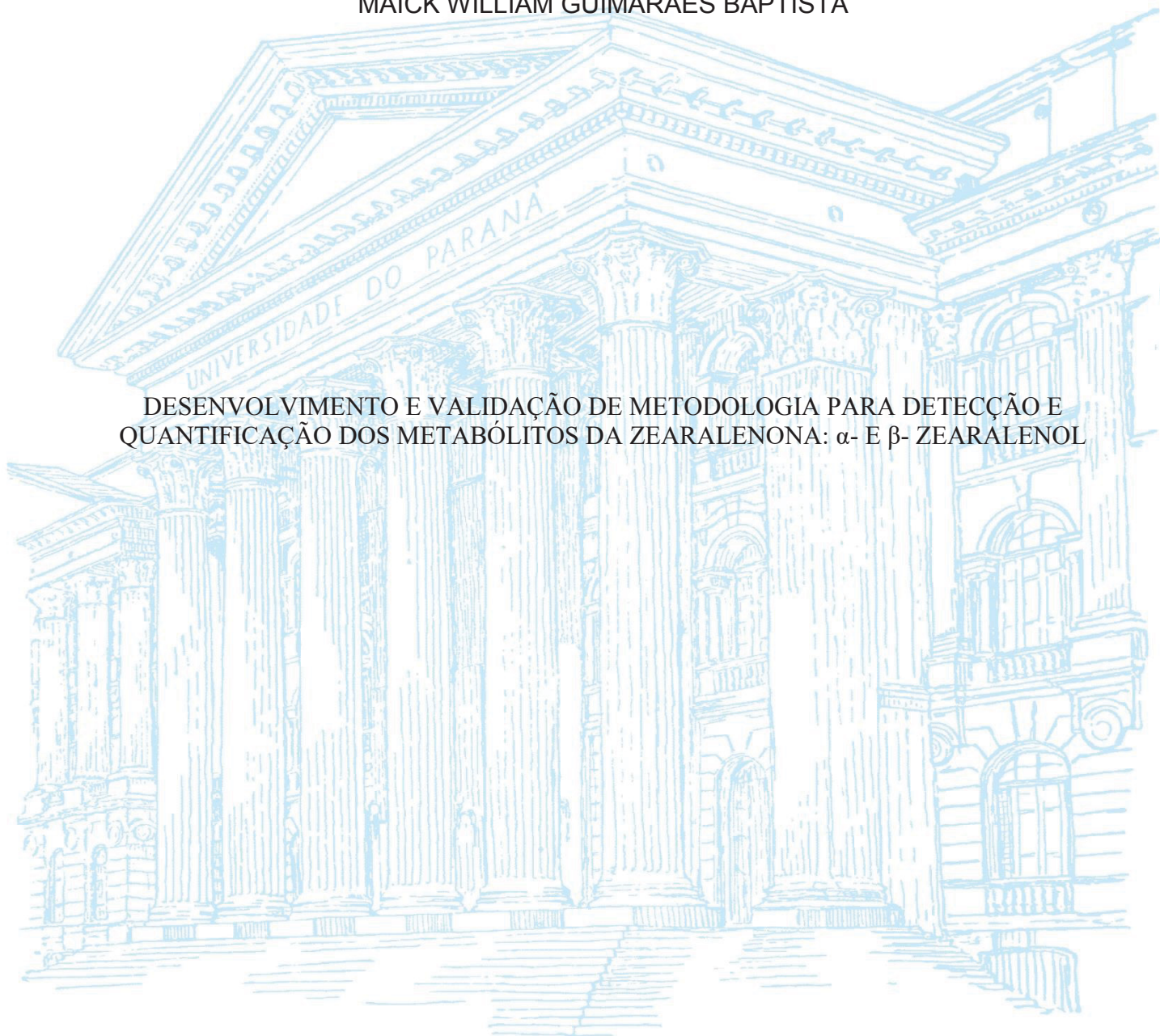


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MAICK WILLIAM GUIMARÃES BAPTISTA

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA PARA DETECÇÃO E
QUANTIFICAÇÃO DOS METABÓLITOS DA ZEARALENONA: α - E β - ZEARALENOL



CURITIBA

2019

MAICK WILLIAM GUIMARÃES BAPTISTA

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA PARA DETECÇÃO E
QUANTIFICAÇÃO DOS METABÓLITOS DA ZEARALENONA: α - E β - ZEARALENOL

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Wagner.

CURITIBA

2019

Baptista, Maick William Guimarães

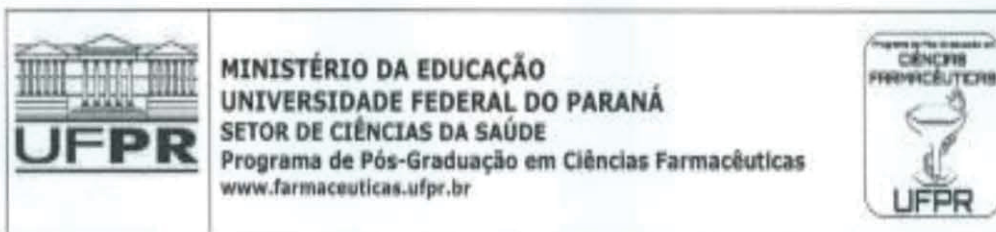
Desenvolvimento e validação de metodologia para detecção e quantificação dos metabólitos da Zearalenona [recurso eletrônico] : α - e β - Zearalenol / Maick William Guimarães Baptista – Curitiba, 2019.

Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, 2019.

Orientador: Professor Dr. Ricardo Wagner

1. Micotoxinas. 2. Zearalenona. 3. Método QuEChERS. 4. HPLC-FLD.
5. Validação. I. Wagner, Ricardo. II. Universidade Federal do Paraná. III. Título.

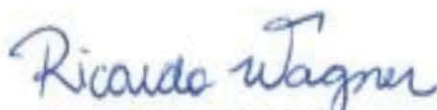
CDD 615.1901



TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da Dissertação de Mestrado de MAICK WILLIAM GUIMARÃES BAPTISTA intitulada: **DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA PARA DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DOS METABÓLITOS DA ZEARALENONA: α - E β - ZEARALENOL**, após terem inquirido o aluno e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa. A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 10 de Maio de 2019.



RICARDO WAGNER

Presidente da Banca Examinadora (UFPR)



IVAN ROQUE DE BARROS FILHO

Avaliador Externo (UFPR)



WESLEY MAURICIO DE SOUZA

Avaliador Interno (UFPR)

**Dedico este trabalho aos meus pais,
grandes educadores.**

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por estar comigo em todos os momentos, principalmente nos mais difíceis, me dando força, saúde e sabedoria para a conquista de mais essa vitória.

Aos meus pais, Dirlene e Roberto, que sempre me incentivaram a estudar, adquirir novos conhecimentos e a prosseguir nessa jornada independentemente de quais fossem os obstáculos a serem ultrapassados.

Ao meu irmão, Guilherme, amigo e companheiro.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Ricardo Wagner, que com sua amizade, paciência e infinita sabedoria, me mostrou o caminho das pedras para a construção desta pesquisa científica.

A farmacêutica Graça, pela amizade, disposição e auxílio no uso do HPLC.

Ao pessoal do Hospital Veterinário da Universidade Federal do Paraná, em especial ao Prof. Dr. Ivan Roque e Prof. Dra. Roberta Carareto, que desde o primeiro contato me auxiliaram e colaboraram com a coleta das amostras utilizadas, sem as quais esta pesquisa seria inviável.

A minha amiga e parceira de trabalho, Pamela, por compreender as dificuldades e as ausências no trabalho.

Aos meus amigos Jefferson, Jonathan e Leonardo, pela parceria de vida e disposição em ajudar sempre que preciso.

Aos meus tios Ivan e Linamara, pelas palavras de incentivo que serviram como combustível para concluir esta árdua caminhada.

Aos colegas de mestrado, pela troca de experiência que me proporcionaram. Em especial à Gabriela, Luana, Lucio e Melina, que foram muito além do coleguismo e tornaram-se amigos, os quais levarei para a vida.

A Universidade Federal do Paraná, por propiciar os meios para que essa pesquisa pudesse ser elaborada.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, pelo incentivo prestado aos alunos de pós-graduação.

A todos os professores, que de uma forma ou de outra, contribuíram com a minha formação.

A todos os amigos e familiares, pelo apoio, incentivo e compreensão dedicados a mim.

“A persistência é o menor caminho do êxito”.
Charles Chaplin

RESUMO

A Zearalenona (ZEA) é uma micotoxina produzida por fungos do gênero *Fusarium* que contaminam grãos, especialmente o milho, geralmente ainda no campo, já que estes fungos tem distribuição mundial. Frequentemente associada a ações tóxicas para seres humanos e animais, esta micotoxina provoca desordens reprodutivas, já que juntamente com seus metabólitos, α -zearalenol e β -zearalenol, mimetizam a ação do estrogênio causando o hiperestrogenismo. Neste trabalho foi validada uma metodologia de análise de α - e β - zearalenol baseada em extração pelo método QuEChERS com posterior detecção por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de fluorescência. Os limites de detecção e quantificação determinados foram, respectivamente, 4 e 13 ng mL⁻¹ para α -zearalenol e 60 e 200 ng mL⁻¹ para β -zearalenol. A média dos coeficientes de recuperação para o método de extração dos metabólitos foi de 87,7% para α -zearalenol e 91,3% para β -zearalenol, com desvio padrão relativo de 5,22% e 1,80%, respectivamente. Em seguida ao desenvolvimento e validação do método analítico foi realizado um estudo de ocorrência dos metabólitos da zearalenona em amostras de plasma de cadelas diagnosticadas com câncer de mama. Foram analisadas 50 amostras, obtidas de animais atendidos pelo Hospital Veterinário da Universidade Federal do Paraná. Os resultados encontrados mostram uma ocorrência de positividade de 14% (n=7), em níveis de concentração de 13,6 – 54,0 ng mL⁻¹ com contaminação média de 31,0 ng mL⁻¹ para α - zearalenol e níveis de concentração de 301,7 – 565,7 ng mL⁻¹ com contaminação média de 380,6 ng mL⁻¹ para β - zearalenol. Conclui-se que a presente metodologia é sensível e pode ser eficientemente aplicada para determinar os metabólitos da zearalenona numa matriz complexa como o plasma de uma forma simples, eficiente e confiável. Baseado nos resultados encontrados o método mostrou-se sensível e adequado para determinação de α - e β - zearalenol e que a correlação entre os metabólitos encontrados e câncer de mama em cadelas pode ser evidenciado pela ingestão de ração contaminada com zearalenona.

Palavras-chave: micotoxinas, zearalenona, método QuEChERS, HPLC-FLD, validação

ABSTRACT

The Zearalenone (ZEA) is a mycotoxin produced by fungus of *Fusarium* gender that contaminate grains, especially corn, usually when they are still in the fields, since these fungi are distributed worldwide. It is frequently associated with toxic actions to human beings and animals, this mycotoxin causes reproductive disorders, once that together with its metabolites, α -zearalenol and β - zearalenol, mimic the action of estrogen causing hyperestrogenism. This work validated a methodology for analysis of α - and β - zearalenol based on the extraction by QuEChERS method with subsequent detection by high performance liquid chromatography coupled to fluorescence detector. The limits of detection and quantification were determined, respectively, 4 and 13 ng mL⁻¹ to α -zearalenol and 60 and 200 ng mL⁻¹ to β -zearalenol. The mean recovery coefficients for the method of extraction were 87.7% for α -zearalenol and 91.3% for β -zearalenol, with a standard deviation of 5,22% and 1,80%, respectively. Following the development and validation of the analytical method was a study of the occurrence of zearalenone metabolites in plasma of female dogs diagnosed with breast cancer. At a total, 50 samples were analyzed, obtained from patients attended by the Veterinary Hospital of the Federal university of Paraná. The results showed an incidence of positivity of 14% (n=7), in concentration levels from 13,6 – 54,0 ng mL⁻¹, with average contamination of 31,0 ng mL⁻¹ to α -zearalenol and concentration levels from 301,7 – 565,7 ng mL⁻¹, with average contamination of 380,6 ng mL⁻¹ to β -zearalenol. It is concluded that the present methodology is sensitive and can be efficiently applied to determine the metabolites of zearalenone in a matrix as complex as plasma in a simple, efficient and reliable way. Based on these results, the method was sensitive and suitable for determination of α e β - zearalenol and that the correlation between the metabolites found and breast cancer in female dogs may be evidenced by ingestion of zearalenone-contaminated feed.

Keywords: mycotoxins, zearalenone, QuEChERS method, HPLC-FLD, validation

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1-	FASES DE CRESCIMENTO FÚNGICO E LOCALIZAÇÃO DA SÍNTESE DE MICOTOXINAS.....	22
FIGURA 2-	ILUSTRAÇÃO DO FUNGO <i>F. graminearum</i>	25
FIGURA 3-	ESTRUTURA QUÍMICA DA ZEARALENONA E DE SEUS METABÓLITOS α - E β -ZEARALENOL.....	27
FIGURA 4-	ESTRUTURA QUÍMICA DO HORMÔNIO ESTROGÊNICO 17 β -ESTRADIOL.....	27
FIGURA 5-	REPRESENTAÇÃO DOS METABÓLITOS E PRINCIPAIS ENZIMAS ENVOLVIDAS NA BIOTRANSFORMAÇÃO DA ZEARALENONA.....	32
FIGURA 6-	REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA METABOLIZAÇÃO E EXCREÇÃO DA ZEARALENONA EM SUÍNOS.....	33
FIGURA 7-	REPRESENTAÇÃO DAS ETAPAS DO MÉTODO QuEChERS ORIGINAL.....	39
FIGURA 8-	DETERMINAÇÃO DO TEMPO DE RETENÇÃO DE α - E β -ZEARALENOL.....	57
FIGURA 9-	CURVA ANALÍTICA PREPARADA A PARTIR DAS SOLUÇÕES ANALÍTICAS DE α -ZEARALENOL EM SOLVENTE ORGÂNICO E EM EXTRATO DE MATRIZ EM CINCO CONCENTRAÇÕES (13,1 - 66,6 ng mL ⁻¹).....	58
FIGURA 10-	CURVA ANALÍTICA PREPARADA A PARTIR DAS SOLUÇÕES ANALÍTICAS DE β -ZEARALENOL EM SOLVENTE ORGÂNICO E EM EXTRATO DE MATRIZ EM CINCO CONCENTRAÇÕES (200 - 1000 ng mL ⁻¹).....	59
FIGURA 11-	CURVA ANALÍTICA PREPARADA A PARTIR DAS SOLUÇÕES ANALÍTICAS DA MICOTOXINA ZEARALENONA EM SOLVENTE ORGÂNICO E EM EXTRATO DE MATRIZ EM SETE CONCENTRAÇÕES (5 - 2000 ng mL ⁻¹)	59
FIGURA 12-	CURVA ANALÍTICA DO α -ZEARALENOL.....	60
FIGURA 13-	CURVA ANALÍTICA DO β -ZEARALENOL.....	60
FIGURA 14-	CROMATOGRAMA COM AS CONCENTRAÇÕES DE α - E β -ZEARALENOL.....	61

LISTA DE EQUAÇÕES

EQUAÇÃO 1- CÁLCULO DO EFEITO MATRIZ (%) A PARTIR DA INCLINAÇÃO DAS CURVAS ANALÍTICAS.....	46
EQUAÇÃO 2- CÁLCULO DO EFEITO MATRIZ POR COMPARAÇÃO DAS ÁREAS.....	46
EQUAÇÃO 3- CÁLCULO DA EXATIDÃO.....	48
EQUAÇÃO 4- CÁLCULO DO LIMITE DE DETECÇÃO.....	49
EQUAÇÃO 5- CÁLCULO DO LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO.....	50
EQUAÇÃO 6- CÁLCULO DA ROBUSTEZ.....	50
EQUAÇÃO 7- DETERMINAÇÃO DA PRECISÃO.....	55
EQUAÇÃO 8- DETERMINAÇÃO DA EXATIDÃO.....	55

LISTA DE TABELAS

TABELA 1-	PRINCIPAIS ESPÉCIES FÚNGICAS RESPONSÁVEIS PELA PRODUÇÃO DE MICOTOXINAS.....	21
TABELA 2-	PRINCIPAIS MICOTOXICOSES HUMANAS.....	23
TABELA 3-	PARÂMETROS A SEREM CONSIDERADOS NA VALIDAÇÃO ANALÍTICA.....	45
TABELA 4-	CONDIÇÕES PARA AVALIAÇÃO DA ROBUSTEZ DO MÉTODO.....	50
TABELA 5-	PARÂMETROS UTILIZADOS PARA EXTRAÇÃO PELO MÉTODO QuEChERS.....	53
TABELA 6-	PERCENTUAL DO EFEITO MATRIZ OBSERVADO NA FAIXA ESTUDADA NAS CURVAS ANALÍTICAS PARA CADA NÍVEL DE CONCENTRAÇÃO.....	58
TABELA 7-	PARÂMETROS DAS CURVAS ANALÍTICAS PARA ANÁLISE DE α - E β -ZEARALENOL.....	61
TABELA 8-	ENSAIO DE AVALIAÇÃO DA PRECISÃO PARA α -ZEARALENOL.....	63
TABELA 9-	ENSAIO DE AVALIAÇÃO DA PRECISÃO PARA β -ZEARALENOL.....	63
TABELA 10-	PRECISÃO INSTRUMENTAL REFERENTE A INJEÇÃO DO PADRÃO DE β -ZEARALENOL.....	64
TABELA 11-	CONCENTRAÇÕES DOS METABÓLITOS α - E β -ZEARALENOL ENCONTRADAS NAS AMOSTRAS DE CADELAS DIAGNOSTICADAS COM CÂNCER DE MAMA.....	65

LISTA SIGLAS

A	–	coeficiente angular
ACN	–	acetonitrila
ANVISA	–	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
C	–	concentração
CEUA	–	Comitê Ética em Uso Animal
CLAE	–	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CMD	–	concentração média determinada
DON	–	deoxinivalenol
DP	–	desvio padrão
DPR	–	desvio padrão relativo
D-SPE	–	extração em fase sólida dispersiva, do idioma inglês <i>Dispersive Solid Phase Extraction</i>
ER	–	receptores de estrogênio
FLD	–	detector de fluorescência
FUN	–	Fumonisina
GC – ECD	–	Cromatografia Gasosa com detector por captura de elétrons
GC – NPD	–	Cromatografia Gasosa com detector de Nitrogênio-Fósforo
HSD	–	hidroxiesteróide desidrogenase
Ka	–	constante cinética
LLE	–	extração líquido-líquido
LMT	–	limite máximo tolerado
LOD	–	limite de detecção, do idioma inglês <i>Limit of detection</i>
LOQ	–	limite de quantificação, do idioma inglês <i>Limit of quantification</i>
LVI	–	injeção de grande volume, do idioma inglês <i>Large volume injection</i>
MgSO ₄	–	Sulfato de Magnésio
NaCl	–	Cloreto de Sódio
NaSO ₄	–	Sulfato de Sódio

OMS	–	Organização Mundial da Saúde
PLE	–	extração líquido pressurizada
PSA <i>Amine</i>	–	amina primária secundária, do idioma inglês <i>Primary and Secondary</i>
PTV	–	temperatura programada vaporizada, do idioma inglês <i>Programmed temperature vaporized</i>
QuEChERS	–	do idioma inglês <i>Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe</i> . Em português: Rápido, fácil, econômico, efetivo, robusto e seguro.
r	–	coeficiente de correlação linear de Pearson
RDC	–	Resolução da Diretoria Colegiada
RSD	–	Desvio padrão relativo, do idioma inglês <i>Relative Standard Deviation</i>
SLE	–	extração sólido-líquido
SPE	–	extração em fase sólida
SQR	–	Substância química de referência
UDFGT	–	glucuronil-difosfatouridina-trasnferase-1
ZAN	–	Zearalanona
ZEA	–	Zearalenona
α - ZAL	–	α -zearalanona
α - ZOL	–	α -zearalenol
β – ZAL	–	β -zearalanona
β - ZOL	–	β -zearalenol

LISTA DE SÍMBOLOS

%	–	Porcentagem
cm	–	Centímetro
DP	–	Desvio Padrão
h	–	Horas
Kg	–	Quilograma
L	–	Litro
m	–	Metro
mg	–	Miligrama
mL	–	Mililitro
ng	–	Nanogramas
nm	–	Nanômetros
°C	–	Graus Celsius
pH	–	Potencial Hidrogeniônico
R	–	Radical
α	–	Letra grega <i>alpha</i>
β	–	Letra grega <i>beta</i>
μm	–	Micromêtro
β	–	Letra grega <i>beta</i>
μm	–	Micromêtro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
2	OBJETIVO	20
2.1	OBJETIVO GERAL	20
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
3	REVISÃO DA LITERATURA	21
3.1	MICOTOXINAS	21
3.2	O GÊNERO <i>FUSARIUM</i>	24
3.3	ZEARALENONA	25
3.3.1	Estrutura química e histórico	26
3.3.2	Ocorrência	27
3.3.2.1	Ocorrência da Zearalenona no milho	28
3.3.3	Legislação	29
3.3.4	Toxicocinética	29
3.3.5	Toxicodinâmica	33
3.4	MÉTODOS ANALÍTICOS	35
3.4.1	Métodos de Extração	36
3.4.1.1	A extração líquido-líquido (LLE)	36
3.4.1.2	Extração em fase sólida (SPE)	37
3.4.1.3	Microextração em fase sólida (SPE)	37
3.4.1.4	Extração sólido-líquido (SLE)	38
3.4.1.5	Extração líquido pressurizado (PLE)	38
3.5	O MÉTODO QuEChERS	38
3.5.1	Método QuEChERS original	38
3.5.2	O solvente de extração	40
3.5.3	A adição de sais e a separação de fases	40
3.5.4	Método QuEChERS modificações	41

3.5.5 Praticidade e versatilidade no método QuEChERS.....	43
3.5.6 Limitações no método QuEChERS	43
3.6 VALIDAÇÃO.....	44
3.6.1 Seletividade.....	45
3.6.2 Efeito Matriz.....	45
3.6.3 Curva analítica e Linearidade	47
3.6.4 Precisão.....	47
3.6.5 Exatidão	48
3.6.6 Limite de detecção	48
3.6.7 Limite de quantificação	49
3.6.8 Robustez	50
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	51
4.1 REATIVOS.....	51
4.2 PREPARO DAS SOLUÇÕES.....	52
4.3 EQUIPAMENTOS	52
4.4 AMOSTRAS DE SANGUE	52
4.5 EXTRAÇÃO DE α E β - ZEARALENOL DO PLASMA	53
4.6 ANÁLISE QUÍMICA DE α E β - ZEARALENOL.....	53
4.7 PARÂMETROS AVALIADOS NA VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA	54
4.7.1 Determinação da Seletividade	54
4.7.2 Determinação da Linearidade.....	54
4.7.3 Determinação da Precisão.....	54
4.7.4 Determinação da Exatidão.....	55
4.7.5 Determinação do Limite de detecção e quantificação	55
4.7.6 Determinação da Robustez	56
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	56
5.1 DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA DETERMINAÇÃO DE α E β - ZEARALENOL.....	56

5.1.1 Determinação do tempo de retenção de α - e β - zearalenol.....	56
5.1.2 Avaliação da seletividade do método analítico	57
5.1.3 Avaliação do Efeito Matriz.....	57
5.1.4 Avaliação da linearidade do método analítico.....	60
5.1.5 Limites de Detecção e Quantificação	62
5.1.6 Avaliação da Exatidão e Precisão.....	62
5.1.7 Avaliação da Robustez	64
5.2 AVALIAÇÃO DAS AMOSTRAS DE CADELAS PORTADORAS DE CÂNCER DE MAMA.....	64
6 CONCLUSÕES	67
REFERÊNCIAS	69

1 INTRODUÇÃO

As micotoxinas são metabólitos secundários naturais produzidos por fungos toxicogênicos, como espécies de *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium* (RICHARD, 2007). Cerca de 400 tipos de micotoxinas já foram descobertos, a maioria desde a década de 1960, e geralmente são categorizados em grupos com base em semelhanças estruturais (BENNETT; KLICH, 2003; BHAT; RAI; KARIM, 2010). Entre as micotoxinas do gênero *Fusarium*, as deoxinivalenol (DON) e zearalenona (ZEA) são de maior importância (DÖLL; DÄNICKE, 2011).

A contaminação de produtos agrícolas por fungos toxicogênicos pode ocorrer em toda a cadeia de produção alimentar, desde o campo até o transporte e armazenamento. Ainda, por apresentarem grande estabilidade química, as micotoxinas podem permanecer no alimento mesmo após a remoção dos fungos pelos processos usuais de industrialização e embalagem (CAST, 2003).

Todas as micotoxinas são prejudiciais de diferentes maneiras, exibindo toxicidade aguda e crônica, como genotoxicidade, toxicidade cancerígena, imunotoxicidade (imunoestimulante ou imunossupressora), mutagenicidade, nefrotoxicidade e teratogenicidade (EFSA, 2014).

Zearalenona é uma micotoxina produzida por várias espécies de fungos do gênero *Fusarium*, principalmente *F. culmorum*, *F. graminearum*, *F. cerealis*, *F. equiseti* e *F. semitectum*, que são fungos comuns do solo, em países temperados e quentes, e são contaminantes regulares no cultivo de cereais no mundo todo (MANKA et al., 1985; BENNETT; KLICH, 2003). Essa micotoxina é altamente resistente à temperatura, e foi encontrada em diversos produtos cereais como milho, farinha, malte, soja e arroz (KWAŚNIEWSKA; GADZAŁA-KOPCIUCH; CENDROWSKI, 2015).

Devido à alta frequência de contaminação de cereais e seus derivados (ZINEDINE et al., 2007), faz-se necessária a adoção de medidas para evitar danos à saúde de seres humanos e animais de criação, por meio do monitoramento e controle desta toxina em diversos níveis da cadeia produtiva (TANAKA et al., 2000; BULLERMAN; BIANCHINI, 2007).

Existem diferentes técnicas de extração adequadas para o isolamento das micotoxinas, como a extração líquido-líquido (LLE) e a extração em fase sólida (SPE) para amostras líquidas, e extração líquida pressurizada (PLE) e extração sólido-líquida (SLE) para amostras sólidas, entre outras (KOPPEN et al., 2010; CAPRIOTTI et al., 2012).

A seleção do método depende da natureza da matriz, suas características e complexidade. No entanto, alguns desses métodos apresentam custo muito elevado, além da

morosidade de suas diversas etapas e ainda a utilização de grandes volumes de solvente. O método QuEChERS (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe*) que tem como vantagens ser rápido, fácil, econômico, efetivo, robusto e seguro, é uma alternativa adequada para a extração de micotoxinas e explora as possibilidades oferecidas pela instrumentação analítica moderna (ANASTASSIADES et al., 2003; MIRÓ-ABELLA et al., 2017).

Desta maneira este trabalho propõe estudar um método de extração mais rápido e eficiente para posterior análise por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de fluorescência.

2 OBJETIVO

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver uma metodologia de análise dos metabólitos da toxina fúngica zearalenona (α - e β -zearalenol) que seja de menor custo possível, mais acessível e de fácil aplicabilidade, utilizando a técnica de extração QuEChERS e análise por CLAE-FLD.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Padronizar a metodologia de extração por metodologia QuEChERS

Validar a metodologia de CLAE-FLD desenvolvida.

Determinar a seletividade, linearidade, precisão, limite de detecção (sensibilidade), limite de quantificação, exatidão e robustez.

Demonstrar a aplicabilidade do método desenvolvido utilizando soro de cadelas diagnosticadas com câncer de mama e pesquisar os metabólitos α - e β -zearalenol.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 MICOTOXINAS

As micotoxinas (do grego “mykes”, fungo, e do latim “toxicum”, veneno) são substâncias tóxicas resultantes do metabolismo secundário de fungos, produzidas durante o crescimento fúngico e podem ser encontradas nas hifas e nos esporos desses organismos. Sua produção se dá no campo durante a estação de crescimento, colheita, secagem e armazenamento (CAST, 2003). Se ingeridas, as micotoxinas podem causar doenças, de forma aguda ou crônica, denominadas micotoxicoses. O interesse pelo estudo das micotoxinas se tornou mais evidente após a descoberta das aflatoxinas na Inglaterra, em 1960 (KOPPEN et al., 2010; MILIĆEVIĆ; ŠKRINJAR; BALTIC, 2010).

No que diz respeito à sua presença, destacam-se as micotoxinas especificadas abaixo (TABELA 1).

TABELA 1- PRINCIPAIS ESPÉCIES FÚNGICAS RESPONSÁVEIS PELA PRODUÇÃO DE MICOTOXINAS

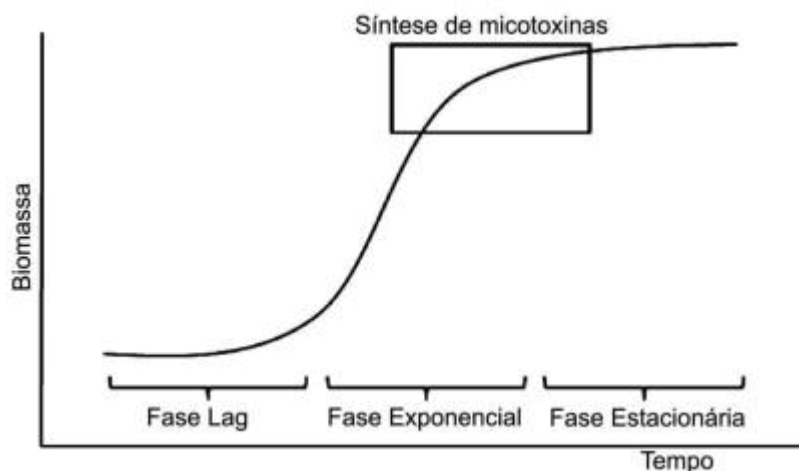
Micotoxinas	Espécies produtoras
Aflatoxinas	<i>Aspergillus flavus</i> ; <i>A. parasiticus</i>
Ocratoxina A	<i>Aspergillus ochraceus</i> ; <i>A. alliaceus</i> ; <i>A. niger</i> ; <i>A. carbonarius</i> , <i>Penicillium verrucosum</i> ; <i>P. nordicum</i>
Tricotecenos	<i>Fusarium spp.</i>
Zearalenona	<i>F. graminearum</i>
Fumonisinias	<i>F. moniliforme</i> (= <i>F. verticillioides</i>); <i>F. proliferatum</i>

FONTE: Marques (2007).

Os fatores mais importantes durante o processo de produção da micotoxina são a disponibilidade de água para o crescimento do fungo produtor e a temperatura, que afeta o crescimento e a saúde das plantas e a competitividade do fungo micotoxinogênico (MARTINS; MARTINS, 2002). Os gêneros mais importantes na produção das micotoxinas são os *Aspergillus*, *Claviceps*, *Penicillium* e *Fusarium* (RICHARD, 2007).

O momento em que ocorre a produção das micotoxinas se dá quando os fungos estão diante de condições de estresse, sejam climáticas, presença de pragas, alteração nas concentrações de oxigênio e dióxido de carbono, entre outros (CAST, 2003). Sua formação se dá no final da fase exponencial e no princípio da fase estacionária do crescimento dos fungos, estando associadas a fase de diferenciação e esporulação (FIGURA 1).

FIGURA 1- FASES DE CRESCIMENTO FÚNGICO E LOCALIZAÇÃO DA SÍNTESE DE MICOTOXINAS.



FONTE: Castillo (2007)

São considerados fatores críticos para a produção de ZEA a presença de oxigênio e o teor de umidade. O crescimento do gênero *Fusarium* ocorre durante um período de 3 semanas em níveis de umidade de mais de 20% e temperatura entre 20 e 25 °C em culturas de laboratórios (CASTILLO, 2007).

É fundamental que ocorra grande variação térmica para se ter a produção de micotoxinas por fungos *Fusarium*, como comprovado por Martins e Martins (2002) em estudo *in vitro*. Os autores verificaram que a maior produção de ZEA ocorreu no milho incubado a 28 °C por 15 dias e seguidos de diminuição na temperatura para 12 °C. Encontram-se essas condições em regiões de clima temperado da América, Europa e Ásia (CREPPY, 2002).

No final do verão ou início do outono, em decorrência da variação da temperatura e umidade, pode ocorrer ainda no campo e no cultivo dos grãos a produção rápida da ZEA. Concentrações elevadas podem ser encontradas nos grãos devido ao armazenamento inadequado, especialmente em decorrência do alto teor de umidade. Sua ocorrência é frequentemente observada em grãos com outra micotoxina derivada do gênero *Fusarium*, a desoxinivalenol (CASTELL et al., 2005).

As fusariotoxinas são facilmente encontradas em cereais e seus produtos, que compõem uma parte importante da alimentação humana e animal. Cultivos altamente contaminados são frequentemente destinados à alimentação animal (BENNETT; KLICH, 2003; SUDAKIN, 2003).

Os ingredientes de formulações de alimentos para animais são um bom substrato para contaminação por fungos, principalmente aqueles produtores de micotoxinas. No Brasil e em

outros países tropicais, as fumosinas, as aflatoxinas e a zearalenona são de grande importância, pois podem causar efeitos tóxicos em seres humanos e animais, além de perdas econômicas na cadeia de produção de alimentos para animais (CAST, 2003).

A principal exposição animal e humana às micotoxinas provém de ingestão crônica de alimentos contaminados. A exposição humana pode se dar de maneira direta, através da ingestão de cereais, ou de forma indireta, pela contaminação de produtos de origem animal (CAST, 2003). As principais micotoxicoses humanas estão apresentadas a seguir (TABELA 2):

TABELA 2 - PRINCIPAIS MICOTOXICOSES HUMANAS

Micotoxicose	Alimento	Agente etiológico
Akakabio-byo	Trigo, cevada, aveia, arroz	<i>Fusarium spp.</i>
Alimentar aleukiaóxicos	Cereais	<i>Fusarium spp.</i>
Nefropatia dos balcãs	Cereais	<i>Penicillium</i>
Beribéri cardíaca	Arroz	<i>Aspergillus spp., Penicillium spp.</i>
Dendroochiotoxicosis	Forragem	<i>Dendroochiumtoxicum</i>
Ergotismo	Centeio, cereais	<i>Claviceps purpurea</i>
Tumores de esôfago	Milho	<i>Fusarium moniliforme</i>
Hepatocarcinoma (aflatoxicose aguda)	Cereais, amendoim	<i>Aspergillus flavus, Aspergillus parasiticus</i>
Doença kashin Beck "doença urov"	Cereais	<i>Fusarium</i>
Kwashiorkor	Cereais	<i>Aspergillus flavus, Aspergillus parasiticus</i>
Síndrome de Reye	Grãos de cereais	<i>Aspergillus</i>
Stachybotryotoxicosis	Cereais, forragens	<i>Stachybotrys atra</i>

FONTE: Silva (2017)

O risco provocado pela exposição à micotoxinas tem levado governos a regular a sua presença em alimentos. No Brasil a Resolução RDC N° 07, de 9 de março de 2011, emitida pela ANVISA, estabelece os Limites Máximos Tolerados (LMT) para diversas micotoxinas em várias matrizes alimentícias, prevendo ainda o acirramento de níveis tolerados para o futuro próximo.

Os danos causados à saúde pelas micotoxicoses dependem de diversos fatores como concentração e duração da exposição à toxina, da toxicidade do composto (efeitos agudos ou

crônicos), o peso corporal do indivíduo e a ocorrência de sinergismo entre as micotoxinas (KUIPER-GOODMAN, 1991; BENNETT; KLICH, 2003).

Apesar de centenas de micotoxinas já terem sido identificadas, informações sobre muitas delas ainda são limitadas em relação à sua ocorrência natural, estabilidade em alimentos e toxicidade para humanos e animais. Frente à diversidade das manifestações toxicológicas e das perdas econômicas, há uma necessidade contínua de proteger a saúde dos seres humanos e dos animais suscetíveis, limitando sua exposição a essas toxinas (MILIĆEVIĆ; ŠKRINJAR; BALTIC, 2010).

A ocorrência de micotoxinas em alimentos comerciais para cães foi relatada por vários pesquisadores (BÖHM et al., 2010; GAZZOTTI et al., 2015), mas há poucos dados sobre o grau de exposição natural de cães no Brasil (SCUSSEL et al., 2006). O controle deve ser administrado pelos governos de cada país, através de ministérios e organizações, tais como o Ministério da Saúde e da Agricultura. Além disso, tanto os produtores quanto a indústria de alimentos e rações devem receber treinamento e incentivo através de políticas públicas para prevenir e controlar a contaminação por micotoxinas em seus produtos (ATANDA et al., 2012).

3.2 O GÊNERO *FUSARIUM*

Uma grande quantidade de espécies pertence ao gênero *Fusarium*, que geralmente são fitopatógenas e saprófitas do solo, a minoria prejudicial ao homem. Na posição sistemática é definida como pertencente ao *Reino Fungi*, *Divisão Eumycota*, *Subdivisão Deuteromycotina*, *Classe Hyphomycetes*, *Ordem Moniliales*, *Família Moniliaceae*, *Gênero Fusarium segundo* (LACAZ; PORTO; MARTINS, 2008).

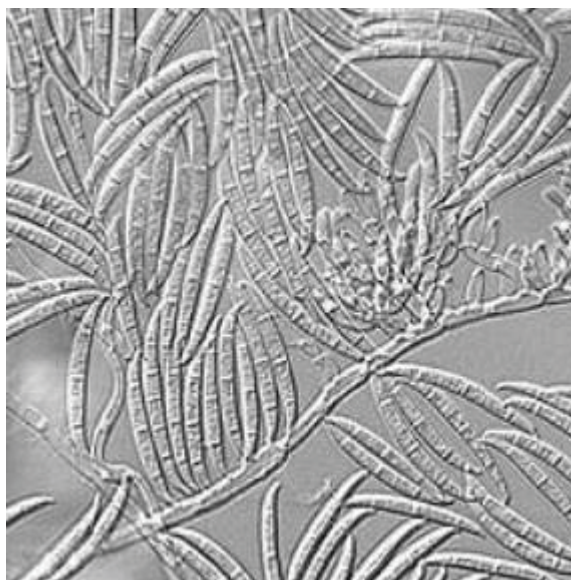
A maior parte das espécies deste gênero habita a parte subterrânea e raízes das plantas, fragmentos vegetais e compostos orgânicos depositados até 100 cm de profundidade do solo. Estes fungos, parasitas ou saprófitas, dispersam seus propágulos por ação da água de chuva, ventos e insetos. Outros grupos habitam as regiões aéreas superiores de plantas e disseminam seus propágulos com a água proveniente da chuva. São importantes fitopatógenos causando cancro em brotos, lesão em galhos e obstrução em inflorescências (BURGESS, 2001).

Em sua maioria, as espécies do gênero *Fusarium* parasitam semente de cereais e outros frutos do campo, causando prejuízo antes e depois da colheita. Certas espécies produzem toxinas que podem atingir a permeabilidade da membrana celular, ocasionando a interrupção do metabolismo celular das plantas. A espécie *Fusarium oxysporum* já provocou doenças em

tomate, batata-doce, peras, doenças no Panamá, trazendo como consequência o abandono de milhares de acres na América Central (MILLS, 1989).

O fungo *F. graminearum* também conhecido por *Gibberella zeae* (FIGURA 2) é responsável pela fusariose do trigo e do milho e sobrevive na forma de ascósporos nos hospedeiros secundários como as plantas, os grãos e os cereais e em sementes na forma de micélio (MCGEE, 1988; REIS; CASA, 1996). A disseminação é favorecida em condições de clima quente e úmido pela formação de peritécios sobre os tecidos infectados (SHURTLEFF, 1992).

FIGURA 2- ILUSTRAÇÃO DO FUNGO *F. graminearum*



FONTE: Mostrom (2007)

3.3 ZEARALENONA

Em 1962, Stob e colaboradores isolaram um metabólito ativo que apresentou atividades estrogênica e anabólica a partir de culturas de *G. zeae* (*F. graminearum*). Este metabólito ativo com característica estrogênica foi nomeado zearalenona, anteriormente conhecido como toxina F-2. Assim, a ZEA foi isolada e caracterizada em 1962 e sua estrutura foi elucidada em 1966 (URRY et al., 1966).

A ZEA exibe uma fluorescência azul-esverdeada, quando excitada com luz ultravioleta de ondas longas de 360 nm e uma fluorescência verde mais intensa quando é excitada com luz ultravioleta de ondas curtas de 254 (OMS, 1983).

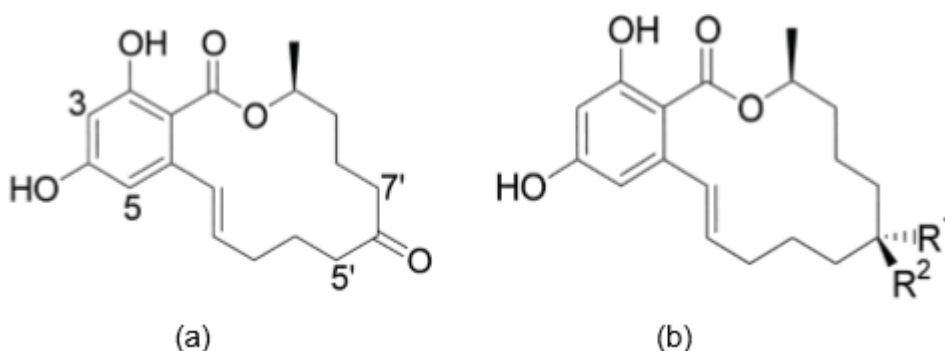
3.3.1 Estrutura química e histórico

A ZEA é um sólido branco cristalino, descrita quimicamente como uma lactona e pode ser produzida por várias espécies de *Fusarium*, sendo que *Fusarium graminearum* e *Fusarium culmorum* são os principais produtores (ZINEDINE et al., 2007). Estas espécies são conhecidas por colonizarem cereais e mostrarem tendência a se desenvolver em baixas temperaturas (OMS, 1983).

Zearalenona é uma lactona ácida resorcílica, sendo o radical “-eno” pela dupla ligação entre os carbonos C1 e C2 e o “-ona” pela presença do grupo cetona no C6. É insolúvel em água, mas solúvel em éter, álcoois e benzeno (URRY et al., 1966). Em mamíferos, o grupamento ceto no C8 é reduzido a dois metabólitos estereoisômeros de ZEA (α - e β -isômeros), como mostra a FIGURA 3. Estes metabólitos são também produzidos pelos fungos, porém em concentrações muito menores que a ZEA (CCFAC, 2000).

A ZEA possui características estrogênicas e apresenta semelhança química com a estrutura do hormônio estrogênico 17 β -estradiol (FIGURA 4) (BOEIRA, 2012). Em experimentos *in vitro*, se liga aos receptores de estrogênio com afinidade semelhante para as formas α e β (KUIPER et al., 1998). Apesar de ter uma afinidade menor pelos receptores de estrogênio do que o 17 β -estradiol, a ZEA atua através destes receptores para ativar a transcrição de genes responsivos a estrogênio, *in vivo* e *in vitro*, além de promover efeitos estrogênicos indesejáveis (MEHMOOD et al., 2000).

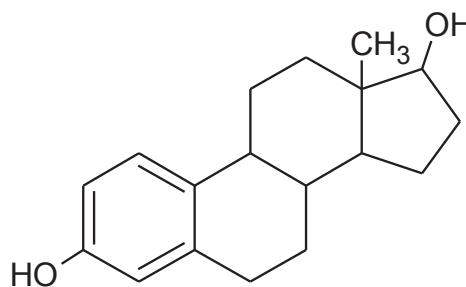
FIGURA 3 – ESTRUTURA QUÍMICA DA ZEA



(a) e de seus metabólitos (b) α -zearalenol ($R_1=OH$ e $R_2=H$) e β -zearalenol ($R_1=H$ e $R_2=OH$).

FONTE: Bennett e Klich (2003).

FIGURA 4 – ESTRUTURA QUÍMICA DO HORMÔNIO ESTROGÊNICO 17 β -ESTRADIOL



FONTE: Zinedine et al (2007)

3.3.2 Ocorrência

A ZEA pode ser produzida em diversos substratos como trigo, cevada, milho, silagem de milho, arroz, sorgo, e casualmente, nas forragens. Entretanto, o milho é o vegetal mais susceptível à contaminação pelos fungos fitopatogênicos do gênero *Fusarium* (KUMAR et al., 2008; SALAY; MERCADANTE, 2002).

A zearalenona é uma micotoxina estrogênica de ocorrência natural e tem sido associada a manifestações clínicas de vários efeitos estrogênicos em seres humanos e animais (FLECK et al., 2016; STOPA et al., 2016; POOR et al., 2017). Apesar de apresentar baixa toxicidade aguda, ZEA provou ser hepatotóxica, hematotóxica, imunotóxica, genotóxica, teratogênica e carcinogênica para uma série de espécies de mamíferos (ZINEDINE et al., 2007).

Há pouca informação conclusiva sobre os efeitos da zearalenona em seres humanos (WARTH et al., 2013). A preocupação com a ingestão deste composto estrogênico aumentou devido a relatos de desenvolvimento precoce de puberdade em crianças de 7 e 8 anos de idade em Porto Rico (SAENZ DE RODRIGUEZ; BONGIOVANNI; CONDE DE BORREGO, 1985).

Em 2000, cientistas húngaros reportaram um aumento da incidência da telarca precoce¹ em crianças com idades compreendidas entre os 6 meses e os 8 anos. Neste caso, a ZEA foi detectada no sangue e nos alimentos ingeridos pelas crianças (SCF, 2000), podendo ter sido o importante agente etiológico desta intoxicação (CAST, 2003).

Um estudo controle realizado na Tunísia avaliou as concentrações de ZEA e seus metabólitos na urina de mulheres diagnosticadas com câncer de mama e encontrou uma correlação entre o aumento no risco de câncer de mama e a presença de metabólitos da ZEA na urina (BELHASSEN et al., 2015).

¹ Desenvolvimento das mamas em meninas, que geralmente ocorre após os 8 anos de idade e é acompanhada por outros sinais de puberdade, incluindo um surto de crescimento.

Os efeitos tóxicos causados na maioria dos animais são semelhantes aos que se originam da exposição a altas concentrações de estrogênio, caracterizadas por infertilidade, lactação anormal, aborto, mastite, vaginite ou prolapso vaginal e retal (CAST, 2003). Há relatos de alterações no sistema reprodutor de cães após 7 dias em doses diárias de 200 µg/Kg de peso corporal e efeitos sobre as concentrações sanguíneas de hormônios sexuais após a exposição a doses mais altas durante um período mais longo de tempo (75 µg/Kg de peso corporal por 42 dias) (GAJECKA et al., 2004; STOPA et al., 2014).

Em animais domésticos, o envenenamento por ZEA tem sido associado a síndromes hiperestrogênicas. Os porcos são geralmente os mais afetados, sendo relatada a ocorrência de problemas genito-urinários. Os principais sintomas de intoxicação incluem hiperemia e edema da vulva em fêmeas pré-púberes e, em casos graves, prolapso da vagina e reto (ZÖLLNER et al., 2002; DÄNICKE et al., 2005).

3.3.2.1 Ocorrência da Zearalenona no milho

A ZEA possui distribuição mundial e ocorre em diversos cereais, principalmente no milho (SILVA; VARGAS, 2001) decorrente principalmente do fungo *F. graminearum*, um importante produtor de ZEA e frequentemente isolado neste grão (MARTINS; MARTINS, 2002). Acredita-se que com a expansão mundial do comércio de grãos o fungo tenha se espalhado de um país a outro (D'MELLO; PLACINTA; MACDONALD, 1999).

A prevalência de ZEA no milho do Brasil dos anos de 1990 a 2000 foi avaliada por Salay e Mercadante (2002). Neste estudo, mais de 50% das amostras dos estados do Rio Grande do Sul, Paraná, Goiás e Mato Grosso do Sul estavam contaminadas. Em outro levantamento realizado também no Brasil, Mallmann e Dilken (2007) analisaram 65.361 amostras colhidas aleatoriamente nas indústrias de ração do país e em 14,8% das amostras de farelo de milho destinados à ração estavam contaminadas, sendo que em alguns momentos do ano ultrapassou os 45%.

A prevalência de micotoxinas na indústria de alimentos da Europa, Ásia e Oceania foi mensurada no período de 2003 a 2005. Na Ásia e Oceania a ZEA foi o contaminante mais comum das amostras de glúten de milho com taxa de contaminação de 92%, com concentração média de 272 µg/kg e máxima de 3.158 µg/kg. Também foi encontrada em 37% das amostras de produtos destinados a alimentação animal e ração em concentração média de 114 µg/kg e máxima de 4.132 µg/kg. Nas amostras de milho da Europa e região do Mediterrâneo a ZEA foi

detectada em 63% do material analisado, com níveis máximos de 1.958 µg/kg e média de 71 µg/kg (BINDER et al., 2007).

3.3.3 Legislação

Desde a descoberta das micotoxinas, muitos países tiveram a necessidade de criar uma legislação adequada, com o objetivo de proteger os consumidores dos efeitos nocivos das mesmas. No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) estabeleceu limites em diversos tipos de alimentos destinados ao consumo humano, através da Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 07, de 18 de março de 2011.

Na Europa, os limites máximos para micotoxinas são definidos no Regulamento nº 188 de 19 de dezembro de 2006. Comparando a legislação brasileira e europeia, observa-se uma diferença em relação aos limites máximos permitidos de ZEA. Estes valores são menores na legislação da Europa.

A ZEA é uma micotoxina frequentemente analisada. Os principais problemas de regulação e controle até agora foram a falta de métodos analíticos rápidos e a falta de comparabilidade dos resultados das medições e dos materiais de referência adequados (MILIĆEVIĆ; ŠKRINJAR; BALTIĆ, 2010).

Para dar suporte à aplicação de regulamentos, proteger a saúde dos consumidores e facilitar o comércio doméstico e internacional de alimentos, o método analítico deve produzir resultados de alta qualidade em um curto espaço de tempo e a um custo acessível. Para atender esses desafios, foram relatados vários métodos para descrever a preparação de amostras e a instrumentação para a determinação de micotoxinas em alimentos (TURNER; SUBRAHMANYAM; PILETSKY, 2009).

3.3.4 Toxicocinética

A zearalenona após administração oral é absorvida ligeiramente (AVANTAGGIATO et al., 2003; CAVRET; LECOEUR, 2006). Em suínos, a absorção após uma dose de 10 mg/kg de peso vivo é de aproximadamente 80 a 85% (BIEHL et al., 1993). Depois da administração da micotoxina, ocorre a distribuição para os órgãos reprodutores (ovário e útero), tecido adiposo, tecido intersticial e células dos testículos (KUIPER-GOODMAN; SCOTT; WATANABE, 1987). A absorção de ZEA segue uma cinética de primeira ordem, com K_a

(constante cinética) igual a 9,3 mg/hora em ratos (RAMOS; FINK-GREMMELS; HERNANDEZ, 1996).

Durante a biotransformação em mamíferos ocorre o desenvolvimento de dois metabólitos estereoisômeros da ZEA, α - e β - zearalenol que, do mesmo modo, possuem ação estrogênica. Ocorre também a produção pelos fungos, entretanto, em uma concentração inferior à produzida no decorrer da metabolização da ZEA no organismo animal (ZINEDINE et al., 2007).

O conhecimento a respeito dos mecanismos de biotransformação é de fundamental relevância para a compreensão dos efeitos tóxicos provenientes da exposição aguda a micotoxinas. As espécies animais demonstram diversos sistemas enzimáticos que convertem as substâncias tóxicas em substâncias mais hidrofílicas para serem excretadas do organismo. Em certos casos os produtos da biotransformação possuem toxicidade mais acentuada que o próprio substrato, como ocorre com a ZEA (D'MELLO et al., 1999). Ainda, espécies animais reagem de modos diferentes aos efeitos tóxicos da ZEA, relacionados com a metabolização hepática desta micotoxina.

Células microssomais hepáticas de suínos produzem maior quantidade de α -zearalenol, que possui maior atividade estrogênica se comparado com β -zearalenol, enquanto microssomas de frango produzem a maior quantidade de β -zearalenol (MALEKINEJAD; MAAS-BAKKER; FINK-GREMMELS, 2006).

A biotransformação da ZEA está representada esquematicamente (FIGURA 5). Sua biotransformação pode ser por duas vias, a via 1, por hidroxilação; e a via 2, por conjugação ao ácido glicurônico (OLSEN et al., 1981) que inativa a ZEA e seus metabólitos. A via 1 consiste na formação de α - e β - zearalenol (α - e β -ZOL) e zearalanona (ZAN), catalisada pelas enzimas 3α - e 3β hidroxisteróide desidrogenase (HSD). Na via 2 a conjugação da ZEA e de seus metabólitos com ácido glicurônico é catalisada pela glucuronil-difosfatouridina-transferase I (UDFGT) (OLSEN et al., 1981). As enzimas 3α - e 3β -HSD estão presentes em vários órgãos e são responsáveis pelo metabolismo dos hormônios esteróides (FINK-GREMMELS; MALEKINEJAD, 2007).

O mecanismo de ação das 3α - e 3β - HSD na biotransformação da ZEA não é completamente conhecido em animais. Em seres humanos essas enzimas agem na presença de dinucleotídeo de nicotinamida adenina reduzido (NADH) e exercem uma função importante na regulação dos hormônios esteróides em nível de receptores (THOMAS et al., 2004).

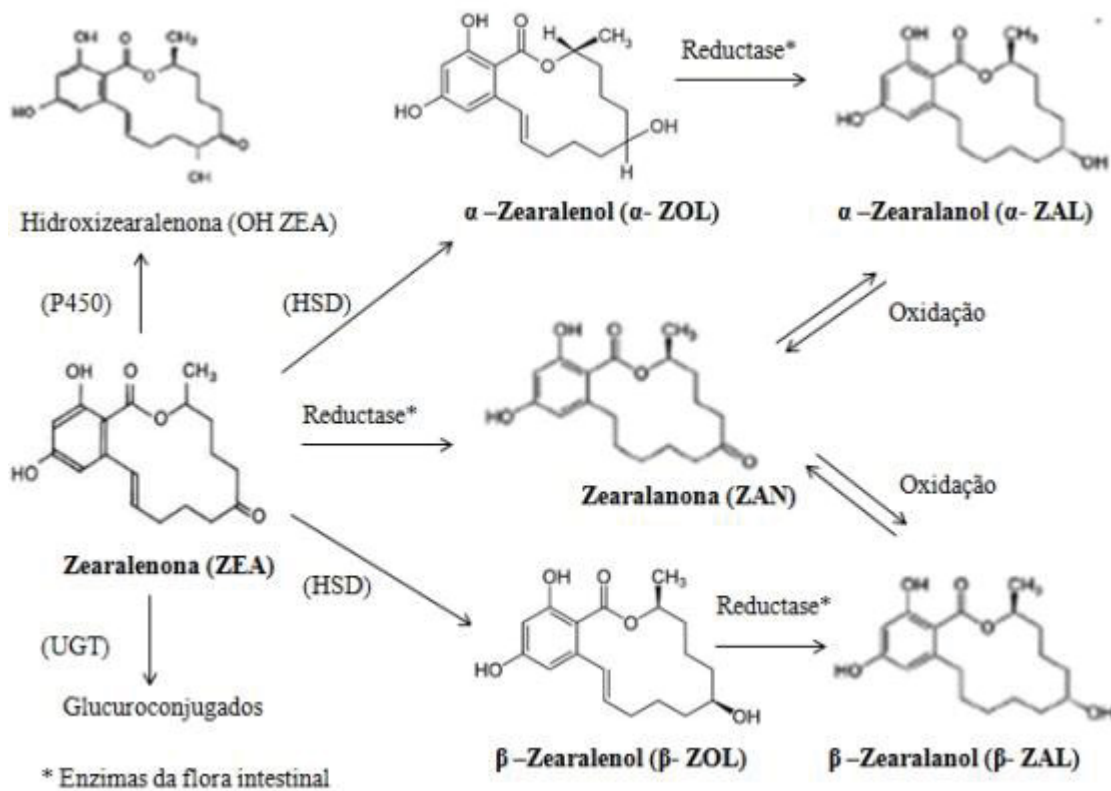
Em exposição prolongada no organismo, a ZEA compete com os hormônios esteróides por servir de substrato às enzimas 3α - e 3β -hidroxisteróide desidrogenase. Além disso, em

suínos e, provavelmente, em seres humanos, a ZEA é rapidamente absorvida após a administração oral e pode ser metabolizada nas células intestinais. Nessas células, a ZEA é degradada em α - e β - zearalenol (α - e β -ZOL) e α - e β - zearalanol (α - e β -ZAL), que são posteriormente conjugados com ácido glicurônico (JECFA, 2000).

O principal órgão responsável pela conversão da micotoxina em α -zearalenol e β -zearalenol é o fígado, e esta rota foi descrita por diversos autores em várias espécies, como nos ratos, suínos, perus e galinhas (JECFA, 2000).

O metabólito α -zearalenol possui maior potencial estrogênico que a ZEA e o β -zearalenol (CELIUS et al., 1999; MINERVINI; DELL'AQUILA, 2008; MALEKINEJAD; MAAS-BAKKER; FINK-GREMMELS, 2006), uma vez que possui maior afinidade pela ligação com os receptores de estrogênio (CELIUS et al., 1999). Assim, a hidroxilação da zearalenona para α -zearalenol aparentemente é um processo de ativação, enquanto que a produção de β -zearalenol seria um processo de desativação. Em suínos há predominância da conversão da ZEA em α -zearalenol em decorrência da eficiência da enzima 3- α -HSD. Outra particularidade dos suínos é que, comparados às outras espécies animais, possuem menor capacidade de glicuronidação e, portanto, menor capacidade de inativação da ZEA e de seus metabólitos (FINK-GREMMELS; MALEKINEJAD, 2007). Somadas estas características e particularidades da metabolização da ZEA explica-se o fato desta espécie ser a mais sensível aos efeitos de ordem reprodutiva em relação a esta micotoxina. Além disso, os suínos estão diretamente expostos à ZEA por terem sua base alimentar constituída de milho, sendo especialmente mais sensíveis aos seus efeitos tóxicos comparando-os as outras espécies animais (MALEKINEJAD; MAAS-BAKKER; FINK-GREMMELS, 2006).

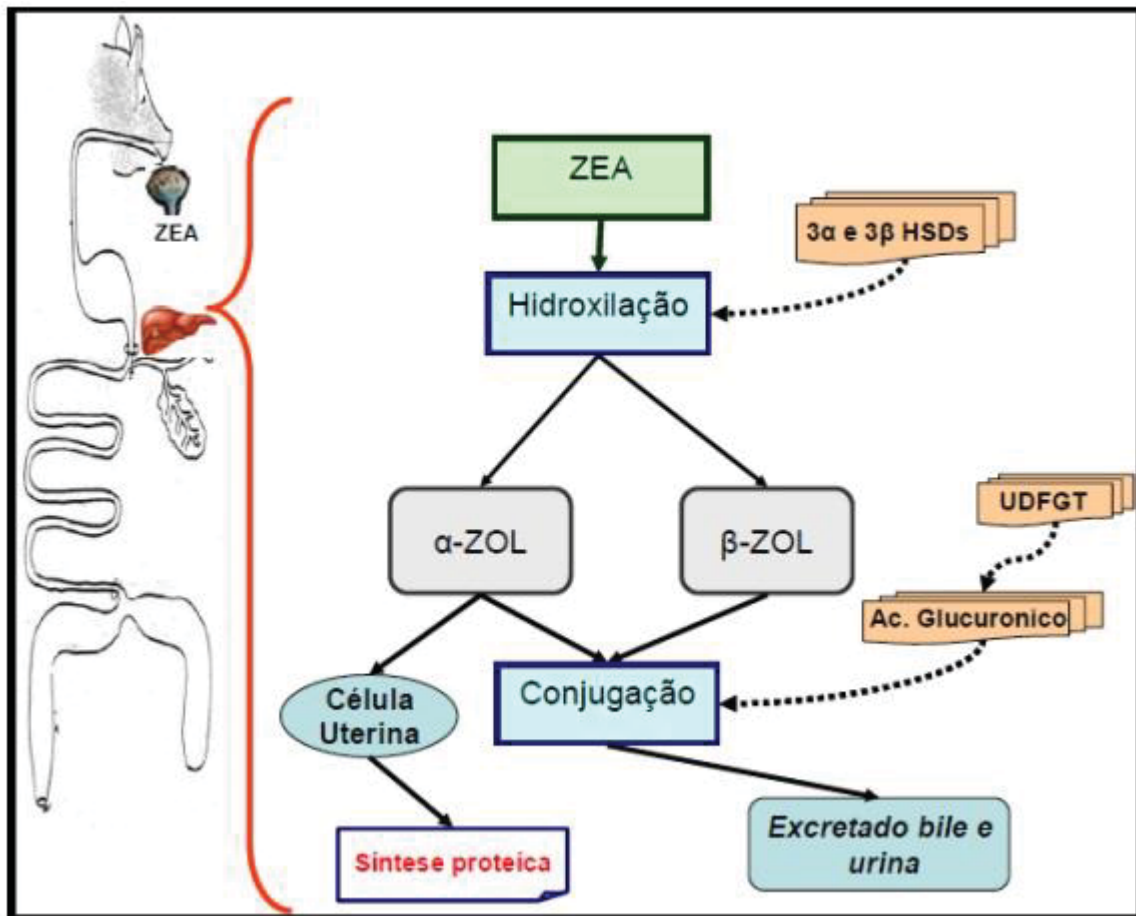
FIGURA 5 – REPRESENTAÇÃO DOS METABÓLITOS E PRINCIPAIS ENZIMAS ENVOLVIDAS NA BIOTRANSFORMAÇÃO DA ZEA.



FONTE: Marin et al. (2011)

As fezes são a principal via de excreção para a maior parte das espécies, apesar dos coelhos excretarem especialmente ZEA na urina e aproximadamente 45% dos metabólitos dos suínos é excretado na bile e apenas 7% nas fezes. Sendo assim, a maior rota de excreção da ZEA em suínos ocorre pela bile e urina (FIGURA 6). A maior parte da zearalenona administrada é excretada em um período de 72 horas para a maior parte das espécies animais (BIEHL et al., 1993).

FIGURA 6 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA METABOLIZAÇÃO E EXCREÇÃO DA ZEA EM SUÍNOS.



FONTE: Hauschild (2006)

3.3.5 Toxicodinâmica

Um dos principais alvos de toxicidade da ZEA é através do sistema reprodutivo (MINERVINI; DELL'AQUILA, 2008; TIEMANN; DANICKE, 2007). A ação da ZEA pode acontecer por meio de estímulos aos receptores estrogênicos citoplasmáticos, elevando a síntese protéica no aparelho reprodutor. Como resultado ela estimula as células endometriais à síntese de proteínas uterinas, o que resulta em um aumento do peso do trato reprodutivo (GAUMY et al., 2001).

Particularmente, a ZEA e seus metabólitos podem se relacionar diretamente com os sítios de ligação dos receptores citoplasmáticos do hormônio 17 β-estradiol e translocar o sítio de ligação destes receptores para o núcleo celular (KATZENELLENBOGEN; KATZENELLENBOGEN; MORDECAI, 1979). No núcleo, a estimulação do RNA leva a síntese de proteínas e sinais clínicos do estrogenismo. A toxicidade da ZEA tem sido associada

à diminuição da fertilidade, redução da ninhada, alteração do peso da adrenal, tireoide e hipófise na prole, além de alteração nos níveis séricos de progesterona e estradiol (EFSA, 2004).

A ZEA se junta aos receptores estrogênicos, resultando em hiperestrogenicidade em diversas espécies de animais, principalmente suínos ocasionando aumento e/ou tumefação da vulva (BOYD; WITTLIFF, 1978; GREEN et al., 1990; MINERVINI; DELL'AQUILA, 2008; TAKEMURA et al., 2007). A intoxicação ocasiona transtornos reprodutivos, como o aumento da infertilidade relacionada ao estro² permanente, atraso no retorno ao estro, persistência vinculada ao estro permanente, persistência de corpo lúteo, falhas na implantação, pseudogestação, anomalias ovarianas e nascimento de leitões fracos (EDWARDS et al., 1987; KUIPER-GOODMAN; SCOTT; WATANABE, 1987; ETIENNE; DOURMAD, 1994; FINK-GREMMELS; MALEKINEJAD, 2007).

Os estrógenos estão presentes tanto no sistema reprodutor feminino quanto no masculino (CLAUS et al., 1987) e assim estão envolvidos na estimulação da espermatogênese e síntese de esteroides mediante a ligação aos receptores de estrogênio (ERs) (RAGO et al., 2006; STABILE; RUSSO; CHIEFFI, 2006).

Dessa maneira, aos machos expostos à ZEA, pode acontecer redução de testosterona sérica, da espermatogênese e do peso dos testículos, além da indução de feminização e diminuição de libido (D'MELLO; PLACINTA; MACDONALD, 1999).

Nos camundongos tratados com ZEA nas doses de 25, 50 e 75 mg/kg por 7 dias via intraperitoneal ocorreu aumento da vesícula seminal e do peso da glândula prepucial do testículo. Foi observada também uma maior porcentagem de espermatozoides anormais, redução de espermatozoides vivos e de sua integridade acrossômica, redução na produção espermiática e das células espermatogênicas, além da redução da concentração sérica de testosterona. Fêmeas que copularam com estes camundongos apresentaram uma taxa de concepção menor (YANG et al., 2007).

A ZEA afeta especialmente o sistema reprodutivo, entretanto, ela pode produzir efeitos adicionais. No decorrer da realização de ensaios *in vitro* com linhagens de células, a ZEA agiu como um ligante específico a certos receptores ativando a transcrição de um fator de regulação da expressão de infinitas enzimas metabolizadoras hepáticas, inclusive a expressão de enzimas do citocromo P450, sinalizando que a ZEA possa induzir o metabolismo de drogas (DING; LICHTI; STAUDINER, 2006).

² Conjunto de fenômenos e comportamentos que precedem e acompanham a ovulação nos mamíferos de sexo feminino.

Ocorre uma variação no quadro clínico das intoxicações pela ZEA de acordo com o tempo de ingestão e idade, sexo e espécie animal. As micotoxinas de modo geral, inclusive a ZEA, ocasionam mudanças dos parâmetros hematológicos, além de também possuírem atividades hepatotóxicas, imunotóxicas e nefrotóxicas em animais e seres humanos (ABID-ESSEFI et al., 2004; HASSEN et al., 2007).

Têm sido apresentado que a ZEA e seus metabólitos tem efeitos deletérios em funções imunológicas nos seres humanos (FORSELL; PESTKA, 1985; VLATA et al., 2006), em bovinos (LIOI et al., 2004), frangos (YEGANI et al., 2006; BORUTOVA et al., 2008), ratos (DORIC et al., 2007) e camundongos (PESTKA et al., 1987).

A administração de 40 e 80 mg/Kg de ZEA em camundongos Balb/C no decorrer de 28 dias ocasionou diminuição do peso relativo dos órgãos do sistema imunológico e redução da quantidade de linfócitos resultando em atrofia do baço e modificação na produção de citocinas e anticorpos (SALAH-ABBÈS et al. 2010).

A ação hematotóxica da ZEA foi apresentada no estudos realizados por Abbès et al. (2007) e Maaroufi et al. (1996), onde camundongos Balb/C e ratos, intoxicados com concentrações superiores a 10 mg/kg de ZEA, observaram disfunção da coagulação, alterações de alguns parâmetros hematológicos como elevação na quantidade das hemácias, hemoglobina, hematócrito, leucócitos totais e diminuição da quantidade de plaquetas. Ocorreu também a diminuição da quantidade de linfócitos, reforçando a capacidade imunossupressora desta micotoxina e confirmando os resultados encontrados por Berek et al. (2001) que também relatou redução de linfócitos T e B em humanos expostos a ZEA.

3.4 MÉTODOS ANALÍTICOS

Para aplicação do método de análise de micotoxinas, é necessário o desenvolvimento de procedimentos de extração comuns, rápidos e efetivos, garantindo recuperações adequadas, com precisão e exatidão. Também é desejável que o preparo da amostra seja comum e que uma única determinação seja empregada. Um método analítico adequado inclui as etapas de amostragem/homogeneização, extração, limpeza e concentração (em alguns casos), antes da análise quali e/ou quantitativa (GOBEL; LUSKY, 2004; REN et al., 2007).

3.4.1 Métodos de Extração

A escolha do método de extração depende da micotoxina em estudo, do tipo de matriz e da instrumentação disponível. Deve ser adequado em termos de identificação do analito, da precisão e da sensibilidade requeridas. A extração deve permitir boas recuperações de todas as micotoxinas sob investigação na matriz específica (ROMERO-GONZALEZ et al., 2011).

No processo de extração, o analito e os compostos com propriedades semelhantes migram para o solvente extrator até que haja o estabelecimento do equilíbrio. Desta forma, os compostos desejáveis podem ser concentrados no solvente e os interferentes removidos.

O ideal é que o solvente de extração seja capaz de remover apenas a micotoxina de interesse da matriz. Devido à ausência de um solvente completamente específico, os solventes escolhidos são os que podem remover o máximo de micotoxinas quanto possível, com um mínimo de interferentes. Além disso, deve ser facilmente recuperável, atóxico, não inflamável, volátil, estável e de baixo impacto ambiental (RAHMANI; JINAP; SOLEIMANY, 2009).

Técnicas de extração tais como: extração líquido-líquido (LLE), extração em fase sólida (SPE), microextração em fase sólida (SPME), extração sólido-líquido (SLE), extração líquido pressurizado (PLE) e QuEChERS têm sido empregadas para a extração de micotoxinas.

3.4.1.1. A extração líquido-líquido (LLE)

Também chamada de extração por solvente ou partição é um método para separar um ou mais componentes específicos em uma mistura de líquidos baseado nas diferentes solubilidades de solventes imiscíveis, normalmente água e um solvente orgânico. A seletividade da técnica se dá por meio da escolha do solvente extrator. A adição de sais ou alterações no pH podem ser empregados para melhorar a eficiência da extração. Os solventes que demonstraram maior eficiência para a extração de micotoxinas são os relativamente polares como metanol, acetona, acetonitrila (ACN), acetato de etila, dietil éter, tolueno e clorofórmio ou misturas destes (RAHMANI; JINAP; SOLEIMANY, 2009).

Como desvantagens, a LLE pode ser uma técnica longa e não específica, pode formar emulsões e requer grandes volumes de solventes orgânicos (RIDGWAY, 2012).

3.4.1.2. Extração em fase sólida (SPE)

Nesta técnica empregam-se materiais adsorventes como o gel de sílica, C8 ou material de fase reversa C18, resinas de troca iônica e materiais poliméricos. Muitas colunas SPE foram testadas na análise de fumonisina no milho e em produtos derivados, e a C18 mostrou ser a mais apropriada após extração com ACN:H₂O (DILKIN et al., 2001).

A maior desvantagem de SPE é a dependência do analito em estudo das condições operacionais tais como temperatura e tempo de extração. Além de ser uma técnica longa se realizada *off line*, os cartuchos e discos extratores tornam a técnica mais cara, se comparada a outras técnicas de extração (KRSKA; WELZIG; BOUDRA, 2007).

3.4.1.3. Microextração em fase sólida (SPE)

É uma microtécnica, alternativa à SPE, de extração tanto pelas dimensões do suporte de extração empregado, como pelos volumes de matrizes e solventes empregados. Utiliza-se uma fibra de sílica fundida, recoberta com um adsorvente adequado. A fibra se encontra acondicionada dentro de uma espécie de agulha em um amostrador semelhante a uma seringa, ficando exposta somente no momento da extração. O processo pode ser realizado por imersão da fibra diretamente na matriz ou através da exposição no espaço confinante chamado *headspace*, onde a fibra entra em contato somente com os vapores do analito que podem ser liberados da matriz por aquecimento. Após a extração pela fibra, o soluto é dessorvido empregando aquecimento (CG) ou empregando quantidades reduzidas de um solvente adequado (CLAE). O processo se baseia no coeficiente de partição do analito entre a matriz e a fibra de extração, sendo que a quantidade extraída normalmente é muito inferior à quantidade total do analito presente na amostra, permitindo que a mesma amostra seja analisada em replicata. O método SPME oferece muitas vantagens sobre outras técnicas de preparação porque não requer solvente orgânico, é relativamente barata, sensível, muitas vezes não requer qualquer outro passo de preparação da amostra e pode ser facilmente automatizada. No entanto, as principais desvantagens são a aplicação somente para amostras aquosas e pouco concentradas e os limites de quantificação são elevados (LIGOR; WÓJCIK; BUSZEWSKI, 2004).

3.4.1.4. Extração sólido-líquido (SLE)

Consiste na separação de um ou mais componentes de uma mistura sólida através de um solvente. Neste processo ocorre o contato do solvente com o sólido, que cede o componente solúvel e a separação da solução do sólido remanescente se dá por filtração, destilação ou evaporação, para recuperação do soluto dissolvido no solvente. Sulyok et al (2006), determinaram 39 micotoxinas em amostras de trigo e milho empregando a mistura de solventes Acetonitrila:água:ácido acético na proporção 79:20:1 (v/v).

3.4.1.5. Extração líquido pressurizado (PLE)

Segundo Desmarchelier et al (2014) esta técnica é alternativa aos métodos de extração, como Soxhlet, maceração, percolação ou refluxo, que oferece vantagens no que diz respeito ao tempo de extração, consumo de solvente, rendimento e reprodutibilidade. Utiliza solventes orgânicos a temperaturas e pressões elevadas a fim de aumentar a eficiência do processo de extração. O aumento da temperatura acelera a cinética de extração e mantém o solvente no estado líquido, permitindo extrações mais rápidas. Além disso, a elevada pressão facilita a entrada do solvente para os poros da matriz facilitando a extração dos analitos. Elevadas temperaturas também diminuem a viscosidade do solvente permitindo uma melhor penetração na matriz e aumenta a difusão do solvente, resultando em aumento da velocidade de extração. Royer; Humpf; Guy (2004), extraíram DON, ZEA e FUN em amostras de milho utilizando este método de extração.

3.5 O MÉTODO QuEChERS

3.5.1 Método QuEChERS original

Em 2003, quando Michelangelo Anastassiades e Steven J. Lehotay publicaram seu novo método de preparo de amostra para extração de resíduos de pesticidas, provavelmente não imaginavam a relevância que o método desenvolvido alcançaria na comunidade científica (GONZÁLEZ-CURBELO et al., 2015).

Com o objetivo de superar as limitações práticas dos métodos de extração existentes na época, o método QuEChERS (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe*), que tem como vantagem ser rápido, fácil, econômico, efetivo, robusto e seguro, além de fornecer resultados

de alta qualidade foi idealizado para gerar extratos que pudessem ser analisados por Cromatografia Líquida e/ou Cromatografia Gasosa acopladas à Espectrometria de Massas em série (GC-MS/MS e LC-MS/MS) (ANASTASSIADES et al., 2003; LEHOTAY et al., 2010). A praticidade e os excelentes resultados fornecidos pelo método QuEChERS em parceria com estas técnicas, contribuíram na popularização deste método e dos seus conceitos (PRESTES; ADAIME; ZANELLA, 2011).

Durante o desenvolvimento do método QuEChERS, Anastassiades e colaboradores (2003) revisaram as condições comumente utilizadas na análise multirresíduo de pesticidas e propuseram este novo método de preparo de amostra (GONZÁLEZ-CURBELO et al., 2015). O procedimento envolve a extração inicial de uma fase de 10 g de amostra com 10 mL de acetonitrila, seguida de partição líquido-líquido formada pela adição de 4 g de sulfato de magnésio anidro, $MgSO_4$, mais 1 g de cloreto de sódio, $NaCl$. A remoção da água residual e a limpeza ocorrem simultaneamente usando um procedimento denominado Extração em Fase Sólida Dispersiva (*Dispersive Solid Phase Extraction, D-SPE*), em que 150 mg de $MgSO_4$ anidro e 25 mg de amina secundária primária (*Primary Secondary Amine, PSA*) são misturados com 1 mL de extrato de acetonitrila. O D-SPE com PSA efetivamente remove muitos componentes da matriz polar, como ácidos orgânicos, alguns pigmentos polares e açúcares (ANASTASSIADES et al., 2003).

Na figura abaixo estão representadas as principais etapas do método QuEChERS original (FIGURA 7).

FIGURA 7 – REPRESENTAÇÃO DAS ETAPAS DO MÉTODO QuEChERS ORIGINAL.



FONTE: Prestes; Adaime; Zanella (2011).

3.5.2 O solvente de extração

A seleção do solvente de extração é um ponto crucial no desenvolvimento de um método de extração multirresíduo. As principais características consideradas na escolha do solvente são: habilidade de extração, apresentar seletividade durante a extração, partição e limpeza (*clean up*), separar-se eficientemente de fases aquosas e ser compatível com diferentes técnicas cromatográficas (ANASTASSIADES et al., 2003; PRESTES; ADAIME; ZANELLA, 2011).

Os principais solventes empregados na extração multirresíduo de micotoxinas são: acetona, acetato de etila e acetonitrila. No desenvolvimento do método QuEChERS, o solvente que apresentou características mais convenientes foi a acetonitrila. Dentre as vantagens, pode-se citar a ampla capacidade de extração em diferentes polaridades, a extração de menores quantidades de coextrativos lipofílicos provenientes da amostra, como ceras, gorduras e pigmentos e a capacidade de permitir a remoção de residual de água apenas com o uso de um agente secante como o sulfato de magnésio anidro (ANASTASSIADES et al., 2003).

3.5.3 A adição de sais e a separação de fases

A inserção de sais para a promoção do efeito *salting out* é usada em diversos métodos multirresíduos. Dependendo da origem do solvente usado na etapa de partição alcança-se melhores percentuais de recuperação para analitos polares, pois a inserção de sais reduz a solubilidade destes compostos na etapa aquosa, bem como a quantidade de água na fase orgânica e vice-versa (PIZZUTTI et al., 2006).

Nos métodos multirresíduos que fazem uso da acetona, a partição é controlada mediante uma combinação de cloreto de sódio e solventes apolares, no entanto apresentam como desvantagem a diluição do extrato e o consumo de um maior volume de solvente. Os métodos multirresíduos que fazem uso de acetonitrila, desenvolvido até então, não fazem uso da adição de nenhum tipo de solvente apolar no processo de partição (SCHENCK et al., 2008).

Na remoção com acetonitrila, a inserção de sais é muito apropriada uma vez que é rápida, fácil, tem baixo custo, tem a grande vantagem de não diluir o extrato da amostra e oferece a separação das fases orgânicas e aquosa (PRESTES; ADAIME; ZANELLA, 2011).

O uso de sais secantes, como sulfato de sódio (Na_2SO_4), tem como objetivo a melhoria da recuperação de pesticidas polares (ANDERSSON; PALSHEDEN, 1991).

A opção do MgSO_4 no desenvolvimento do método QuEChERS foi em decorrência da maior habilidade de remover água quando comparado com outros sais. E também por reduzir o volume de fase aquosa, sua hidratação é uma reação exotérmica, obtendo como resultado o aquecimento entre 40 e 45 °C da amostra no decorrer das etapas de extração/partição, possibilitando a extração, principalmente dos compostos apolares (ANASTASSIADES, 2003).

A fase de limpeza é primordial para favorecer robustez e confiabilidade aos resultados alcançados pelo sistema cromatográfico, pois os componentes não voláteis da matriz podem ficar aderidos no sistema de injeção e também na coluna cromatográfica, modificando a resposta do sistema e elevando a frequência de manutenções técnicas no equipamento (SAITO et al., 2004).

É comum que na etapa de limpeza se empregue SPE, a qual faz uso de cartuchos ou colunas que contenham entre 250 e 1000 mg de sorventes. Esta técnica relaciona a operação manual, faz uso de diversos solventes para lavagem do sorventes, etapas de evaporação e secagem. Diversos fatores atingem a precisão quando se trabalha com SPE, entre eles o ajuste do sistema de vácuo e o fluxo dos solventes. Esta técnica quando automatizada demanda manutenção frequente, e também por os sistemas atuais apresentarem um custo considerável (HYÖTYLÄINEN, 2008).

Diferente dos métodos já existentes para limpeza com SPE que fazem uso de cartuchos ou colunas, a D-SPE possibilita que a limpeza e a diminuição de água residual sejam realizadas de uma maneira rápida e simultânea. Essa fase de remoção de água oferece um extrato final de menor polaridade, facilitando dessa forma a precipitação de co-extrativos polares. (ANASTASSIADES, 2003).

A estrutura bidentada do PSA promove um efeito quelante, proveniente da presença dos grupos amino primário e secundário. A retenção de ácidos graxos livres e de outros compostos polares presentes na matriz é muito forte. Uma limpeza eficaz dá garantia de vida útil maior para insensores e colunas cromatográficas, diminuindo dessa forma a contaminação do sistema cromatográfico e reduzindo o efeito matriz (BEYER; BIZUIK, 2007).

3.5.4 Método QuEChERS modificações

No decorrer do desenvolvimento da primeira versão do método QuEChER, somente 25 pesticidas geralmente utilizados por GC-MS/MS foram avaliados (ANASTASSIADES, 2003). Embora a versão original tenha fornecido ótimos resultados para diferentes tipos de amostras, algumas aplicações demonstraram que certos compostos apresentaram problemas de

estabilidade e/ou recuperação segundo o pH da matriz. Desta maneira, no decorrer do período de otimização do método, verificou-se que a utilização de tampões (pH 5) proporcionavam recuperações satisfatórias (>70%) para compostos dependentes do pH (LEHOTAY; MAŠTOVSKÁ; LIGHTFIELD, 2005).

A adição de uma etapa de tamponamento foi a primeira alteração proposta para o método QuEChERS, com o propósito de aperfeiçoar os percentuais de recuperação (70-120%) (ANASTASSIADES, 2003).

O método “QuEChERS acetato” foi desenvolvido por Cunha e colaboradores (2007), onde o efeito tamponante (pH 4,8) é reconhecido pela adição de acetato de sódio. Este método foi reconhecido em 2007 como método oficial da *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC) para determinação de resíduos de pesticidas em alimentos (AOAC INTERNATIONAL, 2007).

O método “QuEChERS citrato” foi proposto por Anastassiades e colaboradores (2007) para determinação de resíduos de pesticidas em alimentos, onde é usado uma mistura de citrato de sódio diidratado e hidrogenocitrato sesquihidratado como sendo responsáveis pelo efeito tamponante (pH 5,0-5,5).

O *Comité Européen de Normalisation* (CEN) em 2008, oficializou o método “QuEChERS citrato” como sendo o método de referência da União Européia (CEN, 2008).

Outra alteração bastante significativa foi a adição de C18, juntamente com PSA na fase de limpeza (D-SPE), para proporcionar uma limpeza mais eficaz de certas matrizes, em especial aquelas que contém gordura (LEHOTAY; MAŠTOVSKÁ, YUN, 2005).

A combinação do método QuEChERS com limpeza à baixa temperatura, objetivando a redução dos co-extrativos lipídico, também foi utilizada com sucesso. No entanto, a adição de C18 na etapa de D-SPE é mais rápida e fácil, e proporciona uma retirada igualmente eficaz dos lipídios (LEHOTAY et al., 2010).

Além das modificações que ocorreram, a diminuição do teor de clorofila nos co-extrativos provenientes de amostras com pigmentação verde, foi outro avanço realizado na fase de limpeza, alcançado através da adição de uma pequena quantidade de carbono grafitizado (CUNHA et al., 2007).

Outra modificação realizada na fase da limpeza foi a utilização de uma maior quantidade de PSA na etapa de D-SPE em amostras de cereais como proposta de remoção de maneira mais eficiente dos ácidos graxos co-extraídos (MAŠTOVSKÁ et al., 2010).

3.5.5 Praticidade e versatilidade no método QuEChERS

As alterações já foram realizadas no método QuEChERS demonstram um futuro promissor na análise multirresíduo. O método tem sido utilizado de maneira satisfatória quando aliado à Espectrometria de Massa, no entanto não se limita apenas a este tipo de detector (PRESTES; ADAIME; ZANELLA, 2011).

Ensaio de eficiência empregados no método QuEChERS comprovaram sua robustez, sendo transferido com sucesso entre os laboratórios participantes (MARTINEZ-GALERA; GIL-GARCIA; SANTIAGO VALVERDE, 2008).

O método QuEChERS utilizando GC-NPD foram aplicados por Hernández-Borges e colaboradores (2009) para a determinação de 11 pesticidas em banana, com valores de limite de quantificação (LQ) na faixa de 0,01 a 0,14 mg kg⁻¹, percentuais de recuperação entre 67 e 118% e RSD < 16%. O método QuEChERS também foi utilizado na extração de 36 pesticidas em amostras de mel, seguida da determinação por GC-ECD e GC-NPD. Obteve-se percentuais de recuperação entre 70 e 120% e RSD < 22% (BARAKAT et al., 2007).

Os inseticidas diflubenzurona e triflumurona foram extraídos de amostras de tomate fazendo o uso do método QuEChERS e determinados por LC acoplada a sistema de fotoderivatização pós-coluna com detector de quimioluminescência. A recuperação ficou entre 79,7 e 94,2%, com valores de RSD < 10%, valores de LD na faixa de 0,05 a 0,26 µg kg⁻¹ e valores de LQ entre 10 e 20 µg kg⁻¹ (CUNHA, 2007)

3.5.6 Limitações no método QuEChERS

O método QuEChERS tem vivenciado uma grande transformação no preparo de amostras para análise de micotoxinas nos últimos anos, proveniente de suas características de simplicidade, rapidez, baixo custo, entre outras, foram inseridas em diversos laboratórios de rotina. Entretanto, quando foi comparado com métodos que geralmente eram utilizados, verifica-se que a relação entre a quantidade de amostra: solvente (1 g.mL⁻¹) obtida no método QuEChERS é baixa se comparada com os valores típicos de 2 a 5 g.mL⁻¹ dos métodos que utilizam solventes apolares (HIEMSTRA; KOK, 2007).

Entretanto, se a matriz não é uma fonte de ruídos na etapa de análise isto pode direcionar, no método QuEChERS, a valores de LQ mais elevados, para o mesmo volume de injeção. No entanto, considerando a grande detectabilidade das técnicas cromatográficas disponíveis nos dias atuais, especialmente com GC-MS/MS e LC-MS/MS, o método

QuEChERS é apropriado para o preparo de amostra objetivando o controle de micotoxinas em alimentos (HIEMSTRA; KOK, 2007).

A acetonitrila é um ótimo solvente para os métodos de determinação que fazem uso de LC-MS/MS; não existe um ideal para análises utilizando GC-MS/MS. No entanto, os avanços nos sistemas de injeção possibilitam a combinação perfeita entre o método QuEChERS e GC-MS/MS. Entre eles é possível citar a injeção de grandes volumes (*Large Volume Injection – LVI*), que possibilita a injeção de uma grande quantidade de extrato e automaticamente de analitos, favorecendo um aumento representativo de detectabilidade. Um progresso relevante nos sistemas de injeção foi a possibilidade da realização de programação de temperatura de vaporização (*Programmed Temperature Vaporized - PTV*) que permitiu a obtenção de uma resposta cromatográfica melhor (FERNÁNDEZ-ALBA, 2005).

3.6 VALIDAÇÃO

Todo método analítico deve ser cientificamente respaldado e fornecer resultados confiáveis. O processo que demonstra que tal método funciona é chamado de validação analítica ou validação de método analítico (SHARP, 2000).

Segundo a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) a validação é a avaliação sistemática de um método por meio de ensaios experimentais de modo a confirmar e fornecer evidências objetivas de que os requisitos específicos para seu uso pretendido são atendidos (BRASIL, 2017).

Faz-se a validação de um método com o objetivo de garantir a exatidão, reprodutibilidade e flexibilidade de uma metodologia analítica, sobre uma faixa específica na qual uma substância será analisada. Faz-se necessária a validação da metodologia analítica para o registro de novos produtos, para análises qualitativa e quantitativa de métodos oficiais, rastreabilidade dos resultados, entre outros (SKOOG; WEST; CROUCH, 2008).

Para validar uma metodologia analítica são normalmente avaliados os seguintes parâmetros: seletividade, linearidade, sensibilidade, limite de detecção, limite de quantificação, precisão, exatidão e robustez. Dependendo da finalidade do processo há procedimentos distintos para validação, conforme descrito abaixo (QUADRO 1).

QUADRO 1 - PARÂMETROS A SEREM CONSIDERADOS NA VALIDAÇÃO ANALÍTICA

Parâmetro avaliado	Identificação	Teste de impurezas		Doseamento -dissolução (quantificação) -uniformidade de conteúdo -potência
		Quantitativo	Ensaio limite	
Exatidão	não	sim	não	sim
Precisão Repetibilidade	não	sim	não	sim
Precisão Intermediária	não	sim	não	sim
Seletividade	sim	sim	sim	sim
Limite de detecção	não	não	sim	não
Limite de quantificação	não	sim	não	não
Linearidade	não	sim	não	sim
Intervalo	não	sim	não	sim

FONTE: ANVISA (2017)

3.6.1 Seletividade

É a capacidade que um método possui de identificar ou quantificar o analito de interesse, inequivocadamente, na presença de componentes que podem estar presentes na amostra, como impurezas, diluentes e componentes da matriz (BRASIL, 2017).

A seletividade é o primeiro passo no desenvolvimento e validação de um método instrumental (RIBANI et al., 2004).

3.6.2 Efeito Matriz

Efeito matriz é o estudo de seletividade que objetiva assegurar possíveis interferências causadas pelas substâncias que compõem a matriz amostral, gerando basicamente, fenômenos de diminuição ou ampliação do sinal instrumental (MAPA, 2011). O efeito matriz representa uma das maiores fontes de erro nas determinações analíticas em nível de traços, especialmente de micotoxinas (RIGHI, 2013).

É determinado por meio da comparação entre os coeficientes angulares das curvas de calibração construídas com a substância química de referência (SQR) do analito em solvente e com a SQR do analito na matriz amostral. As curvas são estabelecidas da mesma forma que na linearidade para os mesmos níveis de concentração, utilizando, no mínimo, cinco concentrações diferentes em, no mínimo, triplicata. O paralelismo das retas é indicativo de ausência de interferência dos constituintes da matriz e a sua demonstração deve ser realizada por meio de avaliação estatística adequada (BRASIL, 2017).

O cálculo para avaliação do efeito matriz a partir da inclinação das curvas analíticas foi realizado conforme segue abaixo (EQUAÇÃO 1):

EQUAÇÃO 1 – CÁLCULO DO EFEITO MATRIZ (%) A PARTIR DA INCLINAÇÃO DAS CURVAS ANALÍTICAS

$$Efeito\ Matriz(\%) = 100 \times \left(1 - \frac{S_m}{S_s} \right)$$

Onde:

S_m = inclinação da curva analítica preparada com a amostra fortificada;

S_s = inclinação da curva analítica preparada em solvente orgânico.

Outra forma de avaliar o efeito matriz baseia-se em comparar as áreas obtidas das soluções analíticas em solvente orgânico com as áreas obtidas a partir das soluções analíticas com a matriz amostral. O cálculo é efetuado através da seguinte fórmula (EQUAÇÃO 2):

EQUAÇÃO 2 – CÁLCULO DO EFEITO MATRIZ POR COMPARAÇÃO DAS ÁREAS

$$Efeito\ Matriz(\%) = \frac{A_1 - A_2}{A_2} \times 100$$

Onde:

A1 = média das áreas da solução em extrato da matriz, em uma determinada concentração;

A2 = média das áreas da solução em solvente orgânico, em uma determinada concentração.

Através destas equações é possível determinar se o efeito exercido pela matriz é positivo (aumento na intensidade do sinal) ou negativo (supressão do sinal) sobre o resultado da análise. Resultados com efeito matriz entre +20% e -20% são considerados aceitáveis (SANCO, 2013).

3.6.3 Curva analítica e Linearidade

A linearidade de um método é demonstrada pela sua capacidade de obter respostas analíticas diretamente proporcionais à concentração de um analito em uma amostra. Uma relação linear deve ser avaliada em toda a faixa estabelecida para o método (BRASIL, 2017).

O valor do coeficiente de determinação expressa numericamente o percentual da variação total do sinal analítico (y) em função da variação da concentração do analito (x). Esse percentual, como qualquer outro, varia de 0 a 100% e o valor de r^2 , sendo a expressão numérica do mesmo, varia de 0 a 1. Quanto mais próximos de um os valores de r^2 , melhor será a qualidade das curvas analíticas (RIGHI, 2013).

Para avaliação da linearidade, devem ser apresentadas as representações gráficas das respostas em relação ao analito, gráfico de dispersão dos resíduos, equação da reta de regressão de y em x, estimada pelo método dos mínimos quadrados, avaliação da associação linear entre as variáveis por meio de coeficientes de correlação (r) e de determinação (r^2) e avaliação da significância do coeficiente angular. O coeficiente de correlação deve estar acima de 0,9990 e o coeficiente angular deve ser significativamente diferente de zero (BRASIL, 2017).

3.6.4 Precisão

A precisão deve avaliar a proximidade entre os resultados obtidos por meio de ensaios com amostras preparadas conforme descrito no método analítico a ser validado, sendo expressa por meio da repetibilidade, da precisão intermediária ou da reprodutibilidade (BRASIL, 2017).

A determinação da precisão pela repetibilidade deve avaliar as amostras sob as mesmas condições de operação, mesmo analista e mesma instrumentação, em uma única corrida analítica, bem como utilizar no mínimo 9 (nove) determinações, contemplando o intervalo linear do método analítico, ou seja, 3 (três) concentrações: baixa, média e alta, com 3 (três) réplicas em cada nível ou 6 (seis) réplicas a 100% (cem por cento) da concentração do teste individualmente preparadas (BRASIL, 2017).

3.6.5 Exatidão

A exatidão de um método analítico deve ser obtida por meio do grau de concordância entre os resultados individuais do método em estudo em relação a um valor aceito como verdadeiro.

Deve ser verificada a partir de, no mínimo, 9 (nove) determinações, contemplando o intervalo linear do método analítico, ou seja, 3 (três) concentrações: baixa, média e alta, com 3 (três) réplicas em cada nível e o preparo das amostras para avaliação da exatidão deve ser feito de maneira independente, podendo ser utilizadas soluções diluídas de uma mesma solução mãe da SQR.

A exatidão deve ser expressa pela relação percentual de recuperação do analito de concentração conhecida adicionado à amostra ou pela relação entre a concentração média, determinada experimentalmente, e a concentração teórica correspondente, dada pela fórmula abaixo. Quando a exatidão é determinada a partir de um método anteriormente validado, deve-se considerar, em substituição ao termo “concentração teórica”, a concentração do analito determinada por meio desse (EQUAÇÃO 03). Deve ser calculado o desvio padrão relativo (DPR) para cada concentração (BRASIL, 2017).

EQUAÇÃO 3 – CÁLCULO DA EXATIDÃO

$$\text{Recuperação} = \frac{\text{Concentração média experimental}}{\text{Concentração teórica}} \times 100$$

3.6.6 Limite de detecção

O limite de detecção é demonstrado pela obtenção da menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado, porém, não necessariamente quantificado,

sob as condições experimentais estabelecidas. A determinação do limite de detecção pode ser realizada por meio de método visual, da razão sinal-ruído, baseado na determinação do branco ou em parâmetros da curva de calibração, considerando-se as particularidades do método analítico utilizado. Para métodos visuais, o limite de detecção é determinado pela menor concentração para a qual é possível constatar o efeito visual esperado. Para métodos instrumentais, o limite de detecção pode ser determinado pela razão sinal-ruído. O método utilizado para determinação da razão sinal/ruído deve ser descrito e justificado. A razão sinal-ruído deve ser maior ou igual a 2:1.

Para a determinação baseada em parâmetros da curva analítica, o limite de detecção pode ser calculado pela fórmula abaixo:

EQUAÇÃO 4 – CÁLCULO DO LIMITE DE DETECÇÃO:

$$LD = \frac{3,3 \cdot \sigma}{IC}$$

Em que: IC é a inclinação da curva de calibração, σ é o desvio padrão e pode ser obtido de 3 formas:

I - a partir do desvio padrão do intercepto com o eixo Y de, no mínimo, 3 curvas de calibração construídas contendo concentrações do analito próximas ao suposto limite de detecção;

II - a partir do desvio padrão residual da linha de regressão;

III - a partir da estimativa de ruído proveniente da análise de um apropriado número de amostras do branco.

3.6.7 Limite de quantificação

É a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas. O limite de quantificação deve ser coerente com o limite de especificação da impureza. Para a determinação deste parâmetro deve ser seguido o mesmo procedimento para o cálculo do limite de detecção, sendo que a razão sinal/ruído deve ser no mínimo de 10:1. Para a determinação baseada em parâmetros da curva analítica, o limite de quantificação pode ser calculado pela fórmula abaixo.

Devem ser testadas precisão e exatidão nas concentrações correspondentes ao limite de quantificação.

EQUAÇÃO 5 – CÁLCULO DO LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO

$$LQ = \frac{10 \cdot \sigma}{IC}$$

3.6.8 Robustez

É uma medida da capacidade de um método de não sofrer alteração em decorrência de pequenas variações, deliberadamente introduzidas nos parâmetros do método (LANÇAS, 2004); é um indicativo de sua confiança durante o uso na rotina (BRASIL, 2017).

Em situações onde haja mudança de fornecedores, marcas ou equipamentos ao longo do desenvolvimento e validação dos métodos, sem alteração significativa nos resultados, pode se dizer que o método possui robustez intrínseca, pois manteve sua resposta em meio a mudanças no ambiente de análise (RIBANI et al., 2004). O método é considerado robusto se a variação entre os resultados encontrados com os parâmetros alterados não diferir em $\pm 5\%$ dos resultados encontrados com os parâmetros inalterados. A variação é calculada com a EQUAÇÃO 6 que segue:

EQUAÇÃO 6 – CÁLCULO DA ROBUSTEZ

$$\text{Variação (\%)} = [(Rec\ 2 \times 100)/Rec1] - 100$$

Onde:

Rec 1 = recuperação do método inalterado;

Rec 2 = recuperação do método alterado.

TABELA 4 – CONDIÇÕES PARA A AVALIAÇÃO DA ROBUSTEZ DO MÉTODO.

Preparo das amostras	Estabilidade das soluções analíticas
	Tempo de extração
	Compatibilidade de filtros

Espectrofotometria	Variação do pH da solução
	Diferentes lotes ou fabricantes de solventes
Cromatografia líquida	Variação do pH da fase móvel
	Variação na composição da fase móvel
	Diferentes lotes ou fabricantes de colunas
	Temperatura
	Fluxo da fase móvel
Cromatografia gasosa	Diferentes lotes ou fabricantes de colunas
	Temperatura
	Velocidade do gás de arraste
Outras técnicas analíticas	As variações a serem testadas deverão ser avaliadas criticamente e seus resultados deverão ser apresentados

FONTE: Brasil (2017).

4 MATERIAL E MÉTODOS

O preparo das amostras foi realizado no laboratório de Toxicologia e as análises cromatográficas foram executadas na Central Analítica, ambos no bloco de Farmácia da Universidade Federal do Paraná.

A coleta das amostras de plasma sanguíneo de cadelas diagnosticadas com câncer de mama foi realizada pela equipe de médicos veterinários residentes do Hospital Veterinário da Universidade Federal do Paraná.

4.1 REATIVOS

Nesse trabalho foram empregados os seguintes reativos e solventes:

- ✓ água ultrapura;
- ✓ acetonitrila grau cromatográfico (Merck®);
- ✓ Metanol (Merck®);
- ✓ acetato de amônio (Vetec®);
- ✓ padrão α e β - zearalenol (adquiridos da Sigma-Aldrich®) ambos com pureza \geq 98%;
- ✓ acetato de sódio anidro (Vetec®);
- ✓ sulfato de magnésio anidro (Vetec®);
- ✓ PSA (Agilent®);
- ✓ sílica C-18 (Agilent®).

4.2 PREPARO DAS SOLUÇÕES

As soluções padrão de α - e β - zearalenol foram preparadas nas concentrações de 100 $\mu\text{g/mL}$. As demais soluções foram preparadas por diluição da solução estoque.

As soluções de trabalho foram diluídas em acetonitrila na concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$ para α - zearalenol e 40 $\mu\text{g/mL}$ para β -zearalenol. Estas soluções foram sempre armazenadas em freezer -20°C .

4.3 EQUIPAMENTOS

Neste trabalho foram utilizados os seguintes equipamentos: cromatógrafo líquido de alta eficiência, modelo e marca Pro Star, Varian®; agitador tipo vórtex modelo e marca QL-901, Biomixer®; balança analítica modelo e marca AS220/C/2, Radwag®; purificador de água Marca Elga Lab Water, modelo Purelab Classic (Tipo I, 18.2 M Ω -cm).

4.4 AMOSTRAS DE SANGUE

Após a certificação do Comitê de Ética no Uso de Animais do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (processo 23075.177019/2017-21, aprovado em 25/07/2017 – R.O. 06/2017), as amostras de sangue total de cadelas diagnosticadas com câncer de mama foram coletadas no Hospital Veterinário da Universidade Federal do Paraná. Foram obtidas 50 amostras e o plasma foi separado por centrifugação a 3.200 RPM por 2 minutos. Após as coletas, o material foi armazenado em geladeira com temperatura controlada entre 2°C

e 8 °C, sendo transportadas até o laboratório de Toxicologia em caixas térmicas com material refrigerador e acondicionadas em freezer -20 °C. O descongelamento deu-se previamente à realização dos testes.

4.5 EXTRAÇÃO DE α E β - ZEARALENOL DO PLASMA

A extração de α - e β -zearalenol foi feita utilizando o método QuEChERS modificado. O desenvolvimento do procedimento de extração foi realizado tanto para amostras contaminadas quanto para as amostras reais. Foram testadas algumas condições e as que apresentaram melhores resultados são listadas na TABELA 5 abaixo:

TABELA 5 – PARÂMETROS UTILIZADOS PARA EXTRAÇÃO PELO MÉTODO QuEChERS

Extração	Partição	Clean up	Análise
500 μ L de plasma contaminado + 1 mL ACN acidificada 1%	0,2g Acetato de sódio anidro 0,05g sulfato de magnésio anidro Centrifugação	Ao sobrenadante 0,150g de C ₁₈ 0,062g de PSA 0,250g de MgSO ₄ Centrifugação Filtração por membrana	CLAE-FLD

FONTE: O autor (2018).

Em tubo tipo eppendorf de 2mL foram adicionados 500 μ L de plasma contaminado com α - e β - zearalenol acrescido de 1 mL de acetonitrila acidificada a 1% com ácido acético. Esta mistura foi agitada em vortex durante 1 minuto e em seguida foram adicionados os sais do processo de partição. Novamente foi agitado o tubo e em seguida centrifugado durante 1 minuto a 7200 RPM. O sobrenadante foi transferido para outro eppendorf para a etapa de *clean up*. Os sais de *clean up* foram adicionados, agitados durante 1 minuto e novamente centrifugado, o sobrenadante foi filtrado em membrana de 0.22 μ m. para vial de 2mL.

A acetonitrila foi escolhida como solvente de extração para o método QuEChERS pois possibilita a extração de uma menor quantidade de co-extratos lipofílicos da amostra, além de permitir melhores percentuais de recuperação quando acidificada (ANASTASSIADES et al., 2003).

4.6 ANÁLISE QUÍMICA DE α - E β - ZEARALENOL

A determinação de α - e β - zearalenol foi feita utilizando um sistema de Cromatografia

Líquida de Alta eficiência (CLAE) acoplado com detector de fluorescência.

As condições cromatográficas utilizadas foram: coluna de fase reversa C18 (Pursuit 150 x 2,0 mm) com tamanho de partículas de 2,8 μ m; temperatura ambiente; comprimento de onda de excitação de 270 nm e emissão 455 nm; fluxo de 0,2 mL min⁻¹; volume de injeção 20 μ L. Para a eluição foi utilizada a fase móvel constituída de 15 mM de acetato de amônio em metanol/água (65:35) com eluição no modo isocrático.

4.7 PARÂMETROS AVALIADOS NA VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA

Procedemos inicialmente com os testes dos padrões dissolvidos somente em solvente, sem contaminar o plasma. Deste modo, obteve-se as primeiras curvas analíticas.

Após, realizou-se a contaminação do plasma com os padrões, obtendo novas curvas analíticas, avaliando primeiro a seletividade e depois a linearidade, seguindo a normativa ANVISA (BRASIL, 2017).

4.7.1 Determinação da Seletividade

A seletividade do método foi avaliada por meio de comparação entre a matriz isenta dos metabólitos α - e β -zearalenol (plasma em branco) com a matriz contendo o analito (padrão). Um padrão de α - e β -zearalenol na concentração 10 μ g/mL e 40 μ g/mL, respectivamente, foi adicionado na amostra teste, seguida de filtração e injeção no cromatógrafo.

4.7.2 Determinação da Linearidade

A linearidade foi avaliada com base na curva analítica feita a partir de soluções estoque de α - e β -zearalenol na concentração de 10 μ g/mL para α -zearalenol e 40 μ g/mL para β -zearalenol. Para cada padrão foram injetadas 5 concentrações diferentes, todas testadas em quintuplicata. Construiu-se um gráfico da área do pico x concentração do analito, que forneceu o coeficiente de correlação (r) da reta obtida e os coeficientes angular e linear.

4.7.3 Determinação da Precisão

A precisão foi avaliada por meio da repetibilidade. Foram feitos 9 padrões de cada analito em três níveis de concentração (baixa, média e alta), pelo mesmo analista, sob as

mesmas condições experimentais em um curto intervalo de tempo. A precisão foi demonstrada pela dispersão dos resultados, calculando-se o desvio padrão relativo (DPR) da série de medições (EQUAÇÃO 7):

EQUAÇÃO 7 – DETERMINAÇÃO DA PRECISÃO

$$\text{DPR} = (\text{DP}/\text{CMD}) \times 100$$

Onde:

DP é o desvio padrão;

CMD é a concentração média determinada

Também foi avaliada a precisão instrumental por meio do tempo de retenção e área do pico de 10 injeções do padrão de β -zearalenol.

4.7.4 Determinação da Exatidão

A exatidão foi avaliada por meio de ensaios de recuperação, fortificando-se a amostra com diferentes concentrações de padrão de α - e β -zearalenol, e determinando-se em seguida a concentração do analito adicionado. Foram feitas determinações em triplicata em três níveis de concentração (baixa, média e alta – 15 ng, 30 ng e 50 ng para α -zearalenol e 200 ng, 400 ng e 800 ng para β -zearalenol, respectivamente) para ambos os analitos e a porcentagem de recuperação foi calculada segundo a EQUAÇÃO 8:

EQUAÇÃO 8 – DETERMINAÇÃO DA EXATIDÃO

$$\text{Recuperação} = \frac{\text{Concentração média experimental}}{\text{Concentração teórica}} \times 100$$

4.7.5 Determinação do Limite de detecção e quantificação

Os limites de detecção e quantificação instrumentais para α - e β -zearalenol foram avaliados a partir do método baseado nos parâmetros da curva analítica por meio das equações (4) e (5) descritas no item 2.6.6 e 2.6.7.

4.7.6 Determinação da Robustez

Estudos de robustez foram realizados variando fluxo da fase móvel e temperatura do forno da coluna cromatográfica. Foram preparadas amostras em quintuplicata do nível médio de concentração para ambos os metabólitos. Os resultados foram avaliados conforme a EQUAÇÃO 6.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA DETERMINAÇÃO DE α E β - ZEARALENOL

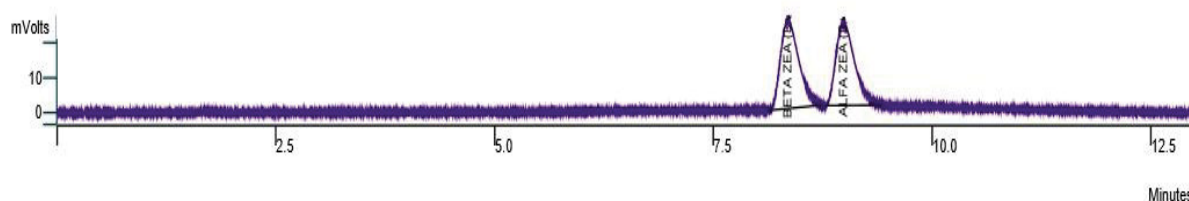
O desenvolvimento do método para determinação de α - e β - zearalenol foi baseado em condições propostas pela literatura (ANASTASSIADES et al., 2003), porém a metodologia foi adaptada e otimizada. Realizamos testes utilizando somente acetonitrila e acetonitrila acidificada com ácido acético a 1%. Nestes testes os melhores resultados foram observados com acetonitrila acidificada.

A validação da metodologia analítica para determinação de α - e β - zearalenol foi feita considerando os parâmetros de seletividade, linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção, limite de quantificação e robustez.

5.1.1 Determinação do tempo de retenção de α - e β - zearalenol

A análise cromatográfica em modo isocrático utilizando como fase móvel 15 mM de acetato de amônio em metanol/água (65:35) demonstrou ser a melhor condição para separar os produtos de biotransformação da zearalenona. Nesta condição o β -zearalenol apresentou um tempo de retenção de 8 minutos e o α -zearalenol de 9 minutos, conforme FIGURA 9 abaixo.

Outras condições de fases móveis foram testadas tanto em modo isocrático como em gradiente, mas em nenhuma condição utilizando a coluna cromatográfica disponível foi possível separar os picos de α -zearalenol e β -zearalenol.

FIGURA 8 – DETERMINAÇÃO DO TEMPO DE RETENÇÃO DE α - E β - ZEARALENOL

FONTE: O Autor (2018)

5.1.2 Avaliação da seletividade do método analítico

Com a escolha da fase móvel que melhor separou os componentes em estudo, a seletividade foi o primeiro parâmetro de desempenho do método a ser avaliado, uma vez que, se a seletividade do método não fosse assegurada, a linearidade, a exatidão e a precisão estariam seriamente comprometidas (RIBANI et al. 2004).

Esse parâmetro foi avaliado por meio da comparação dos cromatogramas referentes à matriz isenta dos analitos (amostra testemunha) com a matriz fortificada. A análise desses cromatogramas evidenciou uma seletividade adequada do método, pois nenhum pico foi observado no tempo de retenção de β -zearalenol (8,0 minutos) e nem do α -zearalenol (9,0 minutos) na amostra teste.

5.1.3 Avaliação do Efeito Matriz

O efeito da resposta cromatográfica influenciada pelo efeito matriz pode causar aumento ou diminuição da resposta do detector para um determinado analito presente no extrato da amostra quando comparado com o mesmo analito em solvente orgânico.

O efeito causado pela matriz depende das características físico-químicas dos analitos e das propriedades endógenas da matriz (polaridade, estabilidade térmica, tamanho das moléculas, entre outros) (PINHO et al., 2010).

Para ambos os metabólitos da micotoxina zearalenona, o efeito matriz observado foi de supressão, ou seja, o sinal analítico de α e β -zearalenol em matriz de plasma sanguíneo foi menor que o sinal analítico somente em solvente acetonitrila.

Na TABELA 06, encontram-se os percentuais de efeito matriz, observados para cada metabólito em cada concentração das soluções da curva analítica. O efeito matriz não é considerável quando seus valores estiverem dentro da faixa de -20% a +20%.

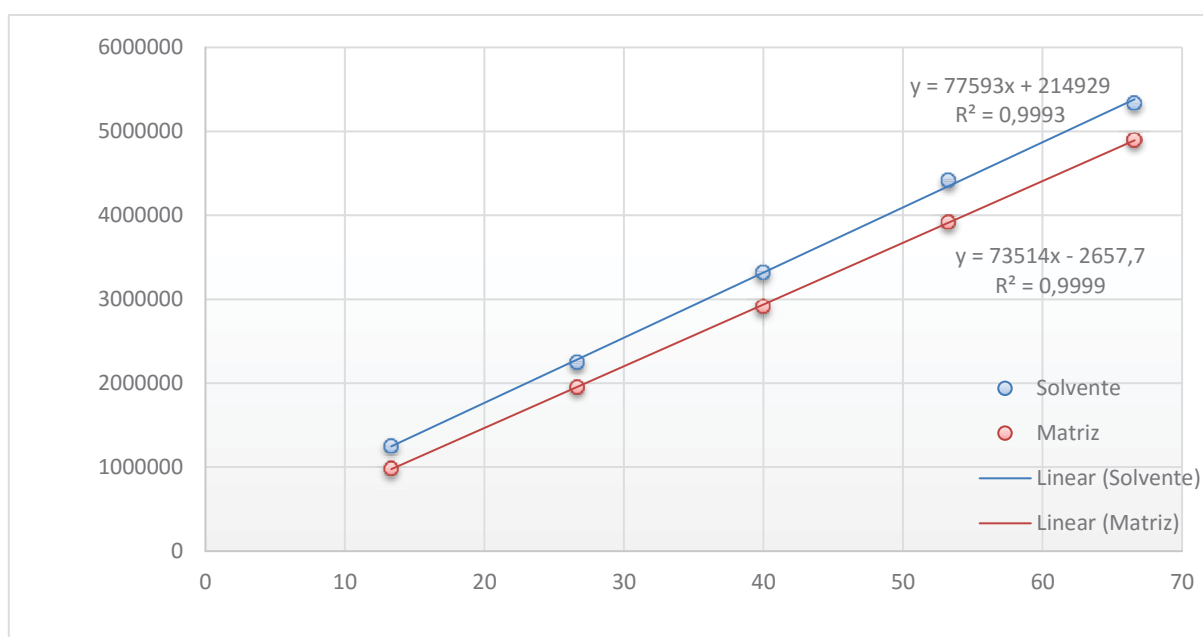
Pode-se observar que os valores se encontram todos dentro da faixa analítica aceitável de 20%, e com valores negativos, o que corresponde ao efeito de supressão anteriormente citado.

TABELA 06 – PERCENTUAL DO EFEITO MATRIZ OBSERVADO NA FAIXA DE CONCENTRAÇÃO ESTUDADA NAS CURVAS ANALÍTICAS PARA CADA NÍVEL DE CONCENTRAÇÃO

Metabólito	Efeito matriz calculado em cada nível de concentração (%)					Média
	Nível 1	Nível 2	Nível 3	Nível 4	Nível 5	
α -zearalenol	-19	-13	-12	-12	-8	-13
β -zearalenol	-20	-13	-10	-10	-9	-12

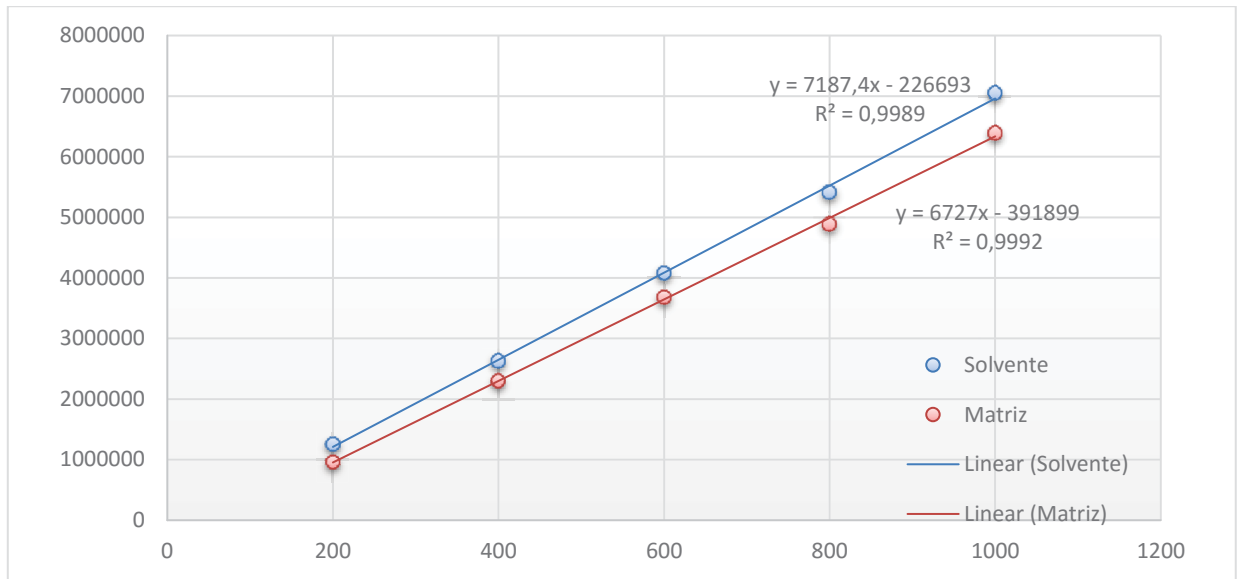
FONTE: O Autor (2018)

FIGURA 9: CURVA ANALÍTICA PREPARADA A PARTIR DAS SOLUÇÕES ANALÍTICAS DE α -ZEARALENOL EM SOLVENTE ORGÂNICO E EM EXTRATO DE MATRIZ EM 5 CONCENTRAÇÕES (13,1 a 66,6 ng mL⁻¹).



FONTE: o Autor (2018).

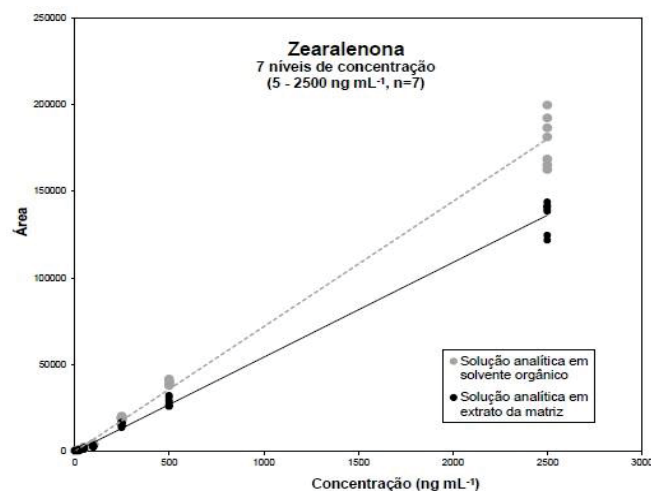
FIGURA 10: CURVA ANALÍTICA PREPARADA A PARTIR DAS SOLUÇÕES ANALÍTICAS DE β -ZEARALENOL EM SOLVENTE ORGÂNICO E EM EXTRATO DE MATRIZ EM 5 CONCENTRAÇÕES (200 a 1000 ng mL⁻¹).



FONTE: o Autor (2018).

Para a micotoxina zearalenona, Souza (2014) em seu trabalho também evidenciou o mesmo efeito matriz de supressão, ou seja, o sinal analítico de ZEA na matriz estudada foi menor que o sinal analítico em solvente orgânico. O resultado encontrado por este autor é representado na FIGURA 11 e corrobora os dados encontrados neste trabalho, mostrando um mesmo perfil de resposta para este analito.

FIGURA 11: CURVA ANALÍTICA PREPARADA A PARTIR DAS SOLUÇÕES ANALÍTICAS DA MICOTOXINA ZEARALENONA EM SOLVENTE ORGÂNICO E EM EXTRATO DE MATRIZ EM 7 CONCENTRAÇÕES (5 - 2500 ng mL⁻¹).

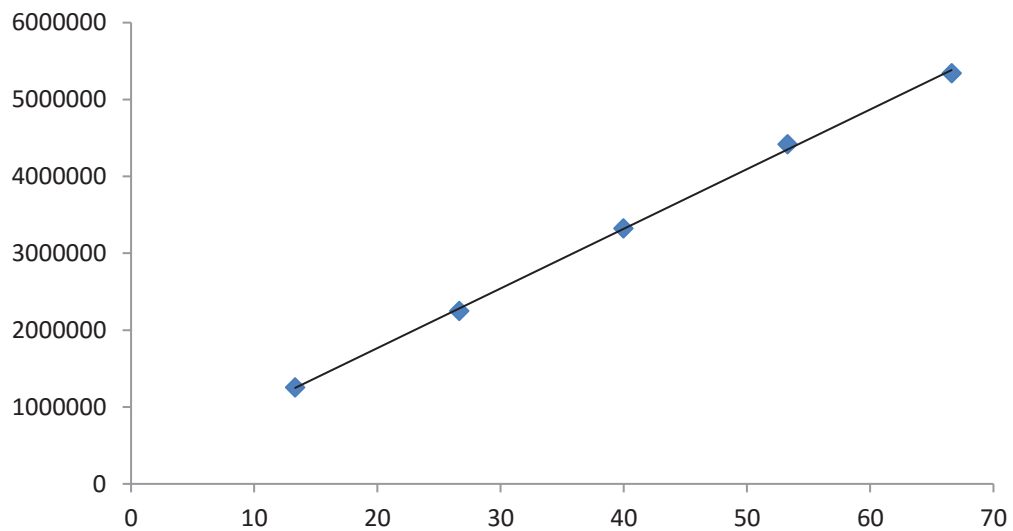


FONTE: Souza (2014).

5.1.4 Avaliação da linearidade do método analítico

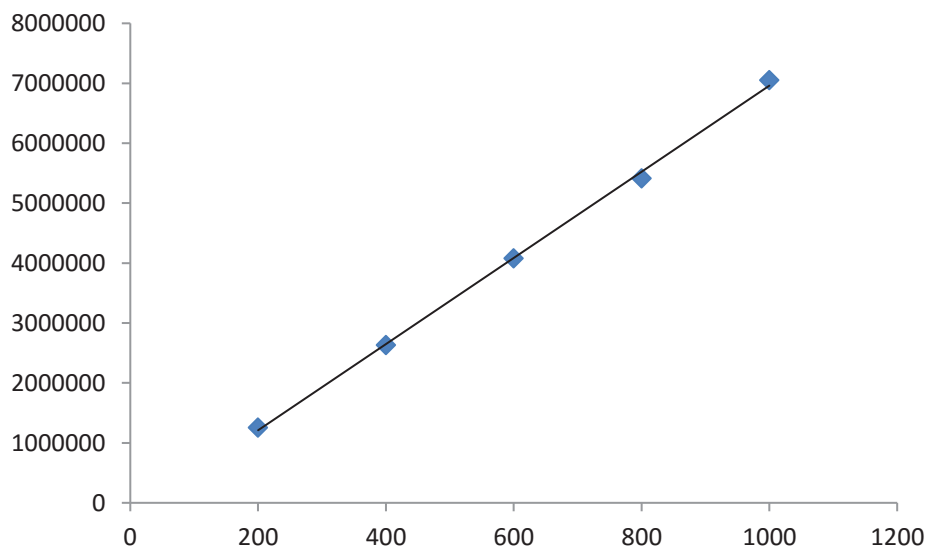
A linearidade permite verificar se os resultados referentes às áreas dos picos são proporcionais às concentrações do analito, dentro de uma faixa de aplicação. Deste modo, foram construídas curvas analíticas para ambos os analitos (FIGURAS 12 e 13) e os parâmetros referentes às curvas estão apresentados abaixo (TABELA 07).

FIGURA 12 - CURVA ANALÍTICA DO α - ZEARALENOL.



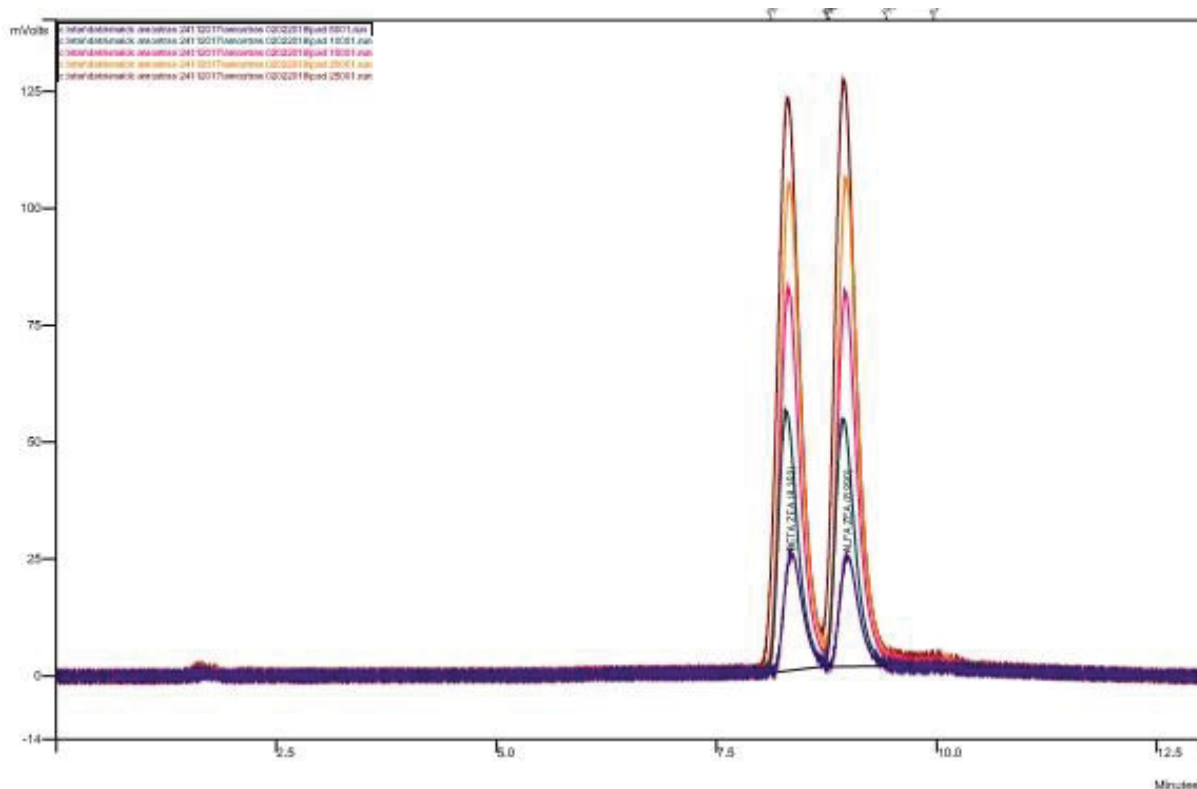
FONTE: o autor (2018).

FIGURA 13 - CURVA ANALÍTICA DO β - ZEARALENOL.



FONTE: o autor (2018)

FIGURA 14 – CROMATOGRAMAS SOBREPOSTOS EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE α - E β -ZEARALENOL



FONTE: O AUTOR (2018).

TABELA 07 – PARÂMETROS DAS CURVAS ANALÍTICAS PARA ANÁLISE DE α - E β -ZEARALENOL

PARÂMETROS	α	β
Coefficiente de correlação (r)	0,9993	0,9989
Equação da reta ($y=ax +b$)	$y= 775928x + 214929$	$y= 7187,4x -226693$
Desvio padrão da regressão	1008706	143748
Faixa de concentração (ng mL^{-1})	13 – 66	200 - 1000
Número de pontos	5	5

FONTE: O AUTOR (2018).

O coeficiente de correlação mostra a qualidade de uma curva analítica, pois quanto mais próximo o valor for de 1,0 menor tende a dispersão do conjunto de pontos experimentais e menor a incerteza dos parâmetros da regressão linear. Logo um coeficiente de correlação de 0,99 pode ser considerado como uma relação boa dos dados na regressão linear (ANVISA, 2017). Dessa forma, podemos salientar que o método analítico apresenta linearidade na faixa

estudada, pois para ambos os analitos o coeficiente de correlação apresentou valores superiores a 0,99.

5.1.5 Limites de Detecção e Quantificação

O limite de detecção (LD) do método foi definido como a menor concentração de α e β - zearalenol que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada (RIBANI et al. 2004). A partir das análises cromatográficas de padrões em concentrações decrescentes, estabeleceu-se o LD de 4 ng mL⁻¹ para α -zearalenol e 60 ng mL⁻¹ para β -zearalenol, sendo a menor concentração que permitiu a visualização inequívoca do pico cromatográfico de interesse.

O limite de quantificação (LQ) do método foi definido como a menor concentração de α - e β - zearalenol que pode ser detectada e quantificada com exatidão e precisão (RIBANI et al. 2004). A partir das análises cromatográficas dos padrões, estabeleceu-se o LQ de 13 ng mL⁻¹ para α -zearalenol e 200 ng mL⁻¹ para β -zearalenol, sendo a menor concentração da faixa linear das curvas de calibração avaliadas, a qual permitiu a quantificação de α - e β -zearalenol com exatidão e precisão.

Os limites de detecção e quantificação foram calculados de acordo com as equações 4 e 5, respectivamente, apresentadas anteriormente.

5.1.6 Avaliação da Exatidão e Precisão

A exatidão do método foi avaliada empregando os ensaios de recuperação. Amostras de plasma humano foram adicionadas do padrão dos metabólitos da micotoxina em três diferentes níveis de concentração (15, 30 e 50 ng para α -zearalenol e 200, 400 e 800 ng para β -zearalenol). A fortificação das amostras foi realizada por pelo menos 12 horas antes do início das análises, com a finalidade de promover maior interação entre os metabólitos da micotoxina e a matriz.

Uma limitação dos ensaios de recuperação é a do padrão adicionado na matriz não estar necessariamente na mesma forma que a presente naturalmente na amostra, o que pode resultar em uma melhor detecção e recuperações otimistas do método (INMETRO, 2010) no entanto, os ensaios de recuperação permitem que o analito de interesse seja avaliado na presença de possíveis interferentes, como impurezas e outros componentes da matriz. As porcentagens de recuperação do método variaram de 82 a 96%, com recuperação média de 87,7% para α -zearalenol e 84 a 96%, com recuperação média de 91,3% para β -zearalenol. Estas porcentagens

de recuperação obtidas foram satisfatórias (ANVISA, 2017). Segundo esta normativa, valores de recuperação entre 80 e 120 % são considerados aceitáveis.

A precisão do método analítico foi avaliada mediante ensaios de repetibilidade, expressos em termo de desvio padrão relativo.

Os desvios padrão relativos variaram de 1,23 a 8,16% para α -zearalenol e 1,58 a 2,24% para β -zearalenol. Os resumos das análises de Exatidão e Precisão constam abaixo (TABELAS 08 e 09).

A precisão instrumental foi avaliada com o propósito de verificar a capacidade do método analítico estudado, em um mesmo laboratório, de fornecer os mesmos resultados da concentração de β -zearalenol em diferentes dias de análises. Ensaios de repetibilidade empregando o mesmo cromatógrafo líquido, sob as mesmas condições cromatográficas, no mesmo laboratório, pelo mesmo analista, foram realizados em uma mesma corrida analítica.

TABELA 08 – ENSAIO DE AVALIAÇÃO DA PRECISÃO PARA α -ZEARALENOL

Nível de Concentração (ng mL ⁻¹)	Média (%)	Desvio Padrão	CV%
15	12,24	1,00	0,082
30	25,79	1,62	0,062
50	47,8	0,59	0,012

FONTE: o autor (2019).

TABELA 09 – ENSAIO DE AVALIAÇÃO DA PRECISÃO PARA β -ZEARALENOL

Nível de Concentração (ng L ⁻¹)	Média (%)	Desvio Padrão	CV%
200	185,05	2,95	0,015
400	339,83	5,38	0,016
800	772,08	17,37	0,022

FONTE: o autor (2019).

Os experimentos feitos para avaliar a precisão do método por meio da repetibilidade demonstraram que existe concordância entre os resultados encontrados para os três níveis de concentração avaliados.

Costuma-se confundir a repetibilidade com precisão instrumental. A primeira envolve várias medições de algumas soluções preparadas da mesma forma a partir de uma única amostra. Já a precisão instrumental avalia as medições de injeções repetitivas de uma única solução (RIBANI et al., 2004). A precisão instrumental foi verificada nesse trabalho por meio da injeção sucessiva de um padrão. Os valores referentes ao CV para tempo de retenção e área do pico para β -zearalenol foram inferiores a 1% (TABELA 10).

TABELA 10 – PRECISÃO INSTRUMENTAL REFERENTE A INJEÇÃO DO PADRÃO DE β -ZEARALENOL

B-zearalenol				
Parâmetro	Concentração (ng)	Média (n=10)	Desvio padrão	CV (%)
Tempo de retenção	400	8,55	0,1755	0,02
Área do pico		2237644	4,2	0,018

FONTE: O autor (2019).

Observa-se que o equipamento utilizado possui boa precisão instrumental, pois tanto os valores de área como os tempos de retenção variaram de forma pouco significativa.

Equipamentos modernos de cromatografia líquida apresentam normalmente precisão elevada garantindo mais confiabilidade aos dados gerados.

5.1.7 Avaliação da Robustez

Para os ensaios de robustez do método foram escolhidas para avaliação, os parâmetros cromatográficos vazão de fase móvel ($0,3 \text{ mL min}^{-1}$) e temperatura da coluna (25°C). O método mostrou-se robusto pois os resultados encontrados com as condições alteradas (3,15 % para α -zearalenol e 3,69% para β -zearalenol) não diferiram em $\pm 5\%$ dos resultados encontrados para a análise realizada com os parâmetros inalterados.

5.2 AVALIAÇÃO DAS AMOSTRAS DE CADELAS PORTADORAS DE CÂNCER DE MAMA

Após a conclusão da validação do método de extração usando o modelo QuEChERS como metodologia de escolha por ser mais rápida, com menor custo e efetiva para se aplicar em laboratório e da validação do método analítico por CLAE-FLD, foram coletadas 50 amostras de sangue de cadelas diagnosticadas com câncer de mama. A coleta foi realizada por médicos veterinários que foram responsáveis pela cirurgia de mastectomia e durante o estado de anestesia foram coletados 5mL de sangue. O sangue foi centrifugado e o plasma separado e congelado até o momento das análises. Após descongelamento estas amostras foram submetidas ao mesmo processo de extração a fim de avaliar a presença dos metabólitos α - e β -zearalenol nessa população. Das 50 amostras em que o método foi testado, 14% (n=7) apresentaram resultado positivo para α - e/ou β -zearalenol, nas concentrações apresentadas abaixo (TABELA 11):

TABELA 11 – CONCENTRAÇÕES DOS METABÓLITOS α E β -ZEARALENOL ENCONTRADAS NAS AMOSTRAS DE CADELAS DIAGNOSTICADAS COM CÂNCER DE MAMA

AMOSTRA N°	CONCENTRAÇÃO DE β -ZEARALENOL	CONCENTRAÇÃO DE α -ZEARALENOL
07	307,5 ng	ND
12	450,6 ng	16,4 ng
25	317,5 ng	13,6 ng
33	301,7 ng	54,0 ng
40	316,6 ng	40,1 ng
45	565,7 ng	ND
48	404,8 ng	ND
CONCENTRAÇÃO MÉDIA:	380,6 ng	31,0 ng

FONTE: O Autor (2019)

ND – Não detectado

É possível observar que em 100% das amostras positivas foi observada a presença do metabólito β -zearalenol; enquanto o metabólito α -zearalenol foi encontrado em 57,1 % (n=4 amostras). Nas amostras onde somente o metabólito β -zearalenol foi encontrado (n=3), é possível inferir que se tratam de quadros mais próximos da eliminação da micotoxina, uma vez que a hidroxilação da zearalenona para o metabólito β -zearalenol é um processo de desativação estrutural, enquanto a hidroxilação para o metabólito α -zearalenol é um processo de ativação, etapa mais inicial do processo de biotransformação.

Em relação aos animais que doaram sangue para este estudo, foram de várias raças e a maioria sem raça definida. Dos animais que apresentaram amostras positivas para os metabólitos estudados, observou-se idades entre 3,5 anos e 10 anos e 2 meses, com idade média de 7 anos.

Em relação ao peso, estes animais pesavam entre 11 Kg e 30 Kg, com peso médio de 18,4 Kg no dia da coleta das amostras.

Trata-se de uma população predominantemente adulta, com hábitos alimentares convencionais, ou seja, são animais alimentados exclusivamente com ração comercial, de 2 a 3 vezes ao dia. Não foi possível o acesso à ração destes animais, uma vez que o consumo foi realizado meses atrás, não tendo mais ração disponível para análise. A análise desta ração seria de fundamental importância para se comprovar o consumo de ração contaminada e poder se fazer uma correlação positiva entre o aparecimento de câncer de mama nestas cadelas estudadas.

Em contrapartida, a positividade na pesquisa dos metabólitos α - e β -zearalenol sugere que a ração servida para o consumo destes animais estava contaminada com a micotoxina zearalenona, ocasionando possivelmente o surgimento do câncer, o que levou estes animais a serem atendidos no hospital veterinário.

A ocorrência dos metabólitos da ZEA encontrados no plasma destas cadelas só demonstra que o consumo de rações contaminadas com micotoxinas pode levar ao aparecimento de doenças que muitas vezes não são correlacionadas com a ingestão de micotoxinas.

6 CONCLUSÕES

Foi desenvolvida uma metodologia para análise dos metabólitos α - e β -zearalenol, utilizando o método QuEChERS como método de extração e com detecção pelo sistema CLAE-FLD;

A seletividade da metodologia foi confirmada através do ensaio de amostras testemunha e a não verificação da presença de interferentes nas regiões de eluição dos analitos em estudo;

As curvas de calibração obtidas para α - e β -zearalenol demonstraram coeficiente de correlação acima de 0,99, o que demonstra a qualidade das curvas obtidas por apresentar menor incerteza dos parâmetros de regressão linear;

A metodologia apresentou linearidade na faixa de 13 a 66 ng mL⁻¹ para α -zearalenol e 200 a 1000 ng mL⁻¹ para β -zearalenol;

A metodologia QuEChERS proporcionou eficiente recuperação de 82% a 96% para α -zearalenol e 84% a 96% para β -zearalenol;

Os resultados encontrados permitem concluir que o método de extração (QuEChERS modificado) e quantificação (CLAE-FLD) empregado para determinação dos metabólitos α - e β -zearalenol em plasma é eficiente, rápido, preciso, exato e robusto;

A aplicação do método QuEChERS para extração dos metabólitos permitiu uma redução do volume de solventes utilizados durante a análise, bem como uma diminuição no tempo de análise;

A validação analítica é uma importante ferramenta para que se conheça as limitações das medidas realizadas durante o método analítico. Feito isso, foi possível atestar a respeito da confiabilidade de todo o método analítico e concluir a adequação do método ao objetivo proposto;

Foi realizada uma avaliação da ocorrência dos metabólitos da zearalenona em 50 amostras de plasma de cadelas diagnosticadas com câncer de mama. Dentre as amostras estudadas, em 07 delas foi quantificado β -zearalenol em concentrações médias de 380,6 ng e, em 4 amostras, 31,0 ng de α -zearalenol;

A alimentação destes animais restringiu-se especificamente à ração comercial, origem da contaminação por zearalenona. Inicialmente pensou-se em coletar uma pequena amostra da ração servida a estes animais e promover a investigação da presença da micotoxina zearalenona, porém não seria possível definir em que momento (lote/marca) a contaminação haveria ocorrido por tratar-se de uma exposição diária e contínua, mas a contaminação por ZEA ocorreu decorrente do consumo de ração contaminada;

Como continuidade desta pesquisa, sugerimos a ampliação do número de amostras de cadelas com câncer de mama e o desenvolvimento e validação do mesmo método de extração aplicado para a micotoxina zearalenona em amostras de rações comercializadas no mercado brasileiro, pois estes testes podem revelar baixos padrões de qualidade na ração direcionada para estes animais e os expõem não só à ZEA, mas como também a diferentes agentes tóxicos.

REFERÊNCIAS

ABBES, S.; OUANES, Z.; SALAH-ABBES, J. B.; ABDEL-WAHHAB, M. A.; OUESLATI, R.; BACHA, H. Preventive role of aluminosilicate clay against induction of micronuclei and chromosome aberrations in bone-marrow cells of Balb/c mice treated with Zearalenone. **Mutation Research**, v. 631, p. 85-92, 2007.

ABID-ESSEFI, S.; OUANES, Z.; HASSEN, W.; BAUDRIMONT, I.; CREPPY, E.; BACHA, H. Cytotoxicity, inhibition of DNA and protein syntheses and oxidative damage in cultured cells exposed to zearalenone. **Toxicology In Vitro**, v.18, p. 467-474, 2004.

American of Official Agricultural Chemists - AOAC. International. Official method 2007.01: pesticide residues in foods by acetonitrile extraction and partitioning with magnesium sulphate. **AOAC International**; 2007.

ANASTASSIADES, M.; LEHOTAY, S. J.; STAJNBAHER, D.; SCHENCK, F. J. 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**, v. 86, n. 2, p. 412-31, 2003.

ANASTASSIADES, M.; SCHERBAUM, E.; TASDELEN, B.; STAJNBAHER, D. Recent developments in QuEChERS methodology for pesticide multiresidue analysis. **Pesticide Chemistry: Crops protection, Public Health, Environmental safety**, p. 439-458, 2007.

ANDERSSON, A.; PALSHEDEN, H. Comparison of efficiency of different GLC multiresidue methods on crops containing pesticide residues. **Fresenius Journal of Analytical Chemistry**, v. 339, n. 6, p. 365-367, 1991.

ATANDA, S. A.; AINA, J. A. ; AGODA, S. A.; USANGA, O. E.; PESSU P. O. Mycotoxin Management in Agriculture: a Review. **J. Anim. Sci. Adv.**, v. 2, Supl.1, p. 250-260, 2012.

AVANTAGGIATO, G.; HAVENAAR, R.; VISCONTI, A. Assessing the zearalenone-binding activity of adsorbent materials during passage through a dynamic in vitro gastrointestinal model. **Food and Chemical Toxicology**, v.41, p.1283-1290, 2003.

BARAKAT, A. A; BADAWY, H. M. A; SALAMA, E; ATTALLAH, E; MAATOOK G. Simple and rapid method of analysis for determination of pesticide residues in honey using dispersive solid phase extraction and GC determination. **Journal of Food Agriculture and Environment**, v. 5, n. 2, p. 97-100, 2007.

BELHASSEN, H. et al. Zearalenone and its metabolites in urine and breast cancer risk: A case-control study in Tunisia. **Chemosphere**, v. 128, p. 1-6, 2015.

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

BEREK, L.; PETRI, I. B.; MESTERHAZY, A.; TEREN, J.; MOLNAR, J. Effects of mycotoxins on human immune functions in vitro. **Toxicology In Vitro**, v. 15, p. 25-30, 2001.

BEYER, A.; BIZIUK, M. Applications of sample preparation techniques in the analysis of pesticides and PCBs in food. **Food Chemistry**, v. 108, n.2, p. 669-680, 2007.

BHAT, R.; RAI, R. V.; KARIM, A. A. Mycotoxins in Food and Feed: Present Status and Future Concerns. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 9, n. 1, p. 57-81, 2010.

BIEHL, M. L.; PRELUSKY, D. B.; KORITZ, G. D.; HARTIN, K. E.; BUCK, W. B.; TRENHOLM, H. L. Biliary excretion and enterohepatic cycling of zearalenone in immature pigs. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 121, p.152–159, 1993.

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

BÖHM, J. et al. Survey and risk assessment of the mycotoxins deoxynivalenol, zearalenone, fumonisins, ochratoxin A, and aflatoxins in commercial dry dog food. **Mycotoxin Research**, v. 26, n. 3, p. 147-153, 2010.

BORUTOVA, R.; FAIX, S.; PLACHA, I.; GRESAKOVA, L.; COBANOVA, K.; LENG, L. Effects of deoxynivalenol and zearalenone on oxidative stress and blood phagocytic activity in broilers. **Archives of Animal Nutrition**., v.62, n. 4, p. 303–312, 2008.

BURGESS, L. W. General ecology of the Fusaria. In: NELSON, P. E.; TOUSSON, T. A.; COOK, R. J. (eds). **Fusarium: disease, biology and taxonomy**. Pennsylvania, State University Press 2001.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº. 07, de 18 de março de 2011.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº. 166, de 24 de julho de 2017.

BOYD, P. A.; WITTLIFF, J. L. Mechanism of *Fusarium* mycotoxin action in mammary ligand. **Journal of Toxicology Environment Health**, v. 4, p. 1-8, 1978.

BULLERMAN, L. B.; BIANCHINI, A. Stability of mycotoxins during food processing. **International Journal of Food Microbiology**, v. 119, n. 1, p. 140-146, 2007.

CAPRIOTTI, A. L. et al. Multiclass mycotoxin analysis in food, environmental and biological matrices with chromatography/mass spectrometry. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 31, n. 4, p. 466-503, 2012.

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

CASTILLO, J. M. S. **Micotoxinas en alimentos**. Valência: Diaz de Santos, 2007. p.393

CELIUS, T.; HAUGEN, T. B.; GROTMOL, T.; WALTHER, B. T. Asensitive zonagenetic assay for rapid in vitro assessment of estrogenic potency of xenobiotics and mycotoxins. **Environmental Health Perspect.**, v. 107, p. 63-68, 1999.

CLAUS, R.; HOANG-VU, C.; ELLENDORFF, F.; MEYER, H.D.; SCHOPPER, D.; WEILER, U. Seminal oestrogens in the boar: origin and functions in the sow. **Journal Steroid Biochemistry**, v. 27, p. 331-335, 1987.

CODEX COMMITTEE ON FOOD ADDITIVES AND CONTAMINANTS (CCFAC). Position paper on Zearalenone. **Food and Agriculture Organization of the United Nations**, v. 32, n. 16, 2000.

COUNCIL FOR AGRICULTURAL SCIENCE AND TECHNOLOGY (CAST). Mycotoxins: Risks in plant, animal, and human systems. **Task Force Report**, v. 139, p. 199, 2003.

CREPPY, E. E. Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe. **Toxicol. Lett.** v.127, n. 1-3, p.19-28, 2002.

CUNHA, S. C; LEHOTAY, S. J.; MAŠTOVSKÁ, K.; FERNANDES, J. O.; OLIVEIRA, B.M.P.P. Evaluation of the QuEChERS sample preparation approach for the analysis of pesticide residues in olives. **Journal of Separation Science**, v. 30, n. 4, p. 620-632, 2007.

DÄNICKE, S. et al. On the effects of graded levels of Fusarium toxin contaminated wheat in diets for gilts on feed intake, growth performance and metabolism of deoxynivalenol and zearalenone. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 49, n. 10, p. 932-943, 2005.

DESMARCHELIER, A.; TESSIOT, S.; BESSAIRE, T.; RACAULT, L.; FIORESE, E.; URBANI, A.; CHAN, W. C.; CHENG, P.; MOTTIER, P. Combining the quick, easy, cheap, effective, rugged and safe approach and clean-up by immunoaffinity column for the analysis of 15 mycotoxins by isotope dilution liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography**, v. 1337, p. 75-84, 2014.

DILKIN, P.; MALLMANN, C. A.; ALMEIDA, C. A. A.; CORREA, B. Robotic automated clean-up for detection of fumonisins B1 and B2 in corn and cornbased feed by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 925, n. 1-2, p. 151-157, 2001.

DING, X.; LICHTI, K.; STAUDINER, J. L. The mycoestrogen zearalenone induces CYP3A through activation of the pregnene X receptor. **Toxicology Science**. v. 91, p. 448-55, 2006.

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

DÖLL, S.; DÄNICKE, S. The Fusarium toxins deoxynivalenol (DON) and zearalenone (ZON) in animal feeding. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 102, n. 2, p. 132-145, 2011.

DORIĆ, M.; RADOVIĆ, S.; BABIĆ, M.; KUSKUNOVIĆ, S.; TOMIĆ, I.; SELAK, I. Zearalenone-induced lymphophagocytosis (T cell apoptosis) on the rat's thymus. **Bosnian Journal of Basic Medical Sciences**, v. 7, p. 66-70, 2007.

EDWARDS, S.; CANTLEY, T. C.; ROTTINGHAUS, G. E.; OSWEILER, G. D.; DAY, B. N. The effects of zearalenone on reproduction in swine: The relationship between ingested zearalenone dose and anestrus in non-pregnant, sexually mature gilts. **Theriogenology**, v. 28, n. 1, p. 43-49, 1987.

ETIENNE, M.; DOURMAD, J. Y. Effects of zearalenone or glucosinolates in the diet on reproduction in sows: a review. **Livestock Production Science**, v. 44, n. 2, p. 99-113, 1994.

EUROPEAN COMMITTEE FOR STANDARDIZATION. CEN, CEN/TC 275 15662:2008: foods of plant origin - Determination of pesticide residues using GC-MS and/or LC-MS/MS following acetonitrile extraction/ partitioning and clean-up by dispersive SPE - **QuEChERS-method**. European Union; 2008. Disponível em: <
http://www.chromnet.net/Taiwan/QuEChERS_Dispersive_SPE/QuEChERS_%E6%AD%90%E7%9B%9F%E6%96%B9%E6%B3%95_EN156622008_E.pdf>.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA). Opinion of the scientific panel on contaminants in the food chain on a request from the commission related to zearalenone as undesirable substance in animal feed. **The EFSA Journal**, v. 89, p. 1-35, 2004.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA). Evaluation of the increase of risk for public health related to a possible temporary derogation from the maximum level of deoxynivalenol, zearalenone and fumonisins for maize and maize products. **EFSA Journal**, v. 12, n. 5, p. 3699-n/a, 2014.

FERNÁNDEZ-ALBA, A. R. **Chromatographic - mass spectrometry food analysis for trace determination of pesticide residues**. Amsterdam: Elsevier, v. 43, 2005.

FLECK, S. C, CHURCHWELL, M. I.; DOERGE, D. R.; TEEGUARDEN, J. G. Urine and serum biomonitoring of exposure to environmental estrogens II: Soy isoflavones and zearalenone in pregnant women. **Food Chem Toxicol**, v. 95, p. 19-27, 2016.

FINK-GREMMELS, J.; MALEKINEJAD, H. Review: Clinical effects and biochemical mechanisms associated with exposure to the mycoestrogen zearalenone. **Animal Feed Science and Technology**, v. 137, n. 3-4, p. 326-341, 2007.

FORSELL, J. H.; WITT, M. F.; TAI, J. H.; JENSEN, R.; PESTKA, J. J. Effects of 8-week exposure of the B6C3F1 mouse to dietary deoxynivalenol (vomitoxin) and zearalenone. **Food and Chemical Toxicology**, v. 24, n. 3, p. 213-219, 1985.

GAJECKA, M. et al. Zearalenone applied per os provides adverse effects in structure of chosen parts of bitch reproductive system. **Pol J Vet Sci**, v. 7, n. 1, p. 59-66, 2004.

GAUMY, J. L., BAILLY, J. D.; BURGAT, V.; GUERRE, P. Zéaralénone: Propriétés et toxicité expérimentale. **Revue de médecine vétérinaire**, v. 152, n. 3, p.219-234, 2001.

GAZZOTTI, T. et al. Occurrence of mycotoxins in extruded commercial dog food. **Animal Feed Science and Technology**, v. 202, p. 81-89, 2015.

GOBEL, R.; LUSKY, K. Simultaneous determination of aflatoxins, ochratoxin A, and zearalenone in grains by new immunoaffinity column/liquid chromatography. **J. AOAC Int.**, v. 87, n. 2, p.411–416, 2004.

GONZÁLEZ-CURBELO, M. Á. et al. Evolution and applications of the QuEChERS method. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 71, p. 169-185, 2015.

GREEN, M. L.; DIEKMAN, M. A.; MALAYER, J. R.; SCHEIDT, A. B.; LONG, G. G. Effect of prepubertal consumption of zearalenone on puberty and subsequent reproduction of gilts. **Journal of Animal Science**, v. 68, n. 1, p. 171178, 1990.

HASSEN, W.; AYED-BOUSSEMA, I.; OSCOZ, A. A.; LOPEZ ADE, C.; BACHA, H. The role of oxidative stress in zearalenone-mediated toxicity in Hep G2 cells: oxidative DNA damage, glutathione depletion and stress proteins induction. **Toxicology**, v. 232, n. 3, p. 294-302, 2007.

HAUSCHILD, L.; LOVATTO, P.; LEHNEN, C.; CARVALHO, A.; GARCIA, G.; MALLMANN, C. Digestibilidade e metabolismo de dietas de suínos contendo zearalenona com adição de organoaluminossilicato. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, n. 2, p. 219-224, 2007.

HIEMSTRA, M; KOK, A. Comprehensive multiresidue method for the target analysis of pesticides in crops using liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography**, v. 1154, n. 1-2, p. 3-25, 2007.

HYÖTYLÄINEN, T. On-line coupling of extraction with gas chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1186, n. 1-2, p. 39-50, 2008.

Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial - **INMETRO**. DOQ-CGCRE-008. Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos. Rio de Janeiro: INMETRO, 2010. 20 p.

Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives – JECFA. Zearalenone. In Safety Evaluation of Certain Food Additives and Contaminants, **WHO Food Additives Series**, v. 44, p. 393–482, 2000.

KATZENELLENBOGEN, B. S.; KATZENELLENBOGEN, J. A., MORDECAI, D. Zearalenones: characterization of the estrogenic potencies and receptor interactions of a series of fungal β -resorcylic acid lactones. **Endocrinology**, v. 105, n. 1, p. 33–40, 1979.
KOPPEN, R. et al. Determination of mycotoxins in foods: current state of analytical methods and limitations. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 86, n. 6, p. 1595-612, 2010.

KRSKA, R.; WELZIG, E.; BOUDRA, H. Analysis of Fusarium toxins in feed. **Animal Feed Science and Technology**, v. 137, n. 3-4, p. 241–264, 2007.

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

KUIPER-GOODMAN, T. Risk assessment to humans of mycotoxins in animal-derived food products. **Vet Hum Toxicol**, v. 33, n. 4, p. 325-32, 1991.

KUIPER, G. G. et al. Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. **Endocrinology**, v. 139, n. 10, p. 4252-63, 1998.

KWAŚNIEWSKA, K.; GADZAŁA-KOPCIUCH, R.; CENDROWSKI, K. Analytical Procedure for the Determination of Zearalenone in Environmental and Biological Samples. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 45, n. 2, p. 119-130, 2015.

LACAZ, C. S.; PORTO, C.; MARTINS, J. E. C. **Guia para Identificação de Fungos Actinomicetos e Algas**. São Paulo: Sarvier, 2008.

LANÇAS, F. M. **Validação de Métodos Cromatográficos de Análise**. São Paulo: RiMa, 2004.

LEHOTAY, S. J.; MAŠTOVSKÁ, K.; YUN, S. J. Evaluation of two fast and easy methods for pesticide residue analysis in Fatty Food Matrixes. **Journal of the association of Official Analytical Chemists**, v. 88, n. 2, p. 630-638, 2005.

LEHOTAY, S. J.; SON, K. A.; KWON, H.; KOESUKWIWAT, U.; FU, W.; MAŠTOVSKÁ, K.; HOH, E.; LEEPIPATPIBOON, N. Comparison of QuEChERS sample preparation methods for the analysis of pesticide residues in fruits and vegetables. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n. 16, p. 2548-2560, 2010.

LIGOR, M.; WÓJCIK, J.; BUSZEWSKI, B. Application of the solid phase microextraction (SPME) and gas chromatography (GC, GC/MS) in food analysis. **Pol. J. Food Nutr. Sci.**, v. 13/54, n. 4, p. 355–362, 2004

LIOI, M. B.; SANTORO, A.; BARBIERI, R.; SALZANO URSINI, V. Ochratoxin and zearalenone: a comparative study on genotoxic effects and cell death induced in bovine lymphocytes. **Mutation Research**, v. 557, n. 1, p. 19–24, 2004.

MAAROUFI, K.; CHEKIR, L.; CREPPY, E. E.; ELLOUZ, F.; BACHA, H. Zearalenone induces modifications of haematological and biochemical parameters in rats. **Toxicon**, v. 34, n. 5, p. 535-540, 1996.

MALEKINEJAD, H.; MAAS-BAKKER, R.; FINK-GREMMELS, J. Species differences in the hepatic biotransformation of zearalenone. **The Veterinary Journal**, v. 172, n. 1, p. 96–102, 2006.

MALLMANN, C. A.; DILKEN, P. **Micotoxinas e micotoxicoses em suínos**. Santa Maria: Ed. Pallotti, 2007, 240p.

MANKA, M. et al. Pathogenicity of Fusarium Isolates from Wheat, Rye and Triticale Towards Seedlings and their Ability to Produce Trichothecenes and Zearalenone. **Journal of Phytopathology**, v. 113, n. 1, p. 24-29, 1985.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (MAPA). **Validação e Controle de Qualidade Analítica**. 1ª ed. Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria da Defesa Agropecuária, 2011. p. 78.

MARIN, D. E. et al. Changes in performance, blood parameters, humoral and cellular immune responses in weanling piglets exposed to low doses of aflatoxin. **Journal of Animal Science**, v. 80, n. 5, p. 1250-1257, 2002.

MARQUES, M. Validação Interna dos Métodos de Determinação de Deoxinivalenol e Zearalenona por HPLC com Purificação por Colunas de Imunoafinidade (Pesquisa de Deoxinivalenol e Zearalenona em Milhos e Alimentos Compostos para Animais). Dissertação apresentada ao Departamento de Engenharia Química e Biológica do Instituto Superior Técnico para obtenção do grau de licenciatura em engenharia química. Lisboa. (2007).

MARTINS, M. L. H.; MARTINS, M. Influence of water activity, temperature and incubation time on the simultaneous production of deoxynivalenol and zearalenone in corn (*Zea mays*) by *Fusarium graminearum*. **Food Chemistry**, v. 79, p.315–318, 2002.

MAŠTOVSKÁ, K.; DORWEILER, K. J.; LEHOTAY, S. J.; WEGSCHEID, J. S.; SZPYLKA K. A. Pesticide Multiresidue Analysis in Cereal Grains Using Modified QuEChERS Method Combined with Automated Direct Sample Introduction GC-TOFMS and UPLC-MS/MS Techniques. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 10, p. 5959-5972, 2010.

MCGEE, D. C. **Maize diseases: a reference source for seed technologists**. Saint Paul: The American Phytopathological Society, p150, 1988.

MEHMOOD, Z. et al. The development of methods for assessing the in vivo oestrogen-like effects of xenobiotics in CD-1 mice. **Food and Chemical Toxicology**, v. 38, n. 6, p. 493-501, 2000.

MILIĆEVIĆ, D. R.; ŠKRINJAR, M.; BALTIĆ, T. Real and Perceived Risks for Mycotoxin Contamination in Foods and Feeds: Challenges for Food Safety Control. **Toxins**, v. 2, n. 4, p. 572-592, 2010.

MILLS, J.Y. Ecology of Mycotoxigenic *Fusarium* species on cereal seeds. **J Food Potec.** v. 52, n. 10, p. 737-42, 1989.

MINERVINI, F.; DELL'AQUILA, M. E. Zearalenone and reproductive function in farm animals. **International Journal of Molecular Science**, v. 9, n. 12, p. 2570-2584, 2008.

MIRÓ-ABELLA, E. et al. Determination of mycotoxins in plant-based beverages using QuEChERS and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 229, p. 366-372, 2017.

MOSTROM, M. Zearalenone (chapter 77). In: GUPTA, R. C. **Veterinary Toxicology: Basic and Clinical Principles**. p. 977- 982, 2007.

OMS. Organización Mundial de la Salud. Criterios de salud ambiental Micotoxinas. **OrganizaçãO Panamericana de la Salud**, p. 133, 1983.

PESTKA, J. J.; TAI, J. H.; WITT, M. F.; DIXON D.; FORSELL, J. H. Suppression of immune response in the B6C3F1 mouse after dietary exposure to the *Fusarium* mycotoxins deoxynivalenol (vomitoxin) and zearalenone. **Food and Chemical Toxicology**, v. 25, n. 4, p. 297–304, 1987.

PINHO, G. P. et al. Influência dos constituintes químicos dos extratos de diferentes matrizes na resposta cromatográfica de agrotóxicos. **Química Nova**, v. 33, n. 4, p. 909-913, 2010.

PIZZUTTI, I. R.; KOK, A; ZANELLA, R.; ADAIME, M.B.; HIEMSTRA, M.; WICKERT C.; PRESTES, O. D. Method validation for the analysis of 169 pesticides in soya grain, without clean up, by liquid chromatography–tandem mass spectrometry using positive and negative electrospray ionization. **Journal of Chromatography A**, v. 11142, n. 2, p. 123-136, 2006.

POOR, M. et al. Interaction of mycotoxin zearalenone with human serum albumin. **J Photochem Photobiol B**, v. 170, p. 16-24, 2017.

PRESTES, O. D.; ADAIME, M. B.; ZANELLA, M. B. QuEChERS: possibilidades e tendências no preparo de amostra para determinação multirresíduo de pesticidas em alimentos. **Scientia Chromatographica** v. 3, n. 1, p. 51-64 2011.

RAGO, V.; SICILIANO, L.; AQUILA, S.; CARPINO, A. Detection of estrogen receptors ER-alpha and ER-beta in human ejaculated immature spermatozoa with excess residual cytoplasm. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 4, n. 1, p. 36-42, 2006.

RAHMANI, A.; JINAP, S.; SOLEIMANY, F. Qualitative and Quantitative Analysis of Mycotoxins. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 8, n. 3, p. 201-251, 2009.

RAMOS, A. J.; FINK-GREMMELS, J.; HERNANDEZ, E. Prevention of toxic effects of mycotoxins by means of nonnutritive adsorbent compounds. **Journal of Food Protection**, v. 59, n. 6, p. 631-641, 1996.

REIS, M.; CASA T. **Manual de Identificação e controle de doenças de milho**. Passo Fundo: Aldeia Norte, p. 80, 1996.

REN, Y.; ZHANG, Y.; SHAO, S.; CAI, Z.; FENG, L.; PAN, H.; WANG, Z. Simultaneous determination of multi-component mycotoxin contaminants in foods and feeds by ultra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. **J Chromatogr A**, v. 1143, n. 1-2, p. 48-64, 2007.

RIBANI, M.; BOTOLLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-789, 2004.

RICHARD, J. L. Some major mycotoxins and their mycotoxicoses—An overview. **International Journal of Food Microbiology**, v. 119, n. 1, p. 3-10, 2007.

RIDGWAY, K. Sample Preparation for food Contaminant Analysis. **LCGC EUROPE**, v. 25, n. 2, p.60, 2012.

RIGHI, L. W. **Método multirresíduo para determinação de micotoxinas em vinho por UPLC-MS/MS**. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria – RS – 2013.

ROMERO-GONZÁLEZ, R.; FRENICH, A. G.; VIDAL, J. L. M.; PRESTES, O. D.; GRIO, S. L. Simultaneous determination of pesticides, biopesticides and mycotoxins in organic products applying a quick, easy, cheap, effective, rugged and safe extraction procedure and

ultra-high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, n. 11, p. 1477–1485, 2011.

ROYER, D.; HUMPF, H. U.; GUY, P. A. Quantitative analysis of Fusarium mycotoxins in maize using accelerated solvent extraction before liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization tandem mass 65 spectrometry. **Food Additives and Contaminants**, v. 21, n. 7, p. 678–692, 2004.

SAENZ DE RODRIGUEZ, C. A.; BONGIOVANNI, A. M.; CONDE DE BORREGO, L. An epidemic of precocious development in Puerto Rican children. **J Pediatr**, v. 107, n. 3, p. 393–6, 1985.

SAITO, Y.; KODAMA, S.; MATSUNAGA, A.; YAMAMOTO, A. Multiresidue Determination of Pesticides in Agricultural Products by Gas Chromatography/Mass Spectrometry with Large Volume Injection. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, v. 87, n. 6, p. 1356–1367, 2004.

SALAH-ABBÈS, J. B., ABBÈS, S., ABDEL-WAHHAB, M., OUESLATI, R. Immunotoxicity of zearalenone in Balb/c mice in a high subchronic dosing study counteracted by Raphanus sativus extract. **Immunopharmacology and Immunotoxicology**, v.32, p. 628–636, 2010.

SALAY, E.; MERCADANTE, A. Z. Mycotoxins in Brazilian corn for animal feed: occurrence and incentives for the private sector to control the level of contamination. **Food Control**, v. 13, n. 2, p.87–92, 2002.

SANCO, D. G. Directorate-General for Health and Consumer Protection. **Guidance document on analytical quality control and validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed**, p. 46, 2013.

SCHENCK, F. J.; BROWN, A. N.; PODHORNIAK, L. V.; PARKER, A.; RELIFORD M.; WONG J. W. A Rapid Multiresidue Method for Determination of Pesticides in Fruits and Vegetables by Using Acetonitrile Extraction/Partitioning and Solid-Phase Extraction Column Cleanup. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, v. 91, n. 2, p. 422–438, 2008

SCUSSEL, G. B.; Simão V.; Rocha M. W.; Reis L. F. C.; Xavier J. J. M. Mycotoxin evaluation in feed for pets using tandem liquid chromatography/mass/massspectrometry. **9th Int. Working Conf. on Stored Product Protection, Campinas, SP**, p. 182–188, 2006.

Disponível em:

<http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.488.8521&rep=rep1&type=pdf>.

SHARP, J. **Quality in the manufactured of medicines and other healthcare products**. 3 ed. London: Pharmaceutical Press, 2000.

SHURTLEFF, C. **Compendium of corns diseases**. Saint Paul: The American Phytopathological Society, p. 105, 1992.

SILVA, C. M.; VARGAS, E. A. A survey of zearalenone in corn using Romer Mycosep 224 column and high performance liquid chromatography. **Food addit. contam.**, v.18, n. 1, p. 39–45, 2001.

SILVA, L. P. Validação de um método multianalito para determinação de micotoxinas e pesticidas em arroz usando metodologia de extração *dilute and shoot* e UHPLC-MS/MS. Dissertação apresentada ao Departamento de Química da Universidade Federal de Minas Gerais (2017).

SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; CROUCH, S. R. **Fundamentos de Química Analítica**. 8ª ed. São Paulo: Cengage Learning, 2008.

SOUZA, D. M. **Micotoxinas em matrizes de milho e trigo: validação de método analítico por UPLC-MS/MS e monitoramento em diferentes pontos da cadeia produtiva e comercial**. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria – RS – 2014.

STABILE, V.; RUSSO, M.; CHIEFFI, P. 17beta-estradiol induces Akt-1 through estrogen receptor-beta in the frog (*Rana esculenta*) male germ cells. **Reproduction**, v. 132, p. 477-484, 2006.

STOPA, E. et al. Immunohistochemical evaluation of apoptosis and proliferation in the mucous membrane of selected uterine regions in pre-pubertal bitches exposed to low doses of zearalenone. **Pol J Vet Sci**, v. 19, n. 1, p. 175-86, 2016.

STOPA, E. et al. The effect of experimental exposure to low doses of zearalenone on uterine histology and morphometry in prepubertal bitches. **Theriogenology**, v. 82, n. 4, p. 537-545, 2014/09/01/ 2014.

SUDAKIN, D. L. Trichothecenes in the environment: relevance to human health. **Toxicology Letters**, v. 143, n. 2, p. 97-107, 2003.

SULYOK, M.; BERTHILLER, F.; KRŠKA, R.; SCHUHMACHER, R. Development and validation of a liquid chromatography/tandem mass spectrometric method for the determination of 39 mycotoxins in wheat and maize. **Rapid Commun. Mass Spectrom.**, n. 20, p. 2649–2659, 2006.

TAKEMURA, H.; SHIM, J.; SAYAMA, K.; TSUBURA, A.; ZHU, B.; SHIMOI, K. Characterization of the estrogenic activities of zearalenone and zeranone in vivo and in vitro. **Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology**, v. 103, p. 170–177, 2007.

TANAKA, T. et al. Simultaneous determination of trichothecene mycotoxins and zearalenone in cereals by gas chromatography–mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 882, n. 1, p. 23-28, 2000.

THOMAS, J. L. et al. Structure/function aspects of human 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 215, n. 1-2, p. 73-82, 2004.

TIEMANN, U.; DANICKE, S. In vivo and in vitro effects of the mycotoxins zearalenone and deoxynivalenol on different non-reproductive and reproductive organs in female pigs. **Food Additives and Contaminants**, v. 24, n. 3, p. 306-314, 2007.

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

URRY, W. H. et al. The structure of zearalenone. **Tetrahedron Letters**, v. 7, n. 27, p. 3109-3114, 1966.

VLATA, Z.; PORICHIS, F.; TZANAKAKIS, G.; TSATSAKIS, A.; KRAMBOVITIS, E. A study of zearalenone cytotoxicity on human peripheral blood mononuclear cells. **Toxicol Lett**, v. 3, n. 165, p. 274-281, 2006.

WARTH, B. et al. New insights into the human metabolism of the Fusarium mycotoxins deoxynivalenol and zearalenone. **Toxicology Letters**, v. 220, n. 1, p. 88-94, 2013.

YANG, J. Y.; WANG, G. X.; LIU, J. L.; FAN, J. J.; CUI, S. Toxic effects of zearalenone and its derivatives alpha-zearalenone on male reproductive system in mice. **Reproductive Toxicology**, v. 24, n. 3-4, p. 381-387, 2007.

YEGANI, M., SMITH T.; LEESON S.; BOERMANS, H. Effects of feeding grains naturally contaminated with Fusarium mycotoxins on performance and metabolism of broiler breeders. **Poultry Science**, v. 85, n. 9, p.1541–1549, 2006.

ZINEDINE, A. et al. Review on the toxicity, occurrence, metabolism, detoxification, regulations and intake of zearalenone: An oestrogenic mycotoxin. **Food and Chemical Toxicology**, v. 45, n. 1, p. 1-18, 2007.

ZÖLLNER, P. et al. Concentration Levels of Zearalenone and Its Metabolites in Urine, Muscle Tissue, and Liver Samples of Pigs Fed with Mycotoxin-Contaminated Oats. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 9, p. 2494-2501, 2002.