



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Sara Travassos Cordeiro

OCORRÊNCIA DE AFB1 EM CEREAIS DE PEQUENO-ALMOÇO
E AVALIAÇÃO DA EXPOSIÇÃO DA POPULAÇÃO PORTUGUESA

Dissertação no âmbito do Mestrado de Segurança Alimentar orientada
pela Professora Doutora Angelina Lopes Simões Pena e pela Professora
Doutora Sofia Cancela Duarte e apresentada à Faculdade de
Farmácia da Universidade de Coimbra.

Outubro de 2020



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Sara Travassos Cordeiro

Ocorrência de **AFBI em cereais de pequeno-almoço e
avaliação da exposição da população Portuguesa**

Dissertação no âmbito do Mestrado de Segurança Alimentar orientada pela Professora Doutora Angelina Lopes Simões Pena e pela Professora Doutora Sofia Cancela Duarte e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra.

Outubro de 2020

Agradecimentos

À minha orientadora, Professora Doutora Angelina Pena, pela compreensão, apoio, disponibilidade e, principalmente, por confiar em mim e possibilitar este estudo.

À minha co-orientadora, Professora Doutora Sofia Cancela Duarte, a minha gratidão, pois foi incansável durante todo este período de aprendizagem. Compreensiva com a minha falta de tempo, mas sempre pronta em articular esforços para que o trabalho se realizasse.

Ao meu marido e à minha filha, serei sempre grata, pela motivação constante, por acreditarem em mim e por fazerem de mim uma pessoa feliz. Aos meus pais, aos meus sogros e ao meu irmão, que também deram todo o seu apoio e estão sempre presentes. Sem a minha família nada seria possível!

RESUMO

As micotoxinas são metabolitos secundários dos fungos, sendo uma das mais importantes, devido ao seu potencial carcinogénico (Grupo I IARC) as aflatoxinas. Estas são produzidas por fungos do género *Aspergillus*, nomeadamente pelas espécies *A. flavus* e *A. parasiticus*. De entre as várias aflatoxinas conhecidas, a aflatoxina B1 (AFB1) é a mais comum e a mais preocupante para a saúde, pois é considerada hepatotóxica, hepatocarcinogénica, teratogénica e mutagénica. Entre outros alimentos, as aflatoxinas encontram-se em cereais, inclusivamente, nos produtos transformados à base de cereais, como os cereais de pequeno-almoço pela elevada resistência aos processos tecnológicos alimentares. Sendo estes produtos consumidos por todos os grupos etários, mas na sua maioria por crianças e adolescentes, torna-se importante a monitorização destes alimentos em relação à contaminação por micotoxinas.

O presente estudo pretendeu determinar a ocorrência de AFB1 em cereais de pequeno-almoço em Portugal e conseqüentemente a avaliação da exposição da população portuguesa. Para a determinação do teor de AFB1 nas amostras, utilizou-se um imunoensaio enzimático RIDASCREEN® Aflatoxin B1 30/15.

Os resultados obtidos revelaram uma baixa incidência, visto que apenas se encontrou uma amostra acima do limite de deteção (LOD 1 µg/Kg). Considerando o teor de AFB1 determinado na única amostra positiva (7,6 µg/Kg) foi estimada uma elevada exposição, principalmente no caso das crianças, assumindo valores que excedem os limites estabelecidos pela União Europeia e considerando a comparação com outros estudos. Concluiu-se que quanto menor é o grupo etário, maior é o risco de exposição a AFB1, sobretudo, quanto menor for a idade da criança. Neste seguimento, face às características da AFB1, acompanhando a evolução dos hábitos alimentares e o efeito das alterações climáticas torna-se importante a continuidade destes estudos.

Palavras-chave: aflatoxina, aflatoxina B1, cereais de pequeno-almoço, exposição.

ABSTRACT

Mycotoxins are secondary metabolites of fungi, one of the most important ones are aflatoxins, due to their carcinogenic potential (Grupo I IARC). These are produced by fungi of the genus *Aspergillus*, namely by the species *A. flavus* and *A. parasiticus*. Among the many known Aflatoxins, Aflatoxin B1 is the most common and the most worrying for health, as it is considered hepatotoxic, hepatocarcinogenic, teratogenic and mutagenic. Among other foods, Aflatoxins are found in cereals, including products processed from cereals, such as breakfast cereals due to their high resistance to technological food processes. Since these products are consumed by all age groups, but mostly by children and adolescents, it is important to monitor these foods for mycotoxins.

The present study aims to determine the occurrence of AFBI in breakfast cereals in Portugal and, consequently, to assess the exposure of the Portuguese population. To determine the AFBI content in the samples, the RIDASCREEN® Aflatoxin B1 30/15 enzyme immunoassay was used.

The results obtained revealed a low incidence, only one sample was found above of the detection limit (LOD 1 µg/Kg). Considering the AFBI content determined in the only positive sample (7,6 µg/Kg), a high exposure was estimated, mainly in the case of children, assuming values that exceed the limits established by the European Union and when compared to other studies. It was concluded that the younger the age group is, the higher the risk of exposure to AFBI. In addition, in view of the characteristics of AFBI, following the evolution of eating habits and the effect of climate change, it is important to continue these studies.

Keywords: aflatoxin, aflatoxin B1, breakfast cereals, exposure.

ÍNDICE

Resumo.....	iii
Abstract.....	iv
Índice de tabelas e figuras	vi
Lista de Siglas e Abreviaturas.....	vii
Parte A – Revisão bibliográfica.....	1
Introdução	2
1. Micotoxinas.....	3
2. Aflatoxinas.....	6
2.1. Toxicocinética.....	8
2.2. Efeitos tóxicos.....	10
2.3. Exposição	11
2.4. Avaliação da exposição.....	12
2.5. Ocorrência nos alimentos	14
2.6. Estudos de biomonitorização.....	16
2.7. Metodologias analíticas	18
Parte B – Trabalho experimental.....	20
1. Justificação e objetivos do estudo.....	21
2. Material e métodos.....	21
2.1. Caracterização das amostras	21
2.2. Reagentes e equipamentos	23
2.3. Preparação das amostras e extração de AFBI	23
2.4. Ensaio Imunoenzimático	24
2.5. Avaliação da exposição e caracterização do risco.....	25
3. Resultados	25
3.1. Avaliação de exposição e caracterização do risco	26
3.2. Discussão dos resultados.....	27
Conclusões.....	31
Referências Bibliográficas.....	32

ÍNDICE DE TABELAS E FIGURAS

Tabela 1. Resumo dos dados de ocorrência de AFBI por categoria de alimentos ($\mu\text{g} / \text{kg}$) (Adaptado EFSA, 2020).....	14
Tabela 2. Resumo de dados de ocorrência de AFBI e AFMI em Portugal	15
Tabela 3. Estudos de biomonitorização de AFBI em Portugal.....	17
Tabela 4. Ingredientes principais das amostras de origem não biológica.....	22
Tabela 5. Ingredientes principais das amostras de origem biológica.....	23
Tabela 6. Cálculo da EDI ($\text{ng}/\text{kg p.c.}/\text{dia}$), relativamente à presença de AFBI em cereais de pequeno-almoço nos adultos em Portugal.....	26
Tabela 7. Cálculo da EDI ($\text{ng}/\text{kg p.c.}/\text{dia}$), relativamente à presença de AFBI em cereais de pequeno-almoço nas crianças e adolescentes em Portugal.....	27
Tabela 8. Resumo da exposição crónica na dieta a AFBI ($\text{ng}/\text{kg p.c.}/\text{dia}$) nos países europeus. (Adaptado EFSA, 2020).....	29
Figura 1. Estrutura química das aflatoxinas: (a) AFBI, (b) AFB2, (c) AFG1, (d) AFG. (Adaptado Tao <i>et al.</i> , 2018).....	7
Figura 2. Visão geral do efeito das aflatoxinas no Homem. (Adaptado Kumar <i>et al.</i> , 2017).....	8
Figura 3. Metabolismo e disposição da AFBI (Adaptado EFSA, 2020)	9
Figura 4. Mecanismo pelo qual a AFBI induz malnutrição e supressão do crescimento (Adaptado Rushing <i>et al.</i> , 2018).....	11
Figura 5. Curva de calibração obtida com base nos resultados.....	25

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AFs – Aflatoxinas

AF-alb – Aducto de albumina aflatoxina

AF-N7-gua -- Aflatoxina-N7-guanina

AFB1 – Aflatoxina B1

AFB1-lys – Aducto lisina aflatoxina B1

AFB2 – Aflatoxina B2

AFG1 – Aflatoxina G1

AFG2- Aflatoxina G2

AFPI - Aflatoxina P1

AFQ1 - Aflatoxina Q1

AFT – Aflatoxina total

BMDL – Limite de confiança inferior da dose de referência

CYP – Citocromo P450

DNA – *Deoxyribonucleic acid* (Ácido Desoxirribonucleico)

DON – Deoxinivalenol (desoxinivalenol)

EDI – Ingestão diária estimada

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

ELISA – *Enzyme-linked immunosorbent assay*

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

FBs – Fumonisinas

FBI - Fumonisina B1

FS - Fluorescence spectroscopy (Espectroscopia de fluorescência)

g/dia – Grama por dia

GI – Trato gastrointestinal

HACCP – *Hazard Analysis and Critical Control Point* (Análise de perigos e controlo de pontos críticos)

HBV – *Hepatitis B virus* (Vírus da hepatite B)

HCC – Carcinoma hepatocelular

HCV – Vírus da hepatite C

HPLC – High Performance Liquid Chromatography (Cromatografia líquida de alta eficiência)

HSI - Hyperspectral imaging (Imagem hiperespectral)

IARC – *International Agency for Reserach of Cancer* (Agência Internacional para a Investigação do Cancro)

JECFA – Joint Expert Committee on Food Additives

LOD – Limit of detection (Limite de deteção)

LCMS – Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa

MOE – Margin of exposure (Margem de exposição)

n – Número de amostras

NIRS - *Near-infrared spectroscopy* (Espectroscopia de infravermelho próprio)

NK – Natural Killer (célula)

OTA – Ocratoxina A

PAT – Patulina

PMTDI - *Provisional Maximum Tolerable Daily Intake* (Máximo provisório de ingestão diária tolerável)

RASFF – *The Rapid Alert System for Food and Feed* (Sistema de alerta rápido para géneros alimentícios e alimentos para animais)

TCs – Tricotecenos

TDI – Ingestão diária tolerável

TLC – Cromatografia em camada fina

UE – União Europeia

ZEA – Zearalenona

µg/kg – Micrograma por quilograma

µg/kg p.c./dia – Micrograma por quilograma de peso corporal por dia

PARTE A – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

INTRODUÇÃO

Numa sociedade em mudança, em que os hábitos alimentares e o consumo são pautados por uma forte publicidade e técnicas de marketing, encontramos uma enorme diversidade de produtos, multiplicados por várias marcas, não esquecendo a oferta dos produtos de marca própria, também designados por produtos de marca branca. Paralelamente, surge uma maior divulgação dos produtos biológicos, em que o comércio/indústria na área alimentar aproveita para desenvolver novos produtos e novas áreas de negócio.

A segurança alimentar é um dos maiores problemas que o mundo enfrenta atualmente. Consequentemente, diversos estudos foram orientados com o intuito de discutir métodos de abordar as preocupações do consumidor com vários aspetos da segurança alimentar (Nielsen *et al.*, 2009). De acordo com o relatório de 2018 *Rapid Alert System for Food and Feed - (RASFF)* da Comissão Europeia, as aflatoxinas são as micotoxinas que representaram o maior perigo em alimentos provenientes de estados não-membros da União Europeia. Para além de que, estima-se que mais de 5 bilhões de pessoas em países em desenvolvimento estejam cronicamente expostas a aflatoxinas através dos alimentos (Tao *et al.*, 2018). Os produtos à base de cereais constituem um dos principais contribuintes para exposição humana a micotoxinas (Assunção *et al.*, 2018).

De acordo com um estudo realizado pela Marktest, concluiu que em 2017, 46,7% dos residentes no Continente com idade igual ou superior a 15 anos consumiram cereais ao pequeno-almoço nos últimos 12 meses, sendo que os que mais consumiram são os indivíduos com idades compreendidas entre os 15 e os 24 anos.

Estudos recentes em Portugal realizados a cereais de pequeno-almoço revelaram a presença de micotoxinas, nomeadamente aflatoxinas (Assunção *et al.*, 2018). A par destes dados há a considerar, também, que existem cereais de pequeno-almoço para crianças, sendo este um grupo vulnerável (Martins *et al.*, 2018). Assim como, que a aflatoxina BI (AFBI) é a mais frequente em alimentos, é genotóxica e carcinogénica pertencente ao Grupo I (IARC, 2012).

I. MICOTOXINAS

Os fungos toxigênicos e as micotoxinas constituíram-se como um problema na alimentação humana na época em que a humanidade começou a cultivar e armazenar os alimentos de uma estação para a outra, talvez há 10.000 anos atrás. O armazenamento de cereais, provavelmente, iniciou a transição da humanidade de caçador-coletor para agricultor, ao mesmo tempo fornecendo, as colheitas de grãos, um vasto e novo nicho ecológico para fungos patogênicos ou saprofitos, muitos dos quais micotoxigênicos. Os grãos sempre foram a principal fonte de micotoxinas na dieta do Homem e dos seus animais domésticos. No contexto histórico, o ergotismo de *Claviceps purpurea* em centeio é conhecido, provavelmente, há mais de 2.000 anos e causou a morte de muitos milhares de pessoas na Europa no último milênio. Conhecido no Japão desde o século XVII, o beribéri cardíaco agudo associado ao consumo de arroz bolorento era devido à citreoviridina produzida por *Penicillium citreonigrum*. Esta toxina era considerada apenas de importância histórica até ao seu ressurgimento no Brasil, há alguns anos. Existem outras toxinas do género *Penicillium*, incluindo a ocratoxina A (OTA), que foi considerada uma possível causa de nefropatia endémica dos Balcãs. O papel das toxinas produzidas por fungos do género *Fusarium* foram alvo de estudo na saúde humana e animal, especialmente a toxina T-2 na aleukia tóxica alimentar na Rússia na década de 1940 e as fumonisinas na leucoencefalomalasia equina (Pitt *et al.*, 2017; Benkerroum, 2019).

Foi, no entanto, um evento singular ocorrido em 1960 na Grã-Bretanha que estabeleceu o significado de micotoxicoses em nível internacional. Consistiu na morte de milhares de aves: perus, patos e pintos, e por isso a doença ficou conhecida como "Perú-X". A análise ao alimento das aves, identificou a presença de um fungo, *Aspergillus flavus*, e a cromatografia de camada fina identificou vários compostos fluorescentes sob iluminação ultravioleta. Esses compostos foram nomeados de aflatoxinas. Desde então, e com o avanço nas metodologias analíticas, muitas mais micotoxinas foram identificadas (McLean *et al.*, 1995).

As micotoxinas são metabolitos secundários de baixo peso molecular, aproximadamente <1000 Da, produzidos tanto pré quanto pós-colheita por diversas espécies de fungos (Escrivá *et al.*, 2017). No entanto, apenas alguns fungos produzem micotoxinas que são perigosas para a saúde. Os fungos podem produzir várias micotoxinas diferentes e algumas micotoxinas podem ser produzidas por vários fungos. A maioria das micotoxinas são muito estáveis em condições adversas, e é muito difícil eliminá-las de géneros alimentícios (Muhialdin *et al.*, 2020). Dos cerca de 200 fungos filamentosos identificados, as espécies toxigênicas mais prevalentes pertencem aos géneros *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium* e *Alternaria*. *Fusarium* e *Alternaria*,

geralmente, representam um alto risco micotoxicológico em nível de pré-colheita ou em produtos recém-colhidos na secagem, enquanto as espécies toxigênicas de *Aspergillus* e *Penicillium* representam um risco maior para alimentos armazenados e produtos para rações ou outros tipos de processamento. É difícil reduzir os riscos de exposição às micotoxinas porque estas ocorrem naturalmente sob certas condições de temperatura e humidade, contaminando os alimentos em toda a cadeia alimentar, no processamento, transporte ou armazenamento. A razão da produção de micotoxinas ainda não é conhecida, uma vez que aparentam não serem necessárias para o crescimento ou desenvolvimento de fungos. Vários fatores, como condições ambientais e ecológicas - temperatura, humidade relativa, pH, concentração de oxigénio, substrato e uso de fungicidas - contribuem para a presença ou produção de micotoxinas em alimentos e rações. No entanto, as inter-relações entre todos esses fatores ainda não são bem compreendidas e a produção de toxinas não pode ser razoavelmente previsto (Escrivá *et al.*, 2017; Asghar *et al.*, 2014).

Contudo, as micotoxinas estão presentes em todas as partes do mundo e com maior prevalência em regiões tropicais e subtropicais. O elevado risco é devido à estabilidade e resistência ao calor durante o processo de cozedura e a incapacidade de procedimentos alimentares normais para removê-los. Além disso, o destino de micotoxinas degradadas durante o processamento de alimentos não é bem conhecido devido aos métodos analíticos limitados relacionado com os contaminantes alvo (Muhialdin *et al.*, 2020).

Porém, houve muitos avanços no processamento de alimentos, desenvolvidos para manter os produtos alimentares finais seguros e saudáveis, como a análise de perigos e controle de pontos críticos (HACCP) e boas práticas de fabrico. Além disso, podem ser aplicados vários métodos físicos, químicos e biológicos que elimina parcialmente ou completamente as toxinas dos alimentos, garantindo a segurança alimentar e as preocupações com a saúde dos consumidores (Kumar *et al.*, 2017).

Dos cerca de 400 compostos diferentes identificados que se enquadram na classe de micotoxinas cerca de 10-15 são considerados de interesse comercial (Escrivá *et al.*, 2017). As micotoxinas mais comuns encontradas em alimentos são as aflatoxinas (AFs) B1, B2, G1 e G2, ocratoxina A (OTA), fumonisinas (FBs) B1, B2 e B3, desoxinivalenol (DON), zearalenona (ZEA), toxina T-2, toxina HT-2, citrinina, alcalóides da cravagem e patulina (PAT) (Muhialdin *et al.*, 2020).

As micotoxinas e os distúrbios de saúde associados em humanos e animais foram reconhecidos como um importante fator de saúde e problema económico. Se ingeridas, as micotoxinas

podem causar episódios de doenças agudas ou crônicas, com efeito cancerígeno, mutagênico, teratogênico, estrogênico, hemorrágico, nefrotóxico, hepatotóxico, neurotóxico e/ou imunossupressor. As micotoxinas não apresentam a mesma toxicidade (Pereira *et al.*, 2014). Com base nos efeitos na saúde humana e animal, AFs, FBs, tricotecenos (TCs), OTA, ZEA e PAT são reconhecidos como as micotoxinas alimentares mais importantes (Escrivá *et al.*, 2017). A sua toxicidade é variável durante o metabolismo, enquanto a suscetibilidade dos animais e os humanos variam com a espécie, idade, nutrição, duração de exposição entre outros fatores (Pereira *et al.*, 2014). Além da notória toxicidade, em que podem ocorrer sinergismos tóxicos resultantes da ingestão simultânea de diferentes micotoxinas, algumas são termicamente estáveis e demonstram vários níveis de bioacumulação (Escrivá *et al.*, 2017).

A ingestão de alimentos contaminados, incluindo grãos de cereais e seus derivados, nozes, frutos secos, especiarias, carne, leite, vinho, cerveja, produtos para crianças e alimentos para bebês, são uma das vias mais comuns de exposição a micotoxinas (Martins *et al.*, 2018).

A Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura (FAO) estimou que aproximadamente 25% dos cereais produzidos no mundo estão contaminados por micotoxinas, mas talvez esse valor esteja próximo de 50%, se tivermos em conta micotoxinas emergentes das quais até o momento existem dados limitados. Esta questão pressupõe particular importância especialmente para grupos populacionais específicos como as crianças, considerando a sua vulnerabilidade devido à sua fisiologia, uma dieta restrita e um maior consumo em relação ao seu peso corporal. Para além de que, os cereais, nomeadamente produtos à base de cereais, como cereais matinais, cereais infantis e biscoitos, estão entre os seus principais alimentos associados a um elevado consumo. Logo, a importância e o potencial risco para a saúde associado às micotoxinas presentes em alimentos geralmente consumidos por crianças requer atenção meticulosa (Assunção *et al.*, 2018).

Em muitas partes do mundo, as crianças são rotineiramente expostas a muitas micotoxinas por meio da cadeia alimentar e as três mais comuns são as aflatoxinas, as fumonisinas, e o desoxinivalenol (Martins *et al.*, 2018).

Atualmente, a contaminação simultânea de produtos alimentares por numerosas micotoxinas, conhecidas ou desconhecidas, constituem uma preocupação crescente, especialmente porque o efeito na saúde resultante da exposição de micotoxinas múltiplas poderia levar a diferente toxicidade e carcinogenicidade do que a exposição a micotoxinas únicas (Assunção *et al.*, 2018). As medidas de pesquisa e controle no campo das micotoxinas requerem análises e métodos analíticos relevantes e confiáveis. A sua determinação em cereais e géneros

alimentícios são desafiadoras, pois geralmente estão presentes em níveis baixos e as matrizes são frequentemente muito complexas (Pereira *et al.*, 2014).

A ocorrência de micotoxinas em cereais de pequeno-almoço pode ser influenciada pela composição da amostra, como a presença de chocolate ou frutos secos. Esses produtos foram amplamente referidos como matéria-prima suscetível à contaminação de OTA. Algumas toxinas podem ocorrer com mais frequência do que outras de acordo com a área de produção e o tipo de alimento, portanto, a fonte de matérias-primas pode influenciar o teor de micotoxinas nas amostras comercializadas, que deve ser levado em consideração pelos fabricantes e instituições reguladoras (Martins *et al.*, 2018).

Perante um período de mudança climática e grande redução da diversidade de culturas, no global, os investigadores que monitorizam o sistema alimentar precisam estar cientes que toxinas fúngicas raras podem reaparecer (Pitt *et al.*, 2017).

2. AFLATOXINAS

As aflatoxinas (AFs) são produzidas por fungos do género *Aspergillus* (A.) (Escrivá *et al.*, 2017). Predominantemente *A. flavus* e *A. parasiticus* (Tao *et al.*, 2018). Mas também *A. nomius* (Muhialdin *et al.*, 2020). O termo "aflatoxina" provém de três palavras, a saber: género *Aspergillus*, espécie *A. flavus* e toxina (Tao *et al.*, 2018). Aflatoxinas são encontradas em vários cereais, sementes oleaginosas, especiarias e nozes (Kumar *et al.*, 2017).

Entre os dezoito tipos diferentes de aflatoxinas identificados até ao momento, os de ocorrência natural e bem conhecidos são a aflatoxina B1 (AFB1, C₁₇H₁₂O₆), a aflatoxina B2 (AFB2, C₁₇H₁₄O₆), a aflatoxina G1 (AFG1, C₁₇H₁₂O₇) e a aflatoxina G2 (AFG2, C₁₇H₁₄O₇) (Tao *et al.*, 2018). Quimicamente, as aflatoxinas são derivados de difuranocumarina, em que um grupo bifurano está ligado a um lado do núcleo de cumarina, enquanto que um anel de pentanona está ligado ao outro lado, no caso das aflatoxinas da série B, ou ligado um anel de lactona nas aflatoxinas da série G (Kumar *et al.*, 2017) (Figura 1).

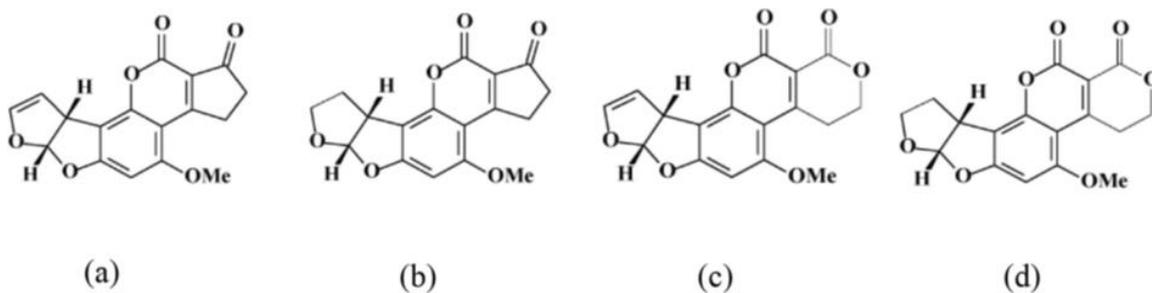


Figura 1. Estrutura química das aflatoxinas: (a) AFB1, (b) AFB2, (c) AFG1, (d) AFG2 (adaptado Tao et al., 2018)

Estas são cristais incolores a amarelo claro e são fluorescentes sob luz ultravioleta (UV): azul para AFB1 e AFB2, verde para AFG1 e AFG2 e azul violeta para AFMI. São instáveis na luz ultravioleta na presença de oxigénio, pH extremo (<3 ou >10) e na presença de agentes oxidantes. Sob condições alcalinas, o anel da lactona abre contudo, a reação é reversível. O anel de lactona também abre, e resulta numa descarboxilação, quando tratado com amónia a altas temperaturas e alta pressão. As aflatoxinas são insolúveis em solventes não polares, enquanto são livremente solúveis em solventes orgânicos moderadamente polares como clorofórmio e metanol. A solubilidade em água é de 10-20 mg/L (IARC, 2012).

As aflatoxinas são as micotoxinas mais conhecidas e amplamente mais estudadas. As espécies de *Aspergillus*, particularmente *A. flavus* e *A. parasiticus*, são fungos produtores de AFs cosmopolitas em vários produtos agrícolas (Asghar, 2013). *A. flavus* produz principalmente AFB1 e AFB2, favorece as partes aéreas das plantas (por exemplo folhas e flores), enquanto que *A. parasiticus* está mais adaptado a um ambiente de solo e tem uma distribuição mais limitada do que *A. flavus*. (EFSA, 2020).

Muitas outras espécies intimamente relacionadas com *A. flavus* (*A. minisclerotigenes*, *A. korhogoensis*, *A. aflatoxiformans* e *A. texensis*) ou *A. parasiticus* (*A. novoparasiticus* e *A. arachidicola*) também produzem aflatoxinas B e G. Para além das quatro aflatoxinas anteriormente mencionadas, esses fungos também formam outras substâncias como aflatoxicol, versicolorina e esterigmatocistina. Os fungos produtores de aflatoxina são encontrados especialmente em regiões com clima quente e húmido (EFSA, 2020). Esses fungos geralmente infetam as plantações de cereais, alimentos como o trigo, as nozes, o milho, o algodão e o amendoim (Kumar et al., 2017). As aflatoxinas são encontradas nos alimentos como resultado de contaminação fúngica pré e pós-colheita (Figura 2). A taxa e o grau a contaminação depende da temperatura, humidade, solo e condições de armazenamento (EFSA, 2020).

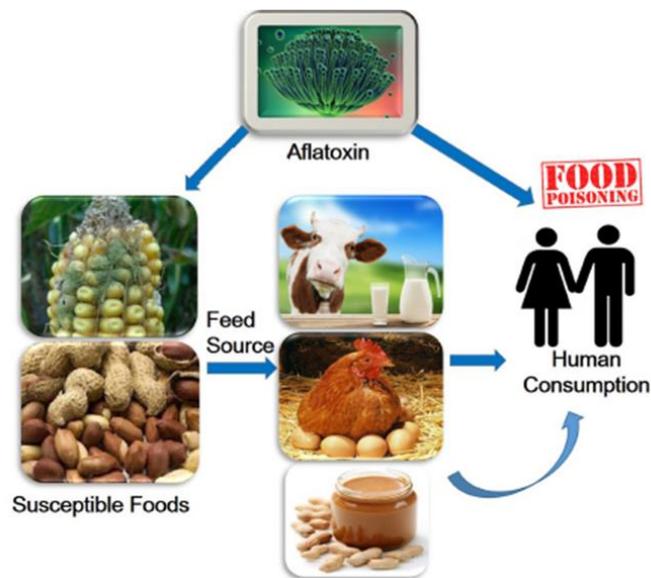


Figura 2. Visão geral do efeito das aflatoxinas no Homem. (Adaptado Kumar *et al.*, 2017).

2.1. TOXICOCINÉTICA

A AFBI é prontamente absorvida e distribuída para o fígado. A nível do fígado, as aflatoxinas são substratos para as monooxigenases citocromo P450 (CYP), incluindo CYP3A4, 3A5 e 1A2. Uma etapa de ativação crítica representa a formação de AFBI-exo-8,9-epóxido. O exo-epóxido é propenso à formação de aducto com macromoléculas como de DNA ou de proteínas. No entanto, não está identificada nenhuma evidência que o respetivo endo-epóxido liga-se ao DNA. O local predominante para a formação do aducto de DNA pela AFBI-exo-8,9-epóxido é N7-gua, resultando em trans-8,9-di-hidro-8-(N7-guanil)-9- hidroxafatoxina B1 (AFBI-N7-gua), que por sua vez, pode ser transformada no anel aberto, e mais estável e, portanto, mais persistente, aducto AFBI-FAPY. Uma vez que apenas AFBI, AFGI e AFMI têm uma ligação dupla na posição 8,9, apenas esses compostos são ativados por CYPs para o reativo 8,9-epóxido (EFSA, 2012).

A AFBI pode ser convertida em aflatoxicol no fígado pela redução de AFBI por via da (NADPH) - redutase dependente. CYP3A4 e 1A2 oxidam AFBI em vários metabolitos diferentes de epóxidos, os principais são os metabolitos hidroxilados AFMI e aflatoxina Q1 (AFQ1). Para além disso, a aflatoxina PI (AFPI) é formada por desmetilação. Os produtos de oxidação (AFQ1 e AFMI) assim como AFPI são potenciais produtos de desintoxicação, uma vez que representam substratos mais fracos para epoxidação do que AFBI. AFBI-8,9-dihidrodiol, resultante da hidrólise do 8,9-epóxido, é instável e sofre rearranjo catalisado para um dialdeído, reagindo principalmente com proteínas, tais como albumina, mas podendo não atingir o DNA (Figura 3). A hidrólise enzimática pelo epóxido hidrolase é discutida na

literatura, mas de acordo com a taxa rápida de hidrólise não enzimática, a contribuição *in vivo* desta via não é clara (EFSA, 2020).

Em humanos a absorção de AFB1 e/ou dos seus metabolitos para circulação sistémica é rápida, com picos de concentração plasmática atingidos em aproximadamente 1 hora. A AFB1 e/ou os seus metabolitos seguem um perfil cinético bifásico: são primeiro eliminados rapidamente do plasma, seguindo uma segunda excreção padrão mais duradora do que a primeira. 95% da sua eliminação através da urina ocorre até 24 horas após a ingestão. A contribuição relativa do metabolismo de aflatoxina no trato gastrointestinal em comparação com o fígado permanece desconhecido (EFSA, 2020). Porém, as aflatoxinas são facilmente absorvidas pelo trato gastrointestinal e a absorção foi estimada em 80%, e, portanto, superior em comparação com outras micotoxinas (Muhialdin *et al.*, 2020). AFB1 e os seus metabolitos são excretados pelas vias fecal e urinária. No entanto, a percentagem excretada por ambas as vias, varia de acordo com a espécie. A AFMI também é excretada no leite materno (EFSA, 2020).

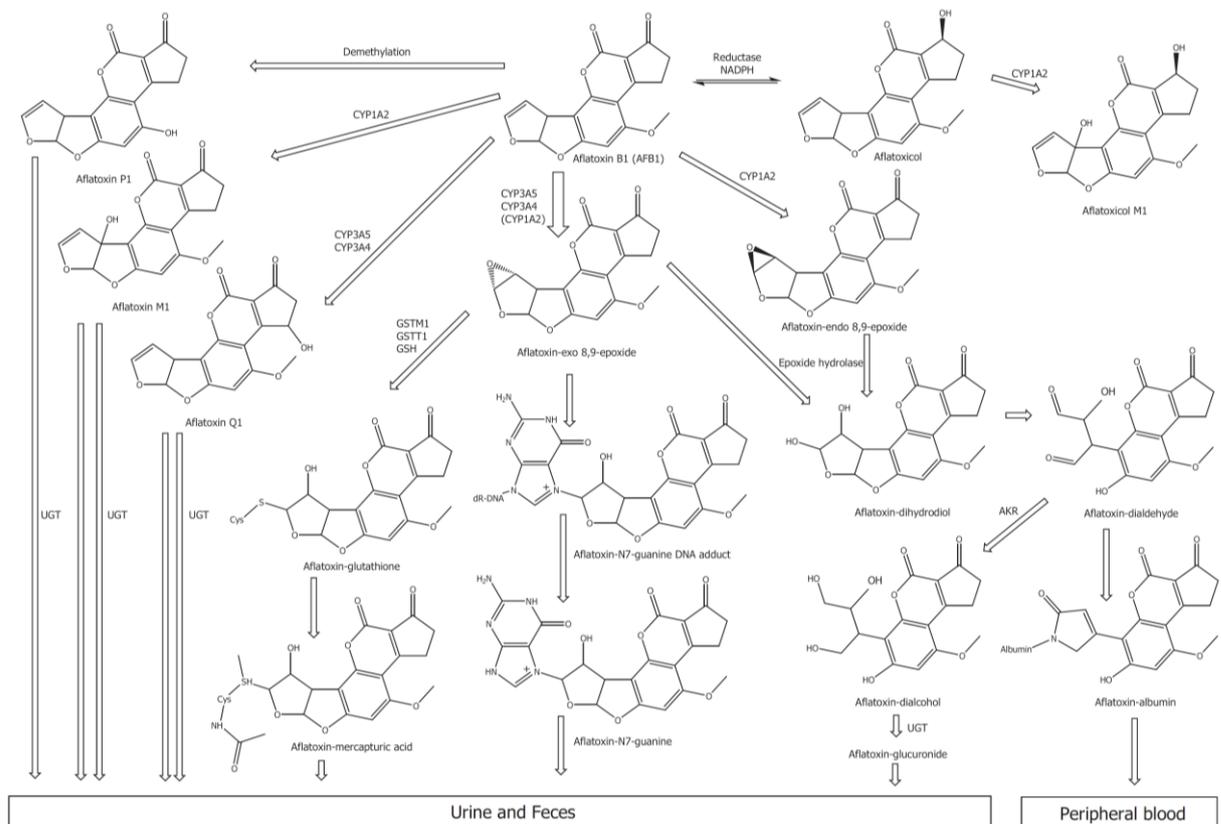


Figura 3. Metabolismo e disposição da AFB1. (Adaptado EFSA, 2020). AKR: NADPH-dependent aldo-keto-reductase; CYP: cytochrome P450; glutathione S-transferase; NADPH: nicotinamide adenine dinucleotide fosfato; UGT: uridine 5'-diphospho-glucuronosytransferase.

2.2. EFEITOS TÓXICOS

Entre as mais de 400 micotoxinas conhecidas, as aflatoxinas, especialmente a AFBI, é reconhecida como a mais tóxica, a mais comum e cancerígena (Tao *et al.*, 2018). AFBI, AFGI e AFMI são cancerígenas quando administradas por via oral através da dieta ou por alimentação artificial. Há evidência limitada de carcinogenicidade de AFB2 e evidência inadequada de carcinogenicidade de AFG2. AFBI é mais potente do que AFGI em relação à carcinogenicidade hepática, mas AFGI induziu uma maior incidência de tumores renais do que AFBI. AFBI também é mais potente do que AFMI em relação à carcinogenicidade no fígado em aproximadamente 10 vezes (EFSA, 2020).

As AFs são prejudiciais à saúde humana, gado e aves. Os efeitos adversos das AFs incluem a diminuição do crescimento, a diminuição da resistência a agentes patogênicos e nefrotoxicidade (Asghar *et al.*, 2014). São conhecidas por serem hepatotóxicas, hepatocarcinogênicas, teratogênicas e mutagênicas (Tao *et al.*, 2018). As AFs têm propriedades imunossupressoras e são potentes agentes carcinogênicos afetando particularmente o fígado. Estão relacionadas com o carcinoma hepatocelular (HCC) e vários estudos relacionaram o cancro do fígado com a presença de AFs em alimentos. Além disso, estão associados a surtos ocasionais de doenças agudas, aflatoxicose, que leva à morte logo após a exposição (Escrivá *et al.*, 2017).

Em várias espécies animais, a AFBI também demonstrou inibir funções de macrófagos, como fagocitose, produção de radicais de oxigênio e secreção de citocinas, mas também quimiotaxia de neutrófilos e a atividade de células natural killer (NK). Muitos estudos realizados em aves, porcos e ratos mostraram que a exposição às aflatoxinas, principalmente através de ração contaminada, que também pode conter outras micotoxinas, resultou na supressão da resposta imunitária mediada por células com depleção de linfócitos, atrofia dos órgãos linfoides, diminuindo a resposta de hipersensibilidade de tipo retardado aos agentes mitogênicos e modificando a produção de citocinas (EFSA, 2020).

A AFBI pode causar toxicidade aguda em humanos (aflatoxicose aguda) quando expostos a altos níveis na dieta alimentar num curto período. Os sintomas de aflatoxicose aguda incluem desconforto gastrointestinal, icterícia, hepatite e a insuficiência hepática. Estes surtos costumam ter uma alta taxa de mortalidade. Níveis inferiores de exposição crônica a AFBI estão associadas à cirrose e indicadores de disfunção hepática. Parece haver uma interação entre a exposição a AFBI e a infecção por HBV ou HCV e, conseqüentemente, a risco de doença hepática não-HCC (EFSA 2020).

AFB1 demonstrou outros efeitos tóxicos além da genotoxicidade e carcinogenicidade. Foi demonstrado causar desnutrição e diminuição do crescimento em modelos humanos e animais (Figura 4) (Rushing *et al.*, 2018).

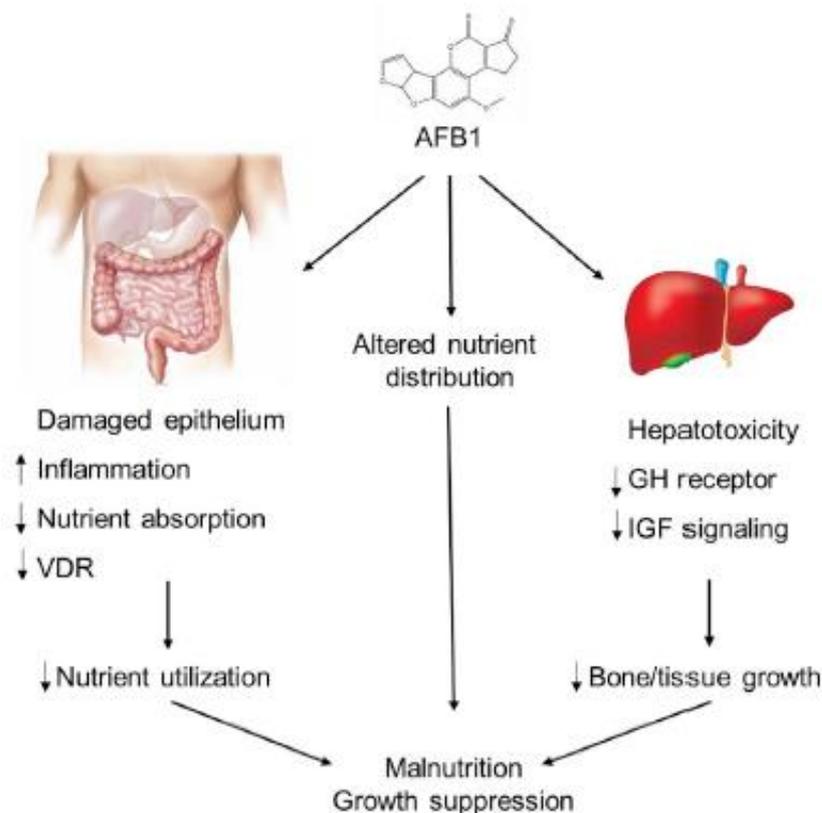


Figura 4. Mecanismo pelo qual a AFB1 induz malnutrição e supressão do crescimento. (Adaptado Rushing *et al.*, 2018).

Durante a gravidez, o feto pode ser afetado pela exposição materna à aflatoxina por meio de toxicidade direta, bem como toxicidade indireta, via inflamação sistêmica materna, prejudicando o crescimento da placenta ou a subida de citocinas placentárias. Os efeitos citotóxicos e sistêmicos da aflatoxina poderiam mediar plausivelmente a anemia materna, a restrição do crescimento intrauterino, perda fetal e nascimento prematuro (Smith *et al.*, 2017).

2.3. EXPOSIÇÃO

Além da exposição na dieta, os indivíduos podem ser expostos a aflatoxinas do meio ambiente, por exemplo, exposição profissional. Dependendo das condições de trabalho, os indivíduos podem ser expostos por inalação e, potencialmente, vias dérmicas e orais (EFSA, 2020). Durante aproximadamente trinta anos, vários estudos investigaram a frequência de trabalhadores expostos a AFB1 no local de trabalho, nos quais o número de casos de cancro que se desenvolveu parecia corresponder a essa exposição. Ocupações que foram estudadas estavam principalmente associadas ao manuseamento ou manipulação de colheitas, bem como as que lidam com a fabricação de produtos para consumo animal. Em geral, espera-se que a

principal via de exposição desses trabalhadores à AFB1 seja a via respiratória, embora alguns autores apontem a possibilidade de exposição dérmica ou oral. AFB1 mostrou estar presente em partículas de poeira provenientes de alimentos/produtos contaminados que, como podem ser aerossol e inalados por aqueles que se encontram nas proximidades. Tendo em conta estudos anteriores, a incidência de cancro foi maior nos trabalhadores potencialmente expostos em comparação com o grupo de controle negativo. Em geral, o cancro do fígado era o tipo de cancro primário, embora também tenha sido encontrado aumentos significativos nas vias respiratórias e cancro biliar (Rushing *et al.*, 2018).

A exposição a micotoxinas individuais com conteúdo abaixo dos limites legislados é considerada seguro para a saúde humana. No entanto, é desconhecido se as crianças, também estão protegidos contra uma exposição combinada de micotoxinas. A co-ocorrência de micotoxinas em cereais matinais consumidos por crianças ganham relevância especial desde os dados de consumo recolhidos no âmbito do projeto português MYCOMIX. Este revelou que 40% dos participantes com idade entre 1 e 3 anos, consumia cereais matinais pelo menos uma vez em três dias, incluindo diferentes tipos (com um máximo de quatro) e várias proporções (38-83%) de grãos na sua composição (Martins *et al.*, 2018).

Anteriormente, a preocupação com os problemas de saúde associados às micotoxinas estava associada aos seus efeitos a curto prazo. Atualmente, o foco da pesquisa está nos efeitos a longo prazo da alta exposição a micotoxinas (Muhialdin *et al.*, 2020).

2.4. AVALIAÇÃO DA EXPOSIÇÃO

A avaliação dos efeitos adversos à saúde é complicada por exposição múltipla a várias micotoxinas que podem levar a efeitos tóxicos aditivos, sinérgicos ou antagonistas. A toxicidade dessas toxinas levou muitos países a estabelecer regulamentos precisos para o seu controle em alimentos e rações, estabelecendo legislação para controlar a sua possível contaminação (Pereira *et al.*, 2014).

São responsáveis pela avaliação de riscos relacionados com as micotoxinas, à escala mundial, o *Joint Expert Committteon Food Additives* (JECFA), um conselho consultivo científico da Organização Mundial da Saúde (OMS) e a FAO. Na União Europeia (UE), os problemas de micotoxinas, cientificamente, estão ao encargo da Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (EFSA), que aconselha a Comissão Europeia (Pereira *et al.*, 2014).

Para os principais grupos de micotoxinas, os níveis máximos para fins regulatórios já existem relativamente a alimentos para adultos e crianças. Alimentos processados à base de cereais,

fórmulas infantis e alimentos para bebês e crianças são regulamentados pelo Regulamento da Comissão 1881/2006 com relação ao conteúdo de micotoxinas. No entanto, a legislação disponível para algumas toxinas (AFB1, soma de AFB1, AFB2, AFG1 e AFG2, DON, ZEA, soma de Toxina T-2 e Toxina HT-2, e soma de FB1 e FB2) não considera os cereais de pequeno-almoço como produtos consumidos por crianças, que geralmente apresenta limites inferiores aos considerados para população em geral. Esta questão constitui uma lacuna legislativa de especial preocupação (Martins *et al.*, 2018).

Segundo o regulamento (CE) N.º 1881/2006 Da Comissão, o teor máximo de aflatoxina B1 para todos os cereais e produtos derivados de cereais, incluindo produtos derivados da sua transformação, com as devidas exceções apresentadas no documento, é de 2,0 µg/kg e alimentos à base de cereais transformados e alimentos para bebês destinados a latentes e crianças jovens é de 0,10 µg/kg.

O painel da EFSA de Contaminantes na Cadeia Alimentar (CONTAM) apresentou, em janeiro de 2020, um parecer científico sobre os riscos para a saúde pública relacionados com a presença de aflatoxinas em alimentos. A avaliação de risco foi limitada a AFB1, AFB2, AFG1, AFG2 e AFM1. Para tal, foram usados mais de 200.000 resultados analíticos sobre a ocorrência de aflatoxinas. Grãos e produtos à base de grãos de cereais são os que contribuíram mais para a exposição alimentar crônica média a AFB1 em todas as faixas etárias "leite líquido" e "produtos lácteos fermentados" foram os principais contribuintes para a exposição média de AFM1. Este painel, selecionou um limite de confiança inferior da dose de referência (BMDL) para uma resposta de referência de 10% de 0,4 µg / kg de peso corporal (pc) por dia para a incidência de hepatocarcinomas (HCC) em ratos machos após exposição AFB1 a ser usada numa margem de exposição (MOE) aproximada. O cálculo de um BMDL a partir de dados humanos não eram apropriados; em vez disso, foram utilizadas as potências de cancro estimadas pelo JECFA em 2016 (EFSA, 2010).

Os valores de MOE para a exposição a AFB1 variaram de 5.000 a 29. Os MOEs calculados estão abaixo de 10.000 para AFB1, onde algumas pesquisas, especialmente para os grupos de idade mais jovens, têm um MOE abaixo de 10.000, este levanta um problema de saúde. Os riscos estimados de cancro em humanos após a exposição a AFB são em linha com a conclusão tirada dos MOEs (EFSA, 2010).

2.5. OCORRÊNCIA NOS ALIMENTOS

As aflatoxinas, geralmente, estão mais concentradas nas sementes (Tola *et al.*, 2016). A AFBI é normalmente predominante em culturas nomeadamente, amendoim, milho, arroz, nozes, sementes de algodão, especiarias e chá verde) (Viegas *et al.*, 2016). Com base em dados disponíveis pela EFSA relativamente a 29 países europeus (Tabela I), a categoria de alimentos com mais dados sobre a contaminação de AFBI é a de legumes, nozes e sementes oleaginosas, onde estão incluídos, por exemplo, pistachios, avelãs e nozes. O processamento dos alimentos pode influenciar a concentração de aflatoxinas nos produtos alimentares. A moagem de cereais distribui as aflatoxinas entre os diferentes produtos moídos, mas não as destrói. Por outro lado, a seleção de grãos e a limpeza, pode levar a uma redução ao remover grãos contaminados. Tratamentos térmicos podem também reduzir a concentração de aflatoxinas, mas não uma redução completa (EFSA, 2020).

Tabela I. Resumo dos dados de ocorrência de AFBI por categoria de alimentos ($\mu\text{g} / \text{kg}$)

(Adaptado EFSA, 2020).

Food category, FoodEx level 1	N	%LCD	Mean		Median ^(a)		P95 ^(b)	
			LB	UB	LB	UB	LB	UB
Grains and grain-based products	8,979	94	0.15	0.57	0	0.42	0.17	1.00
Vegetables and vegetable products	777	90	0.34	0.95	0	1.00	1.26	1.26
Starchy roots and tubers	53	91	0.53	0.87	0	0.30	–	–
Legumes, nuts and oilseeds	27,772	86	1.72	2.18	0	0.60	3.60	3.60
Fruit and fruit products	9,577	88	0.64	0.97	0	0.20	1.63	1.63
Meat and meat products	671	99	0.01	0.17	0	0.10	0.00	0.60
Fish and other seafood	89	94	0.05	0.22	0	0.10	0.28	1.50
Milk and dairy products	22	73	0.07	0.23	0	0.20	–	–
Sugar and confectionery	878	78	0.25	0.47	0	0.20	0.90	1.00
Animal and vegetable fats and oils	836	81	0.80	1.02	0	0.20	2.10	2.10
Fruit and vegetable juices	146	99	0.02	1.00	0	1.00	0.00	1.00
Non-alcoholic beverages	41	98	0.02	0.78	0	1.00	–	–
Alcoholic beverages	383	100	0.00	0.88	0	1.00	0.00	1.00
Herbs, spices and condiments	5,548	71	1.29	1.74	0	0.62	4.10	4.20
Food for infants and small children	1,433	97	0.00	0.06	0	0.03	0.00	1.00
Products for special nutritional use	116	97	0.07	0.48	0	0.20	0.00	1.00
Composite food	101	90	0.04	0.73	0	1.00	0.18	1.00
Snacks, desserts, and other foods	561	85	0.37	0.58	0	0.20	1.20	1.66

N: número de resultados analíticos; % LCD: proporção de dados censurados; P95: percentil 95; LB: limite inferior; UB: limite superior; AFBI: aflatoxina BI. (a): Devido à elevada proporção de dados censurados, a distribuição das concentrações de LB é distorcida. Portanto, os resultados medianos de LB serão zero. (b): Os percentis 95 obtidos em dados de ocorrência com menos de 60 resultados analíticos podem não ser estatisticamente robustos e, portanto, não são relatados na tabela.

A tabela 2, apresenta alguns estudos realizados em Portugal a alimentos em que consta o número de amostras onde foram detetados teores de AFBI e AFMI.

Tabela 2. Resumo de dados de ocorrência de AFBI e AFMI em alimentos em Portugal.

Alimento	N° de amostras contaminadas / %	Aflatoxina	Teores (Min – Max)	Método (LOD)	Bibliografia
Especiarias	34 (43%)	AFBI	Pimenta Cayenne: 2-32 µg/kg Noz-moscada: 1-58 µg/kg Paprika: 1-20 µg/kg Chili, cominhos, caril em pó, açafrão e pimenta branca: 1-5 µg/kg	HPLC – FD (LOD - 1 µg/kg)	(Martins et al., 2001)
logurtes	18 (18,8%)	AFMI	19 -98 ng/kg	HPLC - FD (LOD - 10 ng/kg)	(Martins et al.,2004)
Leite cru	394 (65,8%)	AFMI	0,005 – 0,05 µg/L (54,8%) 0,041 – 0,05 µg/L (2,8%) >0,051 – 0,08 µg/L (8,2%)	IAC HPLC (LOD - 5 ng/kg)	(Martins et al., 2005)
Água (engarrafada)	5 (19,2%)	AFBI	(0.22 ± 0.02)–(0.70 ± 0.06) ng/L	LC–MS/MS	(Mata et al.,2015)
Cereais pequeno-almoço	3 (12%)	AFMI	0,013 – 0,024 µg/kg	IAC HPLC - FD (LOD – 0,003 µg/kg)	(Martins et al., 2018)
	18 (69%)	AFBI	0,009 – 0,130 µg/kg (LOD – 0,003 µg/kg)		

2.6. ESTUDOS DE BIOMONITORIZAÇÃO

A biomonitorização tem um papel importante na determinação da exposição humana às micotoxinas, pelo que, cobre não apenas a ingestão de micotoxinas de todas as fontes da dieta, mas também a exposição por outras vias, como a inalação de micotoxinas no local de trabalho (Viegas *et al.*, 2019). AF-alb (AFBI-lys), AF-N7-gua e AFMI presentes na urina, são biomarcadores de exposição que têm sido validados para a ingestão alimentar de aflatoxina. No entanto, a conversão dos níveis desses biomarcadores não é fiável, em exposição na dieta de indivíduos. Como AF-alb (AFBI-lys) reflete melhor uma exposição a longo prazo (ou seja, várias semanas), tende a ser o biomarcador amplamente mais utilizado, enquanto que AFMI e AF-N7-gua na urina são biomarcadores adequados para determinar uma exposição recente. Para além da presença na urina, a AFMI também pode ser excretada no leite (EFSA, 2020).

Contudo, existem alguns desafios em relação a este tipo de estudos, como ter o conhecimento sobre a toxicocinética e os possíveis metabolitos de todas as micotoxinas relevantes (Viegas *et al.*, 2019).

A tabela 3 apresenta estudos de biomonitorização realizados em Portugal, onde constam o número de amostras detetadas com valores dos biomarcadores em análise, revelando a exposição da população portuguesa a aflatoxinas, nomeadamente, a AFBI.

Tabela 3. Estudos de biomonitorização de AFB1 em Portugal.

Grupo em estudo	Matriz	Nº de amostras contaminadas / %	Biomarcadores	Intervalo de Contaminação	Método (LOD)	Bibliografia
Trabalhadores avicultura (Exposição ocupacional)	Sangue	18 (59%)	AFB1	1 – 4,23 ng/ml	ELISA LOD - 1ng/ml	(Viegas et al., 2012)
Trabalhadores Indústria do lixo (Exposição ocupacional)	Sangue	41 (100%)	AFB1	2,5 – 25,9 ng/ml	ELISA LOD - 1ng/ml	(Viegas et al., 2015)
Trabalhadores Matadouro de aves (Exposição ocupacional)	Sangue	14 (47%)	AFB1	1,06 – 4,03 ng/ml	ELISA LOD - 1ng/ml	(Viegas et al., 2016)
Mulheres lactantes	Leite materno	13 (43,3%)	AFM1	5,1 – 10,2 ng/L	ELISA LOD – 5 ng/L	(Bogalho et al., 2018)
Trabalhadores suinicultura (Exposição ocupacional)	Urina	(16%)	AFM1	2,1–5,4 g/L	HPLC-MS/MS LOD – 0,11 g/L	(Viegas et al., 2019)
População portuguesa	Urina	(13%)	AFM1	0,01 - 0,090 µg/L	LC-MS/MS LOD – 0,01 µg/L	(Martins et al., 2020)
		(19%)	AFB1	0,02 - 0,060 µg/L	LC-MS/MS LOD – 0,02 µg/L	

2.7. METODOLOGIAS ANALÍTICAS

A detecção e quantificação da aflatoxina em géneros alimentícios e alimentos para animais é um aspeto muito importante para as questões da segurança alimentar (Kumar *et al.*, 2017). Devido aos baixos valores em que as micotoxinas estão, geralmente, presentes nos alimentos e às restrições legais, são necessários métodos robustos e seletivos para uma determinação exata (Pereira *et al.*, 2014). Perante isto, métodos de detecção quantitativos precisos e sensíveis são da maior importância (Urusov *et al.*, 2015).

A maioria dos métodos analíticos tem as seguintes etapas em comum: amostragem, uniformização, extração seguida por uma etapa de limpeza para reduzir ou eliminar componentes indesejados da matriz e, finalmente, as etapas de separação e detecção, que podem ser realizadas tanto por uma técnica cromatográfica em combinação com uma variedade de detetores ou por métodos imunoquímicos (Pereira *et al.*, 2014). As aflatoxinas são, normalmente, detetadas e identificadas de acordo com sua absorção e espectro de emissão, com pico de absorvância ocorrendo a 360 nm. Os métodos mais frequentes de detecção são: a cromatografia em camada fina (TLC), a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), a cromatografia líquida acoplada à espectroscopia de massa (LC-MS) e o ensaio imunoenzimático (ELISA) (Kumar *et al.*, 2017). Considerando que os métodos imunoquímicos são geralmente específicos para apenas uma micotoxina ou um pequeno grupo de compostos estruturais relacionados entre si, as técnicas cromatográficas podem separar um grande número de analitos, incluindo alguns com uma estrutura química muito diferente (Pereira *et al.*, 2014).

Com o desenvolvimento de técnicas óticas, vários estudos foram realizados e relatados sobre o uso de espectroscopia de fluorescência (FS), espectroscopia de infravermelho próprio (NIRS) e imagem hiperespectral (HSI) para determinar a aflatoxina e a contaminação fúngica em diferentes variedades de produtos agrícolas (Tao *et al.*, 2018). A cromatografia líquida (LC), a cromatografia gasosa (GC) acoplada a detetor de ultravioleta (UVD), detetor de fluorescência (FLD), ou detetor de díodo (DAD), ou espectroscopia de massa (MS) com base em ionização por electrospray (ESI) ou ionização química de pressão atmosférica (APCI), são outros exemplos de métodos utilizados (Man *et al.*, 2017). Porém, a cromatografia e a espectrometria de massa requerem o uso de equipamentos complexos e dispendiosos. Por esse motivo, são aplicados principalmente em análises de confirmação (Urusov *et al.*, 2015).

Entre os métodos imunológicos, o ensaio imunoenzimático (ELISA) é o mais comum, o mais simples, usa equipamento relativamente não dispendioso, fornece uma elevada produtividade, permitindo o teste em simultâneo de dezenas de amostras e a deteção de micotoxinas com grande sensibilidade e precisão (Urusov *et al.*, 2015). Os imunoenaios são uma técnica analítica poderosa que tem sido amplamente utilizada na deteção de micotoxinas. (Man *et al.*, 2017).

Um método inovador, é a utilização de um microchip que pode converter métodos convencionais em dispositivos de microescala mais eficientes devido às suas propriedades exclusivas de automação, integração, portabilidade, alto rendimento, baixo consumo de amostra e deteção rápida. Os microchips podem ser utilizados na determinação de micotoxinas em alimentos por deteção ótica, deteção eletroquímica, deteção fotoeletroquímica ou num método de deteção sem rótulo. No entanto, a maioria dos microchips aplicados à determinação de micotoxinas são usados apenas em laboratório devido aos instrumentos de deteção em grande escala. Além disso, a complexidade das matrizes da amostra, a diversidade de micotoxinas e a força eletrostática dos canais do microchip também são grandes desafios para este tipo de método (Man *et al.*, 2017).

O desenvolvimento de métodos que podem analisar várias categorias de resíduos químicos orgânicos como as micotoxinas nos alimentos através de um único procedimento analítico, é uma tendência crescente. Estes concentram-se nas propriedades químicas dos analitos, e não em como eles são usados e adulteram os alimentos (Turnipseed *et al.*, 2020). Estudos recentes revelam avanços na deteção de AFBI baseados na nanotecnologia e nanomateriais (Xue *et al.*, 2019).

PARTE B – TRABALHO EXPERIMENTAL

I. JUSTIFICAÇÃO E OBJETIVOS DO ESTUDO

Aliado às mudanças sociais e dos hábitos alimentares, os cereais de pequeno-almoço tornam-se comuns na mesa dos portugueses, muitas das vezes como substituto do pão, nomeadamente pelas crianças. Como consumidores, assistimos ao aumento da diversidade destes produtos a nível da oferta, com o surgir das marcas próprias ou marcas brancas, diferentes composições, dos produtos biológicos e lançamento de novos produtos pelas marcas já conhecidas no mercado.

Sabendo que a ingestão de grãos de cereais e seus derivados, é uma das vias mais comuns de exposição a micotoxinas (Martins *et al.*, 2018), que a AFBI é a aflatoxina mais frequente em alimentos e a micotoxina mais genotóxica e carcinogénica (Grupo I IARC, 2012) bem como que os cereais, nomeadamente os flocos de cereais, podem ser consumidos por crianças, um grupo já considerado anteriormente como vulnerável, justifica-se a pertinência deste estudo.

Para além de que, existem poucas informações na literatura sobre a exposição diária de AFBI em cereais de pequeno-almoço (Villa *et al.*, 2009). Neste contexto, o presente estudo, teve como principais objetivos a determinação da ocorrência de AFBI em cereais de pequeno-almoço de diversas marcas comercializadas em Portugal e a avaliação da exposição da população Portuguesa. Desta forma, e em última análise, pretendeu-se também contribuir para a existência de dados a nível nacional e europeu no âmbito desta problemática da segurança alimentar.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS

Foram incluídas no estudo 36 amostras de produtos à base de cereais, adquiridos em superfícies comerciais da região de Coimbra, entre julho e setembro de 2019. Dezanove eram de origem não biológica (Tabela 4), entre as quais duas de marca branca, dez de fabrico nacional e sete amostras constituídas apenas por um cereal com a designação integral.

As restantes dezassete amostras eram de origem biológica (Tabela 5), quatro delas de marca branca. Das dezassete amostras, cinco continham apenas um cereal integral. Todas as amostras analisadas estavam dentro do prazo de validade, e todas as informações foram retiradas do respetivo rótulo. Devido à oferta no mercado, foram incluídas neste estudo, amostras (BI e

B20) que possuem trigo sarraceno. Apesar deste não ser considerado um cereal, pode ser utilizado ao pequeno-almoço em panquecas e no fabrico de pão.

Tabela 4. Ingredientes principais das amostras de origem não biológica.

Amostra	Ingredientes principais
C1	Trigo
C2	Trigo espelta
C3	Aveia
C4	Aveia integral (sem OGM)
C5	Aveia integral (100%)
C6	Aveia integral
C7	Milho
C8	Trigo hidrolisado e integral, milho, aveia integral, cevada e centeio
C9	Trigo integral (94%), malte de cevada
C10	Milho (99,9%)
C11	Milho e malte de cerveja
C12	Milho (91%) e malte
C13	Milho e malte de cevada
C14	Trigo integral, arroz e malte de cevada
C15	Aveia integral
C17	Trigo integral
C18	Trigo integral (100%)
C19	Trigo hidrolisado, espelta e aveia integral
C20	Cevada integral (100%)

OGM – organismo geneticamente modificado.

Tabela 5. Ingredientes principais das amostras de origem biológica.

Amostra	Ingredientes principais	Origem
B1	Milho, Trigo sarraceno (32,4%)	Agricultura U.E.
B3	Arroz, millet e quinoa	Agricultura U.E./não-U.E.
B5	Aveia	Agricultura U.E.
B6	Aveia	Agricultura U.E.
B7	Trigo espelta	Agricultura U.E.
B8	Espelta integral 85%, grãos de espelta cortados (6%)	Agricultura U.E./não-U.E.
B9	Milho (98,8%)	Agricultura U.E.
B10	Milho	Agricultura U.E.
B12	Aveia	Agricultura U.E.
B13	Aveia integral	Agricultura U.E.
B14	Aveia integral	Agricultura U.E.
B15	Aveia integral	Agricultura U.E./não-U.E.
B17	Cevada integral	Agricultura U.E.
B18	Trigo integral	Agricultura U.E.
B19	Trigo	Agricultura U.E.
B20	Trigo sarraceno	Agricultura não U.E.
B21	Milho	Agricultura U.E.

2.2. REAGENTES E EQUIPAMENTOS

Como reagentes foram utilizados metanol 70%, (diluição efetuada em laboratório), água destilada e o kit do imunoensaio enzimático RIDASCREEN® Aflatoxin BI 30/15 (R-Biopharm) proveniente da Alemanha (reagentes, soluções padrão e sais para preparar a solução tampão). O material de laboratório consistiu em tubos de Falcon de 50ml, tubos Eppendorf®, pipetas, suporte para tubos, centrífugadora, equipamento para leitura do ELISA, agitador Vórtex e frigorífico. Foi também necessário um equipamento para triturar e homogeneizar as amostras, neste caso, um Robot de cozinha PHILIPS®.

2.3. PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS E EXTRAÇÃO DE AFBI

De cada embalagem foram pesadas 50 g de amostra e posteriormente trituradas e homogeneizadas num robot de cozinha PHILIPS®; lavado e descontaminado entre amostras para diminuir a probabilidade de contaminação cruzada. As amostras foram codificadas e guardadas em sacos de plástico fechados, à temperatura ambiente protegidas da luz solar direta.

De cada amostra triturada e homogeneizada, foram pesadas 5 g e colocadas num tubo de Falcon de 50 ml. A cada tubo foi adicionado 25 ml de metanol 70% e posteriormente agitou-se à velocidade máxima no agitador Vórtex. Seguiu-se a centrifugação de cada tubo durante 10 minutos, a 3500 g, à temperatura ambiente (22°C / 24°). Após este processo, foi retirado 1 ml de sobrenadante do tubo e transferido para um tubo Eppendorf® de 2 ml. A cada um destes tubos foram adicionados 1 ml de água destilada e seguidamente agitados no agitador Vórtex.

2.4. ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO

Para a determinação do teor de AFBI nas amostras, utilizou-se o imunoenensaio enzimático RIDASCREEN® Aflatoxin BI 30/15 (R-Biopharm, Alemanha) com o limite de deteção (LOD) de 1 µg/Kg (ppb).

Todos os reagentes utilizados e soluções padrão faziam parte do kit, com exceção da água destilada e da solução de metanol 70%. Seguiram-se escrupulosamente todas as instruções fornecidas pelo fabricante. Foram utilizadas 6 amostras padrão de concentração de AFBI: 0,00 µg/Kg, 1,00 µg/Kg, 5,00 µg/Kg, 10,00 µg/Kg, 20,00 µg/Kg e 50,00 µg/Kg. O primeiro passo consistiu em trazer todos os reagentes à temperatura ambiente, entre 20 - 25°C. Depois de serem usados, os mesmos, devem ser mantidos a temperaturas entre 2 - 8°C. O kit contém sais para fazer uma solução tampão, dissolvendo o seu conteúdo num litro de água destilada. Foi pipetada 50 µl de amostra padrão, usando uma nova ponta de pipeta para cada padrão e de seguida, adicionado 50 µl de conjugado a cada poço. Posteriormente foi adicionado 50 µl de anticorpo a cada poço. Misturou-se delicadamente agitando a placa manualmente e foi a incubar durante 30 min (+/- 1) à temperatura ambiente (20 - 25°C / 68 - 77° F). Concluída esta etapa, despejou-se o líquido dos poços e bateu-se vigorosamente a placa para cima e para baixo contra papel absorvente (três vezes em cada fila) para garantir a completa remoção de líquido dos poços. Feito isto, foram preenchidos todos os poços com tampão de lavagem 250 µl e esvaziado os poços novamente, repetindo este procedimento mais duas vezes. Adicionou-se 100 µl de substrato/cromogénio a cada poço. Misturou-se, delicadamente, agitando a placa manualmente e foi a incubar durante 15 min (+/- 1) à temperatura ambiente (20 - 25°C / 68 - 77° F). No final, adicionou-se 100 µl de solução stop a cada poço e misturou-se delicadamente agitando a placa manualmente e medida a absorbância a 450 nm. A leitura foi efetuada dentro dos 15 minutos após a adição da solução stop.

Um *software* específico, o RIDA®SOFT Win.net (Art. Nr. R9996), está disponível para avaliação dos imunoenaios enzimáticos RIDASCREEN®. Foi usada a função spline cúbica RIDA®SOFT Win.net para avaliação do teste.

2.5. AVALIAÇÃO DA EXPOSIÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO RISCO

A EDI (ng/kg p.c./dia) foi calculada considerando o teor de AFBI, a quantidade consumida (g/dia) sobre o peso corporal (Kg). Para adultos foi calculada considerando o peso corporal de 69 kg (Arezes *et al.*, 2006). Para crianças e adolescentes foi considerado o percentil 50, de acordo com o boletim de saúde infantil e Juvenil em vigor em Portugal (edição de 2009). Os dados de consumo diário, foram obtidos através dos estudos publicados pelo Inquérito Alimentar Nacional e de Atividade Física.

Para a caracterização do risco e na ausência de TDI, considerando a carcinogenicidade da AFBI, foi proposto por Kuiper-Goodman (1998) para adultos e crianças sem hepatite B, 1 ng/kg pc/dia como o valor máximo provisório de ingestão diária tolerável (PMTDI) (Villa *et al.*, 2009) considerado como referência por alguns autores (Abrunhosa *et al.*, 2014).

3. RESULTADOS

Os resultados foram obtidos com recurso ao *software* RIDA®SOFT Win®. A Figura 5 apresenta a curva de calibração obtida.

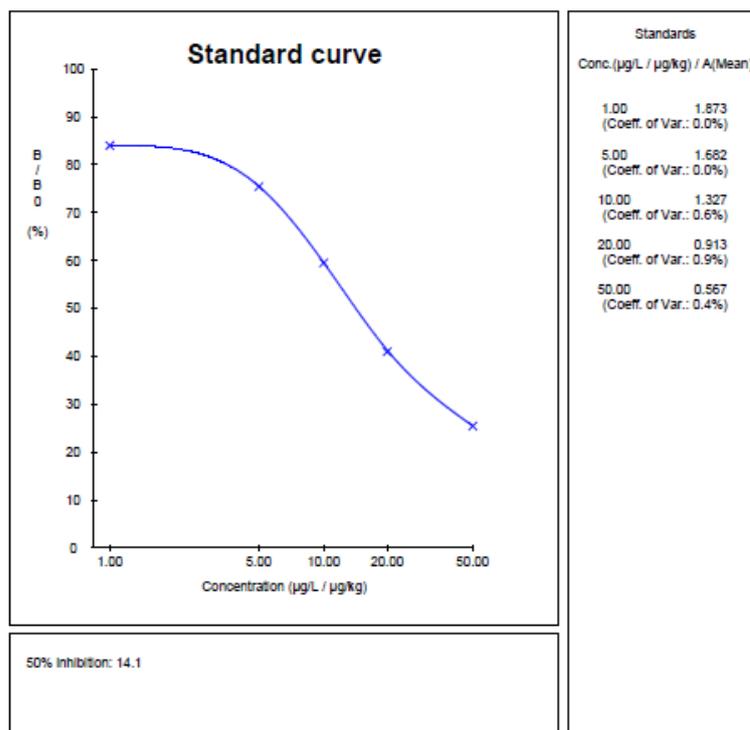


Figura 5. Curva de calibração obtida com base nos resultados.

Apenas uma amostra (C8), apresentou um teor de AFBI (7,6 µg/Kg) superior ao valor de deteção (1 µg/Kg). Outros estudos europeus em que foram detetados AFBI em cereais de pequeno-almoço, o LOD era bastante inferior ao utilizado no presente estudo. No caso do estudo realizado anteriormente em Portugal, 0,003 µg/Kg (Martins *et al.*, 2018), em Espanha 0,051 µg/Kg (Ibáñez-Vea *et al.*, 2011) e na Grécia 0,02 ng/g (Villa *et al.*, 2009).

3.1. AVALIAÇÃO DE EXPOSIÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO RISCO

Considerando o teor 7,6 µg/kg, foi calculado o EDI para adultos (Tabela 6) e crianças (Tabela 7).

Tabela 6. Cálculo da EDI (ng/kg p.c./dia), relativamente à presença de AFBI em cereais de pequeno-almoço nos adultos em Portugal.

Grupo etário	Peso (Kg)	Quantidade diária consumida (g)				EDI (ng/kg p.c./dia)			
		Por grupo etário	Por região (Região Centro)	Por género		Por grupo etário	Por região (Região Centro)	Por género	
				Homens	Mulheres			Homens	Mulheres
Adultos	69	8,9	7,4	10,1	8,3	0,98	0,82	1,11	0,91

Tabela 7. Cálculo da EDI (ng/kg p.c./dia), relativamente à presença de AFBI em cereais de pequeno-almoço nas crianças e adolescentes em Portugal.

Grupo etário	Idade (anos)	Peso (Kg)	Quantidade diária consumida (g)		EDI (ng/kg p.c./dia)	
			Por grupo etário	Por região (Região Centro)	Por grupo etário	Por região (Região Centro)
Crianças	3	14	11,1	7,4	6,03	4,02
	6	20	11,1	7,4	4,22	2,81
	9	29	11,1	7,4	2,91	1,99
Adolescentes	14	49	20,3	7,4	3,15	1,15
	17	55	20,3	7,4	2,81	1,02

3.2. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Os ensaios de imunoabsorção enzimática (ELISA), imunoquímicos, baseados na deteção de anticorpos, são rápidos, simples, específicos, sensíveis que têm sido amplamente usados em análise de triagem de micotoxinas (Pereira *et al.*, 2014). Estão disponíveis comercialmente Kits ELISA para a determinação de aflatoxina total (AFT) e AFBI (EFSA, 2020).

No total das 36 amostras, apenas uma amostra se revelou positiva (incidência de 2,8%) apresentando um valor de 7,6 μ /Kg. A amostra em questão corresponde a um produto, de modo de produção não biológico, com os seguintes cereais na sua composição (trigo, milho, aveia, cevada e centeio), que pode ser consumido por crianças. O valor detetado é aproximadamente quatro vezes superior ao limite máximo estabelecido na UE (2 μ /Kg; EC, 2006). Considerando o consumo por parte de crianças jovens, o teor detetado na única amostra positiva é setenta e seis vezes superior ao limite máximo previsto na EU (0,10 μ g/kg; EC, 2006).

Num estudo anterior (Martins *et al.*, 2018), em Portugal, foi detetada AFBI em cereais de pequeno-almoço, com uma incidência de 69% (n=26), num intervalo de contaminação entre 0,003 (LOD) e 0,130 µg/Kg. De acordo com os dados publicados para a exposição alimentar para o consumo de cereais de pequeno-almoço em crianças entre um ano e três anos de idade, a média foi de 0,013 ng/kg pc/dia, 0,003 ng/kg pc/dia (percentil 50), 0,011 ng/kg pc/dia (percentil 75), 0,030 ng/kg pc/dia (percentil 90), 0,055 ng/kg pc/dia (percentil 95), 0,160 ng/kg pc/dia (percentil 99) (Assunção *et al.*, 2018). Foram analisadas amostras de cereais de pequeno-almoço, em Espanha, com valores de AFBI entre 0,0510 µg/Kg e 0,130 µg/kg, com uma incidência de 9%, apenas em cereais que continham milho (Ibáñez-Vea *et al.*, 2011). Neste estudo, os valores de AFBI nas amostras contaminadas correspondiam a cereais não integrais. Por outro lado, na Grécia foram encontrados valores de AFBI entre 0,05 µg/Kg e 4,3 µg/Kg com uma incidência de (56,3%), também com os valores mais elevados a serem detetados em cereais à base de milho (Villa *et al.*, 2009).

Comparativamente com os valores nos estudos europeus anteriormente considerados, a incidência é bastante menor, mas a quantidade de AFBI detetada na amostra positiva deste estudo é muito superior. Como o LOD do atual estudo é superior aos restantes, é natural que a incidência seja menor. Quanto aos resultados obtidos na avaliação da exposição, é de referir que uma das limitações é o facto de não existirem dados estatísticos sobre o consumo exclusivo de cereais de pequeno-almoço. Desta forma foram considerados dados sobre o consumo conjunto de cereais de pequeno-almoço e barras de cereais em Portugal.

Comparando os valores da EDI com o valor de PMTDI proposto (1 ng/kg pc/dia), verifica-se que os valores são próximos para a população adulta, neste cenário, está próximo da potência tumoral para o cancro do fígado (Abrunhosa *et al.*, 2014).

Contudo, para os restantes cenários, os valores são superiores, nomeadamente, seis vezes superior para o caso das crianças com três anos e com uma ingestão diária de acordo com os dados para o seu grupo etário. Sendo que, em todos os cenários considerados para o grupo etário pertencente às crianças é sempre superior a 1 ng/kg pc/dia. Este facto, leva a ter preocupações em relação à saúde das crianças, quando sujeitas a estes valores de exposição, nomeadamente, em relação aos efeitos carcinogénicos da AFBI.

No entanto, a EFSA organizou informação, a nível dos países europeus, apresentando um resumo estatístico da exposição crónica na dieta (valor médio e o percentil 95) a AFBI (ng/kg p.c./dia) da população total, conforme consta na tabela 8 (EFSA, 2020).

Tabela 8. Resumo da exposição crónica na dieta a AFBI (ng/kg p.c./dia) nos países europeus. (Adaptado EFSA, 2020).

Age group	Minimum		Median		Maximum	
	LB	UB	LB	UB	LB	UB
Mean dietary exposure in total population (ng/kg bw per day)						
Infants	0.08	0.58	0.18	2.01	0.60	4.87
Toddlers	0.43	3.15	0.64	5.35	1.05	6.95
Other children	0.47	3.46	0.76	4.93	1.78	6.12
Adolescents	0.27	1.99	0.40	2.98	1.24	4.27
Adults	0.22	1.35	0.33	2.15	0.49	3.25
Elderly	0.19	1.32	0.26	1.90	0.31	2.91
Very elderly	0.18	1.41	0.26	2.07	0.41	2.93

Age group	Minimum		Median		Maximum	
	LB	UB	LB	UB	LB	UB
95th percentile dietary exposure in total population (ng/kg bw per day)						
Infants ^(a)	0.35	2.79	0.74	5.18	1.84	13.03
Toddlers ^(a)	0.77	6.80	1.46	9.69	2.88	14.01
Other children	1.17	6.03	1.58	8.71	6.22	11.88
Adolescents ^(a)	0.70	3.25	0.98	5.61	4.62	8.62
Adults	0.62	2.76	0.87	4.24	1.36	6.78
Elderly	0.47	2.76	0.62	3.72	1.10	5.26
Very elderly ^(a)	0.42	2.81	0.56	3.86	0.93	5.05

(a): As estimativas do percentil 95 obtidas em pesquisas dietéticas / classes de idade com menos de 60 observações podem não ser estatisticamente robusto (EFSA, 2011b) e, portanto, não estão incluídos nesta tabela. AFBI: aflatoxina B1; pc: peso corporal; LB: limite inferior; UB: limite superior.

Relativamente à exposição de AFBI, a nível europeu a exposição alimentar crónica estimada mais alta para AFBI ocorreu nos grupos da população jovem, o que está em concordância com os resultados obtidos neste estudo (EFSA, 2020). Mais concretamente, quanto menor é o grupo etário, maior é o risco de exposição a AFBI, sobretudo, quanto menor for a idade da criança. Este grupo é de facto, o que assume maior preocupação, face aos resultados obtidos.

A redução da ingestão diária de aflatoxinas pode ser alcançada considerando algumas medidas como: melhoria na variedade e diversidade de produtos à base de cereais consumidos por crianças, redução na quantidade de ingestão diária desses produtos e das contaminações por micotoxinas de matérias-primas à base de cereais usadas para produtos alimentícios, principalmente, os destinados a crianças (Assunção *et al.*, 2018).

Tem sido observado que AFBI contamina grãos de cereais, especialmente o milho (Ibáñez-Vea *et al.*, 2011). A amostra positiva tem na sua constituição vários cereais (milho, aveia, trigo, cevada e centeio). Como os cereais são muito suscetíveis de contaminação por micotoxinas, incluindo os cereais de pequeno-almoço (Martins *et al.*, 2018) o facto de ser um produto com vários cereais na sua constituição, pode estar na justificação para um valor tão elevado de

contaminação. Apesar da utilização de várias amostras 100% integrais, não se verificou contaminação das mesmas, assim como das que não eram integrais. A única amostra contaminada resulta de uma mistura de cereais integrais e não integrais. Contudo, também não foi possível estabelecer uma correlação entre a contaminação de AFBI e os produtos de marca branca ou marca do produtor (marca conhecida). Porém, podemos verificar que as amostras com origem de produção biológica, não apresentam qualquer contaminação, apesar das restrições a que estão sujeitos durante o processo de produção, especificamente, no controlo e eliminação dos fungos.

Segundo dados do INE, da Balança Alimentar 2012-2016, em Portugal, as disponibilidades de cereais estão fortemente dependentes da importação (em média, 86,1% das necessidades nacionais de cereais provêm da importação).

Todavia, a baixa incidência de AFBI detetada nas amostras, correspondendo apenas a uma amostra positiva, comparativamente com estudos anteriormente realizados em Portugal, poderá indiciar um bom controlo e preocupação desde a produção, armazenamento, transporte e transformação dos produtos em análise. Contribuindo desta forma para a segurança alimentar dos consumidores.

É necessário continuar a monitorizar a ocorrência de aflatoxina à luz dos potenciais aumentos devido a mudanças climáticas usando métodos com altos níveis de sensibilidade para deteção (EFSA, 2020).

CONCLUSÕES

Os dados reportados de micotoxinas em grãos de cereais na literatura de referência é muito extensa, em que as aflatoxinas são consideradas as mais conhecidas e estudadas. Entre as aflatoxinas, a AFBI, é reconhecida como a mais tóxica, a mais comum e cancerígena. Tem sido observado que AFBI contamina grãos de cereais, especialmente o milho. A única amostra positiva, neste estudo, tem na sua constituição milho, para além de outros quatro cereais (integrais e não integrais). O facto de ser um produto com vários cereais na sua constituição pode contribuir para a justificar o valor elevado de contaminação da amostra. Não foram encontradas amostras positivas de origem de produção biológica.

Comparando os resultados obtidos com outros estudos a nível europeu, a incidência é bastante menor, mas a quantidade de AFBI detetada na amostra positiva deste estudo é muito superior. O valor detetado é aproximadamente quatro vezes superior ao limite máximo estabelecido na UE (2 µg/Kg). Caso seja considerado um alimento destinado a crianças jovens é setenta e seis vezes superior ao limite máximo previsto na UE (0,10 µg/kg). Quanto à avaliação da exposição é possível concluir que, quanto menor é o grupo etário, maior é o risco de exposição a AFBI, sobretudo, quanto menor for a idade da criança. Pelo que as crianças são o grupo etário que assume maior preocupação face aos resultados obtidos.

O controle contínuo dos níveis de micotoxinas nos alimentos é uma ferramenta importante para reduzir a exposição do consumidor a micotoxinas e, portanto, para fortalecer a segurança alimentar. Além disso, também é importante avaliar a exposição da população, principalmente, acompanhando a evolução dos hábitos alimentares.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRUNHOSA [et al.] (2014) – A Review of Mycotoxins in Food and Feed Products in Portugal and Estimation of Probable Daily Intakes “Food Science and Nutrition” 56:2, 249-265.

AREZES, P. M. [et al.] (2006) – Estudo Antropométrico da População Portuguesa. Lisboa: Instituto para a Segurança, Higiene e Saúde no Trabalho, 2006. (1a Ed.)

ASGHAR, M. [et al.] (2014) – Occurrence of Aflatoxins Contamination in Brown Rice from Pakistan. “Iranian J Publ Health”. Vol.43 (2014) 291-299.

ASSUNÇÃO, R. [et al.] (2018) – Portuguese children dietary exposure to multiple mycotoxins – An overview of risk assessment under MYCOMIX project. “Food and Chemical Toxicology” 118 (2018) 399-408.

BENKERROUM, N. (2019) – Retrospective and prospective look at aflatoxin research and development from a practical standpoint. “International Journal of Environmental research and public health” 2019,16,3633.

BOGALHO, F. [et al.] (2018) – Exposure assessment of Portuguese infants to Aflatoxin M1 in breast milk and maternal social-demographic and food consumption determinants. “Food Control” (2018) 90, 140-145.

EFSA (2007) – Opinion of the scientific panel on contaminants in the food chain (CONTAM) related to the potential increase of consumer health risk by a possible increase of the existing maximum levels for aflatoxins in almonds, hazelnuts and pistachios and derived products. “EFSA Journal 2007” 5 (3): 446, 127 pp. [Acedido a 3de setembro de 2020]. Disponível em: <https://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/446>

EFSA (2020) – Scientific Opinion - Risk assessment of aflatoxins in food “EFSA Journal 2020” 18 (3): 6040, 112 pp. [Acedido a 3de setembro de 2020]. Disponível em: <https://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/6040>

ESCRIVÁ, L. [et al.] (2017) – Studies on the Presence of Mycotoxins in Biological Samples: An Overview. “Toxins” 2017, 9, 251.

EUROPEAN COMMISSION (2019) – RASFF-The Rapid Alert System for Food and Feed-Annual Report 2018. “Health and food safety” [Acedido a 25 de novembro de 2019]. Disponível em: https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/safety/docs/rasff_annual_report_2018.pdf

IARC - (International Agency for Research on Cancer), 2012. Aflatoxins. Chemical Agents and Related Occupations. A review of Human Carcinogens. "IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans." 100F, 225-248.

IBÁÑEZ-VEA, M. [et al.] (2011) – Co-occurrence of aflatoxins, ochratoxin A and zearalenone in breakfast cereals from spanish market. "Food Control" 22 (2011) 1949-1955.

INQUÉRITO ALIMENTAR NACIONAL E DE ATIVIDADE FÍSICA – Ingestão de Cereais de pequeno-almoço e barras de cereais. [Acedido 5 de outubro de 2020]. Disponível em: <https://ian-af.up.pt/>

KUMAR, P. [et al.] (2017) – Aflatoxins: a global concern for food safety, human health and their management. "Frontiers in Microbiology" Vol. 7 (2017)

MAN, Y. [et al.] (2017) – Recent Advances in Mycotoxin Determination for Food Monitoring via Microchip. "Toxins" 9 (10): 324.

MARKTEST. – [Acedido 25 de novembro de 2019]. Disponível em: <https://www.marktest.com/wap/a/n/id~23cb.aspx>

MARTINS, C. [et al.] (2018) – Assessment of multiple mycotoxins in breakfast cereals available in the Portuguese market. "Food Chemistry" 239 (2018) 132-140.

MARTINS, C. [et al.] (2020) – Burden of disease associated with dietary exposure to carcinogenic aflatoxins in Portugal using human biomonitoring approach. "Food research international" (2020) 134:109210.

MARTINS, H. M. [et al.] (2005) – A six year survey (1999-2004) of the occurrence of aflatoxin M1 in dairy products produced in Portugal. "Mycotoxin research" (2005) 21(3):192-5.

MARTINS, M. L. [et al.] (2001) – Aflatoxins in spices market in Portugal. "Food Additives and Contaminants" (2001) Vol. 18, No. 4, 315z-319.

MARTINS, M. L. [et al.] (2004) – Aflatoxin M1 in yoghurt in Portugal. "International Journal of Food Microbiology" 91 (2004) 315– 317.

MATA, A. [et al.] (2015) – Bottled water: Analysis of mycotoxins by LC–MS/MS. "Food Chemistry" 176 (2015) 455–464.

McLEAN, M. [et al.] (1995) – Cellular interactions and metabolism of aflatoxin: an update. "Pharmac. Ther." Vol. 65, pp 163-192. 1995.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (2009) – “Boletim de Saúde Infantil e Juvenil” Modelo n.º 1396. Fonte – NCHS.

MUHIALDIN, B. [et al.] (2020) – Review on the Biological Detoxification of Mycotoxins Using Lactic Bacteria to enhance the sustainability of foods supply. “Molecules” 2020, 25, 2655;

NIELSEN, H. [et al.] (2009) – Consumer perception of the use of high-pressure processing and pulsed electric field technologies in food production. “Appetite” Vol. 52 (2009) 115-126.

PEREIRA, V. [et al.] (2014) – Mycotoxins in cereals and related foodstuffs: A review on occurrence and recent methods of analysis. “Food Science & Technology” 36 (2014) 96 – 136.

PITT, J. [et al.] (2017) – A concise history of mycotoxins research. “Journal of agricultural and food chemistry” Aug 23;65(33): 7021-7033.

REGULAMENTO (CE) N.º 1881/2006 da Comissão de 19 de Dezembro de 2006 – “EUR – Lex” [Acedido a 25 de novembro de 2019]. Disponível em <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/ALL/?uri=celex:32006R1881>

RUSHING, B. [et al.] (2019) – Aflatoxin B1: A review on metabolism, toxicity, occurrence in food, occupational exposure, and detoxification methods. “Food and chemical toxicology” 124 (2019) 81-100.

SMITH, L. [et al.] (2017) – Review article - Aflatoxin Exposure during Pregnancy, maternal anemia, and adverse birth outcomes. “The American Society of Tropical Medicine and Hygiene” 96(4), 2017, pp. 770-776.

TAO, F. [et al.] (2018) – Recent development of optical methods in rapid and non-destructive detection of aflatoxin and fungal contamination in agricultural. “Trends in Analytical Chemistry” (2018) 65-81.

TOLA, M. [et al.] (2016) – Occurrence, importance and control of mycotoxins: A review. “Cogent Food & Agriculture” 1-12.

TURNIPSEED, S. [et al.] (2020) – Analytical methods for mixed organic chemical residues and contaminants in food. “Analytical and bioanalytical chemistry” (2020) 5969-5980.

URUSOV, A. [et al.] (2015) – Rapid Multiple Immunoenzyme Assay of Mycotoxins. “Toxins” (2015) 7(2): 238–254.

VIEGAS, S. [et al.] (2012) – Occupational Exposure to Aflatoxin (AFB1) in Poultry Production. “Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A” (2012) 75:1330–1340.

VIEGAS, S. [et al.] (2015) – Assessment of Workers' Exposure to Aflatoxin B₁ in a Portuguese Waste Industry. "The Annals of occupational hygiene" (2015) Vol. 59, No. 2, 173–181.

VIEGAS, S. [et al.] (2016) – Occupational Exposure to Aflatoxin B₁ in a Portuguese Poultry Slaughterhouse. "The Annals of occupational hygiene" (2016) Vol. 60, No. 2, 176–183.

VIEGAS, S. [et al.] (2019) – Occupational Exposure to Mycotoxins in Swine Production: Environmental and Biological Monitoring Approaches. "Toxins" (2019) 11, 78 1-15.

VILLA, P. [et al.] (2009) – Aflatoxin B₁ and ochratoxin A in breakfast cereals from Athens market: Occurrence and risk assessment. "Food Control" 20 (2009) 455-461.

XUE, Z. [et al.] (2019) – Recent advances in aflatoxin B₁ detection based on nanotechnology and nanomaterials – A review. "Analytica Chimica Acta" (2019) 3;1069:1-27.