

Célia Sofia Melo Laranjeiro

# Ocorrência de Zearalenona em Águas de Superfície em Portugal

Dissertação de Mestrado em Segurança Alimentar, orientada pela Professora Doutora Celeste de Matos Lino e co-orientada pela Professora Doutora Angelina Lopes Simões Pena e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Julho 2015



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Célia Sofia Melo Laranjeiro

# Ocorrência de Zearalenona em Águas de Superfície em Portugal

Dissertação de Mestrado em Segurança Alimentar, orientada pela Professora Doutora Celeste de Matos Lino e co-orientada pela Professora Doutora Angelina Lopes Simões Pena e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Julho 2015





## **AGRADECIMENTOS**

O primeiro agradecimento é dirigido à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, por permitir a realização deste projeto, proporcionado as condições indispensáveis à sua realização.

À primeira pessoa que me acolheu com firmeza neste projeto, a Professora Doutora Celeste de Matos Lino, agradeço por todo o apoio e orientação técnico-científica, bem como pela inteira disponibilidade demonstrada ao longo da realização da dissertação, mas também por todos os seus ensinamentos e pelo nível de exigência que colocou neste trabalho.

À Professora Doutora Angelina Lopes Simões Pena por ter aceite ser co-orientadora deste projeto.

À Doutora Liliana Silva pelo tempo generosamente despendido desde o início das atividades experimentais, pela sua colaboração e ensinamentos transmitidos, os quais foram fundamentais para a realização deste estudo.

Ao Mestre André Pereira pela disponibilidade, preocupação, optimismo e apoio durante toda a atividade experimental.

Às entidades colaboradoras na colheita das amostras de água, pela prontidão e disponibilidade no envio das mesmas, as quais foram fundamentais à realização deste estudo.

Ao Laboratório de Espectrometria de Massa (LEM), na pessoa da Dr.<sup>a</sup> Fátima Nunes, pela colaboração e assistência bem como pela partilha de conhecimento e dedicação, a minha sincera gratidão.

Agradeço, à D. Anabela, pela receção e integração no Laboratório de Bromatologia, Hidrologia e Nutrição da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra assim como a todos colegas com quem tive a oportunidade de partilhar este laboratório.

Agradeço aos meus pais e ao meu irmão pela ajuda e pelo apoio constante, sem os quais não teria sido possível chegar até aqui. A motivação que constantemente me transmitiam foi imprescindível, tanto durante este trabalho como ao longo de toda a minha vida académica.

Por fim quero ainda agradecer o contributo de todos os meus amigos, com os quais partilhei diversos momentos de alegria ao longo deste percurso, pelo apoio e pela entajuda que me proporcionaram.

A todos aqueles que estiveram presentes neste meu percurso, o meu sincero e profundo agradecimento.



## RESUMO

As micotoxinas são metabolitos secundários tóxicos de ocorrência natural, produzidas por espécies fúngicas como *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp., e *Penicillium* ssp. A contaminação de alimentos e produtos agrícolas por fungos capazes de produzir estas toxinas pode ocorrer no campo, antes e/ou após a colheita, e durante o transporte e armazenamento do produto. A zearalenona (ZEA) é uma micotoxina estrogénica não esteróide produzida por diversas espécies de fungos do género *Fusarium*.

A toxicidade de ZEA está relacionada com a estrutura química desta micotoxina estrogénica, semelhante ao estrogénio de ocorrência natural.

Atualmente há uma crescente conscientização sobre a importância dos fungos e micotoxinas na água. Assim, considerou-se essencial determinar a concentração de ZEA nas águas de superfície, em Portugal. As amostras foram colhidas em dois períodos, ou seja, entre setembro a novembro de 2014 e fevereiro a abril de 2015.

A metodologia analítica baseada na extração/purificação da amostra, com recurso a filtração e purificação com colunas IAC, bem como à para deteção e quantificação por cromatografia líquida com deteção por massa em *tandem* (LC-MS/MS), foi validada com a finalidade de avaliar a ZEA, em águas de superfície.

A linearidade da ZEA, em fase móvel, entre 2,5 ng/mL e 50 ng/mL,  $R^2=0,9997$ , e na matriz, preparada entre 5 e 100 ng/L,  $R^2=0,9999$ , foram adequadas. O efeito de matriz obtido foi de 100,05%. As recuperações variaram entre 85,22% e 100,30% e a repetibilidade intra-dia entre 0,54% e 1,73% e inter-dia entre 0,49% e 3,67%. O LOD e o LOQ foram 1,82 e 5,53 ng/L, respetivamente.

Foi avaliado o teor em ZEA em 38 amostras. Nove amostras (23,68%) estavam contaminadas, com teores que oscilaram entre 5,59 e 82,56 ng/L, sendo o teor médio de 16,77 ng/L. Uma das amostras, especificamente do rio Xarrama, em Évora, revelou uma concentração considerável de ZEA, 82,56 ng/L, o valor mais alto detetado e conhecido até ao momento. Entre os dois períodos analisados, outono e primavera, não se verificou a existência de diferenças significativas,  $P=0,09$ .

A incidência de amostras positivas (23,68%), indica que esta micotoxina pode ser um contaminante relativamente frequente na água de superfície.

**Palavras chave:** micotoxinas, *fusarium*, zearalenona, água de superfície, LC-MS/MS.



## ABSTRACT

Mycotoxins are toxic secondary metabolites naturally occurring, produced by fungal species such as *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp., *Penicillium* spp. Contamination of foods and agricultural products by fungi capable of producing these toxins can occur in the field before and / or after harvest, during transportation and storage of the product. Zearalenone (ZEA) is a non-steroidal estrogenic mycotoxin produced by several species of fungi of the genus *Fusarium*.

The ZEA toxicity is related to the chemical structure of estrogenic mycotoxin, similar to naturally occurring estrogen.

Currently there is a growing awareness of the importance of fungi and mycotoxins in the water. Thus, it was considered essential to determine the concentration of ZEA in surface waters in Portugal. Samples were taken in two periods, ie from September to November 2014 and from February to April 2015.

An analytical methodology based on extraction/purification of the sample, using filtration/IAC columns as well as detection and quantification by liquid chromatography with tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) has been validated in order to evaluate the ZEA in surface water.

The linearity of ZEA, in mobile phase, from 2.5 ng/mL and 50 ng/mL,  $R^2 = 0.9997$ , and in the matrix, prepared from 5 to 100 ng/L,  $R^2 = 0.9999$ , were adequate. The matrix effect obtained was 100.05%. Recoveries ranged between 85.22% and 100.30%, and the intra-day repeatability between 0.54% and 1.73% and inter-day between 0.49% and 3.67%. The LOD and the LOQ were 1.82 and 5.53 ng/L, respectively.

The content of ZEA in 38 samples was evaluated. Nine of them (23.68%) were contaminated with levels ranging between 5.59 and 82.56 ng/L. The average level was 16.77 ng/L. One of the samples, specifically from Xarrama river in Évora, revealed a considerable concentration of ZEA, 82.56 ng/L, the highest value detected as far as we know. Statistical differences between the two analyzed periods, Autumn and Spring, were not observed,  $P=0.09$ .

The incidence of positive samples (23.68%) indicates that mycotoxins can be a relatively frequent contaminant on the surface of water.

**Keywords:** mycotoxins, *Fusarium*, zearalenone, surface water, LC-MS/MS.





## ÍNDICE

RESUMO .....	v
ABSTRACT .....	vii
PARTE I REVISÃO DA LITERATURA .....	I
I.1 Micotoxinas .....	3
I.2 Zearalenona.....	6
I.2.1 Características físico-químicas .....	6
I.2.2 Toxicocinética .....	8
I.2.2.1 Absorção e Distribuição.....	8
I.2.2.2 Metabolismos e Excreção.....	10
I.2.3 Atividade estrogénica da ZEA vs estrogénios naturais.....	13
I.2.4 Efeitos fisiológicos e toxicidade.....	16
I.2.4.1 Aguda .....	16
I.2.4.2 Subaguda e subcrónica .....	17
I.2.4.3 Crónica e carcinogénese .....	18
I.2.4.4 Efeitos em humanos.....	20
I.2.4.4.1 Genotoxicidade.....	21
I.2.4.4.2 Toxicidade reprodutiva e de desenvolvimento.....	21
I.2.4.4.3 Efeitos imunológicos.....	22
I.2.5 Incidência .....	22
I.2.5.1 Águas residuais.....	24
I.2.5.2 Águas superficiais .....	25
I.2.5.3 Águas destinadas ao consumo humano.....	28
I.2.6 Métodos de determinação.....	32
I.2.6.1 Extração/Purificação .....	32
I.2.6.2 Deteção e quantificação.....	34
PARTE 2 PARTE EXPERIMENTAL .....	43
2.1 Material e Métodos.....	45

2.1.1 Amostragem .....	45
2.1.2 Reagentes e Material .....	46
2.1.3 Soluções.....	46
2.1.4 Equipamento LC-MS-MS.....	47
2.2 Procedimento Experimental.....	47
2.2.1 Extração / purificação.....	47
2.2.2 Detecção e Quantificação .....	48
2.2.3 Validação .....	48
2.2.3.1 Linearidade .....	49
2.2.3.2 Ensaio de fortificação.....	49
2.2.3.3 Limite de deteção e limite de quantificação.....	49
2.2.4 Análise estatística .....	50
2.3 Resultados e Discussão .....	50
2.3.1 Otimização dos procedimentos analíticos.....	50
2.3.2 Desempenho analítico.....	53
2.3.3 Ocorrência de ZEA em águas de superfície.....	56
2.4 Conclusão.....	61
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	63
ANEXO .....	83
Anexo - Amostras de águas de superfície: zona/rio e data de colheita. ....	83

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química da ZEA .....	7
Figura 2. Estrutura química do $\alpha$ -zearalenol, $\beta$ -zearalenol, $\alpha$ -zearalanol e $\beta$ -zearalanol .....	8
Figura 3. Metabolismo da ZEA - principais metabolitos e enzimas envolvidas na biotransformação da micotoxina .....	12
Figura 4. Estrutura química da molécula de $17\beta$ -estradiol .....	15
Figura 5. Possível distribuição ambiental da ZEA (caixa cinza e setas espessas indicam possíveis fontes emissoras, sujeitas a investigação preliminar) .....	24
Figura 6. Esquema representativo da ação da IAC sobre a amostra injetada .....	33
Figura 7. Identificação dos locais onde foram aleatoriamente colhidas as amostras.....	45
Figura 8. Equipamento de LC-MS/MS.....	47
Figura 9. Cromatograma e espectro de solução padrão de ZEA (50 ng/mL $\simeq$ 1 ng/20 $\mu$ L).....	51
Figura 10. Cromatograma e espectro de ZEA numa amostra fortificada a 50 ng/L.....	52
Figura 11. Cromatograma e espectro numa amostra em que a ZEA não foi detetada.....	52
Figura 12. Cromatograma e espectro de ZEA numa amostra contaminada.....	53
Figura 13. Curva de calibração de ZEA em fase móvel.....	54
Figura 14. Curva de calibração de ZEA na matriz.....	54

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Principais espécies fúngicas responsáveis pela produção de micotoxinas .....	4
Tabela 2 - Propriedades físico-químicas da ZEA .....	7
Tabela 3 - Concentração de ZEA em órgãos de truta arco-íris .....	10
Tabela 4 - Afinidades e potências estrogénicas em hormonas naturais .....	14
Tabela 5 - Frequência e teores (ng/L) de ZEA em diferentes tipos de água em vários países .....	30
Tabela 6 - Metodologias analíticas utilizadas na determinação de zearalenona em águas .....	37
Tabela 7 - Valores relativos à exatidão e à precisão da metodologia analítica para a determinação da ZEA em águas de superfície .....	55
Tabela 8 - Frequência (%) e teores (ng/L) de ZEA nas amostras de água de superfície .....	57
Tabela 9 - Frequência (%) e teores (ng/L) de ZEA, por época, em águas de superfície .....	58



## LISTA DE ABREVIATURAS

ACN - Acetonitrilo

ADN - Ácido desoxirribonucleico

AlaAT - Alanina aminotransferase

Anpromis - Associação nacional dos produtores de milho e sorgo

AOAC - *Association of Official Analytical Chemists*

Arb. - Unidade arbitrária

AspAT - Aminotransferase

CAST - *Council for Agricultural Science and Technology* (Conselho de Ciência e Tecnologia Agrícola)

Conc. - Concentração

CV - Coeficiente de variância

CYP - Citocromo P450

D<sub>6</sub>-ZON - Zearalenona-D<sub>6</sub>

DL50 - Dose Letal 50

E1 - Estrona

E2 - 17β-estradiol

E3 - Estriol

EDC - *Endocrine disrupting compounds* (Compostos Desreguladores Endócrinos)

EFSA - *European Food Safety Authority* (Autoridade Europeia para a Segurança Alimentar)

ER - Recetor de estrogénio

ER $\alpha$  - Estrogénio recetor alfa

ER $\beta$  - Estrogénio recetor beta

ETAR - Estação de Tratamento de Águas Residuais

F. - *Fusarium*

FAO - *Food and Agriculture Organization of the United Nations* (Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação)

FD - *Fluorescent Detection* (deteção por fluorescência)

FDA - *Food and Drug Administration*

GC - *Gas chromatography* (Cromatografia gasosa)

GC/MS - *Gas chromatography/mass spectrometry* (cromatografia gasosa com deteção por massa)

GI - Gastrointestinal

h - horas

H<sub>2</sub>O - Água

HPG - Eixo hipotalâmico-hipofisário gonadal

HPLC - *High performance liquid chromatography* (cromatografia líquida de alta eficiência)

HSDs - Hidroxiesteróides desidrogenases

IAC - *Immunoaffinity chromatography* (Coluna de imunoafinidade)

IARC - *International Agency for Research on Cancer* (Agência Internacional para a Investigação de Cancro)

ICH - *International Conference on Harmonization* (Conferência Internacional de Harmonização)

IPCS - *International Programme on Chemical Safety* (Programa Internacional de Segurança Química)

LC - *Liquid Chromatography* (Cromatografia líquida)

LC-FD - *Liquid chromatography with fluorescence detection* (cromatografia líquida com detetor de fluorescência)

LC-MS/MS - *Liquid chromatography with tandem Mass spectrometry* (cromatografia líquida com deteção por massa em *tandem*)

LEM - Laboratório de Espetrometria de Massa

LH - Hormona luteinizante

LOD - Limite de deteção

LOQ - Limite de quantificação

*m/z* - relação massa/carga

MDL - *Method detection limit* (Limite de deteção do método)

ME - *Matrix effect* (efeito da matriz)

MeOH - Metanol

MS - *Mass spectrometry* (espectrometria de massa)

MS/MS - *Tandem Mass Spectrometry* (Espectrometria de massa em *tandem*)

NADH - Nicotinamida adenina dinucleotido reduzido

NTP - *National Toxicology Program* (Programa Nacional de Toxicologia)

ODS - Octadecilsilano

OMS - Organização Mundial de Saúde

p.c. - peso corporal

R<sup>2</sup> - Coeficiente de determinação/correlação

Ral - Lactona do ácido resorcílico

RBA - Afinidades de ligação relativa ao ER

RDS - *Relative standard deviation* (desvio padrão relativo)

RP - Potências estrogénicas relativas

S/R - Razão sinal - ruído

SCF - *Scientific Committee on Food* (Comité Científico da Alimentação)

SD - *Standard deviation* (desvio padrão)

SPE - *Solid Phase Extraction* (extração e fase sólida)

*spp.* - *species*

SULTs - Sulfotransferases

Sy/x - Desvio padrão residual

UGTs - Uridina difosfato glucuronosiltransferases

USA - *United States of America* (Estados Unidos da América)

vtg - vitelogenina

WB - *Wide bore*

WHO - *World Health Organization*

ZEA - Zearalenona

$\alpha$ -ZAL -  $\alpha$ -zearalanol

$\alpha$ -ZOL -  $\alpha$ -zearalenol

$\beta$ -ZAL -  $\beta$ -zearalanol

$\beta$ -ZOL -  $\beta$ -zearalenol

$\lambda_{em}$  - Comprimento de onda de emissão

$\lambda_{exc}$  - Comprimento de onda de excitação





**PARTE I**  
**REVISÃO DA LITERATURA**



## 1.1 Micotoxinas

Existem milhares de metabolitos secundários produzidos por fungos, sendo o seu número total ainda desconhecido (Paterson, Venâncio e Lima *et al.*, 2004). Alguns deles são tóxicos para humanos e animais, e como tal são designados por micotoxinas (Kelley *et al.*, 2003).

Já foram isoladas e quimicamente caracterizadas mais de 300 micotoxinas, mas somente alguns destes compostos têm sido objeto de intensa investigação, não só devido à ocorrência frequente em diversos alimentos, mas sobretudo pela sua toxicidade (Martins, 2003).

O termo micotoxina deriva da palavra grega “mykes”, que significa fungo, e da latina “toxicum”, que significa veneno ou toxina (Gonzalez *et al.*, 2005).

As micotoxinas são metabolitos secundários tóxicos de ocorrência natural, produzidas por espécies fúngicas como *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp., e *Penicillium* ssp. (Goswami e Kistler, 2004).

Ao contrário dos metabolitos primários, que são essenciais ao crescimento do fungo, os metabolitos secundários são formados durante o final da fase exponencial de crescimento e, aparentemente, não possuem significado para o crescimento ou metabolismo do organismo produtor (Bennett e Klich, 2003).

As micotoxinas são moléculas de baixo peso molecular e são específicas, geneticamente, de um grupo de espécies dentro de cada género. São um conjunto de moléculas toxicológica e quimicamente heterogêneas e têm como característica comum o facto de, em baixas concentrações, poderem causar doenças ou morte em seres humanos e outros vertebrados (Bennett e Klich, 2003).

No que respeita à sua presença e perigosidade realçam-se as micotoxinas especificadas na tabela I.

A contaminação de alimentos e produtos agrícolas por fungos capazes de produzir estas toxinas pode ocorrer no campo, antes e/ou após a colheita, e durante o transporte e armazenamento do produto. Vários fatores contribuem para a sua produção tais como, as condições edafo-climáticas, como a atividade de água, a temperatura, a luminosidade, o pH, a presença de oxigénio e de dióxido carbono e ainda os nutrientes disponíveis (Georgianna e Payne, 2009; Knowmycotoxins, 2008).

**Tabela I** - Principais espécies fúngicas responsáveis pela produção de micotoxinas (adaptado de Marques, 2007).

<b>Micotoxina</b>	<b>Espécies Produtoras</b>
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</i> spp.
Zearalenona	<i>F. graminearum</i> e outras <i>Fusarium</i> spp.
Fumonisinias	<i>F. moniliforme</i> (= <i>F. verticillioides</i> ); <i>F. proliferatum</i>

A contaminação de alimentos e produtos agrícolas por fungos capazes de produzir estas toxinas pode ocorrer no campo, antes e/ou após a colheita, e durante o transporte e armazenamento do produto. Vários fatores contribuem para a sua produção tais como, as condições edafo-climáticas, como a atividade de água, a temperatura, a luminosidade, o pH, a presença de oxigénio e de dióxido carbono e ainda os nutrientes disponíveis (Georgianna e Payne, 2009; Knowmycotoxins, 2008).

As micotoxinas ocorrem numa variedade de culturas, algumas com elevada importância económica como o milho, o trigo e outros cereais, em especiarias, plantas medicinais, frutos secos, café, vinho, entre outras (Goswami e Kistler, 2004; Murphy *et al.*, 2006).

São ubíquas na natureza, acabando por ser ingeridas involuntariamente, quando são consumidos alimentos de origem vegetal contaminados. Por se tratar de contaminantes naturais não é possível eliminar completamente a sua presença dos alimentos, mas o seu nível pode e deve ser reduzido tanto quanto seja tecnologicamente possível, para que não representem risco para a saúde pública (Bennett e Klich, 2003).

A Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação (FAO) estima que cerca de 25% das culturas, no mundo, são afetadas por micotoxinas a cada ano, emergindo como preocupação mundial na área de Segurança Alimentar, Saúde Pública e Animal. As perdas anuais estão estimadas em cerca de 1 bilhão de toneladas de alimentos e derivados. As perdas económicas relevantes ocorrem por perda no rendimento das culturas devido à ocorrência de doenças causadas pelos fungos toxigénicos, pelo valor reduzido da cultura sujeita a contaminação com micotoxinas, por perdas na produtividade animal devido a problemas de saúde relacionados com as micotoxinas e pelos custos associados à saúde humana (Bhat, Rai e Karim, 2010; Hussein e Brasel, 2001; Zain, 2011).

É conhecido que representam um problema económico a nível mundial, devido à sua elevada resistência em matérias-primas e em alimentos compostos para animais e humanos, assim como a dificuldade no seu controlo e eliminação. As micotoxinas apresentam, no geral, uma grande estabilidade química, o que permite a sua persistência nos alimentos, mesmo após a remoção dos fungos pelos processos usuais de industrialização e embalagem (Oliveira, 2006). São bastante resistentes a tratamentos térmicos, como os utilizados no processamento alimentar, quer quando estão sujeitos a altas ou baixas temperaturas, como a cozedura ou congelação (Marques, 2007), pelo que a sua eliminação dos produtos finais é inviável (Santin, 2005).

Nos últimos anos, as infestações por fungos nas culturas têm aumentado devido a fatores como as mudanças nas práticas de cultivo, diminuição da rotação de culturas (Champeil et al., 2004), mas também devido às alterações climáticas (Madgwick et al., 2011).

A principal via de exposição dos animais a micotoxinas é efetuada através da ingestão de alimentos contaminados, apesar de existirem casos esporádicos de inalação de micotoxinas e contacto dérmico (Serra, 2005).

Quando ingeridas, as micotoxinas são metabolizadas pelo fígado e seguidamente exercem efeitos deletérios em vários órgãos e sistemas do organismo, demonstrando propriedades tóxicas para animais e humanos (CAST, 2003a).

As intoxicações humanas e de animais associadas à ingestão de produtos alimentares contaminados com estes metabolitos tóxicos, denominam-se micotoxicoses. Os alimentos contaminados podem originar toxicidade aguda, efeito imediato provocado por concentrações elevadas, ou crónica, provocada por pequenas concentrações e longos tempos de exposição (Fonseca, 2001).

O grau de toxicidade varia em função das características da micotoxina, podendo mesmo ocorrer alterações durante a sua metabolização no organismo, umas vezes com a perda de toxicidade, outras vezes levando à formação de metabolitos mais tóxicos (Cigić e Prosen, 2009). Consequentemente, a avaliação dos seus efeitos adversos na saúde torna-se uma tarefa complexa, sendo muitas vezes dificultada pela coocorrência de várias micotoxinas e pelo facto de uma multiexposição poder incorrer em efeitos aditivos, sinérgicos ou antagónicos entre si (Ficheux, Sibiril e Parent-Massin, 2012).

Os efeitos das micotoxicoses dependem da quantidade e duração da exposição, mas também do tipo de micotoxinas em causa e do seu mecanismo de ação específico, da espécie animal

envolvida, da idade, do estado de saúde e do estado nutricional, da dose, da duração e via de exposição (Aljicevic *et al.*, 2008; Bennett e Klich, 2003; Bhatnagar, Yu e Ehrlich, 2002).

Os sinais e sintomas das micotoxicoses vão desde lesões de pele, sintomas de hepatotoxicidade, nefrotoxicidade, neurotoxicidade, hematotoxicidade ou genototoxicidade, podendo ocasionar a morte. As micotoxinas podem ainda apresentar efeitos mutagênicos, teratogênicos, carcinogênicos ou imunossupressores, neurotóxicos, antibacterianos e hormonais (Cole e Cox, 1981; JECFA, 2001; Kelley *et al.*, 2003; Torrado, 2007).

Várias micotoxinas foram classificadas pela Agência Internacional para a Investigação de Cancro (IARC) como carcinogênicos para humanos, grupo I, como a aflotoxina B<sub>1</sub>, ou carcinogênicos possíveis (Grupo 2B), casos da ocratoxina A e das fumonisinas (IARC, 1993).

## 1.2 Zearalenona

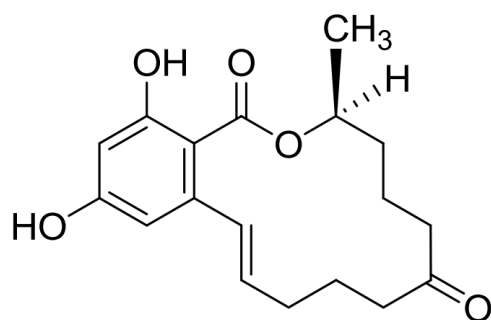
### 1.2.1 Características físico-químicas

A zearalenona (ZEA) é uma micotoxina estrogénica não esteróide produzida por diversas espécies de fungos do género *Fusarium* (*F.*), nomeadamente *F. graminearum* (*Gibberella zeae*), *F. culmorum*, *F. cerealis*, *F. equiseti*, *F. crookwellense* e *F. semitectum* (Glenn, 2007; Gromadzka *et al.*, 2009).

O *F. graminearum* foi isolado pela primeira vez no solo de Buckinghamshire, na Inglaterra (Dixon, 1998), enquanto a história do estrogénismo e as observações que levaram à descoberta da micotoxina foram descritas por Mirocha, Christensen e Nelson (1971).

A denominação zearalenona provém do fungo “*Gibberella zeae*” (forma sexuada do *F. graminearum*), visto ser este o seu principal produtor, mas também pelas características da sua estrutura química (Zinedine *et al.*, 2007). Assim, o seu nome resulta da combinação de *Gibberella zeae* (zea), de se tratar de uma lactona do ácido resorcílico (ral), da existência de uma dupla ligação entre o C-1' e o C-2' (eno) e da presença da cetona em C-6' (ona) (figura 1) (Urry *et al.*, 1966).

A fórmula empírica desta micotoxina é C<sub>18</sub>H<sub>22</sub>O<sub>5</sub>. Quimicamente trata-se de uma lactona do ácido 6-(10-hidroxi-6-oxo-trans-1-undecenil)-β-resorcílico, evidenciada na figura 1, cujo peso molecular é 318,147 g/mol .



**Figura 1.** Estrutura química da ZEA (Mizutani, Nagatomi e Mochizuki, 2011).

A estabilidade da ZEA é consideravelmente elevada, não se degrada a altas temperaturas, sendo considerada bastante persistente no ambiente (Ryu *et al.*, 2003).

É uma substância branca e cristalizável, solúvel em metanol (MeOH) e outros álcoois, éter dietílico, benzeno, acetonitrilo (ACN), acetato de etilo, com ponto de fusão a 165 °C (Marques, 2007). É moderadamente solúvel em água. Segundo alguns investigadores essa solubilidade é de 5,2 mg/L (Megharaj, Garthwaite e Thiele, 1997) e de acordo com outros oscila entre 2,6-4,8 (tabela 2). O log  $K_{ow}$  é 3,7 (Lemke, Grant e Phillips, 1998), o que indica alguma mobilidade no ambiente e um certo potencial de sorção (a absorção e a adsorção ocorrem em simultâneo) e retenção em sistemas do solo (Ryu *et al.*, 2003).

**Tabela 2** - Propriedades físico-químicas da ZEA (adaptado de Bucheli *et al.*, 2005).

Micotoxina	Solubilidade em (mg/L)	log $K_{ow}$ (-)	pKa (-)	Pressão do (Pa)
ZEA	2,6 - 4,8 <sup>a</sup>	3,7 <sup>a</sup>	7,6 <sup>a</sup>	n.a.

<sup>a</sup> - Lemke *et al.* (1998); n.a.: não avaliado.

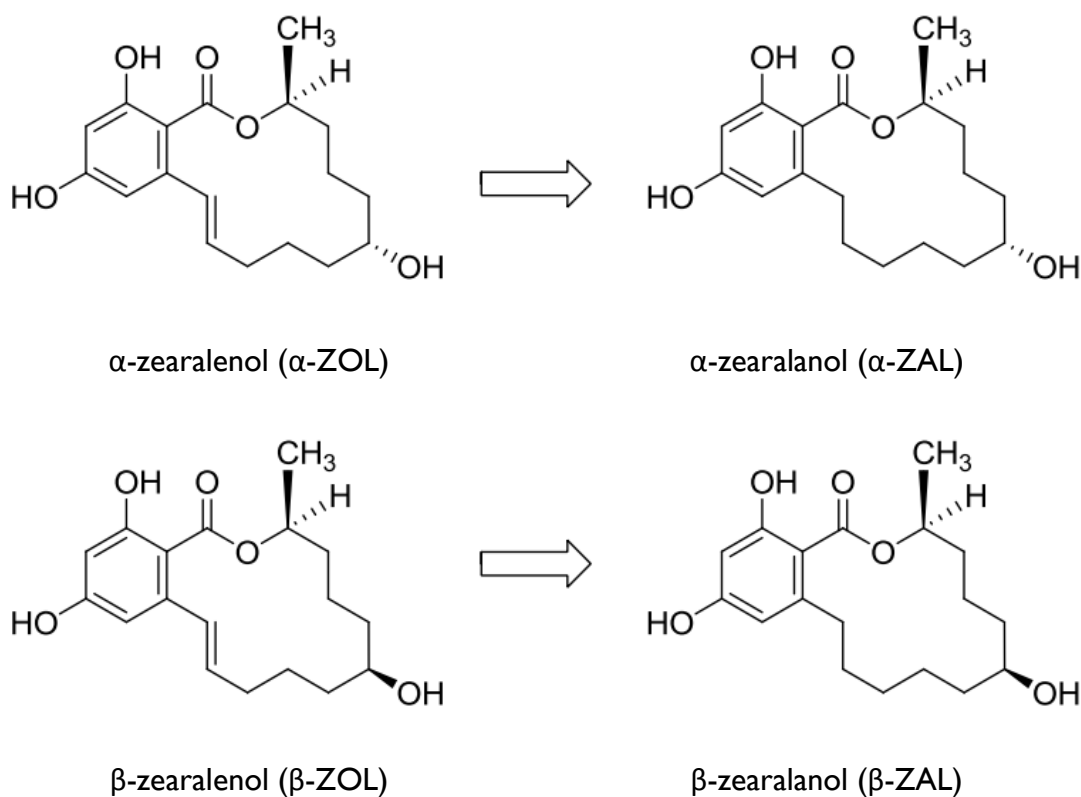
Apresenta uma fluorescência azul-esverdeada, quando excitada com luz ultravioleta de ondas longas de 360 nm e uma fluorescência verde mais intensa quando é excitada com luz ultravioleta de ondas curtas de 254 nm (OMS, 1983).

Além da ZEA existem os seus metabolitos que apresentam conformações semelhantes, como o  $\alpha$ -zearalenol ( $\alpha$ -ZOL),  $\beta$ -zearalenol ( $\beta$ -ZOL),  $\alpha$ -zearalanol ( $\alpha$ -ZAL) e  $\beta$ -zearalanol ( $\beta$ -ZAL) (figura 2) (EFSA, 2011). Estes metabolitos são produzidos por fungos, embora em quantidades reduzidas, o mesmo não se verificando quando estes resultam da metabolização da ZEA no organismo animal, cuja concentração é significativamente superior (Zinedine *et al.*, 2007).



À semelhança da ZEA, estes compostos pertencem ao grupo de lactonas de ácido resorcílico. O  $\alpha$ -ZOL é o que evidencia maior potencial estrogénico, três a quatro vezes superior ao da ZEA, seguindo-se a ZEA e o  $\beta$ -ZOL (Celius *et al.*, 1999; Krska e Josephs, 2001; Malekinejad, Maas-Bakker e Fink-Gremmels, 2006; Minervini *et al.*, 2001; Richardson, Hagler e Mirocha, 1985). Tratando-se de derivados hidroxilados da ZEA, são mais polares do que esta (Llorens *et al.*, 2002).

Importa ainda referir que a ZEA e os seus metabolitos foram avaliados pela IARC e foram classificados, no grupo 3, não sendo possível a sua classificação como carcinogénicos para o ser humano, baseado na informação científica disponível (IARC, 1999).



**Figura 2.** Estrutura química do  $\alpha$ -zearalenol,  $\beta$ -zearalenol,  $\alpha$ -zearalanol e  $\beta$ -zearalanol (adaptado de Mizutani, Nagatomi e Mochizuki, 2011).

## 1.2.2 Toxicocinética

### 1.2.2.1 Absorção e Distribuição

A ZEA é rapidamente absorvida após administração oral (Avantaggiato, Havenaar e Visconti, 2003; Cavret e Lecoœur, 2006). Embora o grau de absorção seja difícil de quantificar devido à

extensa excreção biliar, assume-se que é extensamente absorvida em ratos, coelhos e humanos (Kuiper-Goodman, Scott e Watanabe, 1987; Zinedine *et al.*, 2007).

Em suínos, após a administração de uma dose oral única de 10 mg/kg de peso corporal (p.c.) foi estimada uma absorção de 80-85% (Biehl *et al.*, 1993), verificando-se que após a administração, a mesma se distribui pelos órgãos reprodutores (ovário e útero), tecido adiposo, tecido intersticial e células dos testículos (Kuiper-Goodman, Scott e Watanabe, 1987; Ueno *et al.*, 1977).

Em ratos macho, o tempo estimado para a eliminação da ZEA não conjugada foi de 0,6-2,8 horas após administração intravenosa, e 16,8 horas após administração oral. Este resultado evidencia a importância da recirculação entero-hepática no metabolismo e distribuição da ZEA nesta espécie (Shin *et al.*, 2009).

A ZEA é amplamente distribuída nos tecidos e trato gastrointestinal (GI), incluindo rim, fígado, tecido adiposo, pulmão, coração, baço, músculo, cérebro e testículos (Shin *et al.*, 2009). A metabolização da ZEA inicia-se no fígado, com uma redução da molécula por ação das hidroxisteróide-desidrogenases (HSDs), de que resultam dois metabolitos, o  $\alpha$ -zearalenol e o  $\beta$ -zearalenol (figura 2), tendo o  $\alpha$ -zearalenol atividade estrogénica mais potente que a ZEA ou o  $\beta$ -zearalenol (Malekinejad, Maas-Bakker e Fink-Gremmels, 2005).

De salientar que a ZEA é distribuída para os tecidos alvo de estrogénio, tais como o útero, as células intersticiais dos testículos e os folículos do ovário, podendo mesmo ficar retida em tecidos adiposos (Kuiper-Goodman, Scott e Watanabe, 1987).

A ZEA e os respetivos metabolitos foram identificados no plasma de suíno, sendo que a sua eliminação está intimamente relacionada com a formação de glucuronido, o metabolito reduzido,  $\alpha$ -ZOL, e o seu glucuronido conjugado (Biehl *et al.*, 1993). O tempo de concentração do  $\alpha$ -ZOL e da ZEA no plasma é diferente, sendo as suas semi-vidas de 2,94 e 2,63 horas, respetivamente (Dänicke *et al.*, 2005).

Foi também demonstrada a transferência placentária de ZEA e  $\alpha$ -ZOL em ratos fêmea, após administração intravenosa. Os níveis de ZEA e  $\alpha$ -ZOL encontrados no feto foram de 5 a 38% e 2 a 6%, respetivamente. Os níveis hepáticos maternos e os níveis na placenta duplicaram face aos encontrados no feto (Bernhoft *et al.*, 2010).

A literatura disponível relativa ao estudo das propriedades biológicas da ZEA para espécies aquáticas é limitada. Woźny *et al.* (2012) investigaram trutas arco-íris juvenis, e após 24, 72 e 168 horas de exposição intraperitoneal a uma dose de 10 mg/kg p.c. constataram que a

referida exposição não causou quaisquer diferenças significativas nas aminotransferases, aminotransferase (AspAT) e alanina aminotransferase (AlaAT), nos níveis de atividade, ou de glicose no plasma dos peixes entre quaisquer grupos experimentais ou tempo avaliados (0, 24, 72, 168 h). A exposição durante as 168 h foi demasiado baixa para provocar alguma lesão hepática na truta arco-íris, embora tenha interferido nos processos de coagulação do sangue e armazenamento do ferro (Woźny *et al.*, 2012).

Recentemente, a ZEA foi detetada no fígado e intestinos e, com maior evidência, nos ovários de trutas arco-íris, como evidencia a tabela 3 (Woźny *et al.*, 2013).

**Tabela 3** - Concentração de ZEA em órgãos de truta arco-íris (adaptado de Woźny *et al.*, 2013).

Amostra	Concentração de ZEA [ $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ]		
	Truta I	Truta II	Truta III
<b>Intestino</b>	n.d.	<2,0	<2,0
<b>Fígado</b>	n.d.	<2,0	n.d.
<b>Ovário</b>	<2,0	7,1 $\pm$ 3,2	<2,0
<b>Músculo</b>	n.d.	n.d.	n.d.

n.d. – não detetado.

#### 1.2.2.2 Metabolismos e Excreção

As diferentes espécies animais reagem de forma diferente quando expostas à ZEA, facto que pode estar correlacionado com a biotransformação hepática desta micotoxina (Malekinejad, Maas-Bakker e Fink-Gremmels, 2006).

A EFSA (2011) explana três vias importantes na biotransformação da ZEA em animais e humanos (figura 3):

1. Redução enzimática da ZEA, catalisada pela  $3\alpha$ - e  $3\beta$ -hidroxiesteróide desidrogenases (HSDs), que produzem  $\alpha$ - e  $\beta$ -zearalenol, respetivamente, e quantidades inferiores dos correspondentes  $\alpha$ - e  $\beta$ -zearalenol.
2. A ZEA também pode ser monohidroxilada por citocromos P450 (CYPs) recombinantes humanos (Bravin *et al.*, 2009; Pfeiffer *et al.*, 2009) e nos microsomas do fígado humano *in vitro* (Bravin *et al.*, 2009).

A hidroxilação ocorre na posição 6/8 (alifática) e na posição 13/15 (aromática). Estudos com a oxidação da ZEA por isoformas de CYP recombinantes humanos sugerem que o CYP 1A2 é a principal isoforma com a menor contribuição para o CYP 3A4 (Pfeiffer et al., 2009). Os principais metabolitos oxidativos parecem surgir através da hidroxilação aromática e são catecóis.

3. Ainda é sugerida a conjugação de ZEA e dos seus metabolitos reduzidos com o ácido glucurónico e com sulfato, sendo catalisada pela uridina difosfato glucuronosiltransferases (UGTs) e pelas sulfotransferases (SULTs), respetivamente.

Com base nos estudos *in vitro*, a ZEA, o  $\alpha$ - e  $\beta$ -ZOL e os metabolitos mais reduzidos ( $\alpha$ - e  $\beta$ -ZAL) são glucoronizados tanto no fígado e no intestino, como em outros órgãos extra-hepáticos, quer nos seres humanos quer em outras espécies animais (Pfeiffer et al., 2010).

Com base nos resultados *in vitro*, utilizando UGTs das microssomas hepáticas humanas, foi identificado como maior glucuronido formado *in vivo* o 14-O-glucuronido (Pfeiffer et al., 2010).

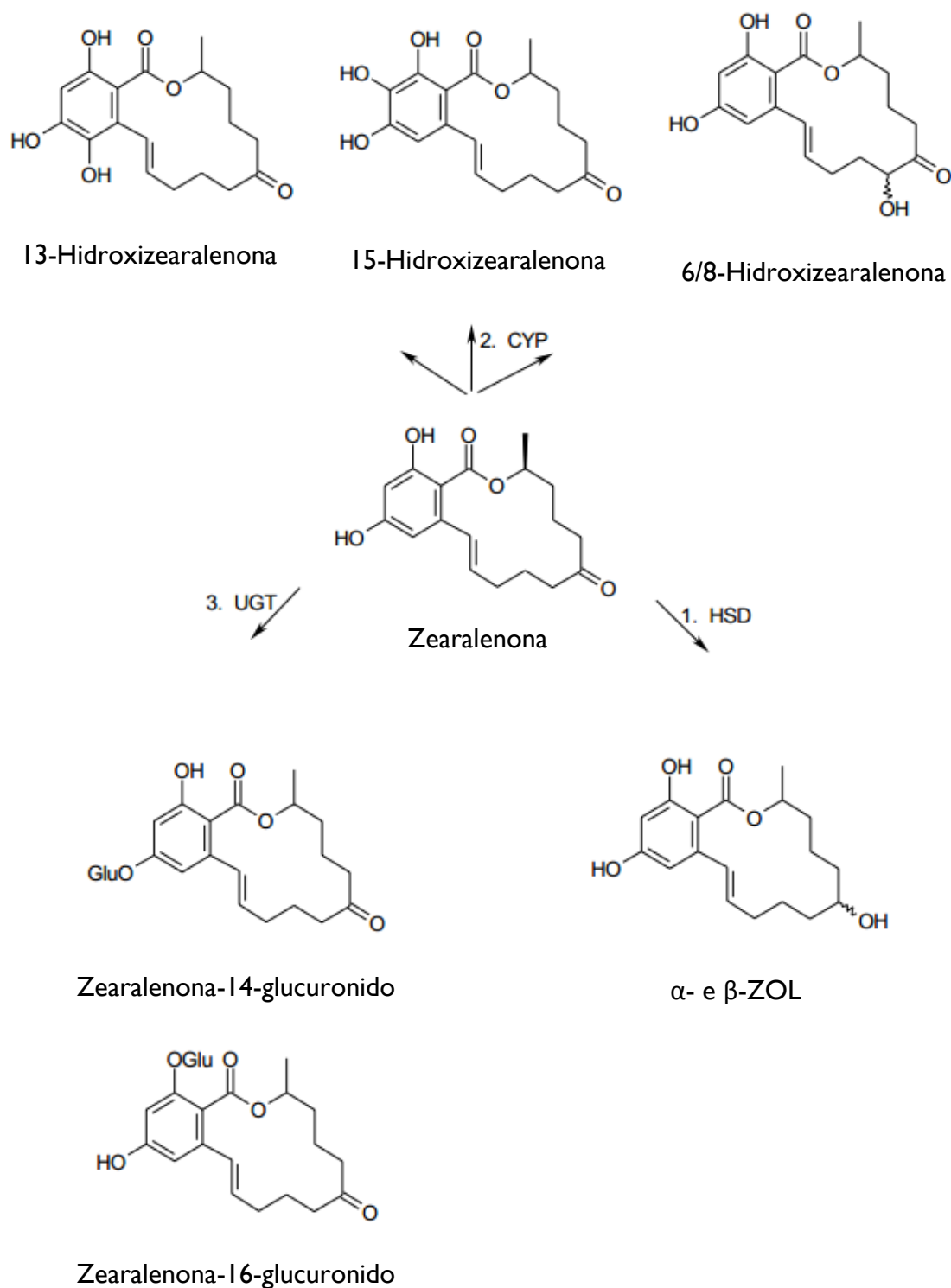
Em humanos estas enzimas atuam na presença da nicotinamida adenina dinucleotido reduzido (NADH) exercendo a sua função na regulação das hormonas esteróides ao nível de recetores. Caso esta exposição seja prolongada, a ZEA compete com as hormonas esteróides (Thomas et al., 2004).

A hidroxilação da ZEA a  $\alpha$ -ZOL é um processo de ativação, enquanto a  $\beta$ -ZOL é um processo de desativação (Fink-Gremmels e Malekinejad, 2007).

Ou seja, estas vias sintetizam a redução do grupo cetona da ZEA para zearalenol (ZOL) e a conjugação com ácido glucurónico para formar glucuronido (Bories et al., 1991; Fitzpatrick, Arbuckle e Hassen, 1988; Migdalof et al., 1983).

Relativamente ao modo de excreção, este varia entre espécies. Os metabolitos podem ser excretados como compostos livres ou conjugados com o ácido glucurónico. Depois da conjugação estes serão eliminados via biliar, urinária e fecal.

Nos suínos, cerca de 45% dos metabolitos são eliminados pela bÍlis, com a circulação entero-hepática, e apenas 7% através das fezes. Esta baixa concentração mostra que existe um processo de reabsorção dos metabolitos excretados pela bÍlis (Biehl et al., 1993). A porção eliminada pela bÍlis é reabsorvida, metabolizada pelas células da mucosa intestinal, entra no fígado e na circulação sistémica via veia porta (Hagler et al., 2001).



**Figura 3.** Metabolismo da ZEA - principais metabolitos e enzimas envolvidas na biotransformação da micotoxina (EFSA, 2011).

Nos seres humanos verifica-se a ausência de dados farmacocinéticos sobre a ZEA, pelo que o metabolismo *in vivo* se baseia numa única experiência. A ZEA, o  $\alpha$ -ZOL e o  $\beta$ -ZOL foram encontrados na urina de um voluntário do sexo masculino 6, 12 e 24 h, após a ingestão de uma dose oral única de 100 mg de ZEA. Os teores encontrados foram de 3,7 e 3  $\mu\text{g/mL}$ , não

sendo detetado  $\beta$ -ZOL, após 6 h; 6,9, 6 e 2,7  $\mu\text{g/mL}$  após 12 h; e 2,7, 4 e 2  $\mu\text{g/mL}$  após 24 h, respetivamente (Mirocha, Pathre e Robison, 1981). Pelo que foi estimado que cerca de 10-20% da dose ingerida de ZEA foi recuperada na urina, após 24h (Metzler, Pfeiffer e Hildebrand, 2010). Em outro estudo que incidiu sobre 163 amostras de urina, obtidas de raparigas residentes nos USA, foi possível detetar predominantemente ZEA e  $\alpha$ -ZOL. No entanto, apenas os metabolitos livres foram quantificados, não tendo sido realizada nenhuma hidrólise enzimática (Bandera *et al.*, 2011).

Considera-se que, para a grande maioria das espécies, a maior parte da ZEA administrada é excretada num período de 72 horas (Kuiper-Goodman, Scott e Watanabe, 1987).

Efetivamente as espécies animais apresentam diferentes suscetibilidades à ZEA, de acordo com as diferenças no seu metabolismo hepático e extra-hepático (Malekinejad, Maas-Bakker e Fink-Gremmels, 2005).

### 1.2.3 Atividade estrogénica da ZEA vs estrogénios naturais

A atividade estrogénica da ZEA é comparável com a dos estrogénios naturais (Le Guevel e Pakdel, 2001).

A afinidade da ligação da ZEA e dos seus metabolitos para os recetores de estrogénio  $\text{ER}\alpha$  (estrogénio recetor alfa) e  $\text{ER}\beta$  (estrogénio recetor beta) tem sido demonstrada em estudos *in vitro*. O padrão de expressão de  $\text{ER}\alpha$  e  $\text{ER}\beta$  difere entre os tecidos, grupos etários, espécies animais e raças. Daí a extrapolação dos resultados obtidos de umas espécies em relação a outras ser apenas qualitativa.

Existe a evidência crescente de que a ZEA fomenta a ligação dos recetores de estrogénio, mas também de que é um substrato para várias enzimas envolvidas na síntese de hormonas esteróides. Como mencionado anteriormente, a biotransformação de ZEA é catalisada pelas hidroxisteróide-desidrogenases (HSDs), que desempenha um papel importante na regulação da homeostase hormonal, no nível pré-recetor. Como a ZEA compete com os substratos fisiológicos, irá afetar os níveis de hormonas no seu destino. (Fink-Gremmels e Malekinejad, 2007).

Devido a este potencial estrogénico, a ZEA pertence a um grupo de substâncias químicas classificadas como compostos desreguladores endócrinos (EDC). De acordo com as definições atuais, um desregulador endócrino é uma substância química natural ou sintética que exerce a atividade endócrina e para a qual tenha sido demonstrada uma ligação plausível

entre a atividade endócrina e efeitos adversos em animais e/ou humanos. Em contraste, as substâncias ativas endócrinas são substâncias que podem interagir com qualquer componente do sistema endócrino, como demonstrado em células que são capazes de sintetizar hormonas esteróides nas condições de cultura. No entanto, tais mudanças (temporárias) não indicam necessariamente um efeito adverso em condições *in vivo*, onde os mecanismos de regulação e *feed-back* compensatórios controlam a homeostase hormonal (EFSA, 2013).

A característica fulcral da estrutura química de ZEA é a sua capacidade para se ligar ao recetor de estrogénio (ER) e induzir a expressão de genes sensíveis ao estrogénio (Woźny *et al.*, 2012). Esta micotoxina está identificada como um desregulador endócrino pois não só se liga a ambas as classes de recetores de estrogénio, mas também interage com as hidroxisteróides desidrogenases (HSDs) envolvidas na síntese de hormonas endógenas (Fink-Gremmels e Malekinejad, 2007; Frizzell *et al.*, 2011).

Em comparação com muitos desreguladores endócrinos sintéticos, o seu recetor de estrogénio (ER) revela afinidades na ligação estabelecida, sendo a sua potência estrogénica várias vezes identificada como sendo superior face a outros estrogénios ambientais, pelos vários ensaios de teste *in vitro* ou em sistemas *in vivo* (tabela 4) (Coldham *et al.*, 1997; Eriksen *et al.*, 2000; Kuiper *et al.*, 1998; Le Guevel e Pakdel, 2001; Leffers *et al.*, 2001; Matthews *et al.*, 2000; Shier *et al.*, 2001; Stahl *et al.*, 1998).

**Tabela 4** - Afinidades e potências estrogénicas em hormonas naturais (Coldham *et al.*, 1997; Matthews *et al.*, 2000).

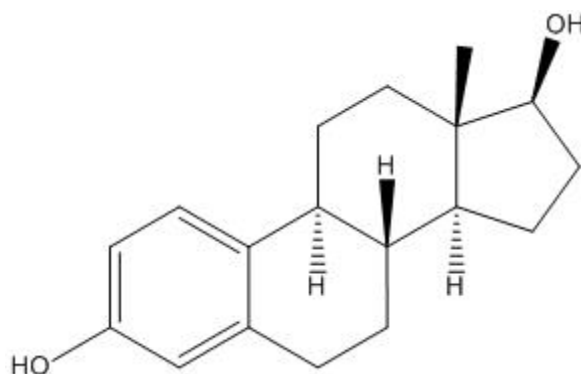
<b>Hormonas naturais</b>	<b>RBA</b> s	<b>RP</b>	<b>Truta</b>	<b>Humanos</b>
	<b>Humanos</b>	<b>Ratos</b>		
<b>17β-estradiol (E2)</b>	100	100	100	100
<b>Estrona (E1)</b>	45	28	14	9,6
<b>Estriol (E3)</b>	28	13	3,7	0,63
<b>ZEA</b>	9,3	12	82	0,26
<b>α-ZOL</b>	48	53	267	8,7
<b>β-ZOL</b>	13	11	91	0,066

RBA-s-afinidades de ligação relativa ao ER; RP-potências estrogénicas relativas.

Portanto, a ZEA e os seus metabolitos têm efeitos estrogénicos, devido à semelhança estrutural com o 17β-estradiol (E2). São capazes de adotar a conformação molecular, que se

assemelha não só ao 17 $\beta$ -estradiol endógeno (figura 4), mas também à estrona e estriol (Gromadzka *et al.*, 2009). Manifestam a sua atividade fisiológica ao ligar-se ao recetor citosólico proteico, sendo deslocado do complexo recetor de estrogénios para o núcleo, de forma análoga às hormonas esteróides (Krogh, 1987), e assim perpetuam a ligação aos recetores de estrogénio (ERs) em células alvo, exercendo ações estrogénicas (agonistas) (Massart e Sagges, 2010).

A interação destes compostos com os recetores de estrogénio humano em competição com o 17 $\beta$ -estradiol foi também relatada (Miksicek, 1994; Kuiper *et al.*, 1998).



**Figura 4.** Estrutura química da molécula de 17 $\beta$ -estradiol (Nature Chemical Biology, 2015).

A competição da ZEA e dos seus metabolitos com o 17 $\beta$ -estradiol, pelos recetores estrogénicos celulares, explica os efeitos anabólicos e estrogénicos observados em diversas espécies (Diekman e Green, 1992).

A ZEA apresenta maior potencial estrogénico quando comparada com o 17 $\beta$ -estradiol, devido ao seu modo de ação e ao tempo de permanência no núcleo das células (Gaumy *et al.*, 2001).

Embora a maioria das propriedades biológicas de ZEA seja atribuída ao efeito agonista no ER, o composto foi encontrado a produzir certas respostas biológicas que não parecem simplesmente ser devidas à sua atividade estrogénica. Até porque a ZEA foi recentemente classificada como uma micotoxina altamente oxidante (El Golli-Bennour e Bacha, 2011), sugerindo que o dano oxidativo pode ser o efeito tóxico predominante da ZEA (Woźny *et al.*, 2012).



## 1.2.4 Efeitos fisiológicos e toxicidade

Apesar dos avanços na compreensão dos mecanismos de toxicidade das micotoxinas, pouco se sabe sobre os efeitos tóxicos da exposição à ZEA em vertebrados aquáticos, peixes em particular (Woźny *et al.*, 2012).

Os efeitos fisiológicos mais relevantes que podem ser atribuídos à ZEA devem-se à sua forte capacidade de interferência nos processos anabólicos em animais e espécies aquáticas, bem como no Homem, devido à sua atividade estrogénica (Marques, 2007), pelo que a toxicidade da ZEA e dos seus metabolitos está relacionada com a sua estrutura química, semelhante à dos estrogénios de ocorrência natural, isto é, do estradiol, estrona e estriol (Gromadzka *et al.*, 2009).

### 1.2.4.1 Aguda

Reconhece-se que a ZEA apresenta baixa toxicidade aguda por via oral, após estudos realizados em murganhos, ratos e porcos (DL50 por via oral superior a 2000 mg/kg p.c.) pela União Europeia e pela Organização Mundial de Saúde (OMS) (Alldrick, 2000; EFSA, 2011).

Em peixes, embora sejam limitados os estudos, os ensaios de toxicidade de curto prazo revelam alguns efeitos da exposição à ZEA. Em 1987, constatou-se que exposição de peixes-zebra (*Danio rerio*) a concentrações até 3200 ng/L não induzia a sua mortalidade, pelo que os peixes se encontravam saudáveis, não apresentando sinais de modificação comportamental. Uma exposição de 3200 ng/L, até 21 dias, não se traduziu em efeitos tóxicos agudos graves. Este estudo está de acordo com os dados de outros estudos toxicológicos demonstrando que, além de efeitos estrogénicos, a ZEA exhibe uma baixa toxicidade aguda em muitas espécies animais (Kuiper-Goodman, Scott e Watanabe, 1987).

Foi observada indução de vitelogenina (vtg) em algumas espécies. As vitelogeninas são precursoras das proteínas, sintetizadas pelo fígado e libertadas na corrente sanguínea, dando origem às proteínas vitelínicas que são as principais reservas nutricionais para o desenvolvimento do embrião. A indução significativa de vtg verificou-se após 7 dias de exposição a uma concentração de 1 e 10 mg/kg de ZEA através de injeção intraperitoneal em salmão juvenil do Atlântico (*Salmo salar*) (Arukwe *et al.*, 1999) e no fígado de trutas arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) (Woźny *et al.* 2010).

Johns *et al.* (2011) analisou uma espécie de água doce frequentemente encontrada na América do Norte designada vairão (*Pimephales promelas*), a qual foi exposta a concentrações de ZEA de 2, 10 e 50 ng/L, por 6 dias. Todos os níveis de exposição

resultaram em aumentos relativos no tamanho do corpo. Também se verificaram anomalias, tais como edema de pericárdio e saco vitelino, quando os peixes foram sujeitos à concentração mais elevada.

Um estudo realizado em embriões do peixe-zebra (*Danio rerio*) menciona que a principal anormalidade detetada durante os ensaios de toxicidade (5 dias) foi a alteração da curvatura para cima do eixo do corpo, observada a partir de 250 µg/L de ZEA (Bakos *et al.*, 2013).

Em 2012, Woźny *et al.* ao avaliarem os parâmetros bioquímicos selecionados em trutas arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*), expostas a uma dose de 10 mg/kg de ZEA durante 168 h, não encontraram quaisquer diferenças significativas na atividade da AlaAT, AspAT ou nos níveis de glicose no plasma do peixe. A dose aplicada foi considerada demasiado baixa para fomentar lesões hepáticas e influenciar os marcadores hepáticos. Verificaram ainda uma ligeira tendência de aumento do tempo de coagulação do sangue, especulando que a micotoxina pode afetar o processo de coagulação do sangue deste peixe. Também observaram uma diminuição significativa de ferro no fígado e nos ovários dos peixes expostos, evidenciando que a ZEA interfere na coagulação do sangue e nos processos de armazenamento do ferro.

Os autores anteriormente referidos (Woźny *et al.*, 2012) consideram que o efeito tóxico da ZEA depende da dose, do tempo de exposição, da espécie animal e do género. Em outras espécies animais, como coelhos fêmea, após 14 dias de exposição oral a uma dose de 100 µg/kg p.c. resultou num aumento significativo da atividade AlaAT e AspAT (Čonková *et al.*, 2001), não tendo sucedido o mesmo em ratos macho (Stadnik e Borzęcki, 2009).

#### 1.2.4.2 Subaguda e subcrónica

Em relação à toxicidade subaguda e subcrónica, os efeitos da micotoxina relacionam-se com a sua capacidade para se ligar aos recetores estrogénicos, o que leva a alterações no trato reprodutivo. Os principais sintomas detetados em animais de experimentação incluem diminuição da fertilidade, aumento da reabsorção do embrião e diminuição do tamanho das ninhadas (Alldrick, 2000; EFSA, 2011; SCF, 2000; Zinedine e Soriano, 2007).

Em animais ovíparos, incluindo peixes, a ZEA imita a ação do estrogénio natural, 17β-estradiol, ligando-se a recetores de estrogénio das células (ERs), ativando os genes que codificam a vitelogenina, podendo afetar a reprodução dos peixes (Arukwe *et al.*, 1999; Chen *et al.*, 2010; Woźny *et al.*, 2008).

Um dos primeiros estudos em espécies aquáticas realizou-se em carpa (*Cyprinus carpio*), na qual foi observada uma redução no número e qualidade dos espermatozóides desta espécie, após exposição à ZEA (Sándor e Ványi, 1990).

Schwartz *et al.* (2010) demonstraram que a exposição do peixe-zebra (*Danio rerio*) à ZEA reduzia significativamente a frequência de desova, entre 1000 e 3200 ng/L, e o tamanho da ninhada. Posteriormente consideraram que esta micotoxina também podia alterar a fecundidade relativa de uma geração para a outra (Schwartz *et al.*, 2011).

Outro estudo em que foi confirmado o potencial estrogénico da ZEA em peixe-zebra (*Danio rerio*) reporta que esta micotoxina influencia a diferenciação sexual e a reprodução registando-se redução da fecundidade, a 100 ng/L (Schwartz *et al.*, 2011). Além disso, os efeitos sobre o desenvolvimento do peixe-zebra (*Danio rerio*) sugerem que a ZEA pode interagir com outras vias ontogénicas (Bakos *et al.*, 2013).

Como mencionado anteriormente, também outros investigadores enunciaram anteriormente efeitos da ZEA e dos seus metabolitos, no gene de indução dependente da expressão do ER, no sistema imunológico, no crescimento e na reprodução (Arukwe *et al.*, 1999, Keles *et al.*, 2002, Woźny *et al.*, 2008, 2010).

#### 1.2.4.3 Crónica e carcinogénese

Embora os dados experimentais relativos aos aspetos toxicológicos da ação da ZEA em diferentes espécies de peixes estejam a aumentar (Arukwe *et al.*, 1999; Schwartz *et al.*, 2010, 2013; Woźny *et al.*, 2012), os estudos relativos à exposição a longo prazo são escassos. Para avaliar a ameaça real representada pela ZEA, em peixes, são necessários mais estudos de longo prazo, para assim compreender quais os efeitos deletérios nestes organismos e por consequência nos seres humanos, pois a exposição a longo prazo pode permitir a deteção de níveis de contaminação ambientalmente relevantes, permitindo avaliar a real ameaça desta micotoxina (Bakos *et al.*, 2013).

Nos ensaios de toxicidade a longo prazo, Schwartz *et al.* (2010, 2011) incluíram um período de depuração posterior a uma exposição de curto prazo, observando os efeitos transgeracionais da exposição a curto prazo à micotoxina, na primeira geração de peixe-zebra (*Danio rerio*). Foi observado um aumento do peso, do comprimento do corpo, e do fator de condição ( $\text{peso} \times 100/\text{cm}^3$ ) dos peixes fêmea, o que também afetou o crescimento e o desempenho reprodutivo da primeira geração, fomentando o desenvolvimento do género feminino nos peixes que sucediam a esta geração. À semelhança dos ensaios de toxicidade a

curto prazo, também nos de longo prazo se verificou um aumento da vtg mas, neste caso, não afetou a fertilidade, a eclosão, a sobrevivência embrionária e a morfologia das gónadas.

Dependendo da gravidade da intoxicação, os animais do meio aquático revelam natação prejudicada, anemia, lesões no fígado, tumores e alterações da coagulação do sangue (Anh Tuan *et al.*, 2002; Poston, Coffin e Combs, 1982; Santacroce *et al.*, 2008).

Como mencionado, são poucos os estudos de toxicidade de longo prazo em espécies aquáticas, pelo que se faz uma breve alusão aos principais efeitos em outras espécies animais expostas à ZEA, embora as diferentes espécies apresentem metabolismos e diferentes capacidades de resposta face à exposição, visto que em ensaios de longa duração, o efeito que a ZEA exerce sobre as espécies, parece depender da interação entre a ZEA e o recetor de estrogénio (ER) (Pallaroni, 2004).

Num estudo do programa nacional de toxicologia encontraram-se evidências de carcinogenicidade em murganhos mas não em ratos (NTP, 2002). Os primeiros dados relativos à capacidade toxicológica da ZEA indicaram que esta tem capacidade para induzir lesões hepáticas adversas com posterior desenvolvimento de hepatocarcinoma (Coe *et al.*, 1992; NTP, 2002). Estudos realizados em murganhos durante cerca de 2 anos, com a administração da micotoxina, demonstraram a formação de adenocarcinomas no fígado e na glândula pituitária (hipófise) (Alldrick, 2000; EFSA, 2011; SCF, 2000; Zinedine *et al.*, 2007; Zinedine e Soriano, 2007).

É um facto que doses de ZEA que são relativamente superiores às concentrações que têm efeito hormonal podem ter efeitos genotóxicos e carcinogénicos (Mitterbauer *et al.*, 2003).

Deve-se ainda tomar em consideração os efeitos da ZEA na maturação do oócito no género feminino. Nos ovários de várias espécies animais, incluindo dos seres humanos, a expressão de ER $\alpha$  foi detetada no epitélio germinal e nas células intersticiais (Beker-Van Woudenberg *et al.*, 2004; Cardenas *et al.*, 2001; Lavoie *et al.*, 2002).

Estudos realizados em ratos mostraram que uma baixa concentração de ZEA é capaz de influenciar negativamente a expressão do gene testicular do esperma dos mesmos, *in vivo*. Detetou-se a diminuição da concentração de espermatozóides em cerca de 40% no grupo dos animais expostos a baixa concentração de ZEA, e ainda a perda da qualidade do esperma, como o aumento de espermatozóides morfologicamente anormais, tendo sido demonstrando que quanto mais baixa a dose de ZEA, maior o efeito sobre a qualidade do esperma e a expressão testicular dos genes, talvez porque uma baixa concentração de uma

hormona possa atuar como estimulante, enquanto uma alta concentração pode ter um efeito oposto ou não (Yang *et al.*, 2007; Zatecka *et al.*, 2014).

Também em estudos realizados em ratos, a ZEA revelou ter propriedades hematotóxicas, na medida em que provocou alterações na coagulação do sangue e em parâmetros sanguíneos, tais como hematócrito, volume globular médio e número de plaquetas (Maaroufi *et al.*, 1996).

Ao nível do sistema endócrino, a ZEA e os seus metabolitos mostraram ser capazes de se ligar competitivamente aos recetores estrogénicos ( $\alpha$  e  $\beta$ ), em sistemas *in vivo* e *in vitro*, sendo responsáveis pela indução da excreção de prolactina (EFSA 2011; SCF, 2000; Zinedine *et al.*, 2007).

Efetivamente, os efeitos adversos produzidos pela ZEA são consequência das perturbações do sistema endócrino, incluindo a indução da proliferação de células e tecidos sensíveis ao estrogénio, feminização das gónadas masculinas ou distúrbios reprodutivos (diminuição do libido, perturbação do ciclo reprodutivo, anovulação, espermatogénese perturbada, infertilidade, lesões neoplásicas, comportamento anormal, diminuiu da fertilidade das crias), osteoporose, mielofibrose na medula óssea, adenomas e deformações ósseas (Kuiper-Goodman, Scott e Watanabe, 1987; Metzler *et al.*, 2010; Williams *et al.*, 1989).

Pelos estudos realizados demonstrou-se que esta micotoxina, além de carcinogénica, tem efeitos hepatotóxicos, hematotóxicos, imunotóxicos e genotóxicos (Zinedine *et al.*, 2007).

#### 1.2.4.4 Efeitos em humanos

Em humanos tem surgido alguma informação documentada em relação aos potenciais efeitos deletérios para a saúde, devidos à exposição à ZEA. Entre 1978 e 1981, foi relatada uma epidemia de puberdade precoce em Porto Rico, a qual se suspeitou ser devida à ZEA ou aos seus metabolitos (Sáenz de Rodriguez, 1984). Apesar destes compostos terem sido detetados no plasma sanguíneo, a *Food and Drug Administration* (FDA) falhou na sua deteção nos alimentos, para imputação da causalidade (Alldrick, 2000).

Em 2000, cientistas húngaros reportaram um aumento da incidência da telarca precoce em crianças com idades compreendidas entre os 6 meses e os 8 anos. Neste caso, a ZEA foi detetada quer no sangue quer nos alimentos ingeridos pelas crianças (SCF, 2000), pelo que a ZEA pode ser um importante agente etiológico de intoxicação em crianças ou fetos expostos a esta micotoxina, resultando em telarca precoce, pubarca, e aumento da mama (CAST, 2003b).

Estudos recentes vieram provar a atividade estrogénica da ZEA em seres humanos. Foi-lhe imputada a capacidade de estimular o crescimento de células cancerígenas mamárias, em tumores estrogénio-dependentes, chegando-se mesmo a concluir que a exposição à micotoxina pode levar a um aumento da ocorrência de cancro da mama (EFSA, 2011; SCF, 2000; Zinedine *et al.*, 2007).

#### 1.2.4.4.1 Genotoxicidade

A ZEA foi identificada como um agente genotóxico capaz de induzir a formação de aductos de ADN (complexo que se forma quando um composto químico se une a uma molécula biológica como o ADN) (Lioi *et al.*, 2004). Além disso, a ZEA também mostrou ser hepatotóxica (Čonková *et al.* 2001), pelo que pode contribuir para o aumento da ocorrência do cancro (Yu *et al.*, 2005).

Considerando a sua capacidade estrogénica, esta micotoxina foi identificada como indutora de hiperestrogenismo, nomeadamente em mulheres, visto serem mais vulneráveis à ação estrogénica da ZEA (Vidal *et al.*, 2013). Pode atuar de modo semelhante a um análogo do estrogénio nos seres humanos, podendo desregular o eixo hipotalâmico-hipofisário gonadal (HPG), razão pela qual tem sido recentemente considerada como um fator desencadeante para a puberdade precoce, pelo menos, em meninas pré-púberes (<8 anos de idade), e para o desenvolvimento de efeitos anabólicos de crescimento em raparigas expostas à ZEA (Deng *et al.*, 2012; Massart e Saggese, 2010; Massart *et al.*, 2008; Vidal *et al.*, 2013), correlacionando-se com altos níveis de estrógeno incomuns. Por exemplo, Massart *et al.* (2008) demonstraram que as meninas pré-púberes expostas a ZEA apresentavam níveis de estradiol (E2) de 25 pg/mL. Estudos epidemiológicos apoiam fortemente a hipótese de que o desenvolvimento da puberdade precoce em humanos pode ser induzido por exposição fetal ou na pré-puberdade a compostos estrogénicos (Massart e Saggese, 2010).

#### 1.2.4.4.2 Toxicidade reprodutiva e de desenvolvimento

A ZEA pode induzir problemas ao nível do sistema reprodutivo como, menor fertilidade, perda fetal, e níveis hormonais mais baixos (Sirof, Fremy e Leblanc, 2013). Em caso de exposição a níveis consideravelmente excessivos podem surgir numerosos distúrbios, que se manifestam, por exemplo, na diminuição da libido, disfunção do ovário e útero, anovulação, infertilidade e lesões neoplásicas em todo o sistema reprodutor (Shier *et al.*, 2001; Tiemann *et al.*, 2003).

Durante a gravidez, a exposição à ZEA reduz a sobrevivência embrionária e por vezes, diminui o peso fetal (D'Mello, Placinta e Macdonald, 1999). Pode afetar o útero, diminuindo a secreção de hormona luteinizante (LH) e progesterona (produzida pelo corpo lúteo ou amarelo), e alterar a morfologia dos tecidos uterinos (Etienne e Dourmad, 1994).

A ZEA e  $\alpha$ -ZOL foram detetados no soro de pacientes com cancro do endométrio (Gajecki *et al.*, 2004). Num estudo prévio realizado em 49 mulheres, na Polónia, foi estabelecida uma forte correlação entre o teor de ZEA no sangue e a presença de patologias uterinas (adenocarcinoma e hiperplasia do endométrio) (Tomaszewski *et al.*, 1998).

De salientar que, nos casos em que a população masculina revela baixa qualidade do esperma, poderá ser atribuído à ZEA um efeito significativo na fertilidade humana (Zatecka *et al.*, 2014).

#### 1.2.4.4.3 Efeitos imunológicos

Os resultados dos estudos *in vitro* evidenciam as várias alterações nos parâmetros imunológicos, relacionadas com as concentrações de ZEA em seres humanos (Berek *et al.*, 2001). Eriksen e Alexander (1998) referem alterações dos parâmetros imunológicos, como a inibição da proliferação de linfócitos ativados por mitógeno, para altas concentrações de ZEA, *in vitro*.

A forte atividade estrogénica da ZEA,  $\alpha$ -ZOL e  $\beta$ -ZOL foi demonstrada em linhas de células de adenocarcinoma da mama e em linhas celulares do cancro da mama (Malekinejad, Maasbakker e Fink-Gremmels, 2005; Minervini *et al.*, 2005).

Em investigações mais recentes, foi ainda demonstrado que além da forte atividade estrogénica, existe a ativação do ER $\alpha$  em células epiteliais de cancro do colo do útero humano e do cancro hepatocelular humano. O mesmo efeito foi demonstrado em linhas celulares de adenocarcinoma do endométrio humano de Ishikawa (Li *et al.*, 2012).

#### 1.2.5 Incidência

Stob *et al.* (1962) isolaram uma substância ativa das culturas de *Gibberella zeae*, que se sabia provocar uma síndrome estrogénica, quando administrada a ratos. Em 1966, Urry *et al.* isolaram a mesma substância de milho contaminado e chamaram-lhe ZEA, determinando a sua estrutura química. Esta micotoxina predomina em culturas de cereais como grãos de milho, aveia, cevada, centeio, trigo e arroz, após exposição prolongada das culturas num

ambiente húmido e aeróbio, em particular nas regiões temperadas e quentes do nosso planeta, quer no campo quer durante o armazenamento (Alldrick, 2000; Bennett e Klich, 2003; Bucheli *et al.*, 2008; Williams *et al.*, 1989; Zinedine *et al.*, 2007).

As enzimas responsáveis pela biossíntese de ZEA são ativadas por baixas temperaturas, entre os 12 e os 14 °C, seguindo-se de uma produção ótima a temperaturas mais altas, de 27 °C, e 16% de humidade (Mirocha, Christensen e Nelson, 1971; Zwierzchowski *et al.*, 2005).

Embora a sua presença predomine nas culturas, também já foi detetada em outras matrizes, nomeadamente, águas superficiais, subterrâneas e afluentes e efluentes de estações de tratamento de águas residuais (ETARs) (Dudziak, 2011; Gajęcka *et al.*, 2011; Gromadzka *et al.*, 2009; Hartmann *et al.*, 2007; Kolpin *et al.*, 2014; Laganà *et al.*, 2001, 2004; Lundgren e Novak, 2009; Maragos, 2012; Spengler, 2001; Ternes, Eggert e Meisenheimer, 2001). Tal facto deve-se à sua emissão para o ambiente aquático, através da drenagem e escoamento dos campos agrícolas infetados (Hartmann *et al.*, 2008a; Bucheli *et al.*, 2008) e à excreção humana emitida via saneamento básico, a qual é encaminhada para as ETARs (Nganje *et al.*, 2004).

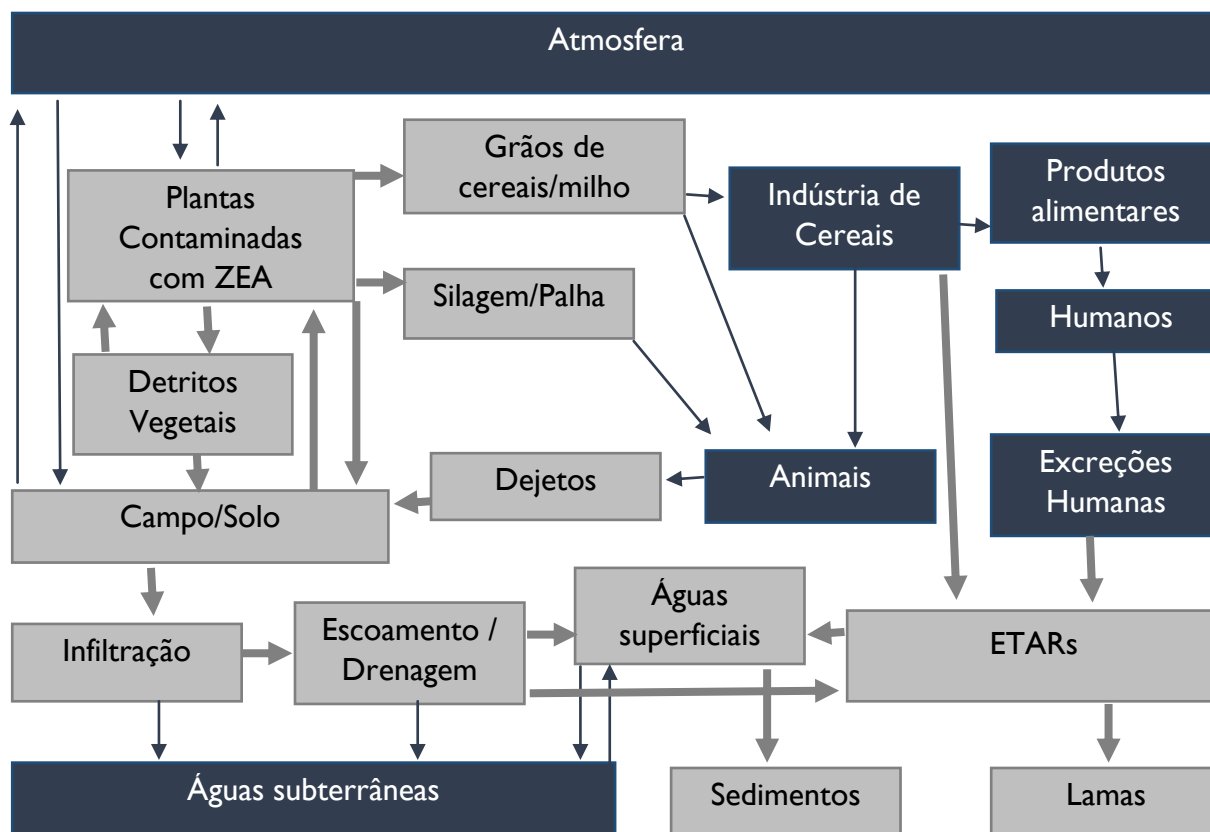
Bucheli *et al.* (2005) também discriminaram, com maior detalhe, algumas das possíveis fontes emissoras de ZEA no meio ambiente. Vários caminhos parecem plausíveis, desde a libertação de micotoxinas a partir de plantas infestadas por *Fusarium*, que podem contaminar e penetrar no solo infiltrando-se posteriormente nas águas subterrâneas. A eluição por escoamento superficial ou drenagem subterrânea para as águas superficiais ou para as ETARs, a evaporação ou disseminação dos esporos dos fungos transportados pelo ar ou partículas do solo; a presença em dejetos animais expostos ao ar livre, que podem ser colocados nos solos agrícolas e conseqüentemente nas águas circundantes constituirão fontes significativas de ZEA. A sua proveniência de águas residuais da indústria de alimentos e/ou de excreções humanas, pode também introduzir micotoxinas via efluente das ETARs para as águas de superfície, como ilustrado na figura 5.

Embora seja extensa a pesquisa de micotoxinas, nomeadamente de ZEA em alimentos e produtos agrícolas (Pittet, 1998; Streit *et al.*, 2013), como referido anteriormente, pouco tem sido feito para determinar o seu destino e distribuição ambiental (Bucheli *et al.*, 2008; Hartmann *et al.*, 2008b; Kolpin *et al.*, 2010; Qu, Kolodziej e Cwiertny, 2012; Schenzel *et al.*, 2012a).

No entanto, têm surgido algumas publicações que mencionam a sua presença em amostras de diferentes tipos de águas, em várias regiões do mundo, incluindo Itália (Laganà *et al.*, 2001,



2004), Alemanha (Pawłowski *et al.*, 2003), Suíça (Bucheli *et al.*, 2008; Hartmann *et al.*, 2007; Hartmann *et al.*, 2008a; Schenzel *et al.*, 2010), Polónia (Gromadzka *et al.*, 2009, Waśkiewicz *et al.*, 2012) e Estados Unidos (Kolpin *et al.*, 2010; Lundgren e Novak, 2009; Maragos, 2012) (tabela 5).



**Figura 5.** Possível distribuição ambiental da ZEA (caixa cinza e setas espessas indicam possíveis fontes emissoras, sujeitas a investigação preliminar) (adaptado Bucheli *et al.*, 2005).

### 1.2.5.1 Águas residuais

As águas residuais compreendem as águas residuais domésticas ou a mistura destas com águas residuais industriais e pluviais recolhidas para a rede de drenagem pública. Estas águas podem conter substâncias orgânicas e inorgânicas dissolvidas e em suspensão na água (Monte e Albuquerque, 2010).

A ocorrência de ZEA em águas residuais tem sido verificada na entrada e na saída das ETARs por alguns investigadores (Gromadzka *et al.*, 2009; Hartmann *et al.*, 2007; Ikonou *et al.*, 2008; Laganà *et al.*, 2001; Laganà *et al.*, 2004; Lundgren e Novak, 2009; Pawłowski *et al.*, 2003; Schenzel *et al.*, 2010) (tabela 5).

Assim, Laganà *et al.* (2001), em 10 amostras de uma ETAR em Itália, detetaram ZEA em quatro amostras com uma concentração (conc.) média de 4 ng/L (entre 1-7 ng/L),  $\alpha$ -ZOL em 5 amostras (conc. média = 7 ng/L). Posteriormente, foi efetuada a pesquisa de ZEA em sete amostras do afluente de uma ETAR, variando a concentração entre 3-18 ng/L (conc. média = 15ng/L). Relativamente às sete amostras de efluente, os níveis variaram entre 3 a 10 ng/L (com. média = 7ng/L), diminuindo a concentração de ZEA após o tratamento (Laganà *et al.*, 2004).

Numa ETAR da Alemanha, o metabolito  $\alpha$ -ZOL foi detetado no efluente em concentrações entre 20 ng/L e 30 ng/L (Pawlowski *et al.*, 2003).

As concentrações encontradas numa ETAR norte americana revelaram que os efluentes de águas industriais continham 95,5-220 ng/L (Lundgren e Novak, 2009).

Também Hartmann *et al.* (2007) quantificou a presença de ZEA no efluente de uma ETAR suíça, detetando concentrações entre 0,8-12,4 ng/L.

Um estudo de Gromadzka *et al.* (2009), realizado na Polónia, revelou a presença da micotoxina no afluente, com uma concentração de 5,0 ng/L, enquanto no efluente o teor de ZEA não ultrapassou 2,7 ng/L. Pelos resultados obtidos, verificou que, durante o processo de tratamento, a eficiência da remoção de ZEA foi de aproximadamente 50%.

Tendo em atenção as concentrações encontradas nos afluentes e efluentes de ETARs, em vários locais diferentes, diferentes investigadores constataram que os níveis de ZEA nos efluentes tendem a ser relativamente mais baixos do que em afluentes (Gromadzka *et al.*, 2009; Laganà *et al.*, 2004; Lundgren e Novak, 2009).

Recentemente, as amostras dos efluentes de ETAR do estudo de Kolpin *et al.* (2014) juntamente com a pesquisa anteriormente realizada por Schenzel, Hungerbühler e Bucheli (2012b), identifica as ETARs como fontes de  $\alpha$ -ZOL e  $\beta$ -ZOL. Ou seja, os metabolitos mencionados não foram detetados a montante da ETAR, tendo sido detetados quer no efluente quer a jusante da mesma em 33 amostras.

#### 1.2.5.2 Águas superficiais

As águas superficiais caracterizam-se por serem águas interiores, com exceção das águas subterrâneas, águas de transição, águas costeiras, incluindo-se nesta categoria, no que se refere ao estado químico, as águas territoriais (Lei n° 58/2005).

Pouco se sabe sobre o impacto ecotoxicológico da ZEA, como um estrogênio ambiental, relativamente aos níveis encontrados nas águas de superfície e as consequências da exposição para os organismos aquáticos (Schwartz *et al.*, 2010).

No entanto surgiram alguns estudos relativos à presença de ZEA em águas superficiais, nomeadamente, rios, lagos e valas de drenagem, que quantificam a presença da referida micotoxina, fornecendo provas que quer as fontes difusas quer as pontuais emanam ZEA para o ambiente (Bucheli *et al.*, 2008; Gromadzka *et al.*, 2009; Hartmann *et al.*, 2007, 2008a; Kolpin *et al.*, 2010; Laganà *et al.*, 2004; Maragos, 2012; Schenzel, Schwarzenbach e Bucheli, 2010; Ternes, Eggert e Meisenheimer, 2001; Waśkiewicz *et al.*, 2012) (tabela 5).

Um grupo de investigadores analisou os níveis de ZEA em águas de superfície, sejam rios, riachos, lagos e valas de drenagem. No rio Bogdanka (Polónia), a maior concentração observada foi de 43,7 ng/L. Seguiram-se níveis compreendidos entre 7,6-12,3 ng/L, em amostras recolhidas em valas de drenagem localizadas nos distritos de Wielkopolska e South-Pomeranian (Gromadzka *et al.*, 2009).

Em águas superficiais na Alemanha, os níveis mais elevados atingiram 60 ng/L (Ternes, Eggert e Meisenheimer, 2001), como citado em Gromadzka *et al.* (2009).

Em 2005, na Suíça, a ZEA foi detetada em água de drenagem com concentrações entre 1 a 32 ng/L (Bucheli *et al.*, 2005). No mesmo país, através de um programa de monitorização de água de rios, a ZEA foi detetada em quatro momentos, aparentemente, em níveis abaixo do limite de quantificação (LOQ) (Bucheli *et al.*, 2008). Posteriormente foram inspeccionadas amostras de água de drenagem (n = 129) e de água de rio (n = 223) tendo sido detetada ZEA em níveis abaixo do LOQ em três das águas de drenagem e em sete das águas de rio (Schenzel, Schwarzenbach e Bucheli, 2010).

Na água do rio Tibre (Itália), a ZEA foi encontrada num teor médio de 3 ng/L (entre 2-5 ng/L) (Laganà *et al.*, 2004). Nos Estados Unidos (Iowa), Kolpin *et al.* (2010) testaram níveis de fitoestrógenos e micotoxinas, incluindo a ZEA, em 15 locais, nos quais foi efetuada a amostragem 5 vezes. A micotoxina estava contida em 13% das 75 amostras analisadas. As concentrações mais elevadas de micotoxinas ocorreram durante a primavera, sendo a concentração de ZEA de 8 ng/L.

No estudo de Maragos (2012), em termos de frequência de deteção (acima do LOD), havia semelhanças entre as águas do riacho, do rio e dos lagos com 32%, 20%, 15% e 26% no lago Money Creek, rio Mackinaw, lago Bloomington e lago Evergreen, respetivamente. A vala de drenagem (Kraft Slough) apresentou uma frequência superior face às outras matrizes: 61%.

Entre os vários locais, os teores máximos ocorreram dentro de um intervalo relativamente pequeno: 3,5 ng/L (Kraft Slough), 5,7 ng/L (lago Bloomington), 4,3 ng/L (lago Money Creek), 2,1 ng/L (lago Evergreen) e 2,3 ng/L (rio Mackinaw).

Relativamente ao estudo realizado por Waśkiewicz *et al.* (2012) todas as amostras de água analisadas, colhidas na zona de Wielkopolska (Polónia), estavam contaminadas por ZEA, nomeadamente as do rio Bogdanka, vala e poço de drenagem em Cerekwica, um curso de água e vala de drenagem em Brodnica e uma vala de drenagem e lago em Leszno. A maior concentração de ZEA foi identificada na vala de drenagem de Leszno, sendo esta de 80,6 ng/L e a mais baixa de 0,4 ng/L. Relativamente às amostras de água do rio Bogdanka, as concentrações estavam compreendidas entre 2,0 e 25,0 ng/L. Neste estudo também se verificou que as concentrações de ZEA variaram consoante a estação do ano, sendo baixos na primavera e no inverno e altos no verão e no outono, alcançando o seu pico em setembro de 2009, 25,0 ng/L.

Na Suíça foi ainda considerando o forte potencial das culturas infestadas, e consequentemente das águas de drenagem subjacentes, as quais também foram sujeitas a avaliação (Bucheli *et al.*, 2008; Hartmann *et al.*, 2007, 2008a). A concentração de ZEA variou entre 0,5 e 2,1 ng/L, na água de drenagem, 0,4 e 1,1 ng/L, na água de rio, e 0,8-12,4 ng/L, a partir da água das culturas de trigo que terão sido inoculadas com *F. graminearum* (Hartmann *et al.*, 2007).

No estudo de Hartmann *et al.* (2008a) foi feita a abordagem numa ordem cronológica, subdividida em quatro períodos de cultivo diferentes, ou seja, de 1 junho a 18 de agosto de 2005. Durante este período, as águas de drenagem continham ZEA em concentrações até 12,0 ng/L, resultado exclusivo da lavagem da água da chuva a partir de plantas de trigo contaminadas por ZEA. Seguiu-se o período de cultivo de rabanete, de 18 de agosto de 2005 a 15 de junho de 2006. Após a colheita de trigo, apenas ocorreu um episódio de descarga da água de drenagem, que resultou em concentrações mensuráveis de ZEA. Os seguintes eventos de descarga da água de drenagem durante o cultivo do nabo não revelaram qualquer emissão de ZEA, embora a 03 de novembro de 2005 tenham sido detetadas 6 g/ha no solo superficial. Os mesmos autores terão verificado, num evento ocasional, a presença de ZEA numa concentração bastante elevada, 250 ng/L, das mais altas que foram relatadas. Esta amostra foi colhida após um evento de chuva intensa, numa poça do campo em estudo, vigorosamente infetado com *F. graminearum*.

Na avaliação efetuada por Bucheli *et al.* (2008), a água de drenagem dos campos de trigo e de milho infestados apresentaram como máximo 35 ng/L. Também estes investigadores

quantificaram o conteúdo de ZEA em valas de drenagem após a inoculação com teores de *F. graminearum* nos campos.

### 1.2.5.3 Águas destinadas ao consumo humano

A água destinada ao consumo humano é toda a água no seu estado original, ou após tratamento, destinada a ser bebida, a cozinhar, à preparação de alimentos ou a outros fins domésticos, independentemente da sua origem e de ser ou não fornecida a partir de uma rede de distribuição, de camião ou navio-cisterna, em garrafas ou outros recipientes, com ou sem fins comerciais, bem como toda a água utilizada na indústria alimentar para o fabrico, transformação, conservação ou comercialização de produtos ou substâncias destinados ao consumo humano, exceto quando a utilização dessa água não afeta a salubridade do género alimentício na sua forma acabada (Lei nº 58/2005).

Existe cada vez mais consciência da importância da presença de micotoxinas em águas e consequentemente da sua presença em água potável (Hageskal *et al.*, 2007).

Os fungos em água potável estão envolvidos na produção de sabores e odores na água (Gonçalves *et al.*, 2006).

Os estudos realizados por Russell e Paterson (2007) indicam que a água deve ser considerada como uma fonte potencial de fungos e de micotoxinas.

Os fungos do género *Fusarium* e zigomicetos são problemas comuns, pelo que se reconhece que em algum momento, os mesmos podem estar presentes na água de abastecimento e, consequentemente, representam uma ameaça. O estudo sistemático dos fungos em sistemas de distribuição de água potável está a começar a aumentar, embora seja geralmente executado em resposta a um problema de contaminação isolado (Gonçalves *et al.*, 2006).

As micotoxinas são suscetíveis de ser produzidas em águas, no entanto as concentrações tenderão a ser baixas, exceto em circunstâncias particulares, como na água armazenada ou em águas estagnadas (Gonçalves *et al.*, 2006).

Embora a informação seja limitada, micotoxinas como a ZEA vêm sendo referidas em água potável (Hageskal *et al.*, 2007, Russell e Paterson, 2007) (tabela 5).

Num estudo realizado por Paterson *et al.* (1997), em colaboração com fabricantes de água engarrafada, foram detetadas aflatoxinas em amostras de água armazenada num tanque. No mesmo estudo, em água da torneira, apenas foram encontrados vestígios de aflatoxina B1, pelo que é provável que tal contaminação será mínima em água destinada ao consumo

humano. No entanto, o problema tende a aumentar se a água for armazenada (por exemplo em garrafas com água), ou se existe um procedimento, no processo produtivo de uma indústria alimentar, que exija o uso de água no estado gasoso (Gonçalves *et al.*, 2006).

É importante saber quais os níveis de micotoxinas que podem estar presentes na água, e ainda, se o crescimento de fungos pode aumentar essas concentrações (Paterson, 2006).

Kelley *et al.* (2003) realizaram um estudo com a duração de três anos, em que fornecem informações relativas à importância dos fungos nos sistemas de distribuição de água dos USA. Muitos metabolitos secundários e micotoxinas foram divulgados de forma preliminar a partir de fungos identificados durante o estudo.

Paterson (2006) demonstrou que a ZEA pode ser produzida em água por *F. graminearum*, pelo que propôs uma metodologia para determinar as concentrações deste fungo em linhas de processamento que utilizam água para a produção de alimentos e rações. Este estudo documenta a presença de micotoxinas em água potável.

Russell e Paterson (2007) isolaram uma estirpe de *F. graminearum*, do sistema de distribuição de água do Water Works Park, USA, em novembro de 1996, com base na informação preliminar de Kelley *et al.* (2003). A ZEA foi detetada numa concentração de 15,0 ng/L.

Num estudo recente, a ZEA não foi detetada nas amostras de água da torneira, pertencentes ao sistema de abastecimento que serve a população de Gliwice, na Polónia, (Dudziak, 2011).

É um facto que os serviços públicos de água parecem ter pouca experiência com estes organismos, em grande parte, porque eles não têm sido implicados diretamente na saúde ou problemas na qualidade da água, no passado. As informações sobre o tratamento, os regimes de desinfeção, o crescimento de fungos, e a capacidade para produzir metabolitos secundários, incluindo as micotoxinas, são escassos. A maioria dos trabalhos sobre a produção de micotoxinas em sistemas diluídos foi resumida por Kelley *et al.* (2003) e os resultados indicam que as micotoxinas podem ser produzidas, e crescer em ambiente aquoso, submerso.

Os dados são ainda insuficientes, pelo que é necessário adquirir novos conhecimentos, relativos à presença de micotoxinas, em especial de ZEA em biofilmes. Como mencionado, normalmente os níveis de micotoxinas seriam baixos. No entanto, os fungos identificados na água poderiam crescer em géneros alimentícios ou infetar pessoas e começar a produzir quantidades significativas de micotoxinas (Leite *et al.*, 2012).

**Tabela 5** - Frequência e teores (ng/L) de ZEA em diferentes tipos de água em vários países.

País/Zona	Tipo de água analisada	Frequência	Teores (ng/L)		Bibliografia
			Min-Máx.	Média	
Polónia / Província de Wielkopolska	- Rio Bogdanka (conc. média anual)	-	2,0 – 25,0	11,53	Waškiewicz <i>et al.</i> , 2012
	- Vala de drenagem de Leszno	-	0,4 - 80,6	27,72	
Polónia			Primavera- Verão	Outono- Inverno	Gromadzka <i>et al.</i> , 2009
	- Rio Bogdanka		1,7	43,7	
	- Rio Warta		1,4	1,6	
	- Lago Rusalka	-	0,7	1,5	
	- Águas subterrâneas		<LOD	0,5	
	- Afluente de ETAR		1,0	5,0	
	- Efluente de ETAR		<LOD	2,7	
- 3 Valas de drenagem		-	7,6; 7,8; 12,3		
Polónia /Nordeste	-Água superficial	-	n.d.	-	Woźny <i>et al.</i> , 2013
Polónia / Gliwice	-Lago Gliwice		1,52		Dudziak, 2011
	-Vala de drenagem		1,14	n.d.	
	-Rio Oldra	-	0,66		
	-Água de abastecimento		n.d.		
Suíça / Reckenholz, norte de Zurique	- Água de drenagem	3/129	0,3 – 44,9	0,9	Schenzel, Schwarzenbach e Bucheli, 2010
	- Água de Rio	7/223	0,3 – 29,0	1,0	
	- Efluente da ETAR	0/4	0,4 – 47,7	1,0	
Suíça / Reckenholz	-Água de drenagem	-	0,5 - 2,1		Hartmann <i>et al.</i> , 2007
	- Água de Rio		0,4 - 1,1	-	
	- Efluente da ETAR		0,8 - 12,4		
Suíça / Zurich Reckenholz	- Água de drenagem	-	1 - 32	-	Bucheli <i>et al.</i> , 2005

**Tabela 5** - Frequência e teores (ng/L) de ZEA em diferentes tipos de água em vários países (continuação).

País/Zona	Tipo de água analisada	Frequência	Teores (ng/L)		Bibliografia
			Min-Máx.	Média	
Suíça	-Rio -Águas de drenagem	-	< LOQ n.d. - 35	-	Bucheli <i>et al.</i> , 2008
Suíça / Zurich Reckenholz	-Águas de drenagem	-	<ng/L - 35	-	Hartmann <i>et al.</i> , 2008a
Alemanha	-Águas superficiais	-	- máx. 60	-	Ternes, Eggert e Meisenheimer, 2001
Itália	- ETAR		1 - 7	4	Laganà <i>et al.</i> , 2001
Itália	-Afluente de ETAR		3 - 18	15	Laganà <i>et al.</i> , 2004
	-Efluente de ETAR		3 - 10	7	
	-Rio Tibre		2 - 5	3	
USA / Central Illinois	-Vala de drenagem (Kraft Slough)	24/39	2,5 - 3,5		Maragos, 2012
	- Lago Bloomington	6/39	2,2 - 5,7		
	- Lago Money Creek	9/28	< LOD - 4,3		
	- Lago Evergreen	6/23	< LOD - 2,1		
	- Rio Mackinaw	4/20	< LOD - 2,3		
USA / Iowa	- Riachos	13 %	< LOD (0,7) – 8	-	Kolpin <i>et al.</i> , 2010
USA / Nova Iorque	-ETAR	26%	n.d.	-	Kolpin <i>et al.</i> , 2014
USA / Works Park	-Água de consumo humano		15	-	Russell e Paterson, 2007
Noruega / Oslo	-Rede de abastecimento	-	-	-	Hageskal <i>et al.</i> , 2007

n.d. - não detetado

- não definido



## I.2.6 Métodos de determinação

As micotoxinas são frequentemente encontradas em concentrações da ordem dos ng/L, pelo que é essencial uma elevada sensibilidade dos métodos de determinação. Os métodos baseiam-se na extração e purificação seguida da deteção e quantificação com diferentes técnicas cromatográficas (Bennett e Klich, 2003).

Os métodos para análise de micotoxinas envolvem três procedimentos básicos nomeadamente a extração/purificação e a deteção e quantificação (Trucksess, 2000).

### I.2.6.1 Extração/Purificação

A quantificação exata e precisa de micotoxinas em níveis significativamente baixos, na ordem de grandeza dos nanogramas por litro em águas naturais requer um método analítico seletivo e sensível, no entanto para atingir esses baixos limites de deteção, é essencial o processo de extração/purificação em fase sólida (SPE), com vista a uma adequada purificação da amostra (Schenzel, Schwarzenbach e Bucheli, 2010).

Considerando as diversas investigações efetuadas em ambiente aquático, nomeadamente na pesquisa de ZEA em diferentes tipos de água, reconhece-se que são utilizadas diferentes quantidades de amostra. A eficiência do procedimento de extração pode ser influenciada pelas técnicas utilizadas na homogeneização da amostra. É fundamental uma separação eficaz das fases líquida e sólida, nomeadamente, as impurezas e interferentes das amostras através de técnicas de filtração (Resnik *et al.*, 1996).

Geralmente, no processo de filtração da água recorre-se a filtros de diferentes dimensões de poro, como evidenciado nos estudos que em seguida se especificam (tabela 6).

Gromadzka *et al.* (2009) utilizaram um litro de amostra de água que foi filtrada através de três diferentes filtros, papel de filtro Filtrak n.º.389, papel de filtro Whatman n.º.5 e filtros de microfibra de vidro Whatman GF/B. Situação análoga foi descrita por Waśkiewicz, *et al.* (2012), tendo substituído o papel de filtro Whatman n.º.5 pelo n.º.4.

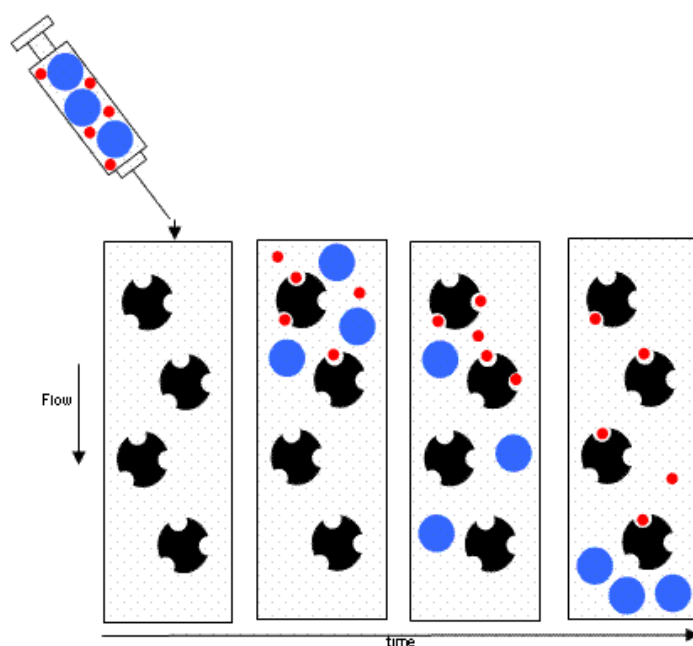
Bucheli *et al.* (2005), Kolpin *et al.* (2010), Schenzel, Schwarzenbach e Bucheli (2010) e Woźny *et al.* (2013), no processo de filtração, recorreram apenas ao uso de filtros de microfibra de vidro.

Na purificação são utilizadas, geralmente, colunas de imunoafinidade (IAC) (Trucksess, 2000; Ventura *et al.*, 2004). A característica mais importante, exigida para os anticorpos a utilizar nas IAC, é a sua especificidade, afinidade, estabilidade face às condições de lavagem, e

reversibilidade. É também essencial que o complexo micotoxina-anticorpo possa ser dissociado para libertar a micotoxina na fase de eluição. O imunoadsorvente é então transferido para uma coluna, à qual é aplicada a amostra ou o extrato aquoso a analisar (Katz, 1992).

A maioria dos investigadores recorre a IACs, pois esta técnica revela ser altamente sensível e seletiva, e fornece a possibilidade de extrair/purificar com rigor as amostras para as fases posteriores (Katz, 1992; Waśkiewicz *et al.*, 2012).

Resumidamente, estas colunas são usadas para reter antígenos ou anticorpos, como mostra a figura 6.



**Figura 6.** Esquema representativo da ação da IAC sobre a amostra injetada (Santos, 2011).

A amostra atravessa a coluna que contém o anticorpo anti-micotoxina. Segue-se a lavagem da coluna e posterior eluição da micotoxina. Depois da evaporação do eluído, a micotoxina é redissolvida em fase móvel e injetada no sistema de HPLC (Santos, 2011). A deteção pode ser efetuada por fluorescência ou por massa.

Para a concretização do processo de purificação, as colunas utilizadas são colunas ZearalaTest™ (Gromadzka *et al.*, 2009; Maragos, 2012; Waśkiewicz *et al.*, 2012), devido à sua elevada seletividade (Manova e Mladenova, 2009; Nuryono *et al.*, 2005; Zöllner e Mayer-Helm, 2006). São também utilizadas colunas ZearalaTest™ WB (Wozny *et al.*, 2013), Supelclean™ Envi-18 (Bucheli *et al.*, 2005; Dudziak, 2011; Hartmann *et al.*, 2007; Laganà *et al.*, 2001) e colunas Oasis HLB (Kolpin *et al.*, 2010, 2014; Laganà *et al.*, 2004; Schenzel, Schwarzenbach e Bucheli, 2010) (tabela 6).

Nas amostras de água filtrada em que foram usadas colunas Supelclean™ Envi-18, Hartmann *et al.* (2007) procederam ao condicionamento das colunas com 5 mL de ACN e 4 mL de água Milli-Q, de forma consecutiva. As amostras de água passaram nas colunas a um caudal máximo de 10 mL/min e, subsequentemente, durante pelo menos 10 minutos, foram secas ao ar. A eluição dos analitos foi efetuada com 4 mL de ACN. Os eluídos foram evaporados até à secura utilizando uma corrente suave de azoto a 50 °C, durante aproximadamente 30 min. Os extratos secos foram posteriormente reconstituídos em 300 µL de água Milli-Q/ACN (80/20, v/v). As amostras foram armazenadas a 4 °C e analisados no prazo de 48 h (Hartmann *et al.*, 2007).

Relativamente às amostras que foram concentradas e purificadas por colunas Oasis HLB (6 mL, 200 mg), Schenzel, Schwarzenbach e Bucheli (2010) efetuaram o condicionamento da coluna com 5 mL de MeOH, 5 mL de mistura água Milli-Q / MeOH (1:1, v/v) e 5 mL de água Milli-Q. As amostras de água (1 L) foram passadas através da IAC com uma taxa máxima de fluxo de 10 mL/min. Subsequentemente, as colunas foram lavadas com 5 mL de água Milli-Q. Sem qualquer passo de secagem da coluna adicional, os analitos foram eluídos com 5 mL de MeOH. A concentração foi realizada sob uma corrente suave de azoto, a 50 °C. Os extratos foram reconstituídos em 900 µL de água Milli-Q / MeOH (90:10, v/v).

Os investigadores cuja opção incidiu sobre colunas ZearalaTest procederam à eluição com diferentes volumes de metanol. Assim, Waśkiewicz *et al.* (2012) optaram por 1,5 mL enquanto Gromadzka *et al.* (2009) utilizaram 3 mL (tabela 6). A reconstituição do eluído seco foi efetuada com 200 µL de mistura de água: metanol: acetonitrilo (70:20:10, v/v) (Waśkiewicz *et al.*, 2012) ou acetonitrilo: metanol: água (70:20:10, v/v) (Gromadzka *et al.*, 2009).

#### 1.2.6.2 Deteção e quantificação

A etapa final do processo envolve a determinação qualitativa e quantitativa da micotoxina. Têm sido desenvolvidos métodos analíticos para a determinação de micotoxinas que normalmente envolvem técnicas cromatográficas. A maioria dos métodos utiliza a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) para este processo (Trucksess, 2000).

Considerando a matriz em análise, os métodos analíticos para determinar micotoxinas, devem ser sensíveis, específicos, exatos e precisos (Muscarella *et al.*, 2009), pelo que para quantificar com precisão, e tendo em conta as baixas concentrações de ZEA encontradas na água, é necessário recorrer a métodos analíticos seletivos e sensíveis. Neste âmbito, os

dados conhecidos através das publicações científicas foram obtidos com recurso a metodologias analíticas como HPLC com deteção por fluorescência (FD) (Gromadzka *et al.*, 2009; Maragos, 2012; Waśkiewicz *et al.*, 2012; Woźny *et al.*, 2013), LC com deteção por massa (MS) ou LC-MS/MS (Bucheli *et al.*, 2008; Hartmann *et al.*, 2007; Laganà *et al.*, 2001, 2004; Schenzel, Schwarzenbach e Bucheli, 2010) (tabela 6). Outros investigadores recorreram à cromatografia gasosa com deteção por massa (GC-MS) (Ternes, 2001; Pawlowski *et al.*, 2004).

Os primeiros estudos desenvolvidos em amostras de água para a análise de ZEA recorreram à GC frequentemente utilizada em combinação com técnicas de deteção com MS (Onji *et al.*, 1998; Suzuki *et al.*, 1981; Young e Games, 1994). No entanto, não é uma técnica utilizada comercialmente, devido à existência de técnicas muito mais económicas e rápidas, como o HPLC (Turner, Subrahmanyam e Piletsky, 2009).

A HPLC tem uma precisão e sensibilidade elevadas, aliadas a um limite de deteção baixo (Santos, 2011).

No que diz respeito ao volume de eluído, após secura e reconstituição em fase móvel, injetado no sistema cromatográfico, observam-se variações de investigador para investigador (tabela 6). A maioria prefere usar volumes de 50  $\mu\text{L}$  (Bucheli *et al.*, 2005; Hartmann *et al.*, 2007; Kolpin *et al.*, 2010; Laganà *et al.*, 2004). Alguns investigadores utilizam 20  $\mu\text{L}$  (Gromadzka *et al.*, 2009; Waśkiewicz *et al.*, 2012). Outros optam por 40  $\mu\text{L}$  (Schenzel, Schwarzenbach e Bucheli, 2010) e por 60  $\mu\text{L}$  (Maragos, 2012). Um volume de injeção mais elevado proporciona um valor de LOD mais baixo.

No que concerne às colunas analíticas, a maioria dos procedimentos por HPLC utiliza as de fase reversa  $\text{C}_{18}$  (ODS) (Bucheli *et al.*, 2005; Gromadzka *et al.*, 2009; Hartmann *et al.*, 2007; Kolpin *et al.*, 2010; Maragos, 2012; Schenzel, Schwarzenbach e Bucheli, 2010; Waśkiewicz *et al.*, 2012; Woźny *et al.*, 2013).

Em relação à escolha das dimensões da coluna cromatográfica observa-se uma grande disparidade. As dimensões das colunas  $\text{C}_{18}$  variam entre 2,0x50 mm (Kolpin *et al.*, 2010), 2,0x125 mm (Kolpin *et al.*, 2014; Schenzel, Schwarzenbach e Bucheli, 2010), 2,0 x150 mm (Bucheli *et al.*, 2005; Hartmann *et al.*, 2007), 3,9x150 mm (Gromadzka *et al.*, 2009; Waśkiewicz *et al.*, 2012) e 4,6x250 mm (Laganà *et al.*, 2001, 2004; Maragos, 2012; Woźny *et al.*, 2013).

No que respeita ao tamanho da partícula da fase estacionária, observa-se também alguma variabilidade. A escolha recai preferencialmente para colunas com 3  $\mu\text{m}$  de tamanho da

partícula (Bucheli *et al.*, 2005; Hartmann *et al.*, 2007; Kolpin *et al.*, 2010, 2014; Schenzel, Schwarzenbach e Bucheli, 2010). Contudo, alguns optam por 4  $\mu\text{m}$  (Gromadzka *et al.*, 2009; Wańkiewicz *et al.*, 2012) ou 5  $\mu\text{m}$  (Laganà *et al.*, 2001, 2004; Maragos, 2012; Woźny *et al.*, 2013).

No que respeita à fase móvel, os solventes mais utilizados são o metanol, acetonitrilo, água e ácido acético. Verificam-se variações nas misturas utilizadas no que se refere às proporções dos diferentes solventes. O pH das soluções, em algumas situações, é ajustado com a solução de acetato de amónio entre 6 e 7 (tabela 6). Os fluxos adotados variam também de procedimento para procedimento, variando entre 0,2 mL/min (Bucheli *et al.*, 2005; Hartmann *et al.*, 2007; Schenzel, Schwarzenbach e Bucheli, 2010) e 1 mL/min (Laganà *et al.*, 2001, 2004; Woźny *et al.*, 2013).

Os comprimentos de onda de excitação e emissão quando se recorre à LC-FD oscilam entre 218 a 438 nm (Woźny *et al.*, 2013) e 275 a 450 nm (Maragos, 2012), respetivamente.

**Tabela 6** - Metodologias analíticas utilizadas na determinação de zearalenona em águas.

Tipo de água analisada	Extração / Purificação	Deteção e Quantificação	LOD (ng/L)	LOQ (ng/L)	Bibliografia
- Rio - Vala de drenagem	- 500 mL amostra Filtração: - Filtro Filtrak n.º.389 - Filtro Whatman n.º.4 - Filtro de vidro Whatman Purificação: coluna IAC ZearalaTest™ - Eluição: 1,5 mL MeOH. - Evaporação: em corrente de azoto à secura. - Extratos reconstituídos em 200 µL de mistura ACN:MeOH:H <sub>2</sub> O (70:20:10).	HPLC - FD - HPLC - FD: $\lambda_{exc}$ = 274 nm; $\lambda_{em}$ = 440 nm - Coluna: C <sub>18</sub> (3,9 mm x 150 mm, 4 µm) - Fluxo: 0,2 mL/min. - Volume de injeção: 20 µL.	-	-	Waśkiewicz et al., 2012
- Água de drenagem - Rio - Efluente da ETAR	Filtração: - Filtros de microfibra de vidro por filtração a vácuo Purificação: SPE – Oasis HLB, 6 mL, 200 mg - Condicionamento da coluna: 5 mL de MeOH, 5 mL de mistura água Milli-Q / MeOH (1:1, v/v), 5 mL de água Milli-Q. - Lavagem da coluna: 5 mL de água Milli-Q. - Eluição: 5 mL de MeOH. - Concentração: a 100 µL sob uma corrente suave de azoto, a 50 °C. Os extratos foram reconstituídos em 900 µL de água Milli-Q/MeOH (90:10, v/v).	LC-MS-MS - Coluna: C <sub>18</sub> (2,0 mm x 125 mm, 3 µm) Fase Móvel: Eluente A: Água Milli-Q/MeOH/ácido acético (89:10:1) Eluente B: Água Milli-Q/MeOH/ácido acético (2:97:1) - Os dois eluentes foram tamponados, a pH entre 6,6 e 7 com solução de acetato de amónio 5 mM. Gradiente de eluição: 27% eluente B / 73% eluente A – 0 min 27% B - 1 min; 45% B - 1,3 min; 45% B - 5 min; 63% B - 5,3 min; 63% B - 9 min; 81% B - 9,3 min; 81% B - 13,0 min; 100% B - 13,3 min. Fluxo: 0,2 mL/min. Volume de injeção: 40 µL.	MDL 0,9 - água de drenagem 1,0 - água de rio 1,0 - água residual	-	Schenzel, Schwarzenbach e Bucheli, 2010
- Rio - Lago - Águas subterrâneas - Afluente de ETAR - Efluente de ETAR - Valas de drenagem	- 1 L de amostra Filtração: - Papel de filtro Filtrak n.º.389 - Papel de filtro Whatman n.º 5 - Filtro de microfibra de vidro Whatman GF/B Purificação: 500 mL do filtrado foi passado pela coluna IAC ZearalaTest. - Eluição: 3 mL de MeOH. - Após evaporação, o eluído foi dissolvido em 200 µL de H <sub>2</sub> O:MeOH:ACN (70:20:10, v/v).	HPLC – Multi FD - HPLC - FD: $\lambda_{exc}$ = 274nm; $\lambda_{em}$ = 440 nm - Coluna: C <sub>18</sub> (3,9 mm x 150 mm, 4 µm) - Fase Móvel: ACN:H <sub>2</sub> O:MeOH (46:46:8, v/v) - Fluxo: 0,5 mL/min. - Volume de injeção: 20 µL.	0,3-0,4-rio	-	Gromadzka et al., 2009

**Tabela 6** - Metodologias analíticas utilizadas na determinação de zearalenona em águas (continuação).

Tipo de água analisada	Extração / Purificação	Detecção e Quantificação	LOD (ng/L)	LOQ (ng/L)	Bibliografia
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Água de drenagem</li> <li>- Água de Rio</li> <li>- Efluente da ETAR</li> </ul>	<p>Filtração:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Filtros de fibra de vidro/filtração a vácuo</li> <li>- O volume exato de 1 L foi enriquecida com 50 µL de solução padrão interno (D<sub>6</sub>-ZON).</li> </ul> <p>Purificação: SPE (Supelclean™ Envi-18; 6 mL, 500 mg).</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Condicionamento: 5 mL de ACN e 4 mL de água Milli-Q a um caudal máximo de 10 mL/min e secos ao ar durante 10 min.</li> <li>- Eluição: 4 mL de ACN.</li> <li>- Concentração à secura: Os eluídos foram evaporados até à secura, utilizando uma corrente suave de azoto a 50 °C.</li> <li>- Os extratos foram reconstituídos em 300 µL de água Milli-Q/ACN (80/20, v / v).</li> </ul>	<p>LC-MS-MS</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Coluna: C<sub>18</sub> (2,0 mm x 150 mm, 3 µm)</li> </ul> <p>Fase Móvel:</p> <p>Eluente A: Água Milli-Q/ACN (95:5)  Eluente B: Água Milli-Q/ACN (5:95)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Os dois eluentes foram tamponados, a pH 6,8 com solução de acetato de amónio 10 mM.</li> </ul> <p>Gradiente de eluição:</p> <p>100% eluente A - 0 min; 0 % B - 3 min; 40% B - 4 min; 67,5% B - 25,5 min; 100% B - 26 min; 100% B - 29 min; 100% eluente A - 30 min; 100% eluente A - 35min.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Proporção de fluxo: 0,2 mL/min. Adição pós-coluna de 0,3 mL/min de MeOH, melhorando a intensidade do sinal por um fator de 1,5.</li> <li>- Volume de injeção: 50 µL.</li> </ul>	<p>MDL</p> <p>0,5 e 2,1 - água de drenagem  0,6 e 0,7 - água de rio  0,8 e 3,7 - efluente de ETAR</p>	-	Hartmann et al., 2007
-Água superficial	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Amostra: 100 mL</li> </ul> <p>Filtração:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Filtro de microfibra de vidro.</li> </ul> <p>Purificação: coluna IAC ZearalaTest™ WB</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Eluição: MeOH, evaporado num banho de água (50 °C).</li> </ul>	<p>HPLC - FD:</p> <p><math>\lambda_{exc} = 218 \text{ nm}</math>; <math>\lambda_{em} = 438 \text{ nm}</math></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Coluna: ODS (4,6 mm x 250 mm, 5 µm)</li> </ul> <p>Fase Móvel:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>-Metanol/acetoneitrilo/água (8:46:46, v/v/v)</li> <li>- Fluxo: 1 mL/min.</li> </ul>	-	-	Woźny et al., 2013
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Vala de drenagem</li> <li>- Lagos</li> <li>- Rio</li> </ul>	<p>Filtração:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>-Aparelho de filtração Millipore, através de Empore™ Grease e Oil disk (47 mm de diâmetro)</li> </ul> <p>Purificação: SPE - C<sub>18</sub> e coluna IAC ZearalaTest™ WB, colocadas em tandem.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>-Condicionamento dos discos: 20 mL de ACN, 20 mL de MeOH e 30 mL de água desionizada, sob vácuo e sem secar.</li> <li>- Eluição: 22 mL de acetoneitrilo.</li> <li>- Lavagem: 2 x 10 ml, e uma lavagem final de 2 mL).</li> <li>- Evaporação: sob vácuo a 2ml.</li> <li>- O eluente foi tamponado, com solução de fosfato de sódio 10 mM e de cloreto de sódio 145 mM em água.</li> </ul>	<p>LC/ FD:</p> <p><math>\lambda_{exc} = 275 \text{ nm}</math>; <math>\lambda_{em} = 450 \text{ nm}</math></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Coluna: C<sub>18</sub> (4,6 mm x 250 mm, 5 µm).</li> </ul> <p>Fase Móvel:</p> <p>Eluente A: ACN/ Água (92:8, v/v)  Eluente B: Água desionizada</p> <p>Gradiente de eluição:</p> <p>60% eluente A e 40% eluente B - 15 min; 90 % A e 10% B - 5 min; 60% A e 40% B - 10 min.</p> <p>Confirmação LC-MS:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Extratos secos dissolvidos em 0,6 mL de ACN / H<sub>2</sub>O (1+1), filtrados através de filtro de seringa PVDF (0,22 mm x 13 mm) e infundida no MS a 60 µL min<sup>-1</sup>.</li> </ul>	0,4	1,5	Maragos, 2012

**Tabela 6** - Metodologias analíticas utilizadas na determinação de zearalenona em águas (continuação).

Tipo de água analisada	Extração / Purificação	Deteção e Quantificação	LOD (ng/L)	LOQ (ng/L)	Bibliografia
	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Proporção de fluxo na IAC: 10 mL de amostra concentrada foi aplicada a um fluxo de 1-2 g/s.</li> <li>Lavagem da IAC: 10 mL de água desionizada.</li> <li>Eluição: 1,8 mL de metanol.</li> <li>Evaporação: corrente suave de azoto a 50 ° C.</li> <li>Reconstituição: dissolução em 0,25 mL de ACN/H<sub>2</sub>O (1+1, v+v).</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Volume de injeção: 60 µL.</li> </ul>			
-Água de drenagem	<p>Filtração:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- filtros de microfibra de vidro, tamanho de poro de 1,2 µm.</li> </ul> <p>Purificação: Envi-18 SPE 6 mL, 500 mg.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Condicionamento das colunas SPE: 5 mL de metanol e 4 ml de água Milli-Q.</li> <li>-Proporção de fluxo: 10 mL/min.</li> <li>- Lavagem: 2 mL de água Milli-Q/ metanol (95:5, v/v), e por, pelo menos, 10 minutos, secou-se ao ar.</li> <li>- Eluição: 1,8 mL de MeOH.</li> <li>- O eluído foi concentrado por evaporação à secura com corrente suave de azoto.</li> <li>- Reconstituição do extrato: 300 µL de água Milli-Q/MeOH (80/20, v/v).</li> </ul>	<p>LC-MS-MS</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Coluna: C<sub>18</sub> (2,0 mm x 150 mm, 3 µm)</li> </ul> <p>Fase Móvel:</p> <p>Eluente A: Água Milli-Q/ACN (95:5)</p> <p>Eluente B: Água Milli-Q/ACN (5:95)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Os dois eluentes foram tamponados, com solução de acetato de amónio 10 mM.</li> </ul> <p>Gradiente de eluição:</p> <p>100% eluente A - 3 min; 40% B - 1 min; 80% B - 30,5 min; 100% B - 0,5 min; 100% B - 4 min.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Fluxo: 0,2 mL/min.</li> <li>- Volume de injeção: 50 µL.</li> </ul>	-	-	Bucheli <i>et al.</i> , 2005
-Riachos	<p>Filtração:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- filtro de micofibra de vidro, de 0,7 µm.</li> </ul> <p>Purificação: SPE - Oasis HLB, 6 mL, 200 mg</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Condicionamento: 5 mL de MeOH e 5 mL de água.</li> <li>- Fluxo: 5 a 10 mL/min.</li> <li>- As colunas foram lavadas com 5 mL de água e secas por vácuo.</li> <li>- Eluição: 10 mL de MeOH.</li> <li>- Evaporação: corrente suave de azoto.</li> <li>- Os extratos secos foram reconstituídos em 300 µL de H<sub>2</sub>O/ACN (80:20, v/v) e transferidos para frascos de vidro âmbar.</li> </ul>	<p>LC-MS-MS</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Coluna: C<sub>18</sub> (2 mm x 50 mm, 3 µm) (deteção e quantificação de acordo com Hartmann <i>et al.</i>, 2007 e Bucheli <i>et al.</i>, 2008).</li> </ul>	0,7	-	Kolpin <i>et al.</i> , 2010



**Tabela 6** - Metodologias analíticas utilizadas na determinação de zearalenona em águas (continuação).

Tipo de água analisada	Extração / Purificação	Deteção e Quantificação	LOD (ng/L)	LOQ (ng/L)	Bibliografia
- ETAR	<p>Filtração: - filtro de fibra de vidro, de 1,5 µm.</p> <p>Purificação: - SPE - Supelclean™ Envi -18, 6 mL - Condicionamento: 10 mL de água Milli-Q e 2 mL de MeOH/H<sub>2</sub>O (50:50, v/v). - Eluição: 5 mL de MeOH. - Evaporação: corrente suave de azoto.</p>	<p>LC-MS-MS - Coluna: C<sub>18</sub> (4,6 mm x 250 mm, 5 µm) Fase Móvel: - ACN / MeOH/H<sub>2</sub>O (37:16:47, v/v) - Os eluente foi tamponado, com solução de acetato de amónio 10 mM. - Fluxo: 1 mL/min. - Volume de injeção: 50 µL.</p>	-	0,4 - efluente 1 - afluente	Laganà <i>et al.</i> , 2001
-Afluente de ETAR -Efluente de ETAR -Rio polaco	<p>Filtração: - filtro de fibra de vidro, de 1,2 µm.</p> <p>Purificação: - O eluente foi tamponado, a pH entre 6,6 e 7,0 com solução de ácido acético. - SPE - Oasis HLB, 200 mg - Lavagem da coluna: 10 mL de água e 400 µL de MeOH. - Eluição: 7 mL de diclorometano: MeOH (50:50, v/v). - Evaporação: corrente suave de azoto. - Os extratos secos foram reconstituídos em 200 µL de H<sub>2</sub>O/ACN (50:50, v/v).</p>	<p>LC-MS-MS - Coluna: C<sub>18</sub> (4,6 mm x 250 mm, 5 µm) Fase Móvel: - ACN/H<sub>2</sub>O (50:50) - Fluxo: 1 mL/min. - Volume de injeção: 50 µL.</p>	1,7 - afluente 0,6 - efluente 0,3 - rio	-	Laganà <i>et al.</i> , 2004
-ETAR	<p>Filtração: - filtro de fibra de vidro, de 0,7 µm.</p> <p>Purificação: - O eluente foi tamponado, a pH entre 6,6 e 7,0 com solução de ácido acético. - SPE - Oasis HLB, 6 mL, 200 mg - Condicionamento: 5 mL de MeOH e 5 mL de água e MeOH (1/1, v/v), e 5 mL de água Milli-Q. - Fluxo: 10 mL/min. - As colunas foram lavadas com 5 mL de água Milli-Q e secas por vácuo. - Eluição: 5 mL de MeOH. - Evaporação: corrente suave de azoto. - Os extratos secos foram reconstituídos em 900 µL de água Milli-Q/MeOH (90:10, v/v) e transferidos para frascos de vidro âmbar.</p>	<p>LC-MS-MS - Coluna: C<sub>18</sub> (2 mm x 125 mm, 3 µm) (deteção e quantificação de acordo com Schenzel, Schwarzenbach e Bucheli, 2010).</p>	0,4 - 47,7	-	Kolpin <i>et al.</i> , 2014

**Tabela 6** - Metodologias analíticas utilizadas na determinação de zearalenona em águas (continuação).

Tipo de água analisada	Extração / Purificação	Detecção e Quantificação	LOD (ng/L)	LOQ (ng/L)	Bibliografia
-Rio -Águas de drenagem	<p>Filtração: - filtro de fibra de vidro, de 1,2 µm. Purificação: IAC específica para ZEA - Condicionamento: 4 mL de MeOH, 4 mL de MeOH / água Milli-Q (50:50, v/v), e 4 mL de água Milli-Q. - Fluxo: 5 a 10 mL/min. - Lavagem da IAC: 5 mL de água Milli-Q. - Eluição: 4 mL de acetato de etilo. - Evaporação: corrente suave de azoto. - Os extratos secos foram reconstituídos em 400 µL de água Milli-Q / MeOH (90:10, v/v) e transferidos para frascos de vidro âmbar.</p>	<p>LC-MS-MS - Coluna: OASIS HLB (6 cm<sup>3</sup>, 200 mg) (detecção e quantificação de acordo com Hartmann <i>et al.</i>, 2007).</p>			Bucheli <i>et al.</i> , 2008
-Água de consumo humano	<p>Filtração: - filtro de fibra de vidro, de 0,45 µm. - plaqueadas em meio de agar (farinha de milho). Purificação: IAC específica para ZEA. - Lavagem da IAC: 20 mL de água. - Fluxo: 5 mL/min. - Eluição: 1,5 mL de ACN e 1 mL de água.</p>	<p>HPLC-FD - Coluna: ODS-3 Fase Móvel: Eluente: ACN:H<sub>2</sub>O (60:40) - O eluente foi tamponado, a pH 3,2 com solução de ácido acético. - Fluxo: 1,0 mL/min. FD: λ<sub>exc</sub> = 274 nm; λ<sub>em</sub> = 455 nm - Volume de injeção: 50 µL.</p>	-	-	Russell e Paterson, 2007
-Água de abastecimento	<p>Filtração: - filtro de fibra de vidro, de 0,45 µm. Purificação: SPE - Envi-18. - Condicionamento: 5 cm<sup>3</sup> de ACN e 5 cm<sup>3</sup> de água. - As colunas foram secas por vácuo. - Eluição: 4 cm<sup>3</sup> de ACN. - Evaporação: corrente suave de azoto.</p>	<p>GC-MS - Coluna VF-5ms (30 mm x 0,25 mm, 0,25 µm) - Volume de injeção: 3 µL.</p>	0,1 ng/µl	0,3 - 0,5 ng/dm <sup>3</sup>	Dudziak, 2011
- não especificado					



**PARTE 2**  
**PARTE EXPERIMENTAL**



## 2.1 Material e Métodos

### 2.1.1 Amostragem

O presente estudo foi realizado em Coimbra, na Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra.

A investigação centrou-se no estudo de ZEA em 38 amostras de águas superficiais, de sete rios e uma ribeira, em Portugal continental (anexo I). As recolhas foram efetuadas a montante das ETARs.

A colheita das amostras realizou-se em dois períodos, ou seja, entre setembro a novembro de 2014 (outono; n=18) e fevereiro a abril de 2015 (primavera; n=20).

A proveniência das amostras colhidas foi aleatória, no entanto foi tida em atenção a amostragem deveria compreender diferentes amostras que caracterizassem o território nacional, como evidência a figura 7.

Após a colheita, as amostras foram devidamente identificadas e encaminhadas para o laboratório, acondicionadas em mala sob atmosfera refrigerada. As amostras mantiveram-se refrigeradas até à sua análise.



**Figura 7.** Identificação dos locais (⊕) onde foram aleatoriamente colhidas as amostras (Infoescola, 2015).

### 2.1.2 Reagentes e Material

O padrão de ZEA, um pó branco, com um grau de pureza  $\geq 99,0$ , foi obtido a partir da marca Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

Os reagentes de grau HPLC utilizados foram acetonitrilo (Carlos Erba, Milão, Itália) e metanol (grau de pureza  $\geq 99,9\%$ , Chromasolv, Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha). A água foi obtida a partir do sistema de filtração Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, USA).

No processo de filtração foram usados papel de filtro de microfibras de vidro (150 mm, Munktell & Filtrak GmbH, Bärenstein, Alemanha), papel de filtro de nitrato de celulose (0,45  $\mu\text{m}$ , Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen, Alemanha) e papel de filtro Whatman® N° 1, de membrana de poliamida (0,2  $\mu\text{m}$ , 50 mm, Whatman GmbH, Dassel, Alemanha).

Foram usadas colunas de imunoafinidade (IAC) ZearalaTest™ WB (VICAM, Milford, USA).

Na análise das amostras foi usada água pura, acetonitrilo (HPLC - gradient, Merck) e ácido acético glacial (Merck, Darmstadt, Alemanha). Foram também usados filtros de membrana para o extrato seco reconstituído (Durapore, 0,22  $\mu\text{m}$ , GVPP; Millipore) e filtros para os solventes da fase móvel (Cellulose Acetat Membrane; 0,2  $\mu\text{m}$ ; Ederol).

Foram ainda usados uma bomba de vácuo (modelo Vacuum pump v-700 Büchi®), material de filtração (funil de Büchner acoplado a um Kitasato e funil tipo copo acoplado à tela de suporte e ao frasco de vidro, Schott), o SPE de Ashcroft (Stratford, CT, USA) ligado a uma tubagem de vácuo de MachereyNagel (USA), uma bomba de Dinko (mol. D-95, 130 W, 220 V) e um bloco de aquecimento com sistema de evaporação de azoto (Reagente 5, Porto, Portugal).

### 2.1.3 Soluções

A solução *stock* de ZEA foi preparada a 5 mg/mL, diluindo-se 10 mg de ZEA em 2 mL de acetonitrilo, e armazenada a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . A solução intermédia foi preparada por diluição da solução *stock* a 50  $\mu\text{g/mL}$ , em acetonitrilo, e a solução trabalho a 1  $\mu\text{g/mL}$  em acetonitrilo, por diluição da solução intermédia. Foram armazenadas no escuro a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

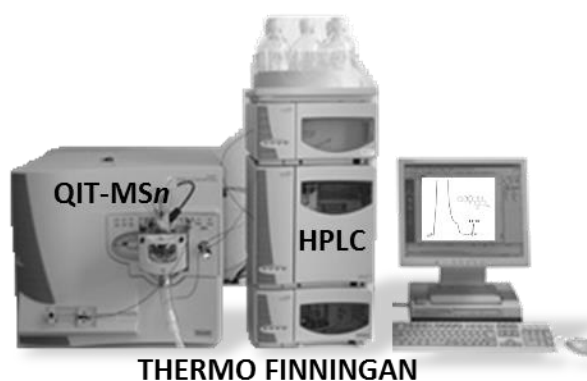
As soluções padrão para a curva de calibração em fase móvel foram preparados entre 2,5 e 50 ng/mL (2,5, 5, 15, 25, 35, 50 ng/mL).

As concentrações para a curva de calibração na matriz foram preparadas entre 5 e 100 ng/L (5, 10, 30, 50, 70, 100 ng/L).

A fase móvel consistia numa solução, filtrada a vácuo, de 40% de água com 0,1% de ácido acético e 60% de ACN. Todos os reagentes de cromatografia líquida foram desgaseificados durante 15 minutos num banho de ultra-sons.

#### 2.1.4 Equipamento LC-MS-MS

O equipamento de cromatografia líquida com detecção por massa em *tandem* (LC-MS/MS) constituído pelo Finnigan Surveyor Autosampler Plus (Thermo), pelo Finnigan Surveyor MS Pump Plus (Thermo), pelo espectrómetro de massa híbrido Quadrupolo-*Ion Trap* (LCQ Advantage MAX, Thermo Finnigan, San Jose, California, USA) (figura 8) e pelo *software* para aquisição e tratamento de dados Xcalibur, 2.0, SR2 (Thermo) foi utilizado na detecção e quantificação da ZEA.



**Figura 8.** Equipamento de LC-MS/MS.

O equipamento de LC estava equipado com coluna cromatográfica Spherisorb ODS2 (2,1 mm x 150 mm, 3  $\mu$ m), a qual era precedida por uma pré-coluna Spherisorb ODS2 (4,6 mm x 10 mm, 5  $\mu$ m) (Waters Corporation, Milford, U.S.A.).

### 2.2 Procedimento Experimental

#### 2.2.1 Extração / purificação

As amostras de água (cerca de 750 mL) foram filtradas através de três filtros, microfibras de vidro, nitrato de celulose e membrana de poliamida. Os tamanhos de poro diminuíram sucessivamente com o objetivo de eliminar uma fração substancial das impurezas existentes na água.



Na fase posterior, 500 mL de amostra de água filtrada passaram através da IAC ZearalaTest™ WB (VICAM, USA), a um fluxo constante, sensivelmente 1-2 gotas por segundo.

Seguiu-se a lavagem da coluna com 10 mL de água Milli-Q e a eluição com 3 mL de metanol.

O eluído foi seco num evaporador a 40 °C sob um fluxo suave de azoto e o extrato seco foi armazenado a -20 °C. Antes da injeção no sistema cromatográfico, o extrato seco foi reconstituído em 1 mL de fase móvel e, de seguida, microfiltrado por uma membrana Durapore (Millipore) com um diâmetro de poro de 0,22 µm.

### 2.2.2 Deteção e Quantificação

A deteção e quantificação da ZEA foram realizadas por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa em *tandem* (LC-MS/MS) com recurso ao cromatógrafo descrito em 2.1.4. O espectrómetro de massa operou em modo de ionização negativa, por *electrospray* (ESI), com aquisição por monitorização seletiva de reações (SRM). As temperaturas da fonte capilar foram de 0 e 270 °C e as voltagens de 4,5V e 10V, respetivamente. O gás nebulizador usado foi o azoto, com uma velocidade do fluxo de 80 arb. (unidades arbitrárias) e o gás auxiliar de varredura com uma velocidade do fluxo de 20 arb.. O gás de colisão utilizado foi o hélio, com uma energia de colisão normalizada de 35%. Foram adquiridas três transições precursor-fragmento, uma para quantificação ( $m/z$  317 ( $|M-H|^-$ )>  $m/z$  273) e as restantes duas para confirmação ( $m/z$  317 ( $|M-H|^-$ )>  $m/z$  175 e  $m/z$  317 ( $|M-H|^-$ )>  $m/z$  149).

O volume de injeção foi de 20 µL (*loop* parcial) e o fluxo cromatográfico de 200 µL/min, em modo isocrático.

A identificação da ZEA foi efetuada, comparando os tempos de retenção dos picos cromatográficos obtidos na amostra com os do padrão bem como comparando os correspondentes espectros de massa. Os resultados foram analisados equiparando os rácios obtidos das áreas dos picos de ZEA da amostra com os do padrão de cada cromatograma.

Para a quantificação da ZEA foram construídas curvas de calibração a partir das soluções padrão, que por comparação com a área média de 5 injeções, permitiram quantificar a concentração de ZEA em cada amostra.

### 2.2.3 Validação

A validação do método foi efetuada através da determinação da linearidade, exactidão, precisão, limite de deteção e limite de quantificação.

### 2.2.3.1 Linearidade

A linearidade atesta a proporcionalidade entre as áreas obtidas dos cromatogramas e as concentrações existentes nas amostras, sendo esta relação tanto maior quanto mais próximo de 1,0 for o valor do coeficiente de determinação ( $R^2$ ). Para a respetiva avaliação foram construídas duas curvas de calibração, uma em fase móvel (2,5 ng/mL - 50 ng/mL) e outra em matriz (5 - 100 ng/L).

### 2.2.3.2 Ensaio de fortificação

A exatidão do método determinou-se através dos ensaios de recuperação de ZEA. A recuperação está relacionada com a exatidão, pois mostra a quantidade de determinado composto recuperado no procedimento, em relação à quantidade real presente na amostra. Para avaliar este parâmetro, foram efetuados três níveis de fortificação numa amostra de água de superfície. Para o efeito foram utilizadas soluções padrão com concentrações a 5, 25 e 50 ng/mL que foram adicionadas a 500 mL de água de superfície por forma a obter níveis de fortificação de 10, 50 e 100 ng/L. Para cada nível de fortificação foram efetuados três replicados.

Os ensaios de recuperação foram analisados nas mesmas condições analíticas e a exatidão foi avaliada através das percentagens de recuperação para cada um dos 3 níveis de fortificação.

A precisão do método analítico foi avaliada através da repetibilidade intra e inter-dia. A repetibilidade intra-dia foi avaliada analisando uma amostra de água superficial, fortificada em triplicado para o mesmo dia e a repetibilidade inter-dia foi avaliada sobre a mesma amostra, utilizando as mesmas condições, mas em três dias diferentes (nove repetições). A reprodutibilidade dos resultados não foi avaliada, uma vez que requeria o envolvimento de diferentes laboratórios.

### 2.2.3.3 Limite de deteção e limite de quantificação

A determinação dos limites de deteção (LODs) baseia-se no sinal-ruído que pode ser aplicada apenas aos processos analíticos que apresentam ruído de linha de base. A determinação da relação sinal-ruído é efetuada por comparação dos sinais medidos a partir de amostras com baixas concentrações conhecidas do analito com a amostra em branco e que estabelece a concentração mínima para a qual a substância a analisar pode ser detetada com fiabilidade (ICH, 2005). A relação sinal-ruído entre 3:1 é usualmente considerada

aceitável para calcular o limite de detecção, pelo que os LODs foram determinados pela razão sinal - ruído (S/R), de 3:1, comparando o sinal obtido do branco da amostra com o sinal obtido na curva de calibração.

Os critérios utilizados para o cálculo dos LODs foram também os selecionados para a determinação dos limites de quantificação (LOQs), no entanto, segundo ICH (2005) a razão sinal-ruído típica utilizada é de 10:1. Neste caso, os LOQs foram determinados como sendo a concentração que produziu uma relação sinal-ruído de 10 vezes nos cromatogramas de ZEA analisada, seguindo o mesmo procedimento analítico do limite de detecção.

Ou seja, os LODs e LOQs foram determinados como três e dez vezes o ruído de mais baixo nível detectado e determinado, respetivamente.

#### 2.2.4 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o GraphPad Prism (6, 01, GraphPad Software, Inc., San Diego, EUA). Para testar se os conjuntos de dados eram de distribuição de Gauss, foi utilizado o teste de normalidade D'Agostino-Pearson. Uma vez que os conjuntos de dados não apresentaram distribuição normal, com variações não homogêneas, foram aplicados testes não paramétricos. Para a comparação entre as duas estações de amostragem foi utilizado o teste de Mann-Whitney. O nível com significado estatístico foi definido como  $P < 0,05$ . Para a análise estatística, se a concentração se encontrava abaixo do limite de detecção (LOD) foi atribuído 50% desse limite.

### 2.3 Resultados e Discussão

#### 2.3.1 Otimização dos procedimentos analíticos

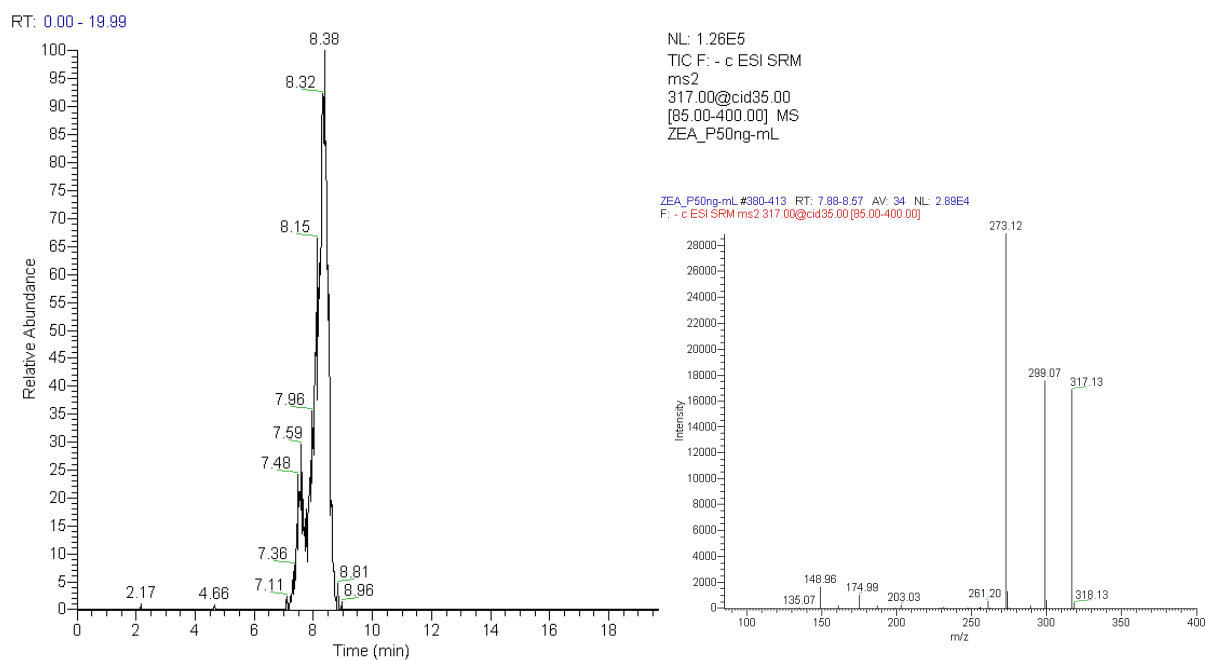
Relativamente ao processo de filtração, a escolha de três filtros diferentes com dimensões de poro sucessivamente inferiores permitiu uma maior eficiência no processo, reduzindo o número de interferentes, quando a amostra atravessa a IAC.

A adoção da cromatografia de imunoafinidade baseada no anticorpo monoclonal permitiu extrair a ZEA das amostras. Esta técnica consiste na separação seletiva pelo anticorpo, o qual imobiliza sobre uma matriz polimérica e é usado para ligar seletivamente compostos específicos. Após a remoção dos componentes não acoplados, a ZEA ligada é deslocada através da alteração da característica química do eluente, o metanol. A escolha da coluna ZearalaTest™ WB permitiu a otimização do processo, pois estas colunas de imunoafinidade

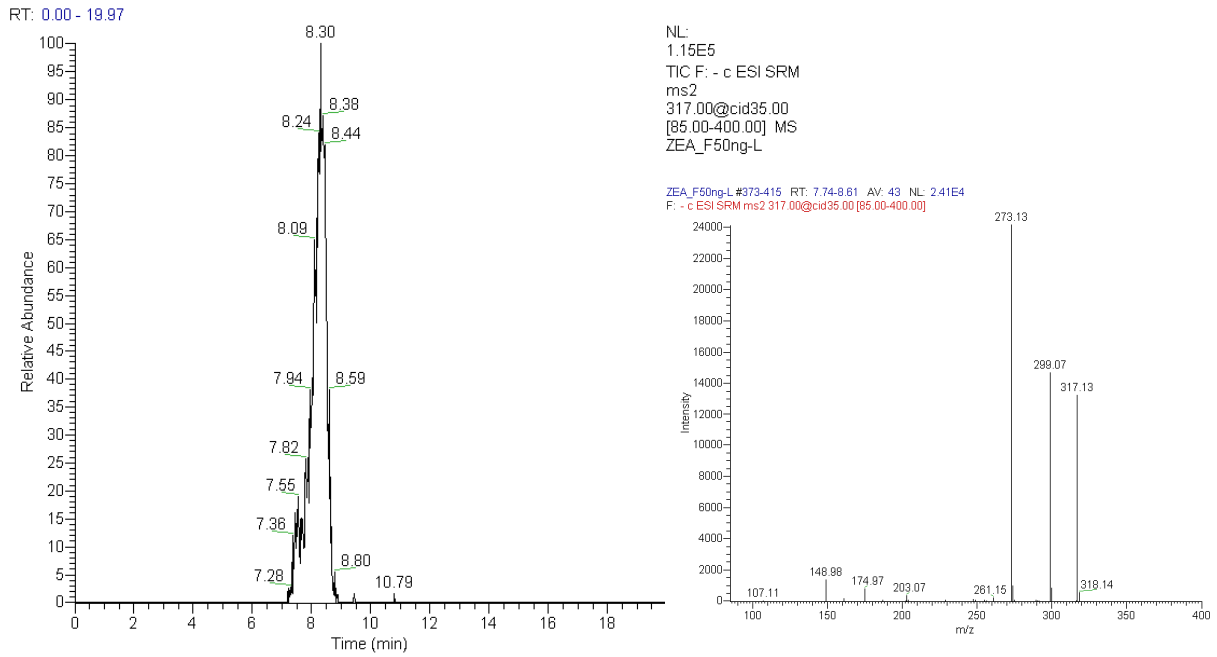
apresentam um diâmetro superior. Com um volume total de eluente de 3 mL, em comparação com o total de 1 mL das colunas IAC convencionais permitiu uma taxa de fluxo superior (VICAM, 2013).

A escolha da detecção por massa em *tandem* (MS/MS) deve-se à sua vantagem na análise da micotoxina, fornecendo informação mais assertiva, com um nível adicional de confirmação da sua identidade, permitindo analisar a fragmentação de ZEA através dos íons específicos, observados no espectro.

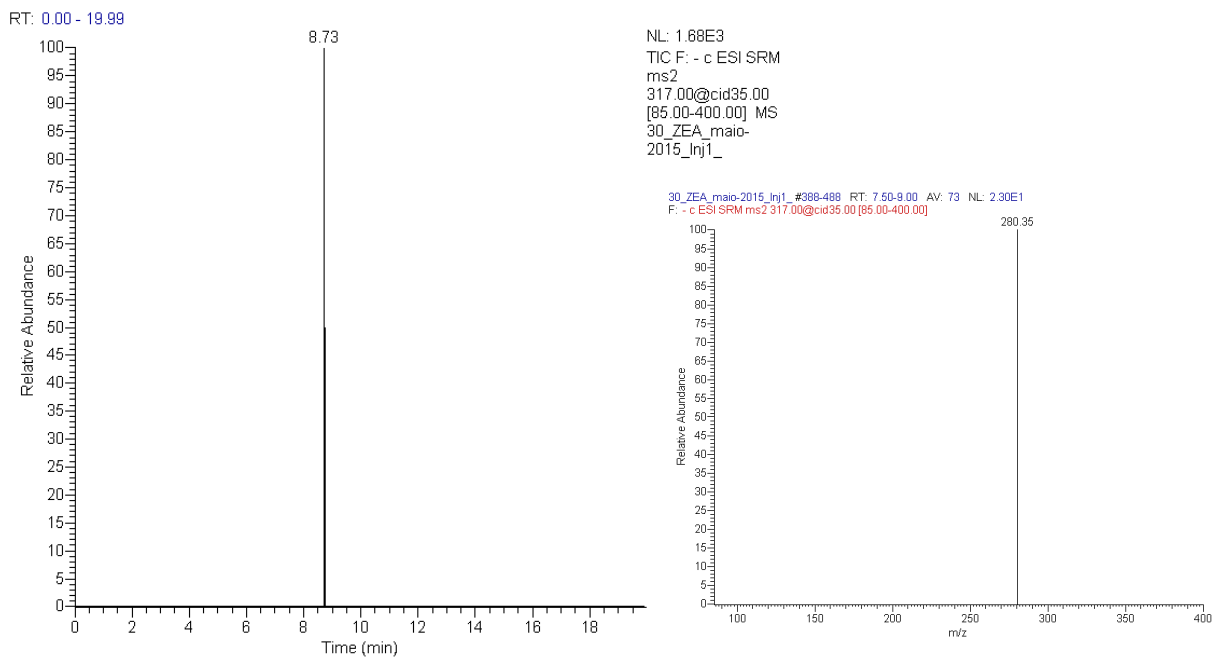
As figuras 9, 10, 11 e 12 representam os cromatogramas e os espectros obtidos por LC-MS/MS de padrão de ZEA, de uma amostra fortificada, de uma amostra em que a ZEA não foi detetada e de uma amostra contaminada.



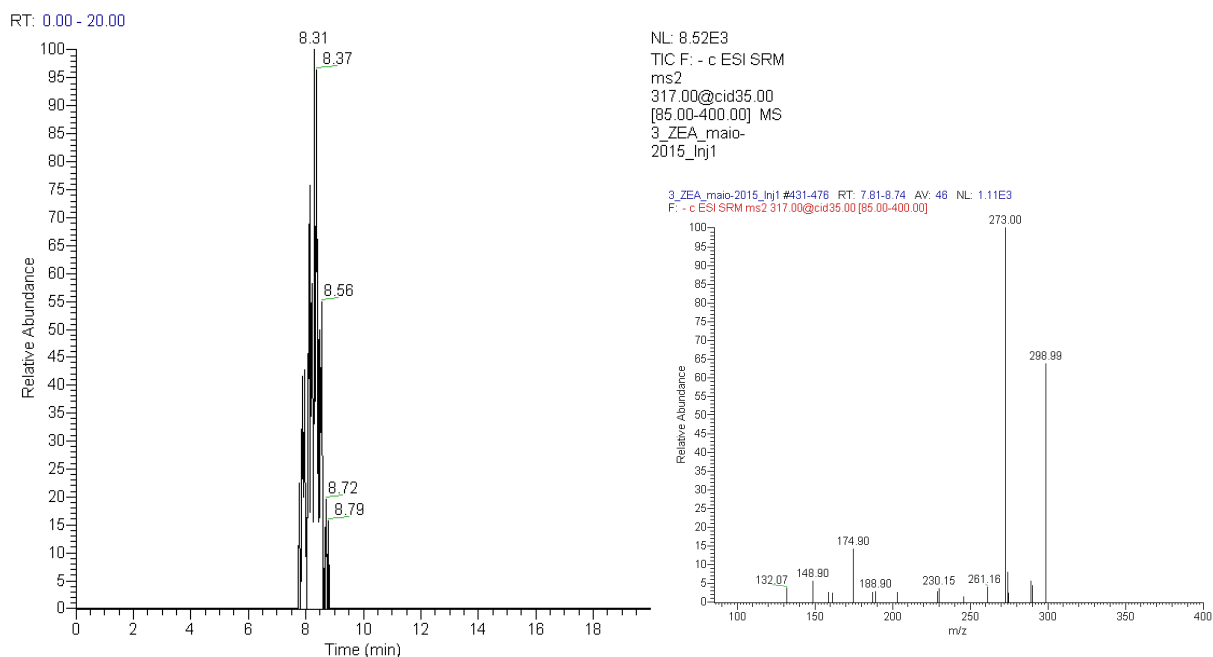
**Figura 9.** Cromatograma e espectro de solução padrão de ZEA (50 ng/mL  $\approx$  1 ng/20  $\mu$ L).



**Figura 10.** Cromatograma e espectro de ZEA numa amostra fortificada a 50 ng/L.



**Figura 11.** Cromatograma e espectro numa amostra em que a ZEA não foi detetada.



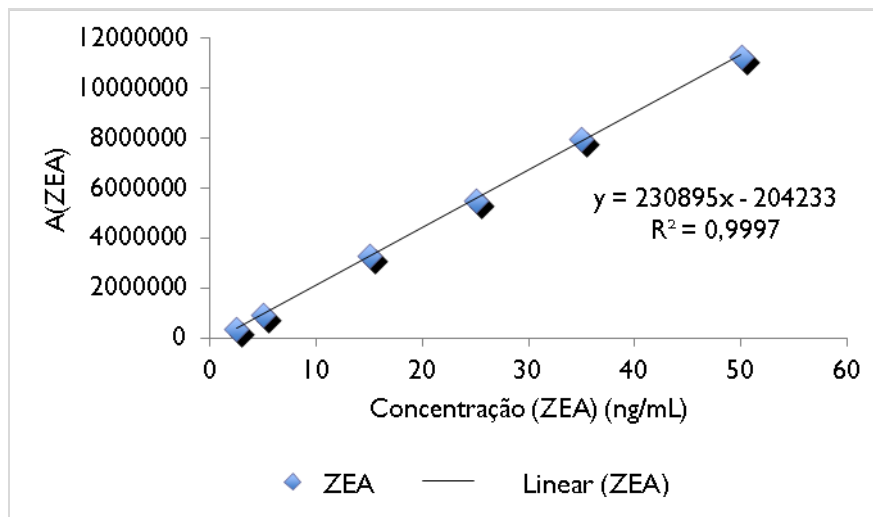
**Figura 12.** Cromatograma e espectro de ZEA numa amostra contaminada.

Importa ainda clarificar que a o espectrómetro de massa híbrido operou em modo de ionização negativa pois o ião carregado negativamente ( $[M-H]^-$ ) de ZEA terá sido encontrado mais abundantemente do que a carga positiva protonada da molécula, à semelhança dos estudos de Dijkman *et al.* (2001) e de Zöllner *et al.* (2000). Este efeito pode ser atribuído, apesar de uma menor fragmentação do ião molecular desprotonado de ZEA em modo de ião negativo, à presença de um grupo fenólico ácido que favorece a desprotonação da molécula na fase gasosa (Laganà *et al.*, 2001).

Para a pesquisa do analito de interesse deu-se a fragmentação e separação ( $m/z$ ), através da desprotonação ( $[M-H]^-$ ), pelo que surgiram o ião precursor e os dois iões produto. O ião produto, específico e intenso, que se revelava mais abundante foi o escolhido para a quantificação, e os dois iões produto secundários foram monitorizados para os ensaios de confirmação.

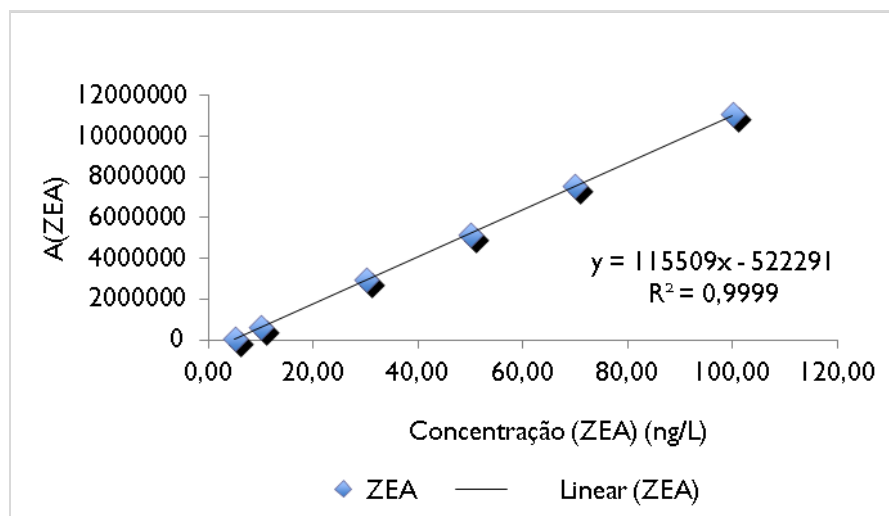
### 2.3.2 Desempenho analítico

A avaliação da linearidade do método foi efetuada recorrendo ao traçado de curvas de calibração. Estas foram obtidas usando o procedimento de regressão linear de mínimos quadrados da área do pico em função da concentração. A linearidade da ZEA em fase móvel foi avaliada com cinco níveis de concentração, entre 2,5 ng/mL e 50 ng/mL. O resultado da avaliação da linearidade foi apropriado, como evidencia o coeficiente de correlação ( $R^2 = 0,9997$ ) (figura 13).



**Figura 13.** Curva de calibração de ZEA em fase móvel.

A curva de calibração preparada na matriz foi obtida com diferentes concentrações de ZEA, preparadas entre 5 e 100 ng/L, sendo o resultado da avaliação da linearidade adequado, como evidenciado pelo coeficiente de correlação ( $R^2 = 0,9999$ ) (figura 14).



**Figura 14.** Curva de calibração de ZEA na matriz.

Como evidenciado pelas curvas de calibração, quer de ZEA em fase móvel quer na matriz, a linearidade do método é adequada. Os coeficientes de correlação obtidos são idênticos ao do estudo de Gromadzka *et al.* (2009).

As curvas de calibração, em fase móvel e com a matriz, foram utilizadas para calcular o efeito de matriz (ME), combinando o declive da calibração na matriz (B) que é dividido pelo declive da calibração do padrão em solvente (A). Assim, a razão  $(B/A \times 100)$  foi definida como o efeito de matriz absoluto (ME %). O valor obtido foi interpretado como se segue: um valor de 100% denota a ausência de efeito de matriz, superior a 100% um aumento do sinal e

abaixo de 100% uma supressão de sinais (Rubert et al., 2011).

O valor do efeito de matriz obtido, 100,05%, pode ser considerado negligenciável.

Relativamente à exatidão, a recuperação foi calculada através da razão entre a quantidade de substância adicionada e a quantidade de substância recuperada (Ahmida et al., 2006), expressa em percentagem. A exatidão do método utilizado foi avaliada por análise de ZEA numa amostra de água superficial fortificada a três níveis diferentes de 10, 50 e 100 ng/L, com três replicados para cada nível (ponto 2.2.3.2.). As recuperações médias variaram entre 85,22% e 100,30% para níveis de fortificação a 10 e 100 ng/L, respetivamente. De acordo com a *Association of Official Analytical Chemists International* (AOAC), as recuperações que variam entre 80 a 100% são aceitáveis, quando os analitos estiverem em concentrações inferiores a 1 µg/kg (AOAC, 1999), dependendo aquelas da matriz, da interação matriz-analito, do processamento da amostra e do nível de fortificação do analito (AOAC, 2002).

A precisão foi avaliada em condições de repetibilidade. A repetibilidade intra-dia variou entre 0,54% e 1,73% para níveis de fortificação de 100 e 10 ng/L, respetivamente. A repetibilidade inter-dia oscilou entre 0,49% e 3,67% para 100 e 10 ng/L, respetivamente (tabela 7). A precisão obtida por este método é adequada.

Adaptando a diretiva CE 401/2006 (CE, 2006), os valores encontrados, tanto para a exatidão como para a precisão, respeitam os requisitos estabelecidos.

**Tabela 7** - Valores relativos à exatidão e à precisão da metodologia analítica para a determinação da ZEA em águas de superfície.

<b>Fortificação (ng/L)</b>	<b>Exatidão (%)</b>	<b>Repetibilidade intra-dia (% RSD)</b>	<b>Repetibilidade inter-dia (% RSD)</b>
<b>10</b>	85,22	1,73	3,67
<b>50</b>	97,58	0,64	0,78
<b>100</b>	100,30	0,54	0,49

RDS-Desvio padrão relativo

O LOD e LOQ, calculados através da curva de calibração na matriz como  $|3.3 Sy/x| / b$  e  $|10 Sy/x| / b$ , respetivamente, onde  $b$  é o declive e  $Sy/x$  é o desvio padrão residual da função linear, foram 1,82 e 5,53 ng/L, respetivamente. Estes valores foram considerados satisfatórios considerando a matriz em análise, pelo que permitem a aplicação deste método a amostras reais, dado serem da mesma ordem de grandeza ou inferiores às concentrações de ZEA



encontradas neste tipo de amostras.

Os LODs descritos na literatura, relativamente à ZEA em águas superficiais, variam entre 0,3 e 0,4 ng/L, nomeadamente para o método de LC-PDA/FLD (Gromadzka *et al.*, 2009) e 0,4 ng/L para o método de LC-FD (Maragos, 2012).

Neste contexto, o LOD encontrado com a metodologia analítica desenvolvida é consistente com alguns dos valores encontrados na literatura científica.

### 2.3.3 Ocorrência de ZEA em águas de superfície

A ocorrência de ZEA em águas vem sendo relatada, embora os dados sejam limitados, pelo que foi oportuno quantificar o nível de contaminação nesta matriz.

No presente estudo, diferentes amostras de água de superfície, obtidas em sete rios e uma ribeira em Portugal continental, em duas épocas, foram alvo de análise com vista a detetar e quantificar ZEA nas mesmas.

Foi avaliado o conteúdo de ZEA em 38 amostras, sendo que 9 destas (23,68%) estavam contaminadas, com teores que oscilaram entre 5,59 e 82,56 ng/L, com teores médios de 16,77 ng/L (tabela 8). Em estudos análogos, tem sido detetada a ocorrência de ZEA em baixas concentrações, na ordem dos ng/L, com teores mínimo e máximo de 0,3 e 43,7 ng/L, respetivamente (Bucheli *et al.*, 2008; Dudziak, 2011; Gromadzka *et al.*, 2009; Hartmann *et al.*, 2007; Laganà *et al.*, 2004; Maragos, 2012; Schenzel, Schwarzenbach e Bucheli, 2010; Ternes, Eggert e Meisenheimer, 2001; Waśkiewicz *et al.*, 2012; Woźny *et al.*, 2013) (tabela 5). Porém, outros estudos revelaram concentrações mais elevadas, entre as quais se destacam as do rio polaco Bogdanka, que variaram entre 1,7 e 43,7 ng/L, nas diferentes estações do ano (Gromadzka *et al.*, 2009), e entre 2,0 e 25,0 ng/L no mesmo rio, segundo o estudo de Waśkiewicz *et al.* (2012). Também na Suíça, as concentrações variaram entre 0,3 e 29,0 ng/L (Schenzel, Schwarzenbach e Bucheli, 2010). Ainda foi detetada por Ternes, Eggert e Meisenheimer (2001), na Alemanha, uma concentração significativamente superior às referidas, até 60 ng/L.

A maioria dos teores de ZEA encontrados em águas de superfície em Portugal apresenta semelhanças nos valores detetados em outros países. No entanto, uma das amostras, especificamente a do rio Xarrama, em Évora, revelou uma concentração considerável de ZEA, ou seja 82,56 ng/L, o valor mais elevado detetado até ao momento.

A incidência de amostras positivas (23,68%), indica que esta micotoxina pode ser um contaminante relativamente frequente na água de superfície. Apesar da sua significativa

ocorrência, os dados sugerem que os níveis de exposição são razoavelmente baixos, embora a concentração encontrada nas nove amostras contaminadas seja superior ao LOQ.

**Tabela 8** - Frequência (%) e teores (ng/L) de ZEA nas amostras de água de superfície.

<b>Localidade (rio)</b>	<b>Número de amostras</b>	<b>Frequência (%)</b>	<b>Min.-Máx. (ng/L)</b>	<b>Média ± SD</b>
<b>Chaves (rio Tâmega)</b>	4	0	nd	-
<b>Cachão (rio Fervença)</b>	4	3 (7,90)	5,87 - 22,30	11,46 ± 9,39
<b>Figueira da Foz (rio Mondego)</b>	4	0	nd	0
<b>Formoselha (rio Mondego)</b>	4	1 (2,63)	5,83	5,83
<b>Coimbra (rio Mondego)</b>	4	1 (2,63)	5,92	5,92
<b>Frielas (rio Trancão)</b>	3	1 (2,63)	5,96	5,96
<b>Évora (rio Xarrama)</b>	4	1 (2,63)	82,56	82,56
<b>Reguengos de Monsaraz (ribeira de Álamo)</b>	4	0	nd	0
<b>Vila Real de Santo António (rio Guadiana)</b>	4	0	nd	0
<b>Sacavém - rio Trancão</b>	2	1 (2,63)	nd-5,59	5,59
<b>Vila Nova da Barca - rio Arunca</b>	1	1 (2,63)	10,69	10,69
<b>Total</b>	<b>38</b>	<b>9 (23,68)</b>	<b>5,59-82,56</b>	<b>16,77</b>

Tendo as colheitas sido realizadas em dois períodos, setembro a novembro de 2014 (outono) e fevereiro a abril de 2015 (primavera), constatou-se que o maior número de amostras contaminadas foi detetado no segundo período, 35% vs 11,1%, bem como com níveis médios mais elevados, 19,8 vs 6,0 ng/L (tabela 9). No entanto não foram encontradas diferenças significativas entre os dois períodos,  $P=0,09$ .

**Tabela 9** - Frequência (%) e teores (ng/L) de ZEA, por época, em águas de superfície.

Época	Amostragem	Frequência (%)	Variação (ng/L)	Média ± SD (ng/L)
set. - nov. 2014	18	2 (11,1)	nd-6,22	6,0 ± 0,2
fev. - abril 2015	20	7 (35)	nd-82,56	19,8 ± 28,3
<b>Total</b>	<b>38</b>	<b>9 (23,7)</b>	<b>nd-82,56</b>	<b>16,8 ± 25,3</b>

O teor de micotoxinas na primavera é provavelmente resultado da combinação do desgaste e degradação parcial dos resíduos dos campos agrícolas e a produção de fungos toxigênicos sobre estes resíduos até que as temperaturas desçam com o início do inverno (Kolpin *et al.*, 2010).

Considerando que as colheitas de cereais, nomeadamente milho, a cultura que apresenta maiores concentrações registadas de ZEA (Pleadin *et al.*, 2012; Hadiani *et al.*, 2003), são efetuadas nos meses de outubro e novembro, e constatando que é a cultura dominante em redor de alguns rios, pode eventualmente considerar-se que esta contaminação decorre de uma maior afluência de fungos do género *Fusarium*, numa fase posterior à colheita do cereal. Esta situação pode ser corroborada pelos estudos de Gromadzka *et al.* (2009) e Waśkiewicz *et al.* (2012). A influência dos fatores de crescimento deste género de fungos, nomeadamente pelas condições climatéricas propícias ao seu desenvolvimento, contribui para um crescimento fúngico mais significativo, o qual certamente é drenado dos campos infetados para os rios envolventes.

Tendo a amostragem sido realizada a montante das ETARs, estas não terão tido influência nos resultados obtidos, uma vez que a influência da excreção humana está ausente.

De acordo com os dados da associação nacional dos produtores de milho e de sorgo, o milho constitui, no contexto agrícola português, a mais importante cultura arvense, e é destacadamente a que mais explorações agrícolas envolve, estimando-se que a área cultivada ocupa cerca de 170.000 hectares, de Norte a Sul do país (Anpromis, 2015). No conjunto dos cereais, o milho tem vindo a acentuar o seu papel de liderança, representando atualmente cerca de 40% do total dos cereais (Agronegócios, 2015).

A área de milho cultivada no Alentejo revela um forte crescimento, mais de 50% (Anpromis, 2014), fator que poderá ter contribuído para a elevada concentração de ZEA encontrada na amostra recolhida no rio Xarrama, em Évora.

O escoamento de ZEA de campos agrícolas ou locais de armazenagem previamente contaminados, como investigado nos estudos de Hartmann *et al.* (2007, 2008a) e de Bucheli *et al.* (2008), demonstrou ser uma importante fonte de contaminação em áreas agrícolas, sendo certamente a principal fonte.

Nos dois períodos assinalados, para cada local terão sido efetuadas colheitas em dias consecutivos. Pelos resultados obtidos pode-se inferir que a concentração de ZEA em água de superfície depende do local e do mês/dia. Os teores variam consideravelmente, em dias consecutivos, o que pode ser consequência do elevado fluxo e fatores de diluição. Como demonstrado por Waśkiewicz *et al.* (2012), a ZEA é transportada pela chuva, dependendo essencialmente da intensidade de ocorrência de fungos patogénicos numa dada área.

Pode presumir-se que as concentrações ZEA aumentam rapidamente em ambientes que suportam o crescimento dos fungos, bem como na presença de fatores de *stress* (Gajęcka *et al.*, 2011). Permanece a dúvida se o aumento da contaminação decorre da diluição da água superficial e de drenagem, proveniente das áreas adjacentes, da sorção eficiente bem como da percolação de ZEA no solo ou simplesmente de diferentes períodos de investigação.

Relativamente às amostras em que a ZEA não foi detetada, nomeadamente no primeiro período de colheita, podem considerar-se as reduzidas taxas de infeção por fungos do género *Fusarium*, possivelmente devido ao clima seco no mês de setembro e portanto, pouca produção de ZEA.

Embora os resultados deste estudo denotem que a concentração de ZEA em água de superfície não é significativamente elevada, tal exposição pode ser perigosa, devido à acumulação de micotoxinas potenciais, nomeadamente se a água contaminada for utilizada na produção de alimentos para seres humanos e animais (Gromadzka *et al.*, 2009; Russell e Paterson, 2007). Ou seja, além do potencial risco ecotoxicológico, a ZEA também representa possível perigo nutricional e de saúde.

Efetivamente, na União Europeia apenas existem limites máximos estabelecidos para ZEA em alguns produtos alimentares. A legislação atual não inclui limites para a ocorrência de ZEA em águas, pois a transmissão é efetuada de forma limitada. No entanto, devem ser consideradas as concentrações identificadas pois, na possibilidade de coocorrência de ZEA com outras micotoxinas, poderá ser uma fonte de preocupação no que diz respeito à toxicidade, quer para a biota aquática quer para a saúde humana.

A identificação de ZEA em águas superficiais deve motivar a novas investigações com vista à identificação de potenciais fontes de contaminação, bem como à sua monitorização, para uma avaliação precisa da sua variabilidade e das rotas de migração sazonal para as águas.

## CONCLUSÃO

Existindo cada vez mais consciência da importância dos fungos em água, considerou-se essencial determinar a concentração de ZEA em águas de superfície.

A extração/purificação das amostras efetuadas com recurso à filtração e a colunas IAC, bem como a deteção e quantificação por LC-MS/MS, permitiram alcançar baixos limites de deteção e de quantificação. Esta metodologia analítica proporcionou bons resultados em termos de linearidade, exatidão e precisão demonstrando que é adequada para a determinação de ZEA em águas de superfície.

O estudo destaca que das 38 amostras de águas de superfície, colhidas em rios em Portugal, 23,68% das amostras estavam contaminadas, tendo a amostra do rio Xarrama, em Évora, apresentado uma concentração considerável de ZEA, 82,56 ng/L, o valor mais elevado encontrado até ao momento. A concentração mais elevada de ZEA foi detetada no segundo período de amostragem, de fevereiro a abril de 2015 (primavera), não tendo sido verificada diferença significativa entre os dois períodos,  $P=0,09$ , o que sugere que a ZEA resulta da drenagem e escoamento agrícola, devido à infestação dos resíduos das culturas, nomeadamente de milho, no solo e conseqüentemente nas águas de rio.

Os resultados sugerem que a exposição a ZEA através das águas de superfície é provavelmente muito baixa em relação à exposição potencial a partir de alimentos. Sob certas circunstâncias, no entanto, os níveis podem ser relevantes para a vida aquática, especialmente em ambientes nos quais as concentrações ZEA podem atingir teores fisiologicamente relevantes. A ocorrência de ZEA e o seu destino e comportamento nas águas de superfície, embora seja na ordem dos nanogramas por litro, poderá representar risco ecotoxicológico, pelo que deve ser continuada a investigação desta micotoxina.

Considerando o estudo desenvolvido seria importante clarificar a ocorrência espacial e temporal deste contaminante natural, avaliar os potenciais impactos cumulativos de tal composto isoladamente ou em combinação com outros contaminantes, bem como a sua presença potencial em fontes de água potável.

A investigação a desenvolver no futuro deve conduzir à elaboração e implementação de um legislação adequada, que regule as concentrações máximas permitidas de ZEA na água, com vista a melhorar a segurança alimentar.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRONEGÓCIOS (2015) - Cerealicultura: A produção de milho em Portugal. [Acedido a 17 de junho de 2015]. Disponível na Internet: <http://www.agronegocios.eu/noticias/a-producao-de-milho-em-portugal/>

AHMIDA, H.S.M., BERTUCCI, P., FRANZÒ, L., MASSOUD, R., CORTESE, C., LALA, A., FREDERICI, G. - Simultaneous determination of plasmatic phytosterols and cholesterol precursors using gas chromatography - mass spectrometry (GC-MS) with selective ion monitoring (SIM). *Journal of Chromatography B*. 842 (2006), 43-47.

ALJICEVIC, M., BESLAGIC, E., ZVIZDIC, S., HAMZIC, S., REBIC, V. - Mycotoxins. *HealthMED Journal*. 2, 3 (2008), 176-182.

ALLDRICK, A.J. - Zearalenone. In: MAGAN, N., OLSEN, M. *Mycotoxins in food - Detection and control*. Cambridge: CRC Press - Woodhead Publishing Limited. (2000), ISBN 0-8493-2557-9. p. 353-366.

ANH TUAN, N., GRIZZLE, J.M., LOVELL, R.T., MANNING, B.B., ROTTINGHAUS G.E. - Growth and hepatic lesions of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fed diets containing aflatoxin B1. *Aquaculture*. 212 (2002), 311-319.

ANPROMIS (2014) - Agroglobal 2014: A Produção de Milho em Portugal e as Dinâmicas de Mercado. Painel com apresentação de Carlos Pedro Trindade no âmbito da Agroglobal 2014. [Acedido a 23 de junho de 2015]. Disponível na Internet: <http://www.anpromis.pt/images/eventos/FeiraMilho/cptrindade.pdf>

ANPROMIS (2015) - O milho. [Acedido a 23 de junho de 2015]. Disponível na Internet: <http://www.anpromis.pt/o-milho.html>

AOAC (1999) - Guidelines for single-laboratory validation of analytical methods for trace-level concentrations of organic chemicals, AOAC: Washington.

AOAC (2002) - AOAC Guidelines for Single Laboratory Validation of Chemical Methods for Dietary Supplements and Botanicals, Arlington, VA. [Acedido a 24 de Junho de 2015]. Disponível na Internet: [http://www.aoac.org/Official\\_Methods/slv\\_guidelines.pdf](http://www.aoac.org/Official_Methods/slv_guidelines.pdf)

ARUKWE, A., GROTMOL, T., HAUGEN, T.B., KNUDSEN, F.R., GOKSOYR, A. - Fish model for assessing the in vivo estrogenic potency of the mycotoxin zearalenone and its metabolites. *Science of the Total Environment*. 236 (1999), 153-161.



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*. 41, (2003), 1283-1290.

BAKOS, K., KOVÁCS, R., STASZNY, A., SIPOS, D.K., URBÁNYI B., MÜLLER F., CSENKI, Z., KOVÁCS, B. - Developmental toxicity and estrogenic potency of zearalenone in zebrafish (*Danio rerio*). *Aquatic Toxicology*. 136-137 (2013), 13-21.

BANDERA, E.V., CHANDRAN, U., BUCKLEY, B., LIN, Y., ISUKAPALLI, S., MARSHALL, I., KING, M., ZARBL, H. - Urinary mycoestrogens, body size and breast development in New Jersey girls. *Science of the Total Environment*. 409 (2011), 5221-5227.

BEKER-VAN WOUDEBERG, A.R., VAN TOL, H.T., ROELEN, B.A., COLENBRANDER, B., BEVERS, M.M. - Estradiol and its membrane-impermeable conjugate (estradiol-bovine serum albumin) during *in vitro* maturation of bovine oocytes: effects on nuclear and cytoplasmic maturation, cytoskeleton, and embryo quality. *Biology of Reproduction*. 70 (2004), 1465-1474.

BENNETT, J., KLICH, M. - Mycotoxins-Clinical Microbiology Review. 16, 3 (2003), 497-516.

BEREK, L., PETRI, I.B., MESTERHAZY, A., TEREN, J., MOLANR, J., - Effects of mycotoxins on human immune functions *in vitro*. *Toxicology In vitro*. 15 (2001), 25-30.

BERNHOF, A., CLASEN, P.E., KRISTOFFERSEN, A,B, TORP, M. - Less *Fusarium* infestation and mycotoxin contamination in organic than in conventional cereals. *Food Additives & Contaminants - Part A*. 27 (2010), 842-852.

BHAT, R., RAI, R., KARIM, A. - Mycotoxins in Food and Feed: Present Status and Future Concerns. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 9, 1 (2010), 57- 82.

BHATNAGAR, D., YU, J., EHRLICH, K.C. - Toxins of filamentous fungi [Abstract]. *Chemical Immunology*. 81 (2002), 167-206.

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*. 121 (1993),152-159.

BORIES, G.F., PERDU-DURAND, E.F., SUTRA, J.F., TULLIEZ, J.E. - Evidence for glucuronidation and sulfation of zearanol and metabolites (taleralanol and zearalanone) by rat and pig hepatic subfractions. *Drug Metabolism and Disposition*. 19 (1991), 140-143.

BRAVIN, F., DUCA, R.C., BALAGUER, P., DELAFORGE, M. - *In vitro* cytochrome p450 formation of a monohydroxylated metabolite of zearalenone exhibiting estrogenic activities:

possible occurrence of this metabolite in vivo. International Journal of Molecular Sciences. 10 (2009), 1824-1837.

BRESSOLLE, F., BROMET-PETIT, M., AUDRAN, M. - Validation of liquid chromatographic and gas chromatographic methods: Applications to pharmacokinetics. Journal of Chromatography B. 686 (1996), 3-10.

BUCHELI, T.D., ERBS, M., HARTMANN, N., VOGELGSANG, S., WETTSTEIN, F.E., FORRER, H.R. - Estrogenic mycotoxins in the environment. Mitteilungen aus Lebensmitteluntersuchung und Hygiene. 96 (2005), 386-403.

BUCHELI, T.D., WETTSTEIN, F.E., HARTMANN, N., ERBS, M., VOGELGSANG, S., FORRER, H.R., SCHWARZENBACH, R.P. - *Fusarium* mycotoxins: Overlooked aquatic micropollutants? Journal of Agricultural and Food Chemistry. 56 (2008), 1029-1034.

CARDENAS, H., BURKE, K.A., BIGSBY, R.M., POPE, W.F., NEPHEW, K.P. - Estrogen receptor beta in the sheep ovary during the estrous cycle and early pregnancy. Biology of Reproduction. 65 (2001), 128-134.

CAST - Council for Agricultural Science and Technology - Mycotoxins: Risk in Plant, Animal and Human Systems. Ames: Council for Agricultural Science and Technology, Task force report, (2003a), ISSN: 0194-4088. p. 139-199.

CAST - Council for Agricultural Science and Technology - Mycotoxins: Risks in plant, animal, and human system. Ames: Council for Agricultural Science and Technology, Task force report, (2003b), ISSN: 0194-4088. p. 48-58.

CAVRET, S., LECOEUR, S. - Fusariotoxin transfer in animal. Food and Chemical Toxicology. 44, (2006), 444-453.

CELIUS, T., HAUGEN, T.B., GROTMOL, T., WALTHER, B.T. - A sensitive zogenetic assay for rapid *in vitro* assessment of estrogenic potency of xenobiotics and mycotoxins. Environmental Health Perspectives. 107 (1999), 63-68.

CHAMPEIL, A., FOURBET, J.F., DORE, T., ROSSIGNOL, L. - Influence of cropping system of *Fusarium* head blight and mycotoxin levels in winter wheat. Crop Protection. 23 (2004), 531-537.

CHEN, H., HU, J., YANG, J., WANG, Y., XU, H., JIANG, Q., GONG, Y., GU, Y., SONG, H. - Generation of a fluorescent transgenic zebrafish for detection of environmental estrogens. Aquatic Toxicology. 96 (2010), 53-61.

CIGIĆ I.K., PROSEN, H. - An Overview of Conventional and Emerging Analytical Methods for the Determination of Mycotoxins. *International Journal of Molecular Sciences*. 10, 1 (2009), 62-115.

COE, J., ISHAK, K.G., WARD, J.M., ROSS, M.J. - Tamoxifen prevents induction of hepatic neoplasia by zearanol, an estrogenic food contaminant. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 89 (1992), 1085-1089.

COLDHAM, N.G., DAVE, M., SIVAPATHASUNDARAM, S., MCDONNELL, D.P., CONNOR C., SAUER M.J. - Evaluation of a recombinant yeast cell estrogen screening assay. *Environmental Health Perspectives*. 105 (1997), 734-742.

COLE, R.J., COX, R.M. - In: *Handbook of Toxic Fungal Metabolites*. New York: Academic Press. (1981), 937.

ČONKOVÁ, E., LACIAKOVÁ, A., PÁSTOROVÁ, B., SEIDEL, H., KOVÁČ, G. - The effect of zearalenone on some enzymatic parameters in rabbits. *Toxicology Letters*. 121 (2001), 145-149.

D'MELLO, J.P.F., PLACINTA, C.M., MACDONALD, A.M.C. - *Fusarium* mycotoxins: a review of global implications for animal health, welfare and productivity. *Animal Feed Science and Technology*. 80 (1999), 183-205.

DÄNICKE, S., SWIECH, E., BURACZEWSKA, L., UEBERSCHÄR, K.H. - Kinetics and metabolism of zearalenone in young female pigs. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*. 89 (2005), 268-276.

DENG, F., TAO, F.B., LIU, D.Y., XU, Y.Y., HAO, J.H., SUN, Y., SU, P.Y. - Effects of growth environments and two environmental endocrine disruptors on children with idiopathic precocious puberty. *European Journal of Endocrinology*. 166 (2012), 803-809.

DIEKMAN, M.A., GREEN, M.L. - Mycotoxins and reproduction in domestic livestock. *Journal of Animal Science*. 70 (1992), 1615-1627.

DIJKMAN, E., MOOIBROEK, D., HOOGERBRUGGE, R., HOGENDOORN, E., SANCHO, J.V., POZO, O., HERNANDEZ, F. - Study of matrix effects on the direct trace analysis of acidic pesticides in water using various liquid chromatographic modes coupled to tandem mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography A*. 926 (2001), 113-125.

DIXON, B. - *Power Unseen, How Microbes Rule the World*, Oxford University Press. 124 (1998), 165-68.

DUDZIAK, M. - Analysis of zearalenone in aqueous environment using GC-MS. Polish Journal of Environmental Studies. 20, 1 (2011), 231-235.

EFSA - European Food Safety Authority - Scientific Opinion on the risks for public health related to the presence of zearalenone in food, EFSA Journal. 9, 6 (2011), 2197.

EFSA - European Food Safety Authority - Scientific Opinion on the hazard assessment of endocrine disruptors: scientific criteria for identification of endocrine disruptors and appropriateness of existing test methods for assessing effects mediated by these substances on human health and the environment. EFSA Journal. 11, (2013), 3132.

EL GOLLI-BENNOUR, E., BACHA, H. - Hsp70 expression as biomarkers of oxidative stress: Mycotoxins' exploration. Toxicology. 287 (2011), 1-7.

ERIKSEN, G.S., ALEXANDER J. In: Nordic Council of Ministers (Ed.), *Fusarium Toxins in Cereals - a risk assessment*, Tema Nord, Copenhagen. 502 (1998), 7-58.

ERIKSEN, G.S., PENNINGTON, J., SCHLATTER, J., ALEXANDER, J., THUVANDER, A. - Zearalenone. In: *Safety Evaluation of Certain Food Additives and Contaminants*, (ed. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives), WHO Food Additives Series. 44 (2000).

ETIENNE, M., DOURMAD, J.Y. - Effects of zearalenone or glucosinolates in the diet on reproduction in sows: a review. *Livestock Production Science*. (1994), 99-113.

EUROPEAN COMMISSION - Commission Regulation (EC) No 401/2006 of 23 February 2006 laying down the methods of sampling and analysis for the official control of the levels of mycotoxins in foodstuffs. *Official Journal of the European Union*. L70 (2006), 12-34.

FICHEUX, A.S., SIBIRIL, Y., PARENT-MASSIN, D. - Co-exposure of *Fusarium* mycotoxins: *In vitro* myelotoxicity assessment on human hematopoietic progenitors. *Toxicol.* 60, 6 (2012), 1171-1179.

FINK-GREMMELS, J., MALEKINEJAD, H. - Review: Clinical effects and biochemical mechanisms associated with exposure to the mycoestrogen zearalenone. *Animal Feed Science and Technology*. 137 (2007), 326-341.

FITZPATRICK, D., ARBUCKLE, L., HASSEN, A. - Zearalenone metabolism and excretion in the rat: Effect of different doses. *Journal of Environmental Science and Health*. 23 (1988), 343-354.

FONSECA, A.F. - Mycotoxins - Morbid Effects and occurrence in foods. Introductory Advanced Course and Practicals in Public Health Microbiology of Food and Drinking Water. (2001), 17-22.

FRIZZELL, C., NDOSSI, D., VERHAEGEN, S., DAHL, E., ERICKSEN, G., SØRLIE, M., ROPSTAD, E., MULLER, M., ELLIOTT, C.T., CONNOLLY, L. - Endocrine disrupting effects of zearalenone, alpha- and beta-zearalenol at the level of nuclear receptor binding and steroidogenesis. *Toxicology Letters*. 206 (2011), 210-217.

GAJĘCKA, M., ZIELONKA, U., DĄBROWSKI, M., GAJĘCKI, M. - Threats resulting from the presence of zearalenone in water. *Medycyna Weterynaryjna*. 67 (2011), 643-646.

GAJĘCKI, M., PRZYBYŁOWICZ, M., ZIELONKA, L., ZWIERZCHOWSKI, W., OBREMSKI, K., SKORSKA-WYSZYŃSKA, E., GAJĘCKA, M., POLAK, M., JAKIMIUK, E. - Preliminary results of monitoring research on zearalenone presence in blood of women with neoplastic lesions in reproductive system. *Polish Journal of Veterinary Sciences*. 7 (2004), 153-156.

GAUMY, J.L., BAILLY, J.D., BURGAT, V., GUERRE, P. - Zéaralénone: propriétés et toxicité expérimentale. *Revue de Médecine Vétérinaire*. 152 (2001), 219-234.

GEORGIANNA, D.R., PAYNE, G.A. - Genetic regulation of aflatoxin biosynthesis: from gene to genome. *Fungal Genetics and Biology*. 46, 2 (2009), 113-125.

GLENN, A.E. - Mycotoxigenic *Fusarium* species in animal feed. *Animal Feed Science and Technology*. 137 (2007), 199-200.

GONÇALEZ, E., FELICIO, J.D., PINTO, M.M., ROSSI, M.H., NOGUEIRA, J. H. C., MANGINELLI, S. - Ocorrência de aflatoxina M1 em leite comercializado em alguns municípios do estado de São Paulo. *Arquivos do Instituto de Biologia*. 72, 4 (2005), 435-438.

GONÇALVES, A.B., RUSSELL, R., PATERSON, M., LIMA, N. - Survey and significance of filamentous fungi from tap water. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*. 209 (2006), 257-264.

GOSWAMI, R.S., KISTLER, H.C. - Heading for disaster: *Fusarium graminearum* on cereal crops. *Molecular Plant Pathology*. 5 (2004), 515-525.

GROMADZKA, K., WAŚKIEWICZ, A., GOLIŃSKI, P., ŚWIETLIK, J. - Occurrence of estrogenic mycotoxin-Zearalenone in aqueous environmental samples with various NOM content. *Water Research*. 43 (2009), 1051-1059.

HADIANI, M.R., YAZDANPANA, H., GHAZI-KHANSARI, M., CHERAGHALI, A.M., GOODARZI, M. - Survey of the natural occurrence of zearalenone in maize from

northern Iran by thin-layer chromatography densitometry. *Food Additives and Contaminants*. 20 (2003), 380-385.

HAGESKAL, G., GAUSTAD, P., HEIER, B.T., SKAAR, I. - Occurrence of moulds in drinking water. *The Society for Applied Microbiology. Journal of Applied Microbiology*. 102 (2007), 774-780.

HAGLER, W.M., TOWERS JUNIOR, N.R., MIROCHA, C.J., EPPLEY, R.M., BRYDEN, W.L. - Zearalenone: mycotoxin or mycoestrogen? In: SUMMERELL, B.A., LESLIE, J.F., BACKHOUSE, D., BRYDEN, W.L., BURGESS, L. W. (Ed.) *Fusarium*. St. Paul: APS Press. (2001), 321-331.

HARTMANN, N., ERBS, M., FORRER, H.R., VOGELGSANG, S., WETTSTEIN, F.E., SCHWARZENBACH, R., BUCHELI, T.D. - Occurrence of zearalenone on *Fusarium graminearum* infected wheat and maize fields in crop organs, soil and drainage water. *Environmental Science and Technology*. 42 (2008a), 5455-5460.

HARTMANN, N., ERBS, M., WETTSTEIN, F. E., HOERGER, C. C., VOGELGSANG, S., FORRER, H. R., SCHWARZENBACH, R. P., BUCHELI, T.D. - Environmental exposure to estrogenic and other mycoand phytotoxins. *Chimia*. 62, 5 (2008b), 364-367.

HARTMANN, N., ERBS, M., WETTSTEIN, F.E., SCHWARZENBACH, R.P., BUCHELI, T.D. - Quantification of estrogenic mycotoxins at the ng/L level in aqueous environmental samples using deuterated internal standards. *Journal of Chromatography A*. 1138 (2007), 132-140.

HUSSEIN, S.H., BRASEL, J.M. - Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. *Toxicology*. 167 (2001), 101-134.

IARC - IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans. Some Naturally Occurring Substances: Heterocyclic Aromatic Amines and Mycotoxins, Lyon. 56 (1993), 397-444.

IARC, - Overall evaluations of carcinogenicity to humans. International Agency for Research on Cancer. IARC Monographs. 1-73 (1999), 1-36.

ICH (2005) - International Conference on Harmonization: Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use. ICH Q2 (R1): Text on Validation of Analytical Procedures.

IKONOMOU, M.G., SHENG-SUAN, C., FERNANDEZ, M.P., BLAIR, J.D., FISCHER, M. - Ultra-trace analysis of multiple endocrine-disrupting chemicals in municipal and bleached

Kraft mill effluents using gas chromatography-highresolution mass spectrometry. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 27 (2008), 243-251.

INFOESCOLA - [Acedido a 28 de maio de 2015]. Disponível na internet: <http://www.infoescola.com/wp-content/uploads/2009/08/full-I-f739dcf681.jpg>

JECFA. - Safety evaluation of certain food additives and contaminants. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Geneva: World Health Organization; Fifty-sixth meeting, 2001.

JOHNS, S.M., DENSLOW, N.D., KANE, M.D., WATANABE, K.H., ORLANDO, E.F., SEPÚLVEDA, M.S. - Effects of estrogens and antiestrogens on gene expression of fathead minnow (*Pimephales promelas*) early life stages. *Environmental Toxicology*. 26, 2 (2011), 195-206.

KATZ, S.E., SIEWERSKI, M. - Drug residue analysis using immunoaffinity chromatography. *Journal of Chromatography*. 642 (1992), 403-409.

KELES, O., CANDAN, A., BAKIREL, T., KARATAS, S. - The investigation of the anabolic efficiency and effect on the nonspecific immune system of zeranol in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*. 26 (2002), 925-931.

KELLEY, J., KINSEY, G., PATERSON, R., BRAYFORD, D., PITCHERS, R., ROSSMOORE, H. - Identification and control of fungi in distribution systems, Awwa Research Foundation. (2003).

KNOWMYCOTOXINS (2008) - Nutritionist: What are mycotoxins?. [Acedido a 20 de maio de 2015]. Disponível na Internet: <http://www.knowmycotoxins.com/npoultry.htm>

KOLPIN, D.K., SCHENZEL, J., MEYER, M.T., PHILLIPS, P.J., HUBBARD, L.E., SCOTT, T., BUCHELI, T.D. - Mycotoxins: Diffuse and point source contributions of natural contaminants of emerging concern to streams. *Science of the Total Environment*. 470-471 (2014), 669-676.

KOLPIN, D.W., HOERGER, C.C., MEYER, M.T., WETTSTEIN, F.E., HUBBARD, L.E., BUCHELI, T.D. - Phytoestrogens and mycotoxins in Iowa streams: an examination of underinvestigated compounds in agricultural basins. *Journal of Environmental Quality*. 39 (2010), 2089-2099.

KROGH, P. - "Mycotoxins in Food", Ed. Palle Krogh, Ed. Academic Press, UK. (1987), 1-96.

KRSKA, R., JOSEPHS, R., - The state-of-the-art in the analysis of estrogenic mycotoxins in cereals. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*. 369 (2001), 469.

KUIPER, G.J., LEMMEN, J.G., CARLSSON, B., CORTON, C., SAFE, S.H., VAN DER SAAG, P.T. - Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor  $\beta$ . *Endocrinology*. 139 (1998), 4252-4263.

KUIPER-GOODMAN, T., SCOTT, P.M., WATANABE, H. - Risk assessment of the mycotoxin zearalenone. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 7 (1987), 253-306.

LAGANÀ, A., BACALONI, A., DE LEVA, I., FABERI, A., FAGO, G., MARINO, A. - Analytical methodologies for determining the occurrence of endocrine disrupting chemicals in sewage treatment plants and natural waters. *Analytica Chimica Acta*. 501 (2004), 79-88.

LAGANÀ, A., FAGO, G., MARINO, A., SANTARELLI, D. - Development of an analytical system for the simultaneous determination of anabolic macrocyclic lactones in aquatic environmental samples. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 15 (2001), 304-310.

LAVOIE, H.A., DESIMONE, D.C., GILLIO-MEINA, C., HUI, Y.Y. - Cloning and characterization of porcine ovarian estrogen receptor beta isoforms. *Biology of Reproduction*. 66 (2002), 616-623.

LE GUEVEL, R., PAKDEL, F. - Assessment of oestrogenic potency of chemicals used as growth promoter by *in vitro* methods. *Human Reproduction*. 16 (2001), 1030-1036.

Leffers, H., Haesby, M., Vendelbo, B., Skakkebaek, N.E., Jorgensen, M. - Oestrogenic potencies of zeranol, oestradiol, diethylstilbestrol, bisphenol-A and genistein: implications for exposure assessment of potential endocrine disrupters. *Human Reproduction*. 16 (2001), 1662-1670.

LEI n° 58/2005 de 29 de dezembro. Diário da República - I Série - N°249, 29 de dezembro de 2005.

LEITE, C., GARDA-BUFFON, J., FAGUNDES, C., BADIALE-FURLONG, E. - Análises quali e quantitativas de micotoxinas em águas da cadeia produtiva do arroz por ccd e ccda. *Química Nova*. 35, 10 (2012), 1955-1960.

LEMKE, S.L., GRANT, P.G., PHILLIPS, T.D. - Adsorption of zearalenone by organophilic montmorillonite clay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 46 (1998), 3789-3796.

LI, Y., BURNS, K.A., ARAO, Y., LUH, C.J., KORACH, K.S. - Differential estrogenic actions of endocrine-disrupting chemicals bisphenol A, bisphenol AF, and zearalenone through estrogen receptor  $\alpha$  and  $\beta$  *in vitro*. *Environmental Health Perspectives*. 120 (2012), 1029-1035.



LIOI, M.B., SANTORO, A., BARBIERI, R., SALZANO, URSINI, M.V. - Ochratoxin and zearalenone: a comparative study on genotoxic effects and cell death induced in bovine lymphocytes. *Mutation Research*. 557 (2004), 19-24.

LLORENS, A., MATEO, R., MATEO, J.J., JIMENEZ, M., - Comparison of extraction and clean-up procedures for analysis of zearalenone in corn, rice and wheat grains by high-performance liquid chromatography with photodiode array and fluorescence detection. *Food Additives & Contaminants*. 19 (2002), 272.

LUNDGREN, M.S., NOVAK, P.J. - Quantification of phytoestrogens in industrial waste streams. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 28 (2009), 2318-2323.

MAAROUFI, K., CHEKIR, L., CREPPY, E.E., ELLOUZ, F., BACHA, H. - Zearalenone induces modifications in haematological and biochemical parameters in rats. *Toxicol.* 34 (1996), 534-540.

MADGWICK, J.W., WEST, J.S., WHITE, R.P., SEMENOV, M.A., TOWNSEND, J.A., TURNER, J.A., FITT, B.D.L. - Impacts of climate change on wheat anthesis and *Fusarium* ear blight in the UK. *European Journal of Plant Pathology*. 130, 1 (2011), 117-131.

MALEKINEJAD, H., MAAS-BAKKER, R., FINK-GREMMELS, J. - Bioactivation of zearalenone by porcine hepatic biotransformation. *Veterinary Research*. 36 (2005), 799-810.

MALEKINEJAD, H., MAAS-BAKKER, R., FINK-GREMMELS, J. - Species differences in the hepatic biotransformation of zearalenone. *Veterinary Journal*. 172 (2006), 96-102.

MANOVA, R., MLADENOVA, R. - Incidence of zearalenone and fumonisins in Bulgarian cereal production. *Food Control*. 20 (2009), 362-365.

MARAGOS, C.M. - Zearalenone occurrence in surface waters in central Illinois, USA. *Food Additives and Contaminants: Part B Surveillance*. 5, 1 (2012), 55-64.

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, A. - Micotoxinas Contaminantes do Café. Faculdade de Ciências da Nutrição e Alimentação. FCNAUP Biblioteca. (2003).

- MASSART, F., MEUCCI, V., SAGGESE, G., SOLDANI, G. - High growth rate of girls with precocious puberty exposed to estrogenic mycotoxins. *Journal of Pediatrics*. 152 (2008), 690-695.
- MASSART, F., SAGGESE, G. - Oestrogenic mycotoxin exposures and precocious pubertal development. *International Journal of Andrology*. 33 (2010), 369-376.
- MATTHEWS, J., CELIUS, T., HALGREN, R., ZACHAREWSKI, T. - Differential estrogen receptor binding of estrogenic substances: a species comparison. *Journal of Steroid Biochemistry*. 74 (2000), 223-234.
- MEGHARAJ, M., GARTHWAITE, I., THIELE, J.H. - Total biodegradation of the oestrogenic mycotoxin zearalenone by a bacterial culture. *Letters in Applied Microbiology*. 24 (1997), 329-333.
- METZLER, M., PFEIFFER, E., HILDEBRAND, A.A. - Zearalenone and its metabolites as endocrine disrupting chemicals. *World Mycotoxin Journal*. 3, 4 (2010), 385-401.
- MIGDALOF, B., DUGGER, H., HEIDER, J., COOMBS, R., TERRY, M. - Biotransformation of zearanol: disposition and metabolism in the female rat, rabbit, dog, monkey and man. *Xenobiotica*. 13 (1983), 209-221.
- MIKSICEK, R.J. - Interaction of naturally occurring non-steroidal estrogens with expressed recombinant human estrogen receptor. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 49 (1994), 153-160.
- MINERVINI, F., DELL'AQUILA, M.E., MARITATO, F., MINOIA, P., VISCONTI, A. Toxic effects of the mycotoxin zearalenone and its derivatives on *in vitro* 40 maturation of bovine oocytes and 17 beta-estradiol levels in mural granulosa cell cultures. *Toxicology in vitro*. 15 (2001), 489-495.
- MINERVINI, F., GIANNOCARO, A., CAVALLINI, A., VISCONTI, A. - Investigations on cellular proliferation induced by zearalenone and its derivatives in relation to the estrogenic parameters. *Toxicology Letters*. 159 (2005), 272-283.
- MIROCHA, C.J., CHRISTENSEN, C.M., NELSON, G.H. - Microbial toxins, Algal and Fungal Toxins. In: KADIS, S., CIEGLER, A., AJL, S.S., Academic Press, New York, London. 3 (1971).
- MIROCHA, C.J., PATHRE, S.V., ROBISON, T.S. - Comparative metabolism of zearalenone and transmission into bovine milk. *Food and Cosmetics Toxicology*. 19 (1981), 25-30.
- MITTERBAUER, R., WEINDROFER, H., SAFAIE, N., KRŠKA, R., LEMMENS, M., RUCKENBAUER, P., KUCHLER, K., ADAM, G. - "A sensitive and inexpensive yeast bioassay

for the mycotoxin zearalenone and other compounds with estrogenic activity." Applied and Environmental Microbiology. 69, 2 (2003), 805-811.

MIZUTANI, K., NAGATOMI, Y., MOCHIZUKI, N. - Metabolism of Zearalenone in the Course of Beer Fermentation. Toxins. 3 (2011), 134-141.

MONTE, H.M., ALBUQUERQUE, A. - A reutilização de águas residuais: estratégia de conservação da água. Série Guias técnicos. 14 (2010), 9.

MURPHY, P.A., HENDRICH, S., LANDGREN, C., BRYANT, C.M. - Food mycotoxins: an update. Journal of Food Science. 71 (2006), 51-65.

MUSCARELLA, M., IAMMARINO, M., NARDIELLO, D., MAGRO, S.L., PALERMO, C., CENTONZE, D., PALERMO, D. - Validation of a confirmatory analytical method for the determination of aflatoxins B1, B2, G1 and G2 in foods and feed materials by HPLC with on-line photochemical derivatization and fluorescence detection. Food Additives and Contaminants Part A - Chemistry Analysis Control Exposure & Risk Assessment. 26 (2009), 1402-1410.

NATURE CHEMICAL BIOLOGY - [Acedido a 15 de janeiro de 2015]. Disponível na internet:[http://www.nature.com/nchembio/journal/v2/n4/compound/nchembio775\\_comp2.html](http://www.nature.com/nchembio/journal/v2/n4/compound/nchembio775_comp2.html).

NGANJE, W.E., BANGSUND, D. A., LEISTRITZ, F.L., WILSON, W.W., TIAPO, N.M. - Regional economic impacts of *Fusarium* head blight in wheat and barley. Review of Agricultural Economics. 26 (2004), 332-347.

NTP-National Toxicology Program. - NTP carcinogenesis bioassay of zearalenone in F344/N rats and F6C3F1 mice, National Toxicology Program Technical Report. Department of Health and Human Services, Research Triangle Park, N.C. 235 (2002).

NURYONO, N., NOVIANDI C.T., BÖHM, J., RAZZAZI-FAZELI, E. - A limited survey of zearalenone in Indonesian maize-based food and feed by ELISA and high performance liquid chromatography. Food Control. 16 (2005), 65-71.

OLIVEIRA, G.R. - Análises micológicas e micotoxicológicas de rações de frangos de corte no município de São José do Vale do Rio Preto. Dissertação apresentada à Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro – Instituto de Veterinária para obtenção grau de *Magister Scientiae* em Microbiologia Veterinária, Brasil (2006).

OMS - Organización Mundial de la Salud. Criterios de salud ambiental Micotoxinas. Organización Panamericana de la Salud. (1983), 133.

- ONJI, Y., AOKI, Y., TANI, N., UMEBAYASHI, K., KITADA, Y., DOHI, Y. - Direct analysis of several *Fusarium* mycotoxins in cereals by capillary gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 815 (1998), 59-65.
- PALLARONI, L. - New approach for zearalenone analysis Doktors der Agrarwissenschaften (Dr. agr.) Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines. (2004), 1-136.
- PATERSON, M. - Fungi and fungal toxins as weapons. *Mycological Research*. 110 (2006), 1003-1010.
- PATERSON, R.R.M., VENÂNCIO, A., LIMA, N. - Solutions to *Penicillium* taxonomy crucial to mycotoxin research and health. *Research in Microbiology*. 155 (2004), 507-513.
- PAWLOWSKI, S., TERNES, T., BONERZ, M., KLUCZKA, T., VAN DER BURG, B., NAU, H., ERDINGER, L., BRAUNBECK, T. - Combined *in situ* and *in vitro* assessment of the estrogenic activity of sewage and surface water samples. *Toxicological Sciences*. 75 (2003), 57-65.
- PAWLOWSKI, S., TERNES, T.A., BONERZ, M., RASTALL, A.C., ERDINGER, L., BRAUNBECK, T. - Estrogenicity of solid phase-extracted water samples from two municipal sewage treatment plant effluents and river Rhine water using the yeast estrogen screen. *Toxicology in vitro*. 18, 1 (2004), 129-138.
- PFEIFFER, E., HILDEBRAND, A., DAMM, G., RAPP, A., CRAMER, B., HUMPF, H.U., METZLER M. - Aromatic hydroxylation is a major metabolic pathway of the mycotoxin zearalenone *in vitro*. *Molecular Nutrition & Food Research*. 53 (2009), 1123-1133.
- PFEIFFER, E., HILDEBRAND, A., MIKULA, H., METZLER, M., - Glucuronidation of zearalenone, zearanol and four metabolites *in vitro*: formation of glucuronides by various microsomes and human UDPglucuronosyltransferase isoforms. *Molecular Nutrition & Food Research*. 54 (2010), 1468-1476.
- PITTET, A. - Natural occurrence of mycotoxins in foods and feeds - an updated review. *Revue de Médecine Vétérinaire*. 149 (1998), 479-492.
- PLEADIN, J., SOKOLOVIĆ, M., PERŠI, N., ZADRAVEC, M., JAKI, V., VULIĆ, A. - Contamination of maize with deoxynivalenol and zearalenone in Croatia. *Food Control*. 28 (2012), 94-98.

POSTON, H.A., COFFIN, J.L., COMBS, G.F. - Biological effects of dietary T-2 toxin on rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Aquatic Toxicology*. 2 (1982), 79-88.

QU, S., KOLODZIEJ, E.P., CWIERTNY, D.M. - Phototransformation rates and mechanisms for synthetic hormone growth promoters used in animal agriculture. *Environmental Science and Technology*. 46, 24 (2012), 13202-13211.

RESNIK, S., NEIRA, S., PACIN, A., MARTINEZ, E., APRO, N., LATREITE, S. - A survey of the natural occurrence of aflatoxins and zearalenone in Argentine field maize: 1983- 1994. *Food Additives and Contaminants*. 13 (1996), 115-120.

RICHARDSON, K.E., HAGLER W.M., MIROCHA J. - Production of zearalenone, alpha- and beta-zearalenol by *Fusarium* spp. in rice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 33 (1985), 862-866.

RUBERT, J., SORIANO, J.M., MANES, J., SOLER, C. - Rapid mycotoxin analysis in human urine: a pilot study. *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*. 49, 9 (2011), 2299-2304.

RUSSELL, R., PATERSON, M. - Zearalenone production and growth in drinking water inoculated with *Fusarium graminearum*. *Mycological Progress*. 6 (2007), 109-113.

RYU, D., HANNA, M.A., ESKRIDGE, K.M., BULLERMAN, L.B. - Heat stability of zearalenone in aqueous buffered model system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 51 (2003), 1746-1748.

SÁENZ DE RODRIGUEZ, C.A. - Environmental hormone contamination in Puerto Rico. *New England Journal of Medicine*. 310 (1984), 1741-1742.

SÁNDOR, G., VÁNYI, A. - Mycotoxin research in the Hungarian central veterinary institute. *Acta Veterinaria Hungarica*. 38 (1990), 61-68.

SANTACROCE, M.P., CONVERSANO, M.C., CASALINO, E., LAI, O., ZIZZADORO, C., CENTODUCATI, G., CRESCENZO, G. - Aflatoxins in aquatic species: metabolism, toxicity and perspectives. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*. 18 (2008), 99-130.

SANTIN, E. - Mould growth and mycotoxin production. In: DIAZ, D. (Ed.), *The Mycotoxin Blue Book*. (2005), 225 -234.

SANTOS, S. - Análise micológica e quantificação de zearalenona e deoxinivalenol em alimentos compostos para suínos. Dissertação apresentada à para a obtenção de grau de

Mestre em Medicina Veterinária, no curso de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária, conferido pela Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, Lisboa. (2011).

SCF - Scientific Committee on Food – Opinion of the SCF on Zearalenone. SCF/CS/CNTM/MYC/22.3 (2000), 1-12.

SCHENZEL, J., FORRER, H.-R., VOGELGSANG, S., HUNGERBÜHLER, K., BUCHELI, T.D. - Mycotoxins in the environment. I. Production and emission from an agricultural test field. *Environmental Science and Technology*. 46 (2012a), 13067-13075.

SCHENZEL, J., HUNGERBÜHLER, K., BUCHELI, T.D. - Mycotoxins in the environment: II. Occurrence and origin in Swiss river waters. *Environmental Science and Technology*. 46 (2012b), 13076-13084.

SCHENZEL, J., SCHWARZENBACH, R.P., BUCHELI, T.D. - Multiresidue screening method to quantify mycotoxins in aqueous environmental samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 58 (2010), 11207-11217.

SCHWARTZ, P., BUCHELI, T.D., WETTSTEIN, F.E., BURKHARDT-HOLM, P. - Life cycle exposure to the estrogenic mycotoxin zearalenone affects zebrafish (*Danio rerio*) development and reproduction. *Environmental Toxicology*. 28 (2011), 276-289.

SCHWARTZ, P., THORPE, K.L., BUCHELI, T.D., WETTSTEIN, F.E., BURKHARDT-HOLM, P. - Shortterm exposure to the environmentally relevant estrogenic mycotoxin zearalenone impairs reproduction in fish. *Science of the Total Environment*. 409 (2010), 326-333.

SERRA, R. - Micoflora das uvas portuguesas e seu potencial para a contaminação das uvas com micotoxinas, com destaque para a ocratoxina A. Tese de Doutoramento em Engenharia Química e Biológica apresentada à Universidade do Minho, Braga. (2005).

SHIER, W.T., SHIER, A.C., XIE, W., MIROCHA, C.J., - Structure-activity relationships for human estrogenic activity in zearalenone mycotoxins. *Toxicol.* 39 (2001), 1435-1438.

SHIN, B.S., HONG, S.H., BULITTA, J.B., HWANG, S.W., KIM, H.J., LEE, J.B., YANG, S.D., KIM, J.E., YOON, H.S., KIM DO, J., YOO, S.D. - Disposition, oral bioavailability, and tissue distribution of zearalenone in rats at various dose levels. *Journal of Toxicology and Environmental Health. Part A*. 72 (2009), 1406-1411.

SIROT, V., FREMY, J.M., LEBLANC, J.C. - Dietary exposure to mycotoxins and health risk assessment in the second French total diet study. *Food and chemical toxicology: an International Journal published for the British Industrial Biological Research Association*. 52 (2013), 1-11.

SPENGLER, P. - Identifizierung und Quantifizierung von Verbindungen mit östrogenen Wirkung im Abwasser. Ph. D. Thesis. Institut für Siedlungswasserbau, Wassergüte und Abfallwirtschaft. Universität Stuttgart. Germany. (2001).

STADNIK, A., BORZĘCKI, A. - Influence of the zearalenone on the activity of chosen liver enzymes in a rat. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*. 16 (2009), 31-35.

STAHL, S., CHUN, T.Y., GRAY, W.G. - Phytoestrogens act as estrogen agonists in an estrogen-responsive pituitary cell line. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 152 (1998), 41-48.

STOB, M., BALDWIN, R.S., TUIE, J., ANDREWS, F.N., GILLETTE, K.G. - Isolation of an anabolic, uterotrophic compound from corn infected with *Gibberella zeae*. *Nature*. 196 (1962), 1318.

STREIT, E., SCHWAB, C., SULLY, M., NAEHRER, K., KRŠKA, R., SCHATZMAYR, G. - Multi-mycotoxin screening reveals the occurrence of 139 different secondary metabolites in feed and feed ingredients. *Toxins*. 5 (2013), 504-523.

SUZUKI, T., KURISU, M., NOSE, N., WATANABE, A. - Determination of butenolide (*Fusarium* toxin) by gas chromatography with an electron-capture detector. *Journal of the Food Hygienic Society of Japan*. 22, 3 (1981), 197-202.

TERNES, T.A. - Analytical methods for the determination of pharmaceuticals in aqueous environmental samples. *Trends in Analytical Chemistry*. 20, 8 (2001), 419-434.

TERNES, T.A., EGGERT, T., MEISENHEIMER, M. - Pflanzliche Hormonell wirksame Stoffe in der aquatischen Umwelt und deren Verhalten bei der Trinkwasseraufbereitung. Abschlussbericht. ESWE-Institut für Wasserforschung und Wassertechnologie GmbH, Wiesbaden, Germany. (2001).

THOMAS, J.L., DUAX, W.L., ADDLAGATTA, A., KACSOH, B., BRANDT, S.E., NORRIS, W.B. - Structure/function aspects of human 3[ $\beta$ ]-hydroxysteroid dehydrogenase. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 215 (2004), 73-82.

TIEMANN, U., TOMEK, W., SCHNEIDE, F., VANSELOW, J. - Effects of the mycotoxins a- and b-zearalenol on regulation of progesterone synthesis in cultured granulosa cells from porcine ovaries. *Reproductive Toxicology*. 17 (2003), 673-681.

TOMASZEWSKI, J., MITURSKI, R., SEMCZUK, A., KOTARSKI, J., JAKOWICKI, J. - Tissue zearalenone concentration in normal, hyperplastic and neoplastic human endometrium. *Ginekologia Polska*. 69 (1998), 363-366.

TORRADO, E. - Caracterização do micobiota em milhos e alimentos compostos para suínos. Dissertação apresentada ao Instituto Superior de Agronomia- Universidade Técnica de Lisboa para obtenção do grau de Licenciado em Biologia, Lisboa (2007).

TRUCKSESS, M.W. - Rapid analysis (thin layer chromatographic and immunochemical methods) for mycotoxins in food and feeds. In: Koe, R.A., SANSON, H.P., EGMOND, J.G, SABINO, M., Mycotoxins and Phycotoxins in Perspective at the Turn of the Millenium. Wageningen the Netherlands, 2 (2000), 29-40.

TURNER, N., SUBRAHMANYAM, S., PILETSKY, S. - Analytical methods for determination of mycotoxins: A review, *Analytica Chimica Acta*. 632 (2009), 168-180.

UENO, Y., AYAKI, S., SATO, N., ITO, T. - Fate and mode of action of zearalenone. *Annales de la Nutrition et de Alimentation*. 31, (1977), 935-948.

URRY, W.H., WEHRMEISTER, H.L., HODGE, E.B., HIDY, P.H. - The structure of zearalenone. *Tetrahedron Letters*. (1966) 3109-3114.

VENTURA, M., GÓMEZ, A., ANAYA, I., DÍAZ, J., BROTO-PUIG, F., AGUT, M., COMELLAS L. - Determination of aflatoxins B1, G1, B2 and G2 in medicinal herbs by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 1048 (2004), 25-29.

VICAM (2013) - ZearalaTest WB: Resultados numéricos precisos. [Acedido a 23 de maio de 2015]. Disponível na Internet: <http://www.vicam.com.pt/zearalanone-test-kits/zearalatest-wb>

VIDAL, A., MARÍN, S., RAMOS, A. J., CANO-SANCHO, G., SANCHIS, V. - Determination of aflatoxins, deoxynivalenol, ochratoxin A and zearalenone in wheat and oat based bran supplements sold in the Spanish market. *Food and Chemical Toxicology*. 53 (2013), 133-138.

WAŚKIEWICZ, A., GROMADZKA, K., BOCIANOWSKI, J., PLUTA, P., GOLIŃSKI, P. - Zearalenone contamination of the aquatic environment as a result of its presence in crops.mycotoxins in aquatic environment through cereals. *Arh Hig Rada Toksikol*. 63 (2012), 429-435.

WHO/IPCS (World Health Organization/International Programme on Chemical Safety) - Principles and Methods for the Risk Assessment of Chemicals in Food. *Environmental Health Criteria*. 240 (2009). ISBN:10-924157240X. p.689.

WILLIAMS, B.A., MILLS, K.T., BURROUGHS, C.D., BERN, H.A., - Reproductive alterations in female C57BL/6 mice exposed neonatally to zearalenone, an estrogenic mycotoxin. *Cancer Letters*. 46, 3 (1989), 225-230.



- WOŹNY, M., BRZUZAN, P., GUSIATIN, M., JAKIMIUK, E., DOBOSZ, S., KUŹMIŃSKI, H. - Influence of zearalenone on selected biochemical parameters in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Polish Journal of Veterinary Sciences. 15, 2 (2012), 221-225.
- WOŹNY, M., BRZUZAN, P., ŁUCZYŃSKI, M.K., GÓRA, M., BIDZI ŃSKA, J., JURKIEWICZ, P. - Effects of cyclopenta[c]phenanthrene and its derivatives on zona radiata protein, ER $\alpha$ , and CYP1A mRNA expression in liver of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum). Chemico-Biological Interactions. 174 (2008), 60-68.
- WOŹNY, M., BRZUZAN, P., WOLINSKA, L., GÓRA, M., LUCZYNSKI, K.M. - Preliminary evaluation of ER and AhR-mediated gene expression patterns in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) liver after short-term exposure to zearalenone in binary mixtures. Environmental Biotechnology. 6, 1 (2010), 16-23.
- WOŹNY, M., OBREMSKI, K., JAKIMIUK, E., GUSIATIN, M., BRZUZAN, P. - Zearalenone contamination in rainbow trout farms in north-eastern Poland. Aquaculture 416-417 (2013), 209-211.
- YANG, J.Y., WANG, G.X., LIU, J.L., FAN, J.J., CUI, S. - Toxic effects of zearalenone and its derivatives alpha-zearalenol on male reproductive system in mice. Reproductive Toxicology. 24 (2007), 381-387.
- YOUNG, J.C., GAMES, D.E. - Analysis of *Fusarium* mycotoxins by gas chromatography-Fourier transform infrared spectroscopy. Journal of Chromatography A. 663 (1994), 211-218.
- YU, Z., ZHANG, L., WU, D., LIU, F. - Anti-apoptotic action of zearalenone in MCF-7 cells. Ecotoxicology and Environmental Safety. 62 (2005), 441-446.
- ZAIN, M. - Impact of mycotoxins on humans and animals. Journal Saudi Chemical Society. 15, 2 (2011), 129-144.
- ZATECKA, E., DED, L., ELZEINOVA, F., KUBATOVA, A., DOROSH, A., MARGARYAN, H., DOSTALOVA, P., KORENKOVA, V., HOSKOVA, K., PEKNICOVA, J. - Effect of zearalenone on reproductive parameters and expression of selected testicular genes in mice. Reproductive Toxicology. 45 (2014), 20-30.
- ZINEDINE, A., SORIANO, J. M. - Zearalenona. In: CASTILLO, J.M.S., Micotoxinas en alimentos. España: Ediciones Diaz de Santos. (2007), 255-267.

ZINEDINE, A., SORIANO, J.M., MOLTO, J.C., MAÑES, J. - Review on the toxicity, occurrence, metabolism, detoxification, regulations and intake of zearalenone: An oestrogenic mycotoxin. *Food and Chemical Toxicology*. 45 (2007), 1-18.

ZÖLLNER, P., BERNER, D., JODLBAUER, J., LINDNER, W. - Determination of zearalenone and its metabolites  $\alpha$ - and  $\beta$ -zearalenol in beer samples by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*. 738 (2000), 233-241.

ZÖLLNER, P., MAYER-HELM, B. - Trace mycotoxin analysis in complex biological and food matrices by liquid chromatography-atmospheric pressure ionisation mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 1136 (2006), 123-169.

ZWIERZCHOWSKI, W., PRZYBYLOWICZ, M., OBREMSKI, K., ZIELONKA, L., SKORSKA-WYSZYNSKA, E., GAJECKA, M., POLAK, M., JAKIMIUK, E., JANA, B., RYBARCZYK, L., GAJECKI, M. - Level of zearalenone in blood serum and lesions in ovarian follicles of sexually immature gilts in the course of zearalenone micotoxicosis. *Polish Journal of Veterinary Science*. 8 (2005), 209-218.



**ANEXO**



**Anexo - Amostras de águas de superfície: zona/rio e data de colheita.**

<b>Nº da Amostra</b>	<b>Zona - rio</b>	<b>Data da colheita</b>
1	Chaves - rio Tâmega	11/11/2014
2	Chaves - rio Tâmega	12/11/2014
3	Cachão - rio Fervença	10/11/2014
4	Cachão - rio Fervença	11/11/2014
5	Figueira da Foz - rio Mondego	09/09/2014
6	Figueira da Foz - rio Mondego	10/09/2014
7	Formoselha - rio Mondego	09/09/2014
8	Formoselha - rio Mondego	10/09/2014
9	Coimbra - rio Mondego	09/09/2014
10	Coimbra - rio Mondego	10/09/2014
11	Frielas - rio Trancão	18/09/2014
12	Frielas - rio Trancão	19/09/2014
13	Évora - rio Xarrama	13/09/2014
14	Évora - rio Xarrama	14/09/2014
15	Reguengos de Monsaraz - ribeira de Álamo	13/09/2014
16	Reguengos de Monsaraz - ribeira de Álamo	14/09/2014
17	Vila Real de Santo António - rio Guadiana	13/09/2014
18	Vila Real de Santo António - rio Guadiana	14/09/2014
19	Chaves - rio Tâmega	23/02/2015
20	Chaves - rio Tâmega	24/02/2015
21	Cachão - rio Fervença	23/02/2015
22	Cachão - rio Fervença	24/02/2015
23	Figueira da Foz - rio Mondego	11/03/2015
24	Figueira da Foz - rio Mondego	12/03/2015
25	Formoselha - rio Mondego	11/03/2015
26	Formoselha - rio Mondego	12/03/2015
27	Coimbra - rio Mondego	11/03/2015
28	Coimbra - rio Mondego	12/03/2015
29	Frielas - rio Trancão	09/03/2015
30	Évora - rio Xarrama	14/03/2015

**Anexo - Amostras de águas de superfície: zona/rio e data de colheita (continuação).**

<b>Nº da Amostra</b>	<b>Zona - rio</b>	<b>Data da colheita</b>
<b>31</b>	Évora - rio Xarrama	15/03/2015
<b>32</b>	Reguengos de Monsaraz - ribeira de Álamo	14/03/2015
<b>33</b>	Reguengos de Monsaraz - ribeira de Álamo	15/03/2015
<b>34</b>	Vila Real de Santo António - rio Guadiana	14/03/2015
<b>35</b>	Vila Real de Santo António - rio Guadiana	15/03/2015
<b>36</b>	Sacavém - rio Trancão	19/02/2015
<b>37</b>	Sacavém - rio Trancão	20/02/2015
<b>38</b>	Vila Nova da Barca - rio Arunca	07/04/2015