

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

Camila Tonini

**BIOMARCADORES SANGUÍNEOS DE EXPOSIÇÃO À  
ZEARALENONA E APLICABILIDADE NA AVALIAÇÃO DA  
EFICIÊNCIA DE ADITIVOS ANTIMICOTOXINAS EM SUÍNOS E  
BOVINOS**

Santa Maria, RS

2020

**Camila Tonini**

**BIOMARCADORES SANGUÍNEOS DE EXPOSIÇÃO À ZEARALENONA E  
APLICABILIDADE NA AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE ADITIVOS  
ANTIMICOTOXINAS EM SUÍNOS E BOVINOS**

Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração em Medicina Veterinária Preventiva, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Medicina Veterinária**.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Augusto Mallmann

Santa Maria, RS

2020

**Camila Tonini**

**BIOMARCADORES SANGUÍNEOS DE EXPOSIÇÃO À ZEARALENONA E  
APLICABILIDADE NA AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE ADITIVOS  
ANTIMICOTOXINAS EM SUÍNOS E BOVINOS**

Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração em Medicina Veterinária Preventiva, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Medicina Veterinária**.

**Aprovado em 14 de fevereiro de 2020:**

---

**Carlos Augusto Mallmann, Dr. (UFSM)** (Orientador)

---

**Alfredo Quites Antoniazzi, Dr. (UFSM)** (Presidente)

---

**Carlos Alberto Araújo de Almeida, Dr. (UFSM)**

---

**Carlos Augusto Rigon Rossi, Dr. (UFSM)**

---

**Everton Luís Krabbe, Dr. (EMBRAPA/SC)**

---

**Luciano Moraes Sá, Dr. (BIOMIN)**

Santa Maria, RS

2020

## DEDICATÓRIA

*A todos aqueles que torceram e ainda torcem por mim, dedico.*

## **AGRADECIMENTOS**

*Ao longo desta trajetória de quatro anos, obtive o auxílio e compreensão de várias pessoas. Agradeço a todos que de alguma forma contribuíram positivamente para a conclusão deste estudo. Meus agradecimentos em especial:*

*A Deus, pela vida e por me iluminar em todos os caminhos e decisões, me mantendo forte para superar cada obstáculo.*

*Aos meus exemplos: Meu pai, Ildo Antonio Tonini, por todos os ensinamentos, sendo meu alicerce. A minha mãe, Oneiva Terezinha Foresti Tonini, pelos ensinamentos e apoio incondicional. Amo vocês!*

*Às minhas irmãs, Angela Tonini e Talita Inês Tonini, que mesmo com a distância física, permaneceram me apoiando em todos os momentos. Obrigada! Amo vocês!*

*Às minhas amigas de longa data, Andressa Stein Maffi, Ariana Gayer Ferro, Bruna Cristina Kuhn Gomes e Thais Elisa Lunardi. Vocês foram essenciais em toda a minha trajetória, participando do meu crescimento pessoal e estando sempre presentes com aquela palavra amiga! Muito obrigada por tanto!*

*Ao meu orientador, Prof. Dr. Carlos Augusto Mallmann, meu eterno agradecimento pela confiança e credibilidade depositada, e principalmente por ter oferecido a chance de me tornar profissional. Muito obrigada!*

*Aos profissionais que me auxiliaram e estiveram comigo lado a lado na construção, andamento e conclusão deste trabalho: Carlos Araújo de Almeida, Cristiane Rosa da Silva, Dima Quatrin, Francis Mallmann Schappo, Luciane Gressler, Mara Luciane Weise, Maurício Schneider Oliveira e Paulo Dilkin. Muito obrigada pelos ensinamentos e experiências compartilhadas! Vocês fizeram a diferença!*

*Aos queridos colegas de Pós-Graduação: Adriano Olnei Mallmann, Denize Tyska, Diego Artemio Franco Sturza, Fernanda Conegatto Paim, Juliano Kobs Vidal, Natália Hoffmann Rossi, Vinicius Duarte e Zoila Naeko Adanya. Obrigada pela troca de conhecimentos, alegrias e incentivo. Seguimos, meus queridos!!!*

*A equipe de estagiários e Residentes do Lamic, principalmente: Ana Beatriz Benevides, Bhabara Coelho, Diogo Liberalesso, Fernando Tusi Bastiani, Luara Schlosser, Magdiel Antonio Reghelin e Vanessa de Lima Kaminski. Agradeço imensamente pela ajuda, incentivos e momentos descontraídos que tornaram tudo mais leve e feliz!*

*Ao Instituto SAMITEC- Soluções Analíticas, Microbiológicas e Tecnológicas, por todo o auxílio na construção e realização dos experimentos.*

*Ao LAMIC- Laboratório de Análises Micotoxicológicas da UFSM, por abrirem as portas na minha chegada, por todo o apoio na construção desta pesquisa e em todo o aprendizado que pude adquirir.*

*À Professora Mara Batistella Rubin e Eliana Burtet Parmeggiani, pela parceria na realização da pesquisa.*

*À banca avaliadora: Alfredo Antoniazzi, Carlos Araújo de Almeida, Everton Luis Krabbe e Luciano Moraes Sá, agradecemos muito pela disponibilidade e por contribuírem com a melhoria deste trabalho.*

*À Universidade Federal de Santa Maria, ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária e ao Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, pela oportunidade de poder fazer parte de seu corpo docente.*

*À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro durante todo o período de estudo.*

*A todos aqueles que de alguma forma contribuíram positivamente em toda a minha trajetória!*

*Este trabalho contribuiu não somente para a minha formação profissional, mas principalmente, por me tornar uma pessoa muito melhor em todos os sentidos!*

**MUITO OBRIGADA!**

## EPÍGRAFE

*“Nada é tão nosso como os nossos sonhos.”*

Friedrich Nietzsche

## RESUMO

### BIOMARCADORES SANGUÍNEOS DE EXPOSIÇÃO À ZEARALENONA E APLICABILIDADE NA AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE ADITIVOS ANTIMICOTOXINAS EM SUÍNOS E BOVINOS

AUTORA: Camila Tonini

ORIENTADOR: Carlos Augusto Mallmann

A inclusão de aditivos antimicotoxinas (AAM) na dieta de animais de produção tem sido utilizada para evitar a exposição às micotoxinas. Preconiza-se a medição das micotoxinas e/ou seus metabólitos em fluidos biológicos como marcadores para confirmar a eficácia desses produtos. Este trabalho consiste em dois estudos e objetivou: (a) aprimorar uma metodologia analítica baseada em cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas (HPLC-MS/MS) para a detecção e quantificação de zearalenona (ZEA) e seus metabólitos,  $\alpha$ -zearalenol ( $\alpha$ -ZEL),  $\beta$ -zearalenol,  $\alpha$ -zearalanol,  $\beta$ -zearalanol ( $\beta$ -ZAL) e zearalanona, em soro sanguíneo; e (b) executar testes em espécies susceptíveis à ZEA para avaliar a exposição à micotoxicose e utilizar biomarcadores sanguíneos para verificar a eficácia de AAM. No primeiro estudo, 24 novilhas de corte foram distribuídas aleatoriamente para receber um destes tratamentos ( $n=6$ /tratamento): T1) dieta basal (controle); T2) dieta basal + 5 mg/kg ZEA; T3) dieta basal + 5 mg/kg ZEA + 2,5 kg/t AAM; e T4) dieta basal + 5 mg/kg ZEA + 5 kg/t AAM. A investigação durou 37 dias. Após o fornecimento da dieta, amostras de sangue foram colhidas em diferentes dias, centrifugadas para a obtenção do soro sanguíneo e analisadas por HPLC-MS/MS. Entre os metabólitos analisados,  $\beta$ -ZAL foi detectado acima do limite de quantificação nas formas não conjugadas ( $>0,60$   $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) e conjugadas ( $>1,70$   $\mu\text{g}/\text{kg}$ ). Os demais metabólitos apresentaram concentrações abaixo do limite de detecção. Na avaliação da eficácia do AAM, não houve diferença significativa ( $P>0,05$ ) entre os tratamentos com e sem aditivo nos níveis de inclusão avaliados. No segundo estudo, 70 leitões pré-púberes foram distribuídas em sete grupos ( $n=10$ ), alimentadas com dietas apresentando dois níveis de inclusão de AAM à base de argila (0,25% e 0,50%) e três níveis de inclusão de ZEA (0, 0,75 e 1 mg/kg) por 42 dias. Foram realizadas avaliações de peso inicial e final, ganho médio diário, consumo médio diário, conversão alimentar e vulvometria junto às colheitas de sangue para avaliação de ZEA e metabólitos em soro. As amostras de sangue foram centrifugadas para a separação do soro e analisadas por HPLC-MS/MS. Ao fim do período experimental, os animais foram abatidos e eviscerados para avaliar o peso e o comprimento do trato reprodutivo. O desempenho zootécnico não foi afetado pela adição de ZEA à dieta, não havendo diferença na inclusão de AAM ( $P>0,05$ ). A ZEA aumentou significativamente ( $P<0,05$ ) o peso, o comprimento do trato reprodutivo e o volume vulvar (largura, comprimento e área); não houve diferença entre os tratamentos com a adição de AAM à dieta ( $P>0,05$ ). Quanto aos metabólitos pesquisados,  $\alpha$ -ZEL foi detectado acima do limite de quantificação nas formas não conjugadas ( $>0,15$   $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) e conjugadas ( $>1,58$   $\mu\text{g}/\text{kg}$ ). A concentração dos demais metabólitos ficou abaixo do limite de detecção, confirmando os resultados da eficácia do AAM ( $P<0,05$ ). Os resultados obtidos com este trabalho contribuem para a busca da qualidade de AAMs comercializados, bem como para a utilização de métodos analíticos e biomarcadores; estes podem representar uma alternativa para a confirmação da eficácia desses produtos em novilhas e leitões.

**Palavras-chave:** Aditivo antimicotoxina. Biomarcador. Adsorção. Argilas. HPLC-MS/MS.



## ABSTRACT

### SEROLOGICAL BIOMARKERS OF ZEARALENONE EXPOSURE AND THEIR APPLICABILITY TO ASSESS THE EFFICACY OF ANTIMYCOTOXINS ADDITIVES IN SWINE AND BOVINE

AUTHOR: Camila Tonini  
ADVISER: Carlos Augusto Mallmann

The inclusion of antimycotoxins additives (AMA) in the diet of production animals has been used to avoid mycotoxins exposure. To confirm the efficacy of such products *in vivo*, measurement of mycotoxins and/or their metabolites in biological fluids is preconized. This work consists of two studies and aimed to: (a) improve an analytical methodology based on High Performance Liquid Chromatography Coupled to Tandem Mass Spectrometry (HPLC-MS/MS) to detect and quantify zearalenone (ZEA) and its metabolites,  $\alpha$ -zearalenol ( $\alpha$ -ZOL),  $\beta$ -zearalenol,  $\alpha$ -zearalanol,  $\beta$ -zearalanol ( $\beta$ -ZAL) and zearalanone, in blood serum; and (b) to conduct tests in species which are susceptible to ZEA to evaluate exposure to mycotoxicosis and to use serological biomarkers to assess the efficacy of AMA. In the first study, 24 beef heifers were randomly assigned to receive one of these treatments (n=6/treatment): T1) basal diet (control); T2) basal diet + 5 mg/kg ZEA; T3) basal diet + 5 mg/kg ZEA + 2.5 kg/t AMA; and T4) basal diet + 5 mg/kg ZEA + 5.0 kg/t AMA. The trial lasted 37 days. Blood was collected on different days after the diet was given, and the samples were centrifuged to obtain the blood serum and then analysed by HPLC-MS/MS. Among the analyzed metabolites,  $\beta$ -ZAL was detected above the limit of quantification both in the unconjugated (>0.60  $\mu$ g/kg) and conjugated (>1.70  $\mu$ g/kg) forms. The remaining metabolites presented concentrations under the limit of detection. In the efficacy evaluation of the AMA, there was no significant difference ( $P>0.05$ ) between the treatments with and without AMA at the tested levels of inclusion. In the second study, 70 pre-pubertal gilts were distributed in seven feeding groups (n=10/treatment) receiving diets with two levels of three clay-based AMAs (0.25% and 0.50%) and three levels of ZEA (0, 0.75 and 1 mg/kg) for 42 days. Initial and final body weight (BW), mean daily weight gain, mean daily feed intake, feed conversion and vulva volume were assessed at the time of blood sampling to determine ZEA and its metabolites in the serum. Blood samples were spun to obtain the serum, which was analyzed via HPLC-MS/MS. When the experimental period ceased, the animals were slaughtered and eviscerated in order to evaluate weight and length of the reproductive tract. The zootechnical performance was not affected by the presence of ZEA in the diet, and inclusion of AMA did not determine differences ( $P>0.05$ ). ZEA caused a significant increase ( $P<0.05$ ) in BW, length of the reproductive tract and vulva measurement (width, length and area), with no difference ( $P>0.05$ ) between treatments with the addition of AMA to the diet ( $P>0.05$ ). With respect to the evaluated metabolites,  $\alpha$ -ZOL was detected above the limit of quantification in both unconjugated (>0.15  $\mu$ g/kg) and conjugated (>1.58  $\mu$ g/kg) forms. The concentration of the remaining metabolites was below the limit of detection, thus confirming the results of the efficacy of AMA ( $P<0.05$ ). The findings in this study contribute to the search of quality of the marketed AMA as well as to the assessment of analytical methods and biomarkers; these substances may represent an alternative to confirm the efficacy of such products in heifers and gilts.

**Key-words:** Antimycotoxins additive. Biomarker. Adsorption. Clays. HPLC-MS/MS.

## LISTA DE FIGURAS

### **CAPÍTULO 2 – REVISÃO DE LITERATURA**

- Figura 1- Estrutura química da zearalenona e de seus metabólitos.....24
- Figura 2- As reações de biotransformação da zearalenona e seus principais metabólitos .....27
- Figura 3 - Estrutura química do hormônio estrogênio 17 $\beta$ -estradiol.....30

### **CAPÍTULO 3 - SEROLOGICAL BIOMARKERS OF ZEARELENONE EXPOSURE IN BEEF HEIFERS RECEIVING OR NOT ANTIMYCOTOXINS ADDITIVE**

- Figure 1- Chromatograms of two samples of bovine blood serum with (A) and without (B) antimycotoxins additive.....59

## LISTA DE TABELAS

### **CAPÍTULO 2 – REVISÃO DE LITERATURA**

Tabela 1 - Diferentes doses de zearalenona e suas consequências em suínos.....31

Tabela 2 - Diferentes doses de zearalenona e suas consequências em bovinos...32

Tabela 3- Biomarcadores mais relevantes para exposição às micotoxinas de acordo com a Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (EFSA).....36

### **CAPÍTULO 3 - SEROLOGICAL BIOMARKERS OF ZEARALENONE EXPOSURE IN BEEF HEIFERS RECEIVING OR NOT ANTIMYCOTOXINS ADDITIVE**

Table 1 - Nutritional composition of the basal feed.....46

Table 2- Analytical parameters observed in the recovery studies.....48

Table 3- Mean concentration of unconjugated metabolites in blood serum on different days of exposure ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) .....49

Table 4- Mean concentration of conjugated metabolites in blood serum on different days of exposure ( $\text{g}/\text{kg}$ ).....49

Table 5- Conjugated and unconjugated  $\beta$ -zearalanol in blood serum of heifers receiving diets containing Zearalenone (ZEA) and supplemented or not with antimycotoxins additive (AMA) ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ).....50

### **CAPÍTULO 4 - EFFECTS OF CHRONIC ZEARALENONE EXPOSURE ON ZOOTECHNICAL PERFORMANCE, REPRODUCTIVE TRACT AND SEROLOGICAL BIOMARKERS IN GILTS FED DIETS WITH OR WITHOUT ANTIMYCOTOXINS ADDITIVE**

Table 1- Nutritional levels of the experimental diets.....63

Table 2- Levels of Zearalenone and montmorillonite clay added to the basal diet to compose the seven treatments given to pre-pubertal gilts for 42 days.....64

Table 3- Analytical parameters observed in the recovery studies.....66

Table 4- Effect of Zearalenone on the zootechnical performance of pre-pubertal gilts receiving or not montmorillonite clay.....67

Table 5- Effect of Zearalenone on weight and length of the reproductive tract of pre-pubertal gilts receiving or not montmorillonite clay.....67

Table 6- Effect of Zearalenone on vulva volume of pre-pubertal gilts receiving or not montmorillonite clay.....	68
Table 7- Mean concentration of unconjugated metabolites in blood serum of gilts on different days of exposure ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ).....	68
Table 8- Mean concentration of conjugated metabolites in blood serum of gilts on different days of exposure ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ).....	69

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3 $\alpha$ e 3 $\beta$ - HSD	3 $\alpha$ e 3 $\beta$ hidroxí-esteróide desidrogenases
AAM	Aditivos antimicotoxinas
AFLA	Aflatoxinas
EFSA	Autoridade Europeia da Segurança dos Alimentos
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
ELL	Extração Líquido-Líquido
FUMO	Fumonisinhas
h	Horas
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
IV	Via intravenosa
LOD	Límite de detecção
LOQ	Límite de quantificação
mg/kg	miligrama por kilo
min	Minutos
MS/MS	Espectrometria de massas
nm	Nanômetros
OTA	Ocratoxina A
REs	Receptores estrogênicos
RNA <sub>m</sub>	RNA mensageiro
TGI	Trato gastrointestinal
TRICO	Tricotecenos
U.V.	Ultra Violeta
UGT	Uridina-difosfato-glucuronil-transferase
ZAN	Zearalanona
ZEA	Zearalenona
$\alpha$ -ZAL	$\alpha$ -zearalanol

$\alpha$ -ZEL/ZOL       $\alpha$ -zearalenol

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

$\beta$ -ZEL/ZOL       $\beta$ -zearalenol

## SUMÁRIO

<b>CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS</b> .....	<b>18</b>
<b>1.1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>18</b>
<b>1.2 HIPÓTESES</b> .....	<b>20</b>
Hipótese 1 .....	20
Hipótese 2 .....	20
Hipótese 3 .....	20
Hipótese 4 .....	20
<b>1.3 PROPOSIÇÃO</b> .....	<b>21</b>
1.3.1. Objetivo geral .....	21
1.3.2. Objetivos específicos .....	21
<b>CAPÍTULO 2 – REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>22</b>
<b>2.1 MICOTOXINAS NA PRODUÇÃO ANIMAL</b> .....	<b>22</b>
<b>2.2 ZEARALENONA</b> .....	<b>23</b>
2.2.1 Estrutura química e condições de desenvolvimento .....	23
<b>3. TOXICOCINÉTICA DA ZEARALENONA EM DIFERENTES ESPÉCIES ANIMAIS</b> .....	<b>24</b>
3.1 Absorção .....	24
3.2 Distribuição .....	25
3.3 Biotransformação .....	25
3.4 Eliminação .....	27
<b>4. SUSCETIBILIDADE À ZEARALENONA E SEUS METABÓLITOS EM DIFERENTES ESPÉCIES ANIMAIS</b> .....	<b>28</b>
<b>5. MECANISMO DE AÇÃO DA ZEARALENONA</b> .....	<b>29</b>
<b>6. SINAIS CLÍNICOS DA EXPOSIÇÃO À ZEARALENONA EM SUÍNOS</b> .....	<b>30</b>
<b>7. SINAIS CLÍNICOS DA EXPOSIÇÃO DA ZEARALENONA EM BOVINOS</b> .....	<b>32</b>
<b>8. ADITIVOS ANTIMICOTOXINAS</b> .....	<b>33</b>
<b>9. BIOMARCADORES DE EXPOSIÇÃO PARA MICOTOXINAS</b> .....	<b>34</b>
<b>10. DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA PARA A DETECÇÃO DE ZEARALENONA E SEUS METABÓLITOS EM SORO SANGUÍNEO</b> .....	<b>36</b>
10.1 PREPARO DE AMOSTRA .....	37
10.2 EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO .....	38
10.3 USO DA CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS PARA ANÁLISE DE MICOTOXINAS .....	38
<b>11. VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA ANALÍTICA</b> .....	<b>39</b>

11.1 ESPECIFICIDADE E SELETIVIDADE.....	39
11.2 LINEARIDADE E CURVA ANALÍTICA .....	40
11.3 LIMITE DE DETECÇÃO .....	40
11.4 LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO .....	41
11.5 EXATIDÃO .....	41
11.6 TENDÊNCIA/RECUPERAÇÃO/FORTIFICAÇÃO .....	41
11.7 PRECISÃO (REPETIBILIDADE, PRECISÃO INTERMEDIÁRIA E REPRODUTIBILIDADE).....	42
11.8 EFEITO MATRIZ .....	42
11.9 ROBUSTEZ.....	42

**CAPÍTULO 3- Serological biomarkers of Zearalenone exposure in beef heifers receiving or not antimycotoxins additive.....44**

1. Introduction.....	45
2. Materials and methods .....	46
3. Results .....	49
4. Discussion .....	50
5. Conclusions.....	53
References .....	53

**CAPÍTULO 4 – Effects of chronic Zearalenone exposure on zootechnical performance, reproductive tract and serological biomarkers in gilts fed diets with or without antimycotoxins additive .....60**

1. Introduction.....	62
2. Materials and methods .....	62
3. Results .....	66
4. Discussion .....	69
5. Conclusions.....	72

**12. Discussão Geral.....76**

**13. Conclusões .....79**

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....80**



## **APRESENTAÇÃO**

Os resultados que fazem parte desta tese estão apresentados sob a forma de artigos científicos enviados para publicação nas revistas científicas: *World Mycotoxin Journal* e *Animal Feed Science and Technology*, disponíveis nos capítulos III e IV. As REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS citam somente os trabalhos que aparecem no item REVISÃO DE LITERATURA desta tese.

## CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

### 1.1 INTRODUÇÃO

A zearalenona (ZEA) é uma micotoxina estrogênica não esteroide com semelhança estrutural ao hormônio estrogênio, produzida por várias espécies de fungos do gênero *Fusarium*. Os fungos desse gênero podem ser encontrados em culturas de cereais, como: centeio, sorgo, trigo, milho, além de pastagem, silagem e feno, comumente utilizados na alimentação de animais de produção. Para que o desenvolvimento fúngico ocorra são necessárias condições ideais de temperatura, umidade e presença de oxigênio. No campo, a temperatura na faixa de 25 °C favorece o crescimento fúngico, enquanto a redução para aproximadamente 10 °C desencadeia o metabolismo secundário, o qual é responsável pela produção da ZEA.

Diante disso, diferentes medidas de controle pós-colheita foram desenvolvidas para mitigar os efeitos nocivos da ZEA. Uma dessas medidas é a adição de aditivos antimicotoxinas (AAM) à ração animal. Esses aditivos atuam como ligantes e/ou modificadores de micotoxinas com a função de adsorver e/ou biotransformar as micotoxinas no trato gastrointestinal (TGI). Dentre os diversos tipos de compostos não nutritivos existentes para adsorver as micotoxinas, estão os aditivos com base em argilas.

A literatura descreve a avaliação da eficácia desses aditivos com base em parâmetros inespecíficos, como: peso de órgãos, consumo de ração e desempenho, realizados por testes *in vivo* que utilizam o modelo animal. No entanto, a Autoridade Europeia da Segurança dos Alimentos (EFSA) afirma que, embora tais parâmetros inespecíficos sejam úteis, apenas biomarcadores específicos para a exposição podem provar a eficácia de AAM para a alimentação animal. Esses parâmetros específicos são as micotoxinas e seus metabólitos, que podem ser avaliados em amostras biológicas como: fezes, urina, plasma/soro/sangue, tecidos e produtos de origem animal.

Dessa forma, a utilização de metodologias analíticas sensíveis é necessária para a avaliação de biomarcadores. O uso de métodos analíticos capazes de

detectar e quantificar micotoxinas com baixas concentrações é de suma importância, visto que a análise desses compostos em matrizes biológicas vem se tornando uma prática indispensável, tanto para fins econômicos quanto para a saúde animal. Porém, deve-se considerar também os custos envolvidos nas análises bem como a aplicabilidade do método, a fim de que este possa ser implantado na rotina laboratorial.

Para a ZEA, é preconizada a avaliação da própria micotoxina e de  $\alpha$ -zearalenol ( $\alpha$ -ZEL) e  $\beta$ -zearalenol ( $\beta$ -ZEL) em soro sanguíneo e/ou a excreção de ZEA e seus metabólitos. Análises *in vivo* demonstraram que a ZEA é reduzida à  $\alpha$ -ZEL e  $\beta$ -ZEL no fígado e no trato gastrointestinal (TGI) por complexos enzimáticos (3 $\alpha$  e 3 $\beta$  hidróxi-esteróide desidrogenases e Uridina Difosfato Glicuronil Transferase); esses metabólitos levam ao aumento e diminuição da atividade estrogênica, respectivamente. Algumas diferenças interespecies são observadas: o  $\alpha$ -ZEL é o metabólito predominante em suínos e o  $\beta$ -ZEL em bovinos e aves. Essas diferenças na biotransformação podem ser correlacionadas com a sensibilidade das espécies à ZEA. Isso reflete a importância de estudos que demonstrem mais informações sobre a ZEA e seus metabólitos em diferentes espécies, juntamente com suas proporções exatas. Após a biotransformação da ZEA, são evidenciados os sinais clínicos característicos: hiperestrogenismo, infertilidade e distúrbios reprodutivos.

Os objetivos do presente trabalho foram: (a) aperfeiçoar uma metodologia analítica baseada em HPLC-MS/MS para a detecção e quantificação de ZEA e seus metabólitos ( $\alpha$ -zearalenol,  $\beta$ -zearalenol,  $\alpha$ -zearalanol,  $\beta$ -zearalanol e zearalanona) em soro sanguíneo; (b) aplicar o estudo em espécies susceptíveis à ZEA (bovinos e suínos) na avaliação da exposição à micotoxicose e na aplicabilidade da utilização de biomarcadores sanguíneos para a avaliação da eficiência de AAM.

## 1.2 HIPÓTESES

### Hipótese 1

É possível detectar ZEA e seus metabólitos em soro sanguíneo por HPLC-MS/MS;

### Hipótese 2

É possível estabelecer a concentração de cada metabólito, determinando a dose-resposta para a exposição à ZEA;

### Hipótese 3

É possível estabelecer o biomarcador de escolha para a exposição à ZEA;

### Hipótese 4

É possível avaliar a eficácia de AAM para ZEA por parâmetro sorológico.

## **1.3 PROPOSIÇÃO**

### **1.3.1 Objetivo geral**

Determinação de biomarcadores sanguíneos de ZEA e aplicabilidade na avaliação da eficácia de AAM.

### **1.3.2 Objetivos específicos**

- Otimizar uma metodologia analítica para detecção e quantificação de produtos de biotransformação de ZEA ( $\alpha$ -zearalenol,  $\beta$ -zearalenol,  $\alpha$ -zearalanol,  $\beta$ -zearalanol e zearalanona) em soro sanguíneo por HPLC-MS/MS;
- Reconhecer os parâmetros analíticos dos metabólitos no processo de detecção e quantificação;
- Determinar o metabólito com maior concentração para a exposição e risco à ZEA, sendo escolhido como biomarcador;
- Propor uma ferramenta de diagnóstico rápido e preciso a nível sanguíneo para a exposição de ZEA em espécies suscetíveis;
- Avaliar a eficácia de AAM por parâmetro sorológico.

## CAPÍTULO 2 - REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 MICOTOXINAS NA PRODUÇÃO ANIMAL

Para se entender a magnitude do problema, afirma-se que cerca de 25% de todos os grãos produzidos no mundo estão contaminados com alguma micotoxina (FREIRE et al., 2007). Micotoxinas são metabólitos secundários tóxicos produzidos por fungos filamentosos com alta prevalência em matérias-primas destinadas à alimentação animal (GAUMY, BAILLY, BURGAT, 2001). Os organismos fúngicos são pertencentes principalmente aos gêneros *Aspergillus*, *Fusarium*, *Alternaria* e *Penicillium* (YIANNIKOURIS e JOUANY, 2002; BENNETT e KLICH, 2003; KABAK, DOBSON, VAR, 2006). Várias espécies de fungos pertencentes a esses gêneros podem produzir micotoxinas como aflatoxinas (AFLA), fumonisinas (FUMO), ocratoxina A (OTA), tricotecenos (TRICO), deoxinivalenol (DON) e ZEA, durante todas as etapas de produção, colheita, transporte e armazenamento de grãos (BENNETT e KLICH, 2003; GALLO et al., 2015, 2016; EGAL et al., 2005; LOI et al., 2017).

A exposição às micotoxinas pode desencadear uma série de problemas à saúde e bem-estar animal, sendo a espécie, a idade e o tempo de exposição fatores que determinam sua toxicidade. Essas toxinas podem induzir a efeitos agudos ou crônicos, como os teratogênicos, carcinogênicos, imunossupressores, estrogênicos, anabolizantes, mutagênicos, hemorrágicos e nutricionais, além da diminuição da ingestão alimentar, aumento na incidência de doenças e redução na capacidade reprodutiva. Do ponto de vista econômico, as micotoxinas afetam o agronegócio, gerando perdas econômicas e interferindo nas relações comerciais, reduzindo, assim, a qualidade dos grãos e a performance animal (LEUNG, DÍAZ-LLANO, SMITH, 2006). As micotoxinas mais comuns e que afetam os animais de produção são principalmente: AFLA, FUMO, OTA, DON e ZEA (BINDER, 2007; MALLMANN e DILKIN, 2007).

Existem espécies animais com maior susceptibilidade às micotoxinas, como bovinos, suínos e aves (MALLMANN e DILKIN, 2007). Ruminantes são frequentemente expostos por sua alimentação incluir concentrados, forragens

verdes, fenos e silagens; essa grande variedade determina uma maior exposição às micotoxinas em comparação aos monogástricos (ZINEDINE et al., 2007). A exposição às micotoxinas em suínos e aves também é frequente devido à dieta ser composta basicamente de milho e soja (MALLMANN e DILKIN, 2007). A presença de fungos em grãos gera perdas energéticas que reduzem o valor nutricional (SOUZA, 2003). Além de problemas relacionados ao desequilíbrio nutricional, as micotoxinas geram problemas reprodutivos nessas espécies, sendo a contaminação pela ZEA uma das principais causas desses transtornos (ETIENNE e DOURMAD, 1994).

## 2.2 ZEARELENONA

### 2.2.1 Estrutura química e condições de desenvolvimento

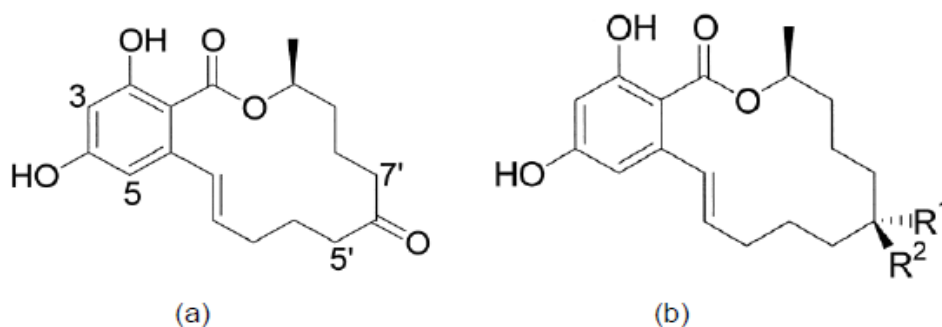
A ZEA é uma micotoxina estrogênica não esteroide, quimicamente descrita como uma lactona do ácido fenólico resorcílico (GAUMY, BAILLY, BURGAT, 2001). Essa denominação resultou da combinação entre a forma sexuada do fungo *Fusarium graminearum* à *Gibberella zeae* (ZEA) e das características de sua estrutura química: (RAL) proveniente da lactona do ácido resorcílico, (EN) da dupla ligação entre os carbonos C-1' e C-2' e (ONA) da presença da cetona C-6' (URRY et al., 1966) (Figura 1).

A fórmula empírica dessa micotoxina é  $C_{18}H_{22}O_5$ , correspondendo ao 6-(10-hidroxi-6-oxo-trans-1-undecenil)- $\beta$ -ácido resorcílico lactona, cujo peso molecular é 318. A ZEA é uma substância cristalizável, branca, solúvel em metanol, éter dietílico, benzeno, acetonitrila, acetato de etila e álcoois, sendo o ponto de fusão a 165 °C; a 366 nm emite uma fluorescência azul sob luz U.V. (MARQUES, 2007). Apesar de ser uma lactona com um grande anel, compreendendo 13 carbonos, é estável ao rompimento hidrolítico. Isto é atribuído à presença de um grupo metil secundário que impede que ataques nucleofílicos sejam efetivados na carbonila da lactona (BENNETT e KLICH, 2003).

A ZEA é produzida por várias espécies de fungos do gênero *Fusarium*, principalmente *F. culmorum*, *F. graminearum* e *F. crookwellense*. Essas espécies colonizam cereais especialmente em estações com umidade elevada e temperaturas amenas. A presença de oxigênio e o teor de umidade são fatores críticos para produção de ZEA. Em culturas de laboratório, o crescimento do gênero *Fusarium*

ocorreu durante um período de 3 semanas em níveis de umidade de mais de 20% e temperatura entre 20 °C e 25 °C (SANTIN, 2005). Dessa forma, a ZEA é encontrada naturalmente em cereais como trigo, cevada, arroz e milho, nas fases de desenvolvimento, maturação, colheita, transporte, processamento ou armazenamento dos grãos (MALLMANN e DILKIN, 2007).

Figura 1 – Estrutura química da zearalenona (a) e de seus metabólitos (b)  $\alpha$ -zearalenol (R1=OH e R2=H) e  $\beta$ -zearalenol (R1= H e R2=OH).



Fonte: BENNETT e KLICH, 2003.

### 3. TOXICOCINÉTICA DA ZEARALENONA EM DIFERENTES ESPÉCIES ANIMAIS

Para qualquer toxina, os parâmetros cinéticos, incluindo absorção, distribuição, biotransformação e eliminação, são determinados pela dose interna e as concentrações da toxina nos locais-alvo (FINK-GREMMELS e MALEKINEJAD, 2007).

#### 3.1 Absorção

Após a administração oral em mamíferos, a ZEA é rapidamente absorvida no TGI e estima-se que sua biodisponibilidade no organismo seja em torno de 80 a 85% a partir da dose ingerida (KUIPER-GOODMAN, SCOTT, WATANABE, 1987; BIEHL et al., 1993). A absorção intestinal da ZEA ocorre por difusão passiva, que é a passagem espontânea da ZEA e/ou seus metabólitos do quimo para o sangue através da parede intestinal. A eficácia desse processo depende da alteração das propriedades físico-químicas da micotoxina (peso, número de partículas, lipofilia ou capacidade de conformação), permitindo a passagem através de membranas



lipofílicas apicais ou basais (RAMOS et al., 1996). Após ser ingerida por ruminantes, a ZEA chega ao rúmen onde é metabolizada pela microbiota ruminal (ROSSI et al., 2009); é nesse órgão que ocorre a conversão de ZEA em seus metabólitos (SEELING e DÄNICKE, 2005), os quais são absorvidos pela mucosa duodenal ao alcançarem o intestino delgado (FINK-GREMMELS, 2008). Em suínos, a ZEA é encontrada no sangue até 30 min após sua ingestão, em concentrações semelhantes às encontradas no TGI (BIEHL et al., 1993; GAJECKI et al., 2010). Em aves, como os frangos de corte, poedeiras e perus, a absorção da ZEA ocorre em um tempo máximo de 0,32 min a 0,97 h (DEVREESE et al., 2012).

### 3.2 Distribuição

O volume aparente de distribuição da ZEA e seus metabólitos incluem tecidos que apresentam receptores estrogênicos (REs), como útero, ovário, tecido adiposo e testículos. A distribuição para os principais órgãos é quantificada em estudos de resíduos (KUIPER-GOODMAN, SCOTT, WATANABE, 1987).

De acordo com estudos toxicocinéticos realizados em diferentes espécies, a meia-vida plasmática de eliminação da ZEA foi estimada em 2,63 h em suínos (DÄNICKE et al., 2005) e 31,8 min em frangos de corte (OSSELAERE et al., 2013). Em bovinos, as concentrações máximas de ZEA e de seus metabólitos são alcançadas mais tarde quando comparado a outras espécies (EFSA, 2017; WINKLER et al., 2014). Não há relatos na literatura sobre a meia-vida plasmática de eliminação da ZEA em vacas; por isso, faz-se necessário o desenvolvimento de estudos toxicocinéticos nessa espécie (WINKLER et al., 2014).

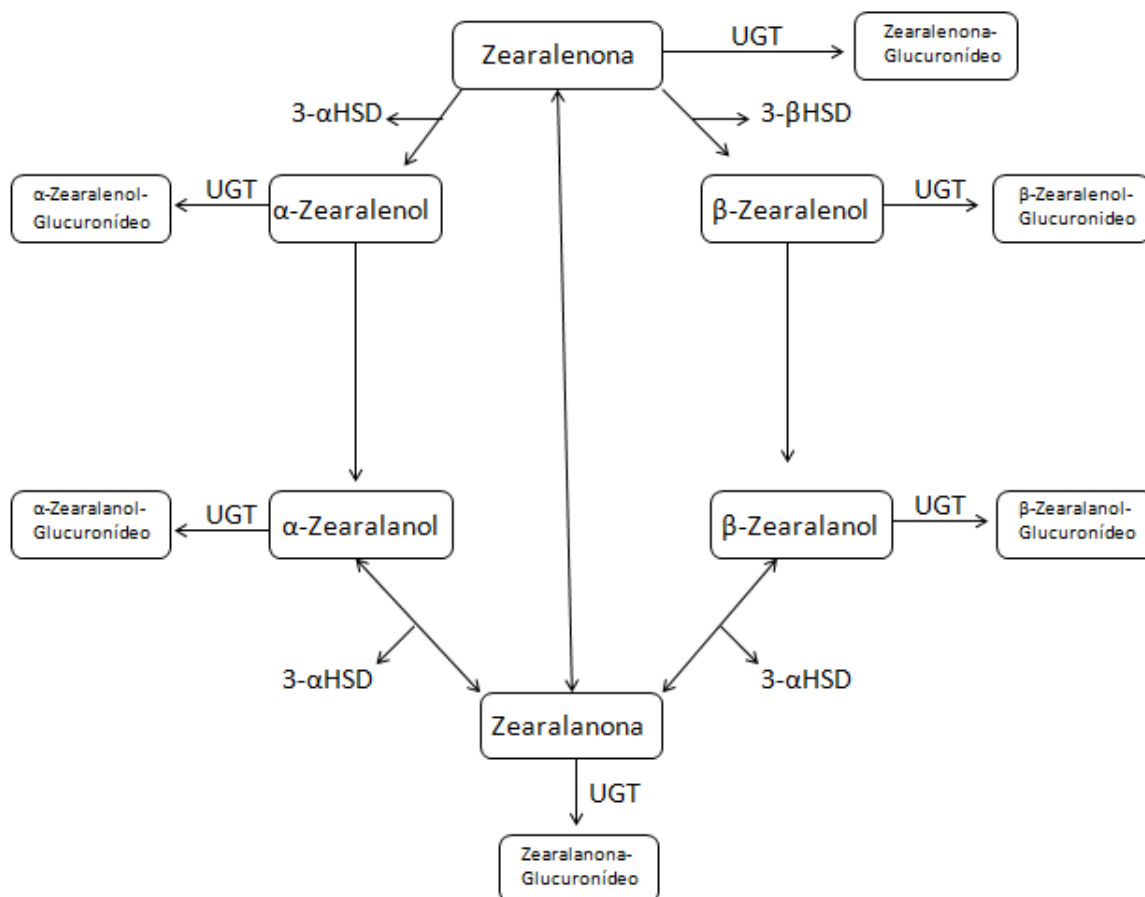
### 3.3 Biotransformação

O conhecimento dos mecanismos de biotransformação tem fundamental importância para o entendimento dos efeitos tóxicos decorrentes da exposição aguda às micotoxinas. A biotransformação da ZEA ocorre no fígado em monogástricos; em ruminantes, ocorre também em outros órgãos como o rúmen e o intestino delgado (KALLELA e VASENIUS, 1982; KIESSLING et al. 1984; MALEKINEJAD; MAAS-BAKKER; FINK-GREMMELS, 2006; OLSEN, 1989; WINKLER et al., 2014). Após a ingestão, a ZEA passa por reações enzimáticas que convertem a toxina em metabólitos denominados:  $\alpha$ -zearalanol ( $\alpha$ -ZAL),  $\beta$ -zearalanol

( $\beta$ -ZAL),  $\alpha$ -zearalenol ( $\alpha$ -ZEL),  $\beta$ -zearalenol ( $\beta$ -ZEL) e zearalanona (ZAN). Essas substâncias podem ser denominados “zeranóis” e possuem toxicidade aguda e crônica, como genotoxicidade e imunotoxicidade reprodutiva (OLSEN, 1989; MARIN et al., 2010; ZINEDINE et al., 2007). A potência relativa da ZEA e de seus metabólitos é distribuída da seguinte forma: ZEA (1),  $\alpha$ -ZEL (92),  $\beta$ -ZEL (0.44),  $\alpha$ -ZAL (18),  $\beta$ -ZAL (3.5) e ZAN (2.5) (SHIER et al., 2001); assim, alguns metabólitos possuem maior toxicidade que a própria micotoxina (D' MELLO et al., 1999).

A biotransformação da ZEA é representada esquematicamente na Figura 2. Seu metabolismo pode ocorrer por duas vias: via 1, pela reação de hidroxilação, e via 2, pela reação de conjugação ao ácido glicurônico. Essas reações são responsáveis por tornar os compostos hidrossolúveis para que sejam excretados do organismo (SCHAUT et al., 2008; OLSEN et al., 1985). As reações de biotransformação hepática da via 1 são catalizadas pela enzima  $3\alpha$  e  $3\beta$ -hidroxiesteroide desidrogenase ( $3\alpha$  e  $3\beta$ -HSD). Essa enzima também é conhecida por degradar 5-androstan-3,1-dione, que é um produto do metabolismo dos esteroides (OLSEN et al., 1985). Na via 2, ocorre a reação de conjugação da ZEA e de seus metabólitos com o ácido glucurônico, a qual é catalisada pela enzima uridina-difosfato-glucuronil-transferase (UGT) (OLSEN et al., 1985). As reações de conjugação são consideradas como uma via de desintoxicação. As proporções das reações de conjugação possuem uma grande variação interespecies. Os metabólitos de ZEA conjugados ao ácido glucurônico representam 99% do total de ZEA em humanos, enquanto que em cães a glucuronidação representa apenas 1% dos metabólitos de ZEA excretados (MIGDALOF et al. 1983).

Figura 2 – As reações de biotransformação da zearalenona e seus principais metabólitos.



Fonte: MUKHERJEE et al., 2014.

### 3.4 Eliminação

A eliminação da ZEA e seus metabólitos é espécie-dependente, sendo excretados como substâncias livres e conjugadas através da urina e das fezes. Não há acúmulo nos órgãos e a proporção dos metabólitos livres e conjugados ainda é desconhecida (RICO e BURGAT-SACAZE, 1983).

A excreção da ZEA e seus metabólitos pode ocorrer em um período superior a 72 h (KUIPER-GOODMAN, SCOOT, WATANABE, 1987), sendo que a ZEA e seus metabólitos podem ser excretados na forma de compostos livres ou conjugados, influenciando na sensibilidade individual e na suscetibilidade aos seus efeitos (D' MELLO et al., 1999).

#### 4. SUSCETIBILIDADE À ZEARALENONA E SEUS METABÓLITOS EM DIFERENTES ESPÉCIES ANIMAIS

A taxa e extensão da produção de  $\alpha$  ou  $\beta$ -ZEL e conseqüentemente sua suscetibilidade é dependente da espécie animal (MALEKINEJAD, MAAS-BAKKER, FINK-GREMMELS, 2006). A suscetibilidade à ZEA varia com as diferenças no metabolismo hepático e extra-hepático das espécies.

Os suínos parecem ser mais sensíveis à ZEA, pois o metabólito considerado mais tóxico e mais estrogênico,  $\alpha$ -ZEL, é produzido em maior quantidade nessa espécie (FINK-GREMMELS, 2008; GAJECKI, 2002; MALEKINEJAD, MAAS-BAKKER, FINK-GREMMELS, 2006; UPADHAYA et al. 2010). Esse metabólito possui maior afinidade de ligação aos REs, a qual é 92 vezes maior em comparação à afinidade de ligação da ZEA. Já o  $\beta$ -ZEL tem uma afinidade 2,5 vezes menor quando ligado aos REs. Portanto, a biotransformação de  $\alpha$ -ZEL para  $\beta$ -ZEL é considerada uma reação de inativação, enquanto a biotransformação para  $\alpha$ -ZEL pode ser vista como uma reação de ativação. Avaliações *in vitro* demonstraram que os microsomas do fígado de suínos são responsáveis por converter ZEA predominantemente em  $\alpha$ -ZEL. Testes *in vivo* também detectaram  $\alpha$ -ZEL na Fase 1 da biotransformação em plasma, urina e fezes de suínos após a administração de ZEA por via intravenosa (IV) (DANICKE, VALENTA, DOLL, 2004). Estudos realizados com leitões sexualmente imaturos demonstraram que a excreção biliar e a circulação entero-hepática também são importantes determinantes dos efeitos adversos da ZEA nessa espécie. Sugere-se que o glucuronato de zearalenona, substancialmente excretado pela bile, é reabsorvido e metabolizado pela mucosa intestinal, chegando posteriormente ao fígado e à circulação sistêmica através do sistema porta. Foi proposto que este ciclo entero-hepático prolongaria a retenção da ZEA e seus derivados no sistema circulatório, retardando sua eliminação e aumentando a duração de seus efeitos adversos (BIEHL et al., 1993). Tais características e particularidades da metabolização da ZEA explicariam o fato dessa espécie ser a mais sensível aos efeitos de ordem reprodutiva dessa micotoxina (MALEKINEJAD, MAAS-BAKKER, FINK-GREMMELS, 2006).

Os bovinos são mais resistentes aos efeitos adversos da ZEA em comparação aos monogástricos porque neles a micotoxina é predominantemente

convertida em  $\beta$ -ZEL, cuja biotransformação é considerada uma reação de desativação que diminui sua toxicidade (OLSEN, 1989; EFSA, 2017);  $\beta$ -ZEL é encontrado predominante em fluidos biológicos como o soro sanguíneo, bile, urina, fezes e leite (DÄNICKE e WINKLER, 2015; EFSA, 2017). Resultados *in vitro* sugerem que galinhas poedeiras e bovinos metabolizam a ZEA predominantemente em  $\beta$ -ZEL, o que confirma a menor propensão aos efeitos da ZEA nesses animais (MALEKINEJAD, MAAS-BAKKER, FINK-GREMMELS, 2006; ZINEDINE et al., 2007).

## 5. MECANISMO DE AÇÃO DA ZEARALENONA

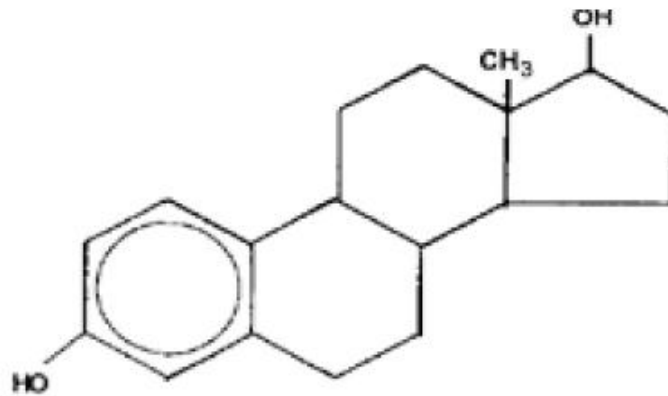
A estrutura química da ZEA e de seus metabólitos é flexível e semelhante ao hormônio estrogênio (17 $\beta$ -estradiol) (Figura 3). Os metabólitos ligam-se de forma competitiva aos REs da célula (DIEKMAN e GREEN, 1992). Dois subtipos de REs são encontrados, REs- $\alpha$  e REs- $\beta$ , que diferem em afinidade; é reconhecido que a ZEA possui maior afinidade aos REs- $\alpha$  (EFSA, 2017). O metabólito de maior afinidade de ligação aos REs é o  $\alpha$ -ZEL, embora este seja absorvido somente em pequenas quantidades/concentrações (FINK-GREMMELS, 2008; GAJECKI, 2002; UPADHAYA et al., 2010); após, a afinidade é seguida para a ZEA e  $\beta$ -ZEL (MALEKINEJAD, MAAS-BAKKER, FINK-GREMMELS, 2006).

A ligação aos REs ocorre por uma interação específica e, após alcançarem os REs citosólicos no hipotálamo, hipófise, útero e glândula mamária (KUIPER-GOODMAN, SCOTT, WATANABE, 1987), e atravessarem a membrana celular passivamente, um complexo receptor-micotoxina é formado. Esse complexo é então transferido para o núcleo da célula, onde se liga a receptores específicos que ativam a expressão gênica do DNA responsável pela síntese de RNAm e atividade polimerase (FINK-GREMMELS e MALEKINEJAD, 2007; KUIPER-GOODMAN, SCOTT, WATANABE, 1987).

O maior potencial estrogênico de ZEA e de seus metabólitos é devido ao mecanismo de ação e ao tempo de permanência no núcleo em comparação aos estrógenos naturais (GAUMY, BAILLY, BURGAT, 2001). Conseqüentemente, a secreção das células endometriais incrementa a síntese proteica no aparelho reprodutor e a síntese de proteínas uterinas; estas levam ao aumento do peso do trato reprodutivo (MALEKINEJAD, MAAS-BAKKER, FINK-GREMMELS, 2006).

Além da interação com os REs, também são um substrato competitivo para as enzimas  $3\alpha$ -HSDs e  $3\beta$ -HSDs envolvidas na síntese e metabolismo dos hormônios esteroides (FINK-GREMMELS e MALEKINEJAD, 2007; KUIPER-GOODMAN, SCOTT, WATANABE, 1987). As HSDs estão presentes no hipotálamo, hipófise, ovário, testículos, próstata, intestino, fígado e rins (OLSEN, 1989).

Figura 3 – Estrutura química do hormônio estrogênio  $17\beta$ -estradiol.



Fonte: ZINEDINE et al., 2007.

## 6. SINAIS CLÍNICOS DA EXPOSIÇÃO À ZEARALENONA EM SUÍNOS

Portanto, a ZEA é responsável por múltiplas alterações no organismo, e seus efeitos estão associados a problemas no trato reprodutivo. As fêmeas jovens parecem ser as mais sensíveis a afecções induzidas por ZEA (JAKIMIUK et al., 2009). Sinais clínicos como edema de vulva, útero e mamilos, prolapso vaginal e infertilidade foram relatados em fêmeas submetidas à alimentação contaminada com ZEA (AOYAMA et al., 2009). O hiperestrogenismo pode ocorrer em doses acima de 1 mg/kg de ZEA na dieta (BENNETT e KLICH, 2003). A toxicidade da ZEA altera o sistema imunológico e interfere nos aspectos bioquímicos da lipogênese e lipólise, impedindo o ganho de peso (DIEKMAN e GREEN, 1992; MAAROUFI et al., 1996). Tais alterações podem levar à pseudogestação pela manutenção do corpo lúteo, resultando em quadros clínicos de vulvovaginite, leitões fracos e natimortos, ocorrência de *spayleg*, marcada redução nas taxas de concepção e repetição de estro (MALEKINEJAD, MAAS-BAKKER, FINK-GREMMELS, 2006).

A ZEA induz hepatomegalia e nefromegalia, aumento nos níveis de AST (aminotransferase), ALT (alanina aminotransferase), GGT ( $\gamma$ -glutamato transferase), ureia, creatinina e MDA (malondialdeído) no soro e no fígado (JIANG et al., 2011). Os leitões são expostos às micotoxinas através da ingestão de leite quando suas progenitoras consomem alimentos contaminados com os produtos de biotransformação (DÄNICKE et al., 2007). A intoxicação mimetiza o estro e os leitões recém-nascidos podem apresentar vulvovaginite infantil. Decréscimo na sobrevivência embrionária e no peso fetal foram observados em porcas alimentadas com ração contaminada com altos níveis de ZEA (ETIENNE e DOURMAD, 1994). Também há relato de alterações no desenvolvimento dos folículos ovarianos e dos embriões já formados (TIEMANN e DÄNICKE, 2007). Diversos sinais clínicos podem ocorrer, variando com a idade do animal e a dose de ZEA ingerida (Tabela 1).

Tabela 1- Diferentes doses de zearalenona e suas consequências em suínos.

<b>Espécie</b>	<b>Doses de ZEA (mg/kg)</b>	<b>Consequências</b>	<b>Referências</b>
Suínos	0.15	Aumento do peso do trato reprodutivo	DOLL et al., 2004
Suínos	1	Hiperestrogenismo	BENNETT e KLICH, 2003
Suínos	3-10	Redução do tamanho da leitegada e reabsorção fetal	MORGAVI e RILEY, 2007
Suínos (porcas prenhes e lactantes)	25-50	Falha de concepção, pseudogravidez e atrofia ovariana	BRIDGES et al., 2010
Suínos (leitoas)	>50	Anestros	BAUER et al., 1987

## 7. SINAIS CLÍNICOS DA EXPOSIÇÃO DA ZEARALENONA EM BOVINOS

Os sinais clínicos provocados pela ZEA e seus metabólitos em bovinos variam de acordo com a categoria e o estado reprodutivo, afetando principalmente fêmeas jovens. A maioria dos surtos identificados são pela forma subaguda e sinais clínicos inespecíficos, havendo comprometimento do sistema imune com susceptibilidade à doenças secundárias causadas pelo desequilíbrio hormonal (MORGAVI e RILEY, 2007).

Os sinais clínicos em fêmeas bovinas se resumem em interferência negativa no sistema reprodutivo, induzindo sinais hiperestrogênicos. A eficiência reprodutiva pode ser comprometida pela redução na fertilidade e conseqüentemente pode haver retorno ao estro com intervalos irregulares, bem como a formação de cistos ovarianos (DE SAEGER et al., 2003). Além disso, essas fêmeas podem ser acometidas por vaginite e secreção vaginal, edema vulvar, uterino e de glândula mamária e prolapso uterino, vaginal e de reto. A maturação dos oócitos, a ovulação, a implantação e a gestação também poderão ser afetadas com conseqüente morte embrionária e aborto, bem como redução na produção leiteira (ZINEDINE et al., 2007).

Tabela 2 - Diferentes doses de zearalenona e suas conseqüências em bovinos.

<b>Categoria animal</b>	<b>Dose de ZEA (mg/kg)</b>	<b>Efeitos</b>	<b>Referências</b>
Vacas de leite	3.19-9.55	Infertilidade, falso estro, edema de vulva e vaginal, secreção vaginal	ROINE et al., 1971.
Vacas	1	Infertilidade, efeitos hiperestrogenismo, letargia, anemia, recusa alimentar e redução da produção de leite	MIROCHA e CHRISTENSEN, 1974.
Bovinos*	12	Aborto	MIROCHA et al., 1976.
Bovinos*	>10	Disfunção reprodutiva, ninfomania, hipertrofia uterina, repetição de cio, secreções vaginais, aborto, perda de peso	FRASER, 1996.



Novilhas	<10	Infertilidade, redução da taxa de concepção, repetição de cio e edema da glândula mamária	OSWEILER, 1998.
Vacas adultas	>10	Infertilidade, redução da taxa de concepção, repetição de cio, vaginite e secreções vaginais	OSWEILER, 1998.
Bovinos*	1.5-3	Efeitos hiperestrogênicos	D' MELLO et al., 1999.
Vacas cíclicas	>10	Redução da taxa de concepção	BRIDGES et al., 2010.
Novilhas	1.5-5	Atraso da puberdade, vaginite e edema de glândula mamária	BRIDGES et al., 2010.
Vacas prenhes	20	Reabsorção e aborto	BRIDGES et al., 2010.

\*Sem categoria definida

Autor: PARMEGGIANI et al., 2018.

## 8. ADITIVOS ANTIMICOTOXINAS

Pela interferência das micotoxicoses no desenvolvimento dos animais, várias alternativas têm sido estudadas a fim de minimizar intoxicações (RAMOS e HERNÁNDEZ, 1997). A mais empregada é a física: os AAM, adsorventes não-nutritivos, são incluídos na ração; estes se ligam às micotoxinas no TGI, diminuindo sua absorção (HUWIG et al., 2001). O uso de AAM é uma estratégia que pode ser usada para reduzir os efeitos negativos da intoxicação por ZEA, uma vez que possuem mecanismos de ação capazes de adsorver, biotransformar ou neutralizar a toxina (KELLER et al., 2012).

A eficiência de ligação às micotoxinas é dependente das propriedades físicas e químicas dos adsorventes como também das micotoxinas (HUWIG et al., 2001). Polaridade, solubilidade, forma, tamanho, distribuição e dissociação de carga dos adsorventes também determinam a especificidade em relação às micotoxinas (AVANTAGGIATO et al., 2003). Há várias substâncias capazes de se ligar a esses compostos tóxicos e evitar sua absorção intestinal a partir do alimento contaminado (BRYDEN, 2012). Uma adsorção eficiente de ZEA por certas zeólitas, produtos derivados de parede celular de leveduras e adsorventes poliméricos, tem sido demonstrada *in vitro* (BUENO et al., 2005).

A eficácia desses produtos precisa ser comprovada antes de serem introduzidos no mercado, uma vez que podem apresentar grande variabilidade em suas propriedades físicas e químicas; para tanto, estudos experimentais *in vivo* devem ser desenvolvidos. A EFSA apresenta as orientações para a realização desses estudos de eficácia com AAM e os pontos a serem seguidos, os quais são especificados individualmente para cada micotoxina (EFSA, 2010). Os estudos *in vivo* são mais eficientes na avaliação da adsorção de micotoxinas e permitem avaliar também a influência do adsorvente na digestibilidade de dietas e absorção de nutrientes (AVANTAGGIATO et al., 2003).

Os relatos na literatura geralmente descrevem a eficácia desses materiais com base em parâmetros inespecíficos, como peso de órgãos, consumo de ração e desempenho zootécnico. Atualmente, preconiza-se a realização de ensaios de eficácia específicos, com base em estudos de absorção, distribuição, metabolismo e excreção, utilizando biomarcadores. Além de avaliar a eficácia de aditivos, a utilização de biomarcadores específicos presentes em fluidos corporais, como o soro sanguíneo ou urina, também são utilizados para mensurar a exposição das micotoxinas em nível individual, além de realizar estudos toxicocinéticos (KOLOSOVA e STROKA, 2011; DE BAERE et al., 2012; DEVREESE et al., 2012).

## 9. BIOMARCADORES DE EXPOSIÇÃO PARA MICOTOXINAS

As micotoxinas têm sido extensivamente estudadas com respeito a mecanismo de ação, mutagenicidade e atividade carcinogênica. O conhecimento desses mecanismos levou ao desenvolvimento de biomarcadores, como os produtos de biotransformação e adutos de macromoléculas. Para confirmar que a doença constitui uma micotoxicose, é necessário mostrar a relação dose/resposta entre a micotoxina e os efeitos tóxicos, que pode ser evidenciada pela utilização de biomarcadores (BANDO et al., 2007).

Sendo assim, a detecção de biomarcadores específicos pode auxiliar na identificação, diagnóstico e tratamento de indivíduos que podem estar sob risco, mas que ainda não apresentam sinais clínicos. Os biomarcadores são classificados como marcadores de exposição, de efeito e de susceptibilidade. Como exemplo de marcadores de exposição, pode-se citar as substâncias xenobióticas, seus

metabólitos ou o produto de interação entre a substância e uma molécula ou célula-alvo (AMORIM, 2003).

Diversos biomarcadores são usados para avaliar a exposição a diferentes micotoxinas. Para as AFLA, são analisados os metabólitos urinários de aflatoxina B1 (AFB1), como aflatoxina M1, aflatoxina P1, aflatoxina Q1, aflatoxina livre em soro ou plasma, os adutos de AFB-N7-guanina, os adutos de albumina ou mutação no gene supressor de tumor p53, presentes em fluidos biológicos. Para as FUMO, os biomarcadores são os níveis de fumonisina B1 e fumonisina B2 livres, ou de esfinganina e esfingosina em sangue e urina. O deoxinivalenol (DON) tem como biomarcadores de exposição os produtos de seu metabolismo e adutos macromoleculares (proteína/DNA) presentes nos fluidos biológicos. Para a exposição à OTA, os biomarcadores se restringem à quantificação da própria toxina nos fluidos biológicos (BANDO et al., 2007).

A ZEA, seus metabólitos e seus glicuronídeos podem ser encontrados em animais, o que torna relevante a análise para avaliar a biotransformação da micotoxina (OLSEN et al., 1985; ZÖLLNER e MAYER-HELM, 2006; DÄNICKE e BREZINA 2013). Embora diferentes métodos para a determinação de ZEA tenham sido desenvolvidos na última década, com exceção da urina, métodos para a determinação desses compostos em amostras fisiológicas são escassos (DE BAERE et al., 2012).

A identificação e a mensuração dos biomarcadores para a avaliação da exposição animal à ZEA por meio de metodologias analíticas simples, rápidas, precisas e exatas pode ajudar a prevenir ou minimizar os agravos à saúde animal. O biomarcador escolhido para exposição deve ser específico para cada micotoxina e espécie-alvo, intimamente relacionado à exposição e de fácil detecção com métodos analíticos sensíveis validados para a matriz utilizada (EFSA, 2010). A EFSA propôs diferentes biomarcadores para exposição a AFLA, DON, ZEA, OTA e FUMO (Tabela 3).

Tabela 3- Biomarcadores mais relevantes para exposição às micotoxinas de acordo com a Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (EFSA, 2010).

<b>Micotoxina</b>	<b>Biomarcador de exposição</b>
Aflatoxina	Aflatoxina M1 no leite/ovos
Deoxinivalenol	DON/metabólitos em soro sanguíneo
Zearalenona	ZEA e $\alpha$ + e $\beta$ -zearalenol em soro sanguíneo ou excreção de ZEA/metabólitos
Ocratoxina A	OTA no rim (ou soro sanguíneo)
Fumonisina B1 + B2	Esfinganina/Esfingosina em sangue, plasma ou tecidos

#### 10. DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA PARA A DETECÇÃO DE ZEARELENONA E SEUS METABÓLITOS EM SORO SANGUÍNEO

Há estudos realizados com HPLC em combinação com ultravioleta (BIEHL et al., 1993), fluorescência (DANICKE et al., 2005; OLSEN et al., 1985; PILLAY et al., 2002) ou MS/MS para a detecção (SONGSERMSAKUL et al., 2006; ZOLLNER et al., 2002; SHIN et al., 2009) de ZEA em soro sanguíneo ou urina de animais. Alguns métodos analisaram ZEA (SHIN et al., 2009), enquanto outros também incluíram seus principais metabólitos (SONGSERMSAKUL et al., 2006; ZOLLNER et al., 2002; DANICKE et al., 2005; DONG et al., 2010; DÄNICKE et al., 2001).

No caso da ZEA, foram sugeridos dois pontos, isto é, é possível realizar a determinação da concentração plasmática em função do tempo (toxicocinética) entre a toxina e os principais metabólitos ou a avaliação da excreção da ZEA e seus metabólitos (EFSA, 2010). Dentro desse estudo, amostras de sangue foram selecionadas em detrimento de outras matrizes, como a bile ou a urina, sendo que estas muitas vezes requerem a cateterização.

Com isso, métodos analíticos sensíveis que possam ser utilizados como um parâmetro bioquímico para a investigação da eficácia de AAM são necessários, juntamente com a avaliação da presença desses compostos tóxicos; assim, um

biomarcador da exposição a ZEA poderá ser usado em amostras de soro sanguíneo de espécies susceptíveis.

## 10.1 PREPARO DE AMOSTRA

A análise cromatográfica de substâncias presentes em matrizes como soro e urina, em geral, requer um pré-tratamento da amostra. As razões para isso são diversas, destacando-se a complexidade das matrizes biológicas das quais os compostos são obtidos, a existência de proteínas que são incompatíveis com as colunas cromatográficas (HUBERT et al., 1999) e a concentração das substâncias a serem analisadas a nível de traço. As técnicas de extração e/ou pré-concentração permitem que a análise dos componentes de interesse se torne possível. A meta final é a obtenção de uma sub-fração da amostra original enriquecida com as substâncias de interesse analítico, de forma que se obtenha uma separação cromatográfica livre de interferentes, com detecção adequada e um tempo razoável de análise (QUEIROZ, COLLINS, JARDIM, 2001).

A maior parte dos métodos em química analítica necessitam de etapas corretas de extração e *clean up*, com exceção de alguns como ELISA, por exemplo. Os métodos de extração são utilizados para remover o analito da matriz, e cada método depende da polaridade do analito a ser analisado. A etapa de *clean up* do método é uma etapa importante, pois a pureza da amostra afeta a sensibilidade dos resultados. Baixos níveis de concentração podem ser mascarados por compostos interferentes, não apenas nos encontrados na matriz, mas também nos materiais, solventes e produtos utilizados. As vidrarias também devem estar livres de contaminação; detergentes alcalinos, por exemplo, podem formar sais com os compostos e resultar em baixas taxas de detecção (TURNER, SUBRAHMANYAM, PILETSKY, 2009).

As técnicas mais comumente utilizadas para extração e/ou pré-concentração de compostos presentes em fluidos biológicos são: extração líquido-líquido (ELL), extração em fase sólida, extração com fluido supercrítico e extração com membranas sólidas (diálise e ultrafiltração) ou líquidas. Tais técnicas têm sido automatizadas para uso na rotina, pois eliminam erros humanos de manipulação, diminuem o tempo de assistência do analista durante a análise, evitam o risco de

contato com substâncias prejudiciais à saúde e aumentam significativamente o número de análises de amostras por tempo (QUEIROZ, COLLINS, JARDIM, 2001).

## 10.2 EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO (ELL)

Os métodos de extração são utilizados para remover o analito da matriz, e cada método depende das propriedades físico-químicas das micotoxinas. Algumas combinações de solventes, muitas vezes com adição de modificadores (por exemplo, ácidos e bases), são utilizados para a extração (TURNER, SUBRAHMANYAM, PILETSKY, 2009).

Na ELL ocorre a partição da amostra entre duas fases imiscíveis (orgânica e aquosa). A eficiência da extração depende da afinidade do soluto pelo solvente de extração, da razão das fases e do número de extrações. Possui as vantagens de ser simples (na configuração mais comum usa-se um funil de separação ou tubos de centrífuga) e poder utilizar um número grande de solventes, puros e disponíveis comercialmente, os quais fornecem uma ampla faixa de solubilidade e seletividade (QUEIROZ, COLLINS, JARDIM, 2001). As vantagens da acetonitrila, por exemplo, estão ligadas à extração de componentes de diferentes polaridades, eficiente desnaturação de proteínas, além da possibilidade de extração de um maior número de coextrativos, tais como pigmentos e gorduras (BERENDSEN, STOLKER, NIELSEN, 2013; CHIAOCHAN et al., 2010; MOL et al., 2008). Além disso, as proteínas presentes nas amostras são desnaturadas, eliminando a contaminação da coluna cromatográfica.

## 10.3 USO DA CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS PARA ANÁLISE DE MICOTOXINAS

Os métodos convencionais atuais para a determinação das micotoxinas em baixas concentrações dependem da cromatografia líquida de alto desempenho, HPLC, acoplada a um detector ultravioleta ou de fluorescência e mais recentemente, a detecção por MS/MS (BOUSIADOU-THEURILLAT, MEIER, RICHARD, 2014).

A cromatografia é uma técnica utilizada para separar a amostra em várias frações e, conseqüentemente, tais frações devem ser identificadas e quantificadas por um detector apropriado. A amostra é movida através de uma coluna, preenchida

com uma fase estacionária, enquanto uma fase móvel é continuamente bombeada através da coluna. Os componentes da amostra sofrem uma série de equilíbrios de partição entre as duas fases e vão sendo separados na coluna e sequencialmente eluídos (COLLINS, BRAGA, BONATO, 2006).

MS/MS é empregada para o estudo das massas de átomos, moléculas ou fragmentos de moléculas (CHIARADIA, COLLINS, JARDIM, 2008). É uma ferramenta há muito utilizada para a medida de isótopos e para determinar a estrutura de moléculas. Atualmente é a melhor técnica de detecção, pois é sensível a pequenas quantidades do analito, fornece informações qualitativas e quantitativas sobre os compostos e pode distinguir substâncias diferentes com o mesmo tempo de retenção (KORFMACHER et al., 1991). Porém, dispositivos chamados fontes de ionização são necessários para que ocorra o acoplamento entre HPLC e MS/MS; assim, ocorre a remoção do solvente e o interfaceamento entre a coluna cromatográfica e o espectrômetro de massas. Tais fontes facilitam a transferência da amostra para a fase gasosa e a ionização da mesma (FERNANDEZ-ALBA, 2005).

O uso do detector de massas oferece o efeito de alta sensibilidade, seletividade, exatidão na identificação do analito e quantificação precisa (BOUTSIADOU-THEURILLAT, MEIER, RICHARD, 2014). Na análise de micotoxinas por HPLC-MS/MS, tem-se como ferramenta principal o uso de processos de extração, purificação e derivatização; dessa forma, é possível realizar a detecção e quantificação dos compostos. Devido à alta sensibilidade e seletividade, a HPLC-MS/MS é frequentemente o método de escolha na análise de níveis de traço de contaminantes polares (NIELSEN et al., 2007).

## 11. VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA ANALÍTICA

É fundamental que os laboratórios disponham de meios e objetivos criteriosos para demonstrar, através da validação, que os métodos de ensaio que executam conduzem a resultados confiáveis e adequados à qualidade pretendida. Se um método for modificado para atender aos requisitos específicos, ou um método totalmente novo for desenvolvido, o laboratório deve assegurar que as características de desempenho do método atendam aos requisitos para as operações analíticas pretendidas (LANÇAS, 2004; LEITE, 2002).

### 11.1 ESPECIFICIDADE E SELETIVIDADE

A especificidade e seletividade de um método analítico dependem de quanto essa metodologia é indiferente à presença de interferentes na amostra que podem alterar a determinação do analito (ALBANO e RAYA-RODRIGUEZ, 2015). Um método que produz resposta para apenas um analito é chamado específico. Um método que produz respostas para vários analitos, mas que pode distinguir a resposta de um analito em relação a outros, é chamado seletivo. A seletividade assegura que o sinal analítico seja exclusivamente do composto de interesse. Se não houver garantia desse parâmetro, a linearidade, a exatidão e a precisão estarão seriamente comprometidas (INMETRO, 2011; RIBANI et al., 2004).

### 11.2 LINEARIDADE E CURVA ANALÍTICA

A linearidade corresponde à capacidade do método de fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância em exame, dentro de uma determinada faixa de aplicação (RIBANI et al., 2004). A linearidade é obtida por padronização interna ou externa e formulada como expressão matemática usada para o cálculo da concentração do analito a ser determinado na amostra real. A equação da reta que relaciona as duas variáveis é:

$$y = a + bx$$

Sendo:

y = resposta medida (absorbância, altura ou área do pico, etc.)

x = concentração

a = interseção com o eixo y, quando x = 0

b = inclinação da curva analítica = sensibilidade.

O método é mais sensível quando pequenas variações de concentração resultam em maior variação na resposta, ou seja, maior inclinação (b) (INMETRO, 2011).

### 11.3 LIMITE DE DETECÇÃO

O limite de detecção (LOD) representa a menor concentração da substância em exame que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, utilizando um determinado procedimento experimental. Já o LOD do método é definido como a concentração mínima de uma substância medida e declarada com



95 a 99% de confiança de que a concentração do analito é maior que zero (RIBANI et al., 2004; INMETRO, 2011; ALBANO e RAYA-RODRIGUEZ, 2015).

#### 11.4 LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO

O limite de quantificação (LOQ), ou “Limite de Determinação”, corresponde normalmente ao padrão de calibração de menor concentração (excluindo o branco) (INMETRO, 2011). A determinação do LOQ representa um compromisso entre a concentração, a precisão e a exatidão exigidas. Isso significa que, quando decresce o nível de concentração do LOQ, a medição torna-se menos precisa (RIBANI et al., 2004). Pode ser obtido por diluição da solução “mãe” sobre a amostra real, até não se obter mais sinal analítico confiável, retornando à concentração anterior. Sendo esta confiável, é então aceita como o LOQ (LEITE, 2002).

#### 11.5 EXATIDÃO

Representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados em um determinado ensaio e um valor de referência aceito como verdadeiro (RIBANI *et al.*, 2004). A exatidão pode ser avaliada através dos ensaios de fortificação e recuperação de matriz branca (EUROPEAN COMMISSION, 2002).

#### 11.6 TENDÊNCIA/RECUPERAÇÃO/FORTIFICAÇÃO

Os processos normalmente utilizados para avaliar a tendência de um método são: uso de materiais de referência certificados (MRC), participação em comparações interlaboratoriais, comparação com método de referência (ou método validado) e realização de ensaios de recuperação. A tendência, quando aplicada a uma série de resultados de ensaio, implica numa combinação de componentes de erros aleatórios e sistemáticos. A determinação da tendência com relação aos valores de referência apropriados é importante no estabelecimento da rastreabilidade aos padrões reconhecidos.

#### 11.7 PRECISÃO (REPETIBILIDADE, PRECISÃO INTERMEDIÁRIA E REPRODUTIBILIDADE)

Normalmente determinada para circunstâncias específicas de medição, sendo comumente expressa através de três maneiras: repetibilidade, precisão intermediária

e reprodutibilidade. O desvio padrão e o coeficiente de variação são usados para a sua expressão.

**Repetibilidade:** Os ensaios com uma boa repetibilidade possuem baixos desvios sendo efetuados de maneira independentes com o mesmo método, com material de ensaio idêntico, no mesmo laboratório, pelo mesmo analista e utilizando o mesmo equipamento, assim como medições repetidas no mesmo objeto ou em objetos similares durante um curto período de tempo (INMETRO, 2011). A repetibilidade pode ser expressa quantitativamente em termos da característica da dispersão dos resultados e pode ser determinada por meio da análise de padrões, material de referência ou adição do analito ao branco da amostra, em várias concentrações na faixa de trabalho.

**Precisão Intermediária:** A precisão intermediária refere-se à precisão avaliada sob condições que compreendem o mesmo procedimento de medição, o mesmo local e medições repetidas no mesmo objeto ou em objetos similares, ao longo dum período extenso de tempo, mas pode incluir outras condições submetidas às mudanças (INMETRO, 2011). Nesse estudo, deve-se definir exatamente quais condições serão variadas (uma ou mais), tais como: diferentes analistas, diferentes equipamentos e diferentes tempos. Essa medida de precisão representa a variabilidade dos resultados em um laboratório.

**Reprodutibilidade:** Embora a reprodutibilidade não seja um componente de validação de método executado por um único laboratório, é considerada importante quando um laboratório busca a verificação do desempenho dos seus métodos em relação aos dados de validação obtidos por meio de comparação interlaboratorial.

## 11.8 EFEITO MATRIZ

O efeito matriz é a alteração ou interferência direta ou indireta na resposta de um instrumento, como por exemplo um espectrômetro HPLC-MS/MS, causado pela presença de analitos que não são de interesse na análise específica ou de outras substâncias interferentes nas amostras (UNODC, 2010).

## 11.9 ROBUSTEZ

A robustez de um método de ensaio mede a sensibilidade que este apresenta frente a pequenas variações experimentais. Um método pode ser considerado robusto se for insensível a essas variações (ALBANO e RAYA-RODRIGUEZ, 2015).

**CAPÍTULO III. Serological biomarkers of Zearalenone exposure in beef heifers receiving or not antimycotoxins additive**

**C. Tonini<sup>1</sup>, M.S. Oliveira<sup>1</sup>, E.B. Parmeggiani<sup>2</sup>, D.A.F. Sturza<sup>1</sup>, A.O. Mallmann<sup>1</sup>, M.I.B. Rubin<sup>2</sup> and C.A. Mallmann<sup>1\*</sup>**

De acordo com normas para publicação em: *World Mycotoxin Journal*

(Artigo submetido ao periódico *World Mycotoxin Journal* – Dez/2019)

<sup>1</sup>Laboratório de Análises Micotoxicológicas (LAMIC), Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), C.P 5011, 97105-970, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil; <sup>2</sup>Laboratório de Embriologia Animal (EMBRYOLAB), Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil; [mallmann@lamic.ufsm.br](mailto:mallmann@lamic.ufsm.br).

## Abstract

The inclusion of antimycotoxins additives (AMA) in the diet of production animals has been widely used to avoid mycotoxins exposure. In order to confirm the efficacy of such products *in vivo*, measurement of mycotoxins and/or their metabolites in biological fluids is preconized. This study aimed at determining the serological biomarkers of Zearalenone (ZEA),  $\alpha$ -zearalenol,  $\beta$ -zearalenol,  $\alpha$ -zearalanol,  $\beta$ -zearalanol ( $\beta$ -ZAL) and zearalanone, to evaluate the efficacy of an AMA in beef heifers. The trial lasted 37 days: 11 days of adaptation, 21 days of actual experiment, and 5 days of regression. Twenty-four heifers were randomly assigned to receive one of the following treatments (n=6/group): T1) basal diet (control); T2) basal diet + 5 mg/kg of ZEA; T3) basal diet + 5 mg/kg of ZEA + 2.5 kg/t of AMA; and T4) basal diet + 5 mg/kg of ZEA + 5.0 kg/t of AMA. Blood sampling was performed on different days after the diet was given. The samples were centrifuged to obtain the blood serum, and then analysed by Liquid Chromatography Coupled to Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS).  $\beta$ -ZAL was detected above the limit of quantification both in the unconjugated (>0.60  $\mu$ g/kg) and conjugated (>0.90  $\mu$ g/kg) forms. The remaining metabolites presented concentrations under the limit of detection. In the efficacy evaluation of the AMA, there was no significant difference ( $P>0.05$ ) between the treatments with and without additive at the tested levels of inclusion, demonstrating that the AMA did not mitigate exposure to the toxin. In the evaluation of ZEA exposure, there was significant difference ( $P<0.05$ ) between control and ZEA (5 mg/kg). Thus,  $\beta$ -ZAL may be employed as a biomarker of ZEA exposure via diet to evaluate the efficacy of an AMA through serological parameter. The technique applied in this study proved to be an adequate alternative for *in vivo* confirmation of the efficacy of products in adsorbing the toxin.

**Key-words:** additives, blood, clays, mass spectrometry, mycotoxins

## 1. Introduction

Zearalenone (ZEA) is a non-steroidal estrogenic mycotoxin that structurally resembles the estrogenic hormone, and is produced by several species of the genus *Fusarium* (EFSA, 2004a,b). These fungi may be found in cereal crops as rye, sorghum, wheat and maize as well as in pasture, silage and hay, all of which are commonly used in cattle feed (Minervini and Dell'aquila, 2008; Zinedine, 2007). Thus, since they ingest a wider variety of substrates which are prone to fungal contamination, cattle are more exposed to mycotoxins when compared to swine and poultry (O'Brien *et al.*, 2006).

After being ingested, ZEA undergoes hepatic biotransformation reactions which are catalysed by enzymatic systems that convert the toxin into the following metabolites:  $\alpha$ -zearalenol ( $\alpha$ -ZOL),  $\beta$ -zearalenol ( $\beta$ -ZOL),  $\alpha$ -zearalanol ( $\alpha$ -ZAL),  $\beta$ -zearalanol ( $\beta$ -ZAL) and zearalanone (ZAN) (Bottalico *et al.*, 1985). Based on these reactions, the interest in exploring the existence of metabolites in the conjugated and unconjugated forms arises (Malekinejad *et al.*, 2006). In bovines, ZEA is mainly metabolized into  $\beta$ -ZOL, which is considered the most toxic metabolite for this species (EFSA 2010, 2011; Malekinejad *et al.*, 2006). It triggers clinical signs with estrogenic properties (Mirocha and Christensen, 1974) such as reduction in productive performance, changes in the genital organs and reproductive problems like hyperestrogenism and infertility (Fink-Gremmels and Malekinejad, 2007).

The additive compounds derived from clay present a high affinity for some mycotoxins, with which they may form stable complexes and thus avoid or reduce systemic adsorption of

toxins; therefore, these are efficient and practical products to be added to the diet of production animals (Abb`Es *et al.*, 2007). According to the European Food Safety Authority (EFSA, 2012), *in vitro* tests and *in vivo* experiments are required to evaluate the efficacy of such additive compounds. The zootechnical parameters assessed in *in vivo* tests must be reported; nonetheless, these criteria are not sufficient to demonstrate the efficacy of substances in reducing the toxic effects caused by mycotoxins (De Baere *et al.*, 2012; EFSA, 2012; Gambacorta *et al.*, 2016). In order to have an *in vivo* confirmation of the binder's efficacy, it is necessary to measure the mycotoxins or their metabolites in biological fluids and/or tissues (EFSA, 2010). The evaluation of biomarkers in faeces/urine and/or their serum/blood concentration is thus preconized. In the case of ZEA, the concentrations of ZEA,  $\alpha$ -ZOL and  $\beta$ -ZOL should be analysed in blood serum, and/or the excretion of ZEA and its metabolites. There is also a need for further dose-response studies to improve the database regarding ruminants, and to substantiate a parameter of animal exposure to mycotoxins (EFSA, 2012).

Measurement of serological biomarkers which are specific of mycotoxins exposure represents a promising approach to evaluate the *in vivo* efficacy of an AMA. There is a paucity of information regarding ZEA and its metabolites in bovine blood serum (Winkler *et al.*, 2014, 2015). Therefore, the current study aimed to assess the use of serological biomarkers,  $\alpha$ -ZOL,  $\beta$ -ZOL,  $\alpha$ -ZAL,  $\beta$ -ZAL and ZAN, as indicators of ZEA exposure for diagnostic perspective in beef heifers, and to verify the efficacy of an additive through the relations between the levels of serological metabolites.

## 2. Materials and methods

### Animals, feed and experimental design

The following protocol was approved by the Ethics Commission on Animal Use of the Federal University of Santa Maria (protocol n° 5706070417). The experimental field occupied a 24-hectare area where the heifers were under continuous grazing of native grass and had unrestricted access to drinking water. The feed was supplemented in individual feeders at 1.8 kg/animal/day, being estimated at 0.7% of the average body weight (BW) of the lot to adjust losses. The isonutritive diets were formulated according to the NRC (2018) demands for the animal category; they were composed of 52% corn bran, 25% soybean meal, 20% wheat bran, 3% vitaminic/mineral premix and salt. A chemical-physical assay was conducted to obtain the data regarding the nutritional composition of the feed, including crude fibre, total fats (Instituto Adolfo Lutz, 2005), total protein, fixed mineral residue – ashes (MAPA, 1991), metabolizable energy and dry matter (Table 1).

**Table 1. Nutritional composition of the basal feed.**

Assay	Result	Unit	LOQ
Metabolizable energy	346.33	Kcal/100g	NE
Crude fiber	3.59	%	0.1
Total fats	2.8	g/100g	1.0
Dry matter	89.42	g/100g	NE
Total protein, foods	14.71	g/100g	0.15
Fixed mineral residue (ashes)	5.61	g/100g	0.07

LOQ: Limit of Quantification; NE: Not Specified.

Twenty-four Simental x Braford beef heifers ( $271 \pm 11.14$  kg; 2 years old) were selected for the tests. The trial lasted 37 days: 11 days of adaptation, 21 days of actual experiment, and 5 days of regression. The experimental design was entirely randomized, and the animals received one of the following treatments ( $n=6/\text{group}$ ): T1) basal diet (control); T2) basal diet + 5 mg/kg of ZEA; T3) basal diet + 5 mg/kg of ZEA + 2.5 kg/t of AMA; and T4) basal diet + 5 mg/kg of ZEA + 5.0 kg/t of AMA.

A pilot study was conducted to determine the level of ZEA to be used in this study. Different doses were tested (0, 5, 10 and 15 mg/ZEA/kg) in order to verify which one would trigger clinical signs. The aforementioned design is part of a study by Parmegianni (2018), in which the experimental diets and *in vivo* zootechnical assessments were describe. Clinical signs (vulvovaginitis) were observed at 5 mg/ZEA/kg. The AMA added to the heifers' diet contained modified bentonite, and the experiment followed the recommendations of the Ministry of Agriculture, Livestock, and Supply (MAPA) for registration and continuous use of AMA (MAPA, 2006).

### **Blood collection and samples preparation**

Blood was collected from all experimental groups within 24 h of diet administration on days 1, 5, 10, 15, 20 and 25. The samples remained at rest for 30 min and were then centrifuged (15 min, 2,500 rpm) to separate the blood serum; next, they were stored at  $-20$  °C. Prior analyses, the samples were thawed at room temperature for a maximum period of 1 h. In total, 144 blood samples were collected and 288 samples of blood serum were analysed so that the existence of ZEA metabolites in the conjugated and unconjugated forms could be explored.

### **Chemical products and reagents**

All standards ( $\alpha$ -ZAL,  $\beta$ -ZAL,  $\alpha$ -ZOL,  $\beta$ -ZOL and ZAN) with concentrations of 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  were diluted in mobile phases and acquired from Biopure (Tulln, Austria); they were stored according to the manufacturer's recommendations.

$\beta$ -glucuronidase Type HP-2 from *Helix pomatia* was acquired from Sigma-Aldrich (São Paulo, São Paulo); it was stored as indicated by the manufacturer ( $2-8$  °C). Sodium acetate buffer (pH = 5.5) was prepared by mixing 11 mL of an acetic acid solution (0.2 M) and 89 mL of sodium acetate (0.2 M).

The solvents which were used to prepare the mobile phases, as the aqueous (water and ammonium acetate) and the organic (methanol) phases, were of Liquid Chromatography Coupled to Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS) grade; they were purchased from J.T Baker (Mexico City, Mexico). Ultrapure water was obtained from a Milli-Q<sup>®</sup> Advantage A10 Water Purification System (Millipore, Bedford, MA, EUA).

### **Blood serum analysis**

Determination of the serological concentrations was performed via LC-MS/MS based on a method described by De Baere *et al.* (2012), with modifications being made in sample preparation and chromatographic configurations.

### **Determination of the unconjugated metabolites**

In a microtube, 750  $\mu\text{l}$  of acetonitrile was added to 250  $\mu\text{l}$  of blood serum; the sample was mixed in vortex (15 s) and then spun (10 min, 14,000 rpm). The supernatant was transferred to another tube and evaporated using nitrogen ( $\text{N}_2$ ) ( $\sim 50^\circ\text{C}$ ). The dry residue was reconstituted in 100  $\mu\text{l}$  of a mixture of water/methanol (50:50, v/v). Following vortex mixing for 1 min, the sample was centrifuged once again (10 min, 14,000 rpm,  $0^\circ\text{C}$ ). An aliquot of 40  $\mu\text{l}$  was injected and analysed through LC-MS/MS.

### Determination of the conjugated metabolites

In a microtube, 500  $\mu\text{l}$  of sodium acetate buffer (pH 5.5) and 25  $\mu\text{l}$  of  $\beta$ -glucuronidase Type HP-2 from *Helix Pomatia* were added to 250  $\mu\text{l}$  of blood serum. The tube was homogenized in vortex (15 s) and then incubated for 24 h at  $37^\circ\text{C}$ . Subsequently, 3 ml of acetonitrile were added and the sample was vortex mixed for 20 min and then spun (15 min, 4,000 rpm). The supernatant was collected and fully evaporated using a gentle  $\text{N}_2$  stream ( $\sim 50^\circ\text{C}$ ). The dry residue was reconstituted in 100  $\mu\text{l}$  of a water/methanol mixture (50:50, v/v). Following vortex mixing, the sample was centrifuged once more (10 min, 14,000 rpm,  $0^\circ\text{C}$ ). An aliquot of 40  $\mu\text{l}$  was injected and analysed via LC-MS/MS.

### Chromatography analysis coupled to tandem mass spectrometry

Chromatographic separation of the compounds was performed in a 1200 Series Infinity HPLC system (Agilent, Palo Alto, USA), with posterior detection in a triple quadrupole mass spectrometer 4000 QTRAP system (Applied Biosystems, Foster City, USA). A Zorbax SB-C18 column (4.6x150 mm, 5  $\mu\text{m}$  particle diameter) (Agilent, Palo Alto, USA) was used. Standards and samples were analysed using a mobile phase composed of ammonium acetate 0.1% (v/v) in water (solvent A), and ammonium acetate 0.1% (v/v) in methanol (Solvent B). Chromatographic analysis lasted 17 min, and the column was kept at  $40^\circ\text{C}$ .

### Analytical Quality Assurance

The limit of quantification (LOQ) and the limit of detection (LOD) were established by means of the signal-to-noise ratio (LOQ=10/1, LOD=3/1) to ensure analytical quality. Seven spiked replicates were analysed in three different concentrations for the analyte of interest to estimate recovery. Linearity was assessed through the coefficient of determination ( $R^2$ ) of the analytical curves of each compound, which was identified by its retention time (RT) and molecular mass (MM). Values of the analytical parameters are shown in Table 2.

**Table 2. Analytical parameters observed in the recovery studies.**

Analyte	MM	RT (min)	Analytical Curve ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	$R^2$	LOD ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	LOQ ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	Recovery (%)
$\alpha$ -ZAL	321	8.01	0.04-2.4	0.99	0.002	0.04	100
$\beta$ -ZAL	321	8.67	0.2-12	0.99	0.03	0.2	99
$\alpha$ -ZOL	319	8.21	0.2-12	0.98	0.16	0.2	99
$\beta$ -ZOL	319	8.81	0.3-18	0.98	0.23	0.3	98
ZAN	319	8.97	0.4-24	0.97	0.02	0.4	98

MM: Molecular mass RT: Retention time  $R^2$ : Determination coefficient.



## Statistical analysis

Descriptive statistics was applied for data analysis (mean and coefficient of variation). The means were compared through Analysis of Variance (ANOVA) using the Duncan's Test ( $P \leq 0.05$ ). The software Statgraphics Centurion XV<sup>®</sup> version 15.1 was employed to conduct the evaluations.

## 3. Results

### Biomarkers of ZEA exposure

The evaluated biomarkers of ZEA exposure were  $\alpha$ -ZAL,  $\beta$ -ZAL,  $\alpha$ -ZOL,  $\beta$ -ZOL and ZAN. The samples collected before feed administration and the control treatment (0 mg/ZEA/kg) did not express concentrations of ZEA biomarkers (<LOQ). After feeding, the concentrations found in the samples of groups T2, T3 and T4, which received ZEA, were below the LOQ for  $\alpha$ -ZAL,  $\alpha$ -ZOL and  $\beta$ -ZOL, and above the LOQ for  $\beta$ -ZAL; ZAN was not detected. Among the unconjugated (Table 3) and conjugated (Table 4) metabolites determined on days 1, 5, 10, 15, 20 and 25 of exposure,  $\beta$ -ZAL was found as the most predominant one.

**Table 3. Mean concentration of unconjugated metabolites in blood serum on different days of exposure to 5  $\mu$ g/ZEA/kg.**

	Days					
	1	5	10	15	20	25
$\alpha$ -ZAL	ND	D	D	D	D	D
$\beta$ -ZAL	ND	D	0.80	D	0.60	D
$\alpha$ -ZOL	ND	D	D	D	D	D
$\beta$ -ZOL	ND	D	D	D	D	D
ZAN	ND	ND	ND	ND	ND	ND

ND: not detected (<LOD); D: detected (>LOD and <LOQ); Value: >LOQ.

**Table 4. Mean concentration of conjugated metabolites in blood serum on different days of exposure to 5  $\mu$ g/ZEA/kg.**

	Days					
	1	5	10	15	20	25
$\alpha$ -ZAL	ND	D	D	D	D	D
$\beta$ -ZAL	ND	D	1.90	D	1.76	D
$\alpha$ -ZOL	ND	D	D	D	D	D
$\beta$ -ZOL	ND	D	D	D	D	D
ZAN	ND	ND	ND	ND	ND	ND

ND: not detected (<LOD); D: detected (>LOD and <LOQ); Value: >LOQ.

### Evaluation of AMA efficacy via serological parameter

In order to verify the efficacy of the tested binder, the biomarkers were measured 24 h after ingestion of ZEA along with the AMA (Groups T3 and T4). Of all biomarkers, only  $\beta$ -ZAL was measurable (>LOQ), with the concentrations of the conjugated and unconjugated forms being added (Table 5). Thus, an estimate of the binder's efficacy was made by comparing the

concentrations of the groups which received the additive (T3 and T4) with those of the group which was solely exposed to ZEA (T2). Results indicated that the bentonite-based additive tested at 2.5 and 5.0 kg/T was inefficient in adsorbing ZEA; it did not demonstrate the best capacity in reducing the concentration of  $\beta$ -ZAL ( $P>0.05$ ), with P values of 0.943 and 0.623 being observed on days 10 and 20, respectively (Table 5). Figure 1 shows a chromatogram of  $\beta$ -ZAL detection in blood serum with administration of ZEA (Group T2), and another of a blood serum sample with ZEA and the additive (Group T4).

**Figure 1.** Chromatograms of two samples of bovine blood serum with (A) and without (B) antimycotoxins additive.

**Table 5. Conjugated and unconjugated  $\beta$ -zearalanol in blood serum of heifers receiving diets containing Zearalenone (ZEA) and supplemented or not with antimycotoxins additive (AMA) ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ).**

Treatments	Days	
	10	20
Control	<LOQ	<LOQ
5 mg ZEA/kg	2.736	2.360
ZEA+2.5 kg/t/AMA	2.516	2.048
ZEA+5.0 kg/t/AMA	2.380	1.774
Mean	2.544	2.061
P-value	0.943	0.623

<LOQ: below the limit of quantification.

#### 4. Discussion

The serological concentrations of ZEA metabolites may be influenced by the dose of the ingested toxin, the feeding regimen and the animal metabolism (Khatoun and Abidin, 2012). Thus, the findings related to *not detected* (ND) and *detected* (<LOQ) metabolites (Tables 3 and 4) may have been affected by the ruminal metabolism. Besides the rumen, whose microbiota converts ZEA into less potent metabolites at lower levels of exposure (Diekman and Green, 1992), the liver and the intestinal mucosa also take part in the toxin's metabolization (Winkler *et al.*, 2014). In the European Union, ruminants are considered resistant production animals, which reflects in greater guidance values for the critical concentrations of ZEA and Desoxynivalenol (DON) in feed, according to the Regulation No 576/2006 (EC, 2006).

Detection of ZEA and its metabolites in bovine blood has been rarely reported. A study conducted by Whitlow and Hagler (1999) used DON as a biomarker of exposure to diets presenting fungi of the genus *Fusarium*. As a result, evaluation of ZEA or other fusariotoxins which are more toxic should have a greater approach via serological parameters. In the current study, the amount of ZEA given to each heifer with or without the inclusion of the binder was 5 mg ZEA/kg of feed. Such level was equivalent to 0.30 mg/ZEA in the total diet; considering that each heifer ingested around 1.8 kg/feed/day, the average ZEA ingestion was 9 mg/BW/day. This dose resulted in serological concentrations of metabolites which were close to the LOD (0.002-0.2  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) (Table 2).  $\beta$ -ZAL was the only metabolite to reach concentrations >LOQ in treatments T2, T3 and T4, ranging from 0.63-1.16  $\mu\text{g}/\text{kg}$  in the unconjugated form, and from 0.94-1.42  $\mu\text{g}/\text{kg}$  in the conjugated form. Such outcomes agree with those reported by Winkler *et al.* (2014): ingestion of ZEA by dairy cows ranged from

0.4-24.3  $\mu\text{g}/\text{kg}$  BW, with ZEA being detected close to the LOD (0.01 ng/mL) from 0.05 to 0.12 ng/mL in all blood serum samples, while ZEA metabolites were detected below the LODs. Contrastingly, Seeling *et al.* (2005) did not detect ZEA residues in blood serum of 14 dairy cows fed with 0.06 mg ZEA/kg of dry matter, most probably due to the greater LODs of the method employed (2 ng/g). In another study, the LOD of the method was 1 ng/g (Dänicke *et al.*, 2002), with ZEA metabolites being obtained under the LODs. According to this, the blood samples of the experiment described herein possibly had ZEA metabolites which were not detected due to the LOD differences of the used method. The LOD of  $\beta$ -ZOL, the main metabolite of ZEA in bovines, was higher than that of  $\beta$ -ZAL, which was the main metabolite found in the samples: 0.23 and 0.03  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , respectively. Such findings are in keeping with previously reported data (Seeling *et al.*, 2005; Winkler *et al.* 2014). Thus, as well as in Dänicke *et al.* (2002), the LOD of ZAN was smaller than the specified LODs. Detection of  $\beta$ -ZAL in the current study agrees with that described by Dänicke *et al.* (2002), who employed a method with a smaller LOD in association with lower concentrations of ZEA in the feed (0.1 mg ZEA/kg of feed), thus allowing for the detection of  $\alpha$ -ZAL and  $\beta$ -ZAL. According to published data (Dänicke *et al.*, 2002; Seeling *et al.*, 2005; Seeling *et al.*, 2006a and Winkler *et al.*, 2014, 2015), such serological concentrations may express exposure to ZEA via diet.

These variations in the detection of the metabolites also include the kinetics of the toxin and the different periods between feed consumption (ingested dose) and blood collection (Winkler *et al.*, 2014). In the protocol applied in this study, blood was collected 24 h following feeding. Toxicokinetic animal studies estimated the plasma elimination half-life of ZEA to be 2.63 h in swine (Dänicke *et al.*, 2005) and 31.8 min in broiler chickens (Osselaere *et al.*, 2013). Nonetheless, a thorough search of the relevant literature has not yielded any articles related to plasma elimination half-life of ZEA in bovines, hence the need to perform toxicokinetic assays in this species (Winkler *et al.*, 2014). The ingested dose is also a relevant factor. Winkler *et al.* (2014) found a ZEA ingestion of 7.2-26.0  $\mu\text{g}/\text{kg}$  BW; the relation between ZEA concentration in the feed and in the blood serum was calculated and a value below 0.01 of consumption was obtained. Thus, the greater ingestion of ZEA resulted in a greater serological concentration. Nonetheless, an uncertainty of 74% ( $r^2 = 0.2577$ ) clearly indicates that other factors contribute to the total variation of ZEA in the blood serum.

With respect to ZEA biotransformation (Tables 3 and 4), greater proportions of  $\beta$ -ZAL in the conjugated form were observed in comparison to the unconjugated one. This is consistent with the findings of Mirocha *et al.* (1981):  $\alpha$ -ZOL and  $\beta$ -ZOL conjugated with glucuronic acid were excreted as more than 50% of the total of ZEA residues. The estrogenic potential of ZEA is enhanced by its metabolism towards  $\alpha$ -ZAL,  $\alpha$ -ZOL and  $\beta$ -ZAL, caused by a greater affinity for the estrogenic receptors (Ueno and Tashiro, 1981). For Snawder and Lipscomb (2000), such differences between the proportions of the conjugated and unconjugated metabolites may be explained by phase I and phase II biotransformation reactions in the liver, respectively known as hydroxylation and glucuronidation. Such reactions are responsible for making the compounds less toxic and also hydrosoluble to favour excretion. These biotransformation routes occur concomitantly in the liver and intestine competing for substrates, especially after oral ingestion of the toxin (Biehl *et al.*, 1993, Malekinejad *et al.*, 2006). The glucuronidation reaction is able to biotransform the metabolites in a greater proportion, thus making presystemic elimination of the toxin easier while prolonging circulation of these compounds due to the enterohepatic recirculation (Biehl *et al.*, 1993). Nebbia (2001) claimed that significant differences occur between the species with regard to the hepatic biotransformation processes. In bovines, for instance, ZEA is predominantly converted into  $\beta$ -ZOL (Mirocha *et al.*, 1981). There is a paucity of scientific information

regarding the use of *in vivo* experimentation to assess ZEA metabolites in bovine serum, hence the importance of further studies on hepatic biotransformation of the toxin in this species.

A new functional group of feed additives was established through Commission Regulation 386/2209/EC of the European Commission (EC, 2009). In order to evaluate the adsorption efficacy of an additive, this study used the concentration of the biomarker  $\beta$ -ZAL ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) to have a quantitative comparison at serological level between groups T3 and T4 in reducing ZEA adsorption. Biomarkers have been used as a measure of the amount of mycotoxin adsorbed at the gastrointestinal level in *in vivo* trials with chickens and gilts as well as in population studies (Al-Jaal *et al.*, 2019; De Baere *et al.*, 2012; Gambacorta *et al.*, 2013, 2016). The dose of the ingested mycotoxin is correlated with the concentration of the circulating biomarker (Gambacorta *et al.*, 2016; Winkler *et al.*, 2014). For an AMA to be commercially available and widely added to the animal diet at 0.1-2%, it must undergo prior evaluation (EFSA, 2012). Most of these compounds are effective in adsorbing mycotoxins *in vitro*, but only a few studies confirm their efficacy *in vivo* (Gambacorta *et al.*, 2016; Grenier *et al.*, 2013; Meissonnier *et al.*, 2009).

Biomarkers have been employed to measure the efficacy of an AMA in adsorbing one (Dänicke *et al.*, 2007; Devreese *et al.*, 2012) or more (Avantaggiato *et al.*, 2005; Gambacorta *et al.*, 2016; Grenier *et al.*, 2013; Lauwers *et al.*, 2019) mycotoxins. In the case of adsorbing agents as bentonite, biomarkers have had their efficacy assessed in poultry and swine (Lauwers *et al.*, 2019), but not in beef heifers. The current study observed a greater decrease in  $\beta$ -ZAL in group T4 (5 kg/T of AMA) compared to group T3 (2.5 kg/T of AMA), but the reductions were not statistically significant. The obtained results (Table 5) may be explained by the level of inclusion of the additive and its physicochemical structure as well as by the mycotoxin being assessed (Bryden, 2012). The physicochemical properties of the mycotoxins such as polarity, solubility, size, shape and charge have a pivotal role in the complex processes of binding and adsorption (Prapapanpong *et al.*, 2019). Some *in vivo* and *in vitro* assays evaluated bentonite against ZEA and detected a low efficacy. This demonstrates that the hydrophilic surface of these compounds is less effective in adsorbing mycotoxins which have a low polarity, as ZEA (Pappas *et al.*, 2014; Parmeggiani, 2018; Prapapanpong *et al.*, 2019; Rejeb *et al.*, 2019). ZEA has a phenolic derivative in its constitution which is chemically described as water insoluble ( $\text{pH}<8$ ), being little adsorbed by compounds constituted of bentonite in the gastrointestinal tract (Avantaggiato *et al.*, 2005; Pappas *et al.*, 2014; Rejeb *et al.*, 2019). *In vivo* tests assessed the efficacy of adsorbents using polymeric glucomannan, activated charcoal, cholestyramine, yeast and bentonite cell walls, aluminosilicate, calcium montmorillonite and clay cell walls. Of these, only calcium montmorillonite and yeast cell wall presented a good capacity of adsorbing Aflatoxin B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>) and Fumonisin B<sub>1</sub> (FB<sub>1</sub>) in the gastrointestinal tract and thus reduce their distribution to blood and target tissues in rats (Firmin *et al.*, 2010; Gambacorta *et al.*, 2016; Mitchell *et al.*, 2014; Robinson *et al.*, 2012). In swine, the use of biomarkers allowed to demonstrate that commercial organophilic clay was not efficient in reducing the gastrointestinal adsorption of mycotoxins, excepting for FB<sub>1</sub> and partially ZEA; nonetheless, the reductions were not statistically significant (Gambacorta *et al.*, 2016). These data evidence that bentonite has affinity in adsorbing aflatoxins but not ZEA. Aflatoxins are characterized as planar aromatic molecules which are relatively hydrophilic and have a very strong adsorption tendency on planar surfaces. ZEA, in turn, is a macrocyclic molecule which is much more hydrophobic than aflatoxins (Avantaggiato *et al.*, 2005). A product consisting of a mixture of the clay with yeast enzymes and mineral adsorbents was tested against ZEA in dairy cows. The additive

compounds which have an enzymatic base show a greater efficacy in altering ZEA molecule, hydrolysing its lactonic ring and resulting in a toxicity-free product (Zouagui *et al.*, 2017). Another adsorbent product containing polymeric glucomannan was tested in piglets in an attempt to alleviate the adverse effects of *Fusarium* toxins, but it did not demonstrate to be effective (Dänicke *et al.*, 2007). As described above, several studies assess the inclusion of AMA in the animal diet; however, few compounds have demonstrated efficacy in ZEA adsorption.

A variety of additive compounds which contain bentonite were tested *in vitro* and *in vivo* regarding their ability to sequester the toxins of the gastrointestinal tract. Clays may be employed as feed additives to adsorb and minimize the bioavailability of the mycotoxins if they fill the criteria of a good decontamination (Lauwers *et al.*, 2019). Thus, *in vivo* efficacy testing of an AMA employing biomarkers must be fully conducted (EFSA, 2012). In Brazil, such assays follow specific protocols set by MAPA. Therefore, the adsorbing agent must be tested for each mycotoxin in every species so that its registration along with the technical documentation that guarantees its harmlessness can be obtained (MAPA, 2006). The current product underwent *in vivo* and *in vitro* testing, being approved for aflatoxins; hence the interest in evaluating it against ZEA. The protocol applied in this study may be used to identify the *in vivo* efficacy of additives, and to select the best additives and the mycotoxin(s) that may be adsorbed by them. Serological exposure to ZEA offered via diet may also be provided and toxicokinetic animal studies may be conducted. Besides, no reports have been found in the literature with respect to the evaluation of an AMA through serological parameter in bovines; so, further research on the issue is required.

## 5. Conclusions

$\beta$ -ZAL was the main blood metabolite in the analyzed samples (>LOQ). It may thus be characterized as the biomarker of choice for ZEA exposure through diet, being used to evaluate the efficacy of an AMA via serological parameter in beef heifers. The technical approach used in this research allowed to establish the quantitative performance of the ZEA adsorbing agent in heifers. As regards ZEA bioavailability in blood serum, further studies are required to gather information on bentonite clay for adsorption of this mycotoxin in heifers. Nevertheless, in order to have more blood samples with increasing concentrations of the toxin and its metabolites, new kinetic studies with doses-response must be developed in bovines to generate additional knowledge about ZEA and its plasma half-life.

## Acknowledgments

We would like to thank Comissão de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for providing graduate fellowship to C. Tonini.

## References

Abb`Es, S., Ouanes, Z., Salah-Abb`Es, J.B., Abdel-Wahhab, M.A., Oueslati, R. and Bacha, H., 2007. Preventive role of aluminosilicate clay against induction of micronuclei and chromosome aberrations in bone-marrow cells of Balb mice treated with Zearalenone. *Mutation Research* 631: 85-92.

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

Avantaggiato, G., Solfrizzo, M. and Visconti, A., 2005. Recent advances on the use of adsorbent materials for detoxification of *Fusarium* mycotoxins. *Food Additives and Contaminants* 22: 379-388.

Biehl, M.L., Prelusky, D.B., Koritz, G.D., Hartin, K.E., Buck, W.B. and Trenholm, H.L., 1993. Biliary excretion and enterohepatic cycling of zearalenone in immature pigs. *Toxicology and Applied Pharmacology* 121: 152-159.

Bottalico, A., Visconti, A., Logrieco, A., Solfrizzo, M. and Mirocha, C.J., 1985. Occurrence of zearalenols (diastereomeric mixture) in corn stalk rot and their production by associated *Fusarium* species. *Applied and Environmental Microbiology* 49: 547-551.

Bryden, W.L., 2012. Mycotoxin contamination of the feed supply chain: Implication for animal productivity and feed security. *Animal Feed Science and Technology* 173: 134-158.

Dänicke, S., Gädeken, D., Ueberschär, K.-H., Meyer, U. and Scholz, H., 2002. Effects of *Fusarium* toxin contaminated wheat and of a detoxifying agent on performance of growing bulls, on nutrient digestibility in wethers and on the carry over of zearalenone. *Archives of Animal Nutrition* 56: 245-261.

Dänicke, S., Goyarts, T. and Valenta, H., 2007. On the specific and unspecific effects of a polymeric glucomannan mycotoxin adsorbent on piglets when fed with uncontaminated or with *Fusarium* toxins contaminated diets. *Archives of Animal Nutrition* 61:266-275.

Dänicke, S., Swiech, E., Buraczewska, L. and Ueberschär, K.H., 2005. Kinetics and metabolism of zearalenone in young female pigs. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 89: 268-276.

De Baere, S., Osselaere, A., Devreese, M., Vanhaecke, L., De Backer, P. and Croubels, S., 2012. Development of a liquid–chromatography tandem mass spectrometry and ultra-high-performance liquid chromatography high resolution mass spectrometry method for the quantitative determination of zearalenone and its major metabolites in chicken and pig plasma. *Analytica Chimica Acta* 756: 37-48.

Devreese, M., Osselaere, A., Goossens, J., Vandenbroucke, V., De Baere, S., Eeckhout, M., De Backer, P. and Croubels, S., 2012. New bolus models for in vivo efficacy testing of mycotoxin-detoxifying agents in relation to EFSA guidelines, assessed using deoxynivalenol in broiler chickens. *Food Additives & Contaminants* 29: 1101-1107.

Diekman, M.A. and Green, M.L., 1992. Mycotoxins and reproduction in domestic livestock. *Journal of Animal Science* 70: 1615-1627.

European Commission (EC), 2006. Commission Regulation (EC) No 576/2006 of 17 August 2006 on the presence of deoxynivalenol, zearalenone, ochratoxin A, T-2 and HT-2 and fumonisins in products intended for animal feeding. *Official Journal of the European Union L* 229: 7-9.

European Commission (EC), 2009. Commission Regulation (EC) No 386/2009 of 12 May 2009 of the European Parliament and of the Council as regards the establishment of a new functional group of feed additives. Official Journal of the European Union L 118: 66.

European Food Safety Authority (EFSA), 2004a. Opinion of the scientific panel on contaminants in the food chain on a request from the commission related to deoxynivalenol as undesirable substance in animal feed. The European Food Safety Authority Journal 73: 1-42.

European Food Safety Authority (EFSA), 2004b. Opinion of the scientific panel on contaminants in the food chain on a request from the commission related to zearalenone as undesirable substance in animal feed. The European Food Safety Authority Journal 89: 1-35.

European Food Safety Authority (EFSA), 2010. Statement on the establishment of guidelines for the assessment of additives from the functional group 'substances for reduction of the contamination of feed by mycotoxins'. The European Food Safety Authority Journal 8: 1-8.

European Food Safety Authority (EFSA), 2011. Panel on Contaminants in the Food Chain: Scientific opinion on the risks for public health related to the presence of zearalenone in food. The European Food Safety Authority Journal 9: 1-124.

European Food Safety Authority (EFSA), 2012. Scientific opinion: Guidance for the preparation of dossiers for technological additives. Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed. The European Food Safety Authority Journal 10: 1-23.

Fink-Gremmels, J. and Malekinejad, H., 2007. Clinical effects and biochemical mechanisms associated with exposure to the mycoestrogen zearalenone. *Animal Feed Science and Technology* 137: 326-341.

Firmin, S., Gandia, P., Morgavi, D. P., Houin, G., Jouany, J. P., Bertin, G. and Boudra, H., 2010. Modification of aflatoxin B1 and ochratoxin A toxicokinetics in rats administered a yeast cell wall preparation. *Food Additives & Contaminants* 27: 1153-1160.

Gambacorta, L., Pinton, P., Avantaggiato, G., Oswald, I. P. and Solfrizzo, M., 2016. Grape Pomace, an Agricultural Byproduct Reducing Mycotoxin Absorption: In Vivo Assessment in Pig Using Urinary Biomarkers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 64: 6762-6771.

Gambacorta, L., Solfrizzo, M., Visconti, A., Powers, S., Cossalter, A. M., Pinton, P. and Oswald, I.P., 2013. Validation study on urinary biomarkers of exposure for aflatoxin B1, ochratoxin A, fumonisin B1, deoxynivalenol and zearalenone in piglets. *World Mycotoxin Journal* 6: 299-308.

Grenier, B., Bracarense, A.P.F.L., Schwartz, H.E., Lucioli, J., Cossalter, A.M., Moll, W.D.; Schatzmayr, G. and Oswald, I.P., 2013. Biotransformation approaches to alleviate the effects induced by *Fusarium* mycotoxins in swine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 61: 6711-6719.

Instituto Adolfo Lutz, 2005. Métodos físico-químicos para análise de alimentos: normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz. ANVISA 22: 1-12.

Khatoon, A. and Abidin, Z.U., 2012. Ruminant microflora, mycotoxin inactivation by ruminant microflora and conditions favouring mycotoxicosis in ruminants: a review. *International Journal of Veterinary Science* 1: 37-44.

Lauwers, M., Croubels, S., Letor, B., Gougoulas, C. and Devreese, M., 2019. Biomarkers for Exposure as a Tool for Efficacy Testing of a Mycotoxin Detoxifier in Broiler Chickens and Pigs. *Toxins* 187: 1-21.

Malekinejad, H., Maas-Bakker, R. and Fink-Gremmels, J., 2006. Species differences in the hepatic biotransformation of zearalenone. *The Veterinary Journal* 172: 96-102.

Meissonnier, G.M., Raymond, I., Laffitte, J., Cossalter, A.M., Pinton, P., Benoit, E., Bertin, G., Galtier, P. and Oswald, I.P., 2009. Dietary glucomannan improves the vaccinal response in pigs exposed to AFB1 or T-2 toxin. *World Mycotoxin Journal* 2: 161-172.

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), 2006. Grupo de Trabalho sobre Micotoxinas em produtos destinados à alimentação animal. *Diário Oficial da União* 2: 5-8.

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), 1991. Manual de métodos oficiais para análises microbiológicas para alimentos. *Coordenação Geral de Laboratório Animal* 2: 111-113.

Minervini, F. and Dell'aquila, M.E., 2008. Zearalenone and reproductive function in farm animals. *International Journal of Molecular Sciences* 9: 2570-2584.

Mirocha, C.J. and Christensen, C.M., 1974. Fungus metabolites toxic to animals. *Annual Review of Phytopathology*, 12: 303-330.

Mirocha, C.J., Pathre, S.V. and Robison, T.S., 1981. Comparative metabolism of zearalenone and transmission into bovine milk. *Food and Cosmetics Toxicology* 19: 25-30.

Mitchell, N.J., Xue, K.S., Lin, S., Marroquin-Cardona, A., Brown, K.A., Elmore, S.E., Tang, L., Romoser, A., Gelderblom, W.C.A., Wang, J.S. and Phillips, T.D., 2014. Calcium montmorillonite clay reduces AFB1 and FB1 biomarkers in rats exposed to single and co-exposures of aflatoxin and fumonisin. *Journal of Applied Toxicology* 34: 795-804.

Nebbia, C., 2001. Biotransformation enzymes as determinants of xenobiotic toxicity in domestic animals. *Veterinary Journal* 161: 238-252.

Nutrient Requirements of Beef Cattle (NRC), 2018 Washington: National Academy of Science, University of Arkansas, United States Department of Agriculture and County Governments Cooperating 8: 1-28.

O'Brien, M., Nielsen, K.F., O'kiely, P., Forristal, P.D., Fuller, H.T. and Frisvad, J.C., 2006. Mycotoxins and other secondary metabolites produced *in vitro* by *Penicillium paneum* Frisvad and *Penicillium roqueforti* Thom isolated from baled grass silage in Ireland. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54: 9268-9276.

Osselaere, A., Devreese, M., Goossens, J., Vandenbroucke, V., De Baere, S., De Backer, P. and Croubels, S., 2013. Toxicokinetic study and absolute oral bioavailability of



deoxynivalenol, T-2 toxin and zearalenone in broiler chickens. *Food and Chemical Toxicology* 51: 350-355.

Pappas, A.C., Tsiplakou E., Georgiadou, M., Anagnostopoulos, C., Markoglou, A.N., Liapis, K. and Zervas, G., 2014. Bentonite binders in the presence of mycotoxins: Results of *in vitro* preliminary tests and an *in vivo* broiler Trial. *Applied Clay Science* 99: 48-53.

Parmeggiani, E.B., 2018. Aspectos fisiopatológicos da reprodução de novilhas submetidas a dietas contendo zearalenona com e sem aditivo antimicotoxina. *Universidade Federal de Santa Maria* 1: 1-57.

Prapapanpong, J., Udomkunsri, P., Mahavorasirikul, W., Choochuay, S. and Tansaku, N., 2019. *In vitro* studies on gastrointestinal monogastric and avian models to evaluate the binding efficacy of mycotoxin adsorbents by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Advanced Veterinary and Animal Research* 6: 125-132.

Rejeb, R., Antonissen, G., De Boevre, M., Detavernier, C., Van de Velde, M., De Saeger, S., Ducatelle, R., Hadj, M.A. and Ghorbal, A., 2019. Calcination Enhances the Aflatoxin and Zearalenone Binding Efficiency of a Tunisian Clay. *Toxins* 602: 1-14.

Seeling, K., Dänicke, S., Ueberschär, K.H., Lebzien, P. and Flachowsky, G., 2005. On the effects of Fusarium toxin-contaminated wheat and the feed intake level on the metabolism and carryover of zearalenone in dairy cows. *Food Additives & Contaminants* 22: 847-855.

Seeling, K., Dänicke, S., Valenta, H., Egmond, H.P.V., Schothorst, R.C., Jekel, A.A., Lebzien, P., Schollenberger, M., Razzazi-Fazeli, E. and Flachowsky, G., 2006a. Effects of Fusarium toxin-contaminated wheat and feed intake level on the biotransformation and carry-over of deoxynivalenol in dairy cows. *Food Additives & Contaminants* 23: 1008-1020.

Snawder, J.E. and Lipscomb, J.C., 2000. Interindividual variance of cytochrome P450 forms in human hepatic microsomes: correlation of individual forms with xenobiotic metabolism and implications in risk assessment. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 32: 200-209.

Ueno, Y. and Tashiro, F., 1981. a-zearalenol, a major hepatic metabolite in rats of zearalenone, an oestrogenic mycotoxin of Fusarium species. *Journal of Biochemistry* 89: 563-571.

Whitlow, L.W. and Hagler, W.M., 1999. An association of mycotoxins with production, health and reproduction in dairy cattle and guidelines for prevention and treatment. *Biotechnology in the Feed Industry: Proceedings of Alltech's 15th Annual Symposium, Nottingham, UK*, 29: 401-419.

Winkler, J., Kersten, S., Meyer, U., Engelhardt, U. and Dänicke, S., 2014. Residues of zearalenone (ZEN), deoxynivalenol (DON) and their metabolites in plasma of dairy cows fed Fusarium contaminated maize and their relationships to performance parameters. *Food and Chemical Toxicology* 65: 196-204.

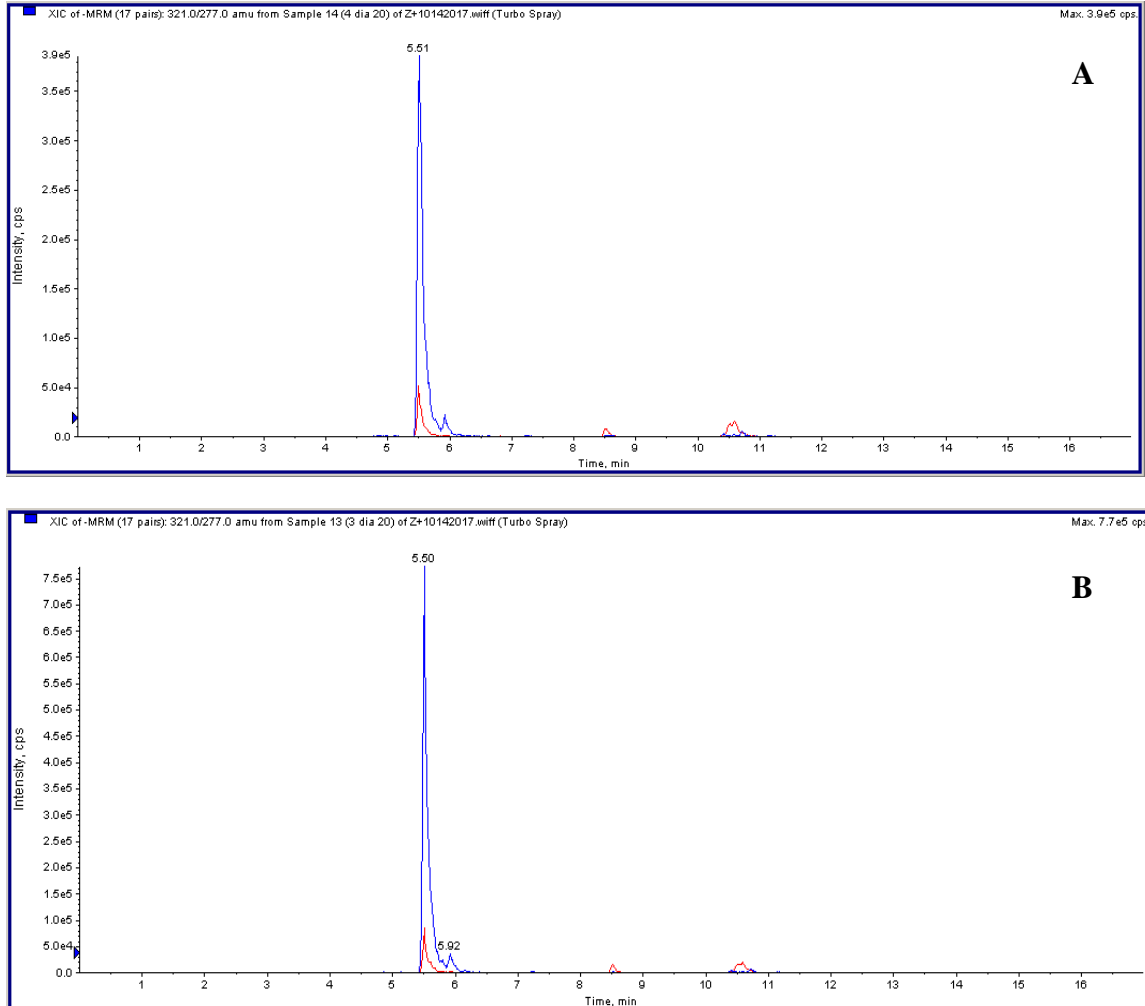
Winkler, J., Kersten, S., Meyer, U., Stinshoff, H., L. Locher, L., Rehage, J., Wrenzycki, C., Engelhardt, U.H. and Danicke, S., 2015. Diagnostic opportunities for evaluation of the exposure of dairy cows to the mycotoxins deoxynivalenol (DON) and zearalenone (ZEN):

reliability of blood plasma, bile and follicular fluid as indicators. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 99: 847-855.

Zinedine, A., Soriano, J.M., Moltó, J.C. and Manés J., 2007. Review on the toxicity, occurrence, metabolism, detoxification, regulations and intake of zearalenone: an oestrogenic mycotoxin. *Food and Chemical Toxicology* 45: 1-18.

Zouagui, Z., Asrar, M., Lakhdissi, H. and Abdennebi, E.H., 2017. Prevention of mycotoxin effects in dairy cows by adding an anti-mycotoxin product in feed. *Journal of Materials and Environmental Sciences* 8: 3766-3770.

**Figure 1.** Chromatograms of two samples of bovine blood serum with (A) and without (B) antimycotoxins additive.



**CAPÍTULO 4. Effects of chronic Zearalenone exposure on zootechnical performance, reproductive tract and serological biomarkers in gilts fed diets with or without antimycotoxins additive**

**Camila Tonini<sup>a</sup>, Diego Artemio Franco Sturza<sup>b</sup>, Maurício Schneider Oliveira<sup>b</sup>,  
Luciane Gressler<sup>c</sup>, Carlos Augusto Mallmann<sup>a</sup>.**

De acordo com normas para publicação em: *Animal feed science and Technology*

(Artigo a ser submetido ao periódico)

<sup>a</sup>Laboratório de Análises Micotoxicológicas – LAMIC, Santa Maria, Brazil.

<sup>b</sup>Instituto Samitec – Soluções Analíticas, Microbiológicas e Tecnológicas, Santa Maria, Brazil.

<sup>c</sup>Independent Veterinary Researcher, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil.

## Abstract

Antimycotoxins additives (AMA) have been included in the diet of production animals to avoid mycotoxins exposure. According to the European Union, the efficacy of such products must be confirmed by assessment of zootechnical parameters and determination of mycotoxins and/or their metabolites in biological fluids. This study was conducted in pre-pubertal gilts and aimed: (a) to evaluate Zearalenone (ZEA) toxicity and the efficacy of montmorillonite clay (MC) on the prevention of ZEA adverse effects; and (b) to investigate the applicability of using biomarkers of ZEA for diagnostic of exposure as well as the efficacy of AMA via serological parameter. Seventy weaned gilts with an average initial body weight (BW) of  $9.2 \pm 0.82$  kg were distributed in seven feeding groups ( $n=10/\text{treatment}$ ) receiving diets with two levels of three clay-based AMAs, 0.25% and 0.50%, and three levels of ZEA, 0, 0.75 and 1 mg/kg, for 42 days. Initial and final BW, mean daily weight gain, mean daily feed intake, feed conversion and vulva volume were assessed, and blood sampling was performed to determine ZEA and its metabolites in the serum. Blood samples were spun to obtain the serum, which was analysed via High Performance Liquid Chromatography Coupled to Tandem Mass Spectrometry (HPLC-MS/MS). In the end of the experimental period, the animals were slaughtered and eviscerated in order to evaluate weight and length of the reproductive tract. Results showed that the zootechnical performance was not affected by the presence of ZEA in the feed, and that the level of AMA inclusion did not result in determine any changes ( $P>0.05$ ). ZEA caused a significant increase ( $P<0.05$ ) in BW, length of the reproductive tract and vulva measurement (width, length and area), with no difference ( $P>0.05$ ) between AMA treatments. With respect to the evaluated metabolites, ZEA and  $\alpha$ -zearalenol were detected above the limit of quantification: the former only in the conjugated form ( $>0.5 \mu\text{g}/\text{kg}$ ) and the latter in both conjugated ( $>1.58 \mu\text{g}/\text{kg}$ ) and unconjugated ( $>0.15 \mu\text{g}/\text{kg}$ ) forms. The concentration of the additional metabolites was below the limit of detection, thus confirming the results of the efficacy of AMA ( $P<0.05$ ). All in all, evaluation of AMA using an animal model and serological biomarkers has the potential to confirm the efficacy of products in adsorbing the toxin *in vivo*.

**Key-words:** additives; biomarkers; efficacy; exposure; HPLC-MS/MS.

## 1. Introduction

Zearalenone (ZEA) is a non-steroidal estrogenic mycotoxin produced by numerous fungi species of the genus *Fusarium* which occur globally in several food crops, mainly in corn and its by-products (Zinedine et al., 2007; Karlovsky et al., 2016). Swine are generally more sensitive to ZEA exposure (Devreese et al., 2012); doses of 1 to 3 mg ZEA/kg of feed resulted in multiple alterations in the reproductive tract (Avantaggiato et al., 2003; Shier et al., 2011). In view of that, there is a need for further studies assessing the effects of low concentrations of this mycotoxin (<1 mg ZEA/kg) in swine (Wang et al., 2012).

After being ingested, ZEA undergoes hepatic biotransformation reactions which are catalysed by enzymatic systems; the mycotoxin is thus converted into the following metabolites:  $\alpha$ -zearalenol ( $\alpha$ -ZOL),  $\beta$ -zearalenol ( $\beta$ -ZOL),  $\alpha$ -zearalanol ( $\alpha$ -ZAL),  $\beta$ -zearalanol ( $\beta$ -ZAL) and zearalanone (ZAN). Such reactions are divided into phase I and phase II, and result in conjugated and unconjugated metabolites (Bottalico et al., 1985; Malekinejad et al., 2006; Lawers et al., 2019). In swine,  $\alpha$ -ZOL presents an estrogenic activity which is three to four times greater than that of the toxin itself (Zinedine et al., 2007; Wang et al., 2012), thus causing a drop in reproductive performance, alterations in the genital organs and reproductive problems as hyperestrogenism and infertility (Doll and Danicke, 2011).

Such effects may be minimized with the addition of antimycotoxins additives (AMA) to the feed (Doll et al., 2005). Binders adsorb mycotoxins on their surface and thus reduce absorption from the gastrointestinal tract (TGI) into the blood circulation and target organs (Prapapanpong et al., 2019). Adsorption has been assessed in several studies using clay products like aluminosilicate, hydrated sodium calcium aluminosilicate, bentonite, montmorillonite, smectite, and zeolite, all of which have good binding efficiency to mycotoxins (Papaioannou et al., 2005; Kang'Ethe et al., 2017). The European Food Safety Authority (EFSA) has established guidelines for *in vitro* and *in vivo* tests that must be conducted in order to confirm the efficacy of these products. Literature reports generally describe the efficacy of such materials based on unspecific parameters as weight of organs, feed intake and zootechnical performance. Nowadays, specific efficacy studies based on adsorption, distribution, metabolism and excretion are preconized (EFSA, 2012). Specific biomarkers present in body fluids as blood serum and urine are also used to measure exposure to single mycotoxins and to conduct toxicokinetic assays (Kolossova, 2011; De Baere et al., 2012; Devreese et al., 2012).

Thus, this study was conducted in pre-pubertal gilts (a) to evaluate toxicity of low levels of ZEA given chronically via feed and the efficacy of montmorillonite clay (MC) on the prevention of the toxin's adverse effects, and (b) to investigate the applicability of using biomarkers for diagnostic of exposure as well as the efficacy of an AMA via serological parameter.

## 2. Materials and methods

This experiment was conducted with the approval of the Ethics Committee on Animal Experimentation of the Federal University of Santa Maria (registration n° 1311091017).

### 2.1 Feed, inclusion of Zearalenone and montmorillonite clay

The isonutritive feed were prepared with corn, soybean meal and a vitaminic/mineral premix (Table 1); they were formulated according to the model and recommendations of

Nutrient Requirements of Swine (1998). The corn was obtained from Instituto de Soluções Analíticas, Microbiológicas e Tecnológicas Ltda - SAMITEC (Santa Maria, Brazil). ZEA was added to the basal diet (Table 1) at 0.75 and 1 mg ZEA/kg feed. Three types of MC (MC1, MC2 and MC3) were used at 0.50 and 0.25 kg/T.

**Table 1.** Nutritional levels of the experimental feeds.

Nutrients	Feed (1-42 days)
Crude protein (%)	21.00
Metabolizable energy (Kcal/g)	3280
Calcium (%)	0.85
Phosphorus (%)	0.45
Sodium (%)	0.23
Methionine (%)	0.35
Methionine + Cystine (%)	0.63
Lysine (%)	1.20
Threonine (%)	0.85
Lactosis (%)	5.00

## 2.2 Mycotoxicological analysis of the basal feed

The feed was screened for the presence of Aflatoxins (AFLA), Fumonisin (FUM), ZEA and Trichothecenes (TRCs) (Deoxynivalenol-DON, Diacetoxyscirpenol and T-2 Toxin) through High Performance Liquid Chromatography Coupled to Tandem Mass Spectrometry (HPLC-MS/MS) as in Raymond et al. (2003). The limit of detection (LOD) was (in  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ): 1 for AFLA, 0.1 for ZEA and TRCs, and 0.25 for FUM. ZEA was not detected in the basal diet ( $<\text{LOD}$ ), and its levels in the experimental diets were as established in the experimental protocol, *i.e.*, 0.75 and 1  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . The remaining toxins were below the LOD.

## 2.3 Experimental design, animals and installations

Seventy genetically homogeneous pre-pubertal gilts ( $9.2 \pm 0.82$  kg) which resulted from industrial crossing were randomly distributed in 7 treatments (Table 2) and trialled for 42 days.

**Table 2.** Levels of Zearalenone and montmorillonite clay added to the basal diet to compose the seven treatments given to pre-pubertal gilts for 42 days.

T	N	ZEA (mg/kg)	MC1 (%)	MC2 (%)	MC3 (%)
1	10	0	0	0	0
2	10	1	0	0	0
3	10	1	0.5	0	0
4	10	1	0	0.5	0
5	10	1	0	0	0.5
6	10	0.75	0	0	0
7	10	0.75	0	0.25	0

T: treatments; N: numbers of animals; ZEA: Zearalenone; MC: montmorillonite clay.

The gilts were given *ad libitum* access to feed and water throughout the experimental period. They were individually placed in elevated stalls (1.50 x 1.37 x 0.80 m) fitted with semiautomatic feeders and automatic nipple watering system, and maintained in a 16:8-h light-dark cycle and a relative humidity of 60-65%. Temperature was kept within the thermal comfort zone for the species according to the phase of development: 28-30 °C in the first week, and 23-25 °C from the second week onwards.

#### 2.4 Zootechnical variables

Mean body weight (BW) and feed intake (FI) were weekly assessed throughout the experiment to determine average daily gain (ADG), average daily intake (ADI) and feed conversion (FC). Vulva morphology was evaluated by means of a pachymeter; measurements of the vertical and horizontal distances as well as depth were taken every 7 days. Vulva volume was estimated by multiplying these three measurements and adjusting the result to the average metabolic body weight ( $BW^{0.6}$ ) for each week. At the end of the experiment and after 6h of fasting, the animals were electrically stunned, slaughtered and eviscerated. The reproductive tract was weighed and longitudinally measured (from the cranial portion of the longest uterine horn to the most distal end of the vulva).

#### 2.5 Blood sampling

Blood samples were taken after the diet was provided on days 1, 7, 14, 21, 28, 35 and 42, along with the vulva morphology assessment. BD Vacutainer<sup>®</sup> serum separation tubes with clot activator were used to obtain the serum. The samples were spun (5,000 rpm, 15 min), then the serum was evenly distributed in microtubes and stored at -20 °C.

#### 2.6 Chemical products and reagents

Standards (ZEA,  $\alpha$ -ZAL,  $\beta$ -ZAL,  $\alpha$ -ZOL,  $\beta$ -ZOL and ZAN) with concentrations of 10  $\mu$ g/ml were diluted in mobile phases and purchased from Biopure (Tulln, Austria). The material was stored according to the specifications provided by the manufacturer.

$\beta$ -glucuronidase Type HP-2 from *Helix pomatia* was obtained from Sigma-Aldrich (São Paulo, São Paulo); it was stored as recommended by the manufacturer (2-8 °C). Sodium acetate buffer (pH = 5.5) was prepared by mixing 11 mL of an acetic acid solution (0.2 M) and 89 mL of sodium acetate (0.2 M).

The solvents used to prepare the mobile phases, as the aqueous (water and ammonium acetate) and the organic (methanol) phases, were of HPLC-MS/MS grade. These substances were acquired from J.T Baker (Mexico City, Mexico). Ultrapure water was obtained from a Milli-Q<sup>®</sup> Advantage A10 Water Purification System (Millipore, Bedford, MA, EUA).



## 2.7 Blood serum analysis

Serological concentrations were determined by HPLC-MS/MS according to De Baere et al. (2012), with modifications in sample preparation and chromatographic configurations.

## 2.8 Determination of the unconjugated metabolites

750  $\mu\text{l}$  of acetonitrile was added to 250  $\mu\text{l}$  of blood serum in a microtube, which was vortexed (15 s) and centrifuged (14,000 rpm, 10 min). The supernatant was placed in another tube and evaporated using nitrogen ( $\text{N}_2$ ) ( $\sim 50^\circ\text{C}$ ). The dry residue was reconstituted in 100  $\mu\text{l}$  of a mixture of water/methanol (50:50, v/v). Vortex mixing was performed for 1 min, then the sample was spun once again (14,000 rpm, 10 min,  $0^\circ\text{C}$ ). An aliquot of 40  $\mu\text{l}$  was injected and analysed through HPLC-MS/MS.

## 2.9 Determination of the conjugated metabolites

500  $\mu\text{l}$  of sodium acetate buffer (pH 5.5) and 25  $\mu\text{l}$  of  $\beta$ -glucuronidase Type HP-2 from *Helix Pomatia* were added to 250  $\mu\text{l}$  of blood serum in a microtube, which was homogenized in vortex (15 s) and then incubated for 24 h at  $37^\circ\text{C}$ . Next, 3 ml of acetonitrile were added and the sample was vortex mixed for 20 min and then centrifuged (4,000 rpm, 15 min). The supernatant was collected and fully evaporated using a gentle  $\text{N}_2$  stream ( $\sim 50^\circ\text{C}$ ). The dry residue was reconstituted in 100  $\mu\text{l}$  of a water/methanol mixture (50:50, v/v). After vortex mixing, the sample was spun once more (10 min, 14,000 rpm,  $0^\circ\text{C}$ ). An aliquot of 40  $\mu\text{l}$  was injected and analysed by HPLC-MS/MS.

## 2.10 Chromatography analysis coupled to tandem mass spectrometry

Chromatographic separation of the compounds was performed in a 1200 Series Infinity HPLC system (Agilent, Palo Alto, USA), with subsequent detection in a triple quadrupole mass spectrometer 4000 QTRAP system (Applied Biosystems, Foster City, USA). A Zorbax SB-C18 column (4.6x150 mm, 5  $\mu\text{m}$  particle diameter) (Agilent, Palo Alto, USA) was used. Standards and samples were analysed using a mobile phase composed of ammonium acetate 0.1% (v/v) in water (solvent A), and ammonium acetate 0.1% (v/v) in methanol (Solvent B). Chromatographic analysis lasted 17 min, and the column was kept at  $40^\circ\text{C}$ .

## 2.11 Analytical Quality Assurance

The limit of quantification (LOQ) and the limit of detection (LOD) were determined by means of the signal-to-noise ratio (LOQ=10/1, LOD=3/1) to guarantee analytical quality. Seven spiked replicates were analysed in three different concentrations for the analyte of interest to estimate recovery. Linearity was assessed through the coefficient of determination

( $R^2$ ) of the analytical curves of each compound, which was identified by its retention time (RT) and molecular mass (MM). Values of the analytical parameters are shown in Table 3.

**Table 3.** Analytical parameters observed in the recovery studies.

Analyte	MM	RT (min)	Analytical Curve ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	$R^2$	LOD ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	LOQ ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	Recovery (%)
ZEA	317	7.05	0.2-12	0.99	0.02	0.3	99
$\alpha$ -ZAL	321	8.01	0.04-2.4	0.99	0.002	0.04	100
$\beta$ -ZAL	321	8.67	0.2-12	0.99	0.03	0.2	99
$\alpha$ -ZOL	319	8.21	0.2-12	0.98	0.16	0.2	99
$\beta$ -ZOL	319	8.81	0.3-18	0.98	0.23	0.3	98
ZAN	319	8.97	0.4-24	0.97	0.02	0.4	98

MM: Molecular mass; RT: Retention time;  $R^2$ : Coefficient of Determination.

## 2.12 Statistical analyses

Descriptive statistics was used for data analysis (mean and coefficient of variation). The means were compared via Analysis of Variance (ANOVA) through the Duncan's Test ( $P \leq 0.05$ ). Evaluations were performed with the software Statgraphics Centurion XV<sup>®</sup> version 15.1.

## 3. Results

### 3.1. Zootechnical performance

No differences in the assessed zootechnical parameters (kg/day) were seen between treatments with the inclusion of ZEA and/or MC in the diet ( $P > 0.05$ ) (Table 4).

**Table 4.** Effect of Zearalenone on the zootechnical performance of pre-pubertal gilts receiving or not montmorillonite clay.

<b>T</b>	<b>BW 0</b>	<b>CV</b>	<b>BW 42</b>	<b>CV</b>	<b>ADG</b>	<b>CV</b>	<b>ADI</b>	<b>CV</b>	<b>FC</b>	<b>CV</b>
<b>1</b>	9.09	8.5	39.31	4.2	0.708	5.9	1.244	4.1	1.743	3.2
<b>2</b>	9.33	8.6	40.18	4.6	0.735	4.0	1.248	3.1	1.700	2.6
<b>3</b>	9.09	10.0	38.30	5.6	0.695	6.1	1.251	3.2	1.790	4.0
<b>4</b>	9.14	11.0	38.11	6.7	0.690	8.1	1.236	3.2	1.747	5.6
<b>5</b>	9.12	8.1	39.30	6.5	0.733	5.1	1.260	2.3	1.698	3.1
<b>6</b>	9.36	9.8	40.49	5.4	0.726	7.5	1.248	4.4	1.714	5.5
<b>7</b>	9.59	7.4	39.68	4.2	0.717	4.2	1.251	1.8	1.749	4.8
<b>Mean</b>	9.24	9.07	39.34	5.30	0.715	5.8	1.249	3.2	1.734	4.1
<b>F-Ratio</b>	0.4925		1.6727		1.6723		0.2912		1.8527	
<b>P-Value</b>	<b>0.8116</b>		<b>0.1434</b>		<b>0.1432</b>		<b>0.9386</b>		<b>0.1037</b>	

T: Treatments; BW: Body weight (kg); CV: Coefficient of variation; ADG: Average daily gain; ADI: average daily intake; FC: Feed conversion.

### 3.2. Weight and length of the reproductive tract

There was an increase in weight and length of the reproductive tract with the addition of both levels of ZEA to the diet ( $P < 0.05$ ).

**Table 5.** Effect of Zearalenone on weight (g) and length (cm) of the reproductive tract of pre-pubertal gilts receiving or not montmorillonite clay.

<b>T</b>	<b>RWRT</b>	<b>CV</b>	<b>LRT</b>	<b>CV</b>
<b>1</b>	2.044	19.7	53.79	13.1
<b>2</b>	3.274	24.3	66.80	13.5
<b>3</b>	3.314	24.2	64.65	11.6
<b>4</b>	3.508	16.4	65.60	7.7
<b>5</b>	2.903	17.3	63.40	12.7
<b>6</b>	3.140	15.3	67.61	13.3
<b>7</b>	3.372	17.6	61.85	14.1
<b>Mean</b>	3.079	19.3	63.39	12.3
<b>F-Ratio</b>	3.7575		2.6674	
<b>P-Value</b>	<b>0.0032</b>		<b>0.0234</b>	

T: Treatments; RWRT: Relative weight of the reproductive tract; LRT: Length of the reproductive tract; CV: Coefficient of variation.

### 3.3. Vulva morphology

Vulva volume was greater ( $P < 0.05$ ) with the addition of ZEA on days 0, 7, 14, 21, 28, 35 and 42 of exposure. No statistical difference was detected between the groups receiving MC ( $P > 0.05$ ).

**Table 6.** Effect of Zearalenone on vulva volume ( $\text{mm}^3/\text{Kg PV}^{0.6}$ ) of pre-pubertal gilts receiving or not montmorillonite clay.

T	VV0	CV	VV7	CV	VV14	CV	VV21	CV	VV28	CV	VV35	CV	VV42	CV
1	593.8	38.5	826.9	23.4	2341.8	20.3	1183.0	22.1	1651.0	18.2	5507.2	69.6	5037	72.8
2	610.9	39.4	3141.9	59.6	11210.4	47.3	9256.8	60.1	16888.4	66.4	22167.4	58.5	29256.9	52.2
3	620.1	37.8	2736.7	62.4	9787.1	44.2	9974.4	48.4	18623.4	59.5	19950	30.7	27655.9	11.8
4	630.1	38.3	1913.2	43.8	7800.5	29.4	6506.5	41.2	11983.0	50.4	19140.6	38.4	25303.1	35.6
5	641.9	39.6	2713.6	34.5	8517.6	20.8	8099.3	41.4	10955.7	14.7	21311.7	38.4	26846.2	35.2
6	658.2	40.0	2582.1	56.4	9248.2	38.8	9082.5	44.5	13088.2	35.8	18535.9	27.7	26358.1	28.7
7	667.8	39.7	2441.7	47.6	8652.1	32.4	7477.0	38.4	11345.6	22.1	20857.6	35.5	25738.6	11.3
Mean	631.8	39.0	2336.6	46.8	8222.5	33.3	7368.5	42.3	12076.5	38.2	18210.1	42.7	23742.3	35.4
F-Ratio	<b>0.1123</b>		<b>3.241</b>		<b>6.5114</b>		<b>5.1852</b>		<b>4.5705</b>		<b>5.3185</b>		<b>8.02032</b>	
P-Value	<b>0.9947</b>		<b>0.008</b>		<b>&lt;0.0001</b>		<b>0.0002</b>		<b>0.0008</b>		<b>0.0002</b>		<b>&lt;0.0001</b>	<b>1</b>

T: Treatments; VV: Vulva volume; CV: Coefficient of variation.

### 3.4. Serological biomarkers of Zearalenone exposure

The biomarkers of ZEA exposure determined in this study were ZEA,  $\alpha$ -ZAL,  $\beta$ -ZAL,  $\alpha$ -ZOL,  $\beta$ -ZOL and ZAN. These biomarkers were not found in samples collected before feed administration. After feeding, the concentrations found in the samples of groups T2, T3, T4, T5, T6 and T7, which received ZEA (0.75 and 1 mg/kg), were below the LOQ for  $\alpha$ -ZAL,  $\beta$ -ZAL and  $\beta$ -ZOL, and above the LOQ for  $\alpha$ -ZOL and ZEA; ZAN was not detected. Among the unconjugated (Table 7) and conjugated (Table 8) metabolites assessed on days 1, 7, 14, 21, 28, 35 and 42 of exposure, ZEA and  $\alpha$ -ZOL were found as the most predominant ones.

**Table 7.** Mean concentration of unconjugated metabolites in blood serum on different days of exposure to 1  $\mu$ g/ZEA/kg.

	Days						
	1	7	14	21	28	35	42
ZEA	ND	D	D	D	D	D	D
$\alpha$ -ZAL	ND	D	D	D	D	D	D
$\beta$ -ZAL	ND	D	D	D	D	D	D
$\alpha$ -ZOL	ND	0.15	0.22	0.26	0.70	0.56	0.66
$\beta$ -ZOL	ND	D	D	D	D	D	D
ZAN	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

ND: not detected (<LOD); D: detected (>LOD and <LOQ); Value: >LOQ.

**Table 8.** Mean concentration of conjugated metabolites in blood serum on different days of exposure to 1  $\mu$ g/ZEA/kg.

	Days						
	1	7	14	21	28	35	42
ZEA	ND	0.5	1.2	1.4	0.89	0.90	0.89
$\alpha$ -ZAL	ND	D	D	D	D	D	D
$\beta$ -ZAL	ND	D	D	D	D	D	D
$\alpha$ -ZOL	ND	2.9	1.9	2.72	2.69	2.18	1.58
$\beta$ -ZOL	ND	D	D	D	D	D	D
ZAN	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

ND: not detected (<LOD); D: detected (>LOD and <LOQ); Value: >LOQ.

### 3.5. Evaluation of antimycotoxins additive efficacy via serological parameter

The biomarkers were measured after ZEA ingestion along with the AMA to assess the efficacy of the tested binder. So, an estimate of the product's efficacy was made by comparing the concentrations of the groups which received AMA with those of the groups fed the ZEA-only diet. The findings showed that the montmorillonite clay additive tested at 2.5 and 5.0 kg/t was inefficient in adsorbing ZEA; it did not demonstrate the best capacity in reducing the concentration of  $\alpha$ -ZOL ( $P>0.05$ ).

## 4. Discussion

### 4.1 Zootechnical performance

Inclusion of ZEA at 0.75 and 1 mg/kg to the diet of pre-pubertal gilts did not alter ADG, ADI, FC or BW (Table 4). Such outcomes agree with those reported in Hauschild et al. (2007): lower doses of ZEA did not affect diet digestibility or protein and energy metabolism in swine. Similarly, oral exposure to higher doses of ZEA (10 mg/kg) did not influence FC, ADG, FI or growth rate in weaned gilts (James e Smith, 1982; Young e King, 1986; Green et al., 1990; Speranda et al., 2006). However, Jiang et al. (2010a) found that ADG and FI of post-weaning gilts were increased by 1.0 mg ZEA/kg inclusion in the diet; the authors suggest that this effect may have contributed to the greater weight of kidney, liver and reproductive tract. Levels of ZEA capable of causing changes in zootechnical variables have not yet been described. However, the present results indicate that chronic exposure to ZEA at 0.75 and 1 mg/kg did not trigger harmful effects on the zootechnical performance of pre-pubertal gilts.

Regarding the inclusion of AMA in the gilt's feed, no significant difference ( $P<0.05$ ) was observed on the evaluated variables of zootechnical performance. Jin et al., 2017, in turn, found that growth and feed intake of piglets were improved by the addition of a mycotoxin binder (1 kg/ton feed) to the contaminated diet.

### 4.2 Reproductive tract and vulva volume

Results of the reproductive tract variables (Tables 5 and 6) indicate significant difference between control and ZEA treatments ( $P<0.05$ ), which may be explained by ZEA's flexibility in spatial conformation as well as by its hepatic biotransformation products. This allowed ZEA to compete with the estrogenic hormone (17- $\beta$ -estradiol) for cytoplasmic estrogenic receptors in uterine, hypothalamic, hypophyseal and mammary glands cells, thus inducing an increase in weight and length of the reproductive tract (Kuiper-Goodman et al.,

1987). Increased protein synthesis was also observed, thus resulting in swollen vulvas (Diekman e Green, 1992; Malekinejad et al., 2006).

The current findings are in keeping with those of an early study which described tumefaction of the vulva in ZEA-fed gilts (0.2, 0.4 and 0.8 mg/ZEA/kg). The initial clinical signs, vulval reddening and swelling, were reported to have appeared within 7 days after the first contact with ZEA (1.5-2 mg/ZEA/kg) (Rainey et al., 1990). Likewise, Cheng et al. (2006) and Jiang et al. (2010a) disclosed that continuous exposure of young gilts to 0.25 and 1 mg ZEA/kg for 24 and 36 days led to hyperestrogenism (enlarged vulva, vulvovaginitis and ovarian alterations).

#### 4.3 *In vivo* assessment of antimycotoxins additive

The AMAs evaluated in this investigation were not efficient in adsorbing ZEA. The following factors greatly influence the efficiency of an AMA in adsorbing mycotoxins: total charge and charge distribution, the size of the pores and surface area. Clays are generally more efficient in binding small-sized polar molecules (Huwig et al., 2001; Kabak et al., 2006). ZEA, in turn, is a fairly non-polar mycotoxin and has a more spherical molecular geometry than the planar surface of Aflatoxin B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>), for example (Avantaggiato et al., 2003). Physico-chemical properties of the mycotoxins, such as polarity, solubility, size, form and charge, also affect the efficacy of adsorption. They play an important role in the formation of binding complexes between the toxin and the additive (Varga and Toth, 2005). The latter authors examined ZEA affinity to organophilic montmorillonite and stated that the adsorption mechanism at neutral pH involved hydrophobic attraction of the mycotoxin into the interlayer and multisite binding of the anionic form to hydroxyl groups on the edge of the clay. Ochratoxin A (OTA), which is a polyaromatic molecule, is more hydrophobic than ZEA when unionized but with two weak acid groups, a carboxyle and a phenol (Boudergue et al., 2009).

*In vivo* assays have investigated the effect of clays on ZEA adsorption in swine and observed that these unmodified minerals do not effectively adsorb it (Hauschild et al., 2007; Jiang et al., 2010ab; Wang et al., 2012). Such findings are in accordance with those in Avantaggiato et al. (2003): the clay would not prevent neither reduce the toxicity of mycotoxins produced by fungi of the genus *Fusarium* as FUM, TRCs and ZEA. On the other hand, MC has been shown to sequester ZEA in the digestive tract, thus leading to a reduced adsorption of the toxin in the small intestine and to a decrease in its estrogenic effect upon vulva swelling in post-weaning gilts (Jiang et al., 2010ab). Other clays have also been efficient against ZEA. Papaioannou et al. (2002), for instance, reported that the zootechnical performance of gilts was enhanced by the inclusion of zeolites in ZEA-contaminated diets (0.16-1.55 mg/ZEA/kg). In this context, Jiang et al. (2012) demonstrated a dose-dependent relationship between the dose of a bentonite-based additive and the adsorbing effect; the lowest concentrations of AMA included in the feed, 1 and 2 g/kg, only partially reduced the effects caused by the addition of 1 mg/kg ZEA to the diet. Nonetheless, such findings could not be reproduced by Frobose et al. (2016) and Döll et al. (2005). Some authors claim that high doses of ZEA may explain the lack of efficacy of AMA in adsorbing the toxin during simultaneous administration.

In order to be commercially released, an adsorbent agent must be tested for each mycotoxin in every species so that its registration along with the technical documentation that guarantees its harmlessness can be obtained (MAPA, 2006). The products assessed in this study were subjected to *in vivo* and *in vitro* testing; they were approved for AFLA, which prompted their evaluation against ZEA. Clay minerals are mycotoxins binders which reduce intestinal adsorption by acting as adsorbents or sequestering materials (Juan-Juan et al., 2010). Nevertheless, the different molecular structures of AMAs and mycotoxins make

adsorption more difficult (Grenier et al., 2017). Thus, the presence of enzymes in an AMA may become an alternative to degrade or transform the adsorbed mycotoxins in less toxic metabolites (Devreese et al., 2013). Therefore, the combination of products with adsorbing characteristics may have the potential to adsorb mycotoxins with a reduced polarity as ZEA.

#### 4.4 Evaluation of antimycotoxins additive efficacy via serological parameter

Results concerning the concentrations of ZEA and its metabolites (Tables 7 and 8) may be influenced by the ingested dose of the toxin, the feeding regime and the animal metabolism (Fink-Gremmels, 2008; Khatoon et al., 2012). Thus, after ingestion, ZEA is promptly absorbed by the TGI cells (Ramos et al., 1996), with an estimate adsorption of 85% in swine (Biehl et al., 1993). In this investigation, efficacy of AMA at 2.5 and 5.0 kg/T was determined by monitoring serological biomarkers in pre-pubertal gilts. Thus, possible biomarkers for efficacy assessment were measured via HPLC-MS/MS. A limited number of studies have explored monitoring of biomarkers to determine AMA efficacy (Dänicke et al., 2001; Devreese et al., 2012). Devreese et al. (2012) and Osselaere et al. (2012) used DON, and Dänicke et al. (2001) selected ZEA and  $\alpha$ -ZOL as biomarkers of efficacy in broilers, whereas Di Gregorio et al. (2017) tested AFB<sub>1</sub>-lysine in swine. Devreese et al. (2012) and Di Gregorio et al. (2017) examined the influence of an AMA for a single mycotoxin in one biological matrix, blood serum. Gambacorta et al. (2016), in turn, tested the efficacy of four agricultural by-products and two commercial binders against multiple mycotoxins: Fumonisin B<sub>1</sub>, DON, ZEA, OTA and AFB<sub>1</sub>. Moreover, Gambacorta et al. (2016), Devreese et al. (2012), Osselaere et al. (2012) and Dänicke et al. (2001) did not include phase II metabolites as possible biomarkers in their analyses. Thus, the current survey determined the most adequate biomarker (mycotoxin or phase I and II metabolites) to test the efficacy of AMA against ZEA in pre-pubertal gilts. As a result, ZEA and  $\alpha$ -ZOL presented concentrations above LOQ after ZEA ingestion via diet; such findings agree with those reported in De Baere et al. (2012).

According to Snawder and Lipscomb (2000), differences between the proportions of the conjugated and unconjugated metabolites may be explained by phase I and phase II biotransformation reactions in the liver; these reactions are respectively known as hydroxylation and glucuronidation, and make the compounds hydrosoluble to enhance excretion. Only a few studies used phase II biomarkers in different matrices (feces and urine) to evaluate toxin exposure. Lauwers et al. (2019) identified ZEA-glucuronide (ZEA-GlcA) as the best biomarker in swine plasma; in dried feces, the highest concentration of ZEA was found being excreted after 24 h. Such late excretion may be attributed to the enterohepatic cycling of ZEA (Malekinejad et al., 2006). Similar findings were seen by Binder et al. (2017), who reported ZEA and  $\alpha$ -ZOL excretion in lyophilized feces after ZEA administration. ZEA and ZEA-GlcA were the metabolites detected at the highest concentrations in piglets' urine, and they were mainly excreted in the first 24h; ZEA-GlcA was considered the ideal biomarker. Likewise, Binder et al. (2017) observed that the greatest part of the ingested dose of ZEA was excreted in the urine as ZEA-GlcA in the first 24h after ingestion. The above-mentioned data are in accordance with the present findings: conjugated ZEA and  $\alpha$ -ZOL were the most predominant circulating metabolites after ZEA ingestion. The metabolites' concentrations are also influenced by the kinetics of the toxin and the different time between feed consumption (ingested dose) and blood sampling (Winkler et al., 2014). ZEA is detected in the circulation of swine 30 min after exposure via diet at concentrations which are similar to those found in the TGI (Biehl et al., 1993; Gajecki et al., 2010). In the current assessment, blood sampling was performed 15 min after feeding, as described in Danicke et al. (2005). Toxicokinetic assays estimated the plasma elimination half-life of ZEA to be 2.63 h in swine (Dänicke et al., 2005).

The protocol used in this study may be used to identify the efficacy of AMA via biomarkers and to select the best additives and the mycotoxins that can be absorbed by them. Serological exposure of feed-administered ZEA may also be provided, and toxicokinetic studies may be conducted in animals.

## 5. Conclusions

*In vivo* tests are essential to evaluate the efficacy of an AMA; nonetheless, this research showed that it is possible to evaluate it through zootechnical parameters and biomarkers. The metabolite  $\alpha$ -zearalenol was the biomarker present in a greater proportion in pre-pubertal gilts. This study also proposes to diagnose mycotoxicosis at an individual level, demonstrating the dose of response and specificity for a target mycotoxin; this is an innovation, since analysis of feed and its ingredients is the commonly used protocol.

## Acknowledgments

We would like to thank Comissão de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for providing graduate fellowship to C. Tonini.

## References

- Avantaggiato, G., Havenaar, R., Visconti, A., 2003. Assessing the zearalenone-binding activity of adsorbent materials during passage through a dynamic *in vitro* gastrointestinal model. *Food and Chemical Toxicology*. 41, 1283-1290.
- Bottalico, A., Visconti, A., Logrieco, A., Solfrizzo, M., Mirocha, C.J., 1985. Occurrence of zearalenols (diastereomeric mixture) in corn stalk rot and their production by associated *Fusarium* species. *Applied and Environmental Microbiology*. 49, 547-551.
- Boudergue, C., Burel, C., Dragacci, S., Favrot, M.C., Fremy, J.M., Massimi, C., Prigen, P., Debongnie, P., Pussemier, L., Boudra, H., Morgavi, D., Oswald, I., Perez, A., Avantaggiato, G., 2009. Review of mycotoxin-detoxifying agents used as feed additives: mode of action, efficacy and feed/food safety. External Scientific Report Submitted to EFSA.
- Cheng, Y.H., Weng, C.F., Chen, B.J., Chang, M.H., 2006. Toxicity of different *Fusarium* mycotoxins on growth performance, immune responses and efficacy of a mycotoxin degrading enzyme in pigs. *Animal Research*. 55, 579-590.
- De Baere, S., Osselaere A., Devreese, M., Vanhaecke, L., De Backer, P., Croubels, S., 2012. Development of a liquid-chromatography tandem mass spectrometry and ultra-high-performance liquid chromatography high-resolution mass spectrometry method for the quantitative determination of zearalenone and its major metabolites in chicken and pig plasma. *Analytica Chimica Acta*. 756, 37-48.
- Devreese, M., De Baere, S., De Backer, P., Croubels, S., 2012. Quantitative determination of several toxicological important mycotoxins in pig plasma using multi mycotoxin and analyte-specific high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometric methods. *Journal of Chromatography A*. 1257, 74-80.



Diekman, M.A., Green, M.L., 1992. Mycotoxins and reproduction in domestic livestock. *Journal of Animal Science*. 70, 1615-1627.

Döll, S., Gericke, S., Dänicke, S., Raila, J., Ueberschär, K.H., Valenta, H., Schnurrbusch, U., Schweigert, F.J., Flachowsky, G., 2005. The efficacy of a modified aluminosilicate as a detoxifying agent in *Fusarium* toxin contaminated maize containing diets for piglets. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*. 89, 342-358.

Döll, S., Dänicke, S., 2011. The *Fusarium* toxins deoxynivalenol (DON) and zearalenone (ZON) in animal feeding. *Preventive Veterinary Medicine*. 102, 132-145.

European Food Safety Authority (EFSA), 2012. Scientific opinion: Guidance for the preparation of dossiers for technological additives. Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed. *The European Food Safety Authority Journal*. 10, 1-23.

Fink-Gremmels, J., Malekinejad, H., 2007. Clinical effects and biochemical mechanisms associated with exposure to the mycoestrogen zearalenone. *Animal Feed Science and Technology*. 137, 326-341.

Green, M.L., Diekman, M.A., Malayer, J.R., 1990. Effect of prepubertal consumption of zearalenone on puberty and subsequent reproduction of gilts. *Journal of Animal Science*. 68, 171-178.

Hauschild, L., Lovatto, P.A., Lehnen, C.R., 2007. Digestibilidade e metabolismo de dietas de suínos contendo zearalenona com adição de organoaluminossilicato. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. 42, 219-224.

Huwig, A., Freimund, S., Kappeli, O., Dutler, H., 2001. Mycotoxin detoxification of animal feed by different adsorbents. *Toxicology Letters*. 122, 179-88.

James, L.J., Smith, T.K., 1982. Effect of dietary alfalfa on zearalenone toxicity and metabolism in rats and swine. *Journal of Animal Science*. 55, 110-118.

Jiang, S.Z., Yang, Z.B., Yang, W.R., Gao, J., Liu, F.X., Chen, C.C., Chi, F., 2010b. Physiopathological effects of zearalenone in post-weaning female piglets with or without montmorillonite clay adsorbent. *Livestock Science*. 131, 130-136.

Jiang, S.Z., Yang, Z.B., Yang, W.R., Yao, B.Q., Zhao, H., Liu, F.X., Chen, C.C., Chi, F., 2010a. Effects of feeding purified Zearalenone contaminated diets with or without clay enterosorbent on growth, nutrient availability, and genital organs in post-weaning female pigs. *Journal of Animal Science*. 23, 74-81.

Jin, L.; Wang, W.; Degroote, J.; Van Noten, N.; Yan, H.; Majdeddin, M.; Van Poucke, M.; Peelman, L.; Goderis, A.; Van De Mierop, K., 2017. Mycotoxin binder improves growth rate in piglets associated with reduction of toll-like receptor-4 and increase of tight junction protein gene expression in gut mucosa. *Journal of Animal Science and Biotechnology*. 8, 80-87.

Kabak, B., Dobson, Ad., Var, I., 2006. Strategies to prevent mycotoxin contamination of food and animal feed: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 46, 593-619.

Kang'ethe, E.K., Sirma, A.J., Murithi, G., Mburugu-Mosoti, C.K., Ouko, E.O., Korhonen, H.J., Nduhiu, G.J., Mungatu, J.K., Joutsjoki, V., Lindfors, E., 2017. Occurrence of mycotoxins in food, feed, and milk in two counties from different agro-ecological zones and with historical outbreak of aflatoxins and fumonisins poisonings in Kenya. *Food Quality and Safety*. 1, 161-169.

Karlovsky, P., Suman, M., Berthiller, F., De Meester, J., Eisenbrand, G., Perrin, I., Dussort, P., 2016. Impact of food processing and detoxification treatments on mycotoxin contamination. *Mycotoxin Research*. 32, 179-205.

Kolosova, A., Stroka, J., 2011. Substances for reduction of the contamination of feed by mycotoxins: a review. *World Mycotoxin Journal*. 4, 225-256.

Kuiper-Goodman, T., Scott, P.M., Watanabe, H., 1987. Risk assessment of the mycotoxin zearalenone. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 7, 253-306.

Lauwers, M., Croubels, S., Letor, B., Gougoulis, C., Devreese, M., 2019. Biomarkers for exposure as a tool for efficacy testing of a mycotoxin detoxifier in broiler chickens and pigs. *Toxins*. 187, 1-21.

Malekinejad, H., Maas-Bakker, R., Fink-Gremmels, J., 2006. Species differences in the hepatic biotransformation of zearalenone. *The Veterinary Journal*. 172, 96-102.

NRC, 1998. *Nutrient Requirements of Swine*, 10th revised edn. National Research of Council. Washington, DC.

Papaioannou, D., Katsoulos, P.D., Panousis, N., Karatzias, H., 2005. The role of natural and synthetic zeolites as feed additives on the prevention and/or the treatment of certain farm animal diseases: A review. *Microporous and Mesoporous Materials*. 84, 161-170.

Prapapanpong, J., Udomkusonsri, P., Mahavorasirikul, W., Choochuay, S., Tansakul, N., 2019. In vitro studies on gastrointestinal monogastric and avian models to evaluate the binding efficacy of mycotoxin adsorbents by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Advanced Veterinary and Animal Research*. 6, 125-132.

Rainey, M.R., Tubbs, R.C., Bennett, L.W., 1990. Prepubertal exposure to dietary zearalenone alters hypothalamo-hypophysial function but does not impair postpubertal reproductive function of gilts. *Journal of Animal Science*. 68, 2015-2022.

Raymond, S.L., Smith, T.K., Swamy, H.V.L.N., 2003. Effects of feeding a blend of grains naturally contaminated with *Fusarium* mycotoxins on feed intake, serum chemistry, and hematology of horses, and the efficacy of a polymeric glucomannan mycotoxin adsorbent. *Journal of Animal Science*. 81, 2123-2130.

Shier, W.T., Shier, A.C., Xie, W., Mirocha, C.J., 2001. Structure-activity relationships for human estrogenic activity in zearalenone mycotoxins. *Toxicol*. 39, 1435-1438.

Speranda, M., Liker, B., Speranda, T., Seri, C, V., Antunovi, C, Z., Grabarevi, C.Z., SenCi, C,D., Grguri, C.D., Steiner, Z., 2006. Haematological and biochemical parameters of weaned

piglets fed on fodder mixture contaminated by zearalenone with addition of clinoptilolite. *Acta Veterinaria Belgrade*. 56, 121-136.

Varga, J., Toth, B., 2005. Novel strategies to control mycotoxins in feeds: a review. *Acta Veterinaria Hungarica*. 53, 189-203.

Wang, J.P., Chi, F., Kim, I.H., 2012. Effects of montmorillonite clay on growth performance, nutrient digestibility, vulva size, faecal microflora, and oxidative stress in weaning gilts challenged with zearalenone. *Animal Feed Science and Technology*. 178, 158-166.

Young, L.G., King, G.J., 1986. Low concentrations of zearalenone in diets of boars for a prolonged period of time. *Journal of Animal Science*. 63, 1197–1200.

Zinedine, A., Soriano, J.M., Molto, J.C., Manes, J., 2007. Review on the toxicity, occurrence, metabolism, detoxification, regulations and intake of zearalenone: an oestrogenic mycotoxin. *Food and Chemical Toxicology*. 45, 1-18.

## 12 DISCUSSÃO

A Zearalenona (ZEA) e seus metabólitos possuem características estrogênicas, sendo conhecidos como agonistas do hormônio estrogênio; no fígado, eles são biotransformados nas formas conjugadas e não conjugadas, havendo interesse em determinar as proporções exatas desses compostos. Os animais de produção são altamente expostos a estas substâncias por sua dieta ser basicamente composta de milho e soja, grãos que podem ser contaminados por ZEA. Após a ingestão da toxina, a ZEA e seus metabólitos resultam em sinais clínicos como hiperestrogenismo, infertilidade e distúrbios reprodutivos (MUKHERJEE et al., 2014).

Para mitigar esses efeitos, uma variedade de aditivos antimicotoxinas (AAM) com base em argilas são testados *in vitro* e *in vivo* quanto à sua capacidade em sequestrar as toxinas do trato gastrointestinal. Esses compostos podem ser utilizados como aditivo alimentar para adsorver e minimizar a biodisponibilidade das micotoxinas desde que preencham todos os pré-requisitos de uma boa adsorção (AVANTAGGIATO et al., 2003). No Brasil, estes estudos seguem os protocolos específicos oferecidos pelo Ministério da Agricultura (MAPA, 2006). Portanto, para que se tenha o registro dos produtos avaliados junto a toda documentação técnica que garanta a sua inocuidade, é necessário que o composto adsorvente seja avaliado e apresente eficácia para cada micotoxina em cada espécie animal.

Os produtos avaliados neste trabalho foram anteriormente testados *in vitro* e *in vivo*, sendo aprovados para Aflatoxinas, por isso o interesse em avaliá-los para a ZEA. A utilização de biomarcadores para a comprovação da eficácia *in vivo* de AAM foi avaliada em estudos integralmente conduzidos de acordo com critérios específicos da avaliação propostos pela Autoridade Europeia para a Segurança Alimentar (EFSA, 2010).

Dessa forma, para o uso de biomarcadores, é necessária a utilização de metodologias analíticas sensíveis. O desenvolvimento de métodos analíticos capazes de detectar e quantificar micotoxinas em baixas concentrações é de suma importância, visto que a análise destes compostos em matrizes biológicas vem tornando-se uma prática indispensável, tanto para fins econômicos (avaliação de AAM) quanto para a saúde do consumidor (DE BAERE et al., 2012; FARRÉ; BARCELÓ, 2013). Porém, deve-se considerar também, os custos envolvidos nas

análises, bem como a aplicabilidade do método, a fim de que possa ser implantado na rotina laboratorial (CIFUENTES, 2012).

No presente estudo, as espécies suscetíveis à ZEA foram abordadas. As proporções dos metabólitos conjugados e não conjugados em ambas as espécies foram exploradas, além da avaliação de compostos adsorventes com base em argilas. Em novilhas de corte, sob dose de 5 mg/kg de ZEA na dieta, foi encontrado o  $\beta$ -ZAL como composto predominante. Os biomarcadores de exposição à ZEA avaliados foram  $\alpha$ -ZAL,  $\beta$ -ZAL,  $\alpha$ -ZOL,  $\beta$ -ZOL e ZAN. As amostras coletadas antes da administração da ração não expressaram concentrações de biomarcadores da ZEA. Após a alimentação, as concentrações encontradas nas amostras dos grupos T2, T3 e T4, que receberam ZEA, ficaram abaixo do LOQ para  $\alpha$ -ZAL,  $\alpha$ -ZOL e  $\beta$ -ZOL e acima do LOQ para  $\beta$ -ZAL; O ZAN não foi detectado. Nas amostras avaliadas com ZEA na ração (5  $\mu$ g/kg), entre os metabólitos não conjugados e conjugados determinados nos dias 1, 5, 10, 15, 20 e 25 de exposição,  $\beta$ -ZAL foi detectado acima do limite de quantificação nas formas não conjugadas (>0,60  $\mu$ g/kg) e conjugadas (>1,70  $\mu$ g/kg). Esses resultados estão de acordo com aqueles apresentados em um estudo que avaliou diferentes doses de ZEA em bovinos com detecções acima do limite de quantificação em nível sanguíneo (WINKLER et al., 2013). Na avaliação de AAM, foi utilizado para estudo o composto formado por bentonita, o qual não demonstrou eficiência no processo de adsorção da ZEA. Com isso, este estudo foi pioneiro na avaliação de AAM (2,5 e 5 kg/t) por parâmetro sorológico na espécie bovina.

A segunda pesquisa foi realizada em leitoas pré-púberes alimentadas com dietas apresentando dois níveis de inclusão de AAM à base de argila (0,25% e 0,50%) e três níveis de inclusão de ZEA (0, 0,75 e 1 mg/kg). O AAM foi avaliado por testes *in vivo* utilizando o modelo animal e também pelas relações de biomarcadores de exposição. Poucos trabalhos demonstram essa avaliação. A maioria dos estudos avaliou o AAM somente por testes *in vivo*, não aplicando testes específicos com o uso de biomarcadores. Assim, a utilização de biomarcadores confere uma prática inovadora, possível de ser realizada com a metodologia utilizada. O  $\alpha$ -ZEL foi detectado acima do limite de quantificação nas formas não conjugadas (>0,15  $\mu$ g/kg) e conjugadas (>1,58  $\mu$ g/kg). A concentração dos demais metabólitos ficou abaixo do limite de detecção, confirmando os resultados da eficácia do AAM ( $P < 0,05$ ). Estes

dados estão de acordo com o estudo desenvolvido por Gambacorta et al., (2016) que avaliou eficiência de produtos aditivos por biomarcadores urinários em leitoas.

A utilização da metodologia do presente estudo demonstrou ser uma ferramenta aplicável para identificar a eficácia de AAM por parâmetro sorológico, selecionando os melhores aditivos e a(s) micotoxina(s) que são capazes de serem adsorvidas. Também pode ser utilizada para fornecer a exposição sorológica da ZEA através da dieta e a realização de estudos toxicocinéticos. Além disso, não há relatos na literatura sobre a avaliação de AAM por parâmetro sorológico em bovinos. Isto faz com que se desenvolvam novas pesquisas na área, novos estudos cinéticos com diferentes doses de exposição para estabelecer as doses mínimas possíveis de serem detectadas, verificando as exposições a campo, gerando maiores informações a cerca da ZEA e sua meia-vida plasmática. Em suínos, também há a necessidade de estudos que mimetizem a exposição de ZEA a campo; para isso, destaca-se a necessidade de metodologias analíticas sensíveis para a detecção destes compostos em condições realísticas. Os resultados obtidos com este trabalho contribuem para a busca da qualidade de AAMs comercializados, bem como para a utilização de métodos analíticos e biomarcadores; estes podem representar uma alternativa para a confirmação da eficácia desses produtos em novilhas e leitoas.

### 13 CONCLUSÕES

O procedimento utilizado para a extração da matriz soro sanguíneo apresentou efeito satisfatório e boa eficiência para a remoção de proteínas e lipídios. Além disso, trata-se de um procedimento simples, considerando a complexidade da matriz. O método proposto para análise preenche todos os requisitos para detecção e quantificação dos seis analitos estudados. Além disso, essa metodologia analítica pode ser validada para aplicação em outras matrizes biológicas e espécies animais. A aplicabilidade do método pôde ser avaliada através da análise de amostras de sangue dos experimentos realizados *in vivo* com novilhas de corte e leitoas pré-púberes, confirmando as diferenças de sensibilidade destas espécies à ZEA.

O diagnóstico da micotoxicose e a avaliação da exposição à ZEA em animais geralmente são feitos através da análise do alimento e de seus ingredientes. No entanto, a variabilidade da contaminação alimentar é alta e a análise não fornece a dose de resposta e especificidade para a micotoxina alvo. Com isso, este trabalho confere sua aplicabilidade na utilização de biomarcadores específicos para a exposição em nível individual, avaliação da eficácia de aditivos antimicotoxinas por biomarcadores e utilização de estudos toxicocinéticos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBANO, F. M.; RAYA-RODRIGUEZ, M. T. **Validação e garantia da qualidade de ensaios laboratoriais: guia prático**. Porto Alegre: Rede Metrológica RS, p. 24, 2015.

AMORIM, L. C. A. Os biomarcadores e sua aplicação na avaliação da exposição aos agentes químicos ambientais. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v.6, p. , 2003.

AOYAMA, K. et al. Zearalenone contamination and the causative fungi in sorghum. **Journal of the Food Hygienic Society of Japan**, v. 50, n. 2, p. 47-51, 2009.

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

BANDO, É. et al. Biomarcadores para avaliação da exposição humana às micotoxinas. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 43, n. 3, p. 175-180, 2007.

BAUER, J. et al. Changes in the genital tract of female swine after feeding with practice-relevant amounts of zearalenone. **Tierärztliche Praxis**, v. 15, n. 1, p. 33-36, 1987.

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

BERENDSEN, B. J. A.; STOLKER L. A. M.; NIELEN, M. W. F. Selectivity in the sample preparation for the analysis of drug residues in products of animal origin using LC-MS. **Trends in Analytical Chemistry**, Vol. 43, 2013.

BIEHL, M. L. et al. Biliary excretion and enterohepatic cycling of zearalenone in immature pigs. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 121, p. 152-159, 1993.

BINDER, E. M. Managing the risk of mycotoxins in modern feed production. **Animal Feed Science and Technology**, v. 133, n. 12, p. 149-166, 2007.



BOUTSIADOU-THEURILLAT, X.; MEIER, P.; RICHARD, C. Development and in house validation of a rapid LC-MS/MS method for the semi quantification of eleven mycotoxins in maize samples. **Food analyses**, v. 68, n. 10, p. 716-720, 2014.

BRIDGES, A. et al. Zearalenone concerns in reproducing livestock. **Purdue University Cooperative Extension Service**, v. 5, n. 1, p. 1-3, 2010.

BRYDEN, W. L. Mycotoxin contamination of feed supply chain: Implications for animal productivity and feed security. **Animal Feed Science and Technology**, v. 173, p. 134-158, 2012.

BUENO, D. J. et al. In vitro binding of zearalenone to diferente adsorbents. **Journal of Food Protection**, v. 68, p. 613, 2005.

CHIAOCHAN, C. et al. Efficient hydrophilic interaction liquid chromatography tandem mass spectrometry for the multiclass analysis of veterinary drugs in chicken muscle. **Analytica Chimica Acta**, v. 682, p. 117-129, 2010.

CHIARADIA, M. C.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. O estado da arte da cromatografia associada à espectrometria de massas acoplada à espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos em alimentos. **Química Nova**, v. 31, p. 623-636, 2008.

CIFUENTES, A. Food Analysis: Present, Future, and Foodomics. **International Scholarly Research Notices: Analytical Chemistry**, v. 2012.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de cromatografia**. São Paulo: Unicamp, 2006. p. 139-166.

D'MELLO, J. P. F. et al. *Fusarium* mycotoxins: a review of global implications for animal health, welfare and productivity. **Animal Feed Science and Technology**, v. 80, n. 3, p. 183-205, 1999.

DÄNICKE S.; BREZINA U. Kinetics and metabolism of the *Fusarium* toxin deoxynivalenol in farm animals: consequences for diagnosis of exposure and intoxication and carry over. **Food and Chemical Toxicology**, v. 60, p. 58-75, 2013.

DÄNICKE, S. et al. Excretion kinetics and metabolism of zearalenone in broilers in dependence on a detoxifying agent. **Archives of animal nutrition**, v. 55, n. 4, p. 299-313, 2001.

DÄNICKE, S. et al. Kinetics and metabolism of zearalenone in young female pigs. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 89, p. 268-276, 2005.

DÄNICKE, S. et al. On the transfer of the Fusarium toxins deoxynivalenol (DON) and zearalenone (ZON) from the sow to the full-term piglet during the last third of gestation. **Food and Chemical Toxicology**, v. 45, n. 9, p. 1565-1574, 2007.

DÄNICKE, S.; VALENTA, H.; DOLL, S. On the toxicokinetics and the metabolism of deoxynivalenol (DON) in the pig. **Archives of Animal Nutrition**, v. 58, p. 169-180, 2004.

DÄNICKE, S.; WINKLER, J. Invited review: diagnosis of zearalenone (ZEN) exposure of farm animals and transfer of its residues into edible tissues (carry over). **Food and Chemical Toxicology**, v. 84, n.1, p. 225-249, 2015.

DE BAERE, S. et al. Development of a liquid–chromatography tandem mass spectrometry and ultra-high-performance liquid chromatography high-resolution mass spectrometry method for the quantitative determination of zearalenone and its major metabolites in chicken and pig plasma. **Analytica Chimica Acta**, v. 756, p. 37-48, 2012.

DE SAEGER, S. et al. Analysis of zearalenone and  $\alpha$ -zearalenol in animal feed using high-performance liquid chromatography. **Analytica Chimica Acta**, v. 487, n. 2, p. 137-143, 2003.

DEVREESE, M. et al. Quantitative determination of several toxicological important mycotoxins in pig plasma using multi-mycotoxin and analyte-specific high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometric methods. **Journal of Chromatography A**, v. 1257, p. 74-80, 2012.

DIEKMAN, M. A; GREEN, M. L. Mycotoxins and reproduction in domestic livestock. **Journal of Animal Science**, v. 70, n. 5, p. 1615-1627, 1992.

DÖLL, S.; DÄNICKE, S.; SCHNURRBUSCH, U. The effect of increasing concentrations of Fusarium toxins in piglet diets on histological parameters of the uterus and vagina. **Archives of Animal Nutrition**, v. 58, n. 5, p. 413-417, 2004.

DONG, M. et al. The toxic effects and fate of intravenously administered zearalenone in goats. **Toxicon**, v. 53, p. 523-530, 2010.

EFSA (EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain), 2010. Statement on the establishment of guidelines for the assessment of additives from the functional group 'substances for reduction of the contamination of feed by mycotoxins'. **EFSA Journal**, v. 7, p. 1693, 2010.

EFSA (EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain), 2017. Scientific opinion on the risks for animal health related to the presence of zearalenone and its modified forms in feed. **EFSA Journal**, v. 15, n. 7, p. 1-123, 2017.

EGAL, S. A. et al. Dietary exposure to aflatoxin from maize and groundnut in young children from Benin and Togo, West Africa. **International Journal of Food Microbiology**, v. 104, p. 215-224, 2005.

ETIENNE, M.; DOURMAD, J. Y. Effects of zearalenone or glucosinolates in the diet on reproduction in sows: A review. **Livestock Production Science**, v. 40, p. 99-113, 1994.

EUROPEAN COMMISSION. Commission Decision 2002/657/EC. Implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and interpretation of results. **Official Journal of the European Communities**, Bruxelles, 12 August 2002, L221: 8- 36, 2002. Capturado em 06/maio. 2016.

FARRÉ, M.; BARCELÓ, D. Analysis of emerging contaminants in food. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 43, p. 240-253, 2013.

FERNANDEZ-ALBA, A. Chromatographic-mass spectrometric foos analysis for the trace determination of pesticides residues. **Comprehensive Analytical Chemistry**, v. 43, p. 287, 2005.

FINK-GREMMELS, J. The role of mycotoxins in the health and performance of dairy cows. **The Veterinary Journal**, v. 176, n. 1, p. 84-92, 2008.

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

FREIRE, F.C.O. et al. Micotoxinas: Importância na Alimentação e na Saúde Humana e Animal. Empresa Brasileira de pesquisa Agropecuária. Documento 110. **Embrapa Agroindústria Tropical**, Fortaleza, 2007.

GAJECKI, M. et al. Zearalenone: Undesirable Substance. Mycotoxins in food, feed and bioweapons., 2010.

GAJECKI, M. Zearalenone-undesirable substances in feed. **Polish Journal of Veterinary Sciences**, v. 5, n. 2, p. 117-122, 2002.

GALLO, A. et al. New assessment based on the use of principal factor analysis to investigate corn silage quality from nutritional traits, fermentation end products and mycotoxins. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 96, p. 437-448, 2016.

GALLO, A. et al. Review on mycotoxin issues in ruminants: Occurrence in forages, effects of mycotoxin ingestion on health status and animal performance and practical strategies to counteract their negative effects. **Toxins**, v. 7, p. 3057-3111, 2015.

GAMBACORTA, L. et al. Grape Pomace, an Agricultural Byproduct Reducing Mycotoxin Absorption: In Vivo Assessment in Pig Using Urinary Biomarkers. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 64, p. 6762-6771, 2016.

GAUMY, J. L.; BAILLY, I; BURGAT, M. Zéaralénone: propriétés et toxicité expérimentale. **Revue de Médecine Vétérinaire**, v. 152, p. 219-234, 2001.

HUBERT, P. et al. Static electric dipole polarizabilities of alkali clusters. **La Revue STP Pharma Pratiques**, v.9, p.160, 1999.

HUWIG, A. et al. Mycotoxin detoxication of animal feed by diferents adsorbents. **Toxicology Letters**, v.122, p.179-188, 2001.

INMETRO. INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA. **Orientação sobre validação de métodos analíticos**. DOQ-CGCRE-008, revisão 04, julho de 2011.

JAKIMIUK, E. et al. Factors determining sensitivity of prepubertal gilts to hormonal influence of zearalenone. **Polish Journal of Veterinary Sciences**, v. 12, n. 1, 149-158, 2009.

JIANG, S. Z. et al. Effects of purified zearalenone on growth performance, organ size, serum metabolites, and oxidative stress in post-weaning gilts. **Journal of Animal Science**, 3658, 2011.

KABAK, B.; DOBSON, A. D. W; VAR, I. Strategies to prevent mycotoxin contamination of food and animal feed: A review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 46, p. 593-619, 2006.

KALLELA, K.; VASENIUS, L. The effects of rumen fluid on the content of zearalenone in animal fodder. **Nordisk Veterinaer Medicin**, v. 34, n. 10, p. 336-339, 1982.

KELLER, K.M., et al. Efeito de parede celular de levedura sobre o desempenho produtivos de frangos de corte intoxicados com Aflatoxina B1. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 34, p. 101-105, 2012.

KIESSLING, K.H. et al. Metabolism of aflatoxin, ochratoxin, zearalenone, and three trichothecenes by intact rumen fluid, rumen protozoa, and rumen bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 47, n. 5, p. 1070-1073, 1984.

KOLOSOVA, A.; STROKA, J. Substances for reduction of the contamination of feed by mycotoxins: a review. **World Mycotoxin Journal**, v. 4, p. 225-256, 2011.

KORFMACHER, W. A. et al. Characterization of the mycotoxin fumonishin B1: Comparison of thermospray, fast-atom bombardment and electrospray mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 5, n. 10, p. 463-468, 1991.

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

LANÇAS, F. M. **Validação de métodos cromatográficos de análise**. São Carlos: RiMa, 2004, 62 p.

LEITE, F. **Validação em Análise Química**. 4.ed. São Paulo: Editora Átomo, 2002, 135 p.

LEUNG, M. C. K; DIAZ-LLANO, G; SMITH, T. K. Mycotoxins in pet food: a review on worldwide prevalence and preventative strategies. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 9, p. 623-635, 2006.

LOI, M. et al. Mycotoxin biotransformation by native and commercial enzymes: Present and future perspectives. **Toxins**, v. 9, p. 111, 2017.

MAAROUFI, K. et al. Zearalenone induces modifications of hematological and biochemical parameters in rats. **Toxicon**, v. 34, p. 535-540, 1996.

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

MALLMANN, C. A; DILKIN, P. **Micotoxinas e micotoxicoses em suínos**. Santa Maria/RS: Editora Pallotti, 2007. 240 p.

MARIN, D. E. et al. Effects of zearalenone and its derivatives on the innate immune response of swine. **Toxicon**, v. 56, n. 6, p. 956-963, 2010.

MARQUES, M.F.C. **Validação Interna dos Métodos de Determinação de Deoxinivalenol e Zearalenona por HPLC com Purificação por Colunas de Imunoafinidade**. Dissertação de mestrado, Universidade Técnica de Lisboa, 93 p., 2007.

MIGDALOF, B. H. et al. Biotransformation of zeranol: disposition and metabolism in the female rat, rabbit, dog, monkey and man. **Xenobiotica**, v. 13, p. 209-221, 1983.

MOL, H. G. J. et al. Toward a generic extraction method for simultaneous determination of pesticides, mycotoxins, plant toxins, and veterinary drugs in feed and food matrixes. **Analytical Chemistry**, v. 80, p. 9450, 2008.

MORGAVI, D. P.; RILEY, R. T. An historical overview of field disease outbreaks known or suspected to be caused by consumption of feeds contaminated with *Fusarium* toxins. **Animal Feed Science and Technology**, v. 137, n. 3, p. 201-212, 2007.

MORGAVI, D. P; RILEY, R. T. An historical overview of field disease outbreaks known or suspected to be caused by consumption of feeds contaminated with *Fusarium* toxins. **Animal Feed Science and Technology**, v. 137, n. 3, p. 201-212, 2007.

MUKHERJEE, D. et al. Physiologically-based toxicokinetic modeling of zearalenone and its metabolites: application to the jersey girl study. **Plos One**, v. 9, n. 12, p. 1-30, 2014.

NIELSEN, M. W .F. et al. Screening and confirmation criteria for hormone residue analysis using liquid chromatography accurate mass time-of-flight, Fourier transform ion cyclotron resonance and orbitrap mass spectrometry techniques. **Analytica Chimica Acta**, v. 586, n. 1, p. 122-129, 2007.

OLSEN, M. Metabolism of zearalenone in farm animals. In: Chelkowski, J. **Fusarium: mycotoxins, taxonomy, pathogenicity**. Volume 2 in Topics in Secondary Metabolism. Amsterdam: Elsevier, 1989. Cap. 9, p. 167-177.

OLSEN, M.E. et al. Plasma and urinary levels of zearalenone and alpha-zearalenol in a prepubertal gilt fed zearalenone. **Acta Pharmacologica et Toxicologica**, v. 56, p. 239-243, 1985.

OLSEN, M.E. et al. Quantitative liquid chromatographic method using fluorescence detection for determining zearalenone and its metabolites in blood plasma and urine. **Journal of AOAC International**, v. 68, p. 632-635, 1985.

OSSELAERE, A. et al. Toxicokinetic study and absolute oral bioavailability of deoxynivalenol, T-2 toxin and zearalenone in broiler chickens. **Food and Chemical Toxicology**, v. 51, p. 350-355, 2013.

PARMEGGIANI, E.B., 2018. Aspectos fisiopatológicos da reprodução de novilhas submetidas a dietas contendo zearalenona com e sem aditivo antimicotoxina. Universidade Federal de Santa Maria 1: 1-57.

PILLAY, D. et al. The quantitative analysis of zearalenone and its derivatives in plasma of patients with breast and cervical cancer. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v. 40, p. 946-951, 2002.

QUEIROZ, S.C.N. et al. Métodos de extração e/ou concentração de compostos encontrados em fluidos biológicos para posterior determinação cromatográfica. **Química Nova**, v. 24, n.1, p. 68-76, 2001.

RAMOS, A. J; HERNÁNDEZ, E. Prevention of aflatoxicosis in farm animals by means of hydrated sodium calcium aluminosilicate addition to feedstuffs: a review. **Animal Feed Science and Technology**, v.65, p.197-206, 1997.

RAMOS, A.J. et al. Intestinal absorption of zearalenone and in-vitro study of non nutritive sorbent materials. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 128, p. 129-137, 1996.

RIBANI, M. et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.



RICO, A. G.; BURGAT-SACAZE, V. New data on metabolism of anabolic agents. In: Anabolics in animal production, 1983, Paris. **Symposium**. Paris: Office International des Epizooties, p. 263-269, 1983.

ROSSI, F. et al. Effects of mycotoxins on fertility of dairy cow. **Annali della Facoltà di Medicina Veterinaria Università di Parma**, v. 29, n. 1, p. 153-166, 2009.

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

SCHAUT, A. et al. Study of the gastrointestinal biotransformation of zearalenone in a Caco-2 cell culture system with liquid chromatographic methods. *Journal of Applied Toxicology*, v. 28, n. 8, p. 966-973, 2008.

SEELING, K.; DÄNICKE, S. Relevance of the *Fusarium* toxins deoxynivalenol and zearalenone in ruminant nutrition: a review. **Journal of Animal and Feed Sciences**, v. 14, n. 1, p. 3-40, 2005.

SHEPHARD, G. S. Chromatographic determination of the fumonisin mycotoxins. **Journal of Chromatography A**, v. 815, n. 1, p. 31-39, 1998.

SHIER, W. T. et al. Structure-activity relationships for human estrogenic activity in zearalenone mycotoxins. **Toxicol**, v. 39, n. 9, p. 1435-1438, 2001.

SHIN, B. S. et al. Determination of zearalenone by liquid chromatography/tandem mass spectrometry and application to a pharmacokinetic study. **Biomedical Chromatography**, v. 23, p. 1014-1021, 2009.

SONGSERMSAKUL, P. et al. Determination of zearalenone and its metabolites in urine, plasma and faeces of horses by HPLC-APCI-MS. **Chromatography B**, v. 843, p. 252-261, 2006.

SOUZA, A.V.C. Valor nutricional de grãos atacados por insetos ou contaminados por micotoxinas para frangos de corte. **Tese (Doutorado em Zootecnia)**. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2003.

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

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

UNODC. Oficina De Las Naciones Unidas Contra La Droga Y El Delito. **Directrices para la validación de métodos analíticos y la calibración del equipo utilizado para el análisis de drogas ilícitas en materiales incautados y especímenes biológicos**. p.57. Ed. Naciones Unidas, New York. 2010.

UPADHAYA, S.D. et al. Mycotoxins and their biotransformation in the rumen: a review. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 23, n. 9, p. 1250-1260, 2010.

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

WINKLER, J. et al. Residues of zearalenone (ZEN), deoxynivalenol (DON) and their metabolites in plasma of dairy cows fed *Fusarium* contaminated maize and their relationships to performance parameters. **Food and Chemical Toxicology**, v. 65, n. 1, p. 196-204, 2014.

YIANNIKOURIS, A.; JOUANY, J. P. Mycotoxins in feeds and their fate in animals: A review. **Animal Research**, v. 51, p. 81-99, 2002.

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

ZÖLLNER, P. et al. Concentration levels of zearalenone and its metabolites in urine, muscle tissue, and liver samples of pigs fed with mycotoxin-contaminated oats. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 9, p. 2494-2501, 2002.

ZÖLLNER, P.; MAYER-HELM, B. Trace mycotoxin analysis in complex biological and foodmatrices by liquid chromatography-atmospheric pressure ionisation mass spectrometry. **Journal Chromatography A**, v. 1136, n. 2, p. 123-169, 2006.