantas senescentes ou estressadas. O que está de acordo com o presente trabalho.

As principais fumonisinas são os análogos da fumonisina B (FB), que incluem FB₁, FB₂ e FB₃, sendo a FB₁ classificada carcinógeno humano do grupo 2B, possivelmente carcinogênica conforme a Agência Internacional de Pesquisa ao Câncer, do inglês *International Agency Research Cancer* (IARC) (Al-jaal., 2019). Em um estudo realizado por Tran et al., (2021), constatou que de 23 micotoxinas analisadas, o grupo fumonisina incluindo FB₁, FB₂ e FB₃, foi frequentemente detectado nas amostras de milho em campos, nas quais FB₁ foi a mais predominante.

Já a zearalenona (ZEA), é comumente encontrada em culturas de milho e principalmente produzida por *Fusarium graminearum* e *Fusarium culmorum* (Zinedine et al., 2007; Al-jaal et al., 2019; Rogowska et al., 2019). ZEA, normalmente contamina as lavouras de milho, causando podridão da espiga de milho, sendo classificados como fungos do campo e não de armazenamento (Zinedine et al., 2007). A contaminação de carne, leite ou ovos se deve a alimentos contaminados na dieta dos animais, além disso, ZEA é resistente a altas temperaturas, não se degrada durante o armazenamento, nem é destruído pela pasteurização. Porém, pode ser degradado pela radiação UV e em ambiente alcalino.

O *Joint Expert Committee on Food Additives* (JECFA) estabeleceu a ingestão diária máxima tolerável (IDT) de 0,5 µg/kg para ZEA, já a Autoridade Europeia de Segurança Alimentar (EFSA) estabeleceu um IDT de 0,25 µg/kg. Devido a rápida biotransformação e excreção pelos animais, a ingestão desta toxina em relação a carne não é muito significativa, ao contrário do leite de vacas que secretam altas doses de ZEA, sendo relatado em estudos uma concentração máxima de 6,1 µg/L no leite de uma vaca alimentada por um dia com ração contendo a concentração de ZEA de 12 mg/kg (Rogowska et al., 2019). Os principais metabólitos ativos e redutores do ZEN em animais e humanos são α -zearalenol (α -ZEL) e β -zearalenol (β -ZEL) (Al-jaal et al., 2019). A ZEA pertence aos xenoestrogênicos, ou seja, sua estrutura química é semelhante aos estrogênios naturais, como o β -estradiol podendo se ligar aos receptores de estrogênio, causando desequilíbrios hormonais e desenvolvimento de doenças do sistema reprodutor (Poór et al., 2017; Rogowska et al., 2019).

A carcinogenicidade do ZEA não foi estabelecida, e a IARC o classificou como um carcinógeno do grupo 3 (IARC, 1993) (Samie et al., 2020). Foi constatado em um estudo

realizado por Zinedine (2007), em ratos Fischer 344/N com ingestão diária de 50mg/kg de ZEA por 103 semanas, apresentaram menor ganho de peso, além das lesões não neoplásicas como inflamação da próstata, atrofia testicular, cistos císticos em glândulas mamárias de machos, aumento da incidência de vacuolização citoplasmática hepatocelular em machos e aumento da incidência de nefropatia crônica progressiva em ambos os sexos.

Além disso, ZEA e seus metabólitos alteram a fertilidade nos animais (Kowalska et al., 2017). De acordo Rogowska et al., (2019) pesquisas foram desenvolvidas e constataram a presença de ZEA em 60% das amostras de grãos de arroz cultivados em 2017 no Brasil. Um estudo realizado por Kowalska et al., (2017) com a finalidade de avaliar o efeito da ZEA no metabolismo mitocondrial, permeabilização da membrana plasmática e ciclo celular de células de câncer de próstata, indicou que ZEA também pode induzir a proliferação de células de câncer de próstata.

Aspergillus, por sua vez, é responsável pelos metabólitos secundários aflatoxinas, ocratoxina A, ácido ciclopiazônico e Patulina. As aflatoxinas são metabólitos secundários produzida pelas espécies *A. flavus*, *A. parasiticus* e *A. nomius*, encontradas geralmente em alimentos secos e oleaginosas (Ismail et al., 2018). A aflatoxina refere-se a quatro tipos principais de micotoxinas que são aflatoxina B₁ (AFB₁), aflatoxina B₂ (AFB₂), aflatoxina G₁ (AFG₁) e aflatoxina G₂ (AFG₂), além de seu metabólito aflatoxina M₁ (AFM₁) secretada no leite. Estão relacionados a saúde humana com o desenvolvimento de carcinoma hepatocelular (Ismail et al., 2018). O fígado é o órgão alvo da AFB₁, onde a toxina é metabolizada principalmente por CYP1A2 e CYP3A4 resultando na formação de adutos de DNA, que é responsável pelas propriedades mutagênicas de AFB₁ (Theumer et al., 20018; Al-jaal et al., 2019). Quando os ruminantes são expostos a dietas ricas em grãos contendo altos níveis de micotoxinas, pode levar o animal ao óbito, devido ao fato que, AFB₁ pode ser absorvido pela parede do rúmen antes de chegar ao intestino e transformado em AFM₁ pelo sistema oxidativo mitocondrial do citocromo P450 no fígado de gado leiteiro em pouco tempo de ingestão. Os ruminantes estão predispostos a doenças como mastite, laminite, lesões hepatocelulares, gastroenterite, diarreia, disfunção imunológica, lesões renais, baixo desenvolvimento testicular e contagem de espermatozoides e cistos ovarianos. Além disso, pode ser encontrados resíduos de aflatoxinas no fígado, moela, rim, leite, ovos e carne, sendo alimentos comumente ingeridos por humanos (Adegbeye et al., 2020).

Frente as demais micotoxinas encontradas nos alimentos, de acordo com Gonzalez-Jartin (2021), a OCRA A e ZEA também foram detectadas no leite de animais. Neste trabalho, a silagem estava contaminada com OCRA A e após este alimento passar pela metabolização ruminal, ainda assim, foram detectadas no leite cru.

A Ocratoxina A é considerada teratogênica, embriotóxica, genotóxica, imunossupressores, carcinogênicos (grupo 2B da IARC) e nefrotóxicos (OMS, 2001). De acordo com Ganesan (2020), uma pesquisa realizada na Turquia demonstrou que o processamento do leite pode diminuir a concentração de OCRA A no leite cru que era de 137 ± 57 ng/L, após pasteurização e ultra alta temperatura reduziu para 135 ± 8 ng/L e 85 ± 4 ng/L. O que está em concordância com os resultados apresentados neste trabalho, apesar do leite não ser pasteurizado, ele é aquecido até uma faixa de 35°C para a adição de coagulantes para a produção de queijo. Este aquecimento pode ter eliminado concentrações de OCRA A, o que exemplifica o porquê não apareceu no queijo após produzido.

Apesar do leite ser uma fonte de nutrientes, ele também pode ser um veículo para contaminantes, como as micotoxinas (Izzo et al., 2019). Mesmo com tratamentos térmicos algumas micotoxinas são resistentes a altas temperaturas se tornando uma preocupação para a segurança alimentar (Ismail et al., 2018; Al-jaal et al., 2019). Apesar das micotoxinas não serem totalmente eliminadas durante seu processamento é, importante que o nível esteja abaixo dos níveis tolerados (Gonzales-Jartin et al., 2021).

As concentrações de OCRA A em alimentos podem ser reduzidas após as técnicas de processamento como a moagem que pode diluir e distribuir micotoxinas. No presente trabalho há uma discordância, pois, a ração comercial apresentou OCRA A mesmo após processamento (Kumar, 2020). Segundo Adegbeye (2020), é comum na indústria de ração animal o uso de aditivos alimentares para adsorver toxinas. Por sua vez, Leite (2020) em seu estudo diz que durante o processamento desses alimentos, as micotoxinas não são completamente eliminadas, o que está em concordância com este trabalho na onde foi detectado a presença de ZEA e OCRA na ração comercial fornecendo ao gado leiteiro.

De acordo com Adegbeye (2020), além dos grãos, ração e silagem outro meio de exposição do gado a micotoxinas é o pastejo. Estudos encontraram ZEA em gramíneas naturais destinadas ao pastoreio e AFM₁ no leite de vacas em pastejo livre. Apesar deste estudo não ter realizado a análise das gramíneas é importante informar que neste estudo os animais também realizam o pastejo simultaneamente.

Estudos relatam que a aflatoxina B₁ pode estar ausente ou presente em níveis muito baixos quando altos níveis de OCRA A estão presentes, sugerindo uma competição entre espécies de *Aspergillus* e suas toxinas durante a produção ou a absorção no trato gastrointestinal, o que pode explicar a ausência de AFB₁ na silagem e na ração e, ausência do metabólito hidroxilado a AFM₁ no leite e queijo (Kumar, 2020).

A amostras foram coletadas na estação outono, o que está de acordo conforme Signorini (2012), já que ração e silagem representam mais da metade da alimentação dos

animais devido a indisponibilidade de pastagem neste período. Durante a colheita, os grãos podem ser contaminados por micotoxinas e estes grãos podem ser utilizados na produção de alimentos para animais (González-Peñas, 2017; Izzo et al., 2019).

A ensilagem produzida com culturas como o milho é um método de conservação de forragem que ocorre em condições anaeróbicas e na presença de bactérias lácticas, levando a uma diminuição dos valores de pH, estas condições permitem prolongar o período de armazenamento, mantendo o valor nutricional. A silagem é a principal fonte de forragem destinados ao gado leiteiro principalmente aonde tem pouco alimento disponível nas pastagens (Rodríguez-Blanco et al., 2019).

Algumas condições como umidade, temperatura, armazenamento inadequado pode comprometer a qualidade da silagem, assim predispondo ao crescimento de micotoxinas (Juan et al., 2020). A contaminação da ração vai depender dos componentes da ração e das condições de armazenamento (Ganesan et al., 2020). A estação do ano pode estar associada ao aumento da concentração de micotoxinas, devido a pouca disponibilidade de pastagens, no outono e inverno, mais de 50% da alimentação será ração e principalmente silagem, para que os animais não reduzam a sua produtividade (Signorini et al., 2012).

Os ruminantes apresentam maior tolerância às micotoxinas, devido a passagem desses compostos pelo rúmen, porém o leite de origem animal pode ficar contaminado quando os ruminantes consomem alimentos contaminados com fungos toxigênicos (Mao et al., 2017; Akinyemi et al., 2021; Gonzalez-Jartin et al., 2021). As fumonisinas passam pelo rúmen sem sofrer alterações, porém algumas micotoxinas como, aflatoxinas e zearalenona, são modificadas em metabólitos mais tóxicos como a aflatoxina B₁ que é hidroxilado em AFM₁ e, que podem ser eliminados pelo leite. Outras micotoxinas também foram detectadas no leite animal como ZEN e OCRA A (Gonzalez-Jartin et al., 2021).

De acordo com Kumar (2020), é importante evitar a mistura de produtos de baixa qualidade com outras commodities. Apesar de ser um dos fatores a se levar em consideração para a prevenção de micotoxinas, porém durante a colheita não tem como fazer seleção de espigas de milho, com isto grãos sadios são misturados com grão doentes e por sua vez já contaminados vão para as cooperativas armazenados em silos ou para a produção de ensilagem.

Países em desenvolvimento, com deficiências de controle de qualidade e clima quente, há maiores riscos de humanos e animais estarem expostos as micotoxinas (Ganesan, 2020). Porém, Adegbeye (2020), em seu estudo descreve que apesar de implantados as boas práticas agrícolas muitos países desenvolvidos como América do Norte, América Central e Sul da Ásia apresentam risco de severo ao extremo de prevalência de micotoxinas, enquanto outras

regiões como o Sudeste Asiático, Oceania e Europa têm risco moderado a alto de prevalência de micotoxinas. Além do mais, insetos podem aumentar a disseminação e o crescimento de fungos micotoxigênicos (Magnoli et al., 2019; Rogowska et al., 2019; Tarazona et al., 2020).

4. Conclusão

Houve a prevalência de micotoxinas nos alimentos analisados no presente trabalho, frente aos subprodutos processados. Apesar da não detecção de AFM₁ que é uma das micotoxinas mais estudadas em leite e com potencial efeito carcinogênico, a ZEA por sua vez, foi detectada em todas as amostras. A OCRA A estava presente na silagem, ração e leite, o que demonstra a prevalência desta micotoxina mesmo após o processo de fermentação ruminal e de outras micotoxinas que poderiam desenvolver uma competição, sendo de extrema importância estudos mais recentes em humanos devido a carcinogenicidade em células renais. Este estudo reafirma que deve ser monitorada os grãos em pré e pós-colheita para que ocorra a redução na exposição de humanos e animais a estas micotoxinas visando a segurança alimentar.

AGRADECIMENTOS

Os autores gostariam de agradecer à Agência Federal Brasileira e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Brasil [CAPES] pelo apoio, bem como ao Laboratório de Analítica Aplicada a Lipídios, Esteróis e Antioxidantes (APLE-A) pela parceria e auxílio nas atividades deste projeto.

CONFLITO DE INTERESSE

Os autores declararam não haver conflito de interesses.

5. Referências

- Adegbeye, M. J., Reddy, P. R. K., Chilaka, C. A., Balogun, O. B., Elghandour, M. M. M. Y., Rivas-Caceres, R. R., & Salem, A. Z. M. (2020). Mycotoxin toxicity and residue in animal products: Prevalence, consumer exposure and reduction strategies – A review. *Toxicon*. 177, 96-108.
- Akinyemi, M.O., Braun, D., Windisch, P., Warth, B., Ezekiel, C.N. (2021). Assessment of multiple mycotoxins in raw milk of three different animal species in Nigeria. *Food Control*. S0956-7135,00396-0.

394

395 Al-Jaal, B.A., Jaganjac, M., Barcaru. A., Horvatovich, P., Latiff, A. (2019). Aflatoxin,
396 fumonisin, ochratoxin, zearalenone and deoxynivalenol biomarkers in human biological
397 fluids: A systematic literature review, 2001–2018. *Food and Chemical Toxicology*. 129, 211–
398 228.

399

400 Bondy, G. S., Curran, I. H. C., Coady, L. C., Armstrong, C., Bourque, C., Bugiel, S., ...
401 Gannon, AM (2021). Um estudo de toxicidade reprodutiva de uma geração da micotoxina
402 ocratoxina A em ratos Fischer. *Food and Chemical Toxicology*, 153, 112247.

403

404 Castro, J.C., Avincola, S.A., Endo, E.H., Silva, M.V., Dias Filho, B.P., Machinski Junior, M.,
405 Pilau, E.J., Abreu Filho, B.A. (2017). Mycotoxigenic potential of *Alternaria*
406 *alternata* isolated from dragon fruit (*Hylocereus undatus* haw.) Using UHPLC-QTOF-MS.
407 *Postharvest Biology and Technology*. 141, 71–76.

408

409 El-Sayed, R. A., Jebur. A.B., Kang, W., El-Demerdash, F.M. (2022). An overview on the
410 major mycotoxins in food products: characteristics, toxicity, and analysis. *Journal of Future*
411 *Foods*, 91–102.

412

413 Ganesan, A.R., Balasubramanian, B., Park, S., Jha, R., Andretta, I., Bakare, A.G., Kim, I.H.
414 (2020). Ochratoxin A: Carryover from animal feed into livestock and the mitigation
415 strategies. *Animal Nutrition* 7, 56-63.

416

417 González-Jartín, J.M., Ferreiro, V., Rodríguez-Cañás I., Alfonso A., M.J., Aguin, O., Vieytes,
418 M.R., Gomes, A., Ramos, I., Botana, L.M. (2021). Occurrence of mycotoxins and
419 mycotoxigenic fungi in silage from the north of Portugal at feed-out. *International Journal of*
420 *Food Microbiology*, 365, 109556.

421

422 IARC, 1993. Monografias da IARC sobre a Avaliação de Riscos Carcinogênicos para
423 Humanos: Alguns Substâncias que ocorrem naturalmente: itens alimentares e constituintes,
424 aminas aromáticas heterocíclicas e micotoxinas, vol. 56. Agência Internacional de Pesquisa
425 sobre o Câncer, Reino Unido. Jackson, LS, Ryu, D., 2017. Resumo do Simpósio ACS em
426 Saúde Pública Perspectivas de Micotoxinas em Alimentos. Publicações ACS.

427

- Ismail, A., Gonçalves, B.L., de Neeff, D.V., Ponzilacqua, B., Coppab, C.F.S.C., Hintzsch, H., Sajide, M., Cruz, A.G., Corassin, C.H., Oliveira, C.A.F. (2018). Aflatoxin in foodstuffs: Occurrence and recent advances in decontamination. *Food Research International* 113, 74–85.
- Izzo, L., Rodríguez-Carrasco, Y., Tolosa, J., Graziani, G., Gaspari, A., Ritieni, A. (2019). Target analysis and retrospective screening of mycotoxins and pharmacologically active substances in milk using a ultra-high performance liquid chromatography approach/high resolution mass spectrometry. *J. Dairy Sci.* 103.
- Juan, C., Mannai, A., Ben Salem, H., Oueslati, S., Berrada, H., Juan-García, A., Manes, J. (2020). Mycotoxins presence in pre- and post-fermented silage from Tunisia. *Arabian Journal of Chemistry* 13, 6753–6761.
- Kalač, P. (2011). The effects of silage feeding on some sensory and health attributes of cow's milk: A review. *Food Chemistry*, 125(2), 307–317.
- Kowalska, K., Habrowska-Górczyńska, D. E., Domińska, K., & Piastowska-Ciesielska, A. W. (2017). The dose-dependent effect of zearalenone on mitochondrial metabolism, plasma membrane permeabilization and cell cycle in human prostate cancer cell lines. *Chemosphere*, 180, 455–466.
- Kumar, P., Mahato, D.K., Sharma, B., Borah, R., Haque, S., Mahmud, M.M.C., Shah, A.K., Rawal, D., Bora, H., Bui, S. (2020). Ochratoxins in food and feed: Occurrence and its impact on human health and management strategies. *Toxicon* 187, 151–162.
- Leite, M., Freitas, A., Silva, A. S., Barbosa, J., & Ramos, F. (2020). Maize (*Zea mays* L.) and mycotoxins: A review on optimization and validation of analytical methods by liquid chromatography coupled to mass spectrometry. *Trends in Food Science & Technology*, 99, 542–565.
- Magnoli, A.P., Poloni, V.L., Cavaglieri, L. (2018). Impact of mycotoxins contamination in the animal feed industry. *Current Opinion in Food Scienc.* S2214-7993, 30145-0.

- Mao, J., Zheng, N., Wen, F., Guo, L., Fu, C., Ouyang, H., Zhong, L., Wang, J., Lei, S. (2017). Multi-mycotoxins analysis in raw milk by ultra-high-performance liquid chromatography coupled to quadrupole orbitrap mass spectrometry. *Food Control*, 50956-7135, 30403-6.
- Meerpoel, C., Vidal, A., di Mavungu, J. D., Huybrechts, B., Tangni, E. K., Devreese, M., ... De Saeger, S. (2018). Sevelopment and validation of an LC-MS/MS method for the simultaneous determination of citrinin and ochratoxin a in a variety of feed and foodstuffs. *Journal of Chromatography A*. S0021-9673, 31309-8.
- Poór, M., Kunsági-Máté, S., Bálint, M., Hetényi, C., Gerner, Z., & Lemli, B. (2017). Interaction of mycotoxin zearalenone with human serum albumin. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 170, 16–24.
- Rodríguez-Blanco, M., Ramos, M., Sanchis, A.J., Marín, V. (2019). Mycotoxins occurrence and fungal populations in different types of silages for dairy cows in Spain. *Fungal Biology*.
- Romera, D., Mateo, E.M., Mateo-Castro, R., Gómez, J.V., Gimeno-Adelantado, J.V., Jiménez, M. (2017). Determination of multiple mycotoxins in feedstuffs by combined use of UPLC-MS/MS and UPLC-QTOF-MS. *Food Chemistry*, 140-148.
- Samiee, F., Kharazi, A., Elaridi, J., Javad, M.T., Leili, M. (2020). An assessment of the occurrence and nutritional factors associated with aflatoxin M1, ochratoxin A, and earalenone in the breast milk of nursing mothers in Hamadan, Iran. *Toxicon* 187, 209–213.
- Signorini, M.L., M. Gaggiotti, M., Molineri, A., Chiericatti, C.A., Zapata de Basílico, M.L., Basílico, J.C., Pisani, M. (2012). Exposure assessment of mycotoxins in cow's milk in Argentina. *Food and Chemical Toxicology* 50, 250–257.
- Tarazona, A., Gómez, J. V., Jiménez, M., Mateo, F., Romera, D., & Mateo, E. M. (2020). Study on mycotoxin contamination of maize kernels in Spain. *Food Control*, 118, 107370.
- Theumer, M. G., Henneb, Y., Khoury, L., Snini, S. P., Tadrist, S., Canlet, C., ... Audebert, M. (2018). Genotoxicity of aflatoxins and their precursors in human cells. *Toxicology Letters*, 287, 100–107.

- Tran, T. M., Ameye, M., Thi-Kim Phan, L., Devlieghere, F., De Saeger, S., Eeckhout, M., & Audenaert, K. (2020). Impact of ethnic pre-harvest practices on the occurrence of *Fusarium verticillioides* and fumonisin B1 in maize fields from Vietnam. *Food Control*. 120, 107567.
- Zhao, Y., Yuan, Y-C., Bai, X.L., Liu, Y-M., Wu, G-F., Yang, F-S., Liao, X. (2019). Multi-mycotoxins analysis in liquid milk by UHPLC-Q-Exactive HRMS after magnetic solid-phase extraction based on PEGylated multi-walled carbon. Nanotubes. *Food Chemistry* 305, 125429.
- Zinedine, A., Soriano, J. M., Moltó, J. C., & Mañes, J. (2007). Review on the toxicity, occurrence, metabolism, detoxification, regulations and intake of zearalenone: An oestrogenic mycotoxin. *Food and Chemical Toxicology*, 45(1).