



UNIVERSIDADE D  
COIMBRA

Catarina Alexandra Marques Perdigão

AVALIAÇÃO DA EXPOSIÇÃO DA POPULAÇÃO PORTUGUESA  
À AFLATOXINA B1 ATRAVÉS DO CONSUMO DE ARROZ

Dissertação no âmbito do Mestrado em Segurança Alimentar orientada  
pela Professora Doutora Angelina Lopes Simões Pena e coorientada  
pela Professora Doutora Anabela Maduro de Almeida Francisco  
apresentada à Faculdade de Farmácia da  
Universidade de Coimbra

Outubro de 2020

1 2



9 0

FACULDADE DE FARMÁCIA  
UNIVERSIDADE D  
**COIMBRA**

Catarina Alexandra Marques Perdigão

**AVALIAÇÃO DA EXPOSIÇÃO DA POPULAÇÃO  
PORTUGUESA À AFLATOXINA B<sub>1</sub> ATRAVÉS DO  
CONSUMO DE ARROZ**

Dissertação no âmbito do Mestrado em Segurança Alimentar orientada pela Professora Doutora Angelina Lopes Simões Pena e coorientada pela Professora Doutora Anabela Maduro de Almeida Francisco apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Outubro de 2020



Dissertação apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra para  
obtenção do grau de Mestre em Segurança Alimentar

O estudo apresentado nesta dissertação foi realizado no Laboratório de Bromatologia, Hidrologia e Nutrição da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, e no Laboratório de Biologia Celular e Molecular da Escola Universitária Vasco da Gama sob a orientação científica da Professora Doutora Angelina Lopes Simões Pena e coorientação da Professora Doutora Anabela Maduro de Almeida Francisco.



## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente, gostaria de expressar o meu agradecimento e apreço à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra e à Escola Universitária Vasco da Gama que me proporcionaram as condições fundamentais para a realização deste projeto de investigação.

À Professora Doutora Angelina Lopes Simões Pena, minha orientadora, por me ter possibilitado a realização desta dissertação e por todo o conhecimento transmitido.

À Professora Doutora Anabela Maduro de Almeida Francisco, minha coorientadora, pela disponibilidade e incansável orientação científica, bem como, a acessibilidade, simpatia, e motivação que me concebeu, contribuindo de forma positiva para o meu percurso académico.

À Professora Doutora Liliana João Gatões da Silva, e à Professora Doutora Sofia Cancela Duarte, pela colaboração e ajuda na realização da parte experimental desenvolvida em laboratório.

Agradeço a todos os colegas de mestrado com quem tive oportunidade de partilhar o Laboratório de Bromatologia, Hidrologia e Nutrição da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra.

Agradeço também a todas as pessoas que colaboraram na recolha de diversas amostras, tornando este estudo possível.

À minha família, em especial à minha irmã e à minha mãe pelo incentivo constante, paciência e apoio ao longo de todo o meu percurso.

Aos meus amigos, por todo o apoio inigualável, motivação e por todo o carinho constante.

Ao Guilherme, o meu namorado, por me apoiar em todas as decisões e pela constante motivação e força na realização deste projeto.

A todos vós, o meu sincero e incondicional, Obrigada!



## RESUMO

As micotoxinas são metabolitos secundários produzidos por fungos filamentosos, que representam um problema grave de saúde pública. As aflatoxinas (AFs), produzidas por certas estirpes de fungos do género *Aspergillus*, apresentam efeitos mutagénicos, carcinogénicos, teratogénicos e imunossupressores, sendo a AFB1 a mais preocupante, pois foi identificada como o principal hepatocarcinogénico natural, classificado pela IARC como Grupo I.

O presente trabalho teve como objetivo analisar o nível de contaminação de AFB1 em 42 amostras de arroz, 20 das quais comercializadas em Portugal e 22 gentilmente cedidas por produtores portugueses. Esta matriz alimentar apresenta elevada importância alimentar e económica, pois corresponde ao segundo cereal com maior consumo/per capita a nível mundial.

De modo a quantificar a AFB1 nas amostras recorreu-se ao ensaio imunoenzimático (ELISA) em formato competitivo (RIDASCREEN®, R-Biopharm, Alemanha), com deteção por espectrofotómetro, de acordo com recomendações do fabricante (limite de deteção de 1 µg/kg). As amostras foram previamente extraídas usando metanol e água destilada (70:30 v/v).

Das 42 amostras de arroz analisadas, apenas 2 foram positivas (4,8%) (> limite de deteção (LOD) de 1 µg/kg para cereais), sendo os teores de contaminação de AFB1 correspondentes a 1,96 e 2,20 µg/kg. A destacar que apenas uma amostra se encontrava acima do limite máximo admissível (LMA) estipulado por lei na União Europeia (UE) (2 µg/kg).

A exposição média da população portuguesa a AFB1 através do consumo de arroz foi estimada em 1,5 ng/ kg p.c./ dia, valor largamente superior à Ingestão Diária Máxima Tolerável Provável (PMTDI) de AFB1 para adultos e crianças com ou sem hepatite.

Devido ao elevado consumo deste género alimentício, estes valores poderão constituir uma preocupação para a saúde dos consumidores. Assim, torna-se imprescindível o desenvolvimento de estudos adicionais, de forma a contribuir para a segurança alimentar no âmbito da produção e comercialização do arroz.

**Palavras-chave:** Micotoxinas, aflatoxina B1, arroz, exposição, ELISA.





## ABSTRACT

Mycotoxins are secondary metabolites produced by filamentous fungi, which represent a serious public health problem. Aflatoxins (AFs), produced by certain strains of fungi of the *Aspergillus* genus, have mutagenic, carcinogenic, teratogenic and immunosuppressive effects, being AFB1 the most hazardous, considering it was identified as the main natural hepatocarcinogen by IARC as Group I.

This study aimed to analyze the level of AFB1 contamination in 42 samples of rice, 20 of which are marketed in Portugal and 22 kindly provided by Portuguese producers. This food matrix has an important role in foodstuffs as well as in the economy, as rice is the second cereal with the highest consumption/per capita in the world.

To quantify AFB1 present in the samples, the enzyme immunoassay (ELISA) in a competitive format was used (RIDASCREEN<sup>®</sup>, R-Biopharm, Alemanha), with detection by spectrophotometry, according to the manufacturer's recommendations (detection limit of 1 µg/kg). The samples were previously extracted using methanol and distilled water (70:30 v/v).

Of the 42 rice samples analyzed, only 2 were positives (4.8%) (> detection limit (LOD), 1 µg/kg for cereals), with the contamination levels of AFB1 corresponding to 1.96 and 2.20 µg/kg. It should be noted that only one sample was above the maximum allowable limit (MAL) stipulated by the laws of the European Union (EU) (2 µg/kg).

The average exposure of the Portuguese population to AFB1 through the consumption of rice was estimated at 1.5 ng/ kg bw/ day, which is much higher than the Maximum Probable Tolerable Daily Intake (PMTDI) of AFB1 for adults and children with or without hepatitis.

Due to the high consumption of this foodstuff, these values may be a concern for the health of consumers. Further studies related to the theme are crucial, to contribute to food safety concerning rice production and commercialization.

**Keywords:** Mycotoxins, aflatoxin B1, rice, exposure, ELISA.



# ÍNDICE

<b>AGRADECIMENTOS.....</b>	<b>V</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>VII</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>IX</b>
<b>ÍNDICE DE TABELAS.....</b>	<b>XIII</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS.....</b>	<b>XIII</b>
<b>LISTA DE SIGLAS, ACRÓNIMOS E ABREVIATURAS.....</b>	<b>XV</b>
<b>PARTE TEÓRICA - I. AFLATOXINAS E METODOLOGIAS PARA A SUA DETERMINAÇÃO NO ARROZ.....</b>	<b>I</b>
<b>I.1. Enquadramento social, económico e alimentar da matriz.....</b>	<b>3</b>
I.1.1. Caracterização da matriz alimentar.....	4
<b>I.2. Micotoxinas.....</b>	<b>10</b>
I.2.1. Contexto histórico e evolução do conceito de micotoxinas.....	10
I.2.2. Fungos produtores.....	10
I.2.3. Tipos de micotoxinas e aflatoxinas.....	11
I.2.4. Coocorrência.....	12
I.2.5. Micotoxinas emergentes.....	13
I.2.6. Micotoxinas “mascaradas”.....	14
<b>I.3. Aflatoxinas.....</b>	<b>15</b>
<b>I.3.1. Características físico-químicas.....</b>	<b>15</b>
<b>I.3.2. Toxicocinética - Absorção, Distribuição, Metabolismo e Excreção (ADME).....</b>	<b>17</b>
I.3.2.1. Absorção.....	17
I.3.2.2. Distribuição.....	17
I.3.2.3. Metabolismo.....	17
I.3.2.4. Excreção.....	19
<b>I.3.3. Aspectos toxicológicos.....</b>	<b>21</b>
I.3.3.1. Humanos.....	21
I.3.3.2. Animais.....	22
<b>I.3.4. Processos de descontaminação.....</b>	<b>23</b>
<b>I.4. Enquadramento da legislação nacional e europeia.....</b>	<b>25</b>
<b>I.5. Ocorrência e fontes de exposição das aflatoxinas no arroz.....</b>	<b>26</b>
I.5.1. Alimentos destinadas ao consumo humano.....	32

I.5.2. Alimentos destinados ao consumo animal.....	33
I.5.3. Ingestão Diária Estimada vs. Ingestão Diária Máxima Tolerável Provisória.....	34
<b>I.6. Metodologia para a determinação de Aflatoxinas.....</b>	<b>35</b>
I.6.1. Amostragem.....	36
I.6.2. Técnicas de extração na preparação das amostras.....	36
<b>    I.6.3. Métodos analíticos.....</b>	<b>37</b>
I.6.3.1. Cromatografia de Camada Fina (TLC).....	38
I.6.3.2. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC).....	38
I.6.3.3. Cromatografia Gasosa (GC).....	39
I.6.3.4. Eletroforese Capilar (CE).....	39
I.6.3.5. Ensaio Imunoenzimático (ELISA).....	39
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>43</b>
<b>PARTE EXPERIMENTAL - II. DETERMINAÇÃO DE AFLATOXINA BI EM ARROZ DESTINADO AO CONSUMO HUMANO.....</b>	<b>45</b>
<b>    II.1. Materiais e métodos.....</b>	<b>47</b>
II.1.1. Amostragem.....	47
II.1.2. Reagentes químicos e soluções padrão.....	49
II.1.3. Materiais e equipamentos.....	49
II.1.4. Preparação das amostras-extração.....	50
II.1.5. Ensaio Imunoenzimático (ELISA).....	50
II.1.6. Avaliação da ocorrência e exposição.....	51
<b>    II.2. Resultados e discussão.....</b>	<b>52</b>
II.2.1. Ocorrência de Aflatoxina BI em arroz.....	53
II.2.2. Avaliação da exposição.....	55
<b>CONCLUSÃO E PERSPETIVAS FUTURAS.....</b>	<b>57</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>58</b>
<b>ANEXO.....</b>	<b>73</b>
Anexo I – Concentração das amostras em estudo.....	74

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 – Caracterização dos tipos de arroz comercializados.....	8
Tabela 2 – Estruturas químicas, fórmula química e peso molecular de ABFI, AFB2, AFG1, AFG2, AFMI e AFM2.....	16
Tabela 3 – Limites máximos de AFs no arroz.....	25
Tabela 4 – Limites máximos permitidos de ABFI e somatório de AFs em cereais/ arroz referente a alguns países produtores.....	26
Tabela 5 – Ocorrência de AFs na matriz arroz no Mundo.....	29
Tabela 6 – Caracterização da matriz em estudo.....	48
Tabela 7 – Concentração de ABFI nas amostras em estudo.....	53

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – N° notificações de micotoxinas e AFs em géneros alimentícios ao longo da última década.....	4
Figura 2 – Distribuição descendente da produção de arroz, em toneladas (t), em diferentes países/regiões do mundo, no ano de 2018.....	6
Figura 3 – As regiões de produção de arroz em Portugal.....	7
Figura 4 – Gãos de arroz: 1. em casca ou <i>paddy</i> ; 2. em película ou integral; 3. branqueado ou Suriname; 4. vaporizado, estufado ou <i>parboiled</i> ; 5. agulha; 6. Carolino.....	9
Figura 5 – Estruturas químicas das ENNs e da BEA.....	14
Figura 6 – Micotoxinas mascaradas estruturalmente elucidadas.....	15
Figura 7 – Metabolismo da ABFI.....	20
Figura 8 – Mecanismo de ação da ABFI.....	21
Figura 9 – Percentagem de amostras de arroz com níveis de ABFI abaixo e acima do LMA na EU, referentes aos estudos da Tabela 5.....	32
Figura 10 – Consumo humano de arroz branqueado e semibranqueado per capita (kg/ hab./ ano).....	34

Figura 11 – Esquema das etapas da técnica ELISA em formato competitivo.....	41
Figura 12 – Caracterização das amostras de arroz em estudo, quanto ao tipo e à sua origem.....	47
Figura 13 – Curva XY'W]MfU ~c obtida no ensaio....."	52
Figura 14 – Os níveis de contaminação de AFBI nas amostras positivas e os LMAs da EU, China e Índia, representados em linhas horizontais.....	53

## LISTA DE SIGLAS, ACRÓNIMOS E ABREVIATURAS

ADME – Absorção, Distribuição, Metabolismo e Excreção

AF-8,9-epóxido – Aflatoxina-8,9-epóxido

AFAR – *Aflatoxin Aldehyde Reductase* (em português, Aflatoxina Aldeído Redutase)

AFBI ou BI – Aflatoxina BI

AFBI-FAPY – Aflatoxina BI-Formamidopirimidina

AFBI-N7-gua – Aflatoxina-N7-guanina

AFBI- $\alpha$ -FAPY – Aflatoxina BI-alfa-Formamidopirimidina

AFBI- $\beta$ -FAPY – Aflatoxina BI-beta-Formamidopirimidina

AFB2 ou B2 – Aflatoxina B2

AFG1 ou G1 – Aflatoxina G1

AFG2 ou G2 – Aflatoxina G2

AFM1 ou M1 – Aflatoxina M1

AFM2 ou M2 – Aflatoxina M2

AFPI ou PI – Aflatoxina PI

AFQ1 ou Q1 – Aflatoxina Q1

AFs – Aflatoxinas

AO – *Ovalbumin* (em português, ovalbumina)

ASAE – Autoridade de Segurança Alimentar e Económica

Aw – *Activity of Water* (em português, Atividade da Água)

BEA – Beauvericina

BMDL<sub>10</sub> – *Benchmark dose lower confidence limit for a 10% increase in tumour incidence* (em português, Dose de referência no menor limite de confiança para o aumento de 10% na incidência de tumores)

CE – *Capillary Electrophoresis* (em português, Eletroforese capilar)

CHC – Carcinoma Hepatocelular

CV – Coeficiente de Variação

D3G – Desoxinivalenol-3-beta-D-glicosídeo

DGAV – Direção Geral de Alimentação e Veterinária

DNA – *Deoxyribonucleic acid* (em português, Ácido Desoxirribonucleico)

DON – Desoxinivalenol

EC – *European Commission* (em português, Comissão Europeia)

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



ELISA – *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (em português, Ensaio Imunoenzimático)

ENNs – Eniatinas

FAO – *Food and Agriculture Organization* (em português, Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura)

FBs – Fumonisinias

FUSXG – Fusarenona-X-glicosídeo

GC – *Gas Chromatography* (em português, Cromatografia gasosa)

GEMS/Food – *Global Environment Monitoring System-Food Contamination Monitoring and Assessment Programme*

GST – Glutathione-S-transferase

HPLC – *High Performance Liquid Chromatography* (em português, Cromatografia Líquida de Alta Performance)

HPLC-FLD – *High Performance Liquid Chromatography coupled to Fluorescence Detection* (em português, Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Detetor de Fluorescência)

HPLC-MS – *High Performance Liquid Chromatography Mass Spectrometry* (em português, Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas)

IAC – *Immunoaffinity columns* (em português, colunas de imunoafinidade)

IAC-HPLC – *High Performance Liquid Chromatography with Immunoaffinity columns* (em português, Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a colunas de imunoafinidade)

IARC – *International Agency for Research on Cancer* (em português, Agência Internacional para a Investigação do Cancro)

IGP – Indicação Geográfica Protegida

JECFA – *Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives*

KLH – *Keyhole limpet hemocyanin* (em português, hemocianina de lapa tipo buraco de fechadura)

LAB – *Lactic acid bacteria* (em português, bactérias do ácido láctico)

LBA – *Ligand Binding Assays* (em português, ensaios de ligação)

LC-MS – *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry* (em português, Cromatografia Líquida/ acoplado à Espectrometria de Massa)

LC-MS/MS – *Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry* (em português, Cromatografia Líquida acoplado à Espectrometria de Massa Sequencial)

LC-UV – *Liquid Chromatography/Ultraviolet* (em português, Cromatografia Líquida com detecção Ultravioleta)

LLE – *Liquid-Liquid Extraction* (em português, Extração Líquido-Líquido)

LOD – *Limit of detection* (em português, Limite de detecção)

LOQ – *Limit of quantification* (em português, Limite de quantificação)

OMS – Organização Mundial de Saúde

OTA – Ocratoxina A

p.c. – Peso corporal

PMTDI – *Provisional Maximum Tolerable Daily Intake* (em português, Ingestão Diária Máxima Tolerável Provável)

PNCA – Plano Nacional de Colheitas de Amostras

ppb – Partes por bilhão

ppm – Partes por milhão

RASFF – *Rapid Alert System for Food and Feed* (em português, Sistema de Alertas Rápidos para Alimentação Humana e Animal)

RP-HPLC-PDA-FLD – *Reverse Phase High Performance Liquid Chromatography with a Photodiode Array and Fluorescence Detector* (em português, Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Fase Reversa acoplado a um Detetor de Díodos e um Detetor de Fluorescência)

SCF – *Scientific Committee for Food* (em português, Comité Científico da Alimentação Humana)

SFE – *Supercritical Fluid Extraction* (em português, Extração de Fluido Supercrítico)

SPE – *Solid Phase Extraction* (em português, Extração em Fase Sólida)

t – Toneladas

TLC – *Thin-Layer Chromatography* (em português, Cromatografia em Camada Fina)

UE – União Europeia

UV – Luz Ultravioleta

VHB – Vírus da Hepatite B

VHC – Vírus da Hepatite C

VNI – Nivalenol

WHO – *World Health Organization* (em português, Organização Mundial de Saúde)

Z14G – Zearalenona-4-glicosídeo

ZEA – Zearalenona



**PARTE TEÓRICA - I. AFLATOXINAS E METODOLOGIAS  
PARA A SUA DETERMINAÇÃO NO ARROZ**



## I.1. Enquadramento social, económico e alimentar da matriz

Segundo o *Codex Alimentarius* (do latim, Lei ou Código dos Alimentos), a *Segurança Alimentar* define-se como a garantia de que os alimentos permanecem seguros e nutritivos, ao assegurar a ausência, ou níveis aceitáveis e seguros de perigos alimentares que podem prejudicar a saúde dos consumidores em todas as etapas da cadeia alimentar, em outros termos, “do prado ao prato” (Aragão, 2014). Os *perigos de origem alimentar* classificam-se como microbiológicos, químicos, físicos, nutricionais e/ou radiológicos (ASAE, Perigos de Origem Alimentar). No âmbito dos perigos químicos encontram-se incluídas as micotoxinas, metabolitos produzidos por fungos toxigénicos. No presente trabalho serão abordados de forma mais detalhada as Aflatoxinas (AFs).

No âmbito nacional, o Plano Nacional de Colheitas de Amostras (PNCA) tem por objetivo garantir que os alimentos que ingerimos não constituem um risco para a saúde (ASAE, 2019), ou seja, tal como refere o artigo 14º do Regulamento (EC) n.º 178/2002, garantir que os géneros alimentícios colocados no mercado são efetivamente seguros. No período de 2014 a 2017, foram analisadas 1387 amostras no âmbito deste plano, sendo a taxa de incumprimento dos limites máximos permitidos de micotoxinas cerca de 3% (ASAE, 2019).

Na União Europeia (UE), o *Rapid Alert System for Food and Feed* (RASFF), em português, Sistema de Alertas Rápidos para Alimentação Humana e Animal, permite a partilha rápida e eficiente de informação sobre os perigos alimentares entre os diferentes Estados-Membros (Parlamento Europeu e do Conselho, 2002). Sempre que é detetado um perigo para a saúde pública, tanto a nível do mercado interno como das fronteiras, este é emitido por um ponto de contacto, incumbência exercida em Portugal pela Direção Geral de Alimentação e Veterinária (DGAV), no Gabinete de Trocas Intracomunitárias (ASAE, RASFF). O RASFF permite estabelecer critérios para a identificação de riscos emergentes para a segurança alimentar, bem como, verificar os casos mais frequentes que ocorreram num dado período (EC, 2019).

Os dados dos relatórios anuais do RASFF (2010-2019), mostram que as micotoxinas são um dos agentes químicos com maior número de notificações ao longo da última década (Figura 1). No ano de 2018 e 2015 as micotoxinas constituíram o perigo químico com mais casos reportados. Contudo, foi em 2010 que se registou o maior nº de notificações, 656 notificações para micotoxinas, das quais 626 corresponderam a AFs. Segundo o portal RASFF em 2019, foram emitidas 553 notificações referentes às micotoxinas em géneros alimentícios, sendo que 84,6% correspondiam a AFs (Figura 1).

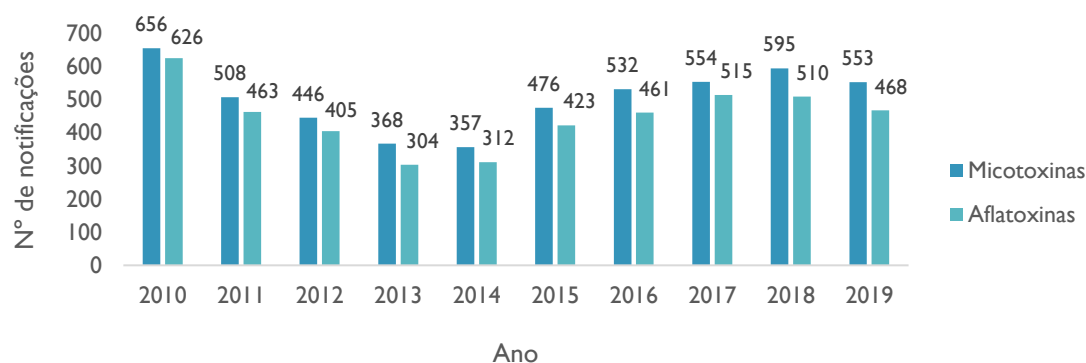


Figura I – N° notificações no RASFF de micotoxinas e AFs em géneros alimentícios ao longo da última década (Fonte: RASFF).

O arroz corresponde a um dos cereais afetados pelas AFs. Contudo, o n° de notificações de AFs no arroz ao longo da última década não tem excedido uma dezena, sendo o valor mais elevado também em 2010, com 14 notificações. Em 2019, foram notificadas 10 amostras com risco sério, ou seja, amostras que excedem os limites legais permitidos e que por isso, foram retiradas do mercado. O teor mais elevado de Aflatoxina AFBI (AFBI) correspondeu a um lote de arroz basmati importado do Paquistão, com 19,9 µg/kg de AFBI, e o respetivo somatório de AFs de 21,6 µg/kg. Contudo, segundo a legislação em vigor, o Regulamento (UE) n.º 165/2010, estes teores de AFs apresentados são largamente superiores ao máximo permitido para cereais (2 µg/kg para o teor individual da AFBI e 4 µg/kg para o total de AFs (somatório das AFs, BI, B2, GI e G2)) (EC, RASFF Portal).

### I.1.1. Caracterização da matriz alimentar

Em relação à matriz alimentar em estudo, o arroz consiste numa planta da família botânica Poaceae, assim como, o trigo, centeio, aveia, cana-de-açúcar, milho, entre outros (Swaminathan, 1985). Este cereal faz parte da dieta da maioria da população mundial, desempenhando um papel fulcral na economia e na sociedade (Sales & Yoshizawa, 2005; Borba, Rodrigues & Badiale-Furlong, 2019). Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), em 2003, através do programa *Global Environment Monitoring System-Food Contamination Monitoring and Assessment Programme* (GEMS/Food), o arroz apresentou-se como o segundo cereal com maior consumo/per capita, logo após o trigo (WHO, 2003).

Numa perspetiva histórica, as primeiras referências às culturas de arroz em Portugal surgiram no reinado de D. Dinis (1279-1325), destinando-se apenas à mesa dos mais ricos (Rama, 2014; Pires, 2015; Garcia, 2017). Mais tarde, no séc. XVIII, durante o reinado de D.

José, surgiram fortes incentivos à produção deste cereal, principalmente nas regiões dos estuários dos principais rios de Portugal. No entanto, devido às más práticas agrícolas daquela época, e ao uso de zonas de “águas paradas” o seu consumo ficou associado ao desenvolvimento de doenças, tais como o paludismo e a malária (Garcia, 2017).

Do ponto de vista nutricional, o arroz consiste numa boa fonte de vitaminas B e E, riboflavina, tiamina e niacina, mas pouca ou nenhuma vitamina A, C ou D (Seck *et al.*, 2012). Destaca-se também por ser um alimento rico em hidratos de carbono, principalmente de amido, de elevado valor calórico. Possui pequenas quantidades de elementos essenciais à dieta, como ferro e zinco. A maioria dos países asiáticos apenas conseguem obter estes micronutrientes devido à elevada ingestão de arroz (Gregorio, Senadhira & Htut, 1999). O consumo de arroz nestes países corresponde a 100-150 kg/ pessoa/ ano, em contrapartida, nos restantes países do mundo o consumo médio é de 60 kg/ pessoa/ ano (Katsurayama & Taniwaki, 2017). Portugal é considerado o maior consumidor europeu de arroz, com cerca de 16 kg/ per capita/ ano (Antunes & Ferreiro, 2017). A Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura (FAO), previu que em virtude do incremento populacional seria necessário aumentar a produção de arroz, sendo que a previsão de produção de arroz para 2018 correspondeu a 769,9 milhões de toneladas (t), de modo a garantir que toda a população obtivesse este alimento básico, garantido assim a *Food Security* (FAO, 2018a).

As espécies de arroz mais consumidas a nível mundial correspondem à *Oryza sativa*, produzida em maior escala na Ásia, e *O. glaberrima*, na África Ocidental (Swaminathan, 1985). Em Portugal, o grão longo é o mais consumido, sendo subdividido em duas denominações, o estreito, isto é, o arroz agulha (Indica) e o oblongo, que corresponde ao arroz carolino (Japonica) (Katsurayama & Taniwaki, 2017). Cerca de 90% do arroz consumido no mundo é cultivado na Ásia, sendo a China o principal produtor (Figura 2). Segundo dados da FAO, em 2018, a China produziu 215 milhões de t de arroz, seguindo-se a Índia, Indonésia, Bangladesh, entre outros (FAO, 2018b). Em Portugal, a produção de arroz em 2018 foi de 161 mil t, correspondendo apenas a 5,5% do total produzido na UE (FAO, 2018b). O arroz é maioritariamente cultivado em condições de regadio, de modo a garantir a existência de suficientes reservas de águas nos períodos de privação (Figueiredo *et al.*, 2013; Antunes & Ferreiro, 2017). Em Portugal, a maioria da produção de arroz encontra-se localizada em bacias hidrográficas, devido à necessidade de água nas culturas, nomeadamente na bacia do Mondego (Figueira da Foz, Coimbra), nas bacias da Beira Baixa, na bacia do Sado (Alcácer do Sal), na bacia dos afluentes do Tejo, bem como no Alentejo e Algarve (Figura 3) (Figueiredo *et al.*, 2013; Antunes & Ferreiro, 2017).



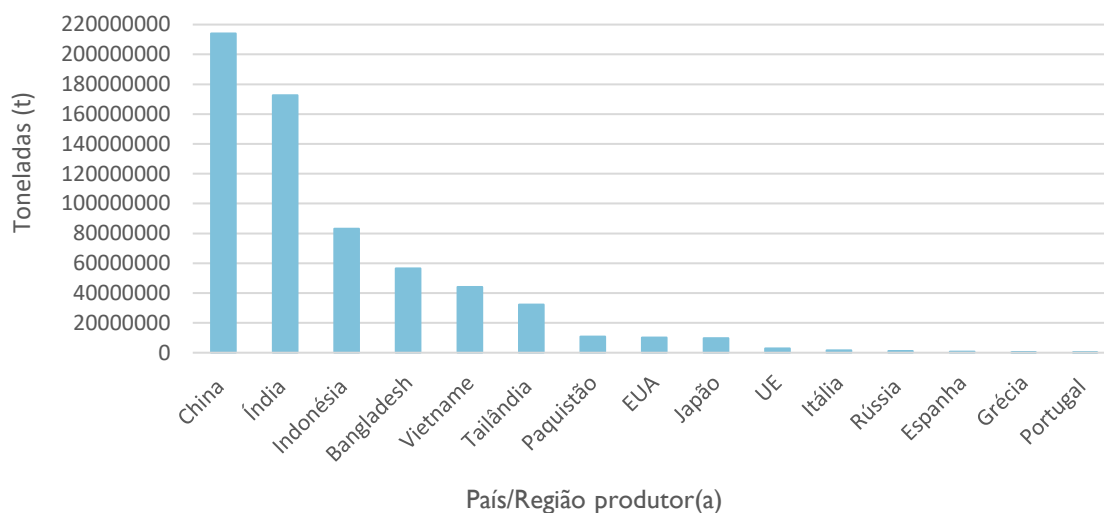


Figura 2 – Distribuição descendente da produção de arroz, em toneladas (t), em diferentes países/regiões do mundo, no ano de 2018 (Adaptado de FAO, 2018b).

Em Portugal, até ao momento, apenas duas marcas de arroz foram classificadas como Indicação Geográfica Protegida (IGP's), o caso do Arroz Carolino das Lezírias Ribatejanas IGP e do Arroz Carolino do Baixo Mondego IGP. O arroz IGP possui determinadas características de qualidade e reputação, que estão relacionadas com a sua origem geográfica (Figueiredo et al., 2013; Antunes & Ferreira, 2017).

Existe diversos fatores que influenciam o cultivo de arroz, nomeadamente, as temperaturas elevadas, principalmente durante a floração, a água disponível que delimita a área de cultivo e que influencia o aparecimento de doenças, e a radiação solar a que os arrozais são expostos (Figueiredo et al., 2013). O arroz constitui um dos principais produtos agrícolas suscetíveis a danos por fungos antes e/ou depois da colheita, bem como nos locais de armazenamento (Sales & Yoshizawa, 2005; Battilani et al., 2012). Normalmente o arroz é colhido com um teor de humidade entre 16% e 28%, dependendo da técnica de colheita (Battilani et al., 2012). Posto isto, é imprescindível que o arroz se mantenha seco, uma vez embalado, não pode exceder o teor de humidade de 14%, de modo a impedir as condições ideais (alta humidade e temperatura) para o crescimento de fungos, e consequentemente de toxinas (Decreto-Lei n.º 157/2017 de 28 de dezembro do Ministério Agricultura, Florestas e Desenvolvimento Rural, 2017).



Figura 3 – Distribuição das regiões de produção de arroz em Portugal (Adaptado de Antunes, & Ferreiro, 2017).

Após a colheita do arroz, este pode ser submetido aos seguintes processos físicos: secagem, descasque e branqueamento (Antunes & Ferreiro, 2017). Antes de ser submetido ao descasque, o arroz em casca, contém frequentemente teores de AFs ligeiramente superiores aos limites máximos permitidos. Contudo, após o descasque e branqueamento, processo que retira totalmente a casca, os teores de AFs no arroz branqueado normalmente situam-se abaixo dos teores máximos (EC, 2010).

O arroz apresenta diversas características no comércio, enumeradas na Tabela I (Alimentarius, 1995; Decreto-Lei n.º 157/2017 de 28 de dezembro do Ministério Agricultura, Florestas e Desenvolvimento Rural, 2017).

Tabela I – Caracterização dos tipos de arroz comercializados.

Estado físico do arroz	Descrição
<b>Arroz em casca (<i>paddy</i>)</b>	Arroz envolvido pela casca após a debulha e separação dos grãos.
<b>Arroz sem casca/ descascado, em película, integral ou meio preparo</b>	Arroz ( <i>paddy</i> ) em que apenas a casca foi retirada.
<b>Arroz semibranqueado</b>	Arroz ( <i>paddy</i> ) em que foi removida a casca, uma parte do gérmen e todas ou parte das camadas externas do pericarpo, mas não as camadas internas.
<b>Arroz branqueado</b>	Arroz ( <i>paddy</i> ) com a eliminação total da casca, das camadas exteriores e interiores do pericarpo, bem como a totalidade do gérmen, no caso do arroz de grãos longos e de grãos médios ou pelo menos uma parte no caso do arroz de grãos redondos.
Dimensão dos grãos de arroz	Descrição
<b>Grãos redondos</b>	$\leq 5,2$ mm de comprimento e cuja relação comprimento/largura seja $< 2$ .
<b>Grãos médios</b>	$\geq 5,2$ mm de comprimento e $\leq 6,0$ mm e cuja relação comprimento/largura seja $< 3$ .
<b>Grãos longos</b>	Dividem-se em 2 categorias A e a B, na categoria A, $> 6,0$ mm de comprimento e cuja relação seja $< 3$ comprimento/largura $> 2$ , já na categoria B, $> 6,0$ mm de comprimento e cuja relação seja comprimento/largura $\geq 3$ .

Fonte: Alimentarius, 1995; Decreto-Lei n.º 157/2017 de 28 de dezembro do Ministério Agricultura, Florestas e Desenvolvimento Rural, 2017.

Atualmente existem disponíveis diversas variedades de arroz, desde arroz branco ou descascado a arrozes exóticos, como basmati, selvagem entre outros (Figura 4).

O arroz integral é um tipo de arroz que apenas foi submetido ao descasque e à limpeza. Como não foi sujeito ao branqueamento, trata-se de um arroz mais rico em fibras, minerais e vitaminas. O arroz basmati, que consiste numa variedade de arroz de grãos longos. Sendo o Paquistão e a Índia os maiores produtores deste arroz. O arroz aromático jasmine ou thai, trata-se de uma variedade de grãos longos bastante apreciada na Tailândia pelo seu aroma. Por último, o arroz selvagem é uma erva aquática da América do Norte (*Zizania aquatica*) cujos grãos são duas a três vezes mais compridos do que as variedades de *Oryza* spp. (EC, 2020).

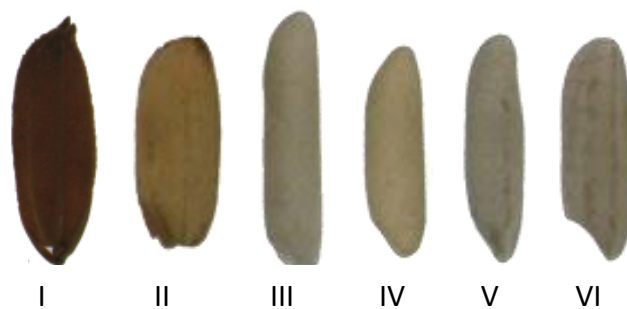


Figura 4 – Gãos de arroz: I. em casca ou *paddy*; II. em película ou integral; III. branqueado ou Suriname; IV. vaporizado, estufado ou *parboiled*; V. agulha; VI. carolino (Adaptado de Arroz Carolino das Lezírias Ribatejanas).

De referir que qualquer tipo de arroz pode ser sujeito a um tratamento térmico durante o seu processamento industrial, sendo nesse caso designado por arroz vaporizado ou pré-cozido (Katsurayama & Taniwaki, 2017).

Em relação ao acondicionamento, o arroz e trinca de arroz destinado a retalho são obrigatoriamente pré-embalados. No entanto, o arroz e a trinca de arroz destinados a industriais, grossistas, entidades aos mesmos equiparadas e exportadores podem ser comercializados a granel. É importante garantir uma adequada conservação, visando que o material em contacto com o arroz e trinca de arroz seja impermeável, inerte e inócuo em relação ao conteúdo (Decreto-Lei n.º 157/2017 de 28 de dezembro do Ministério Agricultura, Florestas e Desenvolvimento Rural, 2017).

O arroz pode ser sujeito a diversos contaminantes químicos, tais como, metais pesados (principalmente, chumbo e arsénio), resíduos de pesticidas e micotoxinas, que serão aprofundadas no presente trabalho (EC, RASFF Portal; Alimentarius, 1995).

Segundo alguns estudos, o arroz basmati correspondeu ao arroz com teores de contaminação mais elevados de AFs. Maioritariamente importado do Paquistão e da Índia, onde o controlo alimentar é bastante reduzido, apresentando frequentemente teores de AFs superiores ao máximo permitido (EC, 2010; Drumond, 2012).

## **I.2. Micotoxinas**

### **I.2.1. Contexto histórico e evolução do conceito de micotoxinas**

O termo micotoxinas, deriva de 2 palavras, a palavra grega, *Mykes*, que significa fungos e o termo do latim, *Toxicum*, que significa toxina (Turner *et al.*, 2009; Medeiros *et al.*, 2012). Este termo surgiu na década de 60, após uma crise veterinária no Reino Unido, que ficou conhecida como, a “*Turkey X disease*”, envolvendo a morte de numerosas aves da família Phasianidae, como, galinhas, faisões, patos, perus e perdizes, estimada em pelo menos 100,000 perdas de aves (Goldblatt, 1969). As aves afetadas ingeriram rações de amendoim contaminadas com AFs provenientes da América do Sul, mais especificamente do Brasil (Kensler *et al.*, 2010). As perdas foram reportadas em distintos pontos do globo, tais como, Reino Unido, Quênia e Uganda (Asplin & Carnaghan, 1961). Este evento levou à descoberta das AFs, um dos grupos de micotoxinas mais tóxicas que se conhece (Richard, 2008).

As aves que sofreram a exposição apresentavam sinais clínicos característicos, entre os quais, perda de apetite, letargia e fraqueza das asas. Os patos juvenis foram os mais suscetíveis à intoxicação. Além disso, nos exames *post-mortem*, observaram-se lesões e hemorragias hepáticas nas aves, bem como, rins edemaciados e degenerescência das células hepáticas (Goldblatt, 1969).

Após a crise, a principal tese exclamava que as rações tinham sido intencionalmente contaminadas com substâncias tóxicas conhecidas, de natureza biológica ou química (Goldblatt, 1969; Richard, 2008). Contudo, o cientista Austwick (1960) forneceu a primeira evidência para refutar a hipótese formulada, propondo que se tratava de uma toxina de origem fúngica, pois após observação microscópica das amostras contaminadas, verificou que os cotilédones dos amendoins continham hifas.

Adiante, em 1961, Sargeant comprovou que *Aspergillus flavus*, um fungo filamentosos, era de facto o agente responsável pelas contaminações. Em 1963, a estrutura química da AFBI foi elucidada, e a origem da palavra aflatoxina derivou da expressão inglesa “*A. flavus toxin*” (Goldblatt, 1969).

### **I.2.2. Fungos produtores**

Os fungos são seres eucariotas e heterotróficos que podem classificar-se como unicelulares (leveduras) ou filamentosos. São microrganismos ubiqüitários, ou seja, encontra-se distribuídos abundantemente e amplamente pelo ambiente, proliferando rapidamente nos

solos, plantas, alimentos, papel e vidro (Pereira *et al.*, 2002). O modo de nutrição destes seres vivos é maioritariamente por absorção (Vitorino, 2012).

Assim, os alimentos constituem um hospedeiro vulnerável ao desenvolvimento de fungos, principalmente quando associado a práticas inadequadas de colheita, transporte, secagem, armazenamento e/ou embalagem (Pereira *et al.*, 2002; Mousavizadeh *et al.*, 2017). O reino Fungi é responsável pela maioria das deteriorações dos alimentos, causando um impacto visual negativo, bem como a eventual formação de micotoxinas nos géneros alimentícios (Pereira *et al.*, 2002; Baptista & Venâncio, 2003).

Os principais fungos produtores de micotoxinas que contaminam os alimentos pertencem aos géneros *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp. e *Fusarium* spp. (Lautert *et al.*, 2014). Variados géneros alimentícios são suscetíveis aos fungos produtores de micotoxinas, e alguns estão fortemente representados na roda dos alimentos, como por exemplo, os cereais, frutos secos, arroz, milho, entre outros (Duarte *et al.*, 2014).

As condições ideais para o crescimento de fungos do género *Aspergillus*, responsáveis pela formação das AFs, correspondem a valores de humidade relativa compreendidos entre 80 e 85% e temperaturas relativamente altas, entre 24 e 35°C (Guevara-Gonzalez, 2011).

### **1.2.3. Tipos de micotoxinas e aflatoxinas**

Até à data, foram reportadas mais de 500 micotoxinas diferentes (Medeiros *et al.*, 2012), constituindo um problema crescente na segurança alimentar. As micotoxinas são metabolitos secundários produzidos por fungos filamentosos do Filo Ascomycota (Whittaker, 1969; EFSA, 2019).

As micotoxinas são compostos orgânicos, relativamente pequenos (massa molecular (MW) ~700 g/mol) (Turner *et al.*, 2009; Duarte *et al.*, 2014), quimicamente estáveis e altamente resistentes aos métodos de processamento utilizados na indústria alimentar (ASAE, 2015). A toxicidade destes contaminantes varia consoante a sua estrutura química e origem biossintética, sendo diversos os efeitos biológicos (Bennett & Klich, 2003).

As micotoxinas incluem vários compostos, designadamente, ácido ciclopiazónico, AFs, citrinina, esterigmatocistina, fumonisinas (FBs), ocratoxina (OTA), patulina, tricotecenos (desoxinivalenol (DON), nivalenol (VNI), toxina T-2 e HT-2) e zearalenona (ZEA). As micotoxinas são categorizadas consoante o fungo produtor, sendo o género *Aspergillus*, nomeadamente as espécies *Aspergillus flavus* e *A. parasiticus* as responsáveis pela produção das AFs. *Fusarium* genus podem produzir variadas micotoxinas, entre elas, FBs, tricotecenos e ZEA.

Por último, *Aspergillus alutaceus* (originalmente *Aspergillus ochraceus*) e espécies de *Penicillium* genus, produzem as OTAs (D'Mello & Macdonal, 1997).

Segundo a Agência Internacional para a Investigação do Cancro, *International Agency for Research on Cancer* (IARC), as principais AFs, AFBI, B2, G1 e G2 integram-se no grupo 1, *agente carcinogénico para Humanos*, sendo a AFBI identificada como o agente hepatocarcinogénico mais potente de origem natural. Em seguida, no grupo 2B, *agente possivelmente carcinogénico para o Homem*, como a Aflatoxina M1 (AFM1), a OTA, FBI. Já a ZEA, DON, Toxina T-2 classificam-se no grupo 3, *agente não classificável quanto à sua carcinogenicidade para o Homem* (IARC, 1993; 2002).

Após a exposição a micotoxinas, podem ocorrer eventos de toxicidade aguda ou crónica, bem como, efeitos hepatotóxicos, genotóxicos, imunossupressores, teratogénicos, nefrotóxicos, neurotóxicos, citotóxicos, dermatotóxicos, e/ ou de disruptores endócrinos (Marchese *et al.*, 2018; Wangia, Tang & Wang, 2019; EFSA, 2020).

Os episódios de micotoxicoses são frequentemente disseminados, com lesões principalmente nos órgãos-alvo, incluindo o fígado, rins, tecido epitelial (pele e mucosas) e o Sistema Nervoso Central, dependendo do tipo de toxina (Duarte *et al.*, 2014).

#### **1.2.4 Coocorrência**

A coocorrência de micotoxinas representa uma preocupação crescente na comunidade, visto que a exposição em simultâneo a diversas micotoxinas pode aumentar a sua toxicidade e carcinogenicidade, em comparação com a exposição a um só composto (Martins *et al.*, 2018). Diferentes micotoxinas podem ser produzidas pelo mesmo género, por exemplo, *Fusarium* spp. pode produzir no mesmo género alimentício, quer beauvericina (BEA) quer eniatinas (ENNs). Todavia, também é possível a coocorrência de micotoxinas produzidas por diferentes fungos, como é o caso, das AFs e FBs, produzidas pelo *Aspergillus* spp. e *Fusarium* spp., respetivamente (Duarte *et al.*, 2014).

Num estudo de Juan *et al.* (2013) analisaram-se 18 micotoxinas diferentes em 93 amostras de cereais. Os resultados comprovaram que 80% das amostras continham pelo menos duas micotoxinas diferentes (Juan *et al.*, 2013; Duarte *et al.*, 2014).

A avaliação da exposição a múltiplas micotoxinas é um tema crucial, que merece o devido destaque principalmente nos grupos mais vulneráveis. As crianças correspondem ao grupo populacional mais exposto a elevadas concentrações de misturas de micotoxinas, devido à razão consumo/peso corporal (p.c.). As aflatoxinas, FBs e DON, constituem as micotoxinas às quais as crianças se encontram mais expostas (Stoev *et al.*, 2010; Ruyck *et al.*, 2015).

O Regulamento (CE) n.º 1881/2006, fixa os teores máximos de certos contaminantes presentes nos géneros alimentícios, tais como, alimentos à base de cereais, fórmulas para lactentes e alimentos para bebés destinados a lactentes e crianças jovens. Contudo, existem lacunas graves na legislação referentes a este tema. A legislação implementada relativamente a certas micotoxinas (AFB1; somatório de AFB1, AFB2, AFG1 e AFG2; DON; ZEA; somatório da Toxina T-2 e Toxina HT-2 e o somatório de FBI e FB2) não considera os cereais matinais como géneros alimentícios consumidos por crianças, que geralmente apresenta limites máximos mais restritos em relação ao resto da população (EC, 2006a; Martins *et al.*, 2018).

### **1.2.5. Micotoxinas emergentes**

No grupo das micotoxinas emergentes encontramos as ENNs (A, AI, B, BI, B2, B3, B4) e a BEA, cujos limites máximos permitidos não estão estabelecidos (Duarte *et al.*, 2014). Até ao momento, foram registados 29 tipos de ENNs, sendo os mais importantes, ENN A, ENN AI, ENN B e ENN BI (Liuzzi *et al.*, 2017) (Figura 5). Estes compostos podem ser produzidos por *Fusarium spp.*, *Alternaria spp.*, *Halosarpheia spp.* e *Verticillium spp.* Já a BEA é produzida por *Beauveria spp.*, *Paecilomyces spp.*, *Polyporus spp.* e *Fusarium spp.* (Duarte *et al.*, 2014).

As ENNs e a BEA foram detetadas em várias matrizes, tais como, nozes e outros frutos secos, bananas, plantas medicinais chinesas, e também foram encontradas nos cursos de água (EFSA, 2014). São substâncias estáveis durante o processamento comercial de cereais, nomeadamente, nos processos de secagem que envolvem altas temperaturas (EFSA, 2014).

Segundo a EFSA (2014), a partir de um episódio de toxicidade aguda determinou-se que o DL<sub>50</sub> para a administração oral de BEA em ratos, é de 100 mg/kg p.c., já numa mistura de ENNs o DL<sub>50</sub> foi mais elevado, 350 mg/kg p.c..

Contudo, são necessários mais estudos de toxicidade, bem como, a validação de novos métodos analíticos, dado que nenhum ensaio imunoenzimático está disponível para a quantificação destas micotoxinas. Os métodos analíticos mais utilizados correspondem à cromatografia líquida (LC) com deteção ultravioleta (UV), ou acoplada à espectrometria de massa sequencial (MS/MS) (EFSA, 2014).



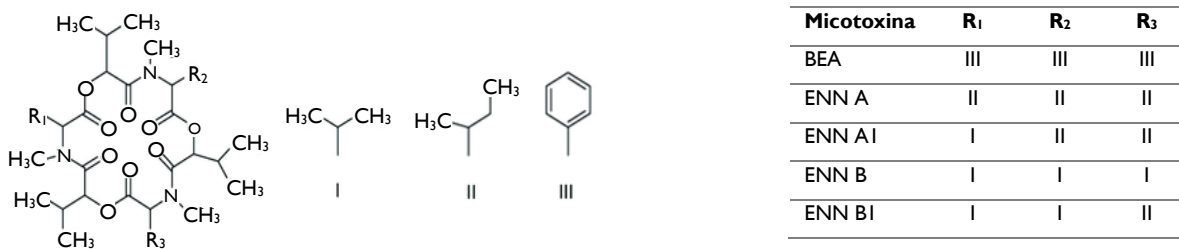


Figura 5 – Estruturas químicas das ENNs e da BEA (Adaptado de Liuzzi *et al.*, 2017; EFSA, 2014).

### 1.2.6. Micotoxinas “mascaradas”

Apesar dos avanços tecnológicos e aperfeiçoamento das técnicas de deteção das micotoxinas, recentemente foram descobertas as micotoxinas “mascaradas”, difíceis de detetar pelas técnicas analíticas convencionais (Berthiller *et al.*, 2012), dado que, a estrutura da micotoxina foi alterada devido à conjugação natural com outras moléculas como, a glicose, glutatona, ácido glicurónico, sulfato e aminoácidos (Pereria *et al.*, 2012; Duarte *et al.*, 2014). Alguns exemplos de micotoxinas mascaradas (Figura 6), tais como, desoxinivalenol-3-beta-D-glicosídeo (Fusarenona-X-glicosídeo (FUSXG) e a Zearalenona-4-glicosídeo (Z14G) foram elucidadas (Berthiller *et al.*, 2012).

Tendo em consideração que a conjugação é um processo de biotransformação do organismo, e por isso de desintoxicação, é espectável que as micotoxinas conjugadas apresentem uma toxicidade inferior relativamente à micotoxina precursora (Berthiller *et al.*, 2012); Pereria *et al.*, 2012). Contudo, pode ocorrer uma reativação parcial das micotoxinas “mascaradas”, no trato gastrointestinal dos mamíferos, durante a digestão, libertando-se a forma “livre”. Gareis *et al.*, (1990) demonstrou que efetivamente a Z14G pode decompor-se em ZEA. Bem como, que a Desoxinivalenol-3-beta-D-glicosídeo (D3G) pode converter-se em DON. Além disso, outros estudos demonstraram que a forma DG3 na cerveja pode ser superior à forma “livre” (Berthiller *et al.*, 2012).

Assim, a avaliação do risco das micotoxinas “mascaradas” nos géneros alimentícios é fundamental, avaliando a sua ocorrência, exposição e toxicidade, visto poderem contribuir para o aumento do teor total de micotoxinas. É igualmente relevante definir limites máximos permitidos para as mesmas, bem como técnicas analíticas que permitam a quantificação total da micotoxina, ou seja, o somatório da livre e da conjugada (Berthiller *et al.*, 2012; Pereira *et al.*, 2012).

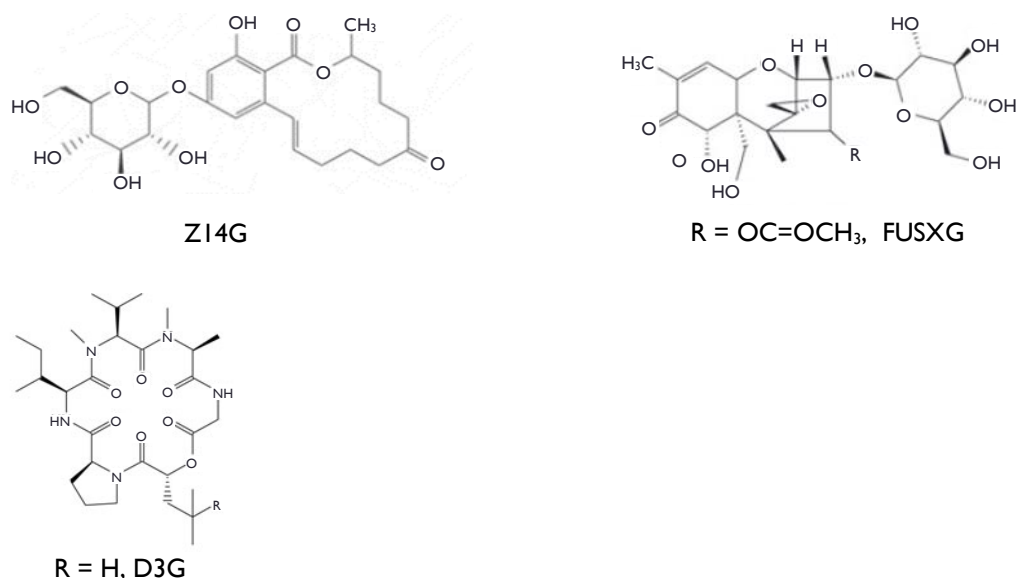


Figura 6 – Micotoxinas mascaradas estruturalmente elucidadas (Adaptado de Berthiller et al., 2013).

### 1.3. Aflatoxinas

As AFs são compostos de bisfuranocumarinas produzidos por *Aspergillus flavus* e *A. Parasiticus* (EFSA, 2019). Até ao momento, mais de 20 tipos de AFs e derivados foram identificados, conquanto, existem 5 AFs com maior relevância, B1, B2, G1, G2 e M1 (Duarte et al., 2014).

*Aspergillus flavus* privilegia as partes aéreas das plantas (como, as folhas e flores), enquanto *A. parasiticus* encontra-se mais adaptada ao solo, e possui uma distribuição mais limitada que *A. flavus* (EFSA, 2019).

#### 1.3.1. Características físico-químicas

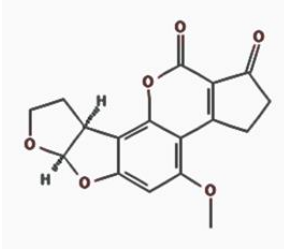
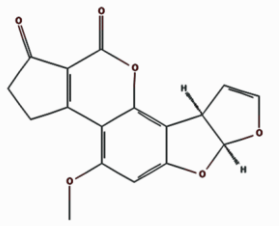
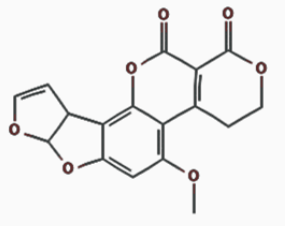
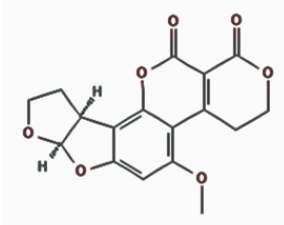
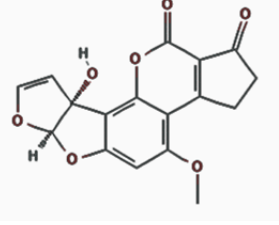
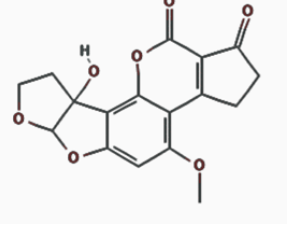
As AFs apresentam-se na forma de cristais incolores a amarelo claro, contudo, apresentam intensa fluorescência em contacto com luz ultravioleta (UV), tendo as AFs sido agrupadas consoante a fluorescência emitida. AFBI e AFB2 apresentam fluorescência azul, enquanto AFG1 e AFG2 apresentam fluorescência verde-amarelo, e a AFMI e M2, fluorescência azul-violeta (Turner et al., 2009; Duarte et al., 2014). Esta característica permite de forma eficaz a identificação e quantificação de AFs em alimentos (Midio & Martins, 2000).

O composto AFBI é uma molécula altamente insaturada, com maior efeito genotóxico (Asao et al., 1965), a AFB2, AFG1 e AFG2 apresentam apenas 50, 20 e 10% do poder genotóxico de AFBI, respetivamente (Duarte et al., 2014).

As AFs são instáveis à luz UV na presença de O<sub>2</sub>, em condições de pH extremo (<3 ou >10) e na presença de agentes oxidantes (EFSA 2019), contudo, são estáveis a temperaturas acima dos 100°C. As AFBs apresentam um anel de ciclopentano (C<sub>5</sub>H<sub>10</sub>), enquanto que as AFGs apresentam um anel de lactona (Duarte *et al.*, 2014). O anel de lactona pode abrir tanto em condições alcalinas como quando sujeitos a tratamentos com amoníaco (alta temperatura e alta pressão) (Duarte *et al.*, 2014).

As AFs são substâncias lipofílicas e de baixo peso molecular, insolúveis em solventes não polares, no entanto, são solúveis em solventes orgânicos (moderadamente polares), como o clorofórmio, metanol, benzeno, acetonitrilo, entre outros (Midio & Martins, 2000; EFSA, 2019). A solubilidade na água é de 10-20 mg/L (IARC, 2012). Em seguida, na Tabela 2, estão representadas as estruturas e formulas químicas, e o peso molecular da ABFI, AFB2, AFGI, AFG2, AFMI e AFM2.

Tabela 2 – Estrutura química, fórmula química e peso molecular de ABFI, AFB2, AFGI, AFG2, AFMI e AFM2 (Adaptado de EFSA, 2019).

<b>Nome da AF:</b>	AFBI	AFB2	AFGI
<b>Estrutura química:</b>			
<b>Fórmula química:</b>	C <sub>17</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	C <sub>17</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	C <sub>17</sub> H <sub>12</sub> O <sub>7</sub>
<b>Peso molecular:</b>	312,3 g/mol	314,3 g/mol	328,3 g/mol
<b>Nome da AF:</b>	AFG2	AFMI	AFM2
<b>Estrutura química:</b>			
<b>Fórmula química:</b>	C <sub>17</sub> H <sub>14</sub> O <sub>7</sub>	C <sub>17</sub> H <sub>12</sub> O <sub>7</sub>	C <sub>17</sub> H <sub>14</sub> O <sub>7</sub>
<b>Peso molecular:</b>	330,3 g/mol	328,3 g/mol	330,3 g/mol

### **I.3.2. Toxicocinética - Absorção, Distribuição, Metabolismo e Excreção (ADME)**

O conhecimento da toxicocinética das micotoxinas é importante para compreender a sua toxicidade (Duarte *et al.*, 2014).

Contudo, até ao presente, os estudos relativos à ADME de AFs são escassos.

#### **I.3.2.1. Absorção**

Relativamente à absorção nos humanos, Jubert *et al.* (2009) realizaram um estudo de toxicocinética da AFBI em 3 indivíduos do sexo masculino através de exposição por via oral de baixas doses de AFBI ligada a [<sup>14</sup>C]. A experiência demonstrou uma rápida absorção de AFs no trato gastrointestinal, posteriormente 95% da radioatividade foi eliminada por via urinária, após 24 horas de exposição.

#### **I.3.2.2. Distribuição**

O fígado corresponde ao órgão mais afetado devido a uma maior acumulação de AFBI (EFSA, 2019), podendo causar cirrose e cancro no fígado.

Segundo a EFSA (2019), a exposição do feto às AFs pode ocorrer através da placenta da mãe. Em diversos estudos foram detetados AFs e/ou respetivos metabolitos no soro do cordão umbilical e na placenta.

#### **I.3.2.3. Metabolismo**

Nos humanos, as enzimas do citocromo P450 (CYP450), entre elas CYP1A2, CYP3A4, CYP3A5 e CYP3A7 no fígado e CYP2A13 no pulmão são responsáveis pela biotransformação de AFBI em 2 isómeros de AFBI-8,9-epóxido (AFBO), o endo-8,9-epóxido e o exo-8,9-epóxido (Raney *et al.*, 1992; Habibi, 2019). Porém, o isómero AFBI-exo-8,9-epóxido possui uma maior expressão (Raney *et al.*, 1992). As principais isoenzimas envolvidas neste processo metabólico são a CYP3A4 e CYP1A2 no fígado (Figura 7) (Rushing & Selim, 2018).

O CYP3A4 é o principal promotor da conversão de AFBI em AFBO quando a concentração de AFBI é elevada, produzindo essencialmente exo-8,9-epóxido (Ueng *et al.*, 1995; Kamdem *et al.*, 2006). No entanto, quando a concentração de AFBI é baixa, o CYP1A2 passa a ser o principal responsável pela produção de AFBO. Em contrapartida, CYP3A4 e CYP1A2 são responsáveis pela formação de AFMI e Aflatoxina Q1 (AFQ1), respetivamente

(Ueng *et al.*, 1995), contudo, estes não apresentam o potencial carcinogénico do AFBO (Gallagher *et al.*, 1996). A via de desintoxicação do AFBO ocorre através da reação com a glutathiona (GSH), mediada pela Glutathiona S-transferase (GST), bem como, a sua redução a álcoois (Pottenger *et al.*, 2014).

Estes compostos reagem com locais nucleofílicos, nomeadamente, S, N e O do DNA e de proteínas (EFSA, 2019), com a ligação de AFBO aos resíduos de guanina no DNA, forma-se o AFBI-N7-guanina (AFBI-N7-gua). O isómero exo possui uma maior afinidade na ligação em comparação com o endo (Rushing & Selim, 2018). Este composto é instável, e rapidamente sofre depurinação, sendo posteriormente excretado na urina (Pottenger *et al.*, 2014). O AFBI-N7-gua pode converter-se em enantiómeros da formamidopirimidina (Aflatoxina BI-alfa-Formamidopirimidina e Aflatoxina BI-beta-Formamidopirimidina (AFBI- $\alpha$ -FAPY e AFBI- $\beta$ -FAPY, respetivamente)). No entanto, AFBI- $\beta$ -FAPY pode causar maiores danos a nível genotóxico (Stone *et al.*, 2011).

O oltipraz, agente quimiopreventivo, impede a formação do epóxido e induz a principal enzima de desintoxicação da AFs, a GST, bem como a Aflatoxina Aldeído Redutase (AFAR) (Creppy, 2002; Pottenger *et al.*, 2014). Devido à capacidade de inibir as principais isoenzimas do CYP450 (CYP3A4 e CYP1A2) é vulgarmente associado à prevenção do cancro no fígado induzido pela AFBI (Deng *et al.*, 2018). Adicionalmente, este composto pode afetar a formação de aductos de DNA e proteínas, e consequentemente diminuir o potencial hepatocarcinogénico do composto em ratos e humanos (Pottenger *et al.*, 2014).

O AFBI-exo-8,9-epóxido é um metabolito instável, quando sofre hidrólise forma um metabolito secundário, AFBI-8,9-dihidrodiol, porém esta reação também pode ocorrer de forma espontânea (Guevara-González, 2011). O metabolito secundário reage principalmente com proteínas, como, a albumina, não afetando o DNA (EFSA, 2019). Segundo Raney *et al.* (1992), o AFBI-endo-8,9-epóxido é menos suscetível à conversão hidrolítica em dihidrodiol do que o exo. Consequentemente, no meio biológico, o endo-epóxido pode ter um período de vida mais longo (Raney *et al.*, 1992).

O AFBI-8,9-dihidrodiol pode reorganizar-se na forma de dialdeído, e ligar-se a resíduos de lisina da proteína, formando aductos, como é o caso da albumina (Pottenger *et al.*, 2014). Contudo, o AFBI-dialdeído pode ser convertido em AFBI-diálcool após a ativação de AFAR, perdendo a capacidade de ligação a proteínas, sendo posteriormente excretado na urina e fezes (Rushing & Selim, 2018).

Assim, a exposição a AFBI pode ser monitorizada através dos aductos AFBI-N7-gua via urinária ou no sangue periférico, e através dos aductos AFBI-albumina (Montesano *et al.*, 1997; Sass *et al.*, 2013).

Como referido anteriormente, a AFB1 também pode ser metabolizada em produtos hidroxilados, tais como, a AFMI, AFQ1, aflatoxina PI (AFPI), aflatoxicol (AFL), aflatoxicol HI (AFHI) e aflatoxina B2a (AFB2a) (Ball & Coulombe, 1991; Gallagher *et al.*, 1996; Rushing & Selim, 2018; EFSA, 2019). AFQ1 e AFMI, bem como a AFPI são potenciais produtos de desintoxicação, sendo este último formado pela desmetilação (EFSA, 2019).

A AFB1 também pode ser convertida em aflatoxicol no fígado, mediado pela redutase dependente de NADPH, sendo um processo reversível (EFSA, 2019).

O metabolito AFMI é detetado tanto no leite humano como animal, após a exposição a AFB1 (Unusan, 2006; Rushing & Selim, 2018; EFSA, 2019). Segundo Creppy (2002), nos animais após a ingestão de rações contaminadas com AFB1, aproximadamente 0,3 a 6,2% é transformado em AFMI, no leite. Este consiste no metabolito hidroxilado com maior potencial carcinogénico (Rushing & Selim, 2018), como referido anteriormente, foi classificado pela IARC como grupo 2B (IARC, 2002). Alguns estudos mais antigos comprovam que a toxicidade aguda da AFMI é praticamente equivalente à da AFB1 em ratos e patos juvenis (Cullen *et al.*, 1987).

#### **1.3.2.4. Excreção**

O trato gastrointestinal consiste na principal via de excreção de metabolitos das AFs através da biliar (Razzaghi-Abyaneh, 2013).

Os metabolitos AFMI, AFQ1, AFPI e AFB1-dialcool conseguem conjugar-se com o ácido glicurónico, e posteriormente serão excretados pela via urinária e fezes (EFSA, 2019). Além disso, também são excretados na urina outros metabolitos como os ácidos mercaptúricos, resultantes da conjugação com GSH, bem como a AFB1-N7-gua e AFMI-N7-guanina (EFSA, 2020).

A existência de biomarcadores de exposição à AFB1, como AFB1-N7-gua e AFB1-lisina na urina e no sangue, respetivamente, foi já documentada (Sass *et al.*, 2013).

Segundo Zarba *et al.* (1992), 0,1 a 0,4% da porção de AFB1 ingerida através da dieta é excretada no leite humano como AFMI.

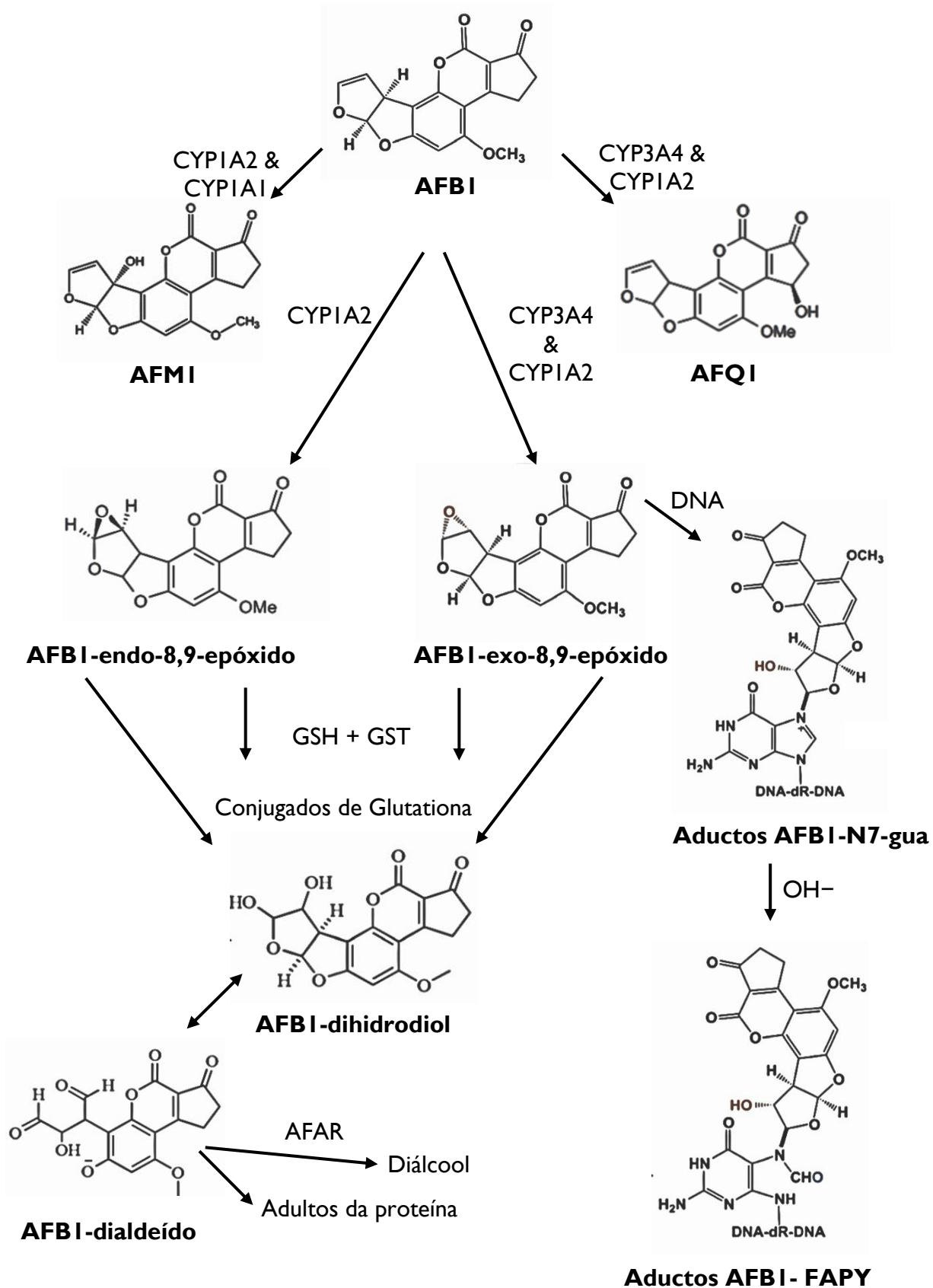


Figura 7 – Metabolismo da AFB<sub>1</sub> (Adaptado de Sass *et al.*, 2013; Pottenger *et al.*, 2014; Marchese *et al.*, 2018; Rushing & Selim, 2018).

### I.3.3. Aspetos toxicológicos

#### I.3.3.1. Humanos

A exposição crónica a alimentos contaminados com baixas concentrações de AFB1, isto é, por um período contínuo e prologado, pode deprimir a imunidade mediada por células devido à modulação da expressão de citocinas, bem como advir na baixa estatura em crianças. O Aflatoxina-8,9-epóxido ao ligar-se ao DNA pode induzir a aparecimento de doenças hepáticas, tais como, o carcinoma hepatocelular (CHC), vulgarmente definido como cancro do fígado primário, cirrose, entre outras (Midio & Martins, 2000; Jolly *et al.*, 2007; Ogodo & Ugboqu, 2016; EFSA, 2019).

Por outro lado, se a exposição a AFB1 ocorrer a curto prazo, e uma ingestão de níveis elevados de contaminação (na ordem dos ppm), o AF-8,9-epóxido rapidamente liga-se às proteínas do fígado, e conseqüentemente ocorre uma aflatoxicose aguda, que pode levar à morte (Figura 8) (Midio & Martins, 2000; Ogodo & Ugboqu, 2016; EFSA, 2019). A aflatoxicose em humanos apresenta características semelhantes com a Síndrome de Reye, um tipo de encefalopatia que surge em crianças. Esta, caracteriza-se por vómitos, hipoglicemia, convulsões, hiperamonemia, coma, e outros sintomas agudos (ASAE, 2009).

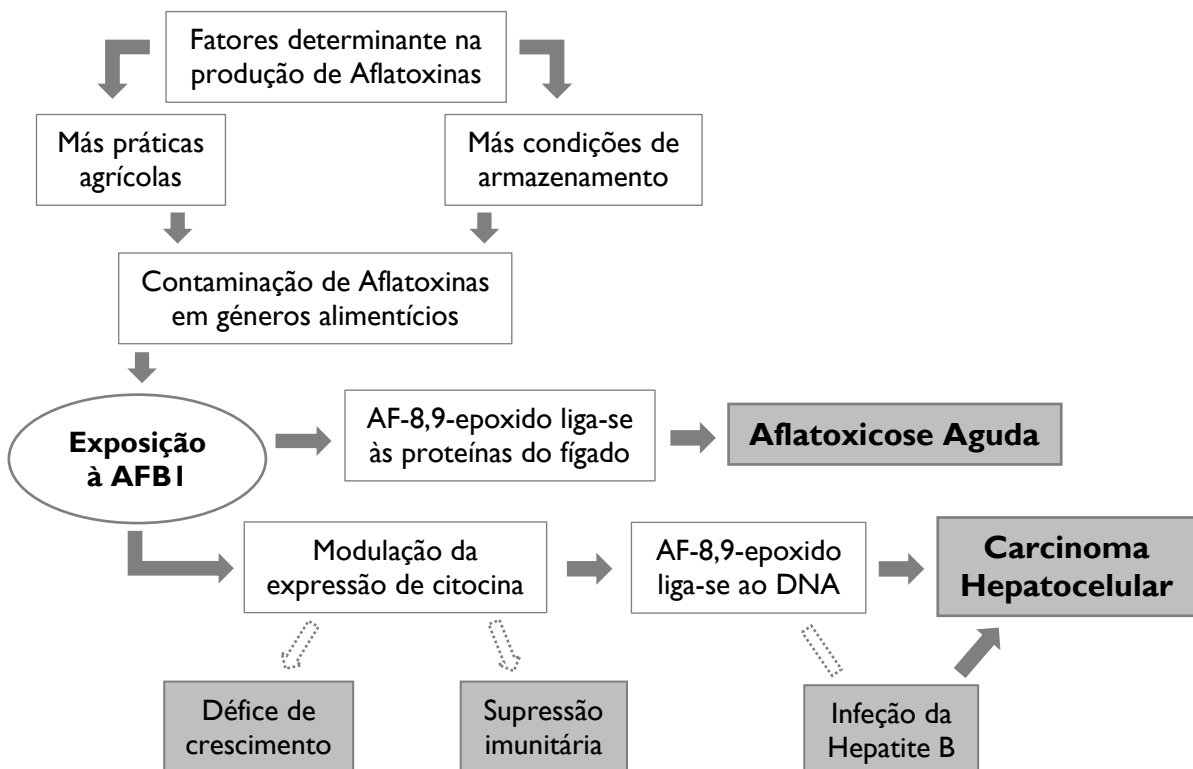


Figura 8 – Mecanismo de ação da AFB1 (Adaptado de Fung & Clark, 2004; Chen *et al.*, 2007; Jolly *et al.*, 2007; Anitha *et al.*, 2014; Ogodo & Ugboqu, 2016; ASAE, 2009).



Diversos estudos confirmam uma relação causa-efeito entre a exposição a AFBI e o aumento do risco de desenvolver carcinoma hepatocelular (Liu & Wu, 2010). Várias populações da China, Gâmbia, África Ocidental, apresentam alta incidência de CHC, sendo que a avaliação do biomarcador de exposição, AFBI-N7-gua na urina, mostrou que o risco de desenvolver CHC é diretamente proporcional à ingestão de AFs (Wogan *et al.*, 2012).

Um estudo caso-controlo realizada na Ghana, concluiu que não existiam diferenças significativas na concentração do biomarcador AFMI na urina entre os pacientes com doenças hepáticas e o controlo (n=276) (Afum *et al.*, 2016). Apesar de níveis elevados dos biomarcadores de exposição a AFs estarem associados a infeções do Vírus da Hepatite B (VHB) e Vírus da Hepatite C (VHC), não existem evidências científicas que provem que a exposição à toxina torna a infeção mais passível. Contudo, é de referir que a coinfeção com hepatite B é um fator sinérgico importante que afeta a carcinogenicidade das AFs (Fung & Clark, 2004; ASAE, 2009).

Um outro estudo, demonstrou que existe uma associação entre a infeção VHB e os níveis de AFB-lisina em pacientes com doenças hepáticas (Anitha *et al.*, 2014). As amostras analisadas apresentavam altos níveis de aductos AFBI-lisina (>76 pg/mg albumina), bem como mutações no gene TP53, que corresponde à mutação mais comum após a exposição a AFs, contudo, demonstrou fraca correlação ( $p=0,07$ ) (Anitha *et al.*, 2014). Segundo os mesmos autores, nenhuma correlação entre o consumo de arroz na população indiana e a presença de aductos de AF-albumina com a mutação TP53 ( $p=0,19$ ) foi observada. Pois os indivíduos em estudo consumiam diversos alimentos para além do arroz, como o milho, trigo e amendoim, que também podem ser sujeitos às AFs, e deste modo contribuir para um efeito cumulativo da presença de aductos AF-albumina no sangue.

Chen *et al.* (2007), também indicou uma associação entre os níveis de AF-albumina e a infeção VHB e entre níveis de AF-albumina e doenças hepáticas em doentes afetados com VHB.

No entanto, um outro estudo demonstrou que os níveis de AFs na Índia, são mais elevados nos pacientes sem VHB e VHC, indicando o papel independente da AFBI como hepatocarcinogénico (Murugavel *et al.*, (2007).

### **I. 3.3.2. Animais**

A sensibilidade e a suscetibilidade aos efeitos tóxicos das AFBI variam consoante a espécie. Em relação às aves, os patos são os mais sensíveis, seguindo-se os perus, gansos, faisões e galinhas. Diversos fatores como a raça, sexo, idade e a dieta, podem alterar a relação

dose-resposta, mesmo entre indivíduos da mesma espécie, geralmente os machos são mais suscetíveis que as fêmeas (WHO, 2002; Duarte *et al.*, 2014).

Nos casos de toxicidade aguda, os valores de LD<sub>50</sub> relatados para AFBI corresponderam entre 1,0 e 17,9 mg/ kg/ p.c., em animais de laboratório, podendo causar lesões hepáticas e efeitos teratogênicos (D'Mello & Macdonal, 1997).

Diversas micotoxinas podem agir sinergicamente entre si, e conseqüentemente causar efeitos adversos às aves de capoeira, nos casos mais graves pode levar à morte das aves (Huff *et al.*, 1988).

Algumas espécies de ruminantes, como os bovinos e caprinos, são geralmente menos suscetíveis aos efeitos tóxicos das micotoxinas, dado que estas são parcialmente degradadas pela microbiota do trato digestivo (Hussein & Brasel, 2001). Em contrapartida, estudos demonstram que a exposição a AFs pode diminuir a conversão alimentar, a imunocompetência, bem como o desempenho reprodutivo (D'Mello & Macdonal, 1997).

Segundo um estudo de Larsson *et al.*, (1990) e outro de Larsson & Tjälve, (1993), metabolitos de AFBI foram identificados tanto no fígado, como no tecido nasal de ratos e saguis. Enquanto que nos perus, a AFBI e os respectivos metabolitos foram quantificados no fígado e no tecido muscular (Gregory *et al.*, 1983).

Todavia, foi reportado que as espécies mais sensíveis aos efeitos carcinogênicos da AFBI são as trutas e os ratos (Pottenger *et al.*, 2014).

Por último, o painel da EFSA definiu BMDL<sub>10</sub> (*Benchmark dose lower confidence limit for a 10% increase in tumour incidence*) de 0,4 µg/ kg p.c./ dia para a indução de CHC devido à exposição a AFBI em ratos machos, como ponto de referência para a avaliação do risco à exposição a AFs (EFSA, 2019).

#### **1.3.4. Processos de descontaminação**

Ao longo dos últimos anos têm-se investido no desenvolvimento de novos métodos de descontaminação de micotoxinas, garantindo sempre que são seguros, eficazes, ecológicos, com uma relação custo-benefício favorável, de uso simples e capazes de reduzir a exposição a níveis aceitáveis. Além disso, necessitam previamente da aprovação pelas agências regulatórias (Duarte *et al.*, 2014).

Os métodos de descontaminação podem ser classificados como métodos físicos, químicos e/ou biológicos. Estes permitem a inativação, destruição e até mesmo a remoção das micotoxinas. No entanto, tais processos têm de assegurar que não ocorre deposições de

substâncias tóxicas, e de garantir que o valor nutritivo e as propriedades organolépticas não são alteradas, bem como, a destruição dos esporos e micélios dos fungos, de modo, a impedir a produção ou o ressurgimento da toxina (Razzaghi-Abyaneh, 2013; Duarte *et al.*, 2014).

Os métodos físicos envolvem processos como, separação mecânica e de densidade, inativação através de calor, aplicação de luz ultravioleta (UV) ou luz pulsada (PL), micro-ondas (MW), feixe de elétrons e radiação gama ( $\gamma$ ) (Duarte *et al.*, 2014; Mahato *et al.*, 2019).

Outra alternativa são os métodos químicos, agentes que quebram as estruturas químicas das micotoxinas, tais como, tratamentos com cloro (uso de hipoclorito de sódio), agentes oxidantes (peróxido de hidrogénio, ozono, bissulfito de sódio) e agentes hidrolíticos (ácidos, alcalinos e amoníaco), bem como o uso de solução de eletrólitos (Razzaghi-Abyaneh, 2013; Duarte *et al.*, 2014). Os métodos mais utilizados são o tratamento com bissulfito de sódio, capaz de reagir com AFBI, AFGI e AFMI, e a amonização. Em relação ao último método, o modo de ação envolve a hidrólise do anel de lactona da AFBI, que consequentemente forma produtos com menor toxicidade (Duarte *et al.*, 2014).

Contudo, tanto os métodos físicos como químicos apresentam desvantagens, dado que geralmente a remoção total da toxina não é conseguida, adicionada de custos elevados e/ ou perdas nutricionais do produto (Razzaghi-Abyaneh, 2013).

Por último, os métodos biológicos permitem o uso de microrganismos na eliminação ou controlo das micotoxinas nos alimentos. Esses microrganismos podem ser leveduras, fungos filamentosos, bactérias, algas, entre outros. O mecanismo de ação opera através de antibiose, competição por nutrientes e área, interações, como a produção de substâncias que interferem com a toxicidade ou modificam as micotoxinas a nível molecular (Razzaghi-Abyaneh, 2013; Duarte *et al.*, 2014). Este método em relação aos anteriores apresenta a vantagem de preservar a qualidade e a segurança do produto.

O microrganismo mais eficaz a ligar-se à AFBI, é uma levedura, *Saccharomyces cerevisiae*. Alguns géneros de bactérias do ácido láctico (LAB), como *Lactobacillus*, *Lactococcus* e *Bifidobacterium*, tem a capacidade de inibir o crescimento de fungos aumentando assim o tempo de útil de vida e as propriedades sensoriais e nutricionais dos alimentos (Ahlberg, Joutsjoki & Korhonen, 2015). As LAB conseguem inibir a biossíntese de AFs, mas caso não seja possível, conseguem remover as AFs dos géneros alimentícios, reduzindo o seu efeito (Kabak *et al.*, 2009; Razzaghi-Abyaneh, 2013).

## I.4. Enquadramento da legislação nacional e europeia

Relativamente à legislação implementada acerca das AFs, em dezembro de 2006, foi implementado o Regulamento (CE) n.º 1881/2006 da Comissão, que fixa os teores máximos de certos contaminantes presentes nos géneros alimentícios. Foi estabelecido um teor máximo de 2 µg/kg para a AFBI e de 4 µg/kg para todos os cereais e produtos derivados de cereais, incluindo assim o arroz, Tabela 3 (EC, 2006).

De referir que ao longo dos últimos anos, os limites regulatórios foram sujeitos a uma redução contínua, sendo desenvolvidos programas de controlo das micotoxinas, bem como o controlo da contaminação em muitas mercadorias (EC, 2006; Sales & Yoshizawa, 2005). Em 2010, surgiu o Regulamento (CE) n.º 165/2010 da Comissão, que altera o regulamento n.º 1881/2006, estabelecendo teores máximos permitidos de certos contaminantes presentes nos géneros alimentícios, no que diz respeito às AFs. Segundo o regulamento referido, o arroz com casca contém frequentemente teores de AFs ligeiramente superiores aos teores máximos permitidos. Contudo, após o branqueamento, processo que retira a totalidade da casca, os teores de AFs no arroz branqueado situam-se abaixo dos teores máximos permitidos (EC, 2010).

Tabela 3 – Limites máximos de AFs em cereais (Adaptado de EC, 2006).

Género alimentício	Teores máximos de AF (µg/kg)		
	BI	Somatório de B1, B2, G1 e G2	M1
Todos os cereais e produtos derivados de cereais, incluindo produtos derivados da sua transformação, com exceção dos géneros alimentícios referidos nos pontos 2.1.7, 2.1.10 e 2.1.12	2,0	4,0	—

Posteriormente, foi implementado o Regulamento (CE) n.º 1058/2012 da Comissão, de novembro de 2012, que altera o Regulamento (CE) n.º 1881/2006 no que diz respeito aos teores máximos permitidos de AFs nos figos secos (EC, 2012).

Os limites máximos admissíveis (LMA) de AFBI e o somatório de AFs em cereais podem variar consoante a legislação implementada em cada país, contudo, o limite de 2 µg/kg corresponde ao valor em vigor em pelo menos 29 países (sendo que a maioria pertence à UE) (Tabela 4). É também importante referir que até ao momento, os Estados Unidos da América, o Canadá, a Guiana, o Paquistão e a Tailândia ainda não definiram um LMA para a AFBI, sendo esperado apresentarem teores mais elevados (FAO, 2004; Liu, Gao & Yu, 2006).

Tal como referido, a China e a Índia são os principais produtores de arroz no mundo, contudo os LMA para AFBI e para o somatório de AFs nestes países são largamente superiores aos da UE, isto é, no caso da China, 10 µg/kg para AFBI e 20 µg/kg para o somatório de AFs, já na Índia os limites máximos são ambos de 30 µg/kg, constituindo um problema preocupante para a saúde dos consumidores (FAO, 2004; Liu, Gao & Yu, 2006).

Verifica-se que na Tailândia, o LMA para o somatório de AFs é 20 µg/kg, país de onde se importa o arroz Thai Jasmine. Contudo, relativamente ao Paquistão não existe LMA regulamentado nem para AFBI nem AFs, país de onde se importa o arroz basmati (FAO, 2004; Liu, Gao & Yu, 2006).

Tabela 4 – Limites máximos permitidos de AFBI e somatório de AFs em cereais/ arroz referente a alguns países produtores (unidade, µg/kg) (Adaptado de FAO, 2004; Liu, Gao & Yu, 2006).

País	Limites máximos para AFBI (µg/kg ou µg/l)	Limites máximos para o somatório de AFs (µg/kg ou µg/l)
China	10	20
Canadá	ND	ND
EUA	ND	20
Guiana	ND	ND
Índia	30	30
Paquistão	ND	ND
Tailândia	ND	20
UE	2	4

N/D – Não disponível, sem LMA regulamentado.

É fundamental que os teores máximos sejam seguros e Tão Baixos Quanto Razoavelmente Exequível (ALARA), tendo por base boas práticas agrícolas e de armazenamento (Duarte *et al.*, 2014).

## 1.5. Ocorrência e fontes de exposição das aflatoxinas no arroz

De forma a controlar a contaminação de AFs ao longo da cadeia alimentar é fundamental a implementação de boas práticas agrícolas, boas práticas de fabrico, bem como, a melhoria dos métodos de secagem e das condições de armazenamento dos géneros alimentícios (Mahato *et al.*, 2019).

A presença de AFs nos alimentos ocorre predominantemente em regiões com climas tropicais e subtropicais (Duarte *et al.*, 2014), sendo expectável que as alterações climáticas tenham um impacto na produção de AFs devido ao aumento da temperatura (Battilani *et al.*, 2012; EFSA, 2019). A contaminação pode decorrer antes ou depois da colheita, ou seja, no cultivo, armazenamento, transporte (terrestre e marítimo), e/ou processamento (Mousavizadeh *et al.*, 2017). A produção de AFs tal como do respetivo fungo dependem de certos fatores, incluindo, a temperatura, humidade, stress hídrico e pluviosidade, atividade de água (*aw*), pH, condições de armazenamento, bem como, dos danos causados por insetos e pelas práticas agrícolas (Abbas, 2005; EFSA, 2007). Segundo o Decreto-Lei n.º 157/2017 de 28 de dezembro do Ministério Agricultura, Florestas e Desenvolvimento Rural (2017), o teor de humidade do arroz não pode exceder os 14%. Apesar de o arroz sofrer um processamento térmico, a secagem, pode desenvolver “bolsas” localizadas, favoráveis à produção de AFs como resultado da humidade gerada por insetos ou condensação local devido ao fluxo do ar dentro dos silos (ASAE, 2009).

As AFs são difíceis de destruir durante o processamento, visto que estas podem permanecer mesmo com a destruição do fungo que as produziu, sendo que o aspeto, sabor ou cheiro não sofrem alterações. Tratamentos térmicos, como cozer e torrar, podem reduzir a concentração de AFs para níveis aceitáveis, mas nunca eliminam o perigo (EFSA, 2020). Segundo Yazdanpanah *et al.* (2005) a torrefação de pistachos durante 120 minutos a 150°C, permite reduzir a concentração de AFBI, em teores superiores a 95%, contudo a matéria prima deixa de ser edível. Portanto, a redução do risco de AFs envolve a redução dos níveis de contaminação, ou de consumo, ou ambos (ASAE, 2017).

A ocorrência mundial de AFs no arroz encontra-se representada na Tabela 5. Segundo os estudos apresentados, verifica-se que o arroz em casca (arroz que não foi submetido ao descasque nem ao branqueamento) apresenta níveis superiores de AFBI e do somatório de AFs relativamente ao arroz branqueado. O arroz integral, também pode apresentar valores elevados, contudo, menores do que o arroz em casca, pois o arroz integral é descascado, e assim perde a parte com as concentrações mais elevadas, contudo, como não é sujeito ao branqueamento, pelo que apresenta teores mais elevados relativamente ao arroz branqueado (Sale & Yoshizawa, 2005; Liu, Gao & Yu, 2006; Iqbal *et al.*, 2016).

Um estudo recente da exposição à AFBI através do consumo de arroz integral no Paquistão, concluiu que as amostras continham concentrações muito elevadas tanto de AFBI como do somatório de AFs, em relação aos outros tipos de arroz, sendo o valor médio de  $8,91 \pm 1,20 \mu\text{g/kg}$  e  $12,4 \pm 0,98 \mu\text{g/kg}$ , respetivamente. Importa referir que cerca de 19% das amostras positivas encontravam-se acima do LMA na EU (Iqbal *et al.*, 2016).

Em relação aos principais países produtores de arroz, um estudo desenvolvido na China, mostrou que 100% das amostras de arroz em casca encontravam-se contaminadas com AFBI (> limite de deteção (LOD), 0,05 µg/kg), o valor médio de contaminação era de 3,87 µg/kg no caso do arroz com casca e 0,88 µg/kg no caso do arroz sem casca (Liu, Gao & Yu, 2006). Um outro estudo também apurou que 100% das amostras estavam contaminados com AFBI (> LOD, 0,1 µg/kg) (Sun *et al.*, 2011).

Os teores de AFBI são mais preocupantes no caso da Índia, segundo um estudo realizado por Elangovan & Kalyanasundaram (1999) a incidência de AFBI nas amostras era de 62%, em que 60% das amostras apresentavam teores de AFBI entre 50-500 µg/kg e 30% valores superiores a 2 mg/kg, valores muito discrepantes em relação ao LMA na UE.

Relativamente aos estudos desenvolvidos na UE, um estudo mais recente de Reiter *et al.* (2010) na Áustria detetou 24 amostras de arroz positivas para AFBI. Porém apenas 3 amostras encontravam-se acima do LMA para a EU, sendo o valor máximo de 9,86 µg/kg, as amostras contaminadas eram da Índia (21), Paquistão (2) e do Egipto (1). Os valores quantificados de AFBI (> LOD, 0,1 µg/kg) variaram entre 0,45 e 9,86 µg/kg. Um outro estudo, realizado na França quantificou o teor de AFBI em amostras provenientes do Vietname, demonstram que 51% das amostras eram positivas (> LOD, 0,07 µg/kg), e 29,8 µg/kg correspondeu ao nível de contaminação mais elevado (Nguyen *et al.*, 2007).

Tabela 5 – Ocorrência de AFs na matriz arroz no Mundo.

	<b>País</b>	<b>N</b>	<b>Matriz</b>	<b>AFs</b>	<b>Método analítico</b>	<b>Solvente de extração</b>	<b>Recuperação (%)</b>	<b>LOD (µg/kg)</b>	<b>LOQ (µg/kg)</b>	<b>Incidência (%)</b>	<b>Resultados (µg/kg)</b>	<b>Referência</b>
1	Paquistão	208	Arroz	AFs & AFBI	HPLC-FLD	Acetonitrilo: água (90 : 10)	89 ± 0,19 (a) 90 ± 0,24 (b) 88 ± 0,98 (c)1	0,04	0,20	35 AFs	0,04 - 21,30	Iqbal et al., 2016
2	Irão	40	Arroz	AFBI	ELISA	Metanol: água (70 : 30)	N/D	N/D	N/D	100	0,29 - 2,92 2,09 (média)	Eslami et al., 2015
3	China	370	Arroz	AFBI	HPLC-FLD	Metanol: água: acetonitrilo (79 : 20 : 1)	85,2 - 112,0	0,009	0,03	63,5	0,030 - 20,0; 0,60 (média)	Lai et al., 2015
4	Paquistão	120	Arroz integral	AFBI	ELISA	Metanol: água (80 : 20)	83,2 - 90,4	1,0	1,0	73,3	1,24 - 11,68; 3,70 (média)	Iqbal et al., 2014
5	Paquistão	20	Arroz	AFBI	HPLC-FLD	Metanol: água (80 : 20) e ciclohexano	90,7 ± 2,6	0,5	N/D	25	4,6	Lutfullah & Hussain, 2012
6	Turquia (Trácia)	100	Arroz	AFs & AFBI	ELISA	Metanol: água (70 : 30)	85 (AFs); 80 - 100 (AFBI)	0,05 (AFs); 1 (AFBI)	N/D	32 AFs 4 AFBI	21,4 AFs (máx.); 17,2 AFBI (máx.)	Aydin, Aksu & Gunsen, 2011
7	Canadá	200	Arroz	AFBI	HPLC-MS	Metanol: água (80 : 20)	81 ± 5	0,002	0,05	56 <sup>2</sup> 43 <sup>3</sup>	0,18 (média); 7,1 (máx.)	Bansal et al., 2011
8	Malásia	13	Produtos à base de arroz	AFBI	ELISA	Metanol	95,2 ± 2,3	0,2	0,35	69,2	0,68 - 3,79; 1,5 (média)	Reddy, Farhana & Salleh, 2011
9	Malásia	30	Arroz	AFs	RP-HPLC-PDA-FLD	Metanol	89,9 ± 10,2	0,025	0,075	33,3	0,19 - 3,96; 2,12 (média)	Soleimany et al., 2011
10	China	29	Arroz	AFBI	ELISA & HPLC	Metanol: água (50 : 50)	N/D	0,1	N/D	100	Huantai: 0,1-1,2; Huaian: 0,2-0,7; Fusui: 0,3 - 1,4	Sun et al., 2011



1	Tunísia	11	Arroz	AFBI	ELISA	Metanol: água (80 : 20)	97,3	0,05	0,1	0	0,0	Ghali et al., 2010
1	Áustria	81	Arroz	AFBI	HPLC- FLD	Metanol: água (80 : 20)	99 ± 3	0,1	0,44	29,6 AFs	0,45 - 9,86	Reiter et al., 2010
1	Irão	71	Arroz	AFs & AFBI	IAC- HPLC	Metanol: água (80 : 20)	70 - 110	0,1	N/D	83	2,09 (média); 10,94 (máx.) & 1,89 AFBI (média); 10 AFBI (máx.)	Mazaheri, 2009
1	Tunísia	16	Arroz	AFBI	ELISA	Metanol: água (70 : 30)	91 ± 1,9	1	N/D	0	0,0	Ghali et al., 2008
1	França	100	Arroz	AFBI	HPLC- FLD	Solução aquosa de acetoneitrilo a 4% de cloreto de potássio (9: 1)	90,1 ± 6	0,07	0,22	51	3,31 (média); 29,8 (max.)	Nguyen et al., 2007
1	China	37 <sup>4</sup>	Arroz	AFBI	HPLC- FLD	Clorofórmio	N/D	0,05	N/D	100 arroz em casca	3,87 (média do arroz com casca); 0,88 µg/kg (média do arroz sem casca)	Liu, Gao & Yu, 2006
1	Filipinas	78 <sup>5</sup>	Arroz	AFBI	IAC- HPLC	Etanol	84	0,025	N/D	94 (arroz branquead o) 100 (arroz integral)	0,025 - 11,0	Sales & Yoshizawa, 2005
1	Índia	14	Farelo de arroz	AFBI	ELISA	Metanol- água - KCl (70 : 30 : 0,5)	>90	0,1	N/D		21 - 30 AFBI	Thirumala- devi et al., 2002

1	Índia	142	Arroz	AFBI	TLC	Metanol	N/D	N/D	N/D	62	60%: 50 - 500; 30%: > 2000	Elangovan & Kalyanasundaram, 1999
2	Emirados Árabes Unidos	500 <sup>6</sup>	Arroz	AFBI	HPLC	Metanol: água (55 : 45)	89 (d) 77 (e) 82 (f) <sup>7</sup>	I	I	64 (arroz de longo) 32 (arroz de curto)	1,2 - 16,5	Osman et al., 1999
2	Colômbia	22	Farelo de Arroz	AFBI	TLC	Acetonitrilo: água (84 : 16)	87-90	I	N/D	36 AFBI	1,0 - 52,8	Cespedez & Diaz, 1997
2	Reino Unido	40	Farelo de Arroz	AFs	HPLC	Diclorometano e ácido clorídrico	>50	<I	N/D	72 AFs	I - 2I	Scudamore et al., 1997

<sup>1</sup> Valor consoante a concentração adicionada: (a)- 2 µg/kg, (b)- 5 µg/kg; 10 µg/kg.

<sup>2</sup> Ano 2008; <sup>3</sup> Ano 2009.

<sup>4</sup> 16 amostras de arroz em casca e 37 de arroz sem casca.

<sup>5</sup> 69 amostras de arroz braqueado e 9 de arroz integral.

<sup>6</sup> 250 amostras de arroz de grão longo e 250 amostras de arroz de grão curto.

<sup>7</sup> Valor consoante a concentração adicionada: (d) - 1 µg/kg, (e) - 25 µg/kg e (f) - 50 µg/kg.

ELISA, Ensaio Imunoenzimático; HPLC, Cromatografia Líquida de Alta Eficiência; HPLC-MS, Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas; HPLC-FLD, Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Detetor de Fluorescência; IAC-HPLC, Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Colunas de Imunoafinidade; N, amostras; N/D, valor não disponível; RP-HPLC-PDA-FLD, Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Fase Reversa acoplado a um Detetor de Díodos e um Detetor de Fluorescência; TLC, Cromatografia de Camada Fina.

Da Tabela 5 e da Figura 9, conclui-se que na maioria dos estudos apresentados (78%), detetaram-se níveis de AFBI acima do limite admissível pela UE.

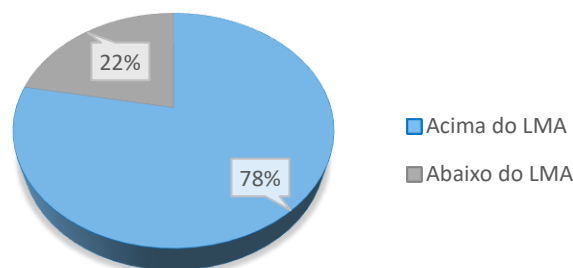


Figura 9 – Percentagem de amostras de arroz com níveis de AFBI abaixo e acima do LMA na EU, referentes aos estudos da Tabela 5.

### 1.5.1. Alimentos destinadas ao consumo humano

Os alimentos mais contaminados com AFs correspondem às leguminosas, nozes e oleaginosas, em particular, pistachos, amêndoas, amendoins, nozes e avelãs. No entanto, também pode ocorrer em especiarias, condimentos, figos, óleos vegetais crus, cacau, milho, arroz, semente de algodão, leite e fórmulas para lactentes (EFSA, 2007; EFSA, 2019).

As crianças pequenas são o grupo populacional mais exposto a AFBI, um estudo da EFSA demonstrou que a *upper bound* (UB) é maior neste grupo (7,47 ng/kg p.c. por dia). Relativamente, a AFMI os lactentes são os mais expostos, com valores máximos de *lower bound* (LB) e UB, de 1,91 e 3,0 ng/kg p.c., por dia, respetivamente (EFSA, 2019). O grupo populacional mais vulnerável corresponde aos latentes e as crianças, bem como, os portadores de VHB (Chu *et al.*, 2017).

Relativamente à ocorrência de AFMI, o queijo parmesão (*Parmigiano-Reggiano*) é classificado como o alimento à base de leite com valores de contaminação mais elevados. Já a ocorrência de AFMI no leite humano está associada ao consumo elevado de arroz e milho (EFSA, 2020).

A concentração média estimada de AFMI no leite é de 0,023 µg/kg na dieta Europeia, 0,022 µg/kg na dieta Americana Latina, 0,36 µg/kg na dieta do Extremo Oriente, 0,005 µg/kg na dieta do Médio Oriente, e 0,002 µg/kg na dieta Africana (Creppy, 2002). Contudo, a ingestão de AFMI no leite prevista é de 6,8 ng/ pessoa/ dia na dieta Europeia, 3,5 ng/ pessoa/ dia na dieta Latino-Americana, 12 ng/ pessoa/ dia para a dieta do Extremo Oriente, 0,7 ng/ pessoa/ dia para a dieta do Oriente Médio e 0,1 ng/ pessoa/ dia para a dieta africana (Creppy, 2002).

Em geral, a exposição da população à AFBI ocorre pela ingestão de alimentos contaminados. Não obstante, a exposição a esta substância também pode ocorrer pela sua inalação, bem como, através do contato direto com a pele e/ou mucosas. Posto isto, é fundamental reduzir as possíveis vias de exposição, visto que até concentrações na ordem dos nanogramas podem causar efeitos adversos na saúde humana e animal (Wangia, Tang & Wang, 2019). Um estudo conduzido em Portugal avaliou a exposição de AFBI em trabalhadores de um matadouro (n=30), dentro dos quais 14 (47%) apresentavam teores de AFBI de 1,06 a 4,03 ng/mL, sendo o valor médio de 1,73 ng/mL. Apesar das incertezas quanto à via de exposição que mais contribui para a exposição (inalação ou dérmica), foi possível concluir que a fonte da contaminação era do matadouro em questão (Viegas *et al.*, 2015).

De modo a minimizar os efeitos da exposição às AFs dos operadores através do ar, deve ser estimulado o uso de equipamento de proteção. Bem como, a instalação de sistemas de ventilação e estratégias administrativas, como, a troca de tarefas de forma a limitar a exposição (Wangia, Tang & Wang, 2019). Além disso, deve-se utilizar soluções de hipoclorito de sódio e acetona na desintoxicação dos equipamentos de laboratório contaminado com AFBI (Kemppainen, Riley & Pace, 1988). Os estudos de Boonen *et al.* (2012) demonstraram que pode ocorrer penetração acidental de micotoxinas na pele, dado que são substâncias lipossolúveis.

### **I.5.2. Alimentos destinados ao consumo animal**

A Diretiva UE 2002/32/CE, considera o 'amendoim, copra, semente de palma, semente de algodão, babaçu, milho e produtos derivados de seu processamento' como substâncias indesejáveis na alimentação animal.

Segundo o Ministério da Agricultura, Pesca e Alimentação (1993), em 1987/88, 6 amostras de sementes de girassol e 4 amostras à base de arroz estavam contaminadas com AFBI, com 21-30 µg/kg e 10-19 µg/kg, respetivamente.

Em 1989/90, 4 amostras de sementes de algodão da Argentina continham 23-26 µg/kg, 1 amostra de semente de palma da Nigéria continha 22 µg/kg, 1 amostra de girassol da Índia continha 24 µg/kg e 3 amostras de arroz/farelo de arroz da Índia e do Paquistão continham 10-17 µg/kg de AFBI (EFSA, 2004).

No trabalho de Scudamore *et al.* (1997) foi realizada a quantificação na semente de palma, com níveis de AFs entre 1 e 11 µg/kg, na *sunflower cake* (um subproduto obtido após a extração do óleo de sementes de girassol) concentrações de AFs de 1 a 15 µg/kg, bem como, em sementes de algodão (5-20 µg/kg de AFs), farelo de arroz (1-13 µg/kg de AFs) e farelo de

soja (1-4 µg/kg de AFs). A copra, *peanut cake* (subproduto obtido após a extração do óleo de sementes de amendoim), *sunflower cake* e glúten de milho foram consideradas as rações mais contaminadas por AFBI (Tate *et al.*, 1990; Blüthgen & Ubben, 2000; Hossain *et al.*, 2018).

Um estudo realizado na Índia, demonstrou que a contaminação por AFs e OTA é maior no *groundnut cake* (subproduto obtido após a extração do óleo de sementes de amendoim), milho, milho-painço e sorgo através da análise de rações destinadas às galinhas (Tate *et al.*, 1990). Relativamente às amostras de *groundnut cake* e sorgo, as concentrações de AFs variaram de 10 a 3,500 mg/kg. Já no caso do milho e do farelo de arroz as concentrações foram mais elevadas, 10-300 mg/kg e 10-100 mg/kg, respetivamente. As sementes de girassol estavam contaminadas tanto com AFs como OTA com 30-50 mg/kg, contudo, as sementes de soja detinham uma incidência de 0% tanto de AFs como de OTA (Thirumala-Devi *et al.*, 2002).

### **I.5.3. Ingestão Diária Estimada vs. Ingestão Diária Máxima Tolerável Provisória**

De forma a avaliar a exposição das populações a AFs, procede-se ao cálculo da ingestão diária estimada (EDI). A ingestão diária estimada de AFBI pode ser calculada multiplicando o consumo de arroz pela concentração de AFBI no género alimentício (Sun *et al.*, 2011).

O gráfico da Figura 10 representa o consumo humano de arroz per capita, em quilogramas (kg) por habitante/ ano, no período de 5 anos em Portugal. O consumo de arroz mantém-se relativamente constante ao longo dos anos, sendo que em 2018/2019 o consumo correspondeu a 15,9 kg por habitante (INE, 2020).

De acordo com os dados fornecidos pelo INE é possível estimar que o consumo diário de arroz pela população portuguesa em 2018/2019 foi aproximadamente de 44 g.

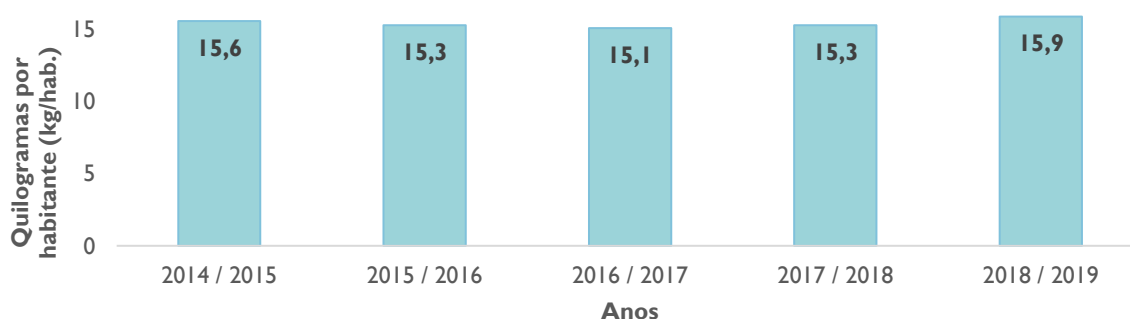


Figura 10 – Consumo humano de arroz branqueado e semibranqueado per capita (kg/ hab./ ano) (Adaptado de Portal do Instituto Nacional de Estatística (INE), 2020).

Dado que as AFs são agentes carcinogénicos e genotóxicos, não é possível estabelecer uma dose limiar abaixo da qual não ocorra a formação de tumores, ou seja, apenas a ausência à exposição pode anular o risco (EC, 1996).

O Comité Científico da Alimentação Humana (SCF), em 1994, concluiu que mesmo níveis muito baixos de exposição a aflatoxinas (1 ng/ kg p.c./ dia) contribuem para o risco de desenvolver cancro no fígado (EC 1996; EFSA, 2007).

A *Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives* (JECFA) atribuiu o valor de ingestão diária tolerável (TDI) para diferentes micotoxinas como, FB1, FB2 e FB3, DON, Nivalenol, T-2 e HT. No entanto, para agentes genotóxicos, como as AFs em que se considera que não há limiar para a toxicidade, uma TDI não pode ser determinada.

Contudo foi determinada a Ingestão diária máxima tolerável provisória (PMTDI), por Kuiper-Goodman em 1998, para 2 grupos populacionais, os adultos e crianças sem hepatite B e os adultos e crianças com hepatite B, sendo o PMTDI de 1,0 ng/ kg p.c./ dia e de 0,4 ng/ kg p.c./ dia, respetivamente (Kuiper-Goodman, 1998).

Segundo dados epidemiológicos de cancro primário de fígado recolhidos pelo JECFA, a ingestão de 1,0 ng de AFs/ kg p.c./ dia aumentará a incidência de cancro no fígado em 0,013 cancros/ ano/ 100 000 habitantes. O cálculo foi baseado nos efeitos sinérgicos da hepatocarcinogenicidade da AFBI e da infeção com o VHB, sendo que indivíduos com positividade para o antigénio de superfície da hepatite B (HBsAg<sup>+</sup>), têm maior probabilidade de desenvolver cancro do fígado, isto é, 0,3 cancros/ ano/ 100 000 habitantes/ ng de AFs/ kg de p.c./ dia. Em contrapartida, nos indivíduos com negatividade para o antigénio de superfície da hepatite B (HBsAg<sup>-</sup>), a potência de AFBI é de 0,01 cancros/ ano/ 100 000 habitantes/ ng de AFs/ kg de p.c./ dia (EC 1996; EFSA, 2007; ASAE, 2009).

## **1.6. Metodologia para a determinação de Aflatoxinas**

A maioria das técnicas analíticas atuais usadas para a deteção e a quantificação de AFs requerem procedimentos de amostragem, preparação da amostra (extração/purificação), seguida por um método de separação/identificação apropriado (Jaimez *et al.*, 2000; Reiter, Zentek, & Razzazi, 2009; Turner *et al.*, 2009).

### **I.6.1. Amostragem**

A amostragem consiste na seleção de uma amostra representativa da população para o estudo (Jaimez, 2000).

O Regulamento (CE) n.º 401/2006, de 23 de fevereiro de 2006, estabelece os métodos de amostragem e de análise para o controlo oficial dos teores de micotoxinas nos géneros alimentícios. Segundo o regulamento, a amostragem desempenha um papel fulcral na determinação exata do teor de micotoxinas. Dado que a distribuição das micotoxinas é, regra geral, muito distinta nos lotes (EC, 2006b, Shephard, 2008a; Reiter, Zentek & Razzazi, 2009; Yao, Hruska & Mavungu, 2015). Consequentemente, pode levar a erros de amostragem (Yao, Hruska & Mavungu, 2015), pois a amostra retirada aleatoriamente do lote pode não ser representativa, dando lugar a falsos positivos ou negativos (Shephard, 2008b). De modo a contornar este problema, é fundamental aplicar procedimentos de amostragem apropriados de modo a diminuir a variabilidade dos resultados e o número de lotes incorretamente analisados (Shephard, 2008b; Reiter, Zentek & Razzazi, 2009; Yao, Hruska & Mavungu, 2015).

As amostras devem ser finamente trituradas e totalmente homogeneizadas, cumprido as devidas normas (EC, 2006b). Para a correta análise de AFs deve-se evitar a exposição à luz solar, visto que se decompõem progressivamente sob influência da luz UV (EC, 2006b).

### **I.6.2. Técnicas de extração na preparação das amostras**

O objetivo deste passo consiste na correta extração dos analitos da matriz e *clean-up* do extrato de forma a remover possíveis interferências. É, portanto, um passo vital para o sucesso do ensaio (Turner *et al.*, 2009).

O método de extração empregue depende maioritariamente das propriedades físico-químicas dos produtos contaminados com AFs. Sendo fundamental a escolha do correto solvente de extração, bem como, as boas práticas de segurança, como a quantificação dos resíduos gerados (Jaimez, 2000; Shephard, 2008b; Turner *et al.*, 2009; Yao, Hruska & Mavungu, 2015). É importante mencionar que o uso de produtos químicos clorados na extração têm decrescido substancialmente devido aos potenciais perigos ecológicos (Turner *et al.*, 2009).

As AFs, como já referido, são moléculas solúveis em solventes polares (moderadamente polares) e insolúveis em solventes apolares. Portanto, normalmente as AFs são extraídas com misturas de solventes orgânicos, com carácter polar, mais comumente, o metanol, o clorofórmio, a acetona e o acetonitrilo (Jaimez, 2000; Shephard, 2008b; Yao, Hruska & Mavungu, 2015). Vários autores, (Osman *et al.*, 1999; Thirumala-Devi *et al.*, 2002;

Ghali *et al.*, 2010; Aydin, Aksu & Gunsen, 2011; Reddy, Farhana & Salleh, 2011; Sun *et al.*, 2011); atribuem ao metanol a classificação de solvente de eleição.

Outra alternativa consiste na combinação de um solvente (dos mencionado acima) com pequenas porções de H<sub>2</sub>O, de modo a humidificar o substrato, e permitir um aumento da penetração do solvente na amostra, bem como numa extração mais eficiente (Jaimez, 2000; Yao, Hruska & Mavungu, 2015). A adição de solventes não polares, como o hexano, permite o particionamento de gorduras (Jaimez, 2000).

Segue-se a filtração ou centrifugação do extrato, e por fim a purificação antes da determinação do teor de AFs. No entanto, os métodos imunológicos, como o ensaio ELISA, não necessitam desta etapa, tal como, o método LC-MS/MS baseado no procedimento “diluir e disparar” (Yao, Hruska & Mavungu, 2015).

Os procedimentos de *clean-up* mais usados consistem na extração em fase sólida (SPE), extração líquido-líquido, extração de fluido supercrítico (SFE), e colunas de imunoafinidade (IAC). O último método referido apresenta maior seletividade (Jaimez, 2000; Shephard, 2008b; Reiter, Zentek, & Razzazi 2009; Turner *et al.*, 2009; Fernandez-Cruz, Mansilla, & Tadeo, 2010; Yao, Hruska & Mavungu, 2015).

### **1.6.3. Métodos analíticos**

Os métodos analíticos mais comuns na determinação de AFs encontram-se estabelecidos em vários setores de alimentos e rações, tais como, a Cromatografia em Camada Fina (TLC), Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC), Cromatografia Gasosa (GC), Eletroforese Capilar (CE) e Ensaio Imunoenzimático (ELISA). Consistem em métodos reconhecidos pelos laboratórios a nível mundial e pelas entidades oficiais como a *Association of Official Analytical Chemists (AOAC)* e o *Comité Europeu de Normalização (CEN)* (Jaimez, 2000; Shephard, 2008b; Reiter, Zentek, & Razzazi 2009; Turner *et al.*, 2009; Fernandez-Cruz, Mansilla, & Tadeo, 2010; Wacoo *et al.*, 2014; Yao, Hruska & Mavungu, 2015; Matabaro *et al.*, 2017).

O método analítico escolhido no presente trabalho corresponde ao ensaio imunoenzimático, ELISA, em formato competitivo, que em seguida será abordado detalhadamente.



### **I.6.3.1. Cromatografia de Camada Fina (TLC)**

O método TLC foi estabelecido como método oficial AOAC, em 1990, contudo, atualmente é um método em desuso, utilizado apenas em países em desenvolvimento.

A TLC consiste num método rápido e bastante económico, que permite testar várias amostras em simultâneo (Shephard, 2008b), necessitando de pouco equipamento, contudo é um processo moroso (Lee *et al.*, 2004). Em alternativa ao TLC usa-se HPLC (ver secção abaixo) e LC-MS para a análise quantitativa de AFs (Shephard, 2008b; Reiter, Zentek, & Razzazi 2009; Yao, Hruska & Mavungu, 2015). No entanto, pode ser usado como método de pré-seleção, ou seja, de *screening* (Shephard, 2008b).

As AFs (B1, B2, G1 e G2) são facilmente caracterizadas por TLC e espectrometria de ultravioleta visível (UV-vis) (Shephard, 2008b; Turner *et al.*, 2009).

### **I.6.3.2. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)**

O HPLC, é atualmente o método de eleição na determinação de AFs, devido às suas vantagens comparativamente com outros métodos analíticos (Jaimez, 2000; Wacoo *et al.*, 2014).

Todos os métodos cromatográficos, usam uma fase estacionária e uma fase móvel. A fase estacionária está contida num tubo de vidro ou de plástico. Já a fase móvel, pode ser constituída por uma fase aquosa ácida (por exemplo, ácido acético ou ácido trifluoroacético), ou em gradiente com metanol ou acetonitrilo (Drumond, 2012; Wacoo *et al.*, 2014).

O solvente é bombeado a alta pressão através de uma coluna com partículas, que constitui a fase estacionária. Antes da deteção, é necessário proceder a um *clean-up* pré ou pós-coluna (por exemplo, IAC) e/ou derivatização, de modo a melhorar os limites de deteção (Turner *et al.*, 2009; Wacoo *et al.*, 2014; Yao, Hruska & Mavungu, 2015). Os métodos de deteção mais comuns usam detetores de UV ou de fluorescência, que dependem da presença de um cromóforo. Diversas toxinas apresentam fluorescência nativa, como por exemplo, AFs e OTA, e conseqüentemente podem ser detetadas diretamente com HPLC–FD (Turner *et al.*, 2009).

De modo a contornar as exigências dos procedimentos referidos anteriormente, surgiu uma modificação ao método HPLC, cromatografia líquida acoplada à espectroscopia de massa (LC-MS/MS) (Shephard, 2008b; Wacoo *et al.*, 2014; Yao, Hruska & Mavungu, 2015). As técnicas de LC-MS/MS permitem usar limites de deteção baixos. Em contrapartida, consiste numa técnica cara, complexa, e apenas pode ser operada por técnicos especializados e qualificados (Wacoo *et al.*, 2014; Yao, Hruska & Mavungu, 2015).

### **I.6.3.3. Cromatografia Gasosa (GC)**

Os procedimentos que usam GC possuem a vantagem de se poderem vincular facilmente ao MS, para confirmação de resultados. Normalmente o GC não é usado para fins comerciais devido a existência de alternativas mais econômica e rápidas como o HPLC (Shephard, 2008b; Turner *et al.*, 2009; Wacoo *et al.*, 2014).

GC-MS é numa técnica usada apenas na análise de resíduos não-polares ou semi-polares, voláteis ou semi-voláteis. Tendo em conta que as micotoxinas são não voláteis, é imprescindível que as substâncias sejam previamente sujeitas à derivatização. Deste modo, a GC não é frequentemente utilizada na determinação de AFs (Turner *et al.*, 2009; Yao, Hruska & Mavungu, 2015).

### **I.6.3.4. Eletroforese Capilar (CE)**

Caracteriza-se por ser um método rápido, simples, e em particular, com uso reduzido de solventes orgânicos (Shephard, 2008b). No entanto esta técnica de separação só se justifica se houver interesse em quantificar as diferentes micotoxinas presentes na amostra (Turner *et al.*, 2009).

Segundo Pena *et al.* (2002) a Cromatografia electrocinética capilar micelar (MECC) acoplada à deteção por fluorescência é um método rápido e simples que permitiu detetar AFs em rações para animais. O método MECC permite a deteção de AFB1, com o limite de deteção (LOD) de 0,03 mg/l (evidentemente abaixo dos limites legais (0,05 mg/l), limite de quantificação (LOQ) de 0,11 mg/l., e com uma taxa de recuperação de 103%. Esses resultados indicam que o procedimento de *clean-up* pode ser aplicado com sucesso para a análise de níveis baixos de AFB1 em matrizes complexas, como é o caso das amostras de ração para animais (Pena *et al.*, 2002).

### **I.6.3.5. Ensaio Imunoenzimático (ELISA)**

O método *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) permite a determinação quantitativa, semi-quantitativa ou qualitativa de AFs, técnica particularmente comum em testes de *screening* (Shephard, 2008b; Reiter, Zentek & Razzazi, 2009; Yao, Hruska & Mavungu, 2015). Os *kits* para testes de ELISA normalmente, combinam numa só embalagem, anticorpos, reagentes, padrão, substratos, e em alguns casos dispositivos de extração, prontos a usar.

Consiste num teste imunoenzimático baseando-se na interação Anticorpo-Antígeno (Ab)-(Ag) (Turner *et al.*, 2009). É uma técnica na qual o analito da amostra e uma quantidade

conhecida de um analito marcado com uma enzima competem por um número conhecido e limitado de locais de ligações em anticorpos (Yao, Hruska & Mavungu, 2015).

Existem diversos formatos de ELISA para a determinação de analitos moleculares pequenos como as AFs, como o ensaio indireto competitivo, o ensaio direto competitivo e o ensaio não competitivo (Li, Zhang Q. & Zhang W., 2009).

No caso do ELISA em formato competitivo, os poços das placas de microtitulação do *kit* estão revestidos por anticorpos específicos para um anticorpo secundário. A função destes anticorpos é de deter as moléculas de analito presente na amostra. O conjugado, que consiste num complexo toxina-enzima, irá competir com a toxina livre, isto é, a presente na amostra, pela ligação aos anticorpos secundários. Posteriormente é necessária uma etapa de lavagem para remover os reagentes em excesso e que não se encontram ligados. De modo a revelar a ligação do conjugado toxina-enzima com os anticorpos, é adicionado o substrato/cromogéneo específico da enzima, que catalisa a oxidação do substrato, e conseqüentemente forma-se um produto azul. As enzimas mais utilizadas são a peroxidase (como a *Horseshoe* peroxidase, (HRP)) e a fosfatase (Wacoo *et al.*, 2014). Na presença de peróxido de hidrogénio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), a HRP catalisa a oxidação do substrato 3,3',5,5'-tetrametilbenzideno (TMB), com conseqüente formação de um produto azul (Carvajal, Berumen & Guardado-Estrada, 2012). A intensidade de cor produzida é inversamente proporcional à concentração da toxina na amostra, isto é, quanto maior a concentração da toxina na amostra (neste caso da AFB1), menor será a ligação entre o anticorpo e o conjugado toxina-enzima, e conseqüentemente menor será a intensidade da cor. Por último, a solução Stop interrompe a reação do substrato com a enzima, alterando a coloração para amarelo (Turner *et al.*, 2009). De modo a quantificar a toxina presente na amostra em estudo, recorre-se a um espectrofotómetro, para medição da densidade ótica que atravessa a placa de microtitulação a um determinado comprimento de onda (Figura 11) (Turner *et al.*, 2009; Carvajal, Berumen & Guardado-Estrada, 2012).

Este método analítico, apesar de ser considerado um método de *screening* apresenta certas vantagens em relação aos métodos convencionais, tais como, LC-MS e HPLC (Matabaro *et al.*, 2017), visto que estes requerem um elevado volume de amostras, bem como um alto custo de execução (Trucksess, 2001; Zheng *et al.*, 2005; Pei *et al.*, 2009).

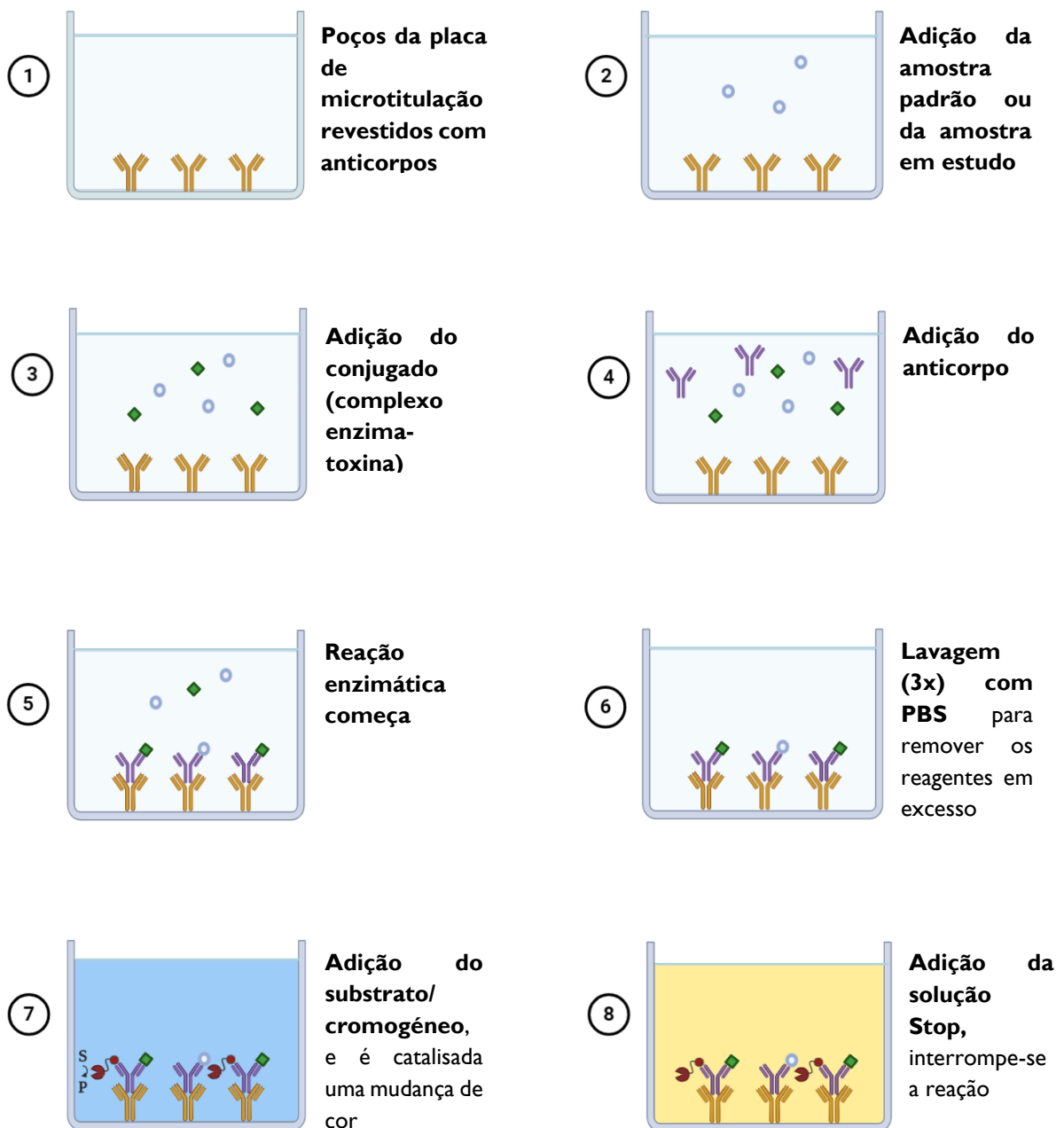


Figura 11 – Esquema das etapas da técnica ELISA em formato competitivo (Adaptado de Li, Zhang Q. & Zhang W., 2009; Turner *et al.*, 2009; Carvajal, Berumen & Guardado-Estrada, 2012; Wacoo *et al.*, 2014; Yao, Hruska & Mavungu, 2015).

O ensaio ELISA, caracteriza-se por ser uma ferramenta rápida, sensível, de baixo custo, automatizável, portátil, com elevada sensibilidade, específica, disponível em *Kits*, com capacidade para um elevado número de amostras que pode ser analisado simultaneamente (96 poços), sendo que, geralmente, o *clean-up* não é um passo necessário. Adicionalmente poderá apresentar um baixo limite de deteção (LOD), comparativamente com o HPLC (Trucksess, 2001; Zheng *et al.*, 2005; Reiter, Zentek & Razzazi, 2009; Fernandez-Cruz *et al.*, 2010; Aydin, Aksu & Gunsen, 2011; Wacoo *et al.*, 2014; Yao, Hruska & Mavungu, 2015).

Não obstante as vantagens numeradas o ELISA consiste numa técnica que requer várias etapas de lavagens, sendo uma técnica trabalhosa e demorada (Wacoo *et al.*, 2014). Os Kits são de utilização única, acarretando grande desvantagem, caso o propósito do teste seja uma triagem em massa, o que leva ao aumento dos custos (Turner *et al.*, 2009). Pode ocorrer uma reatividade cruzada com micotoxinas relacionadas, e consequentemente resultados falsos positivos ou negativos (Reiter, Zentek & Razzazi, 2009; Turner *et al.*, 2009; Yao, Hruska & Mavungu, 2015). Este método apresenta outra desvantagem, pois possui uma gama de deteção reduzida devido à sensibilidade limitada dos anticorpos, quer sejam monoclonais ou policlonais (Turner *et al.*, 2009; Yao, Hruska & Mavungu, 2015).

Devido ao pequeno tamanho das micotoxinas, como já referido, (massa molecular (MW)~700 g/mol), o desenvolvimento de anticorpos para a maioria das micotoxinas requer o desenvolvimento de uma molécula transportadora, geralmente uma proteína (por exemplo, albumina sérica bovina (BSA), hemocianina de lapa tipo buraco de fechadura (KLH), e ovalbumina (AO)), para obter imunogenicidade (Lee *et al.*, 2004; Reddy K., Reddy C. & Muralidharan, 2009; Turner *et al.*, 2009; Carvajal, Berumen & Guardado-Estrada, 2012). Contudo, a seletividade do ELISA aumenta com o AFB-BSA anticorpo monoclonal anti-aflatoxina (conjugado AFBI-BSA) (Carvajal, Berumen & Guardado-Estrada, 2012).

Nas últimas duas décadas, foram validados vários protocolos utilizando a presente técnica, que consiste num método quantitativo para a deteção de micotoxinas em géneros alimentícios e em rações (Trucksess, 2001; Lee *et al.*, 2004). Devido à sua simplicidade, adaptabilidade, sensibilidade e seletividade foram descritos protocolos de ELISA para AFBI, somatório de AFs, e para os principais metabólitos, como AFB2, AFGI, AFQI e AFM. No entanto, apenas *kits* para a deteção do somatório de AFs, AFBI e AFMI estão disponíveis comercialmente (Lee *et al.*, 2004).

Um estudo de Zheng *et al.* (2005) validou-se um *kit* de ELISA *AgraQuant*<sup>®</sup> para a deteção de AFs em cereais e derivados de cereais, como, arroz, trigo, milho, entre outros, em comparação ao método HPLC. Mostrou uma boa exatidão e precisão para cereais e produtos à base de cereais, na quantificação da AFs entre 4-40 µg/kg. O limite de deteção (LOD) no arroz foi de 2,8 µg/kg.

## **OBJETIVOS**

O presente trabalho teve como objetivo a determinação da ocorrência de Aflatoxina B1 em amostras de arroz, utilizando o método imunoenzimático (ELISA), de modo a contribuir para a avaliação da exposição da população portuguesa a esta micotoxina através do consumo deste género alimentício.



**PARTE EXPERIMENTAL - II. DETERMINAÇÃO DE  
AFLATOXINA B1 EM ARROZ DESTINADO AO  
CONSUMO HUMANO**





## II.1. Materiais e métodos

### II.1.1. Amostragem

O estudo incluiu um total de 42 amostras de arroz para consumo humano (20 amostras de comercializadas na região Centro de Portugal e 22 amostras gentilmente cedidas por diversos produtores portugueses de arroz) no período compreendido entre novembro de 2019 e fevereiro de 2020. As amostras de conveniência incluíram amostras de arroz agulha (n=7), arroz basmati (n=2), arroz carolino (n=11), arroz integral (n=15), arroz de Punjab (n=1), arroz selvagem (n=1), arroz sushi (n=1) e arroz thai (n=4), cuja caracterização se encontra na Figura 12 e Tabela 6.

Em relação à origem, a maioria das amostras foi produzida em Portugal continental (n=29), contudo algumas amostras foram importadas (Canadá (n=1), China (n=1); Guiana (n=1), Índia (n=3), Paquistão & Índia (n=1), Suriname (n=1), Tailândia (n=4) e Uruguai (n=1)) (Figura 12 e Tabela 6).

Todas as amostras foram sujeitas ao processo físico de secagem, limpeza e descasque antes de serem adquiridas para o estudo, contudo, das 42 amostras apenas 27 foram submetidas ao branqueamento.

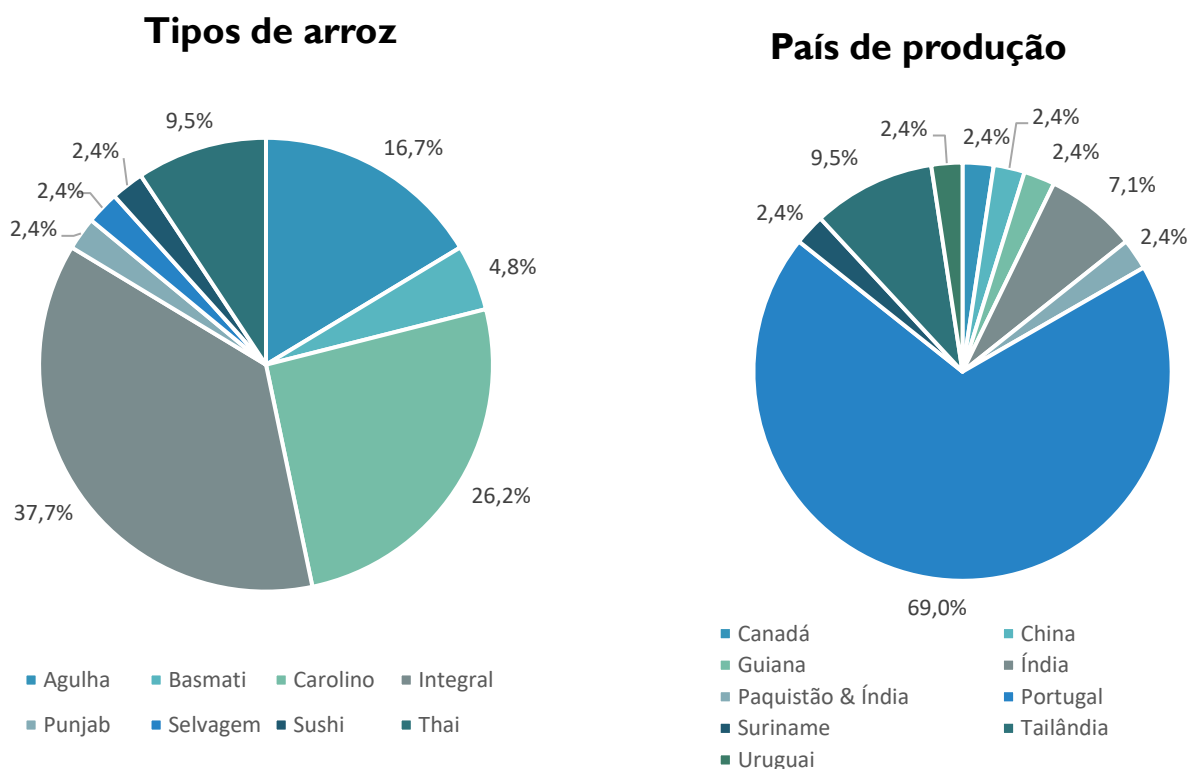


Figura 12 – Caracterização das amostras de arroz em estudo, quanto ao tipo e à sua origem.

Tabela 6 – Caracterização da matriz em estudo.

	<b>Tipo de arroz</b>	<b>Branqueado</b>	<b>Nacional</b>	<b>País / Região de produção</b>	
<b>Amostras de supermercado</b>	1	Extra Longo Branqueado Thai Jasmine	S	N	Tailândia
	2	Extra Longo Integral Vaporizado Negro Variedade nerone	N	N	China
	3	Extra Longo Branqueado Agulha	S	S	Portugal / Oliveira de Azeméis
	4	Extra Longo Selvagem	S	N	Canadá
	5	Extra Médio Branqueado Sushi	S	S	Portugal
	6	Extra Longo Branqueado Thai Perfumado	S	N	Tailândia
	7	Extra Longo Basmati	S	N	Índia / Himalaias
	8	Extra Longo Carolino	S	S	Portugal
	9	Extra Longo Branqueado - Aromático de Punjab	S	N	Índia / Punjab
	10	Extra Longo Branqueado Thai Jasmine	S	N	Tailândia
	11	Extra longo Basmati Integral	N	S	Portugal
	12	Extra Longo Perfumado Branqueado Thai	S	N	Tailândia
	13	Extra Longo Integral	N	S	Portugal
	14	Extra Longo Agulha Branqueado	S	S	Portugal
	15	Extra Longo Agulha Branqueado	S	N	Suriname
	16	Extra Longo Agulha Basmati	S	N	Paquistão & Índia
	17	Extra Longo Agulha Branqueado	S	N	Uruguai
	18	Extra Longo Basmati	S	N	Índia
	19	Extra Longo Integral	N	S	Portugal / Coruche (Vales do Tejo, do Sorraia, do Sado e seus afluentes)
	20	Extra Longo Agulha Branqueado	S	N	Guiana
<b>Amostras de produtor</b>	21	Longo (265S)	S	S	Portugal / Tejo
	22	Integral Longo (265SI)	N	S	Portugal / Tejo
	23	Longo (138S)	S	S	Portugal / Tejo
	24	Integral Longo (138SI)	N	S	Portugal / Tejo
	25	Longo (290S)	S	S	Portugal / Tejo
	26	Integral Longo (290SI)	N	S	Portugal / Tejo
	27	Longo (291S)	S	S	Portugal / Tejo
	28	Integral Longo (291SI)	N	S	Portugal / Tejo
	29	Longo (217ES)	S	S	Portugal / Sado
	30	Integral Longo (217ESI)	N	S	Portugal / Sado
	31	Longo (223S)	S	S	Portugal / Mondego
	32	Integral Longo (223SI)	N	S	Portugal / Mondego
	33	Longo (25S)	S	S	Portugal / Mondego

34	Integral Longo (25SI)	N	S	Portugal / Mondego
35	Agulha (176S)	S	S	Portugal / Mondego
36	Integral Agulha (176SI)	N	S	Portugal / Mondego
37	Longo (19S)	S	S	Portugal / Mondego
38	Longo (19SI)	N	S	Portugal / Mondego
39	Longo (206ES)	S	S	Portugal / Mondego
40	Integral Longo (206ESI)	N	S	Portugal / Mondego
41	Longo (5S)	S	S	Portugal / Mondego
42	Integral Longo (5SI)	N	S	Portugal / Mondego

### II.1.2. Reagentes químicos e soluções padrão

A análise quantitativa de AFBI nas amostras em estudo foi baseada no teste imunoenzimático em formato competitivo. No presente estudo, recorreu-se ao teste *kit RIDASCREEN® Aflatoxin BI 30/15* (Art. n.º TR1211, R-Biopharm, Darmstadt, Alemanha). A preparação das mostras foi realizada de acordo com os métodos descritos no manual do teste *kit RIDASCREEN® Aflatoxin BI 30/15* (Art. n.º TR1211).

O *kit* disponibiliza 6 amostras padrão, com diferentes concentrações, 0 µg/L, 1 µg/L, 5 µg/L, 10 µg/L, 20 µg/L, 50 µg/L de AFBI.

O reagente de extração, preparado no laboratório, foi obtido por diluição de metanol (100%) em água destilada, de modo a obter uma solução de metanol a 70%.

Além destes componentes, o *kit* também continha, a placa de microtitulação com os poços revestidos com anticorpos específicos para o anticorpo secundário, o conjugado (complexo toxina-enzima), o anticorpo secundário específico para o analito em estudo, o substrato/cromogéneo (*Red Chromogen Pro*) e a solução Stop.

Todas as soluções foram mantidas entre 2 e 8°C, e protegidas da luz, de modo a manter a sua integridade total.

### II.1.3. Materiais e equipamentos

No trabalho experimental foi utilizado o seguinte material e equipamento: copo misturador; tubos de falcon de 50 mL; balão de erlenmeyer de 1 L e 50 mL; proveta de vidro de 100 mL e 50 mL; pipetas graduadas de 100 mL; agitador (*Edmund Bühler KL2*); agitador vórtex *VELP Scientifica ZX3*; centrifugadora *Sigma 3-16K*; fracos de vidro de 4 mL; micropipetas

de 50  $\mu\text{L}$  e 100  $\mu\text{L}$  e 1000  $\mu\text{L}$ ; espectrofotómetro *Optic Iyymen System 2100-C* (450 nm) e placa de microtitulação com 96 poços (Darmstadt, Alemanha).

#### **II.1.4. Preparação das amostras – extração**

As amostras foram previamente trituradas e homogeneizadas para a análise de AFBI, com o auxílio de um copo misturador. Em seguida, colocaram-se todos os reagentes à temperatura ambiente (20-25°C/ 68-77°F), antes de usar.

Após a trituração e homogeneização das amostras, transferiu-se 5g de cada uma para tubos de falcon (50 mL) devidamente identificados, com o auxílio de uma balança analítica.

Em seguida, procedeu-se à extração da amostra, adicionando-se 25 mL do solvente de extração, metanol: água destilada (70:30 v/v), e agitando-se vigorosamente a amostra durante 3 minutos recorrendo ao agitador *Edmund Bühler KL2*. De seguida, procedeu-se à separação do extrato, sendo as amostras centrifugadas durante 10 min a 3500 g à temperatura ambiente. Uma alíquota de 1 mL do sobrenadante de cada amostra foi transferida para fracos de vidro de 4 mL devidamente identificados e diluídos com 1 mL de água destilada.

#### **II.1.5. Ensaio Imunoenzimático (ELISA)**

O teste imunoenzimático em formato competitivo foi realizado de acordo com o manual do teste *kit RIDASCREEN® Aflatoxin B1 30/15* (Art. No. TR1211, R-Biopharm, Darmstadt, Alemanha).

O limite de deteção (LOD) da AFBI encontra-se descrito no manual do teste *kit* como 1  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (ppb) para cereais, estabelecido pela quantidade do analito que produz um rácio sinal/ruído de 3:1. Relativamente à taxa de recuperação, o manual refere que corresponde aproximadamente a 93%, em amostras de referências de milho contaminados naturalmente.

Todas as amostras e os padrões foram testados em poços duplicados revestidos com anticorpos. Os volumes de 50  $\mu\text{L}$  de cada amostra/ padrão foram adicionados aos poços correspondentes. Em seguida, 50  $\mu\text{L}$  do conjugado enzimático foram adicionados a cada poço, bem como, 50  $\mu\text{L}$  do anticorpo, para a ligação anticorpo-anticorpo com os anticorpos de revestimento. A placa foi agitada manualmente com cuidado e incubada por 30 minutos à temperatura ambiente (20-25°C). Assim que a reação enzimática inicia, verifica-se uma competição entre a toxina livre, presente na amostra em estudo, e a toxina ligada à enzima, pela ligação aos anticorpos secundários.

Após o período de incubação, o líquido foi vertido dos micropoços, invertendo-se o suporte, de modo a garantir uma remoção completa dos reagentes em excesso, que não se encontram ligados aos anticorpos de revestimento. De seguida, encheram-se os poços da placa de microtitulação com o tampão de lavagem (tampão fosfato salino (PBS)) previamente dissolvido em 1 L de água destilada, para remover os reagentes em excesso e verteram-se novamente. O procedimento de lavagem foi repetido duas vezes, de acordo com recomendações do fabricante.

Seguidamente, adicionaram-se 100 µL de substrato/cromogéneo a cada poço, que resultou num produto azul, e procedeu-se à incubação por 15 min (+/-1) à temperatura ambiente (20-25°C/ 68-77°F). Por fim, adicionou-se 100 µL de solução Stop a cada poço, de modo a interromper a reação do substrato com a enzima, mudando a cor para amarelo. Agitou-se novamente e procedeu-se à imediata medição da absorvância no espectrofotómetro a 450 nm.

Após a leitura, no software fornecido pelo fabricante do kit, the RIDA® SOFT Win.net (Art. n.º R9996), colocaram-se as respetivas absorvâncias e o respetivo fator de diluição de 1 em cada amostra. Na avaliação do teste, usou-se a função *spline cúbica*, tal como descrito no teste kit RIDASCREEN® Aflatoxin B1 30/15.

Em seguida obteve-se a curva padrão através dos níveis de concentrações (0, 1, 5, 10, 20 e 50 µg/kg) com duas determinações cada. A concentração de AFBI (µg/kg) correspondente à absorvância de cada amostra foi lida na curva de calibração, bem como a concentração de AFBI de cada amostra analisada (Anexo I). Dado o formato do teste analisado, verificou-se que a absorvância é inversamente proporcional à concentração de AFBI nas amostras/padrões.

### **II.1.6. Avaliação da ocorrência e exposição**

Após determinação das concentrações de AFBI nas amostras de arroz procedeu-se ao tratamento dos dados, de modo a avaliar a ocorrência de AFBI em amostras de arroz, bem como a estimar a exposição da população portuguesa à AFBI através do consumo deste género alimentício.

## II.2. Resultados e discussão

No presente estudo foi utilizada a técnica ELISA, devido à rapidez do teste, permitindo a redução do tempo de ensaio, uma extração assingelada das amostras e elevada especificidade do teste para a toxina em questão.

Tal como já referido, o LOD descrito no manual do teste *kit* era de 1  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (ppb) para cereais. Dísparos LODs encontram-se descritos na literatura (consultar Tabela 5) desde 0,05  $\mu\text{g}/\text{kg}$  a 0,5  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (Thirumale-devi *et al.*, 2002; Ghali *et al.*, 2010; Aydin, Aksu & Gunsen, 2011; Reddy, Farhana & Salleh, 2011). Em contrapartida, o LOD referente a este estudo é razoavelmente superior aos descritos na literatura, sendo o valor mais próximo de 0,5  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (Reddy, Farhana & Salleh, 2011).

Relativamente à curva de padrão obtida, a média do coeficiente de variação (CV) foi de 2%. Sendo o valor mais elevado de 7%, indo de encontro com os valores de referência de 20% estabelecidos para ensaios de ligação (LBA), que incluem a técnica ELISA (Figura 13) (FDA, 2018).

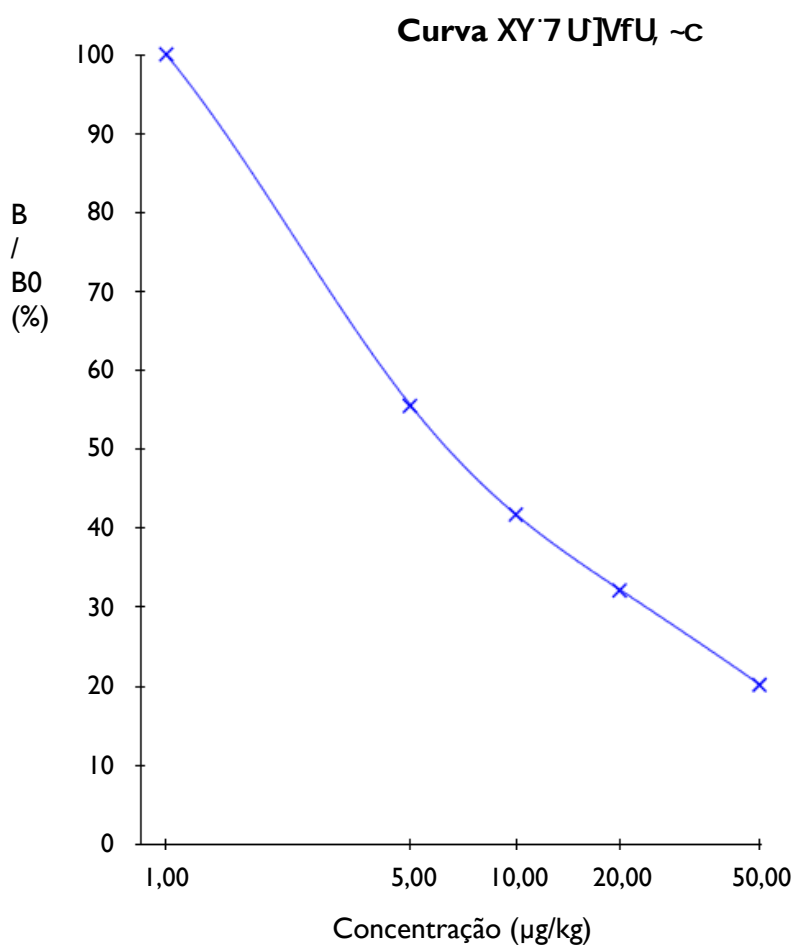


Figura 13 – Curva XY'W]vfU ~c obtida no ensaio.

## II.2.1. Ocorrência de Aflatoxina B1 em arroz

No presente estudo, procedeu-se à deteção e quantificação de AFBI em diversas amostras de arroz (20 amostras de supermercados e 22 amostras de produtores), no entanto, só foi possível quantificar a concentração de AFBI em apenas 2 amostras. Nas restantes amostras (40) não foi possível quantificar esse valor, pois o teor de contaminação era inferior ao LOD.

A ocorrência e os níveis de AFBI em amostras de arroz encontram-se representados na Tabela 7. Os níveis de contaminação de AFBI nas amostras foram 1,96 e 2,20  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , sendo o valor médio das amostras positivas de 2,08  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . A destacar, que apenas uma amostra (2,20  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) se encontrava acima do LMA na EU e em Portugal (2  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ).

Tabela 7 – Concentração de AFBI nas amostras em estudo.

Amostras analisadas (N)	Amostras positivas (>LOD)	Nº de amostras em relação à concentração ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )			Média das amostras positivas ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )
		<1,00 <sup>a</sup>	1,96 <sup>a b</sup>	2,20 <sup>c</sup>	
42	2 (4,8%)	40	1	1	2,08

<sup>a</sup> Abaixo do LMA na EU e em Portugal (2  $\mu\text{g}/\text{kg}$ )

<sup>b</sup> Amostra 4 (Arroz Extra Longo Selvagem (não Nacional, Canadá)

<sup>c</sup> Amostra 8 (Arroz Extra Longo Carolino (Nacional)

No gráfico seguinte (Figura 14) é possível comparar as amostras positivas (>LOD, 1  $\mu\text{g}/\text{kg}$  para cereais) com os LMAs de diferentes países do Mundo, entre eles a EU (incluindo Portugal), China e Índia, 2  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$  e 30  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , respetivamente, verificando-se que nenhuma amostra se encontra acima do LMA na China nem na Índia.

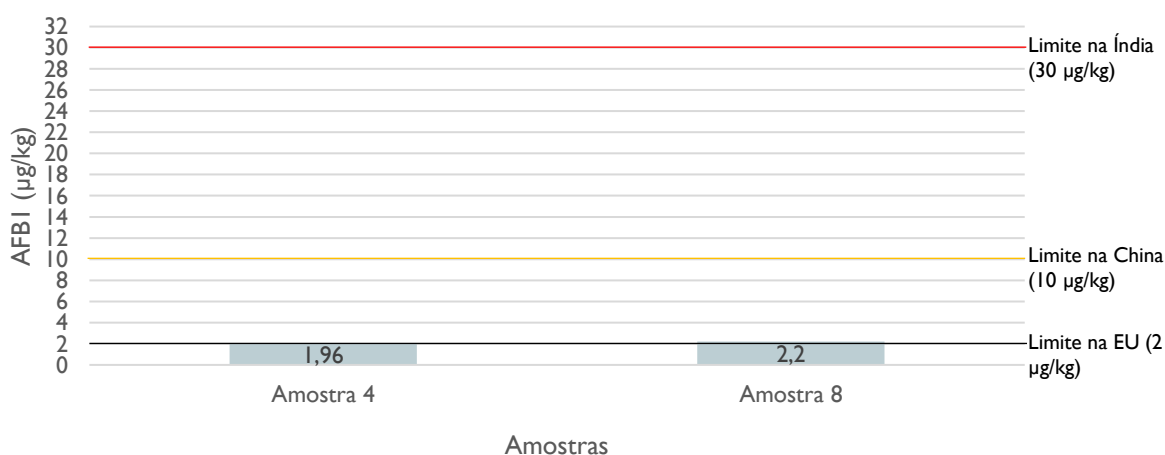


Figura 14 – Os níveis de contaminação de AFBI nas amostras positivas e os LMAs da EU, China e Índia, representados em linhas horizontais.



Tendo em conta os resultados descritos na literatura apresentados anteriormente na Tabela 5, seria espectável que o arroz com casca (*paddy*) apresentasse um teor de AFBI significativamente maior comparado com o arroz sem casca/descascado, contudo tal não se verificou, pois ambas as amostras positivas foram sujeitas ao descasque e ao branqueamento (Sale & Yoshizawa, 2005; Liu, Gao & Yu, 2006; Iqbal *et al.*, 2016). Segundo um estudo de Liu, Gao & Yu (2006), 100% das amostras de arroz com casca, provenientes da China, estavam contaminadas com AFBI. O teor médio de AFBI no arroz com casca (*paddy*) era de 3,87 µg/kg AFBI, enquanto que no arroz sem casca/ descascado os teores foram bastante inferiores, sendo o teor médio de 0,88 µg/kg.

De acordo com o Regulamento (EU) nº 165/2010, o arroz com casca contém frequentemente teores de AFs ligeiramente superiores aos teores máximos permitidos. Contudo, após o branqueamento, processo que retira a casca, os teores de AF no arroz branqueado situam-se geralmente abaixo dos teores máximos (EC, 2010). Em relação ao estudo desenvolvido tal não se verificou, pois em ambas as amostras quantificadas, o tipo de arroz era branqueado.

Comparou-se o presente estudo, com o estudo de Eslami *et al.* (2015), que utilizou o mesmo teste. Das 40 amostras de arroz analisadas, proveniente de províncias do Irão, verificou-se que 100% das amostras encontravam-se contaminadas com AFBI e 62,5% continham teores acima do LMA para a UE. Os teores de AFBI nas amostras variaram entre 0,29 - 2,92 µg/kg, sendo o valor médio de 2,09 µg/kg, valores idênticos aos teores do presente estudo.

Num estudo desenvolvido na Áustria por Reiter *et al.* (2010) analisaram-se vários tipos de arroz, como o basmati, integral, entre outros. Recorreram ao método HPLC-FLD, e concluíram que 29,6% das amostras estavam contaminadas com AFBI com teores entre 0,45 - 9,86 µg/kg.

Alguns estudos reportaram valores muito acima dos resultados obtidos e do LMA na EU. Na Índia, um estudo realizado por Elangovan & Kalyanasundaram (1999), demonstrou uma incidência de 62% nas amostras positivas para AFBI, sendo que 60% das amostras positivas apresentavam níveis de AFBI entre 50 - 500 µg/kg, e 30%, superior a 2 mg/kg, valores bastante elevados em relação ao LMA em Portugal (2 µg/kg). Contudo, estes valores podem estar relacionados com o facto de o método TLC ser pouco sensível.

Já o estudo realizado por Iqbal *et al.* (2016) utilizou outro método, o HPLC acoplado com detetor de fluorescência (HPLC-FLD). Os resultados mostraram que 35% das amostras estavam contaminadas com AFs, com teores entre 0,04 - 21,30 µg/kg, sendo que 19% das amostras continham teores acima do LMA na UE para AFBI. Em relação à AFBI, observa-se

uma boa recuperação de  $89 \pm 0,47\%$ , o LOD e LOQ foram  $0,04 \mu\text{g}/\text{kg}$  e  $0,20 \mu\text{g}/\text{kg}$ , respetivamente.

Todavia, dois estudos realizados na Tunísia, por Ghali *et al.* (2008, 2010) relataram que a concentração de AFBI nas amostras de arroz analisadas era de  $0,0 \mu\text{g}/\text{kg}$ , nenhuma amostra se encontrava contaminada ( $< \text{LOQ}$  de  $0,1 \mu\text{g}/\text{kg}$ ). Posto isto, os autores sugerem que o cereal em estudo é menos favorável à produção de AFs num clima temperado.

Segundo a classificação de Koppen, o clima de Portugal Continental, divide-se em duas zonas. Uma corresponde a um clima temperado com Inverno chuvoso e Verão seco e quente (Csa) e outra a um clima temperado com Inverno chuvoso e Verão seco e pouco quente (Csb) (IPMA, 2020). Contudo, os resultados obtidos no presente trabalho contradizem o referido no estudo de Ghali *et al.* (2008, 2010), pois ambas as amostras positivas para AFBI (4,8%) são provenientes de países com um clima temperado, o Canadá e Portugal.

Posto isto, os resultados obtidos podem dever-se ao facto de este método possuir uma gama de deteção reduzida relativamente a outros métodos, em virtude da sensibilidade limitada dos anticorpos, o que poderá ter contribuído para a quantificação de apenas duas amostras ( $> \text{LOD}$  de  $1 \mu\text{g}/\text{kg}$  para cereais). Além disso, os resultados positivos nas amostras em questão, também podem advir de más práticas agrícolas, de transporte e/ ou de armazenamento por parte dos países produtores.

## II.2.2. Avaliação da exposição

A ingestão diária estimada (EDI) de AFBI pelo consumo de arroz foi calculada através da seguinte fórmula:

$$EDI = \frac{\sum c \times C}{N \times D \times K} \text{ (ng/ kg p.c./ dia)}$$

Sendo que o  $\sum c$  corresponde ao somatório da concentração de AFBI nas amostras positivas ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), C é o consumo médio anual estimado de arroz por individuo, N é o número de amostras positivas, D é o número de dias do ano (365) e o K é o p.c., 60 Kg (IPCS, 2009; Duarte *et al.*, 2013).

Segundos dados da INE, o consumo de arroz pela população portuguesa em 2018/2019 correspondeu a  $15,9 \text{ Kg/ habitante}$  (INE, 2020). O peso médio corporal dos adultos considerado foi de 60 Kg. O EDI obtido foi de  $1,5 \text{ ng/ kg p.c./ dia}$ .

Em contrapartida, segundo um estudo de Iqbal *et al.* (2016), no Paquistão a exposição média a AFBI através do consumo de arroz correspondeu a 22,2 ng/ kg p.c./ dia, valor muito superior ao EDI obtido.

Como referido, segundo dados epidemiológicos de cancro primário de fígado recolhidos pelo JECFA, a ingestão 1,0 ng de AFs/ kg p.c. /dia aumentaria a incidência de cancro no fígado em 0,013 cancros/ ano/ 100 000 habitantes, portanto o EDI obtido é bastante preocupante para a saúde dos consumidores.

Para a avaliação da exposição da população portuguesa às AFs através do consumo de arroz utilizou-se o valor definido por Kuiper-Goodman em 1998, para a Ingestão diária máxima tolerável provisória (PMTDI) para 2 grupos populacionais, os adultos e crianças com hepatite B e os adultos e crianças sem hepatite B com valores de 0,4 ng/ kg p.c./ dia e 1,0 ng/ kg p.c. / dia, respetivamente. Observa-se portanto que a ingestão de AFBI através do consumo de arroz apresenta consequências para os consumidores, dado que o EDI obtido é largamente superior ao PMTDI. No caso dos indivíduos sem o VHB, o EDI para AFBI foi de 1,5 vezes superior ao PTMDI, já no caso dos indivíduos portadores de VHB, o EDI obtido foi cerca de 3,75 vezes superior ao PMTDI. De acordo com o último Inquérito Serológico Nacional, de 2015-2016, a via de transmissão mais comum do VHB nos portugueses é a transmissão sexual, sendo a prevalência de infetados de 0,7% no sexo masculino e 0,2% no sexo feminino, transpondo uma endemicidade baixa em Portugal (INSA IP, 2017).

Também é importante referir que as crianças são um grupo particular, uma vez que consomem maiores quantidades de alimentos do que os adultos relativamente ao seu p.c. (ASAE, 2009).

Portanto, é fundamental tomar medidas de modo a reduzir a produção de toxinas nos cereais, nomeadamente no arroz, para limites considerados aceitáveis e seguros, tendo por base boas práticas agrícolas e de armazenamento (Duarte *et al.*, 2014).

## CONCLUSÃO E PERSPETIVAS FUTURAS

As micotoxinas e os respetivos fungos produtores representam um problema grave de saúde pública, nomeadamente no que toca à AFBI, pois foi identificada como o principal hepatocarcinogénico natural, classificado pela IARC como Grupo I. Devido ao potencial hepatocarcinogénico da AFBI, considerou-se fundamental desenvolver um estudo de análise do teor de contaminação de AFBI em 42 amostras de arroz (20 de supermercados e 22 de produtores), visto ser um dos cereais mais consumidos a nível mundial.

De modo a quantificar e detetar a AFBI presente nas amostras de arroz recorreu-se ao ensaio imunoenzimático ELISA em formato competitivo com deteção por espectrofotómetro.

Das 42 amostras de arroz analisadas, entre as quais, arroz agulha, basmati, carolino, integral, Punjab, selvagem, sushi e thai, apenas 4,8% das amostras estavam contaminadas (> ao LOD, de 1 µg/kg para cereais). Os teores de contaminação de AFBI nas amostras corresponderam a 1,96 µg/kg e 2,20 µg/kg. A destacar que apenas uma amostra se encontrava acima do LMA por lei na UE e em Portugal (2 µg/kg), que foi produzida em Portugal.

Os resultados sugerem que apesar dos avanços tecnológicos, é fundamental apostar em mais estudos relacionados com o tema, bem como, na prevenção e no controlo de possíveis contaminações de AFs ao longo da cadeia alimentar. Para tal é necessário proceder à constante implementação de boas práticas agrícolas e de fabrico, bem como, em melhores condições de secagem, transporte e/ou armazenamento dos géneros alimentícios. Deve proceder-se sempre a uma análise objetiva dos pontos críticos em todas as etapas da cadeia alimentar, ou seja, desde o prado até ao prato, com o intuito de minimizar a exposição humana às AFs, em particular à AFBI.

A legislação atual não estabelece limites máximos permitidos de AFBI no arroz, o valor de referência utilizado no presente estudo é referente ao estabelecido para os cereais. É esperado que os resultados obtidos neste trabalho possam contribuir para a consciencialização e eventual reformulação dos limites máximos estabelecidos referentes às AFs no arroz.

Tendo em conta que o consumidor deve conhecer a verdadeira natureza do género alimentício que pretende consumir, o papel principal da segurança alimentar na cadeia alimentar é de garantir que a qualidade e segurança não é interferida desde o produtor até ao consumidor (Parlamento Europeu e do Conselho, 2002; ASAE, 2019). Assim, torna-se imprescindível apostar em mais estudos relacionados com o tema, bem como na melhora dos métodos de secagem, condições de armazenamento, e na prevenção, através de boas práticas agrícolas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, H. - **Aflatoxin and Food Safety**. Boca Raton, FL: CRC Press, (2005). ISBN 0-8247-2303-1.

AFUM, C. [et al.] (2016) - Association between Aflatoxin M1 and Liver Disease in HBV/HCV Infected Persons in Ghana. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 13:4 (2016) 377.

AHLBERG, S. H. ; JOUTSJOKI, V. & KORHONEN, H. J. (2015). Potential of lactic acid bacteria in aflatoxin risk mitigation. *International Journal of Food Microbiology*. 207 (2015) 87–102.

ALIMENTARIUS, C. (1995) - Codex Standard for rice. *Codex stan*. 198 (1995).

ANITHA, S. [et al.] - (2014) - The association between exposure to aflatoxin, mutation in TP53, infection with hepatitis B virus, and occurrence of liver disease in a selected population in Hyderabad, India. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 766 (2014) 23–28.

ANTUNES, H. I. S. ; FERREIRO, M. D. F. (2017) - Segurança alimentar e sustentabilidade: o caso do setor do arroz no Vale do Tejo e Sorraia-perceção e práticas. (2017).

ARAGÃO, A. (2014) - Administração da Segurança Alimentar na União Europeia: Como Garantir um Nível Elevado de Proteção com Eficácia, Precaução, Transparência e Abertura. *Faculdade de Direito da Universidade de Coimbra*. 90 (2014) 139.

ARROZ CAROLINO DAS LEZÍRIAS RIBATEJANAS - **Os diferentes tipos de arroz**. [Acedido a 10 de fevereiro de 2020]. Disponível na Internet: <https://arrozcarolino.pt/2018/05/05/os-diferentes-tipos-de-arroz/>.

ASAE, Autoridade de Segurança Alimentar e Económica (2015) - Riscos e Alimentos. *Alimentação e Gravidez*. Nº 10 (2015).

ASAE, Autoridade de Segurança Alimentar e Económica - **Aflatoxinas nos alimentos**. 2017. [Acedido a 20 de janeiro de 2020]. Disponível na Internet: <https://www.asae.gov.pt/seguranca-alimentar/riscos-quimicos/aflatoxinas-nos-alimentos.aspx>.

ASAE, Autoridade de Segurança Alimentar e Económica - **Perfil de risco dos principais alimentos consumidos em Portugal**. (2009). [Acedido a 15 de junho de 2020]. Disponível na Internet: <http://www.asae.gov.pt/ficheiros-externos-outros/perfil-de-risco-dos-principais-alimentos-consumidos-em-portugal-pdf.aspx>.

ASAE, Autoridade de Segurança Alimentar e Económica - **Perigos de Origem Alimentar**. [Acedido a 10 de janeiro de 2020]. Disponível na Internet: <https://www.asae.gov.pt/cientifico-laboratorial/area-tecnico-cientifica/perigos-de-origem-alimentar.aspx>.

ASAE, Autoridade de Segurança Alimentar e Económica - **RASFF (Rapid Alert System for Food and Feed)**. [Acedido a 20 de janeiro de 2020]. Disponível na Internet: <https://www.asae.gov.pt/inspecao-fiscalizacao/sistemas-de-alerta-e-troca-de-informacao/rasff.aspx>.

ASAE, Autoridade de Segurança Alimentar e Económica (2019) - Riscos e Alimentos. 10 Anos de PNCA - Ao serviço da Ciência e do Consumidor. Nº 17. (2019).

ASAO, T. [et al.] (1965) - The Structures of Aflatoxins B and G1. *Journal of the American Chemical Society*. 87:4 (1965) 882–886.

ASPLIN, F.D. ; CARNAGHAN R.B.A. (1961) - The toxicity of certain groundnut meals for poultry with special reference to their effect on ducklings and chickens. *Vet. Rec.* 73 (1961) 1215–1219.

AYDIN, A. ; AKSU, H. ; GUNSEN, U. (2011) - Mycotoxin levels and incidence of mould in Turkish rice. *Environmental monitoring and assessment*. 178:1-4 (2011) 271–280.

BALL, R. W. ; COULOMBE, R. A. (1991) - Comparative biotransformation of aflatoxin B1 in mammalian airway epithelium. *Carcinogenesis*. 12:2 (1991) 305–310.

BANSAL, J. [et al.] (2011) - Surveys of rice sold in Canada for aflatoxins, ochratoxin A and fumonisins. *Food Additives & Contaminants: Part A*. 28:6 (2011) 767–774.

BAPTISTA, P. ; VENÂNCIO, A. (2003) - Os perigos para a segurança alimentar no processamento de alimentos. (2003).

BATTILANI, P. [et al.] (2012) - Modelling, predicting and mapping the emergence of aflatoxins in cereals in the EU due to climate change. *EFSA Supporting Publications*. 9:1 (2012) 223.

BENNETT, J. W. ; KLICH, M. (2003) - Mycotoxins. *Clinical Microbiology Reviews*. 16:3 (2003) 497–516.

BERTHILLER, F. [et al.] (2012) - Masked mycotoxins: A review. *Molecular Nutrition & Food Research*. 57:1 (2012) 165–186.

- BLÜTHGEN, A. ; UBBEN E.-H. (2000) - Zur Kontamination von Futtermitteln und Tankwagensammeilmilch mit den Aflatoxinen B1 und M1 in Schleswig-Holstein-ein aktueller überblick. Kieler Milchwirtschaft Forschungsber. 53 (2000) 335–354.
- BOONEN, J. [et al.] (2012) - Human skin penetration of selected model mycotoxins. Toxicology. 301:1-3 (2012) 21–32.
- BORBA, V. S. D. ; PAIVA R. M. H. ; BADIALE-FURLONG, E. (2019) - Impact of Biological Contamination of Rice on Food Safety. Food Reviews International. (2019) 1–16.
- CARVAJAL M. ; BERUMEN J. ; GUARDADO-ESTRADA M. (2012) - The presence of aflatoxin B1-FAPY adduct and human papilloma virus in cervical smears from cancer patients in Mexico, Food Additives & Contaminants: Part A. 29:2 (2012) 258–268.
- CESPEDEZ, A. E. ; DIAZ, G. J. (1997) - Analysis of aflatoxins in poultry and pig feeds and feedstuffs used in Colombia. Journal of AOAC International. 80 (1997) 1215–1219.
- CHEN, C.-H. [et al.] (2007) - Aflatoxin exposure and hepatitis C virus in advanced liver disease in a hepatitis C virus endemic area in Taiwan. The American Society of Tropical Medicine and Hygiene. 77:4 (2007) 747-52.
- CHU, Y. J. [et al.] (2017) - Aflatoxin B1 exposure increases the risk of cirrhosis and hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis B virus carriers. International journal of cancer. 141:4 (2017) 711–720.
- CREPPY, E. E. (2002) - Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe. Toxicology Letters. 127:1-3 (2002) 19–28.
- CULLEN, J.M. [et al.] (1987) - Carcinogenicity of dietary aflatoxin M1 in male Fischer rats compared to aflatoxin B1. Cancer research. 47:7 (1987) 1913–7.
- D'MELLO, J. P. F. ; MACDONALD, A. M. C. (1997) - Mycotoxins. Animal Feed Science and Technology. 69:1-3 (1997) 155–166.
- DE RUYCK, K. [et al.] (2015) - Dietary mycotoxins, co-exposure, and carcinogenesis in humans: Short review. Mutation Research/Reviews in Mutation Research. 766 (2015) 32–41.
- DENG J. [et al.] (2018) - Aflatoxin B1 metabolism: regulation by phase I and II metabolizing enzymes and chemoprotective agents, Mutation Research-Reviews in Mutation Research. (2018).

DRUMOND, V. L. M. M. (2012) - Presença de aflatoxinas em arroz e cereais importados na União Europeia-revisão bibliográfica e análise de dados RASFF. Doctoral dissertation, Faculdade de Ciências e Tecnologia. (2012).

DUARTE, S. C. [et al.] (2013) - Aflatoxin M1 in marketed milk in Portugal: Assessment of human and animal exposure. *Food Control*. 30:2 (2013) 411–417.

DUARTE, S. C. ; PENA, A. L. S. ; DE MATOS LINO, C. (2014) - Mycotoxins and their implications in food safety. Future Science Ltd. (2014).

EC, European Commission (1996) - Aflatoxins, ochratoxin A and Patulin (opinion expressed on september 1994). Reports of the Scientific committee for food 35th series. (1996).

EC, European Commission (2006a) - Regulamento (CE) N° 1881/2006 da Comissão, de 19 de dezembro de 2006, que fixa os teores máximos de certos contaminantes presentes nos géneros alimentícios. OJ L. 364 (2006) 5–24.

EC, European Commission (2006b) - Regulamento (CE) N° 401/2006 da Comissão, de 23 de fevereiro de 2006, que estabelece os métodos de amostragem e de análise para o controlo oficial dos teores de micotoxinas nos géneros alimentícios. OJ L. 70 (2006) 12–34.

EC, European Commission (2010) - Regulamento (UE) N° 165/2010 da Comissão, de 26 de fevereiro de 2010, que altera o Regulamento (CE) N° 1881/2006, que fixa os teores máximos de certos contaminantes presentes nos géneros alimentícios, no que diz respeito às aflatoxinas. OJ L. 50 (2010) 8–12.

EC, European Commission (2012) - Regulamento (UE) N° 1058/2012 da Comissão, de 12 de novembro de 2012, que altera o Regulamento (CE) N° 1881/2006 no que diz respeito aos teores máximos de aflatoxinas nos figos secos. OJ L. 313 (2012) 14–15.

EC, European Commission (2019) - Regulamento de Execução (UE) 2019/1715 da Comissão, de 30 de setembro de 2019, que estabelece regras aplicáveis ao funcionamento do sistema de gestão da informação sobre os controlos oficiais e dos seus componentes de sistema (Regulamento IMSOC). OJ L. 261 (2019) 37–96.

EC, European Commission - **RASFF 2010 annual report**. Luxembourg, 2011. [Acedido a 1 de setembro de 2020]. Disponível na Internet: <https://op.europa.eu/en/publication-detail/-/publication/7de58882-f5c5-4e28-b8b5-0ebf9836dbdf>



EC, European Commission - **RASFF 2011 annual report**. Luxembourg, 2012. [Acedido a 1 de setembro de 2020]. Disponível na Internet: <https://op.europa.eu/en/publication-detail/-/publication/79564291-a792-4c3b-aeb8-53455d22c9a8>

EC, European Commission - **RASFF 2012 annual report**. Luxembourg, 2013. [Acedido a 1 de setembro de 2020]. Disponível na Internet: <https://op.europa.eu/en/publication-detail/-/publication/61360886-b553-4ce1-92f6-09326ee504d6>

EC, European Commission - **RASFF 2013 annual report**. Luxembourg, 2014. [Acedido a 1 de setembro de 2020]. Disponível na Internet: <https://op.europa.eu/en/publication-detail/-/publication/a2cda8f4-cd64-4604-ab3b-5f8a5f698d50>

EC, European Commission - **RASFF 2014 annual report**. Luxembourg, 2015. [Acedido a 1 de setembro de 2020]. Disponível na Internet: <https://op.europa.eu/en/publication-detail/-/publication/a2cda8f4-cd64-4604-ab3b-5f8a5f698d50>

EC, European Commission - **RASFF 2015 annual report**. Luxembourg, 2016. [Acedido a 1 de setembro de 2020]. Disponível na Internet: <https://op.europa.eu/en/publication-detail/-/publication/98e04cfc-aa54-11e6-aab7-01aa75ed71a1>

EC, European Commission - **RASFF 2016 annual report**. Luxembourg, 2017. [Acedido a 1 de setembro de 2020]. Disponível na Internet: <https://op.europa.eu/en/publication-detail/-/publication/7ced87a2-ce70-11e7-a5d5-01aa75ed71a1>

EC, European Commission - **RASFF 2017 annual report**. Luxembourg, 2018. [Acedido a 1 de setembro de 2020]. Disponível na Internet: <https://op.europa.eu/en/publication-detail/-/publication/f4adf22f-4f7c-11e9-a8ed-01aa75ed71a1>

EC, European Commission - **RASFF 2018 annual report**. Luxembourg, 2019. [Acedido a 1 de setembro de 2020]. Disponível na Internet: <https://op.europa.eu/en/publication-detail/-/publication/c3318331-d9c4-11e9-9c4e-01aa75ed71a1>

EC, European Commission - **RASFF Portal**. [Acedido a 30 de julho de 2020]. Disponível na Internet: <https://webgate.ec.europa.eu/rasff-window/portal/?event=SearchByKeyword&NewSearch=1&Keywords=rice>

EC, European Commission - **Trade helpdesk - Classificar arroz**. 2020. [Acedido a 14 de julho de 2020]. Disponível na Internet: <https://trade.ec.europa.eu/tradehelp/pt/classificar-arroz>

EFSA, European Food Safety Authority (2004) - Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in the Food Chain on a request from the Commission related to Aflatoxin B1 as undesirable substance in animal feed. The EFSA Journal. 39 (2004) 1-27.

EFSA, European Food Safety Authority (2007) - Opinion of the scientific panel on contaminants in the food chain on a request from the commission 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. The EFSA Journal. 446 (2007) 1–127.

EFSA, European Food Safety Authority (2014) - Scientific Opinion on the risks to human and animal health related to the presence of beauvericin and enniatins in food and feed. EFSA Journal. 12(8) (2014) 3802.

EFSA, European Food Safety Authority (2019) - Scientific Opinion on the risks to public health related to the presence of aflatoxins in food. The EFSA Journal (2019).

EFSA, European Food Safety Authority (2020) - Scientific Opinion. Risk assessment of aflatoxins in food. The EFSA Journal. 18(3) (2020) 6040.

ELANGO VAN, T.V.P. ; KALYANASUNDARAM, I. (1999) - Prevalence of aflatoxin B1 in rice bran and some associated factors. Indian Phytopathology. 52:2 (1999) 129–133.

ESLAMI, M. [et al.] (2015) - Determination of aflatoxin B1 levels in Iranian rice by ELISA method. Toxin Reviews. 34:3 (2015) 125–128.

FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations (2004) - Mycotoxin regulations in 2003 and current developments. Worldwide Regulations for Mycotoxins in Food and Feed. (2004) 9–28.

FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations (2018a) - Rice Market Monitor (RMM). Volume XXI, Issue No. 1 (2018).

FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations – **Crops** (2018b). [Acedido a 10 de março de 2020]. Disponível na Internet: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>.

FDA, U.S. (2018) - Bioanalytical method validation guidance for industry. US Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research and Center for Veterinary Medicine. (2018).

FERNANDEZ-CRUZ, M. L. ; MANSILLA, M. L. ; TADEO, J. L. (2010) - Mycotoxins in fruits and their processed products: Analysis, occurrence and health implications. *Journal of Advanced Research*. 1:2 (2010) 113–122.

FIGUEIREDO, N. [et al.] (2013) - O cultivo do arroz em Portugal e a resposta do agrossistema às alterações ambientais de temperatura e concentração de dióxido de carbono. *Vida Rural*. 1787 (2013) 28–31.

FUNG, F. ; CLARK, R. F. (2004) - Health Effects of Mycotoxins: A Toxicological Overview. *Journal of Toxicology: Clinical Toxicology*. 42:2 (2004) 217–234.

GALLAGHER, E. P. [et al.] (1996) - The Kinetics of Aflatoxin B1 Oxidation by Human cDNA-Expressed and Human Liver Microsomal Cytochromes P450 1A2 and 3A4. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 141:2 (1996) 595–606.

GARCIA, I. C. M. (2017) - Influência de diferentes variedades de arroz carolino no seu comportamento em cozedura. Doctoral dissertation. (2017).

GAREIS, M. [et al.] (1990) - Cleavage of zearalenone-glycoside, a “masked” mycotoxin, during digestion in swine. *Journal of Veterinary Medicine, Series B*. 37:1-10 (1990) 236–240.

GHALI, R. [et al.] (2008) - Incidence of aflatoxins, ochratoxin A and zearalenone in Tunisian foods. *Food Control*. 19:9 (2008) 921–924.

GHALI, R. [et al.] (2010) - Aflatoxin determination in commonly consumed foods in Tunisia. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 90:14 (2010) 2347–2351.

GOLDBLATT, L. (Ed.). (1969) - Aflatoxin: scientific background, control, and implications. *Food science and technology*. Academic Press. Vol. 7 (1969).

GREGORIO, G. B. ; SENADHIRA, D. ; HTUT, T. (1999) - Improving iron and zinc value of rice for human nutrition. *Agriculture et development*. 23 (1999) 77–81.

GREGORY, J. F. ; GOLDSTEIN, S. L. ; EDDS, G. T. (1983) - Metabolite distribution and rate of residue clearance in Turkeys fed a diet containing aflatoxin B1. *Food and Chemical Toxicology*. 21:4 (1983) 463–467.

GUEVARA-GONZALEZ, R. G. (Ed.). (2011) - Aflatoxins: Biochemistry and Molecular Biology. *BoD–Books on Demand*. (2011).

HABIBI, N. [et al.] (2019) - Aflatoxin B1 exposure and the risk of hepatocellular carcinoma in Iranian carriers of viral hepatitis B and C. *Toxin Reviews*. 38:3 (2019) 234–239.

HOSSAIN, M. M. ; CHAKRABORTY, S. C. ; BROWN, C. L. (2018) - Evaluation of diets with sunflower cake as a replacement for fish meal in feeds for Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) production. (2018).

HUFF, W. E. (1988) - Mycotoxin interactions in poultry and swine. *J. Anim. Sci.* 66 (1988) 2351–2355.

HUSSEIN, H.S. ; BRASEL, J.M. (2001) - Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. *Toxicology*. 167:2 (2001) 101–134.

IARC, International Agency for Research on Cancer (1993) - Some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. IARC monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. 56 (1993) 1–599.

IARC, International Agency for Research on Cancer (2002) - Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene. IARC monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. 82 (2002).

IARC, International Agency for Research on Cancer (2012) - Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans: chemical agents and related occupations. A review of human carcinogens. 100 (2012) 224–248.

IPCS, International Programme on Chemical Safety. (2009) - Dietary exposure assessment of chemicals in food. In Principles and methods for the risk assessment of chemicals in food. Genève, Switzerland: WHO. (2009).

IPMA, Instituto Português do Mar e da Atmosfera - **Área educativa - Clima de Portugal Continental**. [Acedido a 10 de julho de 2020]. Disponível na Internet: <https://www.ipma.pt/pt/educativa/tempo.clima/index.jsp?page=clima.pt.xml>.

IQBAL, S. Z. (2016) - The presence of aflatoxins and ochratoxin A in rice and rice products; and evaluation of dietary intake. *Food chemistry*. 210 (2016) 135–140.

IQBAL, J. [et al.] (2014) - Aflatoxins contamination in Pakistani brown rice: a comparison of TLC, HPLC, LC–MS/MS and ELISA techniques. *Toxicology Mechanisms and Methods*. 24:8 (2014) 544–551.

INE, Portal do Instituto Nacional de Estatística. 2020. [Acedido a 16 de julho de 2020]. Disponível na Internet: [https://www.ine.pt/xportal/xmain?xpid=INE&xpgid=ine\\_indicadores&indOcorrCod=0000186&contexto=bd&selTab=tab2&xlang=pt](https://www.ine.pt/xportal/xmain?xpid=INE&xpgid=ine_indicadores&indOcorrCod=0000186&contexto=bd&selTab=tab2&xlang=pt).

JAIMEZ, J. [et al.] (2000) - Application of the assay of aflatoxins by liquid chromatography with fluorescence detection in food analysis. *Journal of Chromatography A*. 882:1-2 (2000) 1–10.

JOLLY, P. E. [et al.] (2007) - Association between aflatoxin exposure and health characteristics, liver function, hepatitis and malaria infections in Ghanaians. *Journal of Nutritional & Environmental Medicine*. 16:3-4 (2007) 242–257.

JUBERT, C. [et al.] (2009) - Effects of chlorophyll and chlorophyllin on low-dose aflatoxin B(1) pharmacokinetics in human volunteers. *Cancer Prevention Research (Philadelphia, PA)*. 2 (2009) 1015-1022.

JUAN, C. ; RITIENI, A. ; MAÑES, J. (2013) - Occurrence of *Fusarium* mycotoxins in Italian cereal and cereal products from organic farming. *Food chemistry*. 141:3 (2013) 1747–1755.

KABAK, B. ; DOBSON, A. D. (2009) - Biological strategies to counteract the effects of mycotoxins. *Journal of food protection*. 72:9 (2009) 2006–2016.

KAMDEM, L.K. (2006) - Dominant contribution of P450 3A4 to the hepatic carcinogenic activation of aflatoxin B1. *Chemical Research in Toxicology*. 19:4 (2006) 577–586.

KATSURAYAMA, A. M. ; TANIWAKI, M. H. (2017) - Fungi and aflatoxins in rice: occurrence and significance to consumer health. *Brazilian Journal of Food Technology, Campinas*. 20 (2017).

KEMPPAINEN, B. W. ; RILEY, R. T. ; PACE, J. G. (1988) - Skin Absorption as a Route of Exposure for Aflatoxin and Trichothecenes. *Journal of Toxicology: Toxin Reviews*. 7:2 (1988) 95–120.

KENSLER, T. W. [et al.] (2010) - Aflatoxin: A 50-Year Odyssey of Mechanistic and Translational Toxicology. *Toxicological Sciences*. 120 (Supplement 1) (2010) 28–48.

KUIPER-GOODMAN T. (1998) - Food safety: mycotoxins and phytotoxins in perspective. *Mycotoxins and Phytotoxins – Developments in Chemistry, Toxicology and Food Safety*. Alaken Inc., Fort Collins, Colo, 25-48. (1998) 25–48.

LAI, X. [et al.] (2015) - Occurrence of aflatoxins and ochratoxin A in rice samples from six provinces in China. *Food Control*. 50 (2015) 401–404.

LARSSON, P. ; HOEDAYA, W.I. ; TJALVE, H. (1990) - Disposition of 3H-aflatoxin H in mice: formation and retention of tissue bound metabolites in nasal glands. *Journal of Pharmacology and Toxicology*. 67 (1990) 162–71.

- LARSSON, P. ; TJÄLVE, H. (1993) - Distribution and metabolism of aflatoxin B1 in the marmoset monkey (*Callithrix jacchus*). *Carcinogenesis*. 14 (1993) 1–6.
- LAUTERT, C. [et al.] (2014) - Efeitos in vitro de ocratoxina A, deoxinivalenol e zearalenona sobre a viabilidade celular e atividade de E-ADA em linfócitos de frangos de corte. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 34:12 (2014) 1173–1180.
- LEE, N. A. [et al.] (2004) - A Rapid Aflatoxin B1 ELISA: Development and Validation with Reduced Matrix Effects for Peanuts, Corn, Pistachio, and Soybeans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52:10 (2004) 2746–2755.
- LI, P. ; ZHANG, Q. ; ZHANG, W. (2009) - Immunoassays for aflatoxins. *Trends in Analytical Chemistry*. 28:9 (2009) 1115–1126.
- LIU, Y. ; WU, F. (2010) - Global Burden of Aflatoxin-Induced Hepatocellular Carcinoma: A Risk Assessment. *Environmental Health Perspectives*. 118:6 (2010) 818–824.
- LIU, Z. ; GAO, J. ; YU, J. (2006) - Aflatoxins in stored maize and rice grains in Liaoning Province, China. *J. Stored Prod. Res.* 42 (2006) 468–479.
- LIUZZI, V. C. [et al.] (2017) - Enniatin and beauvericin biosynthesis in *Fusarium* species: production profiles and structural determinant prediction. *Toxins*. 9:2 (2017) 45.
- LUTFULLAH, G. ; HUSSAIN, A. (2012) - Studies on contamination level of aflatoxins in some cereals and beans of Pakistan. *Food Control*. 23:1 (2012) 32–36.
- MAHATO, D. K. [et al.] (2019) - Aflatoxins in food and feed: An overview on prevalence, detection and control strategies. *Frontiers in microbiology*. 10 (2019) 2266.
- MAPA DE PORTUGAL (2020) - [Acedido a 16 de julho de 2020]. Disponível na Internet: [https://www.gifex.com/maps/portugal\\_mapas/Mapa\\_Pequena\\_Escala\\_Portugal.gif](https://www.gifex.com/maps/portugal_mapas/Mapa_Pequena_Escala_Portugal.gif).
- MARCHESE, S. [et al.] (2018) - Aflatoxin B1 and M1: Biological Properties and Their Involvement in Cancer Development. *Toxins*. 10:6 (2018) 214.
- MARTINS, C. [et al.] (2018) - Assessment of multiple mycotoxins in breakfast cereals available in the Portuguese market. *Food chemistry*. 239 (2018) 132–140.
- MATABARO, E. [et al.] (2017) - Current immunoassay methods for the rapid detection of aflatoxin in milk and dairy products. *Comprehensive reviews in food science and food safety*. 16:5 (2017) 808–820.

- MAZAHERI, M. (2009). Determination of aflatoxins in imported rice to Iran. *Food and Chemical Toxicology*. 47:8 (2009) 2064–2066.
- MEDEIROS, F. H. V. D. [et al.] (2012) - Biological control of mycotoxin-producing molds. *Ciência e Agrotecnologia*. 36:5 (2012) 483–497.
- MIDIO, A. F. ; MARTINS, D. I. (2000) - *Toxicologia de Alimentos*. São Paulo: Varela. (2000) 295.
- MONTESANO R. ; HAINAUT P. ; WILD C.P. (1997) - Hepatocellular carcinoma: from gene to public health. *J Natl Cancer Inst*. 89 (1997) 1844–1851.
- MOUSAVIZADEH, A. [et al.] (2017) - Determination of total aflatoxin in rice consumption in Yasuj, Iran. *An International Peer Reviewed Open Access Journal For Rapid Publication*. (2017) 195.
- MURUGAVEL, K. G. [et al.] (2007) - Prevalence of aflatoxin B1 in liver biopsies of proven hepatocellular carcinoma in India determined by an in-house immunoperoxidase test. *Journal of Medical Microbiology*. 56:11 (2007) 1455–1459.
- NGUYEN, M. [et al.] (2007) - Occurrence of aflatoxin B1, citrinin and ochratoxin A in rice in five provinces of the central region of Vietnam. *Food Chemistry*. 105:1 (2007) 42–47.
- OGODO, A. C. ; UGBOGU, O. C. (2016) - Public health significance of aflatoxin in food industry-A review. *European Journal of Clinical and Biomedical Sciences*. 2 (2016) 51–58.
- OSMAN, N. [et al.] (1999) - Aflatoxin contamination of rice in the United Arab Emirates. *Mycotoxin Research*. 15:1 (1999) 39–44.
- PARLAMENTO EUROPEU E DO CONSELHO (2002a) - Regulamento (CE) N° 178/2002 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 28 de janeiro de 2002, que determina os princípios e normas gerais da legislação alimentar, cria a Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos e estabelece procedimentos em matéria de segurança dos géneros alimentícios. *OJ L*. 31 (2002) 1–24.
- PARLAMENTO EUROPEU E DO CONSELHO (2002b) - Directiva 2002/32/CE do Parlamento Europeu e do Conselho, de 7 de maio de 2002, relativa às substâncias indesejáveis nos alimentos para animais - Declaração do Conselho. *OJ L*. 140, 30.5. (2002) 10–22.
- PEI, S. C. [et al.] (2009) - Detection of aflatoxin M1 in milk products from China by ELISA using monoclonal antibodies. *Food Control*. 20:12 (2009) 1080–1085.

- PEÑA, R. [et al.] (2002) - Screening of aflatoxins in feed samples using a flow system coupled to capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*. 967:2 (2002) 303–314.
- PEREIRA, M. M. G., DE CARVALHO, E. P., & PRADO, G. (2002). Crescimento e produção de aflatoxinas por *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*. *Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos*. 20:1 (2002).
- PIRES, C. L. (2015). Desenvolvimento de um preparado fermentado com base em subprodutos da transformação do arroz. Doctoral dissertation. (2015).
- PORTUGAL. Diário da República - **Decreto-Lei n.º 157/2017 de 28 de dezembro do Ministério Agricultura, Florestas e Desenvolvimento Rural**. Diário da República: I série, N.º 157, 2017.
- PORTUGAL. Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge - **Inquérito Serológico Nacional 2015-2016: Doenças Evitáveis por Vacinação**. Lisboa: INSA IP, 2017.
- POTTENGER, L. H. [et al.] (2014) - An organizational approach for the assessment of DNA adduct data in risk assessment: case studies for aflatoxin B1, tamoxifen and vinyl chloride. *Critical Reviews in Toxicology*. 44:4 (2014) 348–391.
- PUBCHEM - **AFB1**. Nacional Library of Medicine. [Acedido a 24 de outubro de 2019]. Disponível na Internet: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/image/imgsrv.fcgi?cid=186907&t=1>.
- PUBCHEM - **AFB2**. Nacional Library of Medicine. [Acedido a 27 de outubro de 2019]. Disponível na Internet: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/image/imgsrv.fcgi?cid=2724360&t=1>.
- PUBCHEM - **AFG1**. Nacional Library of Medicine. [Acedido a 27 de outubro de 2019]. Disponível na Internet: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/image/imgsrv.fcgi?cid=14421&t=1>.
- PUBCHEM - **AFG2**. Nacional Library of Medicine. [Acedido a 27 de outubro de 2019]. Disponível na Internet: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/image/imgsrv.fcgi?cid=2724362&t=1>.
- PUBCHEM - **AFM1**. Nacional Library of Medicine. [Acedido a 27 de outubro de 2019]. Disponível na Internet: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/image/imgsrv.fcgi?cid=15558498&t=1>.
- PUBCHEM - **AFM2**. Nacional Library of Medicine. [Acedido a 27 de outubro de 2019]. Disponível na Internet: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/image/imgsrv.fcgi?cid=23318&t=1>.
- RAMA, J. P. F. (2014) - Eco-painéis construídos a partir de madeira e resíduos de palha/casca de arroz. Master's thesis. (2014).
- RANEY, K. D. [et al.] (1992) - The endo-8,9-epoxide of aflatoxin B1: a new metabolite. *Chemical Research in Toxicology*. 5:3 (1992) 333–335.



RAZZAGHI-ABYANEH, M. (2013) - Aflatoxins: recent advances and future prospects. BoD–Books on Demand. 4 (2013).

REDDY, K. R. N. ; FARHANA, N. I ; SALLEH, B. (2011) - Occurrence of *Aspergillus* spp. and Aflatoxin B-I in Malaysian Foods Used for Human Consumption. *Journal of Food Science*. 76:4 (2011) 99–104.

REDDY, K. R. N. ; REDDY, C. S. ; MURALIDHARAN, K. (2009) - Detection of *Aspergillus* spp. and Aflatoxin B1 in rice in India. *Food Microbiology*. 26:1 (2009) 27–31.

REITER, E. V. ; VOUK, F., BÖHM, J. ; RAZZAZI-FAZELI, E. (2010) - Aflatoxins in rice: A limited survey of products marketed in Austria. *Food Control*. 21:7 (2010) 988–991.

REITER, E. ; ZENTEK, J. ; RAZZAZI, E. (2009) - Review on sample preparation strategies and methods used for the analysis of aflatoxins in food and feed. *Molecular Nutrition & Food Research*. 53:4 (2009) 508–524.

RICHARD, J. L. (2008) - Discovery of aflatoxins and significant historical features. *Toxin Reviews*. 27:3-4 (2008) 171–201.

RODRIGUES, P. ; VENANCIO, A. ; LIMA, N. (2012) - Aflatoxigenic Fungi and Aflatoxins in Portuguese Almonds. *Scientific World Journal*. 9 (2012).

RUSHING, B.R. ; SELIM, M.I. (2018) - Aflatoxin B1: A review on metabolism, toxicity, occurrence in food, occupational exposure, and detoxification methods, *Food and Chemical Toxicology*. (2018).

R-BIOPHARM AG (2016) - Enzyme immunoassay for the quantitative analysis of Aflatoxin B1. *Ridascreen Aflatoxin B1 30/15* (Art. No. RI211). Darmstadt, Germany. (2016).

SALES, A. ; YOSHIZAWA, T. (2005) - Updated profile of aflatoxin and *Aspergillus flavus* contamination in rice and its by products from the Philippines. *Food Additives and Contaminants*. 22:5 (2005) 429–436.

SASS, C. [et al.] (2013) - Methods for chemical preparation of aflatoxin B1 adducts, AFBI-N7-guanine and AFBI-lysine. *Toxin Reviews*. 32:4 (2013) 68–74.

SCUDAMORE, K. A. [et al.] (1997) - Occurrence of mycotoxins in raw ingredients used for animal feeding stuffs in the United Kingdom in 1992. *Food Additives & Contaminants*. 14:2 (1997) 157–173.

- SECK, P. A. [et al.] (2012) - Crops that feed the world 7: Rice. *Food security*. 4:1 (2012) 7–24.
- SHEPHARD, G. S. (2008a) - Risk assessment of aflatoxins in food in Africa. *Food Additives and Contaminants*. 25:10 (2008) 1246–1256.
- SHEPHARD, G. S. (2008b) - Determination of mycotoxins in human foods. *Chemical Society Reviews*. 37:11 (2008) 2468–2477.
- SOLEIMANY, F. [et al.] (2011) - Simultaneous detection of 12 mycotoxins in cereals using RP-HPLC-PDA-FLD with PHRED and a post-column derivatization system. *Food Additives & Contaminants: Part A*. 28:4 (2011) 494–501.
- STOEV, S. D. (2015) - Foodborne mycotoxicosis, risk assessment and underestimated hazard of masked mycotoxins and joint mycotoxin effects or interaction. *Environmental toxicology and pharmacology*. 39:2 (2015) 794–809.
- STONE, M. P. [et al.] (2011) - Chemistry and biology of aflatoxin-DNA adducts. *Frontiers in Nucleic Acids*. 1082 (2011) 147–166.
- SUN, G. [et al.] (2011) - Co-contamination of aflatoxin B1 and fumonisin B1 in food and human dietary exposure in three areas of China. *Food additives and contaminants*. 28:4 (2011) 461–470.
- SWAMINATHAN, M. S. (1985) - Arroz: *AgroANALYSIS*. 9:4 (1985) 2–13.
- TATE, P. V. [et al.] (1990) - Processing of commercial peanut cake into food-grade meal and its utilization in preparation of cookies. *Plant Foods for Human Nutrition*. 40:2 (1990) 115–121.
- THIRUMALA-DEVI, K. [et al.] (2002) - Occurrence of aflatoxins and ochratoxin A in Indian poultry feeds. *Journal of food protection*. 65:8 (2002) 1338–1340.
- TURNER, N. W ; SUBRAHMANYAM, S. ; PILETSKY, S. A. (2009) - Analytical methods for determination of mycotoxins: a review. *Analytica Chimica Acta*. 632:2 (2009) 168–180.
- UENG, Y.-F. [et al.] (1995) - Oxidation of Aflatoxin B1 by Bacterial Recombinant Human Cytochrome P450 Enzymes. *Chemical Research in Toxicology*. 8:2 (1995) 218–225.
- UNUSAN, N. (2006). Occurrence of aflatoxin M1 in UHT milk in Turkey. *Food and Chemical Toxicology*. 44:11 (2006) 1897–1900.

- VIEGAS, S. [et al.] (2015) - Occupational Exposure to Aflatoxin B1 in a Portuguese Poultry Slaughterhouse. *Annals of Occupational Hygiene*. 60:2 (2015) 176–183.
- VITORINO, O. C. L. (2012) - Micotoxinas na alimentação e na saúde animal e humana. Doctoral dissertation. (2012).
- WACOO, A. P. [et al.] (2014) - Methods for Detection of Aflatoxins in Agricultural Food Crops. *Journal of Applied Chemistry*. (2014).
- WANGIA, R. N. ; TANG, L. ; WANG, J.-S. (2019) - Occupational exposure to aflatoxins and health outcomes: a review. *Journal of Environmental Science and Health, Part C*. (2019) 1–20.
- WHITTAKER, R. H. (1969) - New concepts of kingdoms of organisms. *Science*. 163:3863 (1969) 150–160.
- WHO, World Health Organization (2002) - Evaluation of Certain Mycotoxins in Food. WHO, Geneva, Switzerland. (2002).
- WHO, World Health Organization (2003) - GEMS/Food regional diets: regional per capita consumption of raw and semi-processed agricultural commodities. (2003).
- WOGAN, G. N. ; KENSLER, T. W. ; GROOPMAN, J. D. (2012) - Present and future directions of translational research on aflatoxin and hepatocellular carcinoma. A review. *Food additives & contaminants: part A*. 29:2 (2012) 249–257.
- YAO, H. ; HRUSKA, Z. ; DI MAVUNGU, J. D. (2015) - Developments in detection and determination of aflatoxins. *World Mycotoxin Journal*. 8:2 (2015) 181–191.
- YAZDANPANA, H. [et al.] (2005) - Effect of roasting on degradation of Aflatoxins in contaminated pistachio nuts. *Food and Chemical Toxicology*. 43:7 (2005) 1135–1139.
- ZARBA, A. [et al.] (1992) - Aflatoxin M1 in human breast milk from The Gambia, West Africa, quantified by combined monoclonal antibody immunoaffinity chromatography and HPLC. *Carcinogenesis*. 13:5 (1992) 891–894.

**ANEXO**

**Anexo I – Concentração das amostras em estudo.**

<b>Amostras</b>	<b>Concentração (µg/kg)</b>
1	<1.00
2	<1.00
3	<1.00
4	2.20
5	<1.00
6	<1.00
7	<1.00
8	1.96
9	<1.00
10	<1.00
11	<1.00
12	<1.00
13	<1.00
14	<1.00
15	<1.00
16	<1.00
17	<1.00
18	<1.00
19	<1.00
20	<1.00
21	<1.00

22	<1.00
23	<1.00
24	<1.00
25	<1.00
26	<1.00
27	<1.00
28	<1.00
29	<1.00
30	<1.00
31	<1.00
32	<1.00
33	<1.00
34	<1.00
35	<1.00
36	<1.00
37	<1.00
38	<1.00
39	<1.00
40	<1.00
41	<1.00
42	<1.00