



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Beatriz Isabel Rodrigues Bogalho de Melo

Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “State of the art of multi-mycotoxins determination methods in groundnuts (peanuts)” referentes à Unidade Curricular “Estágio”, sob a orientação do Dr. André Paiva, da Dra. Beatriz Costa e da Professora Doutora Ana Teresa Sanches Silva e apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas.

Outubro de 2021



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Beatriz Isabel Rodrigues Bogalho de Melo

Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “State of the art of multi-mycotoxins determination methods in groundnuts (peanuts)” referentes à Unidade Curricular “Estágio”, sob a orientação do Dr. André Paiva, da Dra. Beatriz Costa e da Professora Doutora Ana Teresa Sanches Silva e apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas.

Outubro de 2021

Eu, **Beatriz Isabel Rodrigues Bogalho de Melo**, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o n.º **2016227852**, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo do Documento Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “State of the art of multi-mycotoxins determination methods in groundnuts (peanuts)” apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no âmbito da unidade de Estágio Curricular.

Mais declaro que este Documento é um trabalho original e que toda e qualquer afirmação ou expressão, por mim utilizada, está referenciada na Bibliografia, segundo os critérios bibliográficos legalmente estabelecidos, salvaguardando sempre os Direitos de Autor, à exceção das minhas opiniões pessoais.

Coimbra, 25 de outubro de 2021.

Beatriz Isabel Rodrigues Bogalho de Melo

(Beatriz Isabel Rodrigues Bogalho de Melo)

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, pelo amor e apoio incondicionais, agradeço todos os conselhos, conversas, educação e valores que me transmitiram todos os dias. Pela confiança que depositaram e por me mostrarem sempre uma solução para as adversidades. Obrigada por fazerem parte de todas as etapas da minha vida.

Ao Hugo, Sweet Boy, por seres a força e a inspiração, pela inquestionável teimosia e amor, por me apoiares a cada desafio arriscado e por me incentivares a ser a melhor versão de mim. Obrigada pelo carinho, ternura, crua honestidade, pelo passado e o futuro. A uma nova página a ser escrita.

À minha família, avós, padrinhos, primos, afilhada e tios, por serem o pilar e por contribuírem para o alcance deste objetivo. Obrigada pelo carinho, compreensão e estima. À Odília, ao José e ao Hernâni pelo carinho e amabilidade que sempre me demonstraram.

Às minhas meninas, Joana, Bá, Bianca, tenho as melhores memórias possíveis, obrigada por serem a boia sempre a postos, termos as melhores histórias para contar e por partilharem a vossa caminhada comigo. Ao Bruninho, Aquino, Maria, Leila e Mineiro, pelos bons momentos que passamos, pelas recordações gravadas e pelas eternas tardes no bar. Obrigada por fazerem parte desta caminhada.

À minha família de praxe, madrinhas, padrinhos, afilhados e pseudo-afilhados, por me mostrarem uma nova Coimbra que me voltou a acolher, por todas as serenatas, cortejos e tradições.

À minha orientadora, Professora Doutora Ana Teresa Sanches Silva, pela partilha de conhecimentos, orientação e disponibilidade para me esclarecer na realização da monografia.

A toda a Equipa da Farmácia Estádio e a todos os estagiários que me acompanharam, por todos os ensinamentos, profissionalismo, amizade e confiança que depositaram em mim. Obrigada por toda a ajuda e carinho.

À equipa da BasePoint® e à estagiária que me acompanhou, pelos estímulos que foram lançando e por me incentivarem a querer desafiar os meus conhecimentos.

À Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, Docentes e Não Docentes, pela simpatia e ajuda que demonstraram ao longo deste percurso.

A todos, a Coimbra, à Saudade,

OBRIGADA!

ÍNDICE GERAL

PARTE I – Relatório de Estágio em Farmácia Comunitária

Lista de Abreviaturas	8
Lista de Ilustrações	9
Introdução	10
Apresentação e Organização da Farmácia	11
Análise SWOT.....	13
PONTOS FORTES.....	13
1. Equipa.....	13
2. Localização.....	13
3. Organização de Produtos.....	13
4. Plano de Estágio.....	14
5. Sistema de Gestão de Qualidade (SGQ)	15
6. Preparação Individualizada da Medicação (PIM).....	15
7. Reuniões <i>Kaizen</i>	16
PONTOS FRACOS	16
1. Plano Curricular de MIFC	16
2. Venda de MNSRM fora das farmácias e Automedicação	17
OPORTUNIDADES	17
1. Produtos Manipulados.....	17
2. Formações	18
3. Preparação Individualizada da Medicação (PIM).....	18
4. Gestão de vendas e Organização – Grupo Maisfarmácia	19
5. Vivenciar Duas Realidades	19
AMEAÇAS.....	20
1. Sistema Informático Sifarma®	20
2. Medicamentos homeopáticos.....	20
Casos Clínicos	21
Considerações Finais.....	23
Bibliografia	24
Anexos	25
Anexo I – Imagens de diversas formas de Preparação Individualizada da Medicação (PIM).....	25
Anexo 2 – Máquina de Preparação de Medicação.....	26
Anexo 3 – <i>Robot</i> de Farmácia (<i>RD Rowa Smart</i>)	27

PARTE II - Relatório de Estágio em Assuntos Regulamentares

Lista de Abreviaturas	29
Introdução	30
BasePoint e sua Equipa	31
Análise SWOT.....	32
PONTOS FORTES.....	32
1. Equipa.....	32
2. Formações Internas	32

3. Responsabilidades Dirigidas	33
PONTOS FRACOS	33
1. Impossibilidade de Reuniões com Equipa e Clientes	33
2. Plano Curricular de MICF	33
OPORTUNIDADES	34
1. Diversidade de Estágios	34
2. Experiência em Áreas Variadas.....	34
AMEAÇAS.....	34
1. Pesquisa com Informação Reduzida.....	34
2. Formato de Trabalho	35
Considerações Finais.....	35
Bibliografia	36

PARTE III - Monografia “State of the art of multi-mycotoxins determination methods in groundnuts (peanuts)”

List of Tables.....	38
List of Figures.....	38
List of Abbreviations	39
Introduction	44
Mycotoxins	46
Aflatoxins.....	46
Ochratoxin A.....	48
Fumonisin (FB1 and FB2).....	49
Zearalenone (ZEA).....	49
Trichothecenes.....	50
Emerging Mycotoxins.....	51
Co-occurrence of mycotoxins	51
Mechanisms of mycotoxins.....	52
Preharvest Contamination Sources	53
Climate Changes and Mycotoxins.....	54
Mycotoxins Legal Status at EU level.....	55
Procedure for Detection and Determination of Mycotoxins.....	55
1. Sampling and Pre-treatment.....	56
2. Extraction and Purification.....	56
3. Separation, Detection and Quantification of mycotoxins.....	59
Chromatographic Methods	59
Liquid Chromatography Electrospray Ionization Triple Quadrupole Mass Spectrometry.....	61
Capillary Electrophoresis (CE)	62
Immunoassays.....	62
Time-Resolved Fluorescence Immunochromatography Assay (TRFICA)	63
Aptamer-Based Biosensor	64
Surface Plasmon Resonance (SPR).....	66
Multi-mycotoxins analytical methodologies applied to groundnuts	+

Mycotoxins in groundnuts (peanuts): RASFF notifications.....	67
Mycotoxins Detoxification	68
Conclusions and Future Perspectives	69
Bibliography	+\$
Annex	80

PARTE I

Relatório de Estágio em Farmácia Comunitária



Farmácia Estádio

Sob Orientação de: André Paiva

Lista de Abreviaturas

BPF – Boas Práticas de Fabrico

COVID-19 – *Coronavirus disease 2019*

FFUC – Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

IMC – Índice de Massa Corporal

MICF – Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

MNSRM – Medicamentos Não Sujeitos a Receita Médica

MSRM – Medicamentos Sujeitos a Receita Médica

PIM – Preparação Individualizada de Medicação

PVF – Preço de Venda à Farmácia

PVL – Produtos de Venda Livre

PVP – Preço de Venda ao Público

SGQ – Sistema de Gestão de Qualidade

SWOT – *Strenghts, Weaknesses, Opportunities, Threats*

Lista de Ilustrações

Ilustração 1 - Organigrama da Equipa da Farmácia Estádio com indicação do nome e respetivas categorias profissionais	12
Ilustração 2 - PIM manual.....	25
Ilustração 3 - Gaveta de Máquina de PIM.....	26
Ilustração 4 - Máquina de PIM.....	26
Ilustração 5 - Robot de Farmácia (RD Rowa Smart®).....	27

Introdução

No decorrer de todo o plano de estudo do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas (MICF) na Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra (FFUC), deparamo-nos com uma realidade teórica que se torna essencial na experiência profissional dos estudantes que deste curso fazem parte. Assim sendo, torna-se fulcral para o término dos estudos deste curso intensivo a realização de estágio curricular que pode apresentar diversas facetas dependendo dos objetivos determinados por cada aluno em conjunto com as instituições que os acolhem.

Ao contrário do que se poderia verificar há uns anos atrás, o papel do farmacêutico tem vindo a evoluir e a reforçar-se cada vez mais ao longo dos anos, o que torna a valorização da profissão farmacêutica um tema que é discutido e debatido mais regularmente. O farmacêutico deparou-se com a atual população que cada vez consome mais informação, boa e/ou má, o que torna o seu papel muito desafiante, uma vez que existe a necessidade de se informar, pesquisar, estudar e refletir para posteriormente poder apresentar informação fidedigna e corretamente transmitida à população. Havendo cada vez mais investimento na investigação surge mais desafios que põe o Farmacêutico de Farmácia Comunitária à prova na hora do aconselhamento e esclarecimento aos doentes.

Assim sendo, torna-se crucial a informação certa, no momento certo, seja devido ao aconselhamento farmacoterapêutico, advertência para possíveis interações medicamentosas, efeitos secundários, contraindicações. Também é essencial manifestar a importância de estilos de vida saudáveis como uma boa alimentação e a prática de exercício físico e a seleção de alternativa farmacológica adequada para a situação em que cada utente se encontra.

Aquando do momento de escolha do local de estágio foi necessário ter em conta diversas características, nomeadamente Formações e Desenvolvimento de Competências, objetivos e gestão de Qualidade e Orientação Estratégica.

Por esse motivo, numa primeira instância, realizei estágio curricular em Farmácia Comunitária na Farmácia Estádio, em Coimbra, sob a orientação do Dr. André Paiva, o qual teve duração de 11 de janeiro de 2021 a 22 de maio de 2021, tendo retomado de 4 de agosto de 2021 a 17 de agosto de 2021 devido à situação pandémica que se viu agravada no início do estágio, levando a que a farmácia optasse por organização por turnos que dificultou a realização do estágio no tempo inicialmente determinado, com a duração final total de 817 horas de estágio.

O relatório encontra-se segundo as Normas Orientadoras da Unidade Curricular “Estágio” 2020/2021, com Análise SWOT correspondente, com o objetivo de definir os Pontos Fortes (*Strengths*) e Fracos (*Weaknesses*) do meu estágio curricular, bem como Oportunidades (*Opportunities*) e Ameaças (*Threats*) a ser destacadas após a realização do estágio.

Apresentação e Organização da Farmácia

A Farmácia Estádio encontra-se localizada na Rua D. João III, n.º 11 desde 2006, tendo tido uma localização anterior que, apesar da mudança, conseguiu manter fiéis os seus utentes, continuando muitos a frequentar a farmácia desde a sua abertura inicial. O seu horário de funcionamento, durante a semana, verifica-se das 8h30 às 21h e ao sábado das 9h às 19h que permite o seu funcionamento contínuo, flexível e diversificado, adaptado às necessidades dos utentes.

Durante todo o seu percurso que já conta com 64 anos, a Farmácia Estádio sofreu diversos desenvolvimentos que levaram a que a qualidade de atendimento, local de trabalho e metodologia de equipa sofressem constantes alterações, acompanhando as necessidades dos utentes e mantendo a equipa organizada.

A Farmácia Estádio possui diversos locais de organização e espaços físicos da farmácia, nomeadamente, área de receção de encomendas, armazém, 7 salas de atendimento com balcão, gabinetes privados para serviços a doentes, laboratório de preparação de medicamentos manipulados, zona técnica, escritório de Direção Técnica, vestuário, instalações sanitárias. Na zona do *back office* encontra-se o Robot de Farmácia (*RD Rowa Smart*®), frigorífico, armários de armazenamento de medicamentos e produtos por secções.

Para além do normal funcionamento de uma farmácia, a Farmácia Estádio dispõe de diversos serviços uteis para os seus utentes, como Preparação Individualizada da Medicação (PIM), consultas de podologia, consultas de nutrição, administração de injetáveis, medição de Índice de Massa Corporal (IMC), peso e altura, tensão arterial e parâmetros bioquímicos.

Para que todos os serviços disponíveis sejam possíveis, existe uma equipa organizada para diversas tarefas. As categorias de cada profissional são definidas pelo seguinte organigrama:

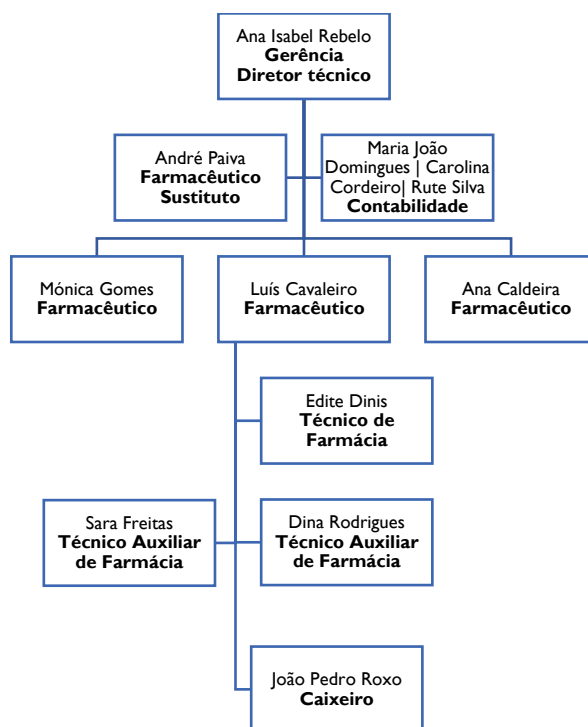


Ilustração I – Organograma da Equipa da Farmácia Estádio com indicação do nome e respetivas categorias profissionais.

Desde o início do período de estágio houve sempre demonstração de preocupação e interesse pelas competências a serem transmitidas, bem como o plano de estágio que a Farmácia propunha, o que assegura um bom estágio curricular.

Desempenhei diversas funções e serviços, entre eles receção de encomendas dos diversos formatos (diárias, instantâneas, manuais ou via verde), gestão de reservas, acondicionamento adequado, regularização de entradas e saídas de psicotrópicos, notas de devoluções, registo e atendimento telefónico a domicílios, observação de preparação e preparação de medicamentos manipulados, preparação individualizada de medicação, medição de parâmetros bioquímicos e fisiológicos (pressão arterial, glicémia, colesterol total e glicémia), formações dermocosméticas, registo de testes rápidos de antigénio (TRAg) a COVID-19, atendimento e dispensa de medicamentos, atendimento de dispensa de receita médica nos seus diversos formatos (receita manual, receita eletrónica), entre muitas outras responsabilidades intrínsecas no papel diário de um farmacêutico.

Análise SWOT

PONTOS FORTES

1. Equipa

Para além de todos os elementos da equipa serem capacitados e que demonstram competências nos diversos serviços que proporcionam, a Farmácia Estádio é composta por elementos diversificados em qualificações e desempenhos, uma vez que é constituída tanto por elementos que contam com anos de experiência, como por farmacêuticos recentes com variadas áreas de especificação. Tornou-se desde logo acessível contactar com todos os elementos da equipa que sempre demonstraram interesse em partilhar conhecimentos e em ajudar em determinadas atividades nas quais sentia alguma dificuldade.

Cada elemento possui determinadas responsabilidades, seja na rápida resposta a instituições, na preparação individualizada da medicação (PIM) ou na preparação de manipulados, o que se verifica numa transparência simples para que não haja sobreposição de tarefas.

2. Localização

Devido à sua localização, no centro da cidade, é facilmente frequentada pela população. A afluência é essencialmente de utentes habituais, uma vez que existem residentes muito próximos à farmácia, o que é uma característica muito favorável devido ao seu movimento habitual, no entanto também é uma componente que incute muita responsabilidade para demonstração de competências no atendimento mais completo, eficaz e o mais rápido possível, dependendo da situação a ser avaliada.

Para além disso, uma vez que está rodeada de clínicas de saúde, existe procura de medicamentos muito específicos para tratamentos prolongados ou temporários, procura essa que é mantida através de um sistema de *stock* sempre atualizado e otimizado, de forma que esses produtos não estejam em falta no momento de interesse do utente.

3. Organização de Produtos

Regularmente, cada farmácia apresenta a sua organização natural dos produtos, sejam eles Medicamentos Sujeitos a Receita Médica (MSRM) ou Medicamentos Não Sujeitos a Receita Médica (MNSRM) ou Produtos de Venda Livre (PVL), como cosméticos,

medicamentos homeopáticos, dispositivos médicos. Tornou-se muito acessível compreender a disposição organizacional dos produtos, mesmo não tendo nenhuma experiência em estágios anteriores. Para além disso, esta etapa inicial do estágio tornou-se crucial para, posteriormente na etapa do atendimento, saber onde estavam dispostos os produtos requisitados ou aconselhados.

4. Plano de Estágio

Desde o momento de apresentação da Farmácia, de todos os elementos da equipa, do seu espaço e da história de evolução, foi apresentado um plano de estágio organizado e com todos os parâmetros que deveriam ser cumpridos ao longo de todo o estágio. A Farmácia Estádio elaborou este plano de acordo com os requisitos da FFUC, envolvendo os seguintes pontos:

- Organização e Gestão de Farmácia;
- Funções relacionadas com o aprovisionamento, armazenamento e gestão de exigências de medicamentos e produtos de saúde;
- Preparação de medicamentos;
- Interação farmacêutico/doente/medicamento;
- Dispensa de medicamentos;
- Informação e documentação científica;
- Automedicação e cuidados de saúde prestados na farmácia.

Todos os parâmetros foram realizados por fases tendo em consideração o desempenho em cada etapa, aumentando o nível de responsabilidade aplicada. Comecei pela receção de encomendas seguido do aprovisionamento dos produtos, o que permitiu logo familiarização e reconhecimento de produtos e do seu objetivo, gestão de logística, gestão de PVF e PVP, alerta de prazos de validade e funcionamento de *Robot de Farmácia (RD Rowa Smart®)* de armazenamento de alguns produtos.

Em paralelo, e apesar de já ter conhecimentos do plano de estudos para o realizar, obtivemos formação acerca de medição de parâmetros bioquímicos e fisiológicos, de modo que todos os procedimentos fossem realizados de modo similar por toda a equipa. Assim, sempre que requisitado, realizei medição dos parâmetros anteriormente referidos, bem como alertei para situações e aconselhamento de consultas fornecidas pela farmácia. As consultas disponíveis para os utentes são consultas de nutrição que eram realizadas no gabinete de utente da farmácia e consultas de podologia, que eram recomendadas mais

regularmente a utentes diabéticos. Preparação Individualizada de Medicação (PIM) também foi uma das tarefas iniciais que era realizado ao longo da semana, gestão de entrada e saída de psicotrópicos e registo de Testes Rápidos de Antigénio (TRAg) compartilhados e não compartilhados, bem como outras funções prévias a atendimento ao público. Tive também oportunidade de auxiliar na preparação de Produtos Manipulados mais simples que são sempre realizados pelo farmacêutico responsável.

Após introdução a todas estas tarefas, comecei a assistir a atendimentos de modo a compreender os diversos processos do atendimento e conseguir conciliar a partilha de aconselhamentos com a gestão do Sistema Sifarma®. Após esta fase inicial, houve uma adaptação a atendimentos, os quais eram seguidos por um farmacêutico da equipa. O farmacêutico realizava o aconselhamento enquanto me ambientava ao sistema Sifarma® que se encontrou uma lacuna, já que nos é fornecido o sistema antigo em MICF e já é utilizado o novo sistema. Passado algum tempo, iniciei atendimentos independentes, tanto em aconselhamentos de determinadas situações particulares, mas também com diverso tipo de receitas, sejam elas eletrónicas, manuais, com diversos planos de participação, bem como diverso tipo de utentes que inculciam cuidados particulares.

5. Sistema de Gestão de Qualidade (SGQ)

Como a Farmácia é certificada relativamente à Qualidade, todos os serviços estão de acordo com a norma NP EN ISO 9001:2015¹, o que implica a sua aplicação contínua. Apesar de existirem maiores exigências de responsabilidades e maior rigor nos serviços, confere maior credibilidade e maior confiança, apesar do possível desconhecimento deste âmbito técnico. Assim sendo, todos os membros da equipa necessitam de cumprir o SGQ, controlado pelo Responsável pela Qualidade, através das Boas Práticas Farmacêuticas (BPF).

6. Preparação Individualizada da Medicação (PIM)

Existem dois tipos de serviços de PIM disponibilizados à população, através da sua preparação de forma manual, utilizando esquema semanal com divisão de “pequeno-almoço”, “almoço”, “jantar” e “deitar” com os respetivos medicamentos a serem tomados (Anexo I). Este serviço pode ser recomendado a utentes que se perceba a sua necessidade, demonstrando o seu benefício e importância, seja devido a elevada quantidade de medicação, várias tomadas diferenciadas e/ou esquecimento frequente do utente.

Também existe um sistema de preparação com auxílio de Máquina de PIM com as mesmas divisórias, mas neste caso em saquetas com os respectivos medicamentos administrados a cada doente, com um esquema terapêutico que todas as semanas é verificado pelos responsáveis por cada doente e pelo farmacêutico responsável pela preparação e programação do esquema (Anexo 2). Este método, apesar dos seus gastos e manutenções, rentabiliza a preparação da medicação, aumenta a rastreabilidade (lotes e validade), diminui o tempo gasto, aumenta a eficiência e diminui possíveis erros. Este esquema é mais frequente para instituições a que são fornecidas medicações, que cada vez mais utilizam este esquema, facilitando o seu trabalho e tornando o esquema farmacoterapêutico de cada utente mais seguro, acessível, compreensível e com maior seguimento de diversos profissionais de saúde que analisam e realizam revisão farmacoterapêutica, sendo um método que beneficia o utente.

7. Reuniões *Kaizen*

As Reuniões *Kaizen* surgiram como um conceito de sugestão de mudanças ou melhorias que a equipa considera relevantes para alcançar novas metas e melhoria de desempenho². Assim, através de reuniões regulares, este método tem como objetivo otimizar, reduzir espaços, tempos e recursos, elaborando um plano de gestão particular e personalizando, consoante as necessidades e metas da farmácia.

Esta iniciativa, que nem todas as farmácias optam por introduzir, produz maior eficiência e progressão da farmácia, levando a maiores resultados e melhorias necessárias.

PONTOS FRACOS

I. Plano Curricular de MICEF

Ao longo do estágio, deparei-me com a dificuldade em lidar com situações práticas e diárias de um farmacêutico, o que me mostrou a realidade do atual funcionamento do ensino. Apesar de ser vasto em conhecimentos, Unidades Curriculares e partilha de ensinamentos, o ensino atual instaurado em MICEF, não apresenta o verdadeiro contacto com a profissão farmacêutica no âmbito de Farmácia Comunitária. Uma vez que a maioria das horas de estágio a serem cumpridas são em Farmácia Comunitária (810 horas), seria interessante incluir mais praticidade deste regime no plano de estudos, evitando, assim, uma lacuna no exercício do estágio. Apesar disso, é possível a realização de estágio de verão e

outras oportunidades que podem ser apresentadas, no entanto, não considero que sejam experiências que cubram completamente a falta de componente prática que se verifica no plano de estudos de MICF.

Esta realidade é maioritariamente vivenciada quando decorre o início do atendimento. Sendo um momento muito ansiado, torna-se também um momento onde reconheci falta de confiança, uma vez que não possuía qualquer experiência, nem relativamente ao modo de abordagem a cada situação, nem da forma como deveria aconselhar quando me fosse requisitada alguma opinião. Naturalmente que apenas com repetição de atendimentos e confronto com diversas situações se ganha experiência, no entanto, considero que se houvesse algum treino em determinadas Unidades Curriculares seria benéfico para todos os alunos.

2. Venda de MNSRM fora das farmácias e Automedicação

Já que é possível a venda de MNSRM em parafarmácias e grandes superfícies comerciais, apesar de facilitar o acesso destes medicamentos, promove a automedicação que pode originar possíveis problemas de saúde. Assim sendo, mesmo o farmacêutico explicar potenciais prejuízos e mostrar alternativas viáveis, o utente acaba por decidir pelo que lhe é mais conveniente e não pela recomendação.

Por diversas vezes fui confrontada com situações de abordagem delicada nas quais o utente não cumpria com as recomendações de uso do fármaco, podendo provocar situações de saúde complicadas como episódios de intoxicação, hipersensibilidade e resistência a medicamentos. Por este motivo, considero como um ponto fraco do meu estágio a dificuldade de abordagem a estas situações.

OPORTUNIDADES

1. Produtos Manipulados

Para que seja possível fornecer à população todo o tipo de produtos com características particulares para cada utente, a Farmácia possui um laboratório equipado, o que permite preparar produtos manipulados. Para isso, é necessário cumprir com as boas práticas de preparação de medicamentos manipulados em farmácia de oficina³ e hospitalar e também cumprir a prescrição e a preparação de medicamentos manipulados⁴.

Apesar de não ter realizado nenhum manipulado, tive oportunidade de auxiliar na preparação de cápsulas à base de minoxidil para promover crescimento capilar e visualizar outras preparações. Além disso, tive a percepção do método de cálculo para definição do preço final, através do cálculo das matérias-primas, mão-de-obra, gastos associados entre outros⁵.

Assim sendo, vejo como uma oportunidade de estágio a preparação de produtos manipulados, uma vez que permite distinguir a formação dos estagiários, bem como criar uma mais-valia para possíveis oportunidades profissionais.

2. Formações

Como é natural, informações novas e produtos novos são criados constantemente, o que se torna complicado de manter sempre atualizado. Assim sendo, no Código Deontológico consta que a correta prática da profissão farmacêutica deve estar associada aos constantes desenvolvimentos farmacêuticos de todos os âmbitos⁶. Por isso, a equipa está sempre atualizada relativamente a formações disponíveis e, uma vez que demonstrei interesse em participar nas mesmas, tive oportunidade de receber formações no âmbito de dermocosmética, nomeadamente formações da Bioderma[®], Caudalie[®] e Uriage[®]. Todas elas complementaram a informação que já possuía do curso, o que permitiu unir conhecimentos científicos com o aconselhamento dos produtos certos e, também, saber como abordar as questões ao utente. Por vezes era possível abordagem formativa na Farmácia por algumas marcas, nomeadamente Curaprox[®], Fisiocrem[®] e Nurofen[®] que permitiram conhecer algumas utilidades distintas de produtos, o que foi benéfico para um aconselhamento diferenciado e mais assertivo.

Estas formações foram uma oportunidade, já que, de outra forma, não teria acesso às mesmas, promovendo novos conhecimentos e novos âmbitos pedagógicos complementares.

3. Preparação Individualizada da Medicação (PIM)

Apesar de já ter colocado como um dos Pontos Fortes do estágio, classifico como uma oportunidade para futuras etapas de plano de estágio. Uma vez que não temos uma abordagem prática deste tema, seria interessante inseri-lo para que haja um ensino amplo de todas as componentes teóricas que estão incluídas no plano de estudos. Apesar disso, é algo que depende naturalmente dos serviços disponibilizados pela farmácia em questão e, por

esse motivo, pode ser um dos componentes a ter em atenção aquando da escolha do local de estágio.

Quando abordado em diversas Unidades Curriculares, PIM sempre foi um serviço pelo qual me interessei, pelo que se tornou uma oportunidade conveniente e útil para que pudesse experienciar as diversas formas de realização deste serviço.

4. Gestão de vendas e Organização – Grupo Maisfarmácia

Apesar de ao longo do plano curricular abordarmos tanto as diversas formas de gestão de uma farmácia, tanto a sua forma de organização, cada farmácia realiza a sua gestão e organização de formas distintas. Por exemplo, farmácias que façam parte do Grupo Maisfarmácia e integram as Farmácias Portuguesas, não só possuem diversos objetivos que devem cumprir, como também existem produtos que devem estar em exposição, que fazem parte desse grupo, e que têm uma disposição específica. O cartão das Farmácias Portuguesas associado a este grupo, através da acumulação de pontos com a posterior possibilidade de estes serem utilizados em determinados produtos ou em vales de desconto numa compra.

Para isso, existem objetivos coletivos e objetivos individuais, de forma a motivar cada membro da equipa, bem como fomentar o trabalho em equipa, cultivando proatividade, que interpretei como um ponto muito forte tanto para a farmácia como para o meu estágio, uma vez que me levou a conhecer ainda mais todos os produtos e serviços disponíveis como também para melhorar cada vez mais a minha forma de atendimento, de aconselhamento cruzado e transmissão de informações relevantes para cada utente.

Este método permite criar sistemas de gestão e estratégias de marketing farmacêutico de modo a incentivar a equipa a cumprir os objetivos delineados, mas sem deixar de esquecer o elemento principal, o utente e a satisfação das suas necessidades.

5. Vivenciar Duas Realidades

Ao longo do tempo de estágio e devido ao agravamento no número de casos de COVID-19, houve diversas equipas que viram o seu número de elementos reduzidos, devido a possíveis contactos ou devido a um caso de COVID-19. A Farmácia em questão, devido a este problema, contactou a Diretora Técnica da Farmácia Estádio, Dra. Ana Isabel Rebelo que prontamente falou com alguns estagiários de forma a questionar se estaríamos disponíveis para ajudar, pelo que, durante uma semana tive a oportunidade de conhecer uma

realidade diferente, não só de organização de produtos e gestão da farmácia, mas também na abordagem aos utentes que eram maioritariamente utentes fidelizados e regulares.

Uma vez que a organização da maioria dos produtos na Farmácia Estádio é realizada pelo *Robot de Farmácia (RD Rowa Smart®)*, quando deparada com a organização por gavetas, esta situação tornou-se uma oportunidade de conhecer outros métodos que de outra forma me era desconhecido.

AMEAÇAS

1. Sistema Informático Sifarma®

Durante o curso, tive a oportunidade de contacto com o Sifarma 2000®, uma ferramenta organizada pela *Glintt®*, que de certa forma ajudou a que o seu funcionamento seja intuitivo. No entanto, está em vigor o novo sistema do Sifarma 2020® que apresenta um formato mais atualizado e com um formato diferente o que levou a que em determinados momentos iniciais do seu funcionamento, necessitar de algum apoio e explicação do seu uso.

Uma vez que a sua utilização na Farmácia varia, em alguns momentos tornou-se confuso, porque muitas das suas funções não se encontram ainda a funcionar na sua plenitude. As encomendas são um exemplo, já que existem diversas funcionalidades que não estão prontas para o seu uso, por isso, utiliza-se ainda o sistema anterior. Já quando se trata de atendimento e gestão de encomendas e produtos, o sistema mais recente é utilizado, sendo uma mais-valia devido à sua informação científica disponibilizada de uma forma muito acessível, acesso ao histórico de cada utente caso possua ficha atualizada na farmácia, bem como encomendas e reservas disponíveis.

2. Medicamentos homeopáticos

Devido à localização da Farmácia Estádio, existem diversas clínicas na sua proximidade, o que leva a que alguns dos seus clientes venham direcionados das mesmas. Um desses casos é uma clínica de medicina integrativa que direciona os seus utentes para a farmácia, uma vez que os produtos se encontram sempre disponíveis.

Assim sendo, tive contacto com diversos produtos homeopáticos, no entanto este não é um assunto que seja abordado no plano curricular, por este motivo, em situação de questões sobre estes produtos é algo complicado de abordar. Existe cada vez mais procura por estes produtos, por isso considero uma ameaça não haver contextualização destes

mesmos produtos ao longo do curso de modo que possamos realizar um aconselhamento correto e com informação diferenciada.

Casos Clínicos

Caso Clínico 1

FB, um senhor de 50 anos saudável, dirige-se à farmácia devido a desconforto associado a “prisão de ventre”, solicitando Dulcolax® (bisacodilo). Após realizar algumas questões ao utente relativamente ao motivo do seu pedido, apercebi-me que se tratava de uma situação recorrente e que, sempre que acontecia, o utente utilizava sempre este produto. Devido às características deste medicamento, expliquei ao utente que o uso sistemático destes medicamentos poderia levar a desidratação por perda de água resultante do seu mecanismo de ação, assim como poderia causar habituação. O utente mencionou que estava em teletrabalho e que tinha alterado a sua dieta. Mencionei que obstipação é muito comum em casos de pessoas que se encontram em muitas situações de stress, que estão muito tempo sentadas, que sofrem alteração de dieta e que ingerem menos líquidos, por esse motivo alertei para aumentar a ingestão de alimentos ricos em fibra para aumentar o volume das fezes e torná-las mais macias, levando à sua progressão pelo intestino, como são exemplo legumes, frutas e cereais. Para além disso, alertei para beber mais água, praticar alguma atividade física (por exemplo caminhadas) para estimular e facilitar a progressão das fezes. Adicionalmente, mencionei a importância de criar um hábito de defecação (ir à casa de banho, preferencialmente de manhã após o pequeno-almoço, com tempo e nunca ignorar a vontade de defecar), levando a reeducação dos intestinos. De forma que sentisse um alívio mais imediato, aconselhei Duphalac® ou o Laevolac® Ameixa, que como são ambos compostos por lactulose, são laxantes osmóticos, promovendo o efeito pretendido com menor irritação da mucosa intestinal, apesar de só se fazerem notar ao fim de 2 a 3 dias de tratamento. A dose recomendada é de 30 mL por dia em duas tomas, uma antes do pequeno-almoço e outra antes do almoço.

Caso Clínico 2

AB, uma senhora de 45 anos, dirige-se à farmácia solicitando um produto para tratamento de fungos nas unhas. Após perceber que o tratamento se indicava para as unhas dos pés, questionei qual o sinal que a unha apresentava. A utente afirmou que a unha apresentava uma mancha amarelada na extremidade e que lhe parecia baça, sem o brilho

natural da unha. Tratando-se de uma onicomicose, uma infeção fúngica comum nas unhas, aconselhei-lhe Nailner[®], um verniz antifúngico de aplicação na unha que necessita de tratamento.

Expliquei que deveria aplicar o verniz 2 vezes por dia (manhã e noite) nas primeiras 4 semanas de tratamento. Após este período, a aplicação pode ser realizada 1 vez por dia, até ao período de renascimento da unha. Expliquei que a primeira etapa para cada aplicação seria limar a área afetada da unha, utilizando as limas descartáveis do produto, de seguida utilizar as saquetas que contém uma compressa com álcool para limpar a unha e, por fim aplicar o verniz na superfície da unha afetada com as espátulas do produto e deixar secar. Sendo um processo moroso dependendo do crescimento da unha, alertei para a fulcral continuidade do tratamento.

Além disso e de forma que evitar reaparecimento ou progressão do fungo, mencionei a importância de higiene dos pés, bem como a sua secagem, trocar de meias diariamente ou sempre que sentir os pés transpirados, evitando a humidade que estimula o desenvolvimento do fungo. Alertei para evitar o uso de calçado apertado e uso de verniz ou unhas falsas, para evitar acumulação de humidade. A unha não deve estar coberta, para não camuflar a sua aparência. De modo a poder realizar manutenção do fungo ou caso piore, informei a possibilidade de frequentar uma consulta de podologia, disponível na farmácia.

Caso Clínico 3

SR, senhor de 40 anos, dirige-se à farmácia solicitando Antigrippine[®] Trieffect. Após ter questionado quais os sintomas que apresentava, o utente informou que tinha realizado teste à COVID-19 para despiste da doença, mas que sentia congestão nasal e pressão naquela região. Questionei e tinha algum quadro de febre ao que o utente me respondeu de forma negativa e, posteriormente, questionei se sentia algum pingão no nariz e espirrava frequentemente. O utente, após pensar um pouco, afirmou que apresentava os dois sintomas. Como o utente não apresentava nenhuma doença diagnosticada, aconselhei o uso de *Spray* Nasal Vibrocil[®] Actilong Duo (brometo de ipratrópio + cloridrato de xilometazolina), já que este é aconselhado em situações de congestão nasal, pingão no nariz, rinorreia, pressão sinusal e espirros.

Indiquei que devia utilizar uma pulverização em cada narina, no máximo 3 vezes por dia, durante 7 dias, tendo o cuidado de fazer intervalo entre cada administração de, pelo menos, 6 horas. Deve inclinar a cabeça ligeiramente para a frente e tapar a narina oposta e

inspirar simultaneamente à pulverização. Além deste produto, evidenciei a importância de realizar limpeza prévia nasal e, por esse motivo, aconselhei limpeza com soro fisiológico. Alertei, também, para possível secura das vias nasais quando usado por tempo prolongado, por isso aconselhei o lubrificante nasal Wet® Gel Nasal, para evitar este efeito. Caso a situação piore ou persista, consultar farmacêutico ou médico.

Considerações Finais

Após este período de estágio, posso afirmar que foi dos maiores desafios de todo o meu percurso em MICF. Sem qualquer dúvida que foi uma experiência enriquecedora, que me permitiu consolidar muitos conhecimentos que adquiri ao longo do curso, conhecer a verdadeira realidade de funcionamento de uma farmácia e, também, conhecer o percurso do medicamento numa farmácia.

Considero que a área de Farmácia Comunitária é a que mais consegue efetivamente criar uma ligação do farmacêutico com a comunidade e é visível o esforço feito diariamente para que o utente se sinta acompanhado no local de saúde. Todos os desafios diários contribuíram para o meu enriquecimento profissional e agradeço a todos os membros da Farmácia Estádio por todos os ensinamentos que me transmitiram.

Com intenção de me manter em constante aprendizagem, termino esta etapa com reforço de admiração pela profissão farmacêutica, esperando contribuir para o aumento da sua valorização.

Bibliografia

1. Norma Portuguesa - Sistemas de Gestão da Qualidade Requisitos (ISO 9001:2015) - 2015) 1–40.
2. CRUZ, Juliana Machado - **Kaizen - melhoria contínua - Administração - InfoEscola** [Consult. 19 ago. 2021]. Disponível em :https://www.infoescola.com/administracao_/kaizen/
3. DIÁRIO DA REPÚBLICA: Portaria N.º 594/2004 de 2 de junho - Aprova as boas práticas a observar na preparação de medicamentos manipulados em farmácia de oficina e hospitalar (2004) 2439–2441.
4. DIÁRIO DA REPÚBLICA: Decreto-Lei n.º 95/2004 de 22 de abril - Regula a prescrição e a Prep. Medicam. Manip. (2004) 3441–3445.
5. INFARMED - Portaria n.º 769/2004 , de 1 de Julho. Estabelece que o cálculo do preço de venda ao público dos medicamentos manipulados por parte das farmácias é efectuado com base no valor dos honorários da preparação, no valor das matérias-primas e no valor dos materiais de embalagem (2004) 4–7.
6. Código deontológico da ordem dos farmacêuticos - [s.d.]).

Anexos

Anexo I – Imagens de diversas formas de Preparação Individualizada da Medicação (PIM)



Ilustração 1 - PIM manual.



Ilustração 2 - PIM com auxílio de Máquina de Preparação Individual de Medicação.

Anexo 2 – Máquina de Preparação de Medicação

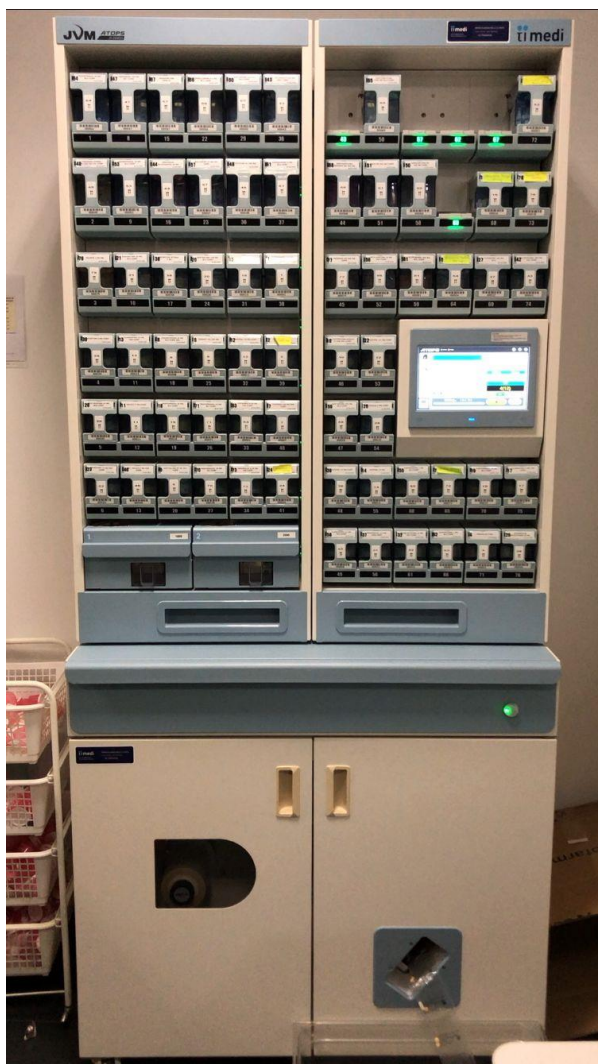


Ilustração 3 - Máquina de PIM.



Ilustração 4 - Tabuleiro de Máquina de PIM.

Anexo 3 – Robot de Farmácia (RD Rowa Smart)



Ilustração 5 - Robot de Farmácia (RD Rowa Smart®).

PARTE II

Relatório de Estágio em Assuntos Regulamentares



Sob Orientação de: Dra. Beatriz Costa

Lista de Abreviaturas

BasePoint – *BasePoint Consulting Services*

CIR – *Cosmetic Ingredient Review*

CosIng – *Cosmetic Ingredient database*

ECHA – *European Chemicals Agency*

FDA – *Food and Drug Administration*

FFUC – *Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra*

MICF – *Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas*

PIF – *Product Identification File*

RDM – *Regulamento relativo a Dispositivos Médicos*

SCCS – *Scientific Committee on Consumer Safety*

SFDA – *Saudi Food & Drug Authority*

SWOT – *Strenghts, Weaknesses, Opportunities, Threats*

Introdução

O Estágio Curricular do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas (MICF) da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra (FFUC), para além do âmbito da Farmácia Comunitária contempla a possibilidade de realizar mais uma etapa de estágio numa outra área. Por este motivo, escolhi a área dos Assuntos Regulamentares para que pudesse experienciar um domínio diferente da profissão farmacêutica.

Tomei a decisão de realizar a segunda parte do estágio na *BasePoint Consulting Services*, empresa que presta serviços de consultoria a diversas empresas para facilitar a conclusão de etapas regulamentares necessárias. Estes serviços englobam diversas áreas de competência para as quais um farmacêutico é essencial, como é o caso de Produtos Cosméticos, Suplementos Alimentares, Dispositivos Médicos, Biocidas e Produtos Químicos.

Atualmente, o papel do farmacêutico, para além da área científica e química que naturalmente se impõe, necessita de conhecimentos de direito, gestão, *marketing* e muitos outros, o que se tornou uma base essencial para o desempenho deste estágio e me ajudou a abrir horizontes relativamente a todas as opções disponíveis para exercer a profissão farmacêutica. Ao longo do período de estágio foi possível aprofundar conhecimentos na área dos Assuntos Regulamentares, nas valências acima mencionadas. Assim, tive oportunidade de aprofundar conhecimentos em áreas como Produtos Cosméticos, Suplementos Alimentares e Dispositivos Médicos.

Realizei estágio curricular em Indústria, mais especificamente em Assuntos Regulamentares, na *BasePoint Consulting Services* sob orientação da Dra. Beatriz Costa durante o período de 4 de maio de 2021 a 30 de julho de 2021, perfazendo um total de 430 horas de estágio. Devido à situação pandémica o estágio foi realizado em formato de teletrabalho.

O relatório encontra-se organizado segundo as Normas Orientadoras da Unidade Curricular “Estágio” 2020/2021, com Análise SWOT correspondente, definindo os Pontos Fortes (*Strengths*) e Fracos (*Weaknesses*) do estágio curricular, bem como Oportunidades (*Opportunities*) e Ameaças (*Threats*) a ser destacadas após a realização do estágio.

BasePoint e sua Equipa

A BasePoint Consulting Services é uma empresa de prestação de serviços de consultoria que se encontra sediada em Coimbra, especificamente na Rua Padre Estevão Cabral n.º 79, Sala 105, 3000-317 Coimbra, com horário de funcionamento das 9h às 19h durante os dias úteis. Exerce as suas funções desde 2015 e tem como objetivo principal gerar um novo género de serviços de consultoria para os seus clientes. Além de lidar com um vasto número de clientes nacionais, conta já com muitos clientes internacionais, uma vez que conseguem acompanhar os clientes em qualquer fase de desenvolvimento dos produtos, sejam eles Cosméticos, Suplementos Alimentares, Dispositivos Médicos, Biocidas e Produtos Químicos. Exercem diversos serviços de apoio sejam eles inspeções, certificações e/ou notificações, primando por criar soluções aprimoradas para resolução de problemas específicos.

A equipa é composta por 5 membros atualmente, Dr. David Costa, Dra. Carmen Pinto, Dra. Beatriz Costa, Dra. Inês Martins e Dra. Jéssica Silva, sendo esta uma equipa multidisciplinar e organizada.

Durante o estágio tive a oportunidade de contactar com as áreas de cosméticos, suplementos alimentares e dispositivos médicos e realizar as mais diversas atividades, como avaliação de rotulagem das três áreas, realização de Ficheiros de Identificação do Produto, mais conhecido pelo termo em inglês *Product Identification File* (PIF) relativos a produtos cosméticos, pesquisas sobre variados temas, como reconhecimento mútuo, requerimentos relativos a *Food and Drug Administration* (FDA) e *Saudi Food & Drug Authority* (SFDA), bem como duas apresentações a ser realizadas para a equipa, a primeira sobre ISO 16128 relativa a definições técnicas de produtos cosméticos naturais e orgânicos e a segunda apresentação sobre as alterações que foram realizadas recentemente referentes aos Dispositivos Médicos, o Regulamento Relativo aos Dispositivos Médicos (RDM).

Análise SWOT

PONTOS FORTES

1. Equipa

Sendo uma equipa multidisciplinar, todos os seus membros possuem funções específicas o que permite uma organização constante das tarefas a serem realizadas. Além disso, uma vez que trabalhamos em teletrabalho, era possível uma comunicação praticamente imediata com todos os elementos através da utilização de *Microsoft Teams*, onde recebia informação dos objetivos que iam sendo propostos e colocava as dúvidas que iam surgindo. Desde logo foi muito acessível esta comunicação, uma vez que sempre demonstraram interesse em ajudar, manifestaram motivação e confiança e vontade de transmissão de conhecimentos apesar das circunstâncias do teletrabalho. De referir que ter uma colega de curso a realizar o estágio simultaneamente facilitou a adaptação.

2. Formações Internas

O Estágio iniciou com uma demonstração do que iríamos realizar durante esse período e com uma breve apresentação das formações que iriam ser divididas em módulos. A primeira formação recaiu sobre as bases gerais de Regulamentos, Decretos-Lei e Diretivas, que se mostrou muito importante para conseguir interpretar todos os documentos a analisar ao longo do estágio. De seguida, realizei uma formação associada a Avaliação de Rotulagem de Produtos Cosméticos e, posteriormente formação de como realizar PIF's de Produtos Cosméticos onde se abordou e analisou pormenorizadamente o Regulamento (CE) n.º 1223/2009 de 30 de novembro¹ e o Decreto-Lei n.º 189/2008 de 24 de setembro². Para a realização das Avaliações de Rotulagem e dos PIF's foram disponibilizados os documentos base para que pudesse adicionar a informação correta para que os documentos ficassem todos uniformizados. Também se tornou crucial a pesquisa em diversas plataformas como *European Chemicals Agency (ECHA)*, *Cosmetic Ingredient database (CosIng)*, *Cosmetic Ingredient Review (CIR)* e *Scientific Committee on Consumer Safety (SCCS)*.

Posteriormente, obtive formação sobre Legislação de Suplementos Alimentares onde decorreu a análise do Decreto-Lei n.º 118/2015 de 23 de junho³ de modo a que pudesse proceder a Avaliação de Rotulagem e Notificação de Suplementos Alimentares, com análise de ingredientes, aditivos alimentares, alegações de saúde, informações ao consumidor e ingredientes proibidos. Foram disponibilizados, à semelhança dos cosméticos, documentos

base para analisar a informação corretamente e para que ficassem todas as avaliações uniformes.

Como último tema, foi abordada a Legislação de Dispositivos Médicos, através da análise do Regulamento (EU) n.º 2017/745 de 5 de abril⁴, que permitiu perceber as regras necessárias para colocação no mercado e a sua disponibilização. Em primeira instância realizei Avaliação de Rotulagem de dispositivos médicos e, como última tarefa, realizei pesquisa, sugestão de rótulo e documentação técnica de um Dispositivo Médico.

3. Responsabilidades Dirigidas

Ao longo do estágio foram indicadas tarefas e, apesar de haver sempre disponibilização para esclarecimento de dúvidas, entregues quando finalizadas. Este método permitiu transmitir confiança no trabalho, criar autonomia e gerar desenvolvimento pessoal, através de pesquisa e análise dos documentos apresentados nas formações a título pessoal. Assim, a responsabilização e as tarefas dirigidas permitiram que me esforçasse na realização de pesquisas e apresentar as tarefas com a máxima informação.

PONTOS FRACOS

1. Impossibilidade de Reuniões com Equipa e Clientes

Devido ao formato teletrabalho, não foi possível experienciar todas as oportunidades que poderiam estar disponíveis, como as Reuniões com a Equipa e as Reuniões com Clientes. Assim sendo, devido à situação pandémica atual, não foi possível contactar com a experiência completa, o que impossibilitou desenvolver capacidades que em formato presencial teria sido possível.

2. Plano Curricular de MICE

As Unidades Curriculares de MICE apresentam uma vasta gama de conhecimentos teóricos importantes para a formação do farmacêutico. No entanto, não é possível ter contacto com contextos reais ao longo do curso, o que se tornou notório quando foram abordadas as bases legais essenciais para a realização do estágio. Sem este conhecimento prévio não seria possível realizar muitas das tarefas propostas ao longo do estágio, salientando a análise dos variados documentos apresentados.

Além disso, as áreas de Suplementos Alimentares e de Dispositivos Médicos, não foram abordadas na componente de Assuntos Regulamentares, o que leva a uma lacuna, dificuldade de compreensão e necessidade de maior acompanhamento exigido neste formato de estágio.

OPORTUNIDADES

1. Diversidade de Estágios

A área dos Assuntos Regulamentares é um âmbito diferenciado da profissão farmacêutica, no qual o seu conhecimento e desempenho são essenciais, por esse motivo escolhi esta área e, também, para experienciar um domínio diferente da formação base do farmacêutico. Uma vez que é difícil entender as diferentes vertentes do exercício da profissão, foi uma ótima oportunidade para perceber o papel do farmacêutico e todos os âmbitos nos quais as competências do mesmo são cruciais e adquirir novas competências que são abordadas ao longo de curso de MICF, tornando os ensinamentos teóricos em concretizações práticas.

2. Experiência em Áreas Variadas

Sendo uma empresa de Consultoria tive a oportunidade de trabalhar em diversas áreas, como Produtos Cosméticos, Suplementos Alimentares e Dispositivos Médicos, o que me permitiu expandir horizontes já abordados em MICF, mas sem abordagem prática dos mesmos. Todas as experiências foram muito enriquecedoras, o que me permitiu apresentar uma maior diversidade de conhecimentos, adquirindo ferramentas de trabalho, confronto de experiências com profissionais competentes e experientes nesta área.

AMEAÇAS

1. Pesquisa com Informação Reduzida

Muitos dos documentos requisitados pelos clientes, como por exemplos PIF's, necessitam de informações fornecidas pelos mesmos. Assim sendo, caso faltassem determinadas informações de matérias-primas ou se constatasse falta de documentação essencial, era necessário contactar com os clientes solicitando estas mesmas informações, de modo que fossem realizados corretamente os documentos pedidos. Também ocorreram situações em que foram realizadas pesquisas de modo a clarificar os clientes ou para

complementar a informação adquirida previamente. Estas situações de certo modo atrasam o trabalho da equipa, mas conseguiram ser sempre superadas.

2. Formato de Trabalho

Uma vez que o período de estágio realizado foi em formato de teletrabalho, apesar de mantermos comunicação constante através de *Microsoft Teams* e realizar reuniões para formações ou para *feedback* com os orientadores através da mesma plataforma, este formato não permitiu conhecer o ambiente de trabalho da empresa e não permitiu que existisse complementaridade nem contacto pessoal entre membros da equipa e os estagiários. Destaco este formato de estágio uma ameaça, já que considero que haveria maior desenvolvimento e caso o estágio fosse realizado em formato presencial, mas não o considero como um ponto fraco, uma vez que este cenário se deveu à situação pandémica atual, com a possibilidade de regressar ao formato presencial.

Considerações Finais

Com o término do estágio, posso concluir que foi uma experiência muito desafiante que me mostrou um universo novo de opções no âmbito da profissão farmacêutica. Não sendo uma área que me despertasse curiosidade numa primeira instância, esta experiência criou uma atenção pelos Assuntos Regulamentares, com uma abrangência e um peso profissional que eu não imaginava.

Apesar de não ter a oportunidade de contactar diretamente com clientes, consegui captar a essência do que engloba trabalhar em empresas de Serviços de Consultoria, bem como ganhar habilidades de apresentação e métodos de trabalho.

Ter a vantagem de contactar com os diversos produtos para além do medicamento, permitiu-me compreender a globalidade da profissão e considero esta experiência como uma etapa muito positiva do meu estágio curricular. Agradeço a toda a equipa da BasePoint por todos os ensinamentos e por me auxiliarem e esclarecerem sempre as minhas dúvidas sobre todos os assuntos, diariamente.

Bibliografia

1. REGULAMENTO (CE) n.º 1223/2009 DO PARLAMENTO EUROPEU E DO CONSELHO de 30 de Novembro de 2009 relativo aos produtos cosméticos - (2009).
2. Decreto-Lei n.º 189/2008, de 24 de Setembro - (2008).
3. Decreto-Lei n.º 118/2015 de 23 de junho - (2015) 4–9.
4. REGULAMENTO (UE) 2017/745 DO PARLAMENTO EUROPEU E DO CONSELHO de 5 de abril de 2017 - 9:(2017) 1–228.

PARTE III

Monografia

“State of the art of multi-mycotoxins determination methods in groundnuts (peanuts)”

Sob Orientação de: Professora Doutora Ana Teresa Sanches Silva

List of Figures

Figure 1 – Aflatoxins chemical structures.....	48
Figure 2 – Ochratoxin A (OTA) chemical structure.....	49
Figure 3 – Fumonisin B1 and B2 chemical structures.....	49
Figure 4 – Zearalenone (ZEA) chemical structure.....	50
Figure 5 – Chemical structures of the most common trchothecenes.....	50
Figure 8 – Chemical structures of beauvericin and enniatins.	51

List of Tables

Table 1 – Maximum levels for certain mycotoxins in groundnuts, nuts and dried fruits according to Commission Regulation (EC) No 1881/2006 and its amendments.....	80
Table 2 - Analytical Techniques for mycotoxins determination in peanuts and multi-mycotoxins determination.....	81
Table 3 – Notification of mycotoxins in groundnuts from RASFF	87
Table 4 - Influence of different Decontamination Techniques	88

List of Abbreviations

AFB1 – Aflatoxin B1

AFB1-BSA – Aflatoxin B1 Bovin Serum Albumin

AFB2 – Aflatoxin B2

AFG1 – Aflatoxin G1

AFG2 – Aflatoxin G2

AFM1 – Aflatoxin M1

AIdnbs – Anti-Idiotypic nanobodies

Anti-AFB1 mAb – Monoclonal Antibody against Aflatoxin B1

ATA – Alimentary Toxic Aleukia

a_w – Water Activity

BEA – Beauvericin

CE – Capillary Electrophoresis

CO₂ – Carbon Dioxide

CYP1A2 – Cytochrome 1A2

CYP450 – Cytochrome 450

DLLME – Dispersive Liquid-Liquid Microextraction

DNA – Deoxyribonucleic acid

DON – Deoxynivalenol

EFSA – European Food Safety Authority

ELISA – Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

EN – Enniatins

ESI – Electrospray Ionization

EU – European Union

FBI – Fumonisin B1

FB2 – Fumonisin B2

FLD – Fluorescence Detector

GC – Gas Chromatography

GNP-SA – Gold Nanoparticle-based Strip Assay

HPLC – High-Performance Liquid Chromatography

HPTLC – High-Performance Thin Layer Chromatography

HRMS – High Resolution Mass Spectrometry

IAC – Immunoaffinity Chromatography Columns

IARC – International Agency for Research on Cancer

IgG – Immunoglobulin G

LAB – Lactic Acid Bacteria

LC – Liquid Chromatography

LC-MS – Liquid-Chromatography and Mass Spectrometry

LC-QQQ-MS – Liquid Chromatography Triple Quadrupole Mass Spectrometry

LD50 – Median Lethal Dose

LOD – Limit of Detection

LOQ – Limit of Quantification

MBs – Magnetic Beads

MFC – Multifunctional Columns

mRNA – Messenger Ribonucleic Acid

MS – Mass Spectrometry

MS/MS – Tandem Mass Spectrometry

MSPD – Matrix Solid-Phase Dispersion

MSPE – Magnetic Solid-Phase Extraction

OPTLC – Over Pressured Thin Layer Chromatography

OTA – Ochratoxin A

OVA – Ovalbumin

QDs – Quantum dots

Q-Orbitrap – Quadrupole-Orbital Ion Trap

QuEChERS – Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe

RASFF – Rapid Alert System for Food and Feed

R_f – Retention factor

RIA – Radioimmunoassay

SERS – Surface-enhance Raman Scattering

SFE – Supercritical Fluid Extraction

SLE – Solid-Liquid Extraction

SPE – Solid Phase Extraction

SPME – Solid Phase Micro-Extraction

SPR – Surface Plasmon Resonance

ss – Single stranded

TLC – Thin Layer Chromatography

TOF – Time-of-Flight

TRFICA – Time-Resolved Fluorescence Immunochromatography Assay

UHPLC – FLD – Ultra-High Performance Liquid Chromatography coupled with Fluorescence Detector

UHPLC – Ultra-High Performance Liquid Chromatography

UPLC-TQEF-MS/MS – Ultra Performance Liquid Chromatography-Thermo Quadrupole Exactive Focus tandem Mass Spectrometry

USA – United States of America

UV – Ultraviolet

ZEA – Zearalenone

Abstract

Mycotoxins are secondary metabolites originated from several species of fungi that have proven to demonstrate high toxicity. In addition, potential contamination sources can promote increased human exposure to adverse effects of these toxins. For this reason, it was necessary to develop several analytical methods that allow detection with the highest possible sensitivity for these toxic metabolites. Furthermore, since these methods involve particular costs, time and sensitivities, the development of multi-analyte detection methods is indispensable. The increasing consumption of groundnuts (legumes) as well as nuts (such as almonds, walnuts, pistachios) and dried fruit (dried figs and dried figs) has increased the risk of poisoning and the harmful effects of mycotoxins, which has encouraged studies for the creation of these methods. This work compiles some of the methods applied to analyse and quantify mycotoxins in groundnuts (peanuts) in junction with decontamination techniques. Methodologies presented in this review are predominantly based in nuts and dried fruits analytical technologies, however every methodology can be compared and used in groundnuts analysis. It was also relevant to elevate the importance of the development of multi-analyte methods in order to identify multiple mycotoxins using a single method, saving time, money and resources.

Keywords: Aflatoxins, Co-occurrence, Chromatography, Detoxification, Dried fruits, Groundnuts, Immunoassay, Multi-analyte, Mycotoxins, Nuts.

Resumo

As micotoxinas são metabolitos secundários de várias espécies de fungos e produzidos em condições específicas. A maioria deles provou ter uma elevada toxicidade. Além disso, diferentes fontes de contaminação podem promover uma maior exposição humana a estas toxinas, que afetam negativamente a saúde. O consumo crescente de amendoins (leguminosas) bem como de frutos secos (como amêndoas, nozes, pistácios) e frutos secos (figos secos e uva passa) aumentou o risco de envenenamento e os efeitos nocivos das micotoxinas, o que encorajou estudos para o desenvolvimento e validação destes métodos. Por esta razão, foram desenvolvidos métodos analíticos com o objetivo de detetar e quantificar estes metabolitos tóxicos com especificidade, baixos limites de deteção, boa precisão e exatidão. Este trabalho identifica as micotoxinas mais comuns nos amendoins, frutos secos e frutas de casca rijas e compila métodos de multi-micotoxinas aplicados à determinação destes contaminantes nos amendoins. Além disso, aborda também técnicas capazes de descontaminar amendoins, frutos secos e frutos secados. As metodologias analíticas apresentadas nesta revisão são predominantemente aplicadas aos amendoins, embora em alguns casos sejam comparadas com as aplicadas aos frutos secos. Nos últimos anos existe uma tendência na utilização de métodos que permitem a determinação simultânea de diferentes micotoxinas, tais como a cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa sequencial (*tandem*). Estes métodos são os chamados métodos de multi-micotoxinas e permitem poupar tempo, custos e recursos.

Palavras-chave: Aflatoxinas, Amendoins, Coocorrência, Cromatografia, Descontaminação, Frutos secos, Frutos secados, Imunoensaios, Multi-análito, Micotoxinas.

Introduction

Legume is any plant that has seeds in long pods, such as peas, beans and peanuts¹. Nuts are considered fruits whose walls become hard when mature. On the other hand, dried fruits result from a drying process of the fruit that is originally rich in water content becoming a product rich in fibre, fat and/or sugars, such as dried figs, and raisins². Nuts and dried fruits, such as walnuts and brazil nuts, are those that naturally have a low water content in their composition².

Groundnuts (peanuts), with the scientific name *Arachis hypogaea* L., are classified as legumes due to their edible seed and are considered an oil crop due to their high oil content. As legumes, they belong to the *Fabaceae* or *Leguminosae* family and they are able to grow in the tropics and subtropics. Its scientific designation given by Carl Linnaeus “*arachis*” means “legume” and “*hypogaea*” means “under the earth” which is related to the formation of pods below ground. Groundnuts (peanuts) develop its pods underground (geocarpy), contrarily to other legume crop plants¹. This legume is a source of protein and oil and provides calories and protein value¹.

Although there are relevant differences at botanical level, most of the time groundnuts and nuts are included in the same food group by consumers taking in account of their comparable taste and nutritional profile and are often used in similar purposes in culinary. Once nuts imply the maturation of the fruit, groundnuts cannot fit this criterion.

One of the groundnuts (peanuts) curiosities is its capability to harbour nitrogen fixing bacteria in root nodules. This is a great advantage in crops rotation, because it requires less fertilizer (nitrogen containing compound) and enhance the fertility of the soil¹. Groundnuts (peanuts) are capable to maintain or increase food production without jeopardising the ecosystems¹.

Despite all the health benefits of nuts, dried fruits and legumes, there are scientific evidences of their susceptibility to contamination by fungi, namely mycotoxins producing fungi. Groundnuts contamination by mycotoxins is a relevant problem in international trade, which has affected the export market of the developing countries. Mycotoxins are secondary metabolites produced by fungi, mainly *Fusarium spp.*, *Aspergillus spp.* (e.g. *Aspergillus flavus* and *Aspergillus paraticus*), and *Penicillium spp.*, and they can exhibit various deleterious effects on human health. Mycotoxins can be produced in various conditions, such as high temperature or humidity, but also on different types of substrates with the presence of various nutrients

and, for this reason, can be considered one of the most significant food contaminants for many countries^{3,4}.

Groundnuts, nuts and dried fruits are increasingly popular and more widely used in the European diet and for this reason, it is necessary to pay attention to the susceptibility of these foods to contamination by fungi. Their intrinsic moisture and nutrient content, long shelf life, high pH and water activity are all factors that boost increased fungal growth^{3,5}. Almonds, walnuts and cashews are among the most produced nuts worldwide, followed by peanuts and pistachios. In a 2015 article, dried fruits production increased by about 5.4% compared to the previous season⁵. In developing countries groundnuts (peanuts) represent an important role as oil crop and food crop, whether it is for domestic consumption or to export¹. According to FAOSTAT⁶, the major producers of groundnuts in shell in 2019 were China, India and Nigeria and they have been maintaining this record from 2000 to 2019. The number of productions are influenced by several restrictions, such as rainfed conditions, stress conditions, incidence of disease and pest, low input-use and socio-economic infrastructures¹.

Groundnuts, nuts and dried fruits are foods with low water activity that are frequently associated with cases and/or outbreaks of food poisoning. The frequency of these cases linked to groundnuts, nuts and dried fruits may be due to the increased consumption of this type of food, better detection methods and reporting systems and inadequately implemented food safety programmes⁵. These foods can be contaminated with pathogens in any state, whether in production, processing, packaging and distribution. However, the low water activity of nuts prevents pathogens from growing on their surface.

There is a wide range of scientific literature which reports high occurrence of mycotoxins in food products. At European Union (EU) there is a raising concern of their effects of mycotoxins in human and animal health. In this line, Commission Regulation (EC) 1881/2006⁷ and the respective amendments, establishes maximum permitted levels for certain mycotoxins in groundnuts, nuts and dried fruits, such as Aflatoxin B1, sum of Aflatoxins B1, B2, G1 and G2 and Ochratoxin A.

The implementation of good agricultural practices and other food safety systems enables a proactive approach to certain concerns⁵. There are several studies that demonstrate mechanisms that prevent mycotoxin growth. Milling is one example of a mechanism to reduce microbial load in nuts⁵.

The principal purpose of this monography was to identify which were the most common mycotoxins in groundnuts and their co-occurrence and compare them with those found in nuts and dried fruits. Moreover, the most relevant and suitable analytical methods to carry out a multi.mycotoxins analysis in groundnuts were systematically reviewed and also compared with those applied to nuts and dried fruits. Finally, mycotoxin' detoxification processes applied to groundnuts were also addressed and discussed.

Mycotoxins

Mycotoxins are secondary metabolites produced by fungi that, if ingested, can cause adverse effects not only on human but also animal health. Due to their easy propagation and contamination, they are considered the most common food contaminants in various countries, which has led to a wide range of research studies⁵.

As mentioned earlier, the susceptibility of mycotoxin contamination depends not only on the intrinsic characteristics of food, such as nutrients content (namely water content), but also on storage conditions (e.g. high humidity, storage time), high pH and water activity.

There are several types of mycotoxins namely Aflatoxins (AFB1, AFB2, AFG1 and AFG2), Ochratoxin A (OTA), Patulin, Deoxynivalenol (DON), Zearalenone (ZEA), Fumonisin (FBI, FB2), T-2 and HT-2 Toxins and Citrinin. However, this monography focuses on the mycotoxins that most frequently affect groundnuts (peanuts), nuts and dried fruits. In this line, Aflatoxins are specially addressed due to the fact that the Commission Regulation no 1881/2006⁷ and its amendments establish maximum permitted values for these mycotoxins in groundnuts, nuts and dried fruits. Dried fruits have also maximum permitted levels for Ochratoxin A. As it may be confirmed in this EU Regulation, mycotoxins maximum permitted values allowed for groundnuts (peanuts) are in the same range as other nuts, however dried fruits have lower maximum permitted values (Table I). Other mycotoxins are arising, the so-called emerging mycotoxins. The emerging mycotoxins include Enniatins (ENs) and Beauvericin (BEA) and they are cyclic hexadepsipeptide³.

Aflatoxins

Aflatoxins are secondary metabolites produced by *Aspergillus* species mainly *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. They are groups of heterocyclic aromatic hydrocarbons and their production is intensified under conditions of high temperature and humidity⁸. In addition to this, aflatoxins are the most abundant mycotoxin in cereals, milk and oil seeds⁹.

According to the high hepatocarcinogenic potential, aflatoxins are recognized by International Agency for Research on Cancer (IARC) as Group I human carcinogen^{10,11,12}.

There are, approximately, 20 types of aflatoxins and have been characterized under UV radiation, in which Aflatoxins B1 (AFB1), B2 (AFB2), G1 (AFG1) and G2 (AFG2) are the most common (Figure 1). AFB1 and AFB2 show a strong blue fluorescence, where as AFG1 and AFG2 exhibit greenish yellow fluorescence under UV radiation, hence the designation of B (blue) and G (green)^{13,14}. Additionally, there are some evidences that indicate a difference in the origin of aflatoxins. In particular, AFB1/AFB2 are produced by *Aspergillus flavus* and the total of AFB1/AFB2/AFG1/AFG2 are produced by *Aspergillus parasiticus*^{13,15}.

Aflatoxin B1 (AFB1) is considered one of the most toxic mycotoxins and most harmful to human health. It can be found in a wide range of food and agricultural products⁴. The mean lethal dose (LD50) of AFB1 is 0.36 mg/kg (body weight)⁸ and is considered to be the most potent hepatocarcinogen^{12,16}.

In general, aflatoxins including AFB1, AFB2, AFG1 and AFG2 can take place in a wide range of raw materials, for example cereals, tree nuts. To avoid human exposure to aflatoxins, it became imperative to develop fast and sensitive methods to analyse agro-products⁴.

Among aflatoxins, aflatoxins M1 (AFM1) is the principal hydroxylated metabolite of AFB1, produced by the action of cytochrome P450 IA2 (CYP1A2)^{17,18,19}. It is strongly fluorescent with emission of blue-violet light¹⁷. AFM1 is mainly important in milk and its derivatives.

The aforementioned aflatoxins were reported to have hepatotoxicity, mutagenicity, carcinogenicity, immunosuppression, neurotoxicity, epigenetic effects, reproductive dysfunction and stunted growth¹³. Besides their potential harmful effects on the human body, at liver, systemic haemorrhages, nephrosis and death²⁰, they also decrease resistance to stress^{9,21}. Given this high toxicity, it is of utmost importance to regulate the maximum permitted values at global level and, in this regard, the development and validation (according to international guideline) of analytical methods suitable to accurately determine the mycotoxins' contamination levels of foodstuffs are imperative.

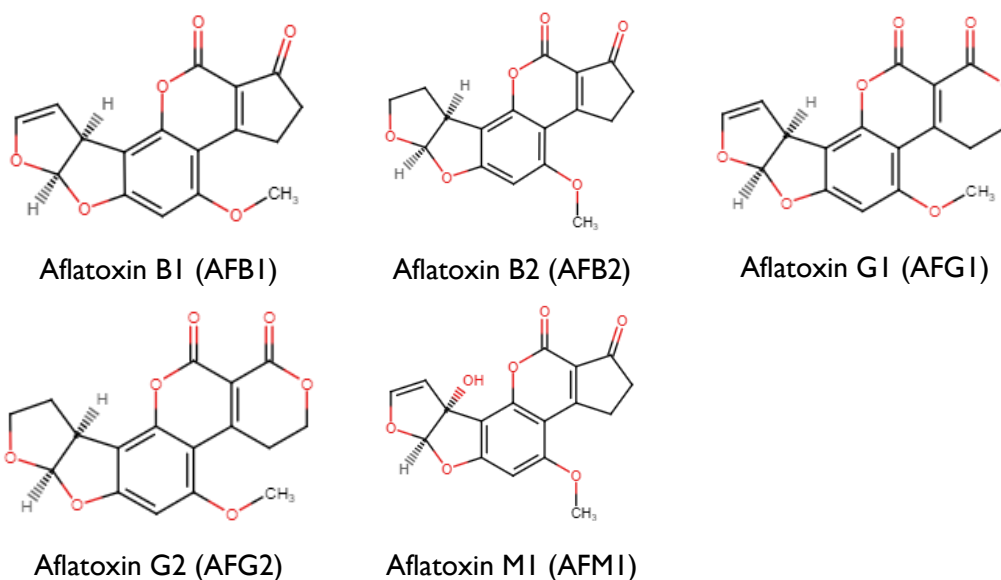


Figure 1 – Aflatoxins chemical structures.

Ochratoxin A

Ochratoxin A (OTA), similar to aflatoxins, is a secondary metabolite produced by fungi of the *Aspergillus ochraceus* and *Penicillium verrucosum*²² species and according to the IARC is classified and listed in group 2B of the list of carcinogens^{10,23}.

Due to the possible genotoxic character, several *in vivo* and *in vitro* studies have shown that guanine-OTA specific DNA adducts persisted for more than 16 days and 5 days, respectively, in situations of genotoxicity at hepatic and renal level^{9,10}.

It is possible to obtain OTA metabolites of phase I and phase II if the latest are hydrolysed. This chemical reaction can occur in the stomach by proteolytic enzymes, being transformed into α -ochratoxin, but there is also the possibility that they undergo hydrolysis in the intestine, since their alkaline pH causes the lactone ring to open, causing a very high toxicity. The plurality of OTA metabolites from phase I and phase II detoxification present low toxicity and due to their strong binding to albumin, their elimination through glomerular filtration is insignificant, being their excretion mainly through tubular secretion and for this reason it is the site where more intracellular accumulation of OTA occurs⁹. In addition to accumulation at the tubular level, OTA can also accumulate in the liver and muscles due to their high affinity for proteins and their non-ionised form, which allows them to remain longer in the body. The kidneys are one of the greatest storage of these mycotoxins as they reabsorb OTA in the proximal and distal tubule, which contributes to the high level of nephrotoxicity⁹.

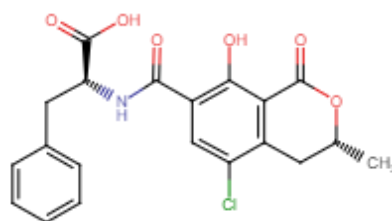
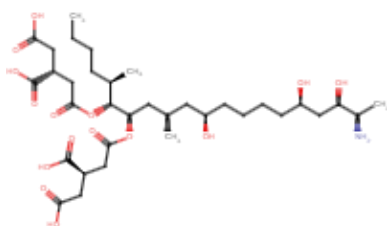


Figure 2 – Ochratoxin A (OTA) chemical structure.

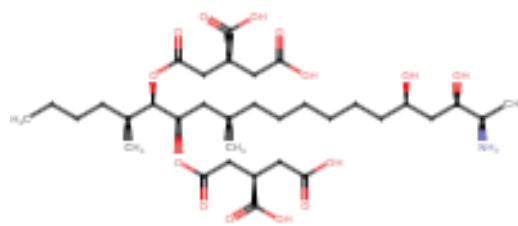
Fumonisin (FB1 and FB2)

Fumonisin found essentially in maize and cereals and derived products produced by *Fusarium proliferatum* and *Fusarium verticillioides*. There exist 28 compounds, but the most frequent are fumonisin B1 (FB1) and fumonisin B2 (FB2)^{24,25}. Both are listed as potential carcinogenic substances in group 2B of IARC²⁵.

These toxins are considered to be carcinogenic, hepatotoxic, immunotoxic, nephrotoxic, neurotoxic, possibly provoking liver damage, heart failure and esophageal cancer. They were found in several food supplements, such as green coffee, milk thistle, mint, chamomile flower and liquorice²⁵.



Fumonisin B1 (FB1)



Fumonisin B2 (FB2)

Figure 3 – Fumonisin B1 and B2 chemical structures.

Zearalenone (ZEA)

Zearalenone (ZEA) are produced by the genus *Fusarium*, essential by *Fusarium graminearum* and *Fusarium culmorum*²⁶ and they are very common in cereals, such as maize wheat rye and derivatives⁷. It is classified as group 3 in IARC, not considered carcinogenic to humans¹⁰.

ZEA has affinity for estrogen receptors because of its structural similarity to 17- β -estradiol, a sex hormone, they may lead to adverse impacts on reproductive system²⁵.

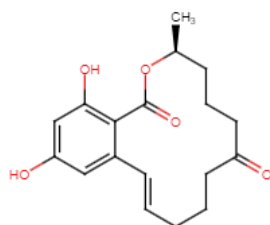


Figure 4 – Zearalenone (ZEA) chemical structure.

Trichothecenes

Trichothecenes are secondary metabolites produced predominantly by *Fusarium*. This group of mycotoxins includes deoxynivalenol (DON), HT-2 toxin and T-2 toxin. They may cause skin irritation, problems in stomach and intestine, disturb mitochondria functions and hypothyroidism of spleen and thymus²⁵. Both T-2 toxin and DON are classified as group 3 according to IARC¹⁰.

DON is essentially produced by *Fusarium graminearum* and *Fusarium culmorum*²⁵. It is common in cereals, such as wheat and maize and in bread¹⁰. It is known to be responsible for nausea, vomiting, abdominal pain, headache and fever due to its vomitoxin action²⁷. Concerning to HT-2 toxin and T-2 toxin, these mycotoxins are mainly found in cereals¹⁰ and are produced by *Fusarium sporotrichioides* and *Fusarium poae*²⁵. T-2 toxin has a haematotoxic effect and is connected to alimentary toxic aleukia (ATA) which originates gastrointestinal irritation, vomiting and diarrhea²⁸.

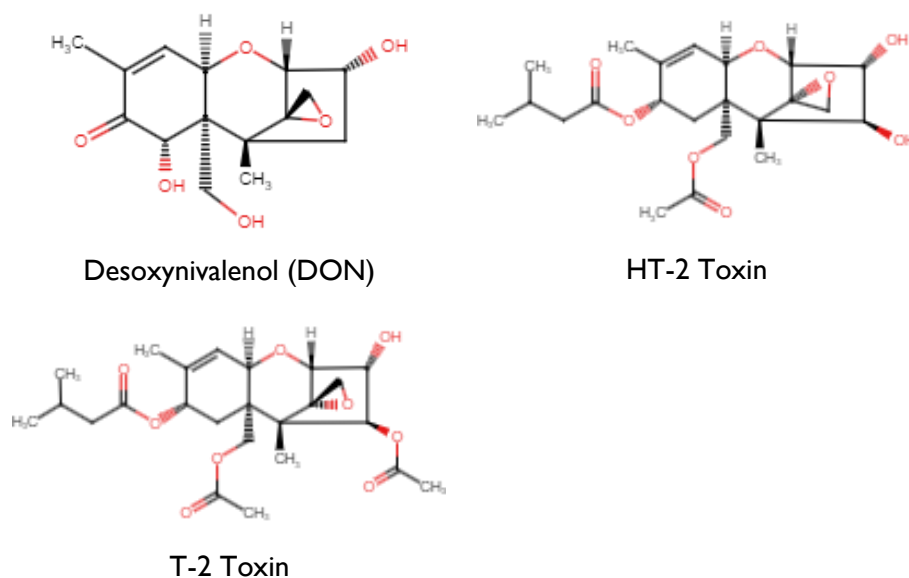


Figure 5 – Chemical structures of the most common trichothecenes.

Emerging Mycotoxins

There are also some new mycotoxins arising, the so-called Emerging Mycotoxins. The emerging mycotoxins include enniatins (ENs) and beauvericin (BEA) and are predominantly derived from *Fusarium* fungi³. They are cyclic hexadepsipeptide with insecticidal properties capable of inducing apoptosis in mammalian cells. In addition, they have antibiotic properties against Gram-positive bacteria and mycobacteria^{3,29}. They have the capacity to cause a wide range of toxic effects in human and animals, which could lead to the development of carcinogenic, teratogenic and mutagenic effects, affecting the production of hormones and immunosuppression^{3,30}.

They act as enzyme inhibitors, antibacterial, antifungal agents and as immunomodulatory substances. They have the capacity to inhibit enzyme acyl-CoA and cholesterol acyltransferase³.

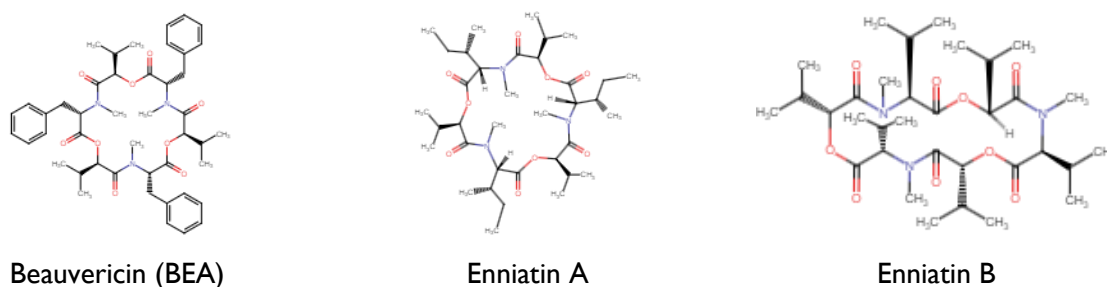


Figure 6 – Chemical structures of beauvericin and enniatins.

Co-occurrence of mycotoxins

This phenomenon has been reported in different food samples and it consists in the occurrence of several mycotoxins in the same matrix. A food item is frequently more exposed to multiple mycotoxins than to a single mycotoxin, for this reason, it is expected to produce combined effects due to the association of the different mycotoxins³¹. The actual risks to health have yet to be studied, since the lack of information available on potential effects^{31,32}.

Frequently, one sample is contaminated with more than one mycotoxin and the most reported cases include co-occurrence of AFB1 and AFB2. In a recent study, peanut paste sample was described to be the most contaminated sample with multi-mycotoxins, essentially by AFB1 and total aflatoxins (AFB1, AFB2, AFG1 and AFG2) as well as different fungi³³.

Mechanisms of mycotoxins

Cytochrome P450 enzymes (CYP450) are present in the organs where mycotoxins present greater toxicity, such as liver, intestines and kidneys. These enzymes are responsible for the biotransformation by oxidation of organic extracts, but also through the biotransformation of xenobiotics, leading to their oxidation^{9,34}. The CYP450 action is dependent on the inhibitory, inductive or substrate capacity of the mycotoxins, which consequently determines the changes that mycotoxins cause metabolically. It is possible that the action of mycotoxins can alter the absorption and biotransformation of nutrients and other substrates that may be present in organisms⁹.

Recent studies performed on piglet livers and kidneys have found differences enhanced by exposure to OTA and AFBI, showing an alteration of the gene expression on the type of gene. In this study, piglets were divided into 3 groups. The first one (E1) was fed with basal diet plus a mixture of two byproducts (grapeseed and sea buckthorn meal), the second group (E2) was fed with basal diet experimentally contaminated with mycotoxins AFBI and OTA and the third group (E3) was fed with basal diet containing 5% of the mixture of the byproducts and contaminated with the mix of AFBI and OTA⁹. In piglets contaminated with OTA and AFBI, the inclusion of grapeseed and sea buckthorn (E3), decreased expression of the CYP P450 gene. The decreased expression of this gene induces decreased bioactivation of the mycotoxins, possibility resulting in decreased toxicity in both organs under study⁹. Therefore, both grapeseed and sea buckthorn can be considered sources of neutralisation of the harmful effects of OTA and AFBI. However, the author concluded that further tests are needed to understand which derived products with antioxidant action decreases or increases the expression of CYPs mRNA and how this process occurs⁹. In other aspect, light microscopic analysis of the liver from a group of piglets fed with a basal diet contaminated with a mixture of AFBI and OTA exhibited local areas with necrosis, dilatation of sinusoid and inflammatory parenchymal infiltration. There were revealed mononuclear cellular infiltration and periportal fibrosis, as well as fibrotic perilobular and fibrotic septa⁹. Analysis to the structural changes in kidneys, demonstrated that mycotoxins administration affected both medulla and cortex. There were noticed atrophy of the glomerular tufts and alteration of the Bowman's capsule and also tubules necrosis of lining epithelial cells with inflammatory cell infiltration in between. Also, between the glomeruli and tubules were observed focal aggregates of inflammatory cells in association with focal areas of congestion in blood vessels, especially in medulla. In this study, the collagen proliferation occurred in areas with tubular injury. The kidney section from the

group fed with basal diet with the mixture of by-products and contaminated with mixture of AFBI and OTA, manifested minor pathomorphological changes, similar to control⁹. With respect to the level of gene expression, the conclusions that can be drawn from this study indicate the concomitant administration of the mixture of grapeseed and sea buckthorn meal and AFBI and OTA promoted a decrease of all analysed gene expressions in liver compared to the control group.

Preharvest Contamination Sources

There are different sources of food contamination by mycotoxins depending on the soil, use of pesticides, animals, harvest, handling and storage³⁵. Firstly, soil type, humidity, surface and subsurface temperature and air temperature are characteristics that influence fungi and mycotoxins³⁵. Repetitive mowing, use of herbicides and other pesticides and grazing using or not animals are aspects that have to be considered to control the spread of the toxins^{35,36}. Results in some studies indicate that contaminations in peanuts were higher when soils were grazed compared to ungrazed soils, with higher contaminations on samples from the wet year compared to the samples from the dry year. Also, when the peanut' shells are intact, fungi could not penetrate to the inside of in-shell peanuts^{35,37}. Water is used for several practices in the soil, whether for irrigation, mixing pesticides or fertilizers, so it is necessary to ensure that the water is safe and has the adequate quality for its use³⁵.

Secondly, if dried fruits, nuts or legumes are harvested from the ground, soil must be prepared prior to harvest in order to ensure proper safety and no potential contamination, such as animal faeces, uncleaned equipment and non-trained workers. For this situation, all workers must be trained regarding good health and hygiene practices in harvesting activities and the equipment must be correctly cleaned. Mechanical harvesting should be processed in dry weather in order to minimize potential cross-contamination³⁵.

The handling process is another important step. Some nuts are mechanically dried after harvesting in order to reduce the moisture content which is critical to prevent microbial growth that may contribute to mycotoxins, namely aflatoxins' formation. The reduction of pathogens on the surface of dried fruits, nuts or peanuts depends on several factors. Time, temperature, type of heat treatment, type of organisms and type of food items are all critical parameters to assure the lethality of mycotoxins. The use of heat treatments are able to ensure adequate and significant reduction of mycotoxins³⁵.

After all these steps, the storage should be taken in a facility that is dry and guarantees protection. It should have minimum temperature fluctuations to prevent microbial growth and insect infestation. Therefore, the storage of the products is essential under controlled conditions to maintain their quality and their shelf life^{35,38}.

Climate Changes and Mycotoxins

For the complete understanding of the toxins contamination and also their' results, it is important to have an overview of environmental factors affecting fungi survival, growth, interactions and metabolic activity^{39,40}.

The environment may provide all the factors to enhance mycotoxin prevalence and, particularly, high temperatures and droughts affect crops, like maize and also the occurrence of *A. flavus*, boosting fungal growth^{39,41}. Therefore, climate changes are predicted to have significant impact on mycotoxins. According to certain available data, concentrations of CO₂ are projected to double or triple of the actual concentration in the next 25 to 50 years. Different regions in Europe are expected to increase 2 to 5°C due to the concentrations of CO₂ and drought episodes^{39,42,43,44}. Because of this situation, the European Food Safety Authority (EFSA) requested the identification of emerging risks and has identified changing patterns in mycotoxins production³⁹ and, for that, they funded the project MODMAP-AFLA. This provided data specifically analysing maize, so that it was possible to predict subsequent aflatoxins contamination risks. The project predicted an increased risk of aflatoxins contamination in the future^{39,45,46}.

The data collected also suggested that climate changes effects depend on geographical regions^{39,46}. Mediterranean regions are expected to be spots of many adverse effects impacting aflatoxins contamination³⁹.

The essential topic for defining the impact of fungal co-occurrence under the influence of different meteorological and ecological conditions on mycotoxins contamination^{39,47,48} was studied in field and *in vitro*³⁹ where fungal interactions could be exhibited under natural conditions except temperature and water activity (a_w). Under influence of different temperatures, the production rate dynamic decreased and the optimal temperature for AFBI suffered some alterations³⁹. During these studies, it was pondered the environmental and toxicological consequences of aflatoxins contamination, clarifying eventual risks that aflatoxins contamination represents in soil ecosystems^{39,49}. Therefore, climatic

strategies are important for future risk assessments of aflatoxins contamination, which may be a determinant factor for soil moisture and air temperature changes³⁹.

Another study was carried out to examine different climate change scenarios considering an increase of 2.5 times CO₂ in southern Italy^{39,50}. In consideration to the concentration's rise, preliminary evidence indicated that temperature increase may reduce the OTA productions^{39,51}. With a particular temperature range of 18/31°C and water stress conditions (0.93 a_w) it was observed that fungi growth rate was slower than 0.99 a_w and was observed an over-expression of OTA genes. On the opposite situation, with a temperature range of 20/37°C it exhibited a higher growth rate at 0.93 a_w. Consequently, higher temperatures and water stress appear not to be favourable for OTA production and this situation must be confirmed in the future³⁹.

On a global level and based on predictions of the AFLA-maize model, AFBI is expected to increase as a result of climate changes. In this way, predictive models have shown to be crucial for addressing future uncertainties and anticipate risk conditions³⁹.

The rise of the risk associated to aflatoxins is related to fungi and mycotoxin co-occurrence, for this reason, in future studies it is important to interpret and convert with careful evaluation by developing countries in order to predict the impact of climate changes on aflatoxins and other mycotoxins occurrence³⁹.

Mycotoxins Legal Status at EU level

The Commission Regulation (EU) no 1881/2006⁷ and its amendments establish the maximum levels for certain contaminants, namely some mycotoxins, in EU in foodstuff. Table I summarizes the maximum levels for certain mycotoxins in groundnuts, nuts and dried fruits according to this regulation.

Procedure for Detection and Determination of Mycotoxins

For a correct detection and determination of mycotoxins, three essential steps must be fulfilled: sample selection, sample treatment and mycotoxin detection and quantification. It is crucial to comply with all the steps so that the sample is representative, treated correctly and that the sample' determination is specific, sensitive and accurate. The various procedures will be described in the following sections. Each sequential step contributes to the variability of the method and avoids possible errors arising from the whole procedure.

1. Sampling and Pre-treatment

Sampling is the selection of representative samples of the population to be analysed. This selection is also important to circumvent difficulties of heterogeneous distribution inducing higher precision when determining mycotoxins levels. Commission Regulation (EC) no 401/2006⁵² lays down the methods of sampling and analysis for the official control of the levels of mycotoxins in foodstuff.

Depending on each lot weight, groundnuts, pistachios, brazil nuts and other nuts can be subdivided into sublots (≥ 500 tonnes; >125 and <500 tonnes; ≥ 15 and ≤ 125 tonnes; <15 tonnes) and each subplot have specific conditions⁵².

The aim of sample pre-treatment is to reduce and, if possible, eliminate matrix effects, this means that it may ensure that components present in the sample will not interfere with the analyte's quantification. Thus, mycotoxins must be extracted efficiently. In addition to extraction, further purification might be carried out to ensure that the sample is analysed under optimal analytical conditions. On the other hand, if techniques such as infrared spectroscopy or other optical techniques formats that do not cause destruction are used, sample pre-treatment is not mandatorily necessary⁵³.

2. Extraction and Purification

Due to the known adverse effects of mycotoxins, such as carcinogenicity, mutagenicity and teratogenicity and, handling of the preparations and extracts should be performed with special care, using the usual laboratory protections, such as lab coat, mask, gloves and eye protection. Standard solutions should be kept away and protected from the light, in amber containers⁵³. The extraction of mycotoxins depends on the use of organic solvents such as methanol, chloroform and acetonitrile. Methanol/water and acetonitrile/water mixtures are commonly used for mycotoxins extraction⁵³. Due to its potential ecological risk, the use of chloroform for mycotoxin extraction has been declining⁵³. There are several methods for purification of the target analytes. The correct purification of the sample determines the sensitivity of the analysis for detection.

2.1. Solid-Liquid Extraction (SLE)

Since aflatoxins are soluble in polar organic solvents, such as chloroform, methanol and acetonitrile, SLE is regularly used to extract and separate aflatoxins from solid food matrices. Although it is simple and does not require specialized work, one of the greatest

disadvantages of this extraction technique is the use of a large quantity of organic solvents especially when it is necessary multiple sample extractions are required^{54,55,56}. Generally, when determining mycotoxin samples are extracted followed by evaporation in order to reduce volume and, consequently, concentrate mycotoxins in the extract. The mycotoxins present in the polar phase may be determined by thin layer chromatography (TLC) and, subsequently, their identification and quantification can be obtained by comparison of the retention factor (Rf) and respective intensity of fluorescence of the samples with standards on TLC plate^{54,57}. Dispersive Liquid-Liquid Microextraction (DLLME) emerged to improve the extraction process and to minimize solvent consumption and increase concentration factors^{54,58}. This method allows to preconcentrate target aflatoxins with a microvolume of the extraction phase⁵⁴. DLLME uses dispersion of the extracting solvent with a second solvent (dispersion solvent), which has to be soluble in water, to extract the analytes at hand⁵⁸.

2.2. Solid Phase Extraction (SPE)

SPE uses a selective retention of analytes at the same time that eliminates extracts interferences, provided by the use of adsorbents with strong affinity to the target analyte(s). Once there are a wide range of adsorbents, this method gained selectivity and flexibility and the SPE cartridges contain predominantly silica gel, florisil and C18. It is important to pay attention to certain key parameters for example type of adsorbent, elution solvents and dilution factors⁵⁴. In order to provide more sensitivity and selectivity, a procedure appeared using aluminium oxide as the adsorbent and methanol-water (80:20 v/v) as the extraction solvent, which retained compounds with high polarity in polar solvents and removing low polarity and non-polar interferences simultaneously from the extract, promoting purification of aflatoxins prior to the analysis^{54,59}. Matrix Solid-Phase Dispersion (MSPD) has been developed to simplify SPE, since it does not need cartridges to mix sample and adsorbent, it is directly mixed in a glass column^{54,60}. A study for MSPD procedure has been evaluated in peanuts using C18 bonded silica as the dispersive adsorbent for the analysis of AFB1, AFB2, AFG1 and AFG2 applying acetonitrile as eluting solvent followed by evaporation and LC-FLD to quantify^{54,61}. Magnetic Solid-Phase Extraction (MSPE) is a technique that uses superparamagnetic nanoparticles, such as Fe₃O₄, as an adsorbent. Using an external magnet, the adsorbent can be separated by magnetic decantation, demonstrating to have selectivity and to be an efficient technique, but it requires time, cost and specialized professionals⁵⁴. Another area worth developing is Solid Phase Micro-Extraction (SPME) which was initially coupled with Gas Chromatography (GC), but recently is used with LC analysis for semi and

non-volatile compounds^{54,62}. It is not recurrently used due to the cost and limited selection of stationary phases of SPME⁵⁴.

2.3. Immunoaffinity Chromatography Columns (IAC)

IAC uses the specificity and high affinity between antibodies and mycotoxins to achieve clean-up procedure. This method provides a high specificity even in complex matrices using simplifying sample analysis^{54,63,64,65}. Through the passage of the extract up the column, mycotoxins bind with the antibodies and, after the wash step, it is used a solvent to disrupt the bindings, in order to analyse them. In recent studies, the multimycotoxin IAC have been coupled with LC-MS, providing screening for aflatoxins, DON, OTA, fumonisin, HT-2 Toxin, T-2 Toxin and ZEA simultaneously. The real challenge of this method is to achieve satisfactory efficiency, capacity of mycotoxins purification and flexibility of the columns. The disadvantages of this technique are the complexity and cost caused by rising of different types of antibodies⁵⁴.

2.4. Supercritical Fluid Extraction (SFE)

SFE uses carbon dioxide (CO₂), which permits extraction of non-polar analytes^{54,66}, because CO₂ has low critical temperature and pressure, 31 °C and 7.3 MPa, respectively^{54,67}. The major advantages is the reduction of organic solvents, easy extraction procedure by releasing pressure and the possibility to connect with analytical instruments^{54,68}. The rise of the applied pressure, temperature and the addition of modifiers promotes solubility of mycotoxins in CO₂. This technique is not implemented at large scale because it requires costs, time and complex operations⁵⁴.

2.5. QuEChERS Technique (quick, easy, cheap, effective, rugged and safe)

QuEChERS method requires 3 steps: extraction step based on LLE, Dispersive Solid-Phase Extraction (d-SPE) and clean-up step which allows to reduce additional centrifugation, filtration or precipitation^{69,70,71}. Despite of QuEChERS effectiveness, it depends on target analyte properties, matrix composition, analytical techniques and available equipment⁶⁹. It is possible to optimize the amount of solvents and salts combinations, in agreement with the target analytes. Also, to increase sensitivity and improve recovery of target analytes in order to enhance analytical performance, it is essential to reduce matrix effects. This promising technique involves smaller sample amounts and organic solvents, in accordance with green chemistry principles^{69,72}. This procedure has been applied to determine mycotoxins, such as aflatoxins, fumonisins, OTA, enniatins, BEA, trichothecenes, T-2 toxin and H-2 toxin in dried fruits and cereals, such as wheat and maize⁶⁹.

3. Separation, Detection and Quantification of mycotoxins

Accurate and reliable detection is essential to be able to monitor the different mycotoxins in a given food product, in this case, more specifically, peanuts, nuts and dried fruits, peanuts and nuts. For this purpose, several techniques include Chromatographic Methods, Capillary Electrophoresis (CE), Immunological Methods and Non-Destructive Techniques⁵³. The detection of mycotoxins can be carried out by conventional strategies, but more sensitive and efficient methods are emerging.

Due to the low permitted levels of aflatoxins in peanuts, nuts and dried fruits, it has become crucial to find simple, selective and sensitive methods for mycotoxin detection. The use of nanomaterials has allowed the development of a fast, accurate, ultrasensitive and easy to perform method. Nanoparticles have macroscopic tunnel vision mechanisms that allow achieving low detection limits, short detection time and high sensitivity values⁸. Given to their size, shape, functionality and surface area, nanoparticles can be used in sample pre-treatment, (e.g. Biosensors and Immunoassays using Au/Ag nanoparticles, Carbon based nanoparticles, Magnetic nanoparticles, Quantum dots, Up-conversion nanoparticles, Metal-organic frameworks and Nano-functional DNA intelligent hydrogel). According to a study⁸, this technique has been applied to detect AFB1 in peanuts, cereal, nuts and dried fruits.

Chromatographic Methods

Chromatography is based on the separation of a mixture of compounds depending on their different affinity for the mobile or stationary phase, which results in different movements in the column that leads to a possible separation. There are several analytic methods based in this technique, such as Thin Layer Chromatography (TLC), Liquid Chromatography (LC), Gas Chromatography (GC). Among LC, High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) and Ultra-High Performance Liquid Chromatography are commonly applied.

TLC is a fast and practical method, which can be used for qualitative, quantitative and semi-quantitative determination of aflatoxins. Various applications have been developed, since early TLC methods demonstrated to be vulnerable to fluorescence interferences that could mask the results. TLC has progressively been replaced by HPLC based on the fact that it does not demonstrate quantitative results. For this reason, some developments created an extension of TLC, the high performance TLC (HPTLC) which provides higher separation efficiency and sensitivity⁵³. Confirmatory procedure have been developed based on

fluorescent reaction products, however, they were unable to be directly analysed by MS which required necessary extensive purification steps⁵⁴. In limited cases, it is possible to use an over pressured TLC (OPTLC) due to its complexity system. For this method, the mobile phase is pumped through a column with a wider cross-section in a planar layer⁵⁴, using external pressure. Although it requires less mobile phase, less time compared to HPLC and is more efficient than TLC⁵³, it is a complex procedure with the need of complex components⁵⁴.

LC is the most common technique with the capability to achieve quick separations and provide high precision and sensitivity due to low detection limit. Nevertheless, substantial changes were investigated to increase the performance of this technique, such as development in column and detector performance, implementing ultraviolet (UV) and Fluorescence Detector (FLD) methods. Since aflatoxins exhibit strong fluorescence (blue and green), FLD is preferable compared to UV-Vis detector, providing higher specificity and better detection. Studies show that FLD detection, in order to extract aflatoxins from the mobile phase after LC separation, uses a flow cell of the fluorometric detector with silica-gel particles because this may absorb and detect aflatoxins at the same time that minimizes quenching⁵⁴. Moreover, another step to improve sensitivity and resolution, is the use of chemical derivatization using an acid (trifluoroacetic acid) and a halogen (usually bromine or iodine). This derivation step allows aflatoxins to promote their respective fluorescence⁵⁴. Therefore, LC-FLD method is an indispensable approach, but is not suitable for multi-mycotoxin detection since other mycotoxins do not exhibit fluorescence.

With the development of analytical techniques, it has emerged the Ultra-High Performance Liquid Chromatography (UHPLC), which uses analytical columns sub-2 μm particle size and combines UHPLC to FLD. This method is characterized for its speed and high resolution. UHPLC-FLD can determine aflatoxins, OTA and ZEA simultaneously, so this technique is suitable for multi-mycotoxins analysis. Photochemical derivatization was tested, in order to increase signal intensity, however bromine and iodine are not suited because OTA and ZEA are incapable to resist to the derivatization step⁵⁴.

LC-MS is able to determine multi-mycotoxins using LC separation and mass to charge (m/z), which uses molecular weight to increase specific identification. This technique is specific and sensitive and able to quantify mycotoxins in one analysis (chromatographic run). LC-MS can be customized with different MS analysers with the purpose to promote detection capacity⁵⁴. LC-Triple Quadrupole Mass Spectrometry (LC-QQQ-MS) developed to be highly sensitive for quantitative analysis and according to some studies, the number of

mycotoxins simultaneously detected in one analysis could be 39 to 300. Considering economic interests, efforts are being made in order to improve precision and accuracy of the LC-MS methods and LC-FLD methods are being substituted by LC-MS methods^{54,73}.

For that goal, it emerged the LC-High Resolution Mass Spectrometry (LC-HRMS), including Time-of-Flight (TOF) and Quadrupole-Orbital Ion Trap (Q-Orbitrap). LC-HRMS technique allow to obtain a high resolution data in full scan mode that can provide sufficient specificity and selectivity for quantification. Moreover, data acquisition rate, data mining software and data storage systems, which are supported by identification criteria guidance, allow these techniques to improve^{54,74,73}.

LC-Orbitrap MS is considered an advanced and efficient method for mycotoxin analysis, which could be used for quantitative and qualitative approach using collected data. It combines target analysis with non-target screening of mycotoxins, providing high resolution, data acquisition rates and accurate mass spectra libraries^{54,75}.

There exists another type of chromatography, Gas Chromatography (GC) which is based on the volatility of aflatoxins. This technique is preceded by capillary column separation on a fused capillary column with a nonpolar phase followed by detection using MS^{54,76}.

Liquid Chromatography tandem Mass Spectrometry

Liquid Chromatography-tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS) or LC-QQ-MS is used frequently as a method for quantitative and qualitative analysis of mycotoxins. Electrospray Ionization (ESI) is a method compatible with most chromatography separation systems, but also its efficiency depends on several factors, namely the treatment and quality of the sample. The combination of these two methods makes them into a sensitive and selective analysis system, but, for this to occur, it is necessary to optimise the factors that affect the retention time^{23,77,78}.

Single analyte procedures are time consuming^{23,79} and there is no asses to the interaction with factors that may affect the ion source^{23,80}. On the other hand, multivariant optimization procedures⁸¹ allow the investigation of interactions between experimental variables and have proven to be effective when applied to LC-MS/MS²³. In a study²³, carried out by Alsharif *et al.* the LC-MS/MS method was combined with QuEChERS technique in order to determine multi-mycotoxins. For this, both LC-MS/MS and QuEChERS performances were evaluated. The factors taken into account for the evaluation were

linearity through linear regression, precision and detection limit. QuEChERS-LC-MS/MS evaluation was important to determine the accuracy of the quantification when changing variables. This technique demonstrated good sensitivity with low limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) for a successful determination of multi-mycotoxins.

Capillary Electrophoresis (CE)

CE is an electrokinetic separation technique which provides effective separation of components without using organic solvents. It can offer rapid and simple analysis with high column efficiency⁵³. In some studies, it is shown potential of CE' miniaturization with the necessary tracing studies for its application in food and mycotoxins. When CE is combined with MS, the complexity of the technique is similar to LC-MS, but, as a well-established method, it is preferable LC-MS based technologies⁵⁴.

According to a study⁸² on maize samples, it was possible to separate aflatoxins AFB1, AFB2, AFG1 and AFG2 using a capillary column and an on-column laser-based fluorescence detector.

Immunoassays

Immunoassays are based on the affinity and specificity between antigen and antibody which is a highly specific new method, essential for mycotoxin' determination. Immunochemical methods can be used for quantification of the reaction by competitive binding. The specificity of the antibody and the existence of specific mycotoxin are both characteristics that influence the accuracy of the immunoassays for mycotoxins namely for aflatoxins⁸³. There are three types of immunochemical methods: Radioimmunoassay (RIA), Chemiluminescence assay and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA).

In relation to RIA, the sample extract with a specific antibody and a constant quantity of radiolabelled mycotoxin are incubated. Thereafter, free mycotoxin and bounded mycotoxin are separated and it is initiated the determination of the radioactivity in those fractions. Throughout comparison between the standard curve and the sample radioactivity in bound fraction and free fraction, it is possible to determine the mycotoxin concentration. On account of the cost, the labelling of mycotoxins with tritium and the disposal of radioactive waste, it is not extensively used^{83,84}. According to Chu⁸⁴, it was possible to

analyse AFBI and OTA with this method through radioactivity determination in each fraction.

The ELISA technique has two versions relative to the formed bound: Direct ELISA and Indirect ELISA. Direct ELISA uses a specific antibody coated to a solid phase incubated with the enzyme conjugate forming an aflatoxin-enzyme conjugate. The quantity of enzyme bound formed can be determined by incubation with a specific substrate solution. The colour formed is measured through comparison with the standard mycotoxin or by a spectrophotometer. This technique depends on the competition for antibody-binding sites, so the free mycotoxin concentration is inversely related to antibody-bound enzyme conjugate^{83,85}. In the case of Indirect ELISA, involves protein-aflatoxin conjugate and a secondary antibody. The conjugate is coated onto the microtitre plate and the sample or standard aflatoxin is inserted. The quantity of antibody bound is detected when added a secondary antibody conjugated to alkaline phosphate, providing a coloured product. By comparison with the standard curve, it is possible to determine mycotoxin concentration⁸³.

Shadbad *et al.*⁸⁶ used immunoaffinity columns for aflatoxins determination using PBS buffer methanol in order to elute aflatoxins. It was possible to determine the total of aflatoxins (AFBI, AFB2, AFGI and AFG2).

Time-Resolved Fluorescence Immunochromatography Assay (TRFICA)

TRFICA is a new sensitive detection method which is considered to increase the sensitivity's detection compared to the gold nanoparticle-based strip assay (GNP-SA). Using lanthanide-chelate-embedded nanoparticles or microbeads with antibodies or proteins TRFICA can be used for quantitative detection, as it has high sensitivity, wide linear range and low background. Since lanthanide chelates have long fluorescence lifetime, wide excitation spectrum and sharp emission spectrum and large Stokes shift, so it demonstrates high fluorescence characteristics. In order to increase fluorescence intensity, lanthanide chelates were embedded into microbeads. This situation also provides the resolution of the limitation of conventional dissociation-enhanced lanthanide fluorescence immunoassay⁴. Nitrocellulose membrane sprayed with test and control lines, used as a sample pad, and absorbent pad are combined into a TRFICA device. The liquid sample present in nitrocellulose membrane moves through capillary action to the absorbent pad which provides the demonstration of the presence or absence of aflatoxins⁴.

In the case of absence of aflatoxins, the fluorescence lanthanide microbead-labelled antibodies create the aflatoxin-protein conjugate with the immobilized antigen on the test line and reacts with the secondary antibody on the control line. For this reason, it is possible to observe under ultraviolet radiation two coloured lines⁴.

On the other hand, when aflatoxin is present in the sample, the immobilized aflatoxin-protein conjugate competes with the aflatoxin present to possibly bind with the lanthanide microbead-labelled antibodies. This action is negatively correlated with aflatoxin' concentration in the sample⁴.

This technique has been applied to different samples, such as maize and peanuts, to determine AFBI and for Total Aflatoxins (AFB1, AFB2, AFG1 and AFG2). The studies on determination of AFBI in food demonstrated rapid and effective results of TRFICA technique⁸⁷. It is used ovalbumin (OVA) to block the sample pad to prevent non-specific absorption. The test and control lines are covered with AFBI-bovine serum albumin (AFBI-BSA) and immunoglobulin G (IgG). For the analysis, it is necessary to mix in a reaction pool first free AFBI and monoclonal antibody against AFBI (anti-AFBI mAb)-conjugated fluorescence microbeads (Eu³⁺) followed by lateral flow through TRFICA via capillary action. It is formed a binding interaction of aflatoxin-antiaflatoxin mAb and antiaflatoxin mAb-IgG and, consequently the detection results are based on fluorescence intensity of the test line and control line read by a TRFICA detector. This method demonstrates a better sensitivity compared to ELISA and GNP-SA methods⁴.

For determination of Total Aflatoxins, it is used coated AFBI- conjugated BSA and rabbit antimouse IgG on the nitrocellulose membrane for, respectively, a test line and control line. Homemade antiaflatoxin mAb was purified with protein G immunoaffinity column. The rest of the method function is similar to the one described above. The binding interaction of aflatoxin-antiaflatoxin mAb and antiaflatoxin mAb-IgG induces fluorescence for detection. The detection sensitivity is higher compared to ELISA and GNP-SA methods⁴.

Aptamer-Based Biosensor

Most quantitative methods for the detection of mycotoxins mention TLC, HPLC and LC-MS but, in the meantime, aptamer-based biosensors have been developed and introduced as a new method for mycotoxin detection²².

Aptamers are single-stranded (ss) DNA or RNA oligonucleotides, an alternative molecule for recognition element to antibodies. The aptamers can form aptamer/target

complexes with strong affinity and high specificity. Compared to antibody-based immunoassays, aptamer-based biosensors use smaller molecules, screened and chemical synthesis *in vitro*, can be stored and transported at room temperature (less sensitive), temperature-induced denaturation is reversible, lower cost, lower time of preparation, no obvious immunogenicity, wider range of target substances, original biological activities with labels and can separate structural analogs or cross-reactive substances²², however it is necessary expensive and special instruments, pre-treatment and professional personnel for the use of this method.

There are several aptasensors developed for OTA analysis such as fluorescent, colorimetric and electrochemical aptasensors, as well as nanomaterial-based methods. A fluorescent aptasensor has been applied to the determination of mycotoxins in peanuts using the principle of aptamer-conjugated magnetic beads (MBs) and CdTe quantum dots (QDs). At the time of OTA addition, it starts the production of aptamer/OTA complex and magnetic separation results in a fluorescence intensity enhancement. This one-step fluorescent aptasensor method provided wide-range responses and lower limit of detection, which might represent a potential strategy for OTA control²².

Since aflatoxins are the most toxic mycotoxins, according to IARC classification, aptamer-based biosensors showed to have high affinity to AFBI. For this reason, a variety of methods have been developed, such as fluorescent aptasensor, colorimetric aptasensor, Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS) aptasensors, Electrochemical aptasensor, Microring Resonators aptasensor, Electrochemiluminescence aptasensors, Microcantilever array sensor. According to a study carried out by Li *et al.*⁸⁸, SERS is an analytical method able to be applied to large amounts of contaminated agricultural products. After AFBI addition, the aptamer and AFBI form the aptamer/AFBI complex leading to the dissociation of complementary DNA. While DNA suffers hybridization, SERS tag was conjugated on the surface of AuNPs. Recently, SERS have been developed as an ultrasensitivity technique through CS-Fe₃O₄ nano-bead signal enrichment. When AFBI is added, the SH-DNA2-ADANRs are induced to be released from the surface of CS-Fe₃O₄ as a result of the competitively binding reaction between AFBI and NH₂-DNA1-CS-Fe₃O₄, which leads to a decrease of SERS' signal. Both techniques have been successfully developed, but the ultrasensitive SERS aptasensor took the advantages of SERS technique, improving the detection stability and sensitivity²².

This method has several advantages, such as high sensitivity and selectivity, rapid, portable and low-cost targets analysis, great potential for field determination and high-throughput identification of multiple mycotoxins²².

In spite of all the advantages, this technique uses small molecules, consequently the screening of nucleic acid aptamers specific to mycotoxins is a complicated process and requires some time for this particular selection. In addition to this, naturally, the molecules have to be strongly specific to each mycotoxin. For this reason, few nucleic acid aptamers have been screened and applied successfully. Some mycotoxins are constituted with various structural analogs, so it is more difficult to select the highly specific aptamers for each analog. All in all, the greatest problem for this development is the way to identify and detect multi-mycotoxins using a limited variety of mycotoxin aptamers, specifically for similar structure mycotoxins²². Apart from that, traditional antibody preparation needs animal experiments, which is difficult to prepare in large quantities and also this preparation has technical barriers that could lead to its monopolization. Also, the affinity of aptamers is normally weaker than antibodies' affinity. Finally, commercial kits have to consider diverse factors, for example stability, sensibility, cost, replicability and technical barriers²².

Another techniques is a DNA-scaffolded silver nanocluster and magnetic separation introducing a high sensitive aptasensor, in order to analyse simultaneously AFB1 and OTA^{22,89}. According to Guo Guo *et al.* and Zhang *et al.*, fluorescence aptasensor represents a great potential for multi-mycotoxins determination^{22,89}.

Surface Plasmon Resonance (SPR)

In this context there is also an analytical strategy, Surface Plasmon Resonance (SPR). This technique has several advantages, such as high sensibility for multiple targets, good specificity, real-time monitoring and high throughput detection^{22,90}. Recently, another development of this method, a SPR-based aptasensor chip has emerged in order to determine four mycotoxins, AFB1, OTA, ZEA and DON^{22,91}. At present time, the majority of aspects such as sensitivity, stability, time consuming, cost and replicability necessary for the detection of mycotoxins by aptamer biosensor are more successful than ELISA, but it is essential to figure a method that could better compete with ELISA performance, namely regarding the simplification of analytical principle and devices²².

Multi-mycotoxins analytical methodologies applied to groundnuts

A vast number of the studies mentioned in the literature determine a single mycotoxin. However, in the last few years there is a tendency to optimize and validate multi-mycotoxins analytical methods. Table 2 summarizes multi-analyte methods for mycotoxins determination in groundnuts (peanuts) and other types of food, such as nuts and dried fruits. According to analytical methods summarized in Table 2, the most common analytical technique is liquid chromatography coupled with mass spectrometry. However, immunoassays such as ELISA and biosensors are also being development and validated. The main differences among the selected methods for mycotoxins determination is efficiency, sensibility, selectivity and the cost/efficiency relation, to provide better detection and quantification of multi-mycotoxins. Concerning Table 2, among extraction methods, SLE and QuEChERS are commonly used for multi-mycotoxins determination in groundnuts. These methods are also applied to nuts and dried foods (Table 2). With regard to chromatographic techniques, the majority of these methods are based in liquid chromatography coupled to mass spectrometry due to allow simultaneously analysis of different mycotoxins from different groups and uses C18 analytical columns (Table 2).

Mycotoxins in groundnuts (peanuts): RASFF notifications

In order to provide valid information about contamination effects in EU, Rapid Alert System for Food and Feed (RASFF) provides food safety information through notifications by different countries from EU or outside EU.

In Table 3 are summarized RASFF notifications regarding mycotoxins in groundnuts. The period of report is between 1st January 2021 until 30th September 2021 obtained in RASFF⁹², so it is possible to observe that all of the notifications are classified as serious risk (Table 1). Most of the notifications indicate that the contaminated groundnuts are from countries outside the EU, namely from Egypt and India. The highest value was found for groundnuts from Bolivia, where it was reported a level of AFBI of 290 µg/kg. These aspects highlight the importance of developing and validate analytical methods to monitor the mycotoxins in groundnuts.

Mycotoxins Detoxification

Normally, aflatoxins are resistant to common treatment strategies, for example pasteurization and sterilization. For this reason, it was necessary to develop effective physical, chemical and biological methods to control the amount of mycotoxins in food^{13,93,94,95,96,97}. It is recommended to focus on new technologies for the control of aflatoxins which can have field-application with the principal aim of protecting human and animal food/feed safety and health. Also important to increase awareness about public health and prevention, raise economic benefits and, at the same time, decrease costs¹³.

Most of the techniques are applied to grains and cereals decontamination, but all the methods mentioned can be implemented for groundnuts (peanuts). The conventional decontamination techniques in cereals are mostly chemical, namely hydrogen peroxide, citric acid, lactic acid, propionic acid and ozonated water⁹⁸. According to some studies, there is a possibility to promote aflatoxin detoxification through the degradation of their structure using different gases or chemical agents that oxidize, or hydrolase or using thermal treatment. In relation to the hydrolysis, in acidic and alkaline conditions, method of detoxification, this is able to open the lactone rings of aflatoxins to produce a water-soluble compound, the beta-keto acid, which is easily removed from the sample using rinsing with water. Concerning to thermal inactivation, for example microwaving, extrusion and heating, irradiation ultraviolet light and absorption gases are the most prevailing physical techniques to detoxify aflatoxins. High temperatures (between 237 and 306°C) or gamma radiation (called as cold process) are used for decontamination to extend food shelf life by declining microbial density, once this method is significantly effective in the degradation of mycotoxins¹³. There is also another type of method, the bio-detoxification which involves enzymes and microorganisms. In fermented food lactic acid bacteria (LAB) and yeast strains can be used^{13,99,100,101,102,103}.

Recent decontamination techniques have been developed without affecting the quality and nutrients which can fulfil some objectives such as utility, environmentally friendly and cost-effective. These decontamination techniques are UV radiation, Gamma radiation, Microwave UV radiation, Extrusion, Electron beam radiation, Pulsed light and Heating¹⁰⁴. In Table 4 it is possible to observe the effectiveness of each treatment through the percentage of mycotoxins reduction.

It is recommended to focus on new technologies for the effective control of aflatoxins which can have field-application with the principal aim of protecting human and

animal food/feed safety and health. It is also important to increase awareness about public health and prevention, raising economic benefits and, at the same time, decreasing costs¹³.

Conclusions and Future Perspectives

Groundnuts (peanuts), nuts and dried fruits have a great tendency to be contaminated by mycotoxins and, due to climate changes, these contaminations could aggravate. The main extraction methods used for mycotoxins are SLE and QuEChERS and the analytical techniques mainly used are LC coupled to mass spectrometry, immunoassays, namely ELISA and biosensors for multi-mycotoxins determination.

According to the needs of multi-mycotoxins analysis, it exists a possibility to use high resolution mass spectrometry techniques, such as Orbitrap and Time of flight (ToF), however further studies are needed to assess their reliability, feasibility and reproducibility in future quantifications. ELISA techniques are expected to continue to be used and developed.

Apta-based biosensors are promissory, neglecting higher sensibility. However, more research is needed to develop successful specific aptamers, for aptasensors and sensor arrays for multi-mycotoxin analyses.

For all these reasons presented, it is imperative to create and perform a technique capable to analyse several mycotoxins simultaneously (ideally from different groups of mycotoxins) with high specificity, sensitivity, precision and accuracy in different food matrices in order to be able to guarantee the safety of food samples with reduction of time analysis, organic solvents (environmentally friendly) and costs.

Bibliography

1. NAUTIYA, P. C. - GROUNDNUT: Post-harvest Operations. (2002).
2. ASAE - **frutos-secos-e-frutos-secados @ www.asae.gov.pt** [Consult. 13 jun. 2021]. Disponível em: <https://www.asae.gov.pt/newsletter2/asaenews-n-92-dezembro-2015/frutos-secos-e-frutos-secados.aspx>
3. TOLOSA, Josefa *et al.* - Nuts and dried fruits: Natural occurrence of emerging Fusarium mycotoxins. **Food Control**. ISSN 09567135. 33:1 (2013) 215–220.
4. LI, Hui *et al.* - Time-Resolved Fluorescence Immunochromatography Assay (TRFICA) for Aflatoxin: Aiming at Increasing Strip Method Sensitivity. **Frontiers in Microbiology**. ISSN 1664302X. 11:May (2020) 1–7.
5. WANG, Yu Jiao *et al.* - Multi-mycotoxin exposure and risk assessments for Chinese consumption of nuts and dried fruits. **Journal of Integrative Agriculture**. ISSN 20953119. 17:7 (2018) 1676–1690.
6. FAOSTAT - **FAOSTAT**, atual. 2019. [Consult. 16 out. 2021]. Disponível em: <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL/visualize>
7. EU (2006) . COMMISSION REGULATION (EC) No 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. **Official Journal of the European Union**. (2006). 50: 1–54.
8. XUE, Zhaohui *et al.* - Recent advances in aflatoxin B1 detection based on nanotechnology and nanomaterials-A review. **Analytica Chimica Acta**. ISSN 0003-2670. 1069:(2019) 1–27.
9. POPESCU, Roua Gabriela *et al.* - The Effectiveness of Dietary Byproduct Antioxidants on Induced CYP Genes Expression and Histological Alteration in Piglets Liver and Kidney Fed with Aflatoxin B1 and Ochratoxin A. **Toxins**. ISSN 20726651. 13:2 (2021).
10. OSTRY, Vladimir *et al.* - Mycotoxins as human carcinogens—the IARC Monographs classification. **Mycotoxin Research**. ISSN 18671632. 33:1 (2017) 65–73.
11. WU, Qifang; XIE, Lijuan; XU, Huirong - Determination of toxigenic fungi and aflatoxins in nuts and dried fruits using imaging and spectroscopic techniques. **Food Chemistry**. ISSN 18737072. 252:December 2017 (2018) 228–242.
12. BARSOUK, Adam *et al.* - Chemical Risk Factors of Primary Liver Cancer: An Update. **Hepatic Medicine: Evidence and Research**. ISSN 1179-1535. Volume 12:(2021) 179–

188.

13. NAZHAND, Amirhossein *et al.* - Characteristics, occurrence, detection and detoxification of aflatoxins in foods and feeds. **Foods**. ISSN 23048158. 9:5 (2020) 1–26.
14. KENSLER, Thomas W. *et al.* - Aflatoxin: A 50-year Odyssey of mechanistic and translational toxicology. **Toxicological Sciences**. ISSN 10966080. 120:SUPPL.1 (2011) 28–48..
15. ZINEDINE, Abdellah; MAÑES, Jordi - Occurrence and legislation of mycotoxins in food and feed from Morocco. **Food Control**. ISSN 09567135. 20:4 (2009) 334–344.
16. LIU, Yan; WU, Felicia - Global burden of Aflatoxin-induced hepatocellular carcinoma: A risk assessment. **Environmental Health Perspectives**. ISSN 00916765. 118:6 (2010) 818–824.
17. MARCHESI, Silvia *et al.* - Aflatoxins B1 and M1: Biological Properties and Their Involvement in Cancer Development. **Toxins**. (2018) 1–19.
18. WILD, C. P.; TURNER, P. C. - The toxicology of aflatoxins as a basis for public health decisions. **Mutagenesis**. 17:6 (2002) 471–481.
19. HEALTH, Environmental; STUDIES, Environmental; CHEMISTRY, Medicinal - Role of Human Microsomal and Human Complementary DNA-expressed Cytochromes P4501A2 and P4503A4 in the Bioactivation of Aflatoxin. 1994) 101–108.
20. JW, Jatfa - Aflatoxicosis Associated with Swine Stillbirth in the Piggery Farm University of Agriculture Makurdi. **Current Trends in Biomedical Engineering & Biosciences**. 13:5 (2018) 83–85.
21. LEE, Hu Suk *et al.* - An investigation into aflatoxin M1 in slaughtered fattening pigs and awareness of aflatoxins in Vietnam. **BMC Veterinary Research**. ISSN 17466148. 13:1 (2017) 1–7.
22. GUO, Xiaodong *et al.* - Aptamer-Based Biosensor for Detection of Mycotoxins. **Frontiers in Chemistry**. ISSN 22962646. 8:April (2020).
23. ALSHARIF, Ali Mohamed Ali; CHOO, Yeun Mun; TAN, Guan Huat - Detection of five mycotoxins in different food matrices in the malaysian market by using validated liquid chromatography electrospray ionization triple quadrupole mass spectrometry. **Toxins**. ISSN 20726651. 11:4 (2019).
24. MAHMOODI, Majid *et al.* - Impact of Fumonisin B1 on the Production of Inflammatory

- Cytokines by Gastric and Colon Cell Lines. 11:June (2012) 165–173.
25. MATYSIAK, Jan - Quality of Dietary Supplements Containing Plant-Derived Ingredients Reconsidered by Microbiological Approach. (2020).
 26. SU, Chunyan *et al.* - Occurrence of Toxigenic Fungi and Mycotoxins on Root Herbs from Chinese Markets. (2017).
 27. (CONTAM), EFSA Panel On Contaminants In The Food Chain *et al.* - Risks for animal health related to the presence of fumonisins , their modified forms and hidden forms in feed. 16:March (2018).
 28. ABRUNHOSA, Luís *et al.* - A Review of Mycotoxins in Food and Feed Products in Portugal and Estimation of Probable Daily Intakes A Review of Mycotoxins in Food and Feed Products in Portugal and Estimation of Probable Daily Intakes. **Taylor and Francis**. 8398:November (2016).
 29. JESTOI, Marika - Emerging Fusarium -Mycotoxins Enniatins , And Moniliformin — A Review. **Taylor and Francis**. May 2013 (2008) 37–41.
 30. KÖPPEN, Robert *et al.* - Determination of mycotoxins in foods : current state of analytical methods and limitations. **Springer**. (2010) 1595–1612.
 31. MAHDJOUBI, Choukri Khelifa; ARROYO-MANZANARES, Natalia; HAMINI-KADAR, Nisserine - Multi-Mycotoxin Occurrence and Exposure Assessment Approach in Foodstuffs from Algeria. **Toxins**. 12:194 (2020) 1–18.
 32. WAN, Lam Yim Murphy; TURNER, Paul C.; EL-NEZAMI, Hani - Individual and combined cytotoxic effects of Fusarium toxins (deoxynivalenol, nivalenol, zearalenone and fumonisins B1) on swine jejunal epithelial cells. **Food and Chemical Toxicology**. ISSN 02786915. 57:(2013) 276–283.
 33. MANIZAN, Ama Léthicia *et al.* - Multi-mycotoxin determination in rice, maize and peanut products most consumed in Côte d'Ivoire by UHPLC-MS/MS. **Food Control**. ISSN 09567135. 87:(2018) 22–30.
 34. ANTONISSEN, Gunther *et al.* - Impact of Fusarium mycotoxins on hepatic and intestinal mRNA expression of cytochrome P450 enzymes and drug transporters, and on the pharmacokinetics of oral enrofloxacin in broiler chickens. **Food and Chemical Toxicology**. ISSN 18736351. 101:(2017) 75–83.
 35. BRAR, Pardeepinder K.; DANYLUK, Michelle D. - Nuts and Grains: Microbiology and Preharvest Contamination Risks. **Preharvest Food Safety**. May (2018) 105–121.

36. DAINES, Ron - Targeted Grazing: Targeted Grazing: **Rangeland Ecology And Management**. (2006).
37. MARCUS, Karen A.; AMLING, H. J. - Escherichia coli Field Contamination of Pecan Nuts . **Applied Microbiology**. ISSN 0003-6919. 26:3 (1973) 279–281.
38. SRICHAMNONG, W., WOOTTON, M., SRZEDNICKI, G. - Effect of nut-in-shell storage conditions on volatile profile in macadamia nuts. **Julius-Kühn-Archiv**. (2010).
39. LEGGIERI, Marco Camardo; TOSCANO, Piero - Predicted Aflatoxin B1 Increase in Europe Due to Climate Change : Actions and Reactions at Global Level. **Toxins**. (2021) 1–21.
40. ANGEL MEDINA, Jesus M. Gonzalez-Jartin And Maria J. Sainz - Impact of global warming on mycotoxins. **Elsevier**. (2017) 76–81.
41. OJIAMBO, Peter S. *et al.* - Cultural and Genetic Approaches to Manage Aflatoxin Contamination: Recent Insights Provide Opportunities for Improved Control. **Phytopathology**. (2018) 1–60.
42. GREGORY, Peter J. *et al.* - Integrating pests and pathogens into the climate change / food security debate. **Journal of Experimental Botany**. 60:10 (2009) 2827–2838.
43. BEBBER, Daniel P.; GURR, Sarah J. - Crop-destroying fungal and oomycete pathogens challenge food security. **Fungal Genetics and Biology**. ISSN 1087-1845. 74:(2015) 62–64.
44. BEBBER, Daniel P.; HOLMES, Timothy; GURR, Sarah J. - The global spread of crop pests. **Global Ecology and Biogeography**. September (2014).
45. UNIVERSITÀ, Rossi V *et al.* - Modelling, predicting and mapping the emergence of aflatoxins in cereals in the EU due to climate change. 178 (2012).
46. BATTILANI, P. *et al.* - Aflatoxin B 1 contamination in maize in Europe increases due to climate change. **Nature Publishing Group**. April (2016) 1–7.
47. CAMARDO LEGGIERI, Marco *et al.* - Aspergillus flavus and Fusarium verticillioides Interaction: Modeling the Impact on Mycotoxin Production. **Frontiers in Microbiology**. ISSN 1664302X. 10:November (2019) 1–10.
48. GIORNI, Paola; BERTUZZI, Terenzio; BATTILANI, Paola - Impact of fungi co-occurrence on mycotoxin contamination in maize during the growing season. **Frontiers in Microbiology**. ISSN 1664302X. 10:JUN (2019).
49. FOUCHÉ, Tanya; CLAASSENS, Sarina; MABOETA, Mark - Aflatoxins in the soil

ecosystem: an overview of its occurrence, fate, effects and future perspectives. **Mycotoxin Research**. ISSN 18671632. 36:3 (2020) 303–309.

50. CERVINI, Carla *et al.* - Interacting climate change factors (CO₂ and temperature cycles) effects on growth , secondary metabolite gene expression and phenotypic ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* strains on a grape-based matrix. **Science Direct**. (2019) 1–8.

51. CERVINI, Carla *et al.* - International Journal of Food Microbiology Effects of temperature and water activity change on ecophysiology of ochratoxigenic *Aspergillus carbonarius* in field-simulating conditions. **International Journal of Food Microbiology**. ISSN 0168-1605. 315: (2020) 108420.

52. COMMISSION REGULATION (EC) No 401/2006 of 23 February 2006 laying down the methods of sampling and analysis for the official control of the levels of mycotoxins in foodstuffs. (06- 12–34.

53. XIE, Lijuan; CHEN, Min - Development of Methods for Determination of Aflatoxins. **Food Science and Nutrition**. (2015) 37–41.

54. ZHANG, Kai; BANERJEE, Kaushik - A Review: Sample Preparation and Chromatographic Technologies for Detection of Aflatoxins in Foods. (2020) 1–39.

55. DORNER, RICHARD J. COLE And JOE W. - Extraction of Aflatoxins from Naturally Contaminated Peanuts with Different Solvents and Solvent/Peanut Ratios. 77:6 (1994) 1509–1511.

56. T. E. MÖLLER, M. Nyberg - Efficiency of different extraction solvent mixtures used in analyses of aflatoxins from a certified peanut meal reference material Efficiency of different extraction solvent mixtures used in analyses of aflatoxins from a certified peanut meal reference ma. June 2015 (2007) 37–41.

57. FISHBEIN, H. L. FALK - CHROMATOGRAPHY OF MOLD METABOLITES. **Elsevier**. 12:(1970) 42–87.

58. AGNIESZKA ZGOŁA-GRZES´KOWIAK, Tomasz Grzes´kowiak - Dispersive liquid-liquid microextraction. **Elsevier**. 30:(2011).

59. DORNER, VICTOR S. SOBOLEV, JOE W. - Cleanup Procedure for Determination of Aflatoxins in Major Agricultural Commodities by Liquid Chromatography. **AOAC International**. (2002) 642–645.

60. BARKER, STEVEN A.; LONG, AUSTIN R.; SHORT, CHARLES R. - ISOLATION OF

DRUG RESIDUES FROM TISSUES BY SOLID PHASE DISPERSION. 475:(1989) 353–361.

61. BLESÁ, J. *et al.* - Determination of aflatoxins in peanuts by matrix solid-phase dispersion and liquid chromatography. **Elsevier**. 1011:(2003) 49–54.

62. LORD, Heather L. - Strategies for interfacing solid-phase microextraction with liquid chromatography. **Elsevier**. 1152:(2007) 2–13.

63. HU, YAN-YUN *et al.* - Determination of aflatoxins in hot chilli products by matrix solid-phase dispersion and liquid chromatography. **Chinese Journal of Chromatography (Se Pu)**. ISSN 10008713. 24:1 (2006) 62–64.

64. TRUCKSESS, Mary *et al.* - Determination of aflatoxins and ochratoxin A in ginseng and other botanical roots by immunoaffinity column cleanup and liquid chromatography with fluorescence detection. **Journal of AOAC International**. ISSN 10603271. 89:3 (2006) 624–630.

65. CHEN, Chia Yang; LI, Wen Jiun; PENG, Kai Yao - Determination of aflatoxin M1 in milk and milk powder using high-flow solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. ISSN 00218561. 53:22 (2005) 8474–8480.

66. ANKLAM, Eike *et al.* - Supercritical fluid extraction (SFE) in food analysis: A review. **Supercritical fluid extraction (SFE) in food analysis: a review**. Taylor and Francis. August 2014 (1998) 37–41.

67. SPAN, R.; WAGNER, W. - A New Equation of State for Carbon Dioxide Covering the Fluid Region from the Triple-Point Temperature to 1100 K at Pressures up to 800 MPa. **Journal of Physical and Chemical**. 1509:1996 (2009).

68. RIEKKOLA, M.L.; MANNINEN, P.; HARTONEN, K. - **Hyphenated techniques in supercritical fluid chromatography and extraction**. ISBN 0444887946.

69. PERESTRELO, Rosa *et al.* - QuEChERS - Fundamentals, relevant improvements, applications and future trends. **Elsevier**. 1070:(2019).

70. RAHMAN, Md. Musfiqur *et al.* - Quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe sample preparation approach for pesticide residue analysis using traditional detectors in chromatography- A review. **Journal of Separation Science**. [s.d.] 1–33.

71. ISLAS, Gabriela *et al.* - Dispersive Solid Phase Extraction for the Analysis of Veterinary Drugs Applied to Food Samples: A Review. **International Journal of Analytical Chemistry**. 2017:(2017).

72. REJCZAK, Tomasz; TUZIMSKI, Tomasz - QuEChERS-based extraction with dispersive solid phase extraction clean-up using PSA and ZrO₂-based sorbents for determination of pesticides in bovine milk samples by HPLC-DAD. **Food Chemistry**. ISSN 0308-8146. 217:(2017) 225–233.
73. RENAUD, Justin B.; MILLER, J. David; SUMARAH, Mark W. - Mycotoxin testing paradigm: Challenges and opportunities for the future. **Journal of AOAC International**. ISSN 19447922. 102:6 (2019) 1681–1688.
74. MALACHOVÁ, Alexandra *et al.* - Advanced LC–MS-based methods to study the co-occurrence and metabolization of multiple mycotoxins in cereals and cereal-based food. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**. ISSN 16182650. 410:3 (2018) 801–825.
75. RENAUD, Justin B.; SUMARAH, Mark W. - Data independent acquisition-digital archiving mass spectrometry: Application to single kernel mycotoxin analysis of *Fusarium graminearum* infected maize. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**. ISSN 16182650. 408:12 (2016) 3083–3091.
76. F. FRIEDLI - Fused Silica Capillary GC/MS Coupling: A New, Innovative Approach. **Journal of High Resolution Chromatography**. 4:10 (1981) 495–499.
77. SARGENT, Mike (ED.) - **Guide to achieving reliable quantitative LC-MS measurements, RSC Analytical Methods Committee, 2013**. ISBN 9780948926273.
78. TAHBOUB, Yahya R. - Chromatographic behavior of co-eluted plasma compounds and effect on screening of drugs by APCI-LC – MS (/ MS): Applications to selected cardiovascular drugs. **Journal of Pharmaceutical Analysis**. ISSN 2095-1779. 4:6 (2014) 384–391.
79. LOW, Kah Hin; ZAIN, Sharifuddin Md; ABAS, Mhd Radzi - Evaluation of microwave-assisted digestion condition for the determination of metals in fish samples by inductively coupled plasma mass spectrometry using experimental designs. **International Journal of Environmental Analytical Chemistry**. ISSN 03067319. 92:10 (2012) 1161–1175.
80. ANDERSON, Mark J. - Response Surface Methods for Peak Process Performance. **Stat-Ease, Inc.** [s.d.] 1–6.
81. DEPOI, Fernanda Dos Santos *et al.* - Multivariate optimization for cloud point extraction and determination of lanthanides. **Analytical Methods**. ISSN 17599679. 4:9 (2012) 2809–2814.
82. HOLLAND, D.; SEPANIAK, Michael J. - FACTORS INFLUENCING PERFORMANCE

IN THE RAPID SEPARATION OF AFLATOXINS BY MICELLAR ELECTROKINETIC CAPILLARY CHROMATOGRAPHY. **Talanta**. 39:9 (1992) 1139–1147.

83. SINHA, Kaushal K.; SPEARE, A. - Testing methods for aflatoxins in foods. **Food and Nutrition Bulletin**. 20:4 (1999) 458–464.

84. CHU, F. S. - Immunoassays for Analysis of Mycotoxins. **Journal of Food Protection**. 47:7 (1984) 562–569.

85. ITOH Y, HIFUMI E, SUDOH K, UDA T, OHTANI K, Kawamura; O, NAGAYAMA S, SATOH S, Ueno Y. - Detection of aflatoxin B1 by direct ELISA. **JSM Mycotoxins**. February 2016 (1987).

86. SHADBAD, Siah et al. - Determination of aflatoxins in nuts of Tabriz confectionaries by ELISA and HPLC methods. **Advanced Pharmaceutical Bulletin**. 2:1 (2012) 123–126.

87. ZHANG, Zhaowei et al. - Rapid On-Site Sensing Aflatoxin B1 in Food and Feed via a Chromatographic Time- Resolved Fluoroimmunoassay. **PLOS ONE**. 1:(2015) 1–14.

88. QIN LI, ZHICHENG LU, XUECAI TAN, XIAOYAN XIAO, PAN WANG, LONG WU, KANG SHAO, Wenmin Yin; HAN, Heyou - Ultrasensitive detection of aflatoxin B1 by SERS aptasensor based on exonuclease-assisted recycling amplification. **Elsevier**. ISSN 0956-5663. 97:May (2017) 59–64.

89. ZHANG, Jing et al. - A Fluorescent Aptasensor based on DNA-scaffolded Silver Nanoclusters Coupling with Zn(II)-ion Signal-enhancement for Simultaneous Detection of OTA and AFB1. **Elsevier**. (2016).

90. PATEL, Kruti et al. - A Novel Surface Plasmon Resonance Biosensor for the Rapid Detection of Botulinum Neurotoxins. **Biosensors**. (2017).

91. WEI, Tao et al. - Simultaneous detection of aflatoxin B1 , ochratoxin A , zearalenone and deoxynivalenol in corn and wheat using surface plasmon resonance. **Food Chemistry**. ISSN 0308-8146. 300:July (2019) 125176.

92. **RASFF - Results** [Consult. 23 out. 2021]. Disponível em: <https://webgate.ec.europa.eu/rasff-window/screen/list>

93. ZHU, Yan et al. - Innovative Technologies for the Mitigation of Mycotoxins in Animal Feed and Ingredients — A Review of Recent Patents. **Animal Feed Science and Technology**. ISSN 0377-8401. (2016).

94. UDOMKUN, Patchimaporn et al. - Innovative technologies to manage aflatoxins in

- foods and feeds and the profitability of application e A review. **Elsevier**. 76:(2017).
95. EDVALDO VASCONCELOS SOARES MACIEL, Karen Mejía-Carmona And Fernando Mauro Lanças - Evaluation of Two Fully Automated Setups for Mycotoxin Analysis Based on Online Extraction-Liquid. **Molecules**. 2020).
96. AGRIOPOULOU, Sofia; STAMATELOPOULOU, Eygenia; VARZAKAS, Theodoros - Control Strategies : Prevention and Detoxification in Foods. **Foods**. (2020).
97. MD. SHOFIUL AZAM, SHAFI AHMED, Md. Nahidul Islam *et al.* - Critical Assessment of Mycotoxins in Beverages and Their Control Measures. **Toxins**. (2021) 1–26.
98. MIR, Shabir Ahmad *et al.* - Application of new technologies in decontamination of mycotoxins in cereal grains: Challenges, and perspectives. **Food and Chemical Toxicology**. ISSN 18736351. 148:(2021) 111976.
99. PÁTER HARKAI, ISTVAN SZABÓ, MATYAS CSERHÁTI, CSILLA KRIFATON, ANITA RISA, JÚLIA RADÓ, ADRIENN BALÁZS, KINGA BERTA, Balázs Kriszt - Biodegradation of aflatoxin-B1 and zearalenone by *Streptomyces* sp. collection. 108:(2016) 48–56.
100. JI, Cheng; FAN, Yu; ZHAO, Lihong - Review on biological degradation of aflatoxin, zearalenone and deoxynivalenol. **Animal Nutrition Journal**. ISSN 2405-6545. (2016).
101. VERHEECKE, C.; LIBOZ, T.; MATHIEU, F. - International Journal of Food Microbiology Microbial degradation of aflatoxin B1 : Current status and future advances. **International Journal of Food Microbiology**. ISSN 0168-1605. 237:(2016) 1–9.
102. ADEBO, O. A. *et al.* - Review on Microbial Degradation of Aflatoxins. **Taylor and Francis**. 8398:October (2015).
103. B.L. GONÇALVES, C. GONÇALVES, R.E. ROSIM, C. A. F. Oliveira And C. H. Corassin - Evaluations of Different Sources of *Saccharomyces cerevisiae* to Binding Capacity of Aflatoxin B1 Utilizing their Adsorption Isotherms. **Journal Food Chemistry and Nanotechnology**. February 2018 (2017).
104. ISMAIL, Amir *et al.* - Aflatoxin in foodstuffs: Occurrence and recent advances in decontamination. **Food Research International**. ISSN 18737145. 113:June (2018) 74–85.
105. SPANJER, Martien C.; RENSEN, Peter M.; SCHOLTEN, Jos M. - LC – MS / MS multi-method for mycotoxins after single extraction , with validation data for peanut , pistachio , wheat , maize , cornflakes , raisins and figs. **Taylor and Francis**. 0049:(2008).
106. JAIME ALCÁNTARA-DURÁNA, DAVID MORENO-GONZÁLEZA, JUAN F.

GARCÍA-REYESA, Antonio Molina-Díaz - Use of a modified QuEChERS method for the determination of mycotoxin residues in edible nuts by nano flow liquid chromatography high resolution mass spectrometry. **Elsevier**. ISSN 0308-8146. 279:(2019) 144–149.

107. NONAKA, Y. *et al.* - Determination of aflatoxins in food samples by automated on-line in-tube solid-phase microextraction coupled with liquid chromatography – mass spectrometry. **Elsevier**. 1216:(2009) 4416–4422.

108. JOSÉ L. HIDALGO-RUIZ, ROBERTO ROMERO-GONZÁLEZ, José Luis Martínez Vidal; FRENICH, Antonia Garrido - Determination of mycotoxins in nuts by ultra high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry: Looking for a representative matrix. **Elsevier**. ISSN 0889-1575. (2019).

109. CHANG, Ming *et al.* - Efficiency and safety evaluation of photodegradation of Aflatoxin B1 on peanut surface. **International Journal of Food Science and Technology**. ISSN 09505423. 48:12 (2013) 2474–2479.

110. IQBAL, Shahzad Zafar *et al.* - Effect of γ irradiation on fungal load and aflatoxins reduction in red chillies. **Radiation Physics and Chemistry**. ISSN 0969806X. 82:1 (2013) 80–84.

111. JABŁOŃSKA, J. - The influence of UV, X and microwave radiation on the aflatoxin B1 concentration in nuts. (2014). 111–119. [Consult. 27 out. 2021]. Disponível em: <https://www.infona.pl/resource/bwmeta1.element.baztech-97bf0b5f-aad0-4477-8b15-9f269b004f9d>

112. ZHENG, Haiyan *et al.* - Reduction of aflatoxin B1 in peanut meal by extrusion cooking. **LWT - Food Science and Technology**. ISSN 00236438. 64:2 (2015) 515–519.

113. ASSUNÇÃO, Ednei *et al.* - Effects of gamma and electron beam radiation on Brazil nuts artificially inoculated with *Aspergillus flavus*. **Journal of Food Protection**. ISSN 0362028X. 78:7 (2015) 1397–1401.

114. RASTEGAR, Hossein *et al.* - Removal of aflatoxin B1 by roasting with lemon juice and/or citric acid in contaminated pistachio nuts. **Food Control**. ISSN 09567135. 71:(2017) 279–284.

Annex

Table 1 – Maximum levels for certain mycotoxins in groundnuts, nuts and dried fruits according to Commission Regulation (EC) No 1881/2006 and its amendments

Mycotoxins	Foodstuffs	Maximum levels (µg/kg)
Aflatoxin B1	Groundnuts (peanuts) and other oilseeds, to be subjected to sorting, or other physical treatment, before human consumption or use as an ingredient in foodstuffs, with the exception of groundnuts (peanuts) and other oilseeds for crushing for refined vegetable oil production.	8.0
	Almonds, pistachios and apricot kernels to be subjected to sorting, or other physical treatment, before human consumption or use as an ingredient in foodstuffs.	12.0
	Hazelnuts and Brazil nuts, to be subjected to sorting, or other physical treatment, before human consumption or use as ingredient in foodstuffs.	8.0
	Tree nuts, other than the tree nuts aforementioned, to be subjected to sorting, or other physical treatment, before human consumption or use as an ingredient in foodstuffs.	5.0
	Dried fruit, other than dried figs, to be subjected to sorting, or other physical treatment, before human consumption or use as an ingredient in foodstuffs.	5.0
	Dried figs.	6.0
Sum of B1, B2, G1 e G2	Groundnuts (peanuts) and other oilseeds (40), to be subjected to sorting, or other physical treatment, before human consumption or use as an ingredient in foodstuffs, with the exception of groundnuts (peanuts) and other oilseeds for crushing for refined vegetable oil production.	15.0
	Almonds, pistachios and apricot kernels to be subjected to sorting, or other physical treatment, before human consumption or use as an ingredient in foodstuffs.	15.0
	Hazelnuts and Brazil nuts, to be subjected to sorting, or other physical treatment, before human consumption or use as ingredient in foodstuffs	15.0
	Tree nuts, other than the tree nuts aforementioned, to be subjected to sorting, or other physical treatment, before human consumption or use as an ingredient in foodstuffs.	10.0
	Dried fruit, other than dried figs, to be subjected to sorting, or other physical treatment, before human consumption or use as an ingredient in foodstuffs.	10.0
	Dried figs.	10.0
Ochratoxin A (OTA)	Dried vine fruit (currants, raisins and sultanas).	10.0

Table 2 - Analytical Techniques for mycotoxins determination in peanuts and multi-mycotoxins determination

Type of sample	Mycotoxins analyzed	Clean-up Methods	Extraction Methods	Detector	Conditions	Analytical Column	Internal Standard	LOD (µg/kg)	LOQ (µg/kg)	References
Peanut Pistachio Wheat Maize Cornflakes Raisin Fig	AFB1, AFB2, AFG1, AFG2, OTA, DON, FB1, FB2, ZEA, H-2 Toxin, HT-2 Toxin,	-	Sample quantity: 25 g Extraction: 100 mL acetonitrile/water (80:20 v/v) on horizontal shaker for 2h; 1 mL of the extract is diluted and mixed with 3 mL of water and filtered	LC-MS/MS	Mobile phase: Solvent A H2O with 0.1% formic acid; Solvent B acetonitrile with 0.1% formic acid Gradient programme: 90% A at 0 min Flow-rate: 0.3mL/min Capillary voltage: 2.5 kV Desolvation temperature: 450 °C Desolvation gas flow: 600 L/h Collision Gas Pressure: 0.8 bar Ionisation: ESI source in positive mode	Altima C18 (150x3.2 mm, 5µm)	-	0.5 - 75	1.0- 150	[104]

<p>Peanut Pistachio Almond</p>	<p>AFB1, AFB2, AFG1, AFG2, AFM1, OTA, FB1, FB2, ZEA, H-2 Toxin, HT-2 Toxin,</p>	<p>QuEChERS</p>	<p>Sample quantity: 5 g Extraction: 10 mL of Milli-Q water, 10 mL of MeCN-formic acid (99.9/0.1 (v/v)), 4 g of anhydrous magnesium sulfate, 1 g of sodium chloride, 1 g of sodium citrate, 0.5 g of disodium hydrogen citrate sesquihydrate on centrifugation for 5 min; dSPE using EMR-Lipid activated with 5 mL of water shaken, 5 mL of organic extract centrifuged for 5 min; collected 5 mL of supernatant with 0.4 g of sodium chloride, 1.6 g anhydrous magnesium sulfate centrifuged for 5 min; dilution 1:25 with water followed by filtration PTFE filters</p>	<p>HPLC-Orbitrap MS</p>	<p>Mobile phase: Solvent A H₂O with 0.1% formic acid (v/v) and Solvent B MeCN with 0.1% formic acid (v/v) Gradient programme: 0-5 min 4% B, 5-20 min 100% B, 20-24 min 100% B, 24-28 min 2% B for 10 min Flow-rate: 200 nL/min Injection volume: 100 nL Capillary temperature: 250 °C Capillary voltage: 2.2 kV Column temperature: 25 °C Autosampler temperature: 7 °C Ionisation: ESI source in positive mode</p>	<p>EASY-Spray PepMap C18 Nano column (75 µm x 150 mm, 3 µm)</p>	<p>-</p>	<p>-</p>	<p>0.05 - 5</p>	<p>[106]</p>
--	---	-----------------	--	-------------------------	---	---	----------	----------	-----------------	--------------

Peanuts, Treenuts Cereals, Dried fruits, Spices	AFB1, AFB2, AFG1, AFG2	SPME	<p>Sample quantity: 0.5 g</p> <p>Extraction: 1 mL of 80% methanol in water (80:20 v/v) centrifuged for 5 min, supernatant used directly in-tube SPME</p>	HPLC-MS	<p>Mobile phase: methanol/acetone/nitrile (69/40 v/v): 5mM ammonium formate (45:55)</p> <p>Gradient programme isocratic mode</p> <p>Flow-rate: 1.0 mL/min</p> <p>Injection volume: 10 µL</p> <p>Column temperature: 40 °C</p> <p>Capillary voltage: 2500 V</p> <p>Drying gas flow: 13 L/min</p> <p>Drying gas temperature: 350 °C</p> <p>Gas pressure: 30 psi</p> <p>Ionisation: ESI source in positive mode</p>	Zorbax Eclipse XDB-C8 column 150 mm x 4.6 mm 5 µm	AFM1	0.04	0.05	[105]
---	---------------------------------	------	--	---------	--	---	------	------	------	-------

Almonds, Hazelnuts, Peanuts, Pistachios, Walnuts	AFB1, AFB2, AFG1, AFG2, ZEA	QuEChERS	<p>Sample quantity: 2 g</p> <p>Extraction: 10 mL of acetonitrile:water (80:20 v/v), 4 g Na2SO4 anhydrous salt and 1 g NaCl centrifugation for 10 min; 3 mL of supernatant, 100 mg of C18, centrifuged for 10 min and filtered</p>	UHPLC-MS/MS	<p>Mobile phase: Solvent A methanol; Solvent B aqueous solution of ammonium formate 5 mM</p> <p>Gradient programme: 25% A, increased to 100% A in 3.75 min during 2.25 min, reduced to initial conditions in 0.5 min during 1 min</p> <p>Flow-rate: 0.2 mL/min</p> <p>Injection volume: 5 µL</p> <p>Column temperature: 25 °C</p> <p>Capillary voltage: 3500 V</p> <p>Nozzle voltage: 500 V</p> <p>Sheath gas temperature: 400 °C</p> <p>Sheath gas flow: 11 L/min</p> <p>Gas temperature: 325 °C</p> <p>Gas flow: 5 L/min</p> <p>Gas pressure: 45 psi</p> <p>Ionisation: ESI source in positive mode for AFB1, AFB2, AFG1 and AFG2; ESI source in negative mode for ZEA</p>	Zorbax plus C18 column 100 x 2.1 mm, 1.8 µm	-	-	0.5 - 1.0	[107]
--	---	----------	---	-------------	---	---	---	---	-----------	-------

Walnut, Almond, Pistachio, Hazelnut, Apricot, Cashew, Sunflower seed kernel, Sesame seeds, Peanut	AFB1, AFB2, AFG1, AFG2	IAC	<p>Sample quantity: 10 g</p> <p>Extraction: 33% methanol solution, filtration, 500 µL of the filtrate and 500 µL of 33% methanol solution, transferred to microtubes and stored at -20 °C</p>	ELISA	Euroclon kit Absorbance: 450 nm	-	-	-	-	-	[86]
				HPLC Fluorescence	<p>Mobile phase: acetonitrile:methanol:water (17:29:54 v/v)</p> <p>Flow-rate: 1 mL/min</p> <p>Injection volume: 20 µL</p> <p>Excitation and emission wavelengths: 365 and 435 nm</p>	Hichrom ODS 250 x 4.6 mm, 5 mm)	-	0.05 - 0.42	0.19 - 1.4		

Apple juice, Grape juice, Orange juice, Pomegrana de juice, Raisin, Dried-fig, Wheat flour, Barley flour, Peanuts, Pistachios, Chili, Mixed spice	AFB1, AFB2, AFG1, AFG2, OTA	QuEChERS	<p>Sample quantity: 2.5 g</p> <p>Extraction: 10 mL acetonitrile, 10 mL water with 0.2% formic acid, rotation for 30 min; 4 g of magnesium sulfate, 1 g of sodium chloride, 1 g of sodium citrate, 0.5 g of sodium hydrogen citrate sesquihydrate, centrifugation; 2 extractions with 20 mL hexane; dSPE with supernatant, 150 mg C18, 900 mg magnesium sulfate, centrifugation, 2 washes with acetonitrile</p>	LC-MS/MS	<p>Mobile phase: Water</p> <p>Flow-rate: 0.2 mL/min</p> <p>Injection volume: 4 μL</p> <p>Column temperature: 30 °C</p> <p>Gas temperature: 250 °C</p> <p>Gas flow: 14 L/min</p> <p>Gas pressure: 25 psi</p> <p>Ionisation: ESI source in positive mode</p>	ODS C18 150 mm x 2.1 mm, 5 μ m	-	0.08 - 0.09	0.10 - 0.20	[23]
---	---	----------	--	----------	---	---	---	-------------	-------------	------

Table 3 – Notification of mycotoxins in groundnuts from RASFF

Date	Country	Product	Mycotoxin	Level (µg/kg)	Risk
06/01/2021	Netherlands	Egypt groundnuts	AFBI	99	Serious
05/02/2021	Netherlands	Egypt groundnuts	AFBI	67	Serious
08/02/2021	Italy	Egypt groundnuts	AFBI	52.6	Serious
24/02/2021	Netherlands	Argentina groundnuts	AFBI	5.4	Serious
01/03/2021	Germany	Egypt groundnuts	AFBI	5.4	Serious
04/03/2021	Italy	Fried groundnuts	AFBI	2.82	Serious
11/03/2021	Netherlands	Egypt organic groundnuts	AFBI	9.8	Serious
17/03/2021	Netherlands	Argentina groundnuts	AFBI	8.6	Serious
22/03/2021	Netherlands	Spain Groundnuts	AFBI	21	Serious
25/03/2021	Netherlands	Egypt groundnuts	AFBI	25	Serious
01/04/2021	Italy	Egypt groundnuts	AFBI	37.6	Serious
12/04/2021	Netherlands	Indian groundnuts	AFBI	19	Serious
20/04/2021	Netherlands	Argentine groundnuts	AFBI	9.4	Serious
21/04/2021	Germany	Egypt groundnuts	Total Aflatoxins	14	Serious
28/04/2021	Netherlands	Bolivian groundnuts	AFBI	9.5	Serious
29/04/2021	Netherlands	Egypt groundnuts	AFBI	20	Serious
05/05/2021	Germany	Egypt groundnuts	AFBI	15.4	Serious
06/05/2021	Netherlands	Egypt groundnuts	AFBI	7.8	Serious
27/05/2021	Netherlands	Egypt groundnuts	AFBI	250	Serious
27/05/2021	Netherlands	Bolivian groundnuts	AFBI	79	Serious
02/06/2021	Netherlands	China organic groundnuts	AFBI	4	Serious
07/06/2021	Netherlands	Bolivian groundnuts	AFBI	290	Serious
10/06/2021	Bulgaria	Brazil shelled groundnuts	AFBI	4.7	Serious
16/06/2021	Netherlands	Argentina groundnuts	AFBI	12	Serious
17/06/2021	Netherlands	Argentine groundnuts	AFBI	15	Serious
21/06/2021	Belgium	Cameroon groundnuts	AFBI	4.41	Serious
22/06/2021	Netherlands	Argentina groundnuts kernels	AFBI	10	Serious
30/06/2021	Italy	India groundnuts	AFBI	7.3	Serious
01/07/2021	Netherlands	Egypt groundnuts	AFBI	8.2	Serious
02/07/2021	Norway	USA blanched groundnuts	AFBI	28.5	Serious
06/07/2021	Netherlands	USA groundnuts	AFBI	5	Serious
29/07/2021	Netherlands	Indian groundnuts	AFBI	12	Serious
05/08/2021	Netherlands	Egypt groundnuts	AFBI	20	Serious
11/08/2021	Netherlands	Nicaraguan groundnuts	AFBI	11	Serious
19/08/2021	Netherlands	Argentina groundnuts	AFBI	4.7	Serious
01/09/2021	Netherlands	Indian groundnuts	AFBI	7.1	Serious
03/09/2021	Netherlands	Indian groundnuts	AFBI	9.2	Serious
07/09/2021	Netherlands	Brazilian groundnuts	AFBI	55	Serious
09/09/2021	Netherlands	Egypt groundnuts	AFBI	8	Serious
10/09/2021	Netherlands	USA groundnuts	AFBI	11	Serious
30/09/2021	Poland	USA groundnuts	AFBI	3	Serious

Table 4 - Influence of different Decontamination Techniques

Mycotoxin	Sample	Decontamination Technique	% Reduction of Mycotoxins	Reference
AFBI	Peanut surface	UV radiation	100	[109]
	Corn and walnut	Gamma radiation	>80	[110]
	Peanuts	Microwave UV radiation	>50	[111]
		Gamma radiation	49	
	Peanut meal	Extrusion	77	[112]
	Brazil nut	Gamma radiation	71	[113]
		Electron beam radiation	84	
	Pistachio nuts (mixed with lemon juice and citric acid)	Heating	93	[114]