



Nádia Bastos Salvador

ZEARALENONA EM CHÁS E PLANTAS MEDICINAIS DESTINADAS À PREPARAÇÃO DE INFUSÕES

Dissertação de Mestrado em Segurança Alimentar, orientada pela Professora Doutora Celeste de Matos Lino
e co-orientada pela Professora Doutora Sofia Cancela Duarte, e apresentada à
Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Junho 2018



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Nádia Bastos Salvador

ZEARALENONA EM CHÁS E PLANTAS MEDICINAIS DESTINADAS À PREPARAÇÃO DE INFUSÕES

Dissertação de Mestrado em Segurança Alimentar, orientada pela Professora Doutora Celeste de Matos Lino e co-orientada pela Professora Doutora Sofia Cancela Duarte e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Junho 2018



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer à minha orientadora, Professora Doutora Celeste de Matos Lino, por toda a disponibilidade, apoio e paciência com que me orientou durante todo o trabalho. Muito obrigada pela partilha de conhecimento e pelas valiosas contribuições para o trabalho.

Gostaria de agradecer também à minha co-orientadora, Professora Doutora Sofia Cancela Duarte por todo o tempo disponibilizado, paciência, apoio e incentivo. Foi muito importante todo o interesse e empenho que demonstrou, os esclarecimentos, os conhecimentos que partilhou e a motivação que me suscitou, muito obrigada.

Por fim, gostaria de agradecer à minha família que sempre me apoiou em todo o meu percurso académico e possibilitou a realização deste trabalho.

RESUMO

As micotoxinas são metabolitos secundários produzidos por espécies diferentes de fungos. As micotoxinas produzidas por fungos do género *Fusarium* são importantes, pois são agentes causadores de doenças em plantas, animais e humanos. A zearalenona (ZEA) é uma micotoxina produzida por *Fusarium spp.*, particularmente pela espécie *F. graminearum*. No Homem, a ZEA liga-se aos recetores estrogénicos (ER), competindo com o 17- β -estradiol. É por isso considerada um desregulador endócrino e produz efeitos hematológicos, citotóxicos, genotóxicos, imunotóxicos e hepatotóxicos.

O consumo de chá e as infusões de plantas medicinais tem vindo a aumentar, associado a estilos de vida e opções alimentares consideradas mais saudáveis. Contudo, são escassos os estudos que avaliam a ocorrência de contaminantes nestas matrizes alimentares.

Os objetivos do estudo foram a determinação da ocorrência de ZEA em chás e plantas medicinais comercializadas em Portugal e a exposição humana decorrente do seu consumo. Foram adquiridas 38 amostras de chás e plantas medicinais disponíveis comercialmente (amostras de conveniência), na região de Coimbra e Aveiro, e o teor de ZEA foi determinado por um kit ELISA competitivo.

Das amostras analisadas, 24 (63,16%) encontravam-se contaminadas com um teor de ZEA superior ao LOD (1,75 $\mu\text{g}/\text{kg}$). Os teores das amostras positivas variaram entre 1,82 $\mu\text{g}/\text{kg}$ e 19,02 $\mu\text{g}/\text{kg}$, com um valor médio de $8,93 \pm 5,20$ $\mu\text{g}/\text{kg}$. A ingestão diária estimada (EDI) de ZEA foi de 0,0227 $\mu\text{g}/\text{kg}$ p.c./dia. As amostras de plantas medicinais, biológicas, fora da União Europeia e vendidas a granel foram as que apresentaram os teores de ZEA mais elevados. No entanto, comparando com outros estudos em chás e plantas medicinais os valores são bastante inferiores. Apesar disso, devido ao aumento do consumo de infusões de chá e de plantas medicinais que tem ocorrido nos últimos anos e da tendência de crescimento do mesmo, estes valores poderão tornar-se significativos.

Palavras-chave: zearalenona, plantas medicinais, chá, ELISA.

ABSTRACT

Mycotoxins are secondary metabolites produced by different species of fungi. Mycotoxins produced by fungi of the genus *Fusarium* are important because they are agents that cause diseases in plants, animals and humans. Zearalenone (ZEA) is a mycotoxin produced by *Fusarium spp.*, particularly by the species *F. graminearum*. In humans, ZEA binds to estrogenic receptors (ER), competing with 17- β -estradiol. It is therefore considered an endocrine disruptor and produces haematological, cytotoxic, genotoxic, immunotoxic and hepatotoxic effects.

Tea and medicinal plants infusions consumption have been increasing, associated with healthier lifestyles and food choices. However, there are very few studies evaluating the occurrence of contaminants in these food matrices.

The objectives of the study were to determine the occurrence of ZEA in teas and medicinal plants marketed in Portugal and the human exposure due to its consumption.

Thirty-eight samples of commercially available teas and medicinal plants (convenience samples) were purchased in the region of Coimbra and Aveiro, and the ZEA content was determined by a competitive ELISA kit.

Of the samples analyzed, 24 (63.16%) were contaminated with a ZEA content higher than LOD (1.75 $\mu\text{g}/\text{kg}$). The contents of the positive samples ranged from 1.82 $\mu\text{g}/\text{kg}$ to 19.02 $\mu\text{g}/\text{kg}$, with a mean value of 8.93 ± 5.20 $\mu\text{g}/\text{kg}$. The estimated daily intake (EDI) of ZEA was 0.0227 $\mu\text{g}/\text{kg}$ b.w./day. Samples of medicinal and biological plants outside the European Union and sold in bulk were those with the highest ZEA levels. However, comparing with other studies in teas and medicinal plants the values are quite inferior. Despite this, due to the increasing consumption of tea and medicinal plants infusions that have occurred in the last years and the trend of growth of the same, these values could become significant.

Key-words: zearalenone, medicinal plants, tea, ELISA.

ÍNDICE

RESUMO	III
ABSTRACT	IV
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	VII
PARTE A – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	I
1. CHÁS E PLANTAS MEDICINAIS	2
2. MICOTOXINAS.....	4
2.1 Zearalenona	6
2.1.1 Características físico-químicas	6
2.1.2 Toxicocinética e toxicodinâmica	8
2.1.3 Efeitos fisiológicos e toxicidade	10
2.1.4 Legislação	13
2.1.4.1 Limites máximos	13
2.1.4.2 Ingestão diária tolerável.....	15
2.1.5 Ocorrência	15
2.1.6 Métodos de determinação	17
PARTE B – TRABALHO EXPERIMENTAL	23
1. OBJETIVOS E SIGNIFICADO DO ESTUDO	24
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	24
2.1 Amostras	24
2.2 Extração e Purificação	27
2.3 Determinação por ensaio imunoenzimático.....	27
2.4 Ingestão Diária Estimada (EDI)	28
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
3.1 Metodologia analítica	28
3.2 Determinação de ZEA em chás e plantas medicinais.....	29
3.3 Ingestão Diária Estimada	32
CONCLUSÕES.....	33
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	34

ÍNDICE DE TABELAS E FIGURAS

Tabela 1 - Ocorrência de matérias-primas contaminadas por ZEA.....	16
Tabela 2 - Características principais das metodologias aplicadas em métodos recentes de determinação da ZEA em plantas e medicamentos tradicionais chineses.....	22
Tabela 3 - Caracterização das amostras incluídas no estudo	25
Tabela 4 - Ocorrência e teores ($\mu\text{g}/\text{kg}$) obtidos nos diferentes tipos de amostras.....	31
Figura 1 - Zearalenona (a, ZEA) e seus metabolitos: b) α -zearalenol (α -ZOL); c) β -zearalenol (β -ZOL); d) zearalanona (ZAN); e) α -zearalanol (α -ZAL); f) β -zearalanol (β -ZAL)	8
Figura 2 - Principais vias metabólicas para a formação dos metabolitos da fase I e da fase II da ZEA.....	10

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

°C – Graus Celsius

AFs – Aflatoxinas

ASAE – Autoridade de Segurança Alimentar e Económica

aw – Water activity (atividade da água)

BA-ELISA – Ensaio imunoenzimático amplificado por biotina-avidina

BEA – Beauvericina

BSA – Albumina de soro bovino

CBI – Center for the Promotion of Imports (Centro para a Promoção de Importações)

Da – Dalton

dcELISA – ELISA competitivo direto convencional

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

DON – Deoxinivalenol

DP – Desvio padrão

EDI – Ingestão diária estimada

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

ELONA – Ensaio de oligonucleótidos ligado a enzimas

ENs – Eniantinas

ER – Recetores de estrogénio

ESI – Ionização eletro-pulverizada

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

FBs – Fumonisinias

FUA – Fusaproliferina

g – Gramas

GC-MS/MS – Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa

Glc – Glicose

GlcA – Ácido glucorónico

h – Horas

HFLPME – Microextração em fase líquida de fibra oca

HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Resolução

HPLC-FLD – Cromatografia líquida de alta eficiência com deteção de fluorescência

HSD – Hidroxi-esteróide desidrogenase

IAC – Coluna de imunoafinidade
IARC – International Agency for Research of Cancer (Agência Internacional de Pesquisa em Cancro)
ICA – Ensaio imunocromatográfico
ISSO – International Organization for Standardization (Organização Internacional de Normalização)
kg – Quilograma
LC – Cromatografia líquida
LC-MS – Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa
LC-MS/MS – Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa em tandem
LD – Letal dose (dose letal)
LM – Limite máximo
LOD – Limite de deteção
LOQ – Limite de quantificação
mAbs – Anticorpos monoclonais
MB-ELISA – ELISA baseado em esferas magnéticas
MBs – Esferas magnéticas
MDA – Malonildialdeído
mg/kg – Miligrama por quilograma
mL – Mililitros
MON – Moniliformina
n – Número de amostras
n.d – Não disponível
ng – Nanograma
NIV – Nivalenol
nm – Nanómetros
OD – Origem desconhecida
OTA – Ocratoxina A
PAHs – Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos
PDI – Ingestão Diária Provável
PLE – Extração líquida pressurizada
ppm – Partes por milhão
QuEChERS – Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe

RASFF – The Rapid Alert System for Food and Feed (Sistema de alerta rápido para alimentos e rações)

ssDNA – Single-Stranded DNA (DNA de cadeia simples)

Sulf – Sulfato

TCs – Tricotecenos

TDI – Ingestão diária tolerável

TLC – Cromatografia em Camada Fina

UE – União Europeia

UHPLC – Cromatografia líquida de ultra alta resolução

UHPLC-ESI-MS/MS – Cromatografia líquida de ultra eficiência associada à espectrometria de massa, com ionização por *electrospray*

UPLC – Cromatografia líquida de alta resolução

UV – Ultravioleta

vLOD – Limite visual de detecção

ZAN – Zearalanona

ZEA – Zearalenona

α -ZAL – α -zearalanol

α -ZEA – α -zearalenol

β -ZAL – β -zearalanol

β -ZEA – β -zearalenol

$\mu\text{g}/\text{kg}$ – Micrograma por quilograma

$\mu\text{g}/\text{kg p.c./dia}$ – Micrograma por quilograma de peso corporal por dia

μL – Microlitros

PARTE A – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

I. CHÁS E PLANTAS MEDICINAIS

O chá é um alimento de baixa humidade e estável no meio ambiente, portanto, microbiologicamente estável sob condições normais de armazenamento. O chá é derivado apenas das folhas tenras de variedades da espécie *Camellia sinensis*. O seu processamento distingue os vários tipos de chá existentes que são o chá preto, o chá *Oolong* e o chá verde. Existem outros tipos de chá também provenientes de *Camellia sinensis*, onde outras formas de processamento/tratamentos especiais podem ser usados, como o chá branco, o chá amarelo e o chá *Pu-Erh* (também conhecido como vermelho) (Tea & Herbal Infusions Europe, 2016).

O chá teve a sua origem na China e atualmente é uma das bebidas mais consumidas no mundo, além da água. A composição química do chá inclui polifenóis, alcalóides, aminoácidos, glúcidos, proteínas, compostos voláteis, sais minerais e micronutrientes. Os polifenóis são o grupo biologicamente mais ativo de componentes do chá porque possuem efeitos antioxidantes, antimutagénicos e anticarcinogénicos (Reto *et al.*, 2007).

Além do chá, existem as infusões de plantas medicinais e frutas que são partes de plantas que não são originárias da planta do chá (*Camellia sinensis*) e são destinadas para uso alimentar por fermentação com água recém-fervida, dando origem às infusões. Existem também misturas de plantas medicinais e frutas com chá como um componente menor. As plantas medicinais e frutas são alimentos com baixo teor de humidade e, portanto, são microbiologicamente estáveis sob condições de armazenamento normais (Tea & Herbal Infusions Europe, 2014).

A grande maioria do chá tem a sua produção no continente asiático. O principal produtor mundial de chá é a China. Em 2013, a produção chinesa de chá atingiu 1924 mil toneladas. O segundo maior produtor de chá mundial é a Índia. Além da China e da Índia, a Indonésia, o Quênia e o Sri Lanka encontram-se entre os países produtores de chá mais importantes (CBI Ministry of Foreign Affairs, 2017a; Tea & Herbal Infusions Europe, [s.d.]).

No que diz respeito à Europa, é praticamente inexistente a produção de folhas de chá. A produção de chá na Europa ocorre no sul do continente onde são produzidas quantidades muito pequenas. Por exemplo, Portugal produziu 76 toneladas em 2016. Portanto, a Europa depende das importações dos países produtores de chá para o consumo do mesmo (Silva, 2014).

Portugal é o único país europeu a produzir chá a nível industrial. Em Portugal, o chá é produzido por duas fábricas localizadas na ilha de São Miguel, nos Açores, uma de maior

escala, a Gorreana, e outra de menor escala, o Porto Formoso. É produzido maioritariamente chá preto, seguindo-se a produção de chá verde. Atualmente, o mercado encontra-se em expansão, apesar da produção se encontrar dependente das condições climáticas da ilha. Em média, a produção anual de chá na ilha de S. Miguel é de cerca de 50 toneladas (Silva, 2014).

Segundo dados da Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), Portugal terá exportado no ano 2013 um total de 134 toneladas de chá, apresentando um crescimento bastante significativo a partir de 2005, ano em que terão sido exportadas 30 toneladas de chá. Desde o ano de 2000 que a importação de chá em Portugal, apesar de ter sofrido bastantes oscilações, teve um aumento enorme, uma vez que em 2000 foram importadas 372 toneladas de chá e no ano de 2013 foram importadas 1382 toneladas (FAO, 2017).

Em Portugal o chá sempre foi visto como uma bebida mais direcionada para os idosos e pessoas doentes, contudo, a crescente consciencialização da população nas questões da saúde e bem-estar afetaram positivamente o consumo de chá, aumentando a sua procura. Muitos consumidores trocaram o café pelo chá por o considerarem moderno e a opção mais saudável. Os maiores importadores de chá do mundo são a Rússia, o Reino Unido e os Emirados Árabes Unidos, pois são países nos quais o consumo de chá já faz parte dos costumes culturais (Silva, 2014).

No que diz respeito ao consumo *per capita* de chá existem dados que indicam que, em 2016, a Turquia era o maior consumidor do mundo, com um consumo anual de quase 7 kg. Em contraste, a China tinha um consumo anual de 0,57 kg por pessoa. A seguir à Turquia a Irlanda, o Reino Unido, Marrocos e a Nova Zelândia são os maiores consumidores (Statista, 2016).

O chá já não é considerado uma bebida ultrapassada pelos jovens consumidores e ganhou popularidade, à medida que as suas perceções da bebida mudaram (Silva, 2014).

Com o aumento mundial do consumo de chá torna-se importante o controlo da sua qualidade e composição. No relatório anual mais recente do The Rapid Alert System for Food and Feed (RASFF), de 2016, constam variados alertas de micotoxinas em diferentes matérias-primas incluindo o chá e plantas medicinais. Além disso, as micotoxinas encontraram-se no *top 10* dos perigos em produtos alimentícios (European Commission - Health and Food Safety, 2017).

A composição química do chá finalizado depende tanto da composição química da matéria-prima da planta quanto do processamento do chá. O primeiro é determinado por fatores

ambientais, incluindo o método de cultivo, as condições atmosféricas e o período de colheita. Além disso, a poluição ambiental pode contribuir para a contaminação do chá com metais pesados, dioxinas, resíduos de pesticidas e hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAHs) (Zachara, Gałkowska e Juszcak, 2017).

A ocorrência de micotoxinas como aflatoxinas (AFs), ocratoxina A (OTA), zearalenona (ZEA) e vários tricotecenos (TCs) em produtos à base de plantas, como plantas medicinais/aromáticas, tem sido relatada em todo o mundo. A produção em campo, bem como a falta de higiene e controlo durante o armazenamento, processamento ou distribuição da matéria-prima deste tipo de produtos, pode levar ao crescimento de fungos e subsequente produção de micotoxinas (Santos *et al.*, 2013).

Várias pesquisas de fungos toxigénicos em plantas encontraram altos níveis de *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium spp.* Embora a presença de fungos possa não estar correlacionada com a presença de micotoxinas, há estudos de AFs, OTA e fumonisinas (FBs) em plantas medicinais e no chá (Trucksess e Scott, 2008).

2. MICOTOXINAS

As toxinas produzidas por fungos filamentosos são designadas por micotoxinas (Rocha *et al.*, 2014). Estas são estruturas orgânicas altamente diversas, caracterizadas por uma variedade de grupos funcionais contendo heteroátomos (Marroquín-Cardona *et al.*, 2014).

O termo "micotoxina" é geralmente reservado para compostos pequenos com cerca de 300-700 Da que são produzidos pré e pós-colheita como metabolitos secundários por várias espécies diferentes de fungos (Turner *et al.*, 2015), tais como *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* e *Alternaria*. São produzidas principalmente, embora não exclusivamente, quando o fungo atinge a maturidade (Ashiq, Hussain e Ahmad, 2014). Estudos revelaram a existência de pelo menos cerca de 400 micotoxinas diferentes (Rocha *et al.*, 2014).

As micotoxinas produzidas por fungos do género *Fusarium* são importantes, pois são agentes causadores de doenças em plantas, animais e humanos (An *et al.*, 2016). Quando ingeridas, inaladas ou absorvidas através da pele causam doenças ou morte em humanos e animais (Ashiq *et al.*, 2014).

Os fungos que produzem micotoxinas são aeróbios e podem colonizar diferentes tipos de produtos alimentares. Estas toxinas são bastantes resistentes a tratamentos térmicos, utilizados no processamento alimentar, como a cozedura ou a congelação (Marques, 2007).

Para além da sua notória toxicidade e estabilidade térmica, demonstram altos níveis de bioacumulação (Turner *et al.*, 2015).

São moléculas com estruturas que variam de anéis heterocíclicos simples, com pesos moleculares até 50 Da, até grupos com 6 e 8 anéis heterocíclicos dispostos irregularmente com um peso molecular total de mais de 500 Da e não apresentam imunogenicidade (Rocha *et al.*, 2014).

As micotoxinas podem afetar muitos órgãos e sistemas, principalmente o fígado, rins e sistema nervoso, endócrino e imunitário (Marques, 2007).

Existem seis micotoxinas, ou grupos de micotoxinas, que ocorrem com bastante frequência em alimentos: deoxinivalenol (DON), nivalenol (NIV), zearalenona (ZEA), fumonisinas (FBs), ocratoxina A (OTA) e aflatoxinas (AFs). A toxina T-2 encontra-se também numa grande variedade de grãos, mas a sua ocorrência, é menos frequente do que as seis micotoxinas anteriormente referidas (Marques, 2007).

Muitos desses potentes produtos químicos orgânicos podem ser encontrados em alimentos contaminados por fungos e podem ser prejudiciais se ingeridos em quantidades suficientemente altas ou durante um período de tempo suficientemente longo (Marroquín-Cardona *et al.*, 2014).

O consumo de alimentos contaminados por micotoxinas raramente origina toxicidade aguda. No entanto, efeitos crónicos graves foram demonstrados para várias delas (Anfossi, Giovannoli e Baggiani, 2016). Quando ingeridas, as micotoxinas podem causar episódios de doença aguda ou crónica, originando efeitos cancerígenos, mutagénicos, teratogénicos, estrogénicos, hemorrágicos, nefrotóxicos, hepatotóxicos, neurotóxicos e/ou imunossupressores (Pereira, Fernandes e Cunha, 2014).

As micotoxinas não são apenas difíceis de definir, também são difíceis de classificar. Devido às suas diversas estruturas químicas e origens biossintéticas, à sua diversidade de efeitos biológicos e a sua produção ocorrer num grande número de espécies de fungos, os esquemas de classificação tendem a refletir a experiência da pessoa que faz a categorização. Assim, as micotoxinas podem ser classificadas como hepatotoxinas, nefrotoxinas, neurotoxinas, imunotoxinas e assim por diante (Bennett e Klich, 2003).

Muitas micotoxinas foram incluídas pela International Agency for Research of Cancer (IARC, 1993) no grupo 2B, carcinogéneos possíveis para o Homem, como as FBs, a OTA e AF M1, enquanto as AFs B1, B2, G1 e G2 foram classificadas como comprovadamente carcinogénicas para o Homem, grupo I. Além disso, a AF B1 foi também classificada como o agente hepatocarcinogénico mais potente conhecido (Anfossi *et al.*, 2016). A ZEA, o DON, o

NIV e a toxina T-2 foram englobadas no grupo 3, o que significa que não são classificáveis quanto à sua carcinogenicidade para os seres humanos (IARC, 1993).

As micotoxicoses são exemplos de patologias causadas por micotoxinas e são análogas às patologias causadas pela exposição a pesticidas ou resíduos de metais pesados. A maioria das micotoxicoses resulta da ingestão de alimentos contaminados. Com exceção da terapia de suporte (por exemplo, dieta, hidratação), quase não há tratamentos para doenças causadas pela exposição a micotoxinas (Bennett e Klich, 2003).

A toxicidade dessas toxinas levou muitos países a estabelecer regulamentos rígidos para o seu controle nos alimentos destinados a humanos e a animais e o consequente estabelecimento de legislação para controlar a sua possível contaminação (Pereira *et al.*, 2014).

Tem sido observada em vários estudos uma ação protetora de antioxidantes, principalmente de origem natural, contra os efeitos tóxicos de várias micotoxinas. Essas propriedades protetoras provavelmente devem-se à sua capacidade de atuar sobre os radicais livres, protegendo assim o DNA, as proteínas celulares e os lipídios dos danos induzidos pelas micotoxinas. Várias substâncias naturais foram usadas pela sua capacidade de modular o stress oxidativo causado por micotoxinas, incluindo o ascorbato (vitamina C), tocoferol (vitamina E), carotenóides (vitamina A), os flavonóides, a curcumina, o chá verde, o licopeno, o ácido fítico, a L-carnitina e a melatonina (Silva, Bracarense e Oswald, 2018).

Nos últimos anos, o termo "micotoxinas emergentes" foi atribuído a toxinas para as quais pouco conhecimento estava disponível no passado, mas atualmente tem sido desenvolvida mais investigação para determinar as suas ocorrências e potenciais efeitos na saúde. As micotoxinas deste grupo incluem a fusaproliferina (FUS), a beauvericina (BEA), as eniانتinas (ENs) e a moniliformina (MON) (Marroquín-Cardona *et al.*, 2014).

Para além dos alimentos, também as especiarias usadas na sua preparação bem como as plantas, sejam medicinais ou não, se encontram contaminadas com micotoxinas (Freire *et al.*, 2007; Serra, 2005).

2.1 ZEARALENONA

2.1.1 CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS

A ZEA é uma lactona do ácido 6-[10-hidroxi-6-oxo-trans-1-undecenil]-β-resorcíclico (Figura 1a) produzida por várias espécies de *Fusarium spp.*, particularmente *F. graminearum* (teleomorfo *Gibberella zeae*) e também pelo *F. culmorum*, *F. equiseti* e *F. verticillioides* (Bennett

e Klich, 2003; EFSA, 2011). A sua fórmula empírica é $C_{18}H_{22}O_5$ e o seu peso molecular 318,147 (Marques, 2007).

Foi isolada pela primeira vez do milho infetado com *G. zeae* e a sua estrutura foi elucidada em 1966 (Zhang *et al.*, 2011).

A ZEA é uma substância cristalizável, branca. É solúvel em metanol, éter dietílico, benzeno, acetonitrilo, acetato de etilo e álcoois e insolúvel em dissulfureto de carbono e tetracloreto de carbono. O seu ponto de fusão é 164-165°C. Pode absorver a luz ultravioleta (UV) com comprimentos de onda de 314, 274 e 236 nm e sob luz UV, a 366 nm, emite uma fluorescência azul (Irnidayanti, 2012; Zhang *et al.*, 2011).

As solubilidades a 25°C, expressas em percentagem de peso, são: água, 0,002; n-hexano, 0,05; benzeno, 1,13; acetonitrilo, 8,6; diclorometano, 17,5; metanol, 18; etanol, 24; e acetona, 58 (IARC, 1993).

A ZEA é um composto estável que não se degrada a altas temperaturas. A sua estabilidade mantém-se quando é aquecida a 120°C. no entanto, ocorre decomposição de cerca de 29% quando submetida a 150°C, e da ordem dos 69% quando aquecida a 200°C, durante 60 min. É estável à hidrólise em soluções tampão neutras ou ácidas (IARC, 1993).

A sua estrutura química foi elucidada por Urry em 1966. É umas das micotoxinas melhor estudadas de entre as que são produzidas por *F. tricinctum*, *F. moniliforme*, *F. avenaceum*, *F. nivale*, *F. equiseti*, *F. graminearum*, *F. sambucinum*, *F. oxysporum* e *F. gibbosum*. Estes fungos sintetizam a ZEA em substratos ricos em glícidos (cereais), a temperaturas entre 12 e 25°C e $a_w > 0,90$ (Marques, 2007).

A ZEA é um composto estável e não se degrada mesmo a altas temperaturas, exibindo fluorescência sob luz UV (Zinedine e Ruiz, 2014), portanto, o processamento de matérias-primas na indústria alimentar não a elimina e a toxina permanece no produto final, como por exemplo, o pão (Kriszt *et al.*, 2012). Como é muito estável em alimentos mesmo durante o processamento térmico, também a sua ingestão não promove dano da sua molécula ativa (Li *et al.*, 2015).

Existem muitos microrganismos que são capazes de degradar as micotoxinas, por exemplo, as estirpes de *actinomicetos*, especialmente os *rhodococci* que são os melhores degradadores das aflatoxinas. Também foi mostrado que a ZEA pode ser eliminada por *Acinetobacter sp.* SM04 e por *Pseudomonas putida* ZEA-I (Kriszt *et al.*, 2012).

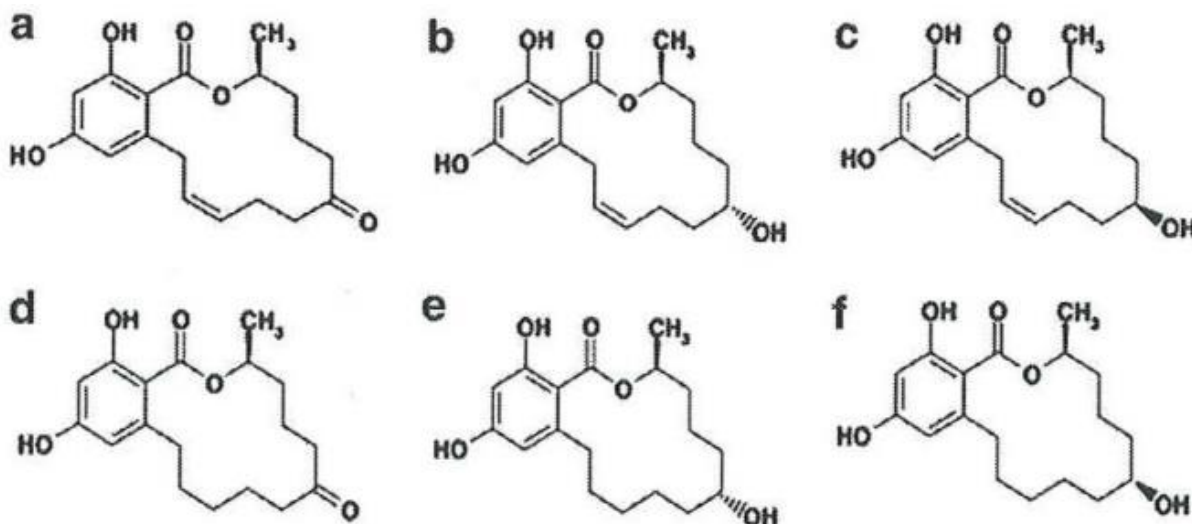


Figura 1- Zearalenona (a, ZEA) e seus metabolitos: b) α -zearalenol (α -ZOL); c) β -zearalenol (β -ZOL); d) zearalanona (ZAN); e) α -zearalanol (α -ZAL); f) β -zearalanol (β -ZAL) (adaptado de Minervini e Aquila, 2008).

2.1.2 TOXICOCINÉTICA E TOXICODINÂMICA

No Homem, a ZEA liga-se aos recetores estrogénicos (ER), competindo com o 17- β -estradiol. Em crianças expostas a leites contaminados com 160 ng/mL de ZEA verifica-se um desenvolvimento sexual precoce. O α -zearalenol possui efeitos estrogénicos 10 vezes superiores aos da ZEA. Tanto este metabolito como outros (α e β -zearalanol) foram utilizados como promotores de crescimento em animais devido precisamente aos seus efeitos estrogénicos e anabolizantes. No entanto demonstrou-se que, para além disso, estes derivados têm efeitos carcinogénicos, razão pela qual o seu uso está proibido em todos os países da União Europeia (UE) (Marques, 2007).

A ZEA não tem uma estrutura química como os esteróides, mas tem uma potente atividade luteotrófica em alguns animais (Irnidayanti, 2012).

Foi demonstrado que *in vitro* (Kriszt *et al.*, 2012) os metabolitos da ZEA se ligam competitivamente aos recetores de estrogénio (ER- α e ER- β) devido à sua semelhança estrutural com a hormona sexual 17- β estradiol (Zinedine e Ruiz, 2014).

In vivo, a ZEA é rapidamente absorvida após administração oral e metabolizada em metabolitos principais, α -zearalenol (α -ZOL) e β -zearalenol (β -ZOL), que também são ligantes do ER (Kriszt *et al.*, 2012).

A ZEA é reduzida, principalmente a α -ZOL (baixo ponto de fusão, 168 a 169°C) e, em menor quantidade a β -ZOL (ponto de fusão elevado, 174 a 176°C) (Bottalico *et al.*, 1985), que são então decompostos em α -zearalanol (α -ZAL) e β -zearalanol (β -ZAL). A hidroxila-

esteróide desidrogenase (HSD) desempenha um papel fundamental nessas transformações (Gadzała-Kopciuch *et al.*, 2011) pois, é metabolizada através de duas vias nos hepatócitos e células, nomeadamente a conjugação com ácido glucurónico e a redução a α e β -ZOL por ação da 3 α (β)-hidroxi-esteróide desidrogenase (Minervini *et al.*, 2006). Como a ZEA tem uma estrutura muito semelhante ao estradiol, torna-se um substrato para a 3 α -HSD e a 3 β -HSD. É metabolizada a α -ZOL com o envolvimento de 3 α -HSD e a β -ZOL com o envolvimento de 3 β -HSD (Gadzała-Kopciuch *et al.*, 2011).

Estas reações mostram semelhanças com processos no metabolismo de esteróides porque as HSDs catalisam reações de oxidação/redução na síntese e inativação de hormonas esteróides (Minervini *et al.*, 2006).

O metabolito α -ZOL (naturalmente presente em culturas de *Fusarium* e na alimentação animal) (Bottalico *et al.*, 1985) apresenta uma maior estrogénicidade que a ZEA, pelo que o β -ZOL se apresentou menos eficaz no teste de proliferação do MCF-7 (*cell proliferation assay of estrogenic activity*). A ZEA e os seus metabolitos mostram propriedades estrogénicas similares, com exceção do α -ZOL, que induz maior atividade estrogénica (Kriszt *et al.*, 2012). As formas modificadas de ZEA são metabolitos fase I e fase II. Os metabolitos da fase I são formados principalmente por meio da redução. Os metabolitos da fase II são formados pela conjugação de ZEA e seus metabolitos de fase I com glicose ou sulfato e, nos animais, pelo ácido glucurónico (Figura 2). De acordo com estudos *in vitro* e *in vivo*, as formas conjugadas da ZEA podem ser hidrolisadas no trato gastrointestinal de mamíferos, principalmente como uma biotransformação microbiana que ocorre no intestino. Mais estudos são necessários para determinar a biodisponibilidade de formas modificadas de ZEA, em particular, metabolitos de fase II de origem vegetal e fúngica (EFSA, 2016a).

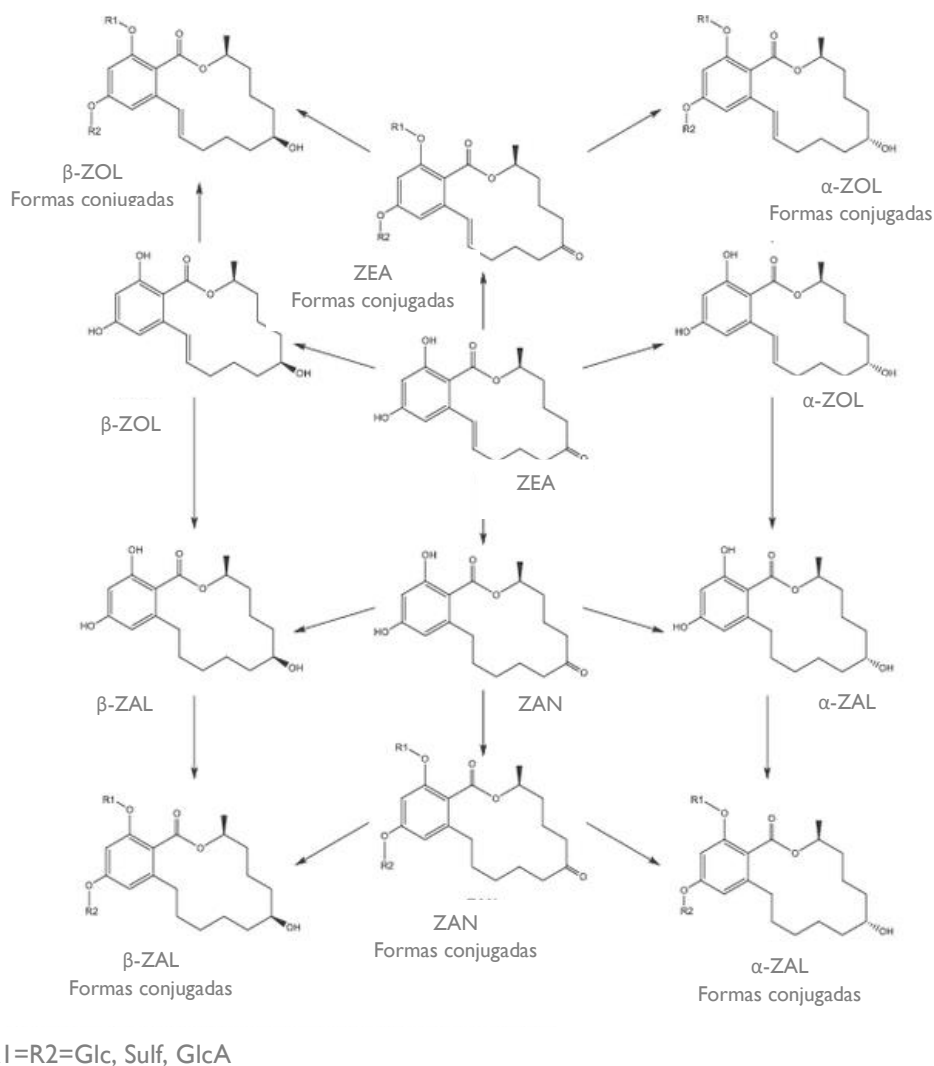


Figura 2 - Principais vias metabólicas para a formação dos metabolitos da fase I e da fase II da ZEA (adaptado de EFSA, 2016a).

As formas modificadas da ZEA foram descritas principalmente em alimentos de origem vegetal, devido à biotransformação realizada por plantas e/ou fungos. Como as vias de biotransformação são frequentemente similares em plantas, fungos e até mesmo em mamíferos, vários compostos podem resultar de múltiplas vias (EFSA, 2016a).

2.1.3 EFEITOS FISIOLÓGICOS E TOXICIDADE

A ZEA é uma micotoxina não esteróide que pode sofrer metabolização em fungos, plantas e mamíferos. A ZEA e os seus metabolitos representam um sério perigo para a saúde animal e humana (Zinedine e Ruiz, 2014). Devido à sua potente atividade estrogénica a ZEA foi assinalada como um fitoestrogénio, um micoestrogénio e um promotor de crescimento (Bennett e Klich, 2003).

A contaminação dos alimentos destinados a humanos e animais com ZEA constitui um perigo para a saúde humana e animal. Esta micotoxina pode ser rapidamente absorvida após a administração oral e é metabolizada originando principalmente α e β -zearalenol (α e β -ZOL) (Kong *et al.*, 2013).

Além disso, a ZEA produz efeitos hematológicos, citotóxicos, genotóxicos, imunotóxicos e hepatotóxicos (Zinedine e Ruiz, 2014) que não estão relacionados com a sua afinidade de ligação a recetores de estrogénio (Liu *et al.*, 2014).

Também foi reportado que a ZEA facilita a carcinogénese, a toxicidade reprodutiva e a imunidade por supressão. A maioria das atividades biológicas da ZEA são atribuídas ao efeito agonista nos recetores de estrogénio, apesar de existirem outras reações biológicas que não podem ser explicadas pela sua atividade estrogénica (Chatopadhyay e Pandey, 2012).

Os efeitos tóxicos da ZEA podem ser induzidos por mecanismos que não estão associados à sua atividade estrogénica. A ZEA afeta a integridade do DNA e das mitocôndrias, diminui a proliferação celular e modula a resposta inflamatória (Silva *et al.*, 2018).

A ZEA e os seus metabolitos (Figura 1) demonstram atividade genotóxica que resulta em ruturas de replicação do DNA, aberrações cromossómicas (alterações na estrutura ou número de cromossomas), alterações nos cromátídeos irmãos (ruturas durante a divisão meiótica ou mitótica dos cromátídeos separados que dão origem a novos cromossomas), indução da fragmentação do DNA (deleção, inversão, duplicação, translocação), pausa no ciclo celular, inibição da síntese de proteínas e DNA e apoptose (Gadzała-Kopciuch *et al.*, 2011).

A ZEA visa principalmente o sistema reprodutivo porque tem fraca atividade de estrogénio. Aparentemente, tem cerca de 20 vezes menor ligação ao recetor de estrogénio do que o estrogénio endógeno estradiol (Li *et al.*, 2015).

Pode causar problemas reprodutivos em animais como gado, suínos e aves de capoeira, e possivelmente em seres humanos (Selvaraj *et al.*, 2015).

Os seus efeitos adversos podem ser ainda mais acentuados durante a gestação, uma vez que os fetos são suscetíveis a toxinas devido ao seu frágil estado de desenvolvimento e ao mecanismo de defesa inadequado. Muitos estudos demonstraram que a ZEA pode alterar o ambiente intra-uterino durante a gestação precoce, afetando o mecanismo secretor do endométrio. Foi demonstrado que a exposição à ZEA durante a gestação precoce afetou a capacidade reprodutiva materna e o atraso no desenvolvimento fetal. Da mesma forma, muitos estudos mostraram que afeta a fecundidade, e os efeitos podem transferir-se da placenta para o feto (Liu *et al.*, 2014).

De todas as espécies animais, os suínos são a espécie mais sensível, seguida pelos ruminantes. As aves são as espécies mais resistentes. No que diz respeito às espécies equinas, os efeitos da ZEA foram apenas demonstrados em alguns casos. Um surto de micotoxicoses provocadas pela ZEA em cavalos foi associado à ingestão de milho contendo aproximadamente 2,6 mg/kg de ZEA (Minervini *et al.*, 2006). Os teores de micotoxinas nos alimentos para peixes raramente foram investigados, mas dados recentes mostram que a ZEA é altamente prevalente em ingredientes e rações usadas em aquicultura (Pietsch *et al.*, 2015).

Geralmente, as marrãs são as espécies mais sensíveis à exposição da ZEA. As fêmeas pré-púberes reagem de forma mais sensível. Os sintomas típicos da toxicose por ZEA em marrãs e porcas são vermelhidão, hiperemia e inchaço edematoso da vulva, aumento do útero com a formação de quistos nos ovários e aumento das glândulas mamárias (Binder *et al.*, 2017).

Nos suínos, ratos e galinhas, a ZEA é metabolizada a α e β -zearalenol, sendo que a ligação do α -zearalenol aos recetores estrogénicos é 10 a 20 vezes mais forte que a ZEA e a do β -zearalenol 100 vezes mais forte (Popiel *et al.*, 2014).

Foi demonstrado que a ZEA atravessa facilmente a barreira intestinal e é rapidamente absorvida pelos enterócitos. Embora as reações de biotransformação xenobiótica ocorram principalmente no fígado, o intestino também pode contribuir para a biotransformação geral. Além disso, surgiram vários estudos que evidenciam os seus efeitos sobre o stress oxidativo demonstrando que a ZEA induz a peroxidação lipídica no fígado, baço, rins e testículos (Liu *et al.*, 2014).

Estudos *in vivo* e *in vitro* mostraram que a ZEA aumenta os níveis de malonildialdeído (MDA), marcador de stress oxidativo, devido à modulação dos mecanismos antioxidantes intracelulares (Silva, Bracarense e Oswald, 2018).

A ZEA manifesta a sua atividade fisiológica ao ligar-se ao recetor citosólico proteico, sendo translocada do complexo recetor de estrogénios para o núcleo, de forma análoga às hormonas esteróides. Possui uma grande afinidade para os recetores de estrogénios citoplasmáticos. Marasas e seus colaboradores, em 1979, caracterizaram esta micotoxina como um composto tóxico não-agudo (LD 50 > 2,000-20,000 mg/kg peso vivo) (Marques, 2007).

Os efeitos tóxicos da ZEA foram amplamente estudados por métodos *in vitro* e *in vivo*. Mas pouca evidência conclusiva está disponível sobre os efeitos da ZEA em seres humanos. Contudo, a presença simultânea e não individual de micotoxinas em produtos destinados ao consumo humano é mais importante. Assim, é importante estabelecer se as micotoxinas

interagem umas com as outras quando ocorrem conjuntamente e, se sua interação pode aumentar seus respectivos efeitos tóxicos (Zinedine e Ruiz, 2014).

A ZEA no desempenho reprodutivo foi investigada principalmente em animais fêmeas, particularmente bovinos e suínos, enquanto relativamente poucos estudos examinaram a influência da ZEA na função reprodutiva masculina. Em contraste com os suínos e ruminantes, acredita-se que os cavalos sejam relativamente insensíveis aos efeitos da ZEA na função reprodutiva. Um conjunto significativo de evidências experimentais demonstrou que as hormonas esteróides podem influenciar a função reprodutiva via os recetores de membrana plasmática e, assim, exercer os seus efeitos através de vias não genómicas (Filannino *et al.*, 2011).

Vários estudos demonstram que concentrações de ZEA tão baixas quanto 1,0 ppm, veiculadas pela alimentação, podem levar a síndromes hiperestrogénicas em suínos. Concentrações mais elevadas podem provocar aborto e outros problemas. A forma reduzida da ZEA, zearalenol, aumentou a atividade estrogénica. A ZEA também tem sido usada para tratar sintomas pós-menopáusicos em mulheres, e tanto o zearalenol como a ZEA foram patenteados como contraceptivos orais (Bennett e Klich, 2003).

A potência biológica da ZEA e dos seus metabolitos é alta, mas a toxicidade real é baixa. A dose letal de 50% em ratos fêmea é superior a 10000 mg/kg e em porquinhos-da-índia fêmea é de 5000 mg/kg, enquanto que apenas 1 µg/kg pode criar uma resposta luteogénica detetável em suínos fêmea (Bennett e Klich, 2003).

A eliminação dos níveis excessivos de ZEA e seus metabolitos ocorre principalmente através da urina e da bÍlis (Gadzała-Kopciuch *et al.*, 2011).

2.1.4 LEGISLAÇÃO

2.1.4.1 LIMITES MÁXIMOS

Para as AFs, OTA, DON, ZEA e FBs, existem limites legais estabelecidos pela legislação europeia numa variedade de itens alimentares. No entanto, no caso de especiarias e ervas, existe apenas legislação oficial para contaminação por AFs e OTA (European Commission, 2010; Tripathy *et al.*, 2015).

A proteção dos consumidores também é assegurada através da manutenção dos níveis de micotoxinas tão baixos quanto razoavelmente alcançados na sequência de boas práticas agrícolas, de armazenamento e de processamento. As micotoxinas e as matérias-primas

regulamentadas, e os limites máximos variam significativamente em diferentes países (Anfossi *et al.*, 2016).

Os Limites Máximos (LMs) estabelecidos na União Europeia (UE) para a ZEA em alimentos destinados à alimentação humana são 20 µg/kg para alimentos transformados à base de milho para lactentes e crianças jovens e alimentos à base de cereais; 50 µg/kg para pão (incluindo pequenos produtos de panificação), produtos de pastelaria, bolachas, refeições leves à base de cereais e cereais para pequeno-almoço, com exceção de refeições leves à base de milho e cereais para pequeno-almoço à base de milho; 75 µg/kg para cereais destinados ao consumo humano direto, farinha, sêmola e gérmen de cereais, enquanto produto final comercializado para consumo humano direto; 100 µg/kg de milho destinado ao consumo humano direto, refeições leves à base de milho e cereais para pequeno-almoço à base de milho; 350 µg/kg de milho não transformado e 400 µg/kg para óleo de milho refinado (*Regulamento (CE) N° 1126/2007*).

Para matérias-primas usadas em alimentação animal, o LM é de 2 mg/kg para cereais e produtos derivados de cereais e 3 mg/kg para subprodutos do milho. Em relação aos alimentos complementares e completos, o LM é de 0,1 mg/kg para leitões e marrãs, 0,25 mg/kg para porcas e suínos de engorda e 0,5 mg/kg para vitelos, vacas leiteiras, ovelhas (incluindo borregos) e cabras (incluindo cabritos) (*Recomendação da Comissão, de 17 de Agosto de 2006*).

A alimentação dos animais de companhia também se tornou uma preocupação e, em 2016, foi publicada uma recomendação da UE que estabeleceu limites para a ZEA. Para matérias-primas destinadas à alimentação animal - cereais e produtos à base de cereais com exceção dos subprodutos do milho (3 mg/kg) o valor de orientação de alimento para animais para um teor de humidade de 12% é de 2 mg/kg, alimentos compostos para leitões, marrãs, cachorros, gatinhos, cães e gatos para reprodução o valor é 0,1 mg/kg e alimentos compostos para cães e gatos adultos, exceto para reprodução o valor é 0,2 mg/kg (*Recomendação (UE) 2016/1319 da Comissão de 29 de Julho de 2016*).

A Food and Drug Administration (FDA) não estabelece diretrizes regulatórias para esta micotoxina (Smith *et al.*, 2016).

2.1.4.2 INGESTÃO DIÁRIA TOLERÁVEL

A Autoridade de Segurança Alimentar Europeia (EFSA, 2011) publicou uma opinião científica sobre os riscos para a saúde pública da ZEA, tendo estabelecido uma ingestão diária tolerável (TDI) de 0,25 µg/kg peso corporal/dia com base nos dados mais recentes obtidos em suínos, mas tomando também em consideração as comparações entre suínos e humanos.

2.1.5 OCORRÊNCIA

A ZEA ocorre predominantemente em culturas de cereais, bem como produtos relacionados, como milho, trigo, aveia, cevada, géneros alimentícios e alimentos para animais (Zhang *et al.*, 2011). Enquanto a ZEA é principalmente um contaminante de campo, a produção de toxina também pode ocorrer em condições de armazenamento precárias (EFSA, 2011).

A contaminação por ZEA em alimentos e ração animal representa um alto risco para a saúde humana e animal. Esta micotoxina pode ser rapidamente absorvida após a administração oral e transformada principalmente em dois metabolitos, α -ZOL e β -ZOL (Zhang *et al.*, 2011).

Também é importante enfatizar que a humidade relativa do ar, o teor de humidade dos grãos, alta temperatura, luz e danos mecânicos levam à produção de toxinas por fungos micotoxigénicos presentes nos alimentos nos locais de armazenagem e *stock* (Cover *et al.*, 2010).

A sua ocorrência geográfica mais prevalente é nas regiões temperadas do norte (Europa, América e Ásia) (Santos *et al.*, 2009).

O DON e a ZEA são as principais micotoxinas formadas em silagem. O seu conteúdo é reduzido pela atividade de algumas lactobactérias na silagem. Alguns estudos indicaram que a alta matéria seca na ensilagem, bem como o armazenamento reduzido, poderiam ser uma maneira prática de reduzir ou eliminar algumas toxinas de *Fusarium* em silagens contaminadas (Jovaišiene *et al.*, 2017)

Foi realizado um estudo em Portugal, com um total de 87 amostras (69 amostras de quatro tipos diferentes de plantas e 18 amostras de chá preto) compradas em supermercados e analisadas por cromatografia líquida (LC) por deteção para fumonisinas B1 (FB1) e B2 (FB2). Cinquenta e cinco amostras encontravam-se contaminadas com FB1, 16 amostras de chá preto e 39 de plantas medicinais com níveis a variar entre 80 a 280 µg/kg e de 20 a 700

$\mu\text{g/kg}$ FBI, respetivamente (Trucksess e Scott, 2008). Contrastando com estes teores, os cereais como o milho apresentam níveis de ZEA manifestamente superiores (Tabela I).

Tabela I - Ocorrência de matérias-primas contaminadas por ZEA

País	Matéria-prima	N° Amostras positivas/total	Teores ($\mu\text{g/kg}$)		Bibliografia
			Min-Máx	Média	
Espanha	Alcachofra	2/2	7,8	-	(Santos et al., 2009)
	Raiz de bardana	2/2	10,9	-	
	Lúcia-lima	2/2	14	-	
	Chá vermelho	2/2	11,2	-	
	Estrela-de-anis	2/2	10,1	-	
	Chá branco	2/2	11,2	-	
China	Plantas Medicinais	12/12	5,3-295,8	150,55	(Kong et al., 2013)
	Lágrima de Nossa Senhora	-	119,6	-	
	Lágrima de Nossa Senhora	1/1	211,4	-	(Zhang et al., 2011)
Índia	Medicamentos fitoterápicos	-	110,0	-	(Ashiq et al., 2014)
Canadá	Milho	23/81	10-500	-	
USA	Milho	3/3	900-7800	-	
Brasil	Milho	16/328	260-9800	-	
Áustria	Milho	3/6	420-1000	-	(IARC, 1993)
Polónia	Milho	5/5	700-350000	-	
Argentina	Trigo	20/20	-	10	
	Cevada	13/20	-	5	
Itália	Pimentão doce fresco	7/7	-	0,23	(Gambacorta et al., 2017)

Poucos estudos têm sido desenvolvidos com a finalidade de avaliar o teor de ZEA em chás e plantas medicinais, como se evidencia na Tabela 1.

Da revisão efetuada constatou-se que os teores de ZEA encontrados em chás (branco e vermelho) e em plantas medicinais oriundos de Espanha são baixos, oscilando entre 7,8 e 11,2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (Santos *et al.*, 2009), enquanto na China as plantas medicinais apresentam teores 5,3 e 295,8 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (Kong *et al.*, 2013). Quanto à frequência de detecção esta foi de 100% em Espanha e na China.

2.1.6 MÉTODOS DE DETERMINAÇÃO

As micotoxinas encontram-se nos alimentos em concentrações que requerem métodos analíticos sensíveis e confiáveis para sua detecção. Devido à variedade de estruturas químicas destes compostos, não é possível usar um método padrão para detetar todas as micotoxinas. Os métodos de extração e purificação devem ser confiáveis e são vitais para o sucesso da análise. Eles despendem a maior parcela do tempo total da análise e são dependentes da matriz e da estrutura da toxina (Iamanaka, Oliveira e Taniwaki, 2013).

A extração da ZEA presente nas matérias primas é efetuada recorrendo a solventes orgânicos, sendo a mistura metanol-água 80:20 (v/v) a mais usualmente utilizada (Tabela 2).

O estabelecimento de procedimentos analíticos eficientes, que gerem o mínimo de resíduos, tem sido um desafio constante para a análise de contaminantes. Tendo em conta essa dificuldade, foi criado um procedimento para extração de agrotóxicos denominado QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe), que se caracteriza pela extração rápida, confiável, fácil, económica, robusta e segura de analitos a partir de matrizes complexas (Heidtmann-Bemvenuti *et al.*, 2012). Alguns investigadores recorrem ao QuEChERS para extrair e purificar extratos contendo ZEA (Berthiller *et al.*, 2018; González-Sálamo *et al.*, 2017).

A purificação com colunas de imunoafinidade (IACs) é um dos processos mais usados (Tabela 2) (Marques, 2007; Wang *et al.*, 2013). As IACs fornecem uma série de vantagens sobre os métodos convencionais de extração, como a alta especificidade do anticorpo para o analito, o rápido processo de purificação e a redução efetiva de solventes tóxicos, portanto, tem um bom desempenho na extração do analito alvo (Tang *et al.*, 2014).

Um método para a determinação da ZEA no milho foi desenvolvido aplicando extração líquida pressurizada (PLE) e usando solventes orgânicos ambientalmente aceitáveis e menos nocivos. Os extratos foram analisados por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa (LC-MS), equipada com uma interface de ionização eletro-pulverizada (ESI). A

mistura de extração otimizada foi isopropanol e uma solução aquosa de trietilamina (1%) 50:50 (v/v), que permitiu reduzir a metade o uso de solvente orgânico em comparação com o método proposto pela ISO (International Organization for Standardization). Ao aplicar o método otimizado a cinco amostras de milho naturalmente contaminadas, as concentrações obtidas foram ligeiramente aumentadas em comparação com a análise anteriormente utilizada em que o solvente usado consistiu numa mistura de acetonitrilo-metanol (Pallaroni e Holst, 2004).

Outro método para a determinação de compostos estrogénicos em amostras de leite e iogurte utilizou a microextração em fase líquida de fibra oca (HFLPME) e deteção e quantificação por GC-MS/MS. Além de quatro hormonas sexuais, dois exoestrogénios, dois estrogénios sintéticos, também a ZEA, α -ZOL, β -ZOL, α -ZAL e β -ZAL foram incluídos no método (Berthiller *et al.*, 2018).

Os métodos analíticos para micotoxinas incluem técnicas baseadas em ensaios imunoquímicos que se aplicam principalmente para controlos rotineiros e rápidos, deteção no local e técnicas baseadas em cromatografia que proporcionam determinação sensível, precisa e seletiva de micotoxinas conhecidas, além de identificação de compostos novos ou modificados, através de detetores de massa em tandem (Anfossi *et al.*, 2016).

As crescentes demandas para a deteção altamente sensível de micotoxinas em amostras de alimentos levaram ao desenvolvimento de muitos métodos analíticos tradicionais. Estes métodos são Cromatografia em Camada Fina (TLC), Cromatografia Líquida de Alta Resolução (HPLC) com deteção de fluorescência ou por massa, Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massa (GC-MS), ensaios imunoenzimáticos (ELISA), radioimunoensaios e imunoensaio fluorescente (Tabela 2) (Marques, 2007; Wang *et al.*, 2013).

Alguns investigadores efetuam a quantificação de compostos estrogénicos recorrendo à UHPLC-ESI-MS/MS incluindo a ZEA e os seus metabolitos (α -ZOL, β -ZOL, ZAN, α -ZAL e β -ZAL), em produtos lácteos. Estes foram extraídos usando QuEChERS (González-Sálamo *et al.*, 2017).

Devido à simplicidade e baixo custo associados à sensibilidade e seletividade, os imunoensaios são de preferência usados para os estudos de triagem e levantamento de primeiro nível sobre a contaminação por micotoxinas. Os kits baseados em ELISA estão comercialmente disponíveis para todas as micotoxinas reguladas e fornecem a ferramenta analítica mais utilizada para garantir a segurança alimentar através da cadeia alimentar (Anfossi *et al.*, 2016).

Os métodos de detecção imunológica variam de imunoenensaio de fluxo lateral simples e ELISA para imunossensores altamente sofisticados. Deve-se notar que, tendo em conta o tamanho da maioria das toxinas, elas requerem frequentemente a conjugação de uma proteína (muitas vezes albumina de soro bovino-BSA) para a criação de anticorpos (Meulenberg, 2012; Turner *et al.*, 2015).

O ELISA é um dos métodos mais populares para a triagem de amostras contendo ZEA. No entanto, o ELISA tradicional com detecção colorimétrica possui baixa sensibilidade e requer pré-tratamento redundante para enriquecer e purificar a ZEA de amostras complexas (Zhan *et al.*, 2016).

O ELISA é um método analítico confiável, sensível, rápido e simples e amplamente aplicado na segurança alimentar. Existem muitos formatos do ELISA, como o método do anticorpo monoclonal duplo, método indireto e método competitivo. O método do anticorpo monoclonal duplo e o método indireto são aplicados principalmente no diagnóstico clínico. O método competitivo é aplicado principalmente no exame de segurança alimentar. O ELISA competitivo é classificado em duas categorias de acordo com o princípio de funcionamento: ELISA competitivo direto e ELISA competitivo indireto. A principal desvantagem do ELISA tradicional é que a sensibilidade é baixa (Huang *et al.*, 2014).

Devido à abundante contaminação por micotoxinas e à complexidade da matriz das plantas e especiarias, continuam a ser desenvolvidos novos métodos e realizadas novas pesquisas. Seguindo a necessidade do mercado, dois tipos distintos de métodos de análise de multi-micotoxinas continuam a emergir em lados opostos do espectro analítico, métodos altamente seletivos de espectrometria de massa em tandem por cromatografia líquida (LC-MS/MS) mais demorados e dispendiosos e métodos de seleção ELISA mais rápidos e menos dispendiosos. Um método altamente seletivo para detectar e quantificar multi-micotoxinas foi desenvolvido utilizando LC-MS/MS no modo íon positivo e negativo para a detecção de AFs, OTA e ZEA em pó de pimenta vermelha recorrendo à extração e purificação de amostras com QuEChERS. Este método de LC-MS/MS foi comparado com um método ELISA através da análise de 56 amostras de pimenta vermelha da Coreia do Sul e os resultados de ambos os métodos demonstraram consistência (Berthiller *et al.*, 2018).

Nos últimos anos, os imunossensores amperométricos livres de etiquetas foram amplamente utilizados, pois os ensaios são mais convenientes, rápidos e de baixo custo (Selvaraj *et al.*, 2015).

Um ensaio imunocromatográfico (ICA) multi-componente competitivo que oferece detecção simultânea e sensível de AFBI, OTA e ZEA foi também desenvolvido. Três antigénios das

micotoxinas foram imobilizados como linhas de teste, permitindo que a detecção de múltiplos analitos fosse realizada em uma única tira de teste em 20 minutos sem qualquer instrumento dispendioso. O tampão de bloqueio e as quantidades de antígenos e anticorpos monoclonais (mAbs) foram otimizados. Os limites visuais de detecção (vLODs) desta faixa otimizada foram 0,25 ng/mL, 0,5 ng/mL e 1 ng/mL para a AFB I, OTA e ZEA, respectivamente (Li *et al.*, 2013). Atualmente, os analitos de baixo peso molecular (livres e conjugados) são amplamente utilizados em ensaios quantitativos cromatográficos e imunológicos para detectar micotoxinas em produtos agrícolas para produção de alimentos e rações. No entanto, alguns analitos de baixo peso molecular são bastante tóxicos (como pesticidas e micotoxinas), e o uso de um analito e/ou conjugado num ensaio pode ser prejudicial para o operador e/ou o ambiente. Para melhorar os métodos analíticos, foram desenvolvidos anticorpos anti-idiotípicos e peptídeos representados por fagos para imitar epítopos antigénicos nas superfícies dos analitos (Wang *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2015).

A evolução sistémica da tecnologia de ligantes por enriquecimento exponencial (SELEX) foi desenvolvida na década de 1990 para gerar sequências de ácido nucleico altamente específicas (aptâmeros) com alta afinidade para diversos ligantes. Um imunoensaio hipotóxico para detectar ZEA foi desenvolvido usando um aptâmero de ssDNA para substituir a conjugação de ZEA, evitando assim a exposição ambiental e do operador à toxina. Múltiplos analitos de baixo peso molecular podem ser analisados simultaneamente usando aptâmeros e um ensaio de oligonucleotídeos ligados a enzimas (ELONA), o que oferece várias vantagens sobre outros métodos, como alta sensibilidade, rapidez e segurança (Wang *et al.*, 2015).

Um método de ensaio imunoenzimático amplificado por biotina-avidina (BA-ELISA) foi desenvolvido para detectar resíduos de ZEA em milho. A concentração de antígeno de revestimento, anticorpo monoclonal biotinilado específico para ZEA, avidina-peroxidase de rábano silvestre e o tempo de reação no sistema de BA-ELISA foram otimizados. A avidina, uma glicoproteína abundantemente disponível a partir de clara de ovo, tem uma afinidade extremamente alta para a biotina. As moléculas de biotina podem ser acopladas a anticorpos e a avidina pode ser covalentemente conjugada com várias enzimas. A biotina ligada a um anticorpo ainda está disponível para interação com avidina. Uma vez que a avidina tem quatro locais de ligação para a biotina e várias moléculas de biotina podem ser ligadas a uma determinada molécula de anticorpo, o anticorpo biotinilado pode ligar-se a mais do que uma molécula de avidina. Estas duas propriedades fundamentais do complexo indicam um potencial de amplificação da detecção de antígeno quando incorporado em imunoenaios. Em

comparação com o ELISA tradicional, o BA-ELISA mostrou boa sensibilidade e o seu uso foi simples (Huang *et al.*, 2014).

No entanto, é difícil preparar amostras de ELISA, porque a complexa matriz de amostras, especialmente com respeito a produtos agrícolas, poderia afetar negativamente a precisão do método. A ZEA é uma molécula pequena e é frequentemente encontrada em quantidades reduzidas. A matriz complexa do milho pode afetar a determinação da ZEA. Portanto, uma purificação altamente confiável e específica é necessária para simplificar a preparação da amostra e melhorar a eficiência da recuperação. Como método de purificação, as IACs podem ser conduzidas numa fase estacionária que consiste num anticorpo conjugado a uma matriz sólida, assim como um antigénio numa fase móvel (Tang *et al.*, 2014).

Como alternativa ao ELISA tradicional surgiu o ELISA baseado em esferas magnéticas (MB-ELISA). As esferas magnéticas (MBs) são sempre selecionadas como uma fase imóvel para evitar o revestimento anterior, bloquear e reduzir o tempo de incubação. Portanto, o MB-ELISA que combina a tecnologia de esferas magnéticas com o ELISA não tem apenas a vantagem de possuir alto rendimento, mas também de reduzir o tempo de deteção. Recentemente, foi relatado um imunoensaio baseado em MBs para o rastreio de ZEA em cereais e rações. No entanto, este imunoensaio foi um ELISA competitivo indireto e necessita de 90 minutos para os passos de incubação. Assim, o procedimento mostrou não ser tão vantajoso comparado com o ELISA convencional (Zhang *et al.*, 2015).

Zhao *et al.* (2017) desenvolveram uma nova estratégia MB-ELISA para detetar ZEA em amostras de milho. O MB-ELISA desenvolvido contém apenas um passo de incubação de 20 minutos de antigénio-anticorpo e não leva mais de 45 minutos para efetuar a deteção em dezenas de amostras. Este método analítico é rápido, simples, de baixo custo e bastante adequado para a monitorização rotineira de compostos de baixo peso molecular em amostras de alimentos. O MB-ELISA desenvolvido mostrou a sua superioridade em comparação com o ELISA competitivo direto convencional (dcELISA). A duração das reações antigénio-anticorpo foi de apenas 20 minutos, um terço da duração do dcELISA (60 min). O MB-ELISA desenvolvido não precisou de nenhum passo anterior de revestimento e bloqueio, e apenas duas lavagens após a reação antigénio-anticorpo foram suficientes. Estes procedimentos simplificados tornaram o MB-ELISA mais conveniente.

Tabela 2 - Características principais das metodologias aplicadas em métodos recentes de determinação da ZEA em plantas e medicamentos tradicionais chineses.

Matéria-prima	Extração (Solução)	Purificação	Método	Coluna Cromatográfica	LOD/LOQ. (µg/kg)	Bibliografia
Plantas medicinais chinesas	Homogeneização Metanol-água (80:20, v/v)	IAC	HPLC-FLD	-	LOD 9,5	
Lágrima de Nossa Senhora	Dissociação ultrassônica Metanol-água (80:20, v/v)	IAC	HPLC-FLD	-	LOD 11,7-50,2 LOQ 29,3-125,5	
Medicamentos tradicionais chineses	Agitação Metanol-água (80:20, v/v)	IAC	LC-MS/MS	-	LOD 0,6 LOQ 1,2	(Zhang et al., 2018)
Amostras de plantas medicinais e/ou aromáticas	-	-	ELISA	-	LOD 0,28	
Pimentão doce	Agitação	IAC (Myco6in I + Vicam®)	LC-MS/MS	UPLC BEH coluna analítica de fenil (2,1×150 mm, 1,7 µm; Waters)	LOD 0,012 LOQ 0,04	(Gambacorta et al., 2017)
Plantas medicinais	Agitação Metanol-água (80:20, v/v)	IAC	HPLC-FLD	Ultimate XB-C ₁₈ coluna (250 mm×4,6 mm.i.d., 5µm; Welch Materials)	LOD 4 LOQ 7,5	(Kong et al., 2013)

IAC - coluna de imunoafinidade; HPLC-FLD - cromatografia líquida de alta eficiência com detecção de fluorescência; LC-MS/MS - espectrometria de massa em tandem por cromatografia líquida; ELISA - ensaio imunoenzimático; UPLC - cromatografia líquida de ultra performance.

PARTE B – TRABALHO EXPERIMENTAL

I. OBJETIVOS E SIGNIFICADO DO ESTUDO

A adoção de um estilo de vida mais saudável tem vindo a ganhar popularidade ao longo dos anos e, conseqüentemente, tem havido uma crescente consciência dos consumidores sobre os benefícios dos chás e plantas medicinais para a saúde. Essa conjugação de fatores tem aumentado o seu consumo diário e a exigência dos consumidores, que cada vez são mais cuidadosos relativamente aos efeitos dos alimentos que consomem sobre a sua saúde e aos contaminantes neles presentes (CBI Ministry of Foreign Affairs, 2017b; Silva, 2014).

Tendo em conta que o consumo de infusões de chás e plantas medicinais possui uma tendência de crescimento, perspectiva-se um maior interesse da comunidade científica na avaliação de potenciais contaminantes e um maior controlo relativamente à sua presença, nomeadamente contaminantes naturais como as micotoxinas. A ZEA é considerada um desregulador endócrino, que afeta principalmente o sistema reprodutivo e além disso, a ZEA e os seus metabolitos são considerados genotóxicos (Gadzała-Kopciuch *et al.*, 2011).

Neste contexto, os objetivos do estudo foram a determinação da ocorrência de ZEA em chás e plantas medicinais comercializadas em Portugal e a exposição humana decorrente do seu consumo.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 AMOSTRAS

Foram adquiridas 38 amostras de chás e plantas medicinais disponíveis comercialmente (amostras de conveniência), na região de Coimbra e Aveiro, entre Junho e Dezembro de 2017. A caracterização das amostras encontra-se esquematizada na tabela 3, de acordo com a informação constante no rótulo. Toda a informação sobre as amostras foi retirada do rótulo, e todas se encontravam dentro do prazo de validade. Desta forma as amostras analisadas foram categorizadas segundo o tipo (chá, n=7, ou planta medicinal, n=31), modo de produção (biológico, n=4, ou convencional, n=34), forma de comercialização (a granel, n=15 ou empacotado, n=23) e origem.

Tabela 3 - Caracterização das amostras incluídas no estudo.

Nº	Nome vulgar/ Designação de venda	Composição/Ingredientes	Tipo	Modo de produção	Modo de comercialização	Origem país/EU [embalado]
1	Chá verde Marrakech	Folhas de chá verde <i>Chun mee</i> (80%), folhas de hortelã (19,4%) e aroma líquido de menta.	Planta medicinal	Convencional	Empacotado	UE
2	Chá Preto Earl Grey	Chá preto <i>Ceylan</i> (94%), azul aciano (5%) e aroma de bergamota.	Planta medicinal	Convencional	Empacotado	OD [Espanha]
3	Chá vermelho detox	Chá vermelho <i>Yunnan</i> (39%), chá verde <i>Sencha</i> (34%), morango (10%), cenoura (10%), <i>Melissa officinalis</i> (5%) e aroma de morango (2%).	Planta medicinal	Convencional	Empacotado	OD [Espanha]
4	Tisana FG	Abacateiro (<i>Persea gratissima</i> , folha); Funcho (<i>Foeniculum vulgare</i> , planta); Hipericão (<i>Hypericum perforatum</i> L., planta); Arenária (<i>Arenaria rubra</i> L., planta); Boldo (<i>Peumus Boldus</i> , folha); Cavalinha (<i>Equisetum arvense</i> L., planta); Hortelã-pimenta (<i>Mentha Piperita</i> , folha); Urgebão (<i>Verbena officinalis</i> L., planta)	Planta medicinal	Convencional	Empacotado	OD [Portugal]
5	Urtiga vulgar	<i>Urtica dioica</i> L., planta	Planta medicinal	Biológico	Empacotado	Portugal/UE
6	Camomila Flor	<i>Matricaria chamomilla</i> , flor	Planta medicinal	Convencional	Empacotado	Egipto
7	Camomila Flor	<i>Matricaria chamomilla</i> L., flor	Planta medicinal	Convencional	Empacotado	Egipto
8	Jasmim Flor	<i>Jasminum grandiflorum</i> L., flor	Planta medicinal	Convencional	Empacotado	China
9	Cavalinha planta	<i>Equisetum arvense</i> L., planta	Planta medicinal	Convencional	Empacotado	Portugal/UE
10	Erva Príncipe	<i>Cymbopogon citratos</i> L.	Planta medicinal	Convencional	Empacotado	Egipto
11	Cidreira Planta	<i>Melissa officinalis</i> L.	Planta medicinal	Convencional	Empacotado	UE
12	Lúcia-lima Planta	<i>Aloysia citriodora</i> P.	Planta medicinal	Convencional	Empacotado	OD [Portugal]
13	Chá verde folhas	<i>Camellia sinensis</i> L.	Chá	Convencional	Empacotado	Vietname
14	Centelha Asiática	<i>Hydrocotyle asiatica</i> , planta	Planta medicinal	Convencional	Empacotado	Índia
15	Alcachofra	<i>Cynara scolymus</i> , folha	Planta medicinal	Convencional	Empacotado	Marrocos
16	Hibisco flor	<i>Hibiscos sabdariffa</i> L., flor	Planta medicinal	Convencional	Empacotado	Egipto
17	Cavalinha	<i>Equisetum arvense</i> L., planta	Planta medicinal	Convencional	Empacotado	Portugal/UE
18	Laranjeira flor	<i>Citrus aurantium</i> , flor	Planta medicinal	Convencional	Empacotado	Espanha/UE
19	Hipericão-do-Gerês	<i>Hypericum androsaemum</i> , planta	Planta medicinal	Convencional	Empacotado	Portugal/UE
20	Urtiga-branca	<i>Lamium álbum</i> L., planta	Planta medicinal	Convencional	Empacotado	Portugal/UE
21	Infusão Camomila biológica	<i>Matricaria recutita</i> , flor	Planta medicinal	Biológico	Empacotado	Portugal/ UE

(n.d. – não disponível; OD- Origem/ Produção Desconhecida através do rótulo; UE – União Europeia)

Tabela 3 - Caracterização das amostras incluídas no estudo (continuação)

Nº	Nome vulgar/ Designação de venda	Composição/Ingredientes	Tipo	Modo de produção	Modo de comercialização	Origem país/UE [embalado]
22	Infusão Cidreira Planta	n.d.	Planta medicinal	Convencional	A granel	Portugal/UE
23	Chá aroma Silhueta	n.d.	Planta medicinal	Convencional	A granel	UE
24	Infusão Hiperião- do-Gerês	<i>Hypericum androsaemum</i>	Planta medicinal	Biológico	A granel	Portugal/UE
25	Infusão Laranjeira folhas	n.d.	Planta medicinal	Convencional	A granel	Portugal/UE
26	Infusão Tília folhas	n.d.	Planta medicinal	Convencional	A granel	Bulgária/UE
27	Infusão Erva Príncipe planta	n.d.	Planta medicinal	Convencional	A granel	Paraguai
28	Infusão Cavalinha planta	n.d.	Planta medicinal	Convencional	A granel	Portugal/ UE
29	Infusão Lúcia-lima folhas	n.d.	Planta medicinal	Convencional	A granel	Espanha/ UE
30	Chá verde folhas	n.d.	Chá	Convencional	A granel	China
31	Infusão funcho sementes	n.d.	Planta medicinal	Convencional	A granel	Egipto
32	Infusão funcho planta	n.d.	Planta medicinal	Convencional	A granel	Portugal/UE
33	Chá Preto folhas	n.d.	Chá	Convencional	A granel	China
34	Chá vermelho folhas	n.d.	Chá	Convencional	A granel	China
35	Chá aroma Earl Grey	n.d.	Planta medicinal	Convencional	A granel	UE
36	Chá Aroma Pakistani	n.d.	Planta medicinal	Convencional	A granel	UE
37	Infusão Erva Cidreira biológica	<i>Melissa officinalis</i>	Planta medicinal	Biológico	Empacotado	Portugal/UE
38	Chá verde	<i>Camellia Sinensis</i>	Chá	Convencional	Empacotado	Portugal/UE

(n.d. – não disponível; UE – União Europeia).

Relativamente à origem, 21 amostras foram produzidas na União Europeia (UE), das quais 13 em Portugal), e 13 em países extra-UE. Não foi possível determinar a origem de produção em quatro amostras, uma vez que esta informação não se encontrava disponível no respetivo rótulo. As amostras foram trituradas e mantidas à temperatura ambiente até se iniciar a análise.

Relativamente à categorização segundo o tipo de chá, foi considerado que são amostras de chá as que apenas contêm as folhas da planta *Camellia sinensis* e amostras de plantas medicinais as que contêm plantas não originárias da planta do chá. Uma infusão é junção das plantas com água recém-fervida.

2.2. EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO

A determinação foi efetuada de acordo com o método descrito por Santos *et al.* (2009). Depois de trituradas, foram pesadas 25 g de cada planta medicinal. Posteriormente, foram adicionados 100 mL-150 mL de acetonitrilo-água (Panreac Química Sau, Barcelona, Espanha) numa proporção de 84:16 (v:v) e a mistura foi agitada durante 30 minutos num agitador magnético (Agimatic-S, Selecta, Barcelona, Espanha). De seguida, foi efetuada a filtração com papel de filtro (Whatman N°4, 150 mm; Whatman International Ltd., Maidstone, Reino Unido). Do filtrado resultante, 8 mL foram acidificados com 80 µL de ácido acético (Sigma-Aldrich, Laborchemikalien, Alemanha) e purificados através da coluna Mycosept® 226 AflaZon+ (Romerlabs, EUA). De seguida, 4 mL foram evaporados com um fluxo suave de azoto a 40°C.

2.3. DETERMINAÇÃO POR ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO

Para a determinação foi utilizado o *kit* ELISA RIDASCREEN® Zearalenone (R-Biopharm AG®, Alemanha) em formato de competição e seguido o procedimento indicado pelo fabricante. Antes de realizar a análise, o extrato da amostra foi reconstituído com 100 µL de metanol-água 70:30 (v:v) (Panreac Química Sau, Barcelona, Espanha) e 600 µL de água destilada. Foram registadas todas as posições das soluções padrão e das amostras. De seguida, adicionou-se 50 µL das soluções padrão ou amostra preparada, em poços duplicados. Foram adicionados 50 µL do conjugado enzimático diluído em cada poço e misturou-se suavemente agitando a placa manualmente. De seguida a placa foi incubada durante 2h à temperatura ambiente (20-25°C), no escuro.

Foi descartado o líquido dos poços e bateu-se com força o suporte da microplaca (três vezes seguidas) contra papel absorvente, para garantir a remoção completa do líquido dos poços. Encheram-se todos os poços com 250 µL de água destilada e foi descartado novamente o líquido. Este procedimento de lavagem foi repetido duas vezes.

Foram adicionados 50 µL de substrato e 50 µL de cromogéneo a cada poço e misturou-se suavemente, agitando a placa manualmente. Posteriormente, ocorreu incubação durante 30 minutos, à temperatura ambiente, no escuro. Adicionaram-se 100 µL da solução Stop (ácido sulfúrico) a cada poço e agitou-se a placa manualmente. Por fim e de imediato foi medida a absorvância a 450 nm.

2.4. INGESTÃO DIÁRIA ESTIMADA (EDI)

A exposição à ZEA através do consumo de chás e plantas medicinais foi calculada usando a informação sobre o peso corporal (69 kg) segundo Arezes *et al.*, (2006) e o consumo anual *per capita* de chá (0,064 kg/ano; Statista, 2016), de acordo com a fórmula $EDI = (\sum c) (CN^{-1} D^{-1} K^{-1})$, na qual EDI corresponde à ingestão diária estimada, $\sum c$ à soma da concentração de ZEA nas amostras analisadas, C à ingestão média anual estimada, N ao número de amostras analisadas, D ao número de dias num ano e K ao peso corporal médio.

No relatório da avaliação da exposição alimentar a alguns contaminantes na população europeia da EFSA, consta que na sua base de dados de consumo foram reportadas, aproximadamente, 118000 ocasiões de consumo de chá e infusões de plantas medicinais. A proporção usada no estudo para uma infusão é de 2 g de chá ou planta medicinal para 150 mL de água (EFSA, 2016b).

A percentagem de ingestão diária tolerável (TDI) do consumo de chás e plantas medicinais foi calculada da seguinte forma: $\%TDI = EDI/TDI \times 100$, considerando o valor de TDI (0,25 µg/kg peso corporal/dia) estabelecido pela EFSA (2011).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. METODOLOGIA ANALÍTICA

A equação exponencial $y=57,457e^{-0,337x}$, da curva padrão foi utilizada para calcular a concentração de ZEA nas amostras analisadas. O coeficiente de correlação (r^2) foi de 0,9006 apresentando assim uma tendência linear. O limite de deteção considerado, conforme veiculado nas instruções inclusas no *kit*, foi 1,75 µg/kg.

Atualmente, o imunoenensaio mais frequentemente aplicado, devido às suas vantagens, é o ELISA. Este método possui alta especificidade e sensibilidade, de relativa rápida aplicação, facilidade de manuseio e é, comparativamente a métodos cromatográficos, pouco dispendioso. É um método bastante aplicado para a detecção e *screening* de micotoxinas em alimentos. É proposto nalguns estudos que seja efetuada a purificação do extrato da amostra usando uma coluna multifuncional ou de imunoafinidade antes do teste ELISA (Motta e Duarte, 2010; Zhang *et al.*, 2018). Neste caso, foi usada a coluna de imunoafinidade de modo a diminuir a ocorrência de interferentes.

Apesar de existirem vários estudos de determinação da ocorrência de ZEA em alimentos e vários métodos de análise com diferentes limites de detecção (LODs), são poucos os estudos efetuados em chás e plantas medicinais. Num estudo realizado em Espanha, para determinar as concentrações de ZEA e analisadas variadas plantas medicinais, foi aplicado um *kit* de ELISA com um LOD de 0,14 µg/kg (Santos *et al.*, 2009). Um LOD superior (2,5 µg/kg) foi reportado (Kong *et al.*, 2013) num método para determinar ZEA em 100 alimentos e plantas medicinais amplamente consumidos na China, o qual envolvia a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência com detecção de fluorescência (HPLC-FLD), precedida por uma extração com uma solução de metanol-água (80:20, v/v) e purificação com IAC. Em plantas/medicamentos medicinais chinesas foram igualmente descritos métodos cromatográficos, mas com recurso a LC-MS/MS, com LODs que variaram entre 0,6 µg/kg, quando associada uma IAC, (Shen *et al.*, 2011) e 0,06-0,79 µg/kg, quando associada uma coluna de separação em fase sólida preparada no laboratório (Han *et al.*, 2011).

Pelo que antecede, o LOD estimado no *kit* aplicado no presente trabalho (1,75 µg/kg) foi relativamente satisfatório, considerando que o ELISA é uma técnica de *screening*, permitindo uma sensibilidade adequada aos valores de ocorrência reportados em estudos anteriores.

3.2. DETERMINAÇÃO DE ZEA EM CHÁS E PLANTAS MEDICINAIS

Das 38 amostras de chás e plantas medicinais analisadas, 24 (63,16%) encontravam-se contaminadas com um teor de ZEA superior ao LOD (1,75 µg/kg). Os teores das amostras positivas variaram entre 1,82 µg/kg e 19,02 µg/kg, com um valor médio de 8,93±5,20 µg/kg (Tabela 4). Os teores mais elevados de ZEA foram determinados em amostras de camomila biológica produzida em Portugal (19,02 µg/kg), flor de camomila do Egipto (17,52 µg/kg), alcachofra de Marrocos (14,99 µg/kg), hipericão-do-Gerês (14,54 µg/kg) e folhas de chá verde do Vietname (13,62 µg/kg).

Categorizando as amostras segundo o **tipo** e considerando apenas as amostras de chás (80% positivas), a média das concentrações foi $9,33 \pm 4,22 \mu\text{g/kg}$, variando entre $4,97 \mu\text{g/kg}$ e $13,62 \mu\text{g/kg}$. A média das concentrações das plantas medicinais (60,6% positivas) foi ligeiramente inferior ($8,85 \mu\text{g/kg}$), variando entre $1,82 \mu\text{g/kg}$ e $19,02 \mu\text{g/kg}$. Nas infusões de plantas medicinais pode existir uma mistura de plantas de várias origens e até de fruta ou especiarias, o que não ocorre nas infusões de chá uma vez que são feitos com uma planta apenas (*Camellia sinensis*) (Tea & Herbal Infusions Europe, 2016).

Em relação à **origem das amostras**, a média das concentrações obtidas nas amostras com produção na UE foi de $7,77 \mu\text{g/kg}$, com teores a oscilar entre $2,27 \mu\text{g/kg}$ e $19,02 \mu\text{g/kg}$. As amostras provenientes de países fora da UE apresentaram uma média de concentrações superior ($10,88 \mu\text{g/kg}$), sendo que os valores mais elevados corresponderam a amostras provenientes do Egito ($17,52 \mu\text{g/kg}$) e do Vietname ($13,62 \mu\text{g/kg}$). Apesar de na UE não existirem LMs relativamente à presença de ZEA em chás e plantas medicinais, existem diferentes requisitos e exigências na produção de matérias-primas alimentares, para além de uma política de segurança dos alimentos. Essa política engloba uma legislação exaustiva em matéria de segurança dos alimentos destinados ao consumo humano e animal, bem como em matéria de higiene dos alimentos, pareceres científicos sólidos nos quais se fundamentam as decisões e a garantia do cumprimento das normas em vigor e os controlos inerentes (União Europeia, 2018). Por outro lado, os países fora da UE, principalmente africanos e asiáticos, são menos exigentes em termos de regulamentação.

Quanto ao **modo de produção**, das quatro amostras biológicas analisadas, duas encontravam-se contaminadas com uma média de $16,78 \pm 3,17 \mu\text{g/kg}$ e um valor máximo de $19,02 \mu\text{g/kg}$. Das amostras produzidas em agricultura convencional, a média das concentrações foi praticamente metade ($8,49 \pm 4,84 \mu\text{g/kg}$), com um valor máximo de $17,52 \mu\text{g/kg}$. A amostra de origem biológica com o valor máximo de $19,02 \mu\text{g/kg}$ foi a amostra que apresentou um valor máximo mais alto de entre todas as amostras analisadas. Apesar das amostras biológicas analisadas no presente estudo serem apenas quatro, as condições de produção poderão ser determinantes. Como não são usados quaisquer tipos de pesticida, herbicida ou fungicida e quando ocorre uma praga é usado um predador para combatê-la, este tipo de cultivo poderá favorecer o crescimento de certos fungos, apesar de todo o controlo, pois a presença de insetos é um fator que favorece o desenvolvimento de fungos (AGROBIO – Associação Portuguesa de Agricultura Biológica, 2011; Guerra *et al.*, 2012).

No que diz respeito à **comercialização**, nas amostras de venda a granel, a média das concentrações foi de $9,32 \pm 2,89 \mu\text{g/kg}$, enquanto nas amostras empacotadas a média das

concentrações foi ligeiramente inferior ($8,74 \pm 5,85 \mu\text{g/kg}$). Se a venda a granel não cumprir requisitos de acondicionamento e higiene, e houver alguma falha, mais facilmente apresenta produtos contaminados. Se existir má conservação dos alimentos aumenta os riscos de proliferação de bactérias e toxinas. Por outro lado, as amostras empacotadas têm uma proteção adicional. Existem várias notificações da ASAE de apreensão de produtos a granel em Portugal, o que significa que deve ser tido um cuidado adicional (ASAE, 2018).

Tabela 4 - Ocorrência e teores ($\mu\text{g/kg}$) obtidos nos diferentes tipos de amostras.

Variável	Categorias	Positivos (%)	Média \pm DP	[Mín; máx]
Tipo	Chás	4/5 (80%)	$9,33 \pm 4,22$	[4,97; 13,62]
	Plantas medicinais	20/33 (60,6%)	$8,85 \pm 5,46$	[1,82; 19,02]
Origem	Origem UE	15/25 (60%)	$7,77 \pm 5,31$	[2,27; 19,02]
	Origem Extra-UE	9/13 (69,2%)	$10,88 \pm 4,63$	[1,82; 17,52]
Modo de produção	Biológico	2/4 (50%)	$16,78 \pm 3,17$	[14,54; 19,02]
	Convencional	22/34 (64,7%)	$8,49 \pm 4,84$	[1,82; 17,52]
Tipo de comercialização	Granel	8/15 (53,3%)	$9,32 \pm 3,89$	[4,41; 14,54]
	Empacotado	16/23 (69,6%)	$8,74 \pm 5,85$	[1,82; 19,02]
TOTAL	-	24/38 (63,16%)	$8,93 \pm 5,20$	[1,82; 19,09]

(DP - Desvio padrão; UE - União Europeia).

A quantidade de estudos existentes e de pesquisa de contaminantes em chás é bastante escassa, principalmente, quando se trata de micotoxinas, incluindo a ZEA. Apesar de no relatório anual de 2016 do RASFF constarem vários alertas para micotoxinas que incluem chás e plantas medicinais, não foi registado nenhum para a ocorrência de ZEA nestas matrizes (European Commission - Health and Food Safety, 2017).

Em Espanha, um estudo realizado em plantas medicinais para determinar as concentrações de ZEA reportou valores elevados, designadamente em amostras de casca de frângula (amieiro negro, $44,1 \mu\text{g/kg}$), folhas de oliveira ($42,7 \mu\text{g/kg}$), ruibarbo ($24,4 \mu\text{g/kg}$), dente de leão ($17,0 \mu\text{g/kg}$), lúcia-lima ($14,0 \mu\text{g/kg}$) e flor de camomila ($12,5 \mu\text{g/kg}$) (Santos *et al.*, 2009). Num estudo realizado em medicamentos fitoterápicos, na Índia, o valor máximo

determinado foi superior (110 µg/kg) (Ashiq *et al.*, 2014). Contudo, valores superiores foram determinados, por ELISA, em extratos brutos de raízes de ginseng secas, de quatro fontes (um de *Panax quinquefolius* selvagem, 680 µg/kg, dois de *P. ginseng* 183 e 386 e um de *P. quinquefolius* 177 µg/kg). Contudo, quando os teores foram confirmados pela técnica de HPLC, observaram-se teores substancialmente inferiores (2,6; 11,7; 6,13 e 0,25 µg/kg, respetivamente) (Gray *et al.*, 2004; Trucksess e Scott, 2008).

Em França, foi realizado um estudo sobre a dieta da população, no ano de 2011, em que foram analisados variados alimentos como pão e produtos de pão seco, cereais de pequeno-almoço, bebidas não alcoólicas, entre outros. A média das concentrações de ZEA em bebidas quentes foi entre 0,1-0,4 µg/kg (ANSES- French agency for food, 2011).

3.3. INGESTÃO DIÁRIA ESTIMADA

Neste estudo a EDI obtida corresponde a 0,0227 µg/kg p.c./dia. Considerando o maior e o menor valor de concentração de ZEA obtido, 19,02 µg/kg e 1,82 µg/kg, respetivamente, foi calculada a EDI para o pior e para o melhor cenário possível. Para o pior cenário a EDI foi de 0,0483 µg/kg p.c./dia e para o melhor cenário foi de 0,0046 µg/kg p.c./dia.

A EDI (0,0227 µg/kg p.c./dia) corresponde a 9,08% da TDI estabelecida pela EFSA (0,25 µg/kg p.c./dia). Tendo em conta a EDI calculada no presente estudo (0,0227 µg/kg p.c./dia) e a proporção utilizada pela EFSA (2 g de chá ou planta medicinal para 150 mL de água usados em cada infusão), verifica-se que seria necessário usar pelo menos 22 g, de chá ou plantas medicinais para atingir a TDI estabelecida (0,25 µg/kg p.c./dia). Considerando a EDI do pior cenário possível, a quantidade necessária para atingir a TDI seria, aproximadamente, 10 g e no melhor cenário possível seria, aproximadamente 109 g de chá ou plantas medicinais.

Num estudo de revisão recente efetuado por Abrunhosa *et al.* (2016), considerando os valores de ZEA determinados em alimentos em Portugal, foi estimada a Ingestão Diária Provável (PDI) desta micotoxina como 0,0339 µg/kg p.c./dia. Este valor foi calculado com base no consumo de alimentos à base de trigo, cereais e milho, cereais de pequeno-almoço, farinha de trigo, farinha de milho e farinha de mandioca previamente reportados. Verifica-se, desta forma, que o consumo apenas de chá e infusões à base de plantas medicinais (0,0227 µg/kg p.c./dia) aproxima-se do valor estimado através do consumo de todos estes alimentos em conjunto. O consumo de chá e infusões de plantas medicinais revela-se por isso um fator relevante de exposição à ZEA entre a população portuguesa.

CONCLUSÕES

Das 38 amostras de chá e plantas medicinais analisadas, 24 (63,16%) encontravam-se contaminadas com um teor de ZEA superior ao LOD (1,75 µg/kg). Apesar da média das concentrações determinada ($8,93 \pm 5,20$ µg/kg) ser inferior ao reportado pelos escassos estudos realizados anteriormente, a ingestão diária estimada (EDI 0,0227 µg/kg p.c./dia) representa cerca de 9% da TDI estabelecida pela EFSA (0,25 µg/kg p.c./dia). É igualmente de fazer notar que a Ingestão Diária Provável (PDI) de ZEA, com base no consumo de cereais e seus derivados, considerados a principal forma de exposição a esta micotoxina, é apenas 1,5 vezes superior à EDI calculada pelo consumo exclusivo de chás e plantas medicinais.

Considerando os resultados obtidos pelo presente estudo, associados ao facto do consumo de infusões de chá e plantas medicinais estar em crescimento marcado e não existirem limites máximos previstos na legislação relativamente à ocorrência de ZEA nestas matrizes, será necessário efetuar novos estudos de avaliação da ocorrência desta micotoxina, a fim de monitorizar a exposição da população decorrente do seu consumo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRUNHOSA, L. *et al.* (2016) - A Review of Mycotoxins in Food and Feed Products in Portugal and Estimation of Probable Daily Intakes. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. ISSN 15497852, 56(2), 249–265. doi: 10.1080/10408398.2012.720619.

AGROBIO – Associação portuguesa de agricultura biológica (2011) - O que é a Agricultura Biológica? Disponível em <http://www.agrobio.pt/pt/o-que-e-a-agricultura-biologica.T136.php>.

ALDANA, J. R. *et al.* (2014) - Occurrence and risk assessment of zearalenone in flours from Portuguese and Dutch markets. *Food Control*. ISSN 09567135, 45, 51–55. doi: 10.1016/j.foodcont.2014.04.023.

AN, T. J. *et al.* (2016) - Prevalence, Characterization, and Mycotoxin Production Ability of *Fusarium* Species on Korean Adlay (*Coix lacrymal-jobi* L.) Seeds. *Toxins*. ISSN 20726651, 8(11), 1–11. doi: 10.3390/toxins8110310.

ANFOSSI, L.; GIOVANNOLI, C.; BAGGIANI, C. (2016) - Mycotoxin detection. *Current Opinion in Biotechnology*. ISSN 18790429, 37, 120–126. doi: 10.1016/j.copbio.2015.11.005.

ANSES- French agency for food, Environmental And Occupational Health & Safety (2011) - Second French Total Diet Study (TDS2) Disponível em <https://www.anses.fr/en/content/second-french-total-diet-study-tds-2-report-1-inorganic-contaminants-minerals-persistent>

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

ASAE (2018) - Venda a granel [Consultado 2 jun. 2018] Disponível em <https://www.asae.gov.pt/pesquisa.aspx>.

ASHIQ, S.; HUSSAIN, M.; AHMAD, B. (2014) - Natural occurrence of mycotoxins in medicinal plants: A review. *Fungal Genetics and Biology*. ISSN 10960937, 66, 1–10. doi: 10.1016/j.fgb.2014.02.005.

BENNETT, J. W.; KLICH, M. (2003) - Mycotoxins. *Clinical microbiology reviews*. ISSN 0893-8512, 16(3), 497–516. doi: 10.1128/CMR.16.3.497.

BERTHILLER, F. *et al.* (2018) - Developments in mycotoxin analysis: an update for 2016-2017. *World Mycotoxin Journal*. ISSN 1875-0710, 11(1), 1–28. doi: 10.3920/WMJ2017.2250.

BINDER, S. B. *et al.* (2017) - Metabolism of zearalenone and its major modified forms in pigs. *Toxins*. ISSN 20726651, 9(2), 1–15. doi: 10.3390/toxins9020056.

BOTTALICO, A. *et al.* (1985) - Occurrence of zearalenols (diastereomeric mixture) in corn stalk rot and their production by associated fusarium species. *Applied and Environmental Microbiology*. ISSN 00992240, 49(3), 547–551. doi: 10.3760/cma.j.issn.1003-9406.2011.04.016.

CBI MINISTRY OF FOREIGN AFFAIRS (2017a) - What is the demand for tea in Europe? [Consultado 4 maio. 2018] Disponível em <https://www.cbi.eu/market-information/tea/trade-statistics/>.

CBI MINISTRY OF FOREIGN AFFAIRS (2017b) - Which trends offer opportunities on the European wine market? Disponível em <https://www.cbi.eu/market-information/tea/trends/>.

CHATOPADHYAY, P.; PANDEY, A. (2012) - Hepatic Hyperplasia and Damages Induced by Zearalenone Fusarium Mycotoxins in BALB/c Mice. *Arquivos de Gastroenterologia*, (1), 77–81.

COVER, J. *et al.* (2010) - Zearalenone Determination in High Performance Liquid Chromatography: A New Standardization Method For Commercial Swine Rations. , 37(5), 369–375.

EFSA (2011)- Scientific Opinion on the risks for public health related to the presence of zearalenone in food. *EFSA Journal*. ISSN 1831-4732, 9(6:2197), 1–124. doi: 10.2903/j.efsa.2011.2197.Available.

EFSA (2016a) - Appropriateness to set a group health-based guidance value for zearalenone and its modified forms. *EFSA Journal*. ISSN 18314732, 14(4). doi: 10.2903/j.efsa.2016.4425.

EFSA (2016b) - Dietary exposure assessment to pyrrolizidine alkaloids in the European population (Vol. 14) Disponível em <http://doi.wiley.com/10.2903/j.efsa.2016.4572>.

European Commission - Health and food safety (2017) - The Rapid Alert System for Food and Feed. 2016 Annual Report Disponível em https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/safety/docs/rasff_annual_report_2016.pdf.

European Commission - Regulamento (CE) N° 165/2010 da Comissão de 26 de Fevereiro de 2010, *Jornal Oficial da União Europeia*, 50/8 - (2010) Disponível em https://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/ALL/?uri=uriserv:OJ.L_.2010.050.01.0008.01.POR

FAO (2017) - [Consultado 17 maio. 2018] Disponível em <http://www.fao.org/faostat/en/#compare>.

FILANNINO, A. *et al.* (2011) - Dose-response effects of estrogenic mycotoxins (zearalenone, alpha- and beta-zearalenol) on motility, hyperactivation and the acrosome reaction of stallion sperm. *Reproductive Biology and Endocrinology*. ISSN 14777827, 9(1), 134. doi: 10.1186/1477-7827-9-134.

FREIRE, F. *et al.* (2007) - Micotoxinas: Importância na Alimentação e na Saúde Humana e Animal. *Oecologia*. ISSN 1677-1915, p. 48.

GADZAŁA-KOPCIUCH, R. *et al.* (2011) - Determination of zearalenone and its metabolites in endometrial cancer by coupled separation techniques. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. ISSN 16182642, 401(7), 2069–2078. doi: 10.1007/s00216-011-5206-x.

GAMBACORTA, L. *et al.* (2017) - Co-occurrence of toxigenic moulds, aflatoxins, ochratoxin A, *Fusarium* and *Alternaria* mycotoxins in fresh sweet peppers (*Capsicum annuum*) and their processed products. *World Mycotoxin Journal*. ISSN 1875-0710, 11(1), 1–16. doi: 10.3920/WMJ2017.2271.

GONZÁLEZ-SÁLAMO, J. *et al.* (2017) - Core-shell poly(dopamine) magnetic nanoparticles for the extraction of estrogenic mycotoxins from milk and yogurt prior to LC–MS analysis. *Food Chemistry*. ISSN 18737072, 215, 362–368. doi: 10.1016/j.foodchem.2016.07.154.

GRAY, S. L. *et al.* (2004) - Mycotoxins in root extracts of American and Asian ginseng bind estrogen receptors α and β . *Experimental Biology and Medicine*. ISSN 15353702, 229(6), 560–568. doi: 10.1177/153537020422900615.

GUERRA, F. L. *et al.* (2012) - Análise das condições favoráveis à formação de bolor em edificação histórica de Pelotas, RS, Brasil. *Ambiente Construído*. ISSN 1678-8621, 12(4), 7–23. doi: 10.1590/S1678-86212012000400002.

HAN, Z.; REN, Y.P.; ZHOU, H.L.; LUAN, L.J.; CAI, Z.X.; WU, Y.J. (2011) A rapid method for simultaneous determination of zearalenone, alpha-zearalenol, beta-zearalenol, zearalanone, alpha-zearalanol and beta-zearalanol in traditional Chinese medicines by ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B* 2011, 879, 411–420.

HUANG, Y. et al. (2014) - Determination of zearalenone in corn based on a biotin-avidin amplified enzyme-linked immunosorbent assay. *Food and Agricultural Immunology*. ISSN 09540105 , 25(2), 186–199. doi: 10.1080/09540105.2012.759540.

IAMANAKA, B. T.; OLIVEIRA, I. S.; TANIWAKI, M. H. (2013) - Micotoxinas Em Alimentos. *Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica*. ISSN 2448-2811, 7(0), 138–161.

IARC (1993) - Some Naturally Occurring Substances: Food Items and Constituents, Heterocyclic Aromatic Amines and Mycotoxins - Toxins Derived from *Fusarium graminearum*, *F. culmorum* and *F. crookwellense*: Zearalenone, Deoxynivalenol, Nivalenol and Fusarenone X. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans

IRNIDAYANTI, Y. (2012) - Effect of Zearalenone Administrated at Late Gestation Days on Fertility of The F-1 Offspring in Swiss webster (*Mus musculus*). *International Journal of Morphology*. ISSN 0717-9502, 30(3), 1197–1202. doi: 10.4067/S0717-95022012000300068.

JOVAIŠIENE, J. et al. (2017) - Biogenic amines and mycotoxins concentrations in baled silage from organic and conventional farms. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. ISSN 16784162, 69(2), 269–277. doi: 10.1590/1678-4162-9130.

KONG, W. J. et al. (2013) - Analysis of zearalenone and α -zearalenol in 100 foods and medicinal plants determined by HPLC-FLD and positive confirmation by LC-MS-MS. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. ISSN 00225142, 93(7), 1584–1590. doi: 10.1002/jsfa.5926.

KRISZT, R. et al. (2012) - A New Zearalenone Biodegradation Strategy Using Non-Pathogenic *Rhodococcus pyridinivorans* K408 Strain. *PLoS ONE*. ISSN 193262031, 7(9), 1–9. doi: 10.1371/journal.pone.0043608.

LI, L. et al. (2015) - Zearalenone Inhibits Rat and Human 11 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 2. *BioMed Research International*. ISSN 23146141, 2015, 1–7. doi: 10.1155/2015/283530.

LI, X. et al. (2013) - Multi-component immunochromatographic assay for simultaneous detection of aflatoxin B1, ochratoxin A and zearalenone in agro-food. *Biosensors and Bioelectronics*. ISSN 09565663, 49, 426–432. doi: 10.1016/j.bios.2013.05.039.

LIU, M. *et al.* (2014) - Toxic effects of maternal zearalenone exposure on intestinal oxidative stress, barrier function, immunological and morphological changes in rats. *PLoS ONE*. ISSN 19326203 , 9(9), 1–14. doi: 10.1371/journal.pone.0106412.

MARQUES, M. (2007) - Validação Interna dos Métodos de Determinação de Deoxinivalenol e Zearalenona por HPLC com Purificação por Colunas de Imunoafinidade. (Tese de Mestrado em Engenharia Biológica, Universidade Técnica de Lisboa) Disponível em <https://fenix.tecnico.ulisboa.pt/cursos/lebl-pb/dissertacao/2353642080813>

MARROQUÍN-CARDONA, A. G. *et al.* (2014) - Mycotoxins in a changing global environment - A review. *Food and Chemical Toxicology*. ISSN 18736351, 69, 220–230. doi: 10.1016/j.fct.2014.04.025.

MEULENBERG, E. P. (2012) - Immunochemical methods for ochratoxin A detection: A review. *Toxins*. ISSN 20726651, 4(4), 244–266. doi: 10.3390/toxins4040244.

MINERVINI, F. *et al.* (2006) - Influence of mycotoxin zearalenone and its derivatives (alpha and beta zearalenol) on apoptosis and proliferation of cultured granulosa cells from equine ovaries. *Reproductive Biology and Endocrinology*. ISSN 14777827, 4, 1–9. doi: 10.1186/1477-7827-4-62.

MINERVINI, F.; AQUILA, M. E. D. (2008) - Zearalenone and reproductive function in farm animals. *International Journal of Molecular Sciences*. ISSN 14220067, 9(12), 2570–2584. doi: 10.3390/ijms9122570.

PALLARONI, L.; HOLST, C. Von (2004) - Development of an extraction method for the determination of zearalenone in corn using less organic solvents. *Journal of Chromatography A* , 1055(1–2), 247–249.

PEREIRA, V. L.; FERNANDES, J. O.; CUNHA, S. C. (2014) - Mycotoxins in cereals and related foodstuffs: A review on occurrence and recent methods of analysis. *Trends in Food Science and Technology*. ISSN 09242244, 36(2), 96–136. doi: 10.1016/j.tifs.2014.01.005.

PIETSCH, C. *et al.* (2015) - Effects of dietary exposure to zearalenone (ZEN) on carp (*Cyprinus carpio* L.). *Toxins*. ISSN 20726651, 7(9), 3465–3480. doi: 10.3390/toxins7093465.

POPIEL, D. *et al.* (2014) - Zearalenone lactonohydrolase activity in *Hypocreales* and its evolutionary relationships within the epoxide hydrolase subset of a/b-hydrolases. *BMC Microbiology*. ISSN 14712180, 14(1), 1–12. doi: 10.1186/1471-2180-14-82.

Recomendação (UE) 2016/1319 da Comissão de 29 de julho de 2016 - Jornal Oficial da União Europeia, 208/58 - (2016) Disponível em <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/ALL/?uri=CELEX%3A32016H1319>

Recomendação da Comissão, de 17 de Agosto de 2006- Jornal Oficial da União Europeia, 229/7 - (2006) Disponível em <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/?uri=CELEX%3A32006H0576>

REGULAMENTO (CE) N° 1126/2007 da Comissão de 28 de Setembro de 2007 - Jornal Oficial da União Europeia, 225/14 - (2007) Disponível em <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/?uri=celex:32007R1126>

RETO, M. *et al.* (2007) - Chemical composition of green tea (*Camellia sinensis*) infusions commercialized in Portugal. *Plant Foods for Human Nutrition*. ISSN 09219668 , 62(4), 139–144. doi: 10.1007/s11130-007-0054-8.

ROCHA, M. E. F. *et al.* (2014) - Mycotoxins and their effects on human and animal health. *Food Control*. ISSN 09567135 , 36(1), 159–165. doi: 10.1016/j.foodcont.2013.08.021.

SANTOS, L. *et al.* (2009) - Screening of mycotoxin multicontamination in medicinal and aromatic herbs sampled in Spain. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. ISSN 00225142 , 89(10), 1802–1807. doi: 10.1002/jsfa.3647.

SANTOS, L. *et al.* (2013) - Mycotoxin in Medicinal/Aromatic Herbs – a Review. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*. ISSN 0717-7917, 12(2), 119–142.

SELVARAJ, J. N. *et al.* (2015) - Mycotoxin detection - Recent trends at global level. *Journal of Integrative Agriculture*. ISSN 20953119, 14(11), 2265–2281. doi: 10.1016/S2095-3119(15)61120-0.

SERRA, R. M. A. (2005) - Micoflora das uvas portuguesas e seu potencial para a contaminação das uvas com micotoxinas, com destaque para a Ocratoxina A. (Tese de Doutoramento em Engenharia Química e Biológica, Escola de Engenharia da Universidade do Minho) Disponível em <https://repositorium.sdum.uminho.pt/handle/1822/2579?mode=full>.

SHEN, H.H.; QIU, F.; YANG, M.H.; ZHEN, O.Y. (2011) Simultaneous determination of zearalenone and α -zearalenol in traditional Chinese medicines by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Chin. J. Health Lab. Technol.* 2011, 21, 1322–1327.

- SILVA, E. O.; BRACARENSE, A. P. F. L.; OSWALD, I. P. (2018) - Mycotoxins and oxidative stress: where are we? *World Mycotoxin Journal*. ISSN 1875-0710, 11(1), 1–22. doi: 10.3920/WMJ2017.2267.
- SILVA, R. (2014) - *O Chá Em Portugal: História e Hábitos de Consumo*. Universidade do Minho, 2014.
- SMITH, M. C. *et al.* (2016) - Natural Co-occurrence of mycotoxins in foods and feeds and their in vitro combined toxicological effects. *Toxins*. ISSN 20726651, 8(4). doi: 10.3390/toxins8040094.
- STATISTA (2016) - Annual per capita tea consumption worldwide as of 2016, by leading countries (in pounds) [Consultado 4 maio 2018] Disponível em <https://www.statista.com/statistics/507950/global-per-capita-tea-consumption-by-country/>.
- TANG, X. *et al.* (2014) - Development and application of an immunoaffinity column enzyme immunoassay for mycotoxin zearalenone in complicated samples. *PLoS ONE*. ISSN 19326203, 9(1), 1–7. doi: 10.1371/journal.pone.0085606.
- TEA & HERBAL INFUSIONS EUROPE (s. d.) - Tea Growing Countries [Consultado 4 maio 2018] Disponível em <http://www.thie-online.eu/tea/tea-growing-countries/>.
- TEA & HERBAL INFUSIONS EUROPE (2014) - *Compendium of Guidelines for Herbal and Fruit Infusions* Disponível em <http://www.etc-online.org>.
- TEA & HERBAL INFUSIONS EUROPE (2016) - *Compendium of Guidelines for Tea (Camellia Sinensis)* Disponível em <http://www.etc-online.org>.
- TRIPATHY, V. *et al.* (2015) - Residues and contaminants in medicinal herbs - A review. *Phytochemistry Letters*. ISSN 18767486, 14, 67–78. doi: 10.1016/j.phytol.2015.09.003.
- TRUCKSESS, M. W.; SCOTT, P. M. (2008) - Mycotoxins in botanicals and dried fruits: A review. *Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment*. ISSN 19440057, 25(2), 181–192. doi: 10.1080/02652030701567459.
- TURNER, N. W. *et al.* (2015) - Analytical methods for determination of mycotoxins: An update (2009-2014). *Analytica Chimica Acta*. ISSN 18734324, 901, 12–33. doi: 10.1016/j.aca.2015.10.013.
- UNIÃO EUROPEIA (2018) - *Segurança dos alimentos na UE* [Consultado 3 jun. 2018] Disponível em https://europa.eu/european-union/topics/food-safety_pt.

WANG, Y. *et al.* (2014) - Phage-Displayed Peptides that Mimic Aflatoxins and its Application in Immunoassay. *J Agric Food Chem.* ISSN 1527-5418, 70(12), 773–779. doi: 10.1097/OGX.0000000000000256.Prenatal.

WANG, Y. K. *et al.* (2013) - Highly sensitive electrochemical immunoassay for zearalenone in grain and grain-based food. *Microchimica Acta.* ISSN 00263672 , 180(3–4), 187–193. doi: 10.1007/s00604-012-0915-1.

WANG, Y. K. *et al.* (2015) - Screening of single-stranded DNA (ssDNA) aptamers against a zearalenone monoclonal antibody and development of a ssDNA-based enzyme-linked oligonucleotide assay for determination of zearalenone in corn. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* ISSN 15205118, 63(1), 136–141. doi: 10.1021/jf503733g.

ZACHARA, A.; GAŁKOWSKA, D.; JUSZCZAK, L. (2017) - Contamination of tea and tea infusion with polycyclic aromatic hydrocarbons. *International Journal of Environmental Research and Public Health.* ISSN 16604601, 15(1). doi: 10.3390/ijerph15010045.

ZHAN, S. *et al.* (2016) - Novel fluorescent ELISA for the sensitive detection of zearalenone based on H₂O₂-sensitive quantum dots for signal transduction. *Talanta.* ISSN 00399140, 158, 51–56. doi: 10.1016/j.talanta.2016.05.035.

ZHANG, L. *et al.* (2018) - A Review of Current Methods for Analysis of Mycotoxins in Herbal Medicines. *Toxins* 2018, Vol. 10, Page 65. ISSN 20726651, 10(2), 65. doi: 10.3390/TOXINS10020065.

ZHANG, X. *et al.* (2011) - Determination of zearalenone in traditional Chinese medicinal plants and related products by HPLC-FLD. *Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment.* ISSN 19440049, 28(7), 885–893. doi: 10.1080/19440049.2011.563429.

ZHANG, X. *et al.* (2015) - A magnetic nanoparticle based enzyme-linked immunosorbent assay for sensitive quantification of zearalenone in cereal and feed samples. *Toxins.* ISSN 20726651, 7(10), 4216–4231. doi: 10.3390/toxins7104216.

ZHAO, F. *et al.* (2017) - Development of a rapid magnetic bead-based immunoassay for sensitive detection of zearalenone. *Food Control.* ISSN 09567135, 79, 227–233. doi: 10.1016/j.foodcont.2017.03.051.

ZINEDINE, A.; RUIZ, M.-J. (2014) - "Zearalenone" in Mycotoxins and their implications in food safety. Ed. Future Science, 2014, ISBN 978-1-909453-22-7 (pp. 53–66).