

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE RESIDÊNCIA EM ÁREA PROFISSIONAL DA
SAÚDE
MEDICINA VETERINÁRIA

Isadora Fabris Laber

**AVALIAÇÃO DE ALTERNATIVA DE EXTRAÇÃO E
QUANTIFICAÇÃO DE TRICOTECENOS EM AMOSTRAS DE MILHO
UTILIZANDO CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ACOPLADA À
ESPECTROMETRIA DE MASSAS EM TANDEM**

Santa Maria, RS
2023

Isadora Fabris Laber

Avaliação de alternativa de extração e quantificação de tricotecenos em amostras de milho utilizando cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em tandem

Monografia apresentada ao Programa de Residência em Área Profissional da Saúde – Medicina Veterinária da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do grau de **Especialização em Medicina Veterinária – Área de concentração em Medicina Veterinária Preventiva.**

Orientador: Prof. Dr. Carlos Augusto Mallmann

Santa Maria, RS
2023

Isadora Fabris Laber

**AVALIAÇÃO DE ALTERNATIVA DE EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE
TRICOTECENOS EM AMOSTRAS DE MILHO UTILIZANDO CROMATOGRAFIA
LÍQUIDA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS EM TANDEM**

Monografia apresentada ao Programa de Residência em Área Profissional da Saúde - Medicina Veterinária da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do grau de **Especialização em Medicina Veterinária – Área de concentração em Medicina Veterinária Preventiva.**

Aprovado em 27/02/2023:

Carlos Augusto Mallmann, Dr. (UFSM)
(Presidente/Orientador)

Carlos Alberto Araujo de Almeida, Dr. (Externo)

Janine Alves Sarturi, Me. (Externo)

Santa Maria, RS
2023

RESUMO

AVALIAÇÃO DE ALTERNATIVA DE EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE TRICOTECENOS EM AMOSTRAS DE MILHO UTILIZANDO CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS EM TANDEM

AUTORA: Isadora Fabris Laber
ORIENTADOR: Carlos Augusto Mallmann

As micotoxinas são uma problemática global que impacta na segurança alimentar humana e animal, além de causar prejuízos econômicos significativos. Os tricotecenos são um grupo de mais de 200 micotoxinas que diferem quimicamente entre si, produzidos principalmente por fungos *Fusarium spp* e que estão divididos em quatro grupos, sendo os tricotecenos presentes no tipo A e B os mais relevantes do ponto de vista sanitário e econômico. As diferenças químicas entre os tricotecenos fazem com que metodologias analíticas que englobem todos eles sejam de difícil elaboração, sendo necessários procedimentos complexos para que seja possível extrair todas as micotoxinas desejadas, fazendo-se uso de extração em fase sólida por exemplo, tornando o procedimento mais oneroso e demorado. O objetivo do presente estudo foi avaliar uma metodologia alternativa capaz de recuperar sete tricotecenos, sendo eles T-2, HT-2 e DAS do tipo A e 3-AcDON, 15-AcDON, NIV e FusX do tipo B, em amostras de milho fortificadas com padrões comerciais em 3 concentrações (80, 300 e 600 µg/L) através de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em tandem (HPLC-MS/MS). Os resultados preliminares obtidos nesse estudo recuperaram com sucesso seis dos sete tricotecenos testados, trazendo perspectivas positivas para que essa metodologia possa ser utilizada para auxiliar na avaliação dos níveis de tricotecenos de maneira mais rápida e barata do que as metodologias atualmente disponíveis.

Palavras-chave: Tricotecenos. Micotoxinas. Metodologia.

ABSTRACT

EVALUATION OF EXTRACTION ALTERNATIVES AND QUANTIFICATION OF TRICHOHECENES IN CORN SAMPLES USING LIQUID CHROMATOGRAPHY-TANDEM MASS

AUTHOR: Isadora Fabris Laber
ADVISOR: Carlos Augusto Mallmann

Mycotoxins are a global problem that impacts food and feed safety and causes significant economic losses. The trichothecenes are a group of more than 200 chemically different mycotoxins, produced mainly by *Fusarium* spp. fungi, and are divided into four groups, with type A and B trichothecenes being the most relevant from a health and economic point of view. The chemical differences between the trichothecenes make analytical methodologies that include all of them difficult to elaborate, requiring complex procedures to extract all the desired mycotoxins, using solid phase extraction for example, making the procedure more costly and time consuming. The objective of the present study was to evaluate an alternative methodology capable of recovering seven trichothecenes, being T-2, HT-2 and DAS of type A and 3-AcDON, 15-AcDON, NIV and FusX of type B, in corn samples fortified with commercial standards in 3 concentrations (80, 300 and 600 $\mu\text{g/L}$) through liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS). The preliminary results obtained in this study successfully recovered six of the seven trichothecenes tested, bringing positive prospects that this methodology can be used to aid in the assessment of trichothecene levels more quickly and cheaply than currently available methodologies.

Keywords: Trichothecenes. Mycotoxins. Methodology.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	7
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	8
2.1 TRICOTECENOS	8
2.1.1 Tricotecenos tipo A: T-2, HT-2 e DAS	10
2.1.2 Tricotecenos tipo B: DON, 3-Ac DON, 15-Ac DON, NIV, FUS-X.....	11
2.2 PROCEDIMENTOS ANALÍTICOS PARA DETERMINAÇÃO DE TRICOTECENOS.	12
3 JUSTIFICATIVA.....	13
4 OBJETIVOS	13
4.1 OBJETIVO GERAL.....	13
4.2 OBJETIVO ESPECÍFICO.....	13
5 MATERIAL E MÉTODOS.....	13
4.2 PADRÕES UTILIZADOS.....	14
4.3 PREPARAÇÃO E FORTIFICAÇÃO DE AMOSTRAS.....	14
4.4 EXTRAÇÃO, CONCENTRAÇÃO E DILUIÇÃO.....	14
4.5 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS EM TANDEM	15
4.6 LIMITE DE DETECÇÃO (LOD) E LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO (LOQ).....	15
4.7 CURVA ANALÍTICA E LINEARIDADE	16
4.8 RECUPERAÇÃO DO MÉTODO	Erro! Indicador não definido.
5 RESULTADOS E CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	17
REFERÊNCIAS	18

1 INTRODUÇÃO

Cereais e seus subprodutos constantemente se deparam com a problemática das micotoxinas, contaminantes tóxicos secundários ao metabolismo de alguns gêneros de fungos como *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* entre outros (NADA et al., 2022). Prestes et al. (2019) afirmam que o milho (*Zea mays*) é uma das culturas mais importantes do mundo, abastecendo a cadeia produtiva animal e também o consumo humano, porém a contaminação com micotoxinas é um desafio a ser combatido. Um dos desafios está no fato de que as micotoxinas são resistentes às etapas do processamento de grãos e farinhas, não sendo inativadas (SCUMADORE et al., 2009).

As micotoxinas se tornaram uma preocupação global por se tratar de um problema de difícil resolução apesar dos esforços contínuos de melhorias nas práticas agrícolas de cultivo, armazenagem e processamento dos alimentos, essa dificuldade se dá pela estabilidade das toxinas frente aos recursos físicos e químicos utilizados para tratamento dessas matrizes (ALSHANNAQ & YU, 2017). De acordo com a Food and Agriculture Organization (FAO), pelo menos 25% das culturas alimentares produzidas no mundo são afetadas pela contaminação com micotoxinas, gerando perdas econômicas de bilhões de dólares todos os anos (ADEYEYE et al., 2022).

Moretti et al. (2019), consideram ainda a importância das mudanças climáticas, a exemplo do aumento da temperatura oceânica e atmosférica, como um fator de risco que pode elevar consideravelmente a presença de micotoxinas e modificar o perfil das espécies fúngicas toxigênicas contaminantes de alimentos no continente europeu nos próximos 30 anos, uma vez que a temperatura e a umidade relativa exercem um papel importante na colonização e sobrevivência das culturas fúngicas. As mudanças climáticas também podem ser responsáveis por um maior estresse nas plantas causado pela seca, predispondo a infestação por pragas, o que acentua a contaminação fúngica e a consequente produção de micotoxinas em grãos (VAN DER FELLS-KLERX, LIU & BATTILANI, 2016).

A ingestão crônica de alimentos contaminados com micotoxinas podem causar distúrbios relacionados a nefrotoxicidade, imunossupressão, carcinogenicidade, hepatotoxicidade e problemas reprodutivos tanto em humanos quanto animais (GONZÁLEZ-JARTÍN et al., 2021). Em humanos, além do consumo de grãos e cereais contaminados com micotoxinas, existe ainda outra questão importante que gera preocupações à segurança alimentar, algumas micotoxinas acabam sendo transferidas para produtos de origem animal como carne, ovos e, principalmente, leite e seus subprodutos através de processos de

biotransformação ocorridos no organismo do animal quando esses consomem alimentos e rações contaminadas (KEMBOI et al., 2020).

Centenas de micotoxinas já foram identificadas, mas os grupos mais relevantes encontrados em alimentos são: aflatoxinas, produzidas por espécies de *Aspergillus*, ocratoxina A produzida por *Aspergillus* e *Penicillium*, tricotecenos, zearalenona e fumonisinas B1 e B2 produzidas principalmente por espécies de *Fusarium* (MARIN et al., 2013).

Segundo Krska et al. (2007), os tricotecenos podem ser divididos em 4 grupos (A, B, C e D), sendo os grupos A e B os que possuem as micotoxinas mais relevantes, sendo as toxinas HT-2 e T-2 as principais representantes do grupo A e do grupo B há maior destaque para as toxinas DON, 3-acetil-DON (3-Ac-DON), 15-acetil-DON (15-Ac-DON), nivalenol (NIV) e fusarenol X (FUS-X).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

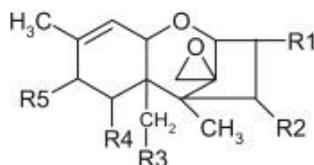
2.1 TRICOTECENOS

A família dos tricotecenos abrange de mais de 200 toxinas que possuem uma estrutura central tricíclica comum de 12,13-epoxitricotec-9-eno (MCCORMICK et al., 2011). Se caracterizam quimicamente como sesquiterpenos cíclicos de baixo peso molecular que contaminam cereais e seus derivados (PEREIRA et al., 2014). Na figura 1 é possível visualizar que os tricotecenos se diferem entre si através dos seus grupamentos.

Ibáñez-Vea et al. (2011) sugerem que essa diferença entre eles, somada à ação de interferentes presentes nas matrizes analisadas, tornem a extração simultânea de compostos do grupo A e B bastante complexa.

Os tricotecenos são diferenciados basicamente pela substituição que ocorre no C-8, tricotecenos do tipo A podem ser compostos por uma hidroxila, um éster ou nenhuma substituição em C-8, enquanto o tipo B possui uma carbonila nessa posição, já o grupo C tem um epóxi localizado em C-7/C8 e o grupo D possui um anel adicional que liga o C-4 ao C-15 e por isso é conhecido como tricoteceno macrocíclico (MCCORMICK et al., 2011). Essas características químicas acrescidas do fato dos tricotecenos do tipo A serem menos polares que os demais pela ausência de hidroxila, torna o processo de análise de tricotecenos bastante complexo (KRSKA & MOLINELLI, 2007).

Figura 1 – Estrutura química dos tricotecenos dos grupos A e B.



TRICOTHECENES		R1	R2	R3	R4	R5
Type-A	T-2 toxin (T-2)	OH	OAc	OAc	H	OCOCH ₂ CH(CH ₃) ₂
	HT-2 toxin (HT-2)	OH	OH	OAc	H	OCOCH ₂ CH(CH ₃) ₂
	Diacetoxyscirpenol (DAS)	OH	OAc	OAc	H	H
	Neosolaniol (NEO)	OH	OAc	OAc	H	OH
Type-B	Deoxynivalenol (DON)	OH	H	OH	OH	=O
	3-Acetyldeoxynivalenol (3-ADON)	OAc	H	OH	OH	=O
	15-Acetyldeoxynivalenol (15-ADON)	OH	H	OAc	OH	=O
	Nivalenol (NIV)	OH	OH	OH	OH	=O
	Fusarenon X (FUS-X)	OH	OAc	OH	OH	=O

Fonte: (IBÁÑEZ-VEA et al., 2011).

Os tricotecenos podem ser produzidos por diversos gêneros de fungos, porém são os produzidos por *Fusarium* que geram grande preocupação à segurança de alimentos e rações (PROCTOR et al., 2018). Adhikari et al. (2017) sugerem que alguns fatores ambientais como umidade relativa acima de 70%, umidade do solo entre 10 e 20% e atividade de água (A_w) acima de 0,88, além da presença de oxigênio, favorecem a formação dos fungos produtores de tricotecenos.

A toxicidade desses compostos é motivo de alarme por se tratar de substâncias com alto potencial de absorção, podendo penetrar pela pele e por inalação, além de ser facilmente absorvido pelas membranas do trato gastrointestinal, de onde rapidamente se distribui para diversos órgãos e tecidos devido ao peso molecular reduzido e a natureza anfifílica (POLAK-ŚLIWIŃSKA & PASZCZYK, 2021).

O mecanismo de ação dos tricotecenos ocorre através da inibição da síntese de proteínas, causando oxidação às células e interferindo na síntese de ácidos nucleicos e, conseqüentemente, proteínas, levando à apoptose e comumente causando quadros de anorexia, vômito, alterações neuroendócrinas, retardo no crescimento e imunossupressão (ESCRIVA et al., 2015). Zhu et al. (2020), afirmam que o quadro clínico causado pela toxina varia dependendo da espécie animal

acometida, sendo os sinais mais sensíveis relacionados ao sistema nervoso, imunológico, hematológico e reprodutivo.

Acredita-se que a anorexia e a êmese sejam resultado de dois mecanismos distintos, um relacionado a ação direta da toxina no cérebro e o outro através da ação indireta no sistema gastrointestinal. A ação direta ocorre através da ativação de populações neuronais específicas que contém fatores anorexígenos, enquanto a ação indireta ocorre através das células enteroendócrinas, secretando diversos hormônios que se comunicam com o sistema nervoso através do eixo intestino-cérebro (TERICIOLO et al., 2018).

A União Europeia através do Comitê de Aditivos em Alimentos (JECFA, do inglês Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives) estabelece a ingestão diária tolerável de alguns tricotecenos, sendo a dose máxima recomendada para T-2 de 0,02 µg por kg de peso vivo, enquanto DON e seus derivados têm um limite máximo recomendado de 1 µg/kg de peso vivo e NIV possui uma recomendação de ingestão diária máxima de 0,7 µg/kg de peso vivo (EFSA, 2011; EFSA, 2013).

2.1.1 Tricotecenos tipo A: T-2, HT-2 e DAS

Os tricotecenos tipo A são considerados mais agressivos do que os do tipo B, sendo os compostos mais tóxicos o T-2 e o HT-2 (MORCIA et al., 2016). Ibáñez-Vea et al. (2012), relata que esse tipo de tricoteceno é mais prevalente do que o tipo B em regiões com temperaturas mais baixas.

T-2 é formado principalmente por *Fusarium sporotrichoides* (*F. sporotrichoides*), *F. poae*, *F. equiseti* e *F. acuminatum* (WU et al., 2011). Xu et al. (2018), relatam que essa é uma toxina comumente observada em cereais como milho, trigo, aveia, cevada e arroz e também em ração animal, particularmente em regiões úmidas e frias. Zeng et al. (2019) relatam que conjugação, epoxidação, hidrólise e hidroxilação são as principais vias metabólicas desse tricoteceno, podendo gerar derivados como T-2 triol e neosolaniol. Essa toxina costuma causar lesões no fígado, diminuir a contagem de células sanguíneas e a glicose plasmática e comumente resulta em perda de peso (LI et al., 2011).

HT-2 é uma toxina muitas vezes encontrada em coexistência com T-2, podendo ser, também, biotransformada através de T-2 e, portanto, tem características bastantes semelhantes à essa micotoxina (ZHANG et al., 2017). HT-2 inibe a síntese de proteínas, DNA e RNA, tendo toxicidade imunológica, sanguínea e na medula óssea (CHEN et al., 2020).

DAS ou diacetoxiscirpenol também pode ser biotransformada a partir de T-2, mas

costuma ter efeitos menos tóxicos, porém semelhantes, como imunotoxicidade, hematotoxicidade, distúrbios pulmonares, distúrbios do crescimento e efeitos cardiovasculares (YANG et al., 2015).

2.1.2 Tricotecenos tipo B: DON, 3-Ac DON, 15-Ac DON, NIV, FUS-X

compostos considerados bastante tóxicos e estão ocasionalmente presentes em cereais e em alimentos de consumo animal e humano (PRONK et al., 2002). Segundo Gilbert et al. (2010), 3-AcDON costuma afetar células em divisão no timo, baço e intestino, sendo considerado citotóxico, já o 15-AcDON além desses efeitos, também age na medula óssea interferindo na divisão celular e é conhecido por afetar o ganho de peso de animais de produção.

Nivalenol (NIV) é também observado em produtos agrícolas, tendo uma toxicidade maior quando comparado ao DON, cuja diferença

Tricotecenos tipo B incluindo desoxinivalenol e seus derivados acetilados 3-acetil-desoxinivalenol e 15-acetil-desoxinivalenol, juntamente com nivalenol e fusarenon X costumam ser produzidos principalmente por *F. culmorum* e *F. graminearum* (MAHATO et al., 2022).

As toxinas do tipo B não são tão agressivas aos mamíferos quanto as do tipo A, mas ainda assim, podem ser letais em concentrações muito altas (FOROUD et al., 2019).

DON ou desoxinivalenol é uma micotoxina amplamente conhecida por causar diarreia e vômito, sendo referida muitas vezes como vomitoxina, sendo mais capaz de causar esses sinais clínicos do que a T-2, por exemplo (ROTTER et al., 1996).

Foroud et al. (2019), comenta que DON costuma causar uma gama de enfermidades como anorexia, diminuição do crescimento, leucocitose, hemorragia e problemas reprodutivos e neurológicos, e diversos autores citam essa como a micotoxina mais frequentemente relatada em cereais. DON possui alguns derivados acetilados de importância, os principais são 3-acetil-desoxinivalenol (quimiotipo 3-AcDON) e 15-acetil-desoxinivalenol (quimiotipo 15-AcDON) que também se acumulam nos grãos de cereais contaminados com *Fusarium*

Tanto 3-AcDON quanto 15-AcDON são é apenas um grupo hidroxila a mais em C-4, pois sua ação se concentra em imunotoxicidade e hematotoxicidade (ZINGALES et al., 2021).

Fusarenon-X ou FUS-X é uma toxina que se difere quimicamente de DON e NIV por possuir um grupo acetóxi em C-4, porém o mecanismo de ação é semelhante, causando normalmente problemas na síntese de DNA e das proteínas (AUPANUN et al., 2017).

2.2 PROCEDIMENTOS ANALÍTICOS PARA DETERMINAÇÃO DE TRICOTECENOS

Os tricotecenos são onipresentes nos cereais, portanto métodos eficientes para sua determinação são imprescindíveis para aplicar legislações, controlar a qualidade e monitorar a exposição dos consumidores à essas toxinas, criando estratégias de prevenção e controle para a população humana e animal (DIAZ, 2005).

Independente da micotoxina a ser analisada, é importante que a amostra fornecida seja representativa, corretamente moída e misturada para que uma subamostra possa ser retirada e utilizada na análise, esses procedimentos garantem confiabilidade aos dados obtidos, uma vez que as micotoxinas não se distribuem uniformemente matrizes (MANEELY et al., 2011).

Considerando os desafios da amostragem, é impossível determinar verdadeiramente a concentração de um lote com total certeza, uma vez que fatores como a quantidade de amostra recolhida, a homogeneização dessa amostra, o tamanho da subamostra que será analisada e a técnica de análise interferem na acurácia do teste (WHITAKER, 2006).

Maneely et al. (2011) também menciona a existência de métodos qualitativos, totalmente quantitativos e semiquantitativos, a escolha do teste a ser executado normalmente é feita tendo em vista a simplicidade de execução do teste, a rapidez para obtenção do resultado, a habilidade técnica dos operadores e o custo da análise, porém para qualquer teste uma extração eficiente da micotoxina é fundamental.

Um levantamento realizado por Lattanzio et al. (2009), constatou que o método de extração simultânea de tricotecenos A e B mais amplamente utilizado envolve acetonitrila e água (84:16, v/v), contanto, a utilização de outros solventes como metanol e acetato de etila é bastante relatada. A extração de tricotecenos de diferentes grupos é uma parte crítica da análise, para isso, a ampla maioria dos métodos quantitativos disponíveis atualmente faz uso de colunas de limpeza, que servem para purificar os extratos, sendo chamada de extração em fase sólida ou SPE (*solid-phase extraction*). As colunas mais relatadas para extração de tricotecenos são as MycoSep[®] (Romer Labs, Áustria).

A técnica mais tradicional para a análise de tricotecenos em alimentos é realizada por cromatografia líquida de alta eficiência ou gasosa acopladas a detectores de espectrometria de massas (HPLC-MS/MS e GC-MS/MS), cuja vantagem é a alta sensibilidade e especificidade do teste, em contrapartida, essa técnica exige processos de extração por vezes complexos e demorados, os equipamentos de execução são caros e o nível técnico necessário para operá-los é alto (PEREIRA et al., 2014).

3 JUSTIFICATIVA

Sabendo da importância das micotoxinas no cenário de segurança alimentar e também o impacto econômico delas, é importante que as estratégias de detecção sejam cada vez mais assertivas, trazendo benefícios para a saúde humana e animal.

Zhao et al. (2023), comenta sobre a importância de elaborar métodos mais simples, automatizados e ecologicamente corretos para detecção de micotoxinas. Visando sanar essas questões o presente trabalho foi elaborado.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo desse trabalho foi avaliar uma metodologia alternativa capaz de detectar sete micotoxinas do grupo dos tricotecenos através de um método mais rápido, barato e sustentável comparado ao atual realizado no Laboratório de Análises Micotoxicológicas (LAMIC) da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), utilizando menos solvente e eliminando o processo de extração em fase sólida, também conhecida como SPE (*solid-phase extraction*).

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar testes com diferentes metodologias e compará-las para obter um método seguro para extração de tricotecenos em menor tempo e com menor custo;
- Definir a melhor metodologia que atenda os quesitos supracitados; e
- Obter dados consistentes para a utilização do método alternativo na rotina laboratorial.

5 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 REAGENTES E PRODUTOS QUÍMICOS

Para a realização do experimento os solventes orgânicos de grau HPLC utilizados foram metanol (Biograde, Brasil) e acetonitrila (J.T Baker, USA) e os reagentes de grau HPLC foram

acetato de amônio (NH₄AC) e ácido acético (AcOH) (J.T Baker, USA). A água ultrapura foi obtida a partir do sistema Milli-Q[®] Direct 8/16 System (Millipore SAS, França).

4.2 PADRÕES UTILIZADOS

Os padrões de tricotecenos utilizados foram o Biopure[®] Mix 4 (A+B-Trichothecenes & Zearalenone) contendo 3-AcDON, DON, NIV, FusX, HT-2, T-2, DAS e Zearalenone com concentração de 10 µg/mL e o Biopure[®] 15-Acetyl-Deoxynivalenol (15-AcDON) com concentração de 100 µg/mL, ambos provenientes da Romer Labs (Áustria).

4.3 PREPARAÇÃO E FORTIFICAÇÃO DE AMOSTRAS

A amostra utilizada nesse experimento foi obtida através de um *pool* de amostras de milho previamente moídas a 1 mm e armazenadas no Laboratório de Análises Micotoxicológicas (LAMIC) da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), foi testada para 7 (sete) tricotecenos (3-AcDON, 15-AcDON, NIV, FusX, HT-2, T-2, e DAS) através do método convencional utilizado no laboratório e também pelo novo método, sendo atestada como negativa para tal, sendo considerada uma amostra branca.

Alíquotas de 5 g foram pesadas em tubos cônicos tipo *Falcon* de 50 mL e, em seguida, fortificações com padrões para estimar a recuperação da metodologia. As fortificações das amostras foram feitas com concentrações pré-definidas de 80, 300 e 600 µg/L para os 7 tricotecenos de interesse.

A amostra branca foi pesada em septuplicata para cada concentração, totalizando 21 amostras a cada dia de experimentação, que foi repetida em 3 dias distintos pela mesma analista, totalizando 63 amostras. Esse experimento não caracteriza uma validação, porém seguiu boa parte dos critérios estabelecidos no protocolo de validação estipulado pelo Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO, 2003).

As fortificações eram realizadas na noite anterior à extração e agitadas regularmente para garantir a fortificação da totalidade da alíquota.

4.4 EXTRAÇÃO, CONCENTRAÇÃO E DILUIÇÃO

A extração dos tricotecenos foi realizada utilizando solução acetonitrila:água:ácido acético (790:200:10), posteriormente as alíquotas permaneceram em mesa agitadora orbital (Lucadema, São Paulo, Brasil) para homogeneização pelo tempo de 60 minutos.

Após o tempo transcorrido na mesa agitadora, as amostras foram submetidas à centrifugação (Eppendorf – 5804R) a 2500 rpm por 5 min e, então, 5 mL das amostras foram transferidas a um tubo de ensaio limpo e concentradas (evaporadas) sob um fluxo de nitrogênio à 50 °C. Utilizando 5 mL o tempo de evaporação é muito menor em comparação aos 10 mL utilizados no método atualmente validado. Não houve diferença no coeficiente de recuperação quando concentrados 10 ou 5 mL.

O resíduo foi reconstituído com 2 mL de solução contendo acetonitrila:água:ácido acético (84:16:0,5 v/v) e agitado durante 1 minuto.

Essa metodologia visou a não utilização de nenhum processo *clean-up*, gerando diminuição no tempo e no valor da análise, o método tradicional utiliza a coluna SPE MultiSep 227 Trich+ (Romer Labs, Áustria) que, segundo o fabricante, se aplica a matrizes complexas de alimentos e rações.

A diluição foi realizada em *vial*, adicionando-se 50 µL do extrato reconstituído em 950 µL de solução contendo acetonitrila:água:ácido acético (20:79:1 v/v) também utilizada por Sulyok (2020), homogeneizado e encaminhado à cromatografia.

4.5 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS EM TANDEM

Para realização desse estudo foi utilizado um sistema UHPLC 1290 Infinity Series (Agilent Technologies Inc., EUA) acoplado a um detector de massas QTRAP 5500 (Sciex, Canada), equipado com fonte de ionização por eletrospray (ESI). A separação cromatográfica foi realizada em uma coluna Zorbax SB-Aq, 150 × 4,6 mm, com diâmetro de partícula de 5 µm. As fases móveis na eluição por gradiente foram compostas por água:metanol:acetato de amônio:ácido acético (100:990:5:5 v/v) e metanol:água:acetato de amônio:ácido acético (970:20:5:5 v/v). Testes também foram realizados fazendo-se uso de fases móveis sem a utilização de ácido acético, percebendo-se que a acidificação tem efeito positivo na recuperação no presente método.

4.6 LIMITE DE DETECÇÃO (LOD) E LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO (LOQ)

Da Silva et al. (2022), discorre que para determinar o limite de detecção (LOD), a relação entre o pico do analito e o ruído da linha de base nas proximidades do tempo de retenção das micotoxinas analisadas deve ser 1/3. O limite de quantificação (LOQ) é obtido através da injeção de padrões em concentrações crescentes até que se obtenha uma relação 10/1 entre o

pico do analito e o ruído da linha de base.

O limite de detecção (LOD) foi então determinado como 60 µg/L e o limite de quantificação (LOQ) 90 µg/L.

4.7 CURVA ANALÍTICA E LINEARIDADE

Um padrão intermediário de 1000 µg/L contendo os os 7 analitos desejados (3-AcDON, 15-AcDON, NIV, FusX, HT-2, T-2, e DAS) em acetonitrila foi preparado para construção da curva analítica.

A curva analítica foi estabelecida de acordo com o LOQ estimado, em concentrações ascendentes. A linearidade foi determinada com base na equação linear e do coeficiente de determinação (R^2) obtido através do software Analyst[®] utilizado para quantificar os tricotecenos de eleição. Foram utilizadas 7 concentrações (2, 3, 5, 12, 25, 50, 100 µg/L) para elaborar a curva, tendo como base o padrão intermediário de 1000 µg/L. Os níveis de contaminação correspondentes da curva foram 60, 90, 120, 360, 750, 1500 e 3000 µg/L. O diluente utilizado para construção da curva foi o mesmo usado para diluir as amostras, ou seja, acetonitrila:água:ácido acético (20:79:1 v/v).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A média das análises feitas nas amostras fortificadas com os três níveis de contaminação (80, 300 e 600 µg/L) estimaram a recuperação do método. Esses resultados foram avaliados conforme os critérios estabelecidos pelo Comitê Europeu de Regulamentação (EC n° 401/2006), que possui valores recomendados de recuperação para T-2 e HT-2 entre 60 e 130%, esses valores foram estendidos para os demais analitos em estudo que não possuem intervalos de recuperação estabelecidos.

A média dos resultados de concentração e recuperação obtidos nas 21 amostras fortificadas durante os 3 dias de experimento estão dispostas na tabela 1.

Tabela 1 – Médias de concentração e recuperação obtidas nas amostras de milho submetidas a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em tandem.

Fortificação (µg/L)	Tricoteceno ¹	Média da Concentração (µg/L)	Média da Recuperação (%)
	T-2	78,9	98,6
	HT-2	69	86,3

80	NIV	86,1	107,7
	FUS-X	62,8	78,6
	3-AcDON	65,8	82,3
	15-AcDON	0	0
	DAS	75	93,8
300	T-2	295,9	98,6
	HT-2	282,7	94,2
	NIV	278,6	92,9
	FUS-X	244	81,3
	3-AcDON	270,1	90
600	15-AcDON	0	0
	DAS	246,7	83,7
	T-2	618,1	103
	HT-2	570,6	95,1
	NIV	577,9	88
600	FUS-X	430,3	94,7
	3-AcDON	572,2	71,7
	15-AcDON	0	0
	DAS	528	88

¹T-2 = toxina T-2; HT-2 = toxina HT-2; NIV = nivalenol; FUS-X = fusarenon-X; 3-AcDON = 3-acetil-desoxinivalenol; 15-AcDON = 15-acetil-desoxinivalenol; DAS = diacetoxiscirpenol.

Levando em consideração que o objetivo do presente experimento foi diminuir o tempo e os processos do método, diversos testes foram realizados previamente para definir qual seria a metodologia de extração utilizada.

Foi avaliada a eficácia de duas soluções de extração distintas, acetonitrila:água (840:160) e acetonitrila:água:ácido acético (790:200:10), sendo avaliada a recuperação das fortificações e o melhor cromatograma com menor sinal ruído e então determinado que os melhores resultados foram obtidos com a solução contendo ácido acético, seguindo o método descrito por Sulyok (2020), sendo essa a solução utilizada para desenvolver a metodologia. O volume da solução foi de 20 mL para ambos os testes.

A extração também foi testada quanto ao tempo de permanência na mesa agitadora orbital (Lucadema, São Paulo, Brasil), sendo avaliados os tempos de 60 e 90 minutos, demonstrando não haver diferença significativa no coeficiente de recuperação e, portanto, optando-se pelo menor tempo (60 min). Os 60 minutos foram baseados no método convencional realizado no laboratório e os 90 minutos no método de Sulyok (2020) em que essa extração foi baseada.

Também foram realizados testes quanto à possibilidade de diluição direta, sem evaporação, porém, a presença de interferentes e a baixa recuperação para alguns tricotecenos fazem crer que é necessária a utilização de algum método de limpeza para que isso possa ocorrer.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Fica claro que existem diferenças químicas marcantes entre os tricotecenos, dessa maneira os resultados preliminares obtidos nesse estudo são animadores para a validação de um método que possa avaliar diversos tricotecenos de diferentes grupos, por meio de cromatografia líquida de alta eficiência, sem a utilização de colunas SPE, tornando a operação mais rápida e barata, podendo ser utilizada como método alternativo na rotina laboratorial. Os resultados foram satisfatórios para seis dos sete tricotecenos testados, não sendo capaz de recuperar apenas o tricoteceno 15-AcDON, pertencente ao tipo B, as dificuldades na recuperação desse tricoteceno não estão claras, sendo necessário mais testes e estudos.

Esse estudo abre caminho para a criação de métodos que envolvam diferentes grupos de micotoxinas, colaborando para a avaliação desse importante problema de ordem mundial.

As possibilidades futuras envolvem a resolução do obstáculo na recuperação de 15-AcDON, além da criação de uma metodologia que permita a avaliação de DON e zearalenona concomitantemente às toxinas avaliadas no método desenvolvido nesse estudo, pois apesar de ZEA não ser um tricoteceno, é uma micotoxina presente no padrão comercial utilizado rotineiramente no laboratório juntamente com DON.

REFERÊNCIAS

ADEYEYE, S. A. O.; ASHAOLU, T. J.; IDOWU-ADEBAYO, F. Mycotoxins: Food Safety, Consumer Health and Africa's Food Security. **Polycyclic Aromatic Compounds**, v. 42, n. 8, p. 5779-5795, 2022. DOI: [10.1080/10406638.2021.1957952](https://doi.org/10.1080/10406638.2021.1957952). Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10406638.2021.1957952>. Acesso em 25/11/2022.

ADHIKARI, M.; NEGI, B.; KAUSHIK, N.; ADHIKARI, A.; AL-KHEDHAIRY, A. A.; KAUSHIK, N. K. & CHOI, E. H. T-2 mycotoxin: toxicological effects and decontamination strategies. **Oncotarget**, v. 8, n. 20, p. 33933, 2017. DOI: [10.18632/oncotarget.15422](https://doi.org/10.18632/oncotarget.15422). Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5464924/>. Acesso em: 05/02/2023.

ALSHANNAQ, A.; YU, J. Occurrence, toxicity, and analysis of major mycotoxins in

food. **International journal of environmental research and public health**, v. 14, n. 6, p. 632, 2017. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijerph14060632>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1660-4601/14/6/632>. Acesso em: 05/02/2023.

AUPANUN, S.; POAPOLATHEP, S.; GIORGI, M.; IMSILP, K.; & POAPOLATHEP, A. An overview of the toxicology and toxicokinetics of fusarenon-X, a type B trichothecene mycotoxin. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 79, n. 1, p. 6-13, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1292/jvms.16-0008>. Disponível em: https://www.jstage.jst.go.jp/article/jvms/79/1/79_16-0008/article/-char/ja/. Acesso em: 12/02/2023.

CHEN, P.; XIANG, B.; SHI, H.; YU, P.; SONG, Y.; & LI, S. Recent advances on type A trichothecenes in food and feed: Analysis, prevalence, toxicity, and decontamination techniques. **Food Control**, v. 118, p. 107371, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107371>. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956713520302875?casa_token=wgizvGv3vsAAAAA:6gyFnc6Y8UZe6ny1vHcmiYTKHpAvZ8BAzavOrKCAANL4QiikN8KRQQWL34C69TrnURinizZ_I#bib90. Acesso em: 05/02/2023.

DA SILVA, C. R.; SIMÕES, C. T.; VIDAL, J. K.; REGHELIN, M. A.; DE ALMEIDA, C. A. A.; & MALLMANN, C. A. Development and validation of an extraction method using liquid chromatography-tandem mass spectrometry to determine patulin in apple juice. **Food Chemistry**, v. 366, p. 130654, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130654>. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814621016605?casa_token=qo_YJc3-8MAAAAA:WdBg6DSpHITxFgERff7SbS9DezDZc5t4E9w-1WeF7EWzFNVJv51B6age3RXPIyDwwFLaM6XPIfg. Acesso em: 11/02/2023.

DIAZ, D. E. **The mycotoxin blue book**. Nottingham University Press, 2005.

ESFA. European Food Safety Authority. Scientific opinion on risks for animal and public health related to the presence of nivalenol in food and feed. **EFSA J.**, 11, 2013.

ESFA. European Food Safety Authority. Scientific Opinion on the risks for animal and public health related to the presence of T-2 and HT-2 toxin in food and feed. **EFSA J.**, 9, 1–

187, 2011.

FOROUD, N. A.; BAINES, D.; GAGKAEVA, T. Y.; THAKOR, N.; BADEA, A.; STEINER, B.; BÜRSTMAYR, M.; BÜRSTMAYR, H. Trichothecenes in cereal grains—An update. **Toxins**, v. 11, n. 11, p. 634, 2019. DOI: [10.3390/toxins11110634](https://doi.org/10.3390/toxins11110634). Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6891312/>. Acesso em: 12/02/2023.

GILBERT, J.; CLEAR, R. M.; WARD, T. J.; GABA, D.; TEKAUZ, A.; TURKINGTON, T. K.; WOODS, S. M.; NOWICKI, T.; & O'DONNELL, K. Relative aggressiveness and production of 3-or 15-acetyl deoxynivalenol and deoxynivalenol by *Fusarium graminearum* in spring wheat. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v. 32, n. 2, p. 146-152, 2010. DOI: [10.1080/07060661003740231](https://doi.org/10.1080/07060661003740231). Disponível em: https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/07060661003740231?casa_token=HhhIqKssrlEAAAAA%3Ak5KxuP7xaP0SOPGYHADZfmnxac9AtXVEu9yDtd_8AM2tRPvkmvINgmbam09BF162vTizgHdjawB-Xpc. Acesso em: 13/02/2023.

GONZÁLEZ-JARTÍN, J. M.; RODRIGUEZ-CANAS, I.; ALFONSO, A.; SAINZ, M. J.; VIEYTES, M. R.; GOMES, A.; RAMOS, I. & BOTANA, L. M. Multianalyte method for the determination of regulated, emerging and modified mycotoxins in milk: QuEChERS extraction followed by UHPLC–MS/MS analysis. **Food Chemistry**, v. 356, p. 129647, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129647>. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814621006531?casa_token=7ofaJ17kp7QAAAAA:UYRin6NleH1n9dRcNBtSNzTcVhBPo0aHErASQb_OBi2M-ali3NVgcTrtWYopoL_or4Uwz7b3duE. Acesso em: 02/02/2023.

IBÁÑEZ-VEA, M.; LIZARRAGA, E.; GONZÁLEZ-PEÑAS, E.; & DE CERAIN, A. L. Co-occurrence of type-A and type-B trichothecenes in barley from a northern region of Spain. **Food Control**, v. 25, n. 1, p. 81-88, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.10.028>. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956713511004324?casa_token=U2ohTbhRSR0AAAAA:ODncKd_Hwykh58vP6cdb4HdtGCicwVWNzEF111yfwmOvQDruwkEdQu_KhPXqZZ8SWyhgDMxM04. Acesso em: 10/02/2023.

IBÁÑEZ-VEA, M.; LIZARRAGA, E.; GONZÁLEZ-PEÑAS.; Simultaneous determination

of type-A and type-B trichothecenes in barley samples by GC-MS. **Food Control**, v. 22, p. 1428-1434, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.03.004>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956713511000879>. Acesso em: 05/02/2023.

INMETRO. Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial – DOC CGCRE-008. Orientações sobre validação de métodos de ensaio químico. Rio de Janeiro, 35p, 2003.

KEMBOI, D. C.; ANTONISSEN, G.; OCHIENG, P. E.; CROUBELS, S.; OKOTH, S.; KANGETHE, E. K.; FAAS, J.; LINDAHL, J. F. & GATHUMBI, J. K. A review of the impact of mycotoxins on dairy cattle health: Challenges for food safety and dairy production in sub-Saharan Africa. **Toxins**, v. 12, n. 4, p. 222, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/toxins12040222>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2072-6651/12/4/222>. Acesso em: 03/02/2023.

KRSKA, R., MOLINELLI, A. Mycotoxin analysis: state-of-the-art and future trends. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, p. 145-148, 2007. Acesso em: 05/02/2023.
LATTANZIO, V. M.T.; PASCALE, M.; VISCONTI, A. Current analytical methods for trichothecene mycotoxins in cereals. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 28, n. 6, p. 758-768, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.trac.2009.04.012>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165993609000843>. Acesso em: 10/02/2023.

LI, Y.; WANG, Z.; BEIER, R. C.; SHEN, J.; SMET, D.; DE SAEGER, S.; & ZHANG, S. T-2 toxin, a trichothecene mycotoxin: review of toxicity, metabolism, and analytical methods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 8, p. 3441-3453, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1021/jf200767q>. Disponível em: https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/jf200767q?casa_token=krakPgbY1K8AAAAA%3As7rzfCPEvWTiMdwxbzquBik1ehYpTuvRu37pQkkIR66zA3KO5VSl13OQaTsiCU88pOoMrbRxxcpbTC9n. Acesso em: 12/02/2023.

MAHATO, D. K. et al. Trichothecenes in food and feed: Occurrence, impact on human health and their detection and management strategies. **Toxicon**, 2022. DOI:

<https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2022.01.011>. Disponível em:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0041010122000253#bib115>. Acesso em:
12/02/2023.

MARIN, S.; RAMOS, A. J.; CANO-SANCHO, G. & SANCHIS, V. Mycotoxins: Occurrence, toxicology, and exposure assessment. **Food and chemical toxicology**, v. 60, p. 218-237, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.07.047>. Disponível em:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0278691513005024>. Acesso em:
01/02/2023.

MCCORMICK, S. P.; STANLEY, A. M.; STOVER, N. A. & ALEXANDER, N. J. Trichothecenes: from simple to complex mycotoxins. **Toxins**, v. 3, n. 7, p. 802-814, 2011. DOI: <https://doi.org/10.3390/toxins3070802>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2072-6651/3/7/802#B5-toxins-03-00802>. Acesso em: 08/02/2023.

MENEELY, J. P.; RICCI, F.; VAN EGMOND, H. P.; & ELLIOTT, C. T. Current methods of analysis for the determination of trichothecene mycotoxins in food. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 30, n. 2, p. 192-203, 2011. DOI:
<https://doi.org/10.1016/j.trac.2010.06.012>. Disponível em:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165993610002244#b0115>. Acesso em
08/02/2023.

MORCIA, C.; TUMINO, G.; GHIZZONI, R.; BADECK, F. W.; LATTANZIO, V. M. T.; PASCALE, M.; & TERZI, V. Occurrence of *Fusarium langsethiae* and T-2 and HT-2 toxins in Italian malting barley. **Toxins**, v. 8, n. 8, p. 247, 2016. DOI:
<https://doi.org/10.3390/toxins8080247>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2072-6651/8/8/247>. Acesso em: 10/02/2023.

MORETTI, A.; PASCALE, M.; LOGRIECO, A. F. Mycotoxin risks under a climate change scenario in Europe. **Trends in Food Science & Technology**, v. 84, p. 38-40, 2019. DOI:
<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.03.008>. Disponível em:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0924224417304090>. Acesso em:
02/02/2023.

NADA, S.; NIKOLA, T.; BOZIDAR, U.; ILIJA, D. & ANDREJA, R. Prevention and practical strategies to control mycotoxins in the wheat and maize chain. **Food Control**, v. 136, p. 108855, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2022.108855>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956713522000482>. Acesso em: 03/02/2023.

PEREIRA, V. L.; FERNANDES, J. O.; CUNHA, S. C. Mycotoxins in cereals and related foodstuffs: A review on occurrence and recent methods of analysis. **Trends in Food Science & Technology**, v. 36, n. 2, p. 96-136, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2014.01.005>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0924224414000077?via%3Dihub>. Acesso em: 05/02/2022.

POLAK-ŚLIWIŃSKA, M.; PASZCZYK, B. Trichothecenes in food and feed, relevance to human and animal health and methods of detection: A systematic review. **Molecules**, v. 26, n. 2, p. 454, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules26020454>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1420-3049/26/2/454#B17-molecules-26-00454>. Acesso em: 08/02/2023.

PRESTES, I. D.; ROCHA, L. O.; NUNEZ, V. M. & SILVA, N. C. C. Principais fungos e micotoxinas em grãos de milho e suas consequências. **Scientia Agropecuaria**, Trujillo, v. 10, n. 4, p. 559-570, 2019. DOI: <http://dx.doi.org/10.17268/sci.agropecu.2019.04.13>. Disponível em: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2077-99172019000400013&lng=es&nrm=iso. Acesso em: ?

PROCTOR, R. H.; MCCORMICK, S. P.; KIM, H-S.; CARDOZA, R. E.; STANLEY, A. M.; LINDO, L.; KELLY, A.; BROWN, D. W.; LEE, T.; VAUGHAN, M. M.; ALEXANDER, N. J.; BUSMAN, M.; & GUTIÉRREZ, S. Evolution of structural diversity of trichothecenes, a family of toxins produced by plant pathogenic and entomopathogenic fungi. **PLoS Pathogens**, v. 14, n. 4, p. e1006946, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006946>. Disponível em: <https://journals.plos.org/plospathogens/article?id=10.1371/journal.ppat.1006946> . Acesso em: 05/02/2023.

ROTTER B. A., PRELUSKY D. B., PESTKA J. J. Toxicology of deoxynivalenol (vomitoxin). **Journal Of Toxicology And Environmental Health Sciences**. 1996; 48: 1–34.

doi: 10.1080/009841096161447. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8637056/>.

Acesso em: 13/02/2023.

SCUDAMORE, K.; HAZEL, C.; PATEL, S.; SCRIVEN, F.; Deoxynivalenol and other Fusarium mycotoxins in bread, cake and biscuits produced from UK-grown wheat under commercial and pilot scale conditions. **Food Additives and Contaminants**, v. 26 (8), p.1191-1198, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1080/02652030902919426>. Disponível em:

<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/02652030902919426>. Acesso em: 08/02/2023

SULYOK, M.; STADLER, D.; STEINER, D.; & KRŠKA, R. Validation of an LC-MS/MS-based dilute-and-shoot approach for the quantification of > 500 mycotoxins and other secondary metabolites in food crops: Challenges and solutions. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 412, p. 2607-2620, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00216-020-02489-9>.

Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00216-020-02489-9>. Acesso em: 11/02/2023.

TERICIOLO, C.; MARESCA, M.; PINTON, P. & OSWALD, I. P. Role of satiety hormones in anorexia induction by Trichothecene mycotoxins. **Food and Chemical Toxicology**, v. 121, p. 701-714, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.09.034>. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0278691518306781>. Acesso em:

08/02/2023.

VAN DER FELLS-KLERX, H. J.; LIU, C.; BATTILANI, P. Modelling climate change impacts on mycotoxin contamination. **World Mycotoxin Journal**, v. 9, n. 5, p. 717-726, 2016. DOI: <https://doi.org/10.3920/WMJ2016.2066> Disponível em:

<https://www.wageningenacademic.com/doi/epdf/10.3920/WMJ2016.2066?role=tab>. Acesso em: 07/02/2023.

WHITAKER, T. B. Sampling foods for mycotoxins. **Food additives and contaminants**, v. 23, n. 1, p. 50-61, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1080/02652030500241587>. Disponível em:

<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/02652030500241587>. Acesso em: 09/02/2023.

WU, Q.; HUANG, L.; LIU, Z.; YAO, M.; WANG, Y.; DAI, M.; & YUAN, Z. A comparison of hepatic in vitro metabolism of T-2 toxin in rats, pigs, chickens, and carp. **Xenobiotica**, v. 41, n. 10, p. 863-873, 2011. DOI: <https://doi.org/10.3109/00498254.2011.593206>. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.3109/00498254.2011.593206>. Acesso em: 11/02/2023.

XU, H.; DONG, Y.; GUO, J.; JIANG, X.; LIU, J.; XU, S.; & WANG, H. Monoclonal antibody production and the development of an indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay for screening T-2 toxin in milk. **Toxicon**, v. 156, p. 1-6, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2018.10.307>. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0041010118307153?casa_token=x1YEHTMSOloAAAAA:2sSo3lhHF3-c0qJfF7_IY9CAAdZEjzuFutUES2VWi4SRWu_yqEj8-wQ-IqVcT6WGGGo4DsasEphz8. Acesso em: 11/02/2023.

YANG, S.; DE BOEVRE, M.; ZHANG, H.; DE RUYCK, K.; SUN, F.; WANG, Z.; CAO, X.; SHEN, J.; DE SAEGER, S.; & ZHANG, S. Unraveling the in vitro and in vivo metabolism of diacetoxyscirpenol in various animal species and human using ultrahigh-performance liquid chromatography-quadrupole/time-of-flight hybrid mass spectrometry. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 407, p. 8571-8583, 2015. DOI: [10.1007/s00216-015-9016-4](https://doi.org/10.1007/s00216-015-9016-4). Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26362158/>. Acesso em 12/02/2023.

ZENG, D.; LIN, Z.; ZENG, Z.; FANG, B.; LI, M.; CHENG, Y-H.; & SUN, Y. Assessing global human exposure to T-2 toxin via poultry meat consumption using a lifetime physiologically based pharmacokinetic model. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 67, n. 5, p. 1563-1571, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b07133>. Disponível em: https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/acs.jafc.8b07133?casa_token=LyJl_bH8DvcAAAAA%3AoKi4F0MGsciuuFPzfdg43_s16caCUnBRM4WPOmZouTiskz977IiSFXPDdnr6RKgu4HsrWz759p0tv_uP. Acesso em 11/02/2022.

ZHANG, J.; LIU, S.; ZHANG, H.; LI, Y.; WU, W.; & ZHANG, H. Gut satiety hormones cholecystokinin and glucagon-like Peptide-17-36 amide mediate anorexia induction by trichothecenes T-2 toxin, HT-2 toxin, diacetoxyscirpenol and neosolaniol. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 335, p. 49-55, 2017. DOI: [10.1016/j.taap.2017.09.020](https://doi.org/10.1016/j.taap.2017.09.020). Disponível

em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0041008X17303927?casa_token=-IM5L7gCvEEAAAAA:cs6cGZWWoAdGZtJ8m0p59sV92yv4j8gq_16qCAmNGRhMoums4QFXzZ9EMq11OIjrruxU1qky0w4. Acesso em: 12/02/2023.

ZHAO, Y. et al. Sample preparation and mass spectrometry for determining mycotoxins, hazardous fungi, and their metabolites in the environment, food, and healthcare. **Trends in Analytical Chemistry**, p. 116962, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.trac.2023.116962>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165993623000493>. Acesso em: 07/02/2023.

ZHU, M.; CEN, Y.; YE, W.; LI, S. & ZHANG, W. Recent advances on macrocyclic trichothecenes, their bioactivities and biosynthetic pathway. **Toxins**, v. 12, n. 6, p. 417, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/toxins12060417>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2072-6651/12/6/417>. Acesso em: 08/02/2023.

ZINGALES, V.; FERNÁNDEZ-FRANZÓN, M.; RUIZ, M. Occurrence, mitigation and in vitro cytotoxicity of nivalenol, a type B trichothecene mycotoxin—Updates from the last decade (2010–2020). **Food and Chemical Toxicology**, v. 152, p. 112182, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2021.112182>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0278691521002155>. Acesso em: 12/02/2023.