



UNIVERSIDADE D  
COIMBRA

Inês Filipa Correia Duarte

AVALIAÇÃO DE EXPOSIÇÃO À  
ZEARALENONA NAS CRIANÇAS

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

Setembro de 2022



FACULDADE DE FARMÁCIA  
UNIVERSIDADE DE  
COIMBRA

Inês Filipa Correia Duarte

## AVALIAÇÃO DE EXPOSIÇÃO À ZEARALENONA NAS CRIANÇAS

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

Setembro de 2022

## Declaração

Eu, Inês Filipa Correia Duarte, estudante do Mestrado em Segurança Alimentar com o nº 2017262376, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo da Dissertação apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no âmbito da unidade curricular de Dissertação/Projecto.

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

Coimbra, 09 de Setembro 2022.

as)

Inês Duarte

A parte experimental apresentada nesta dissertação foi realizada no Laboratório de Bromatologia, Hidrologia e Nutrição da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra e no Laboratório de Toxicologia da Escola Universitária Vasco da Gama sob a orientação científica da Professora Doutora Angelina Lopes Simões Pena e coorientação da Professora Doutora Sofia Alexandra Giestas Cancela Duarte.



## **AGRADECIMENTOS**

Uma dissertação é fruto essencialmente do empenho e esforço individual daquele que se propõe a fazê-lo e, por isso, começo por agradecer a mim mesma pela ambição e persistência, mas também pelo stress e adaptação que juntos me permitiram, umas vezes de forma mais lenta e outras vezes mais célere, cumprir este objetivo.

A elaboração desta tese representa também a colaboração e contributo de várias pessoas, de forma direta e indireta, às quais quero expressar a minha gratidão.

Agradeço à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra e à Escola Universitária Vasco da Gama por proporcionarem as condições fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço à Professora Doutora Angelina Lopes Simões Pena, Coordenadora do Mestrado em Segurança Alimentar e minha orientadora, por ter possibilitado a realização desta dissertação e pelo apoio prestado à mesma.

De forma especial, quero expressar a minha gratidão à Professora Doutora Sofia Alexandra Giestas Cancela Duarte, minha coorientadora, pela disponibilidade, acessibilidade e simpatia que sempre demonstrou, pela partilha de conhecimentos e experiência científica e pela confiança no meu trabalho.

Agradeço também à Professora Doutora Ana Cláudia Paiva Santos pela disponibilidade e ajuda prestada.

Sem esquecer dos tutores e crianças que participaram neste estudo, o meu obrigado pela vossa cooperação e colaboração.

Aos meus pais, Isabel e José, e à minha irmã, Joana, quero agradecer profundamente pelo incentivo incondicional, pelos valores e princípios que me faço acompanhar e transpor diariamente, mas também por terem proporcionado e confiado em mim todos estes anos de formação académica.

Por último, mas não menos importante, quero agradecer às minhas amigas, Inês, Sofia e Diana, pela amizade, motivação e pelas horas de estudo que agora vemos recompensadas.

A todos vós, o meu sincero obrigado!

## RESUMO

A biomonitorização humana (HBM - do Inglês *Human Biomonitoring*) tem-se revelado uma ferramenta eficaz na avaliação da exposição individual, nomeadamente a micotoxinas. A micotoxina Zearalenona (ZEA) apresenta principalmente propriedades estrogénicas atuando como desregulador endócrino no sistema reprodutor, apresentando também um perfil imunotóxico, hematotóxico, hepatotóxico e genotóxico, aspetos que sustentam a necessidade de monitorizar a sua exposição.

Assim, o estudo de HBM realizado na presente dissertação tem como objetivos determinar os níveis de ZEA em amostras de urina através do imunoensaio enzimático ELISA (do Inglês *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*), avaliar o risco de exposição à ZEA por parte das crianças com idade entre os cinco e os 12 anos e identificar os fatores antropométricos, socio-demográficos, características individuais e os hábitos alimentares determinantes para a exposição das crianças.

Para isso, foram recolhidas 42 amostras de urina de crianças, entre os cinco e os 12 anos, do sexo masculino e feminino residentes no distrito de Santarém, e analisadas pelo imunoensaio enzimático ELISA, após extração em fase sólida (SPE).

O presente estudo demonstrou que cerca de 76% das amostras analisadas encontravam-se contaminadas por ZEA, com concentração média de  $188,12 \pm 253,99$  ng/mL. Para a avaliação de exposição, foi calculada a ingestão diária provável (PDI) e comparada com a ingestão diária tolerável (TDI) estabelecida pela EFSA com um valor de  $0,25$  µg/kg. O quociente de perigo variou entre 0,01 e 4,01, apontando a ZEA como uma preocupação para a Saúde Pública. Apenas o gelado apresentou uma correlação estatisticamente significativa com o teor de ZEA.

Assim, são necessários estudos adicionais para obter uma avaliação de risco mais robusta, considerando as características inerentes às diferentes populações, os efeitos tóxicos desta micotoxina e a frequência de deteção determinada.

**PALAVRAS-CHAVE:** Exposição, Biomonitorização humana, Zearalenona, urina, crianças, ELISA

## **ABSTRACT**

Human Biomonitoring (HBM) reveals to be an efficient tool for individual exposure assessment, for example of mycotoxins. The mycotoxin Zearalenone (ZEA) exposure needs monitoring due to the fact that besides being known as an estrogenic mycotoxin acting as an endocrine disruptor at reproductive system, it also shows an immunotoxic, hematotoxic, hepatotoxic and genotoxic profile.

Thus, the HBM study performed in this thesis aims to determinate ZEA levels in urine samples through Enzyme-Linked Immunosorbent Assay ELISA, assess ZEA exposure risk to children aged between five and 12 years old and identify anthropometric and socio-demographic factors, individual characteristics and eating habits that can be determinant for children's exposure.

For this purpose, 42 samples were collected from girls and boys aged between five and 12 years old and residing in district of Santarém, and analysed by ELISA enzyme immunoassay after solid-phase extraction (SPE).

The present study showed that about 76% of the samples were contaminated with ZEA, with a mean concentration of  $188,12 \pm 235,99$  ng/mL. Furthermore, for the exposure assessment, the probable daily intake (PDI) was calculated and compared with tolerable daily intake (TDI) established by EFSA with a value of  $0,25$  µg/kg. Hazard Quotient varied between 0,01 and 4,01 showing that ZEA is a concern for Public Health. Only ice-cream showed a statistically significant correlation with ZEA level.

Therefore, further studies are needed to obtain a more robust risk assessment, considering different population's characteristics, the toxic effects of this mycotoxin and the given detection's frequency.

**KEYWORDS:** Exposure, Human Biomonitoring, Zearalenone, urine, children, ELISA



## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Enumeração dos ODM e ODS (Vieira, 2015) .....	6
Figura 2 – Estrutura química de ZEA (Ropejko e Twarużek, 2021) .....	15
Figura 3 – ZEA e os seus metabolitos resultantes da redução enzimática (Rai, Das e Tripathi, 2020).....	17
Figura 4 – Vias de biotransformação da ZEA e respetivos metabolitos resultantes (Mally, Solfrizzo e Degen, 2016) .....	18
Figura 5 - Estrutura química de ZEA e os seus metabolitos: (a)Zearalenona(ZEA), (b) $\alpha$ -Zearalenol( $\alpha$ -ZEL), (c) $\beta$ -Zearalenol( $\beta$ -ZEL), (d)Zearalanona(ZAN), (e) $\alpha$ -Zearalanol( $\alpha$ -ZAL) e (f) $\beta$ -Zearalanol( $\beta$ -ZAL) (Zinedine <i>et al.</i> , 2007).....	19
Figura 6 - Comparação do número de notificações de micotoxinas em produtos alimentares entre 2017 e 2020 .....	23
Figura 7 - Comparação do número de notificações de micotoxinas em alimentação para animais entre 2018 e 2020 .....	23
Figura 8 - Composição do processo de análise do risco .....	26

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 – Ocorrência de ZEA em amostras de urina de crianças e adultos reportadas em vários estudos .....	33
Tabela 2 - Ocorrência de ZEA em amostras de urina de adultos reportada em vários estudos .....	34
Tabela 3 – Legislação da ZEA em G.A. na UE, adaptado do Regulamento (CE) n° 1881/2006 da Comissão, de 19 de Dezembro de 2006 .....	39
Tabela 4 – Legislação de ZEA em produtos destinados à alimentação animal adaptado da Recomendação (UE) 2016/319 da Comissão de 29 de Julho de 2016, que altera a Recomendação 2006/576/CE .....	40
Tabela 5 – Teores de ZEA (ng/L) na urina de acordo com algumas variáveis consideradas no questionário .....	55
Tabela 6 – Cálculo do melhor, do pior e do cenário médio para cada grupo etário, baseado no peso corporal médio de cada grupo .....	58
Tabela 7 – Valores de PDI indicados na literatura .....	59

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADI – Ingestão Diária Aceitável (do Inglês *Acceptable Daily Intake*)

AFs - Aflatoxinas

ARfD – Dose de Referência Aguda

aw – Atividade da água

BPA - Bisfenol A (do Inglês *Bisphenol A*)

BPA's – Boas práticas agrícolas

BPFs – Boas práticas de fabrico

CE – Comissão Europeia

CONTAM – Painel de peritos em contaminantes da cadeia alimentar da EFSA

DEs – Desreguladores Endócrinos

DNA – Ácido desoxirribonucleico (do Inglês *Deoxyribonucleic acid*)

DON – Deoxinivalenol

ECHA – Agência Europeia dos Produtos químicos (do Inglês *European Chemicals Agency*)

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

ELISA – Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (do Inglês *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*)

EM – Estados-Membros

ESI-qTOF-MS – Espectrometria de massa com analisador por quadrupolo de tempo de voo e ionização por eletrospray (do Inglês *liquid chromatography coupled with electrospray ionization-quadrupole-time of flight-mass spectrometry*)

EUVG – Escola Universitária Vasco da Gama

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

FUM – Fumonisinias

FS – Fator de Segurança

G.A. – Géneros Alimentícios

GC – Cromatografia Gasosa (do Inglês *Gas Chromatography*)

GPR30 – Recetor estrogénico acoplado á proteína G 30 (do Inglês *G protein coupled recetor for estrogen*)

HBM – Biomonitorização Humana (do Inglês *Human biomonitoring*)

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – Peróxido de hidrogénio

HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

HSDs - Hidroxiesteroide desidrogenases

IAC – Colunas de Imunoafinidade (do Inglês *Immunoaffinity Columns*)

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

Ig - Imunoglobulinas

LC – Cromatografia Líquida (do Inglês *Liquid Chromatography*)

LH – Hormona luteinizante (do Inglês *luteinizing hormone*)

LOAEL – Nível mínimo no qual se observa efeitos adversos (do Inglês *Lowest Observable Adverse Effect Level*)

LOD – Limite de deteção (do Inglês *Limit of Detection*)

LOQ – Limite de quantificação (do Inglês *Limit of Quantification*)

MCFs-7 – do Inglês *Michigan Cancer Foundation-7 cells*

MS – Espectrometria de Massa (do Inglês *Mass Spectrometry*)

NOAEL – Nível no qual não se observa efeitos adversos (do Inglês *No Observe Adverse Effect Level*)

ODM – Objetivos de Desenvolvimento do Milénio

ODS – Objetivos de Desenvolvimento Sustentável

OMS – Organização Mundial da Saúde

OMts – Organo-montmorilonita modificada

ONU – Organização das Nações Unidas

OTA – Ocratoxina A

P.c. – Peso corporal

PCBs - Bifenilos policlorados (do Inglês *Polychlorinated Biphenyls*)

PCCs – Pontos críticos de controlo

PDI – Ingestão Diária Provável (do Inglês *Probable Daily Intake*)

PEE – Pacto Ecológico Europeu

PMTDI – Ingestão Diária Máxima Tolerável Provisória (do Inglês *Provisional Maximum Tolerable Daily Intake*)

PTWI - Ingestão Semanal Tolerável Provisória

P450 – Citocromo P450

QP – Quociente de perigo

RASFF – Sistema de Alerta Rápido para os Géneros Alimentícios e os Alimentos para Animais (do Inglês *Rapid Alert System for Food and Feed*)

REs – Recetores estrogénicos

SBF – Fluido corporal sintético

SGF – Fluido gástrico sintético

SPE – Extração em Fase Sólida (do Inglês *Solid Phase Extraction*)

SULTs – Enzimas sulfotransferases

TDI – Ingestão Diária Tolerável (do Inglês *Tolerable Daily Intake*)

TLC – Cromatografia de Camada Delgada (do Inglês *Thin Layer Chromatography*)

TMI – Ingestão Mensal Tolerável (do Inglês *Tolerable Monthly Intake*)

TWI – Ingestão Semanal Tolerável (do Inglês *Tolerable Weekly Intake*)

UE – União Europeia

UGTs - Enzimas uridina difosfato-glucuronosiltransferases

UPLC e UHPLC – Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (do Inglês *Ultra Performance Liquid Chromatography*)

USSR – União das Repúblicas Socialistas Soviéticas (do Inglês *Union of Soviet Socialist Republics*)

VIH/SIDA – Vírus de imunodeficiência humana / Síndrome de imunodeficiência adquirida

ZAN - Zearalanona

ZEA – Zearalenona

$\alpha$ -ZAL –  $\alpha$ -Zearalanol

$\beta$ -ZAL –  $\beta$ -Zearalanol

$\alpha$ -ZEL –  $\alpha$ -Zearalenol

$\beta$ -ZEL –  $\beta$ -Zearalenol



## ÍNDICE

<b>AGRADECIMENTOS</b> .....	<b>VI</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>VII</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>VIII</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	<b>IX</b>
<b>ÍNDICE DE TABELAS</b> .....	<b>X</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS</b> .....	<b>XI</b>
<b>PARTE TEÓRICA</b> .....	<b>I</b>
<b>I REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>4</b>
1.1 INTRODUÇÃO.....	4
1.2 PERIGOS ALIMENTARES.....	7
1.3 NOTA HISTÓRICA.....	11
1.4 MICOTOXINA ZEARALENONA.....	14
1.5 ASPETOS TOXICOCINÉTICOS.....	16
1.6 ASPETOS TOXICODINÂMICOS.....	20
1.7 OCORRÊNCIA E DADOS DO RASFF.....	21
1.8 ANÁLISE DE RISCO: AVALIAÇÃO, GESTÃO E COMUNICAÇÃO DE RISCO.....	25
1.8.1 BIOMONITORIZAÇÃO HUMANA.....	30
1.9 METODOLOGIAS ANALÍTICAS.....	36
1.10 LEGISLAÇÃO.....	38
1.11 PROCESSOS DE CONTROLO.....	40
<b>PARTE EXPERIMENTAL</b> .....	<b>46</b>
<b>1 JUSTIFICAÇÃO E OBJETIVO DO ESTUDO</b> .....	<b>47</b>
<b>2 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>48</b>
2.1 AMOSTRAGEM.....	48
2.2 DADOS SOCIODEMOGRÁFICOS E HÁBITOS ALIMENTARES.....	48
2.3 DETERMINAÇÃO ANALÍTICA DE ZEA.....	49
2.4 AVALIAÇÃO DE RISCO.....	51
2.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	51
<b>3 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>53</b>
3.1 TEORES DE ZEA NAS AMOSTRAS DE URINA E DETERMINANTES DE EXPOSIÇÃO.....	53
3.2 INGESTÃO DIÁRIA PROVÁVEL E AVALIAÇÃO DE RISCO.....	57

<b>4</b>	<b>ANÁLISE CRÍTICA.....</b>	<b>60</b>
<b>5</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>61</b>
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>62</b>
	<b>ANEXOS .....</b>	<b>75</b>





## **PARTE TEÓRICA**

## I Revisão bibliográfica

### I.1 Introdução

A *Declaração Universal dos Direitos Humanos de 1948, artigo 25*, menciona o seguinte, que se transcreve infra:

*“Toda a pessoa tem direito a um nível de vida suficiente para lhe assegurar e à sua família a saúde e o bem-estar, principalmente quanto à alimentação, (...)”.*

Perante esta premissa, todo o indivíduo, independente da sua idade, tem o direito ao acesso a uma alimentação nutricionalmente satisfatória para o correto funcionamento do seu organismo (FAO, 1996). No entanto, o caminho para satisfazer este direito não é tão linear como deveria ser. Por este motivo, é que em pleno século XXI, a sociedade mundial ainda se depara com a pobreza, tanto económica como alimentar, que conseqüentemente se interligam (FAO et al., 2022). De modo a garantir que todas as pessoas possam usufruir deste direito importante, cada país deve garantir a Segurança dos Alimentos e a Segurança Alimentar/Disponibilidade Alimentar, nacionais e internacionais, consoante os seus recursos e capacidades. A Segurança Alimentar apenas é atingida quando as pessoas, a todo o momento, têm acesso físico e económico a alimentos seguros, nutritivos e suficientes para satisfazer as suas necessidades dietéticas e preferências alimentares, a fim de levarem uma vida ativa e sã. Fatores como a pobreza mundial, as guerras, o terrorismo, a corrupção política, as alterações climáticas e a degradação ambiental contribuem para a Insegurança Alimentar (FAO, 1996). Para que todas as pessoas possam ter acesso a alimentos que satisfaçam as suas necessidades alimentares básicas, cada país deve assegurar a Segurança dos Alimentos, isto é, assegurar que os alimentos no mercado estão ausentes de qualquer perigo para a Saúde Pública ou apresentam teores aceitáveis para os possíveis perigos alimentares presentes (CAC, FAO e WHO, 2020).

No que diz respeito à União Europeia (UE), o Livro Branco sobre a Segurança dos Alimentos, publicado pela Comissão Europeia (CE) em 2000, apresenta várias ações de melhoria da política de Segurança dos Alimentos que sustentam os elevados padrões de proteção da Saúde Pública, nomeadamente a criação da EFSA e respetivas funções, a atualização da legislação europeia de modo a abranger toda a cadeia alimentar e incluir a produção de alimentos para animais e assim satisfazer o princípio “Da exploração agrícola à mesa”, a atribuição de responsabilidade pela produção de alimentos seguros aos produtores, à indústria e aos fornecedores, a implementação do princípio de rastreabilidade, do princípio de precaução e de controlos oficiais a nível europeu e mundial, a comunicação com os

consumidores e partes interessadas e o cumprimento das exigências sanitárias da Comunidade Europeia para os produtos importados e exportados (CE, 2000).

A publicação do Regulamento (CE) nº 178/2002 permitiu a entrada em vigor das medidas e princípios que o Livro Branco sugeria, assegurando a livre circulação dos géneros alimentícios (G.A.) e dos alimentos para animais no mercado interno e um elevado nível de proteção da Saúde Pública. A criação da EFSA pela CE foi muito importante porque tornou-se a referência científica independente na avaliação dos riscos, responsável por formular pareceres científicos independentes, gerir sistemas de alerta rápido, comunicar e dialogar com os consumidores e outras partes interessadas e, constituir redes com as agências nacionais e os organismos científicos (CE, 2002).

À escala mundial, a Organização das Nações Unidas (ONU), em 2000, aprovou a Agenda 2015 que enumerava oito “Objetivos de Desenvolvimento do Milénio” (ODM) (consultar figura 1), que os países membros da ONU assumiram atingir até 2015 (Roma, 2019). No final do prazo, o cumprimento das metas teve um balanço geral positivo; a título de exemplo, o número de pessoas que vivia em extrema pobreza, a percentagem de pessoas subnutridas, o número de crianças sem escola, a taxa de mortalidade de crianças com menos de 5 anos e a taxa de mortalidade materna diminuí para quase metade (Vieira, 2015).

Em 2015, foi formulada a Agenda 2030 que apresenta 17 “Objetivos de Desenvolvimento Sustentável” (ODS) (consultar figura 1), que sucedem e atualizam os ODM (Roma, 2019). A Agenda 2030 reúne também os meios de implementação para alcançar os objetivos mencionados. A concretização dos ODS, em particular no que diz respeito à Segurança Alimentar, dependerá não apenas do compromisso dos governos, mas também do envolvimento dos cidadãos que, cada vez mais, priorizam uma escolha segura, consciente e informada dos alimentos que querem inserir na sua dieta. Os consumidores procuram alimentos frescos, menos processados, e mais sustentáveis com o objetivo de melhorar a sua saúde, estilo de vida e ambiente (EC, 2020).

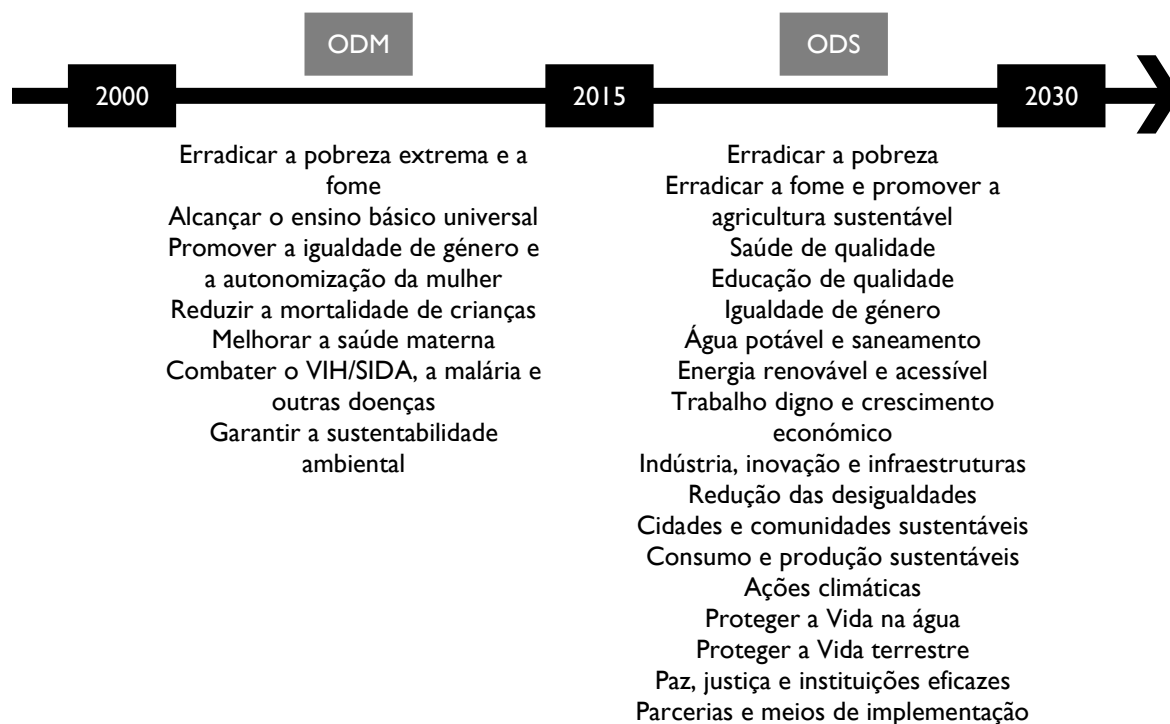


Figura 1-Enumeração dos ODM e dos ODS (Vieira, 2015)

Notas: De modo mais detalhado, a Agenda 2030 pretendem acabar com a pobreza em todas as suas formas, em todos os lugares; acabar com a fome, alcançar a segurança alimentar e melhoria da nutrição e promover a agricultura sustentável; assegurar uma vida saudável e promover o bem-estar para todos, em todas as idades; assegurar a educação inclusiva, e equitativa e de qualidade, e promover oportunidades de aprendizagem ao longo da vida para todos; alcançar a igualdade de género e o empoderamento de todas as mulheres e meninas; garantir a disponibilidade e manuseio sustentável da água e saneamento para todos; garantir o acesso a energia barata, confiável, sustentável e renovável para todos; promover o crescimento económico sustentado, inclusivo e sustentável, emprego pleno e produtivo, e trabalho digno para todos; construir infraestruturas resilientes, promover a industrialização inclusiva e sustentável, e fomentar a inovação; reduzir as desigualdades dentro dos países e entre eles; tornar as cidades e os povoadamentos humanos inclusivos, seguros, resilientes e sustentáveis; assegurar padrões de produção e de consumo sustentáveis; tomar medidas urgentes para combater as alterações climáticas e seus impactos; promover a conservação e uso sustentável dos oceanos, dos mares, e dos recursos marinhos para o desenvolvimento sustentável; proteger, recuperar e promover o uso sustentável dos ecossistemas terrestres, gerir de forma sustentável as florestas, combater a desertificação, deter e reverter a degradação da Terra e deter a perda da biodiversidade; promover sociedades pacíficas e inclusivas para o desenvolvimento sustentável, proporcionar o acesso à justiça para todos e construir instituições eficazes, responsáveis e inclusivas em todos os níveis e; fortalecer os meios de implementação e revitalizar a parceria global para o desenvolvimento sustentável.

Como amplamente reconhecido, o planeta está a enfrentar o aquecimento global, alterações climáticas, extinção de espécies animais e a poluição ambiental. Em resposta ao impacto que estes problemas têm na saúde humana, animal e ambiental, a CE criou em 2019 o Pacto Ecológico Europeu (PEE) que faz parte da Agenda 2030. O PEE pretende tornar a Europa o primeiro continente a alcançar a neutralidade climática até 2050. Na Europa, estima-se que mais de 75% das emissões de gases com efeito de estufa advenha da extração de recursos e da sua transformação em materiais, combustíveis e alimentos, e da utilização de energia em todos os setores económicos. Assim, o PEE ambiciona que estes setores não

produzam emissões de gases com efeito de estufa e, simultaneamente, criar uma economia circular e sustentável (CE, 2019).

A estratégia “Da exploração agrícola à mesa” ou “Do Prado ao Prato” é a peça central do PEE e tem como objetivo criar um sistema alimentar sustentável, ao reconhecer que a saúde humana, animal e ambiental estão intrinsecamente relacionadas (EC, 2020).

## 1.2 Perigos alimentares

O Regulamento CE nº 178/2002, define perigo alimentar como:

“um agente biológico, químico ou físico presente nos géneros alimentícios ou nos alimentos para animais, ou uma condição dos mesmos, com potencialidades para provocar um efeito nocivo para a saúde” (CE, 2002)

Os perigos alimentares podem ocorrer em todas as fases da cadeia alimentar, pelo que é necessário considerar atentamente o processo de produção, fabrico, transporte e distribuição dos alimentos destinados aos animais produtores de G.A. assim como dos G.A. destinados aos consumidores finais (CE, 2002).

Os perigos biológicos são microrganismos patogénicos que, nas condições adequadas, desenvolvem-se contaminando os G.A. provocam doenças no consumidor. Englobam as bactérias e as suas toxinas, vírus e parasitas (Pettoello-Mantovani *et al.*, 2021).

O relatório técnico relativo às zoonoses na perspetiva da *One Health* (EFSA, 2021) apresenta dados de prevalência de surtos de origem alimentar reportados em 2020. O relatório indica que, relativamente aos vírus, o norovírus foi significativamente o agente patogénico que provocou maior número de surtos, quando comparado com o vírus da hepatite A e da hepatite E. Ao nível das intoxicações alimentares, as toxinas produzidas pela bactéria *Bacillus cereus* provocaram maior número de surtos, seguidas pelas toxinas produzidas pela bactéria *Clostridium perfringens* e pela bactéria *Staphylococcus aureus*. Adicionalmente, as salmoneloses e as campilobacterioses foram as doenças mais frequentes transmitidas por alimentos contaminados por bactérias. Em relação aos parasitas, o número de surtos reportados é menor quando comparados com os outros agentes patogénicos. Os parasitas mais comuns de causarem surtos foram os géneros *Trichinella*, *Cryptosporidium*, *Anisakis* e *Giardia* (EFSA, 2021).

Os perigos físicos são objetos ou matérias estranhas ao alimento que podem ocorrer por contaminação acidental ou pela execução incorreta de práticas agrícolas, de higiene e de fabrico (European Court of Auditors, 2019). Os perigos físicos incluem fragmentos metálicos

– por exemplo estilhaços, lâminas, agulhas, utensílios de metal ou agrafos -, lascas de osso, conchas e cascas duras de frutos secos, fragmentos de material em contacto com o alimento ou produto alimentar – por exemplo plástico das embalagens -, pedras, vidros – provenientes de lâmpadas ou recipientes de vidro -, lascas de madeiras - derivadas de estruturas de madeira ou paletes de madeira-, insetos, e itens pessoais (Pettoello-Mantovani *et al.*, 2021).

A deglutinação e eventual ingestão de materiais estranhos pode provocar quebra de dentes, lesões, cortes e/ou perfurações da boca, esófago ou outro órgão do sistema digestivo (FDA, 2022), que pode originar infeções (Baptista e Venâncio, 2003). Também são reportadas situações de asfixia, com possíveis consequências fatais (Baptista e Venâncio, 2003).

Os perigos químicos são substâncias químicas que podem ocorrer naturalmente nos alimentos ou adicionados de forma deliberada aos alimentos, em qualquer fase da cadeia alimentar. O quadro jurídico da UE até ao momento regula cerca de 8 000 substâncias químicas. Os perigos que podem surgir nos alimentos de forma não intencional podem ser poluentes industriais ou ambientais, contaminantes resultantes do processamento alimentar, e as toxinas produzidas por organismos vivos como fungos, algas e algumas plantas. Os perigos adicionados por mão humana durante a produção e fabrico dos alimentos incluem os aditivos não autorizados para alimentação humana e animal, resíduos de pesticidas e de medicamentos veterinários, e também as substâncias que migram dos materiais em contacto com os alimentos (European Court of Auditors, 2019).

A presente dissertação irá focar-se nos contaminantes que ocorrem naturalmente nos alimentos, nomeadamente as toxinas produzidas por fungos.

O *Codex Alimentarius* define contaminante como:

*“Qualquer substância presente na alimentação humana ou animal, de forma não intencional, como resultado dos processos de produção (incluindo os processos de agricultura, pecuária e/ou medicina veterinária), transformação e distribuição, ou como resultado de contaminação ambiental. O termo de contaminante não inclui fragmentos de insetos, pelos de roedores ou outras matérias de natureza estranha”* (EC, 1993).

Ou seja, os contaminantes são substâncias químicas que podem ocorrer nos alimentos, de forma não intencional, como resultado do desempenho incorreto das práticas agrícolas ou da contaminação durante o processo de produção dos G.A. ou ainda por contaminação ambiental, através da água, solo e/ou ar (EC, 1993).

Associado ao perigo está o risco que o *Codex Alimentarius* define como a probabilidade de ocorrer o dano, causado pelo perigo. A interpretação do risco pode ser feita de duas maneiras, de forma objetiva e técnica, realizada principalmente pelos investigadores e técnicos,

ou de forma subjetiva e emotiva, desempenhada pelos consumidores (Santeramo e Lamonaca, 2021).

De uma forma objetiva, a avaliação do risco baseia-se nas características quantitativas do perigo, combinando a probabilidade de exposição e a gravidade do efeito adverso (Siegrist e Árvai, 2020). Por exemplo, o botulismo é uma intoxicação provocada pela ingestão da toxina da bactéria *Clostridium botulinum* cujo perigo é considerado elevado, contudo a probabilidade de ocorrência da toxina é baixa (Santeramo e Lamonaca, 2021).

Por outro lado, a percepção do risco pelo consumidor é considerada subjetiva e emotiva dado que não depende apenas das características diretamente relacionadas com o perigo, como a natureza do perigo, a probabilidade de exposição, a magnitude dos efeitos (Liao, Luo e Zhu, 2020). Também depende da confiança que o consumidor tem nas entidades responsáveis pela segurança alimentar e nas empresas da cadeia alimentar, assim como a familiaridade e o conhecimento subjetivo sobre o perigo, e o nível de controlo percebido sobre o risco, que relacionam-se negativamente com a percepção do risco (Machado Nardi *et al.*, 2020). Os consumidores percebem maior risco na segurança alimentar quanto menor for a confiança (Machado Nardi *et al.*, 2020) ou o conhecimento (Machado Nardi *et al.*, 2020 e Jenkins, Harris e Osman, 2021) ou o nível de controlo (Jenkins, Harris e Osman, 2021) que têm sobre o risco.

No estudo realizado por Santaremo e Lamonaca (2021), foi observado que 39,8% dos fatores de risco de origem alimentar, como é o caso dos contaminantes químicos, do mercúrio, da bactéria *Escherichia coli* e das substâncias adulterantes de alimentos, não representam uma ameaça, na visão subjetiva dos consumidores. Uma explicação possível é o facto de os fatores não representantes de ameaça para os consumidores serem caracterizados como controláveis pelos mesmos sendo, por isso, percebido menor risco associado a esses fatores (Santeramo e Lamonaca, 2021). Paralelamente, o desconhecimento sobre os fatores também resulta num menor risco percebido pelos consumidores (Machado Nardi *et al.*, 2020).

Verificou-se ainda que o nível de escolaridade e o rendimento influenciam de forma negativa a percepção do risco, ao contrário da idade, da presença de crianças e do número de pessoas no agregado familiar (Machado Nardi *et al.*, 2020). Todavia, as características sociodemográficas não são tão importantes como as características psicológicas mencionadas em primeiro lugar (Siegrist e Árvai, 2020).

Intuitivamente, os consumidores baseiam-se nos processos heurísticos para avaliar o risco. Por exemplo, o indivíduo tende a avaliar o risco consoante os dados de prevalência e frequência que conhece relativos ao risco ou que amigos, familiares ou conhecidos tenham



partilhado – enviesamento de disponibilidade. O enviesamento do otimismo revela que as pessoas tendem a acreditar que estão sujeitas a menor risco do que as outras pessoas (Paek e Hove, 2017 e Siegrist e Árvai, 2020). Outro exemplo diz respeito ao enviesamento do afeto, no qual as emoções substituem a escassez de conhecimento e tornam-se a base da perceção do risco resultando na subestimação ou sobrestimação do risco (Paek e Hove, 2017).

Apesar da segurança alimentar basear-se em resultados e evidência científica, também é influenciada por interesses políticos, sociais e económicos (Chen, 2008). A consciência desta influência pelos consumidores torna a relação consumidor-organização frágil e vulnerável quando o consumidor encara uma crise alimentar (Liao, Luo e Zhu, 2020). Desta forma, as entidades organizacionais devem informar os consumidores sobre os perigos e riscos de forma transparente e adequada para fortalecer a relação consumidor-organização e permitir que os consumidores percecionem o perigo e o risco de forma objetiva (Liao, Luo e Zhu, 2020).

De acordo com a CE e a Agência Europeia dos Produtos Químicos (ECHA-*do Inglês European Chemicals Agency*), os desreguladores endócrinos (DEs) são substâncias naturais ou sintéticas que interferem com o sistema endócrino do ser humano e do animal. O sistema endócrino é responsável pelo crescimento e desenvolvimento, comportamento, imunidade, reprodução e metabolismo dos organismos. Os DEs são capazes de imitar as hormonas endógenas tal como o estrógeno, androgéneo e as hormonas da tiróide, podem atuar como antagonistas impedindo a ligação das hormonas endógenas aos recetores e, podem alterar a quantidade de recetores nas várias glândulas ou a concentração de hormonas na circulação sanguínea (Gore *et al.*, 2015 e Kabir, Rahman e Rahman, 2015). Os DEs que atuam como agonistas ou antagonistas normalmente atuam nos recetores das membranas celulares ou nos recetores nucleares, que respondem à ligação de hormonas peptídicas (insulina) e de hormonas lipofílicas pequenas (hormonas sexuais esteróides), respetivamente (Casals-Casas e Desvergne, 2011 e Guarnotta *et al.*, 2022).

Os compostos exógenos com atividade endócrina dividem-se em compostos naturais como as hormonas, fitoestrogéneos e as micotoxinas, e em compostos sintéticos de origem industrial (dioxinas, bifenilos policlorados (PCBs - *do Inglês Polychlorinated Biphenyls*) e alquifenóis), de origem agrícola (pesticidas e dioxinas), ftalatos, bisfenol A (BPA - *do Inglês Bisphenol A*), produtos farmacêuticos e metais pesados (Guarnotta *et al.*, 2022 e Connolly, Ropstad e Verhaegen, 2011).

Várias organizações científicas apresentaram relatórios indicando que os DEs provocam efeitos adversos graves no sistema endócrino de indivíduos em períodos mais sensíveis do

seu desenvolvimento – período perinatal e puberdade (Connolly, Ropstad e Verhaegen, 2011) (Kahn *et al.*, 2020).

Os seres humanos podem ser expostos aos DEs através da ingestão de alimentos/água, do contacto com a pele, inalação, via intravenosa ou, no caso dos fetos e dos lactentes, através da transferência placentária ou da amamentação (Guarnotta *et al.*, 2022).

A ZEA (Zearalenona) é um exemplo de DE presente nos alimentos.

A ZEA e os seus metabolitos são xenoestrogéneos que induzem desregulação endócrina no animal e no ser humano devido à semelhança química entre as suas estruturas químicas e as estruturas químicas dos estrogénios endógenos. A semelhança química permite a ligação de ZEA e dos seus metabolitos aos recetores estrogénicos (REs)  $\alpha$  e  $\beta$  resultando em efeitos negativos no organismo (Rogowska *et al.*, 2019 e Bulgaru *et al.*, 2021), conforme descrito adiante no capítulo 1.6. A ZEA é um antagonista parcial dos REs- $\beta$  e um agonista dos REs- $\alpha$  (Bulgaru *et al.*, 2021). Nakamura e Kadowaka, (2015) reportaram a capacidade da ZEA desregular a produção da hormona luteinizante (LH – do Inglês *luteinizing hormone*) na glândula pituitária presente nas células bovinas através da modulação do recetor estrogénico acoplado à proteína G (GPR30 – do Inglês *G protein coupled recetor for estrogen*), induzindo efeitos adversos. Outro efeito da desregulação endócrina provocado pela ZEA e pelos seus metabolitos é a alteração da função das glândulas sexuais, modulando a atividade dos órgãos reprodutores (Rai, Das e Tripathi, 2020).

Dado que os DEs representam uma preocupação para a Saúde Pública, é necessário a monitorização constante e a reavaliação do risco da ZEA e dos seus metabolitos (Lorenz *et al.*, 2019).

### **1.3 Nota histórica**

No passado, a forte crença na divindade e nas entidades sobrenaturais, e a inexistência de evidência científica, sobrepuseram-se à investigação da verdadeira causa de muitas doenças. Por esta razão, leva-se a crer que já existiram doenças provocadas por fungos ou pelas toxinas produzidas por fungos, mas que não estariam associadas ao verdadeiro agente causador (Benkerroum, 2019).

Outrora a frequência epidémica de algumas doenças, que hoje se conhecem por micotoxicoses, resultou do desconhecimento da ocorrência das micotoxinas e das suas propriedades, e das insuficientes ou inexistentes boas práticas agrícolas, de produção e fabrico (Peraica e Rašić, 2012).

O livro de Êxodo descreve as dez pragas do Egito. Considera-se atualmente que, a primeira Praga, resultou da erupção do vulcão Santorini e o vento arrastou sulfatos, em elevada concentração, para a água do Rio Nilo, tornando-a vermelha e inutilizável para a rega dos solos. Em resultado, as reservas de cereais que existiam eram dadas, de forma preferencial, aos filhos primogénitos. A décima Praga é caracterizada pela morte dos filhos primogénitos e existe a teoria de que foi provocada pela presença de micotoxinas nos cereais (Peraica e Rašić, 2012).

A primeira micotoxina mencionada na literatura remonta para 600 anos antes de Cristo identificada pelo nome de Ergot (Cervellin, Longobardi e Lippi, 2021). Mais tarde, o período da Idade Média contabilizou vários surtos de ergotismo porque o centeio tornou-se o alimento base da dieta (Grzybowski, Pawlikowska-Łagód e Polak, 2021 e Pitt e David Miller, 2017). A partir do ano 945, foram registados na Europa 83 surtos de ergotismo, número que pode estar incompleto (Cervellin, Longobardi e Lippi, 2021). O surto designado por Fogo de S<sup>to</sup>. António é referenciado inúmeras vezes na literatura como exemplo de ergotismo. Nesta época, os doentes acreditavam que ao fazer a peregrinação à capela de devoção do S<sup>to</sup>. António, os sintomas da doença aliviavam (Santos, Dos *et al.*, 2014).

Em 1596, o físico alemão Wendelin Thelius identificou a micotoxina Ergot como agente causador do ergotismo, após a ocorrência de uma epidemia no Ducado de Hesse. Mais tarde, em 1676, foi verificado que o ergotismo era provocado pelo consumo de centeio infetado pelo fungo *Claviceps purpurea* (Cervellin, Longobardi e Lippi, 2021 e Grzybowski, Pawlikowska-Łagód e Polak, 2021).

O último surto de ergotismo registado na Europa ocorreu em 1954, no qual 200 pessoas adoeceram, entre as quais quatro faleceram (Pitt e David Miller, 2017).

Por volta do ano 1890, nas regiões do Japão (Logrieco *et al.*, 2018), China e Coreia (Pitt e David Miller, 2017) foram reportadas as primeiras toxicoses no ser humano após o consumo de cereais, principalmente de trigo, que atualmente são conhecidas como Fusarioses da espiga do trigo. O Deoxinivalenol (DON) apenas foi identificado como o contaminante responsável por estas intoxicações em 1970 (Logrieco *et al.*, 2018).

O primeiro caso de micotoxicose provocada por Tricotecenos ocorreu na ex-União Soviética, em 1930, quando o consumo de alimentos contaminados pela toxina T-2 ficou associado ao desenvolvimento da doença de aleucia alimentar e a inúmeras fatalidades (Santos, Dos *et al.*, 2014 e Logrieco *et al.*, 2018).

Em 1960, a ocorrência de mais de 100 000 mortes de perus, patos e faisões no Reino Unido despoletou o interesse dos investigadores no agente letal. O consumo de alimento para

animais produzido com amendoim, importado do Brasil e África, contaminado com Aflatoxinas (AFs), toxina produzida pelo fungo *Aspergillus flavus* seria a causa das mortes, caso que ficou conhecido como “Turkey X disease” (Santos, Dos *et al.*, 2014; Stefano, Di *et al.*, 2014; Pitt e David Miller, 2017). No mesmo ano, um investigador sul-africano especulou que as AFs poderiam ser responsáveis pelos casos de cancro do fígado em cidadãos africanos, dado que o consumo de amendoins tinha sido elevado nas regiões com maior prevalência de casos de cancro hepático (Benkerroum, 2019).

Assim, apesar dos relatos de problemas na saúde animal e humana provocados por substâncias produzidas por fungos durante a Idade Média, apenas a partir de 1960, os esforços de definição e caracterização de outras micotoxinas e o reconhecimento de uma possível ameaça para a saúde animal e humana intensificou, de forma marcada (Santos, Dos *et al.*, 2014).

Em 1962, foi isolado um composto com propriedades estrogénicas a partir de milho infetado por *Fusarium graminearum*, identificado inicialmente por toxina F-2 (Liu e Applegate, 2020). Em 1966, após a caracterização da sua estrutura química, esta toxina foi renomeada como ZEA. A primeira intoxicação provocada pela contaminação de alimento para animais com ZEA ocorreu em 1928 em suínos (Morgavi e Riley, 2007). No norte da Itália, em 1979, verificou-se uma epidemia em raparigas que resultou no crescimento precoce dos órgãos sexuais secundários. Os efeitos de desregulação endócrina foram provocados pela presença de  $\alpha$ -Zearalanol ( $\alpha$ -ZAL) (metabolito de ZEA), um esteróide anabolizante/promotor de crescimento, nas carnes de aves, suínos, vitela e cordeiro, animais que foram tratados com essas substâncias (Massart e Saggese, 2010). Em resultado, em 1985, a UE banuiu o uso de promotores de crescimento na agricultura, de acordo com a Diretiva 2008/97/CE.

A primeira associação realizada entre Ocratoxina A (OTA) e episódios de nefrotoxicidade no ser humano remonta para 1956 na Bulgária onde se verificou casos de nefropatia endémica dos Balcãs (Pavlović, 2013). Porém, apenas em 1965, a OTA foi identificada como metabolito 2º de *Aspergillus ochraceus* em laboratório, na África do Sul (Nan, Xue e Bi, 2022). Bem mais tarde, em 1980, na Dinamarca, sinais de nefropatia foram descritos em suínos (Duarte, Pena e Lino, 2011).

As Fumonisinhas (FUM) foram identificadas em 1988 (Logrieco *et al.*, 2018) como metabolito secundário da espécie fúngica *F. vertillioides* (Alshannaq e Yu, 2017). O consumo de milho infetado por *F. vertillioides* foi associado ao surto de encefalomalácia equina (Yli-Mattila e Sundheim, 2022) ocorrido entre 1890 e 1901, nos Estados Unidos da América (Pitt e David Miller, 2017) e, em 1970, na África do Sul (Alshannaq e Yu, 2017). A partir de 1960, surgiram

os primeiros registos de cancro esofágico no ser humano provocado por FUM, ocorridos na África do Sul (Pitt e David Miller, 2017).

Com os avanços nesta matéria, atualmente são conhecidas mais de 300 micotoxinas, tendo sido demonstrado que as AFs, ZEA, Tricotecenos, FUM e Ocratoxinas são os grupos de micotoxinas mais frequentes e que representam o maior impacto para a saúde animal e humana (Stefano, Di *et al.*, 2014; Santos, Dos *et al.*, 2014).

Assim, apesar da evolução das estratégias preventivas e de controlo para a contaminação por micotoxinas, ainda se verifica a exposição a estes compostos (EC, 2020) porque as micotoxinas são contaminantes alimentares naturais cuja ocorrência é imprevisível e inevitável (Sarkanj, Sarkanj e Shamtsyan, 2020), mesmo quando as boas práticas agrícolas e de produção são cumpridas (Alshannaq e Yu, 2017), e porque os modelos preventivos e de controlo não conseguem eliminar por completo risco de contaminação (Daou *et al.*, 2021).

#### **1.4 Micotoxina Zearalenona**

O nome micotoxina tem origem na fusão da palavra fungo em grego “*mykes*” com a palavra veneno em latim “*toxicum*” (Turner, Subrahmanyam e Piletsky, 2009). As micotoxinas são metabolitos secundários, de baixo peso molecular, produzidas por fungos filamentosos que contaminam as culturas agrícolas a nível mundial (Al-Jaal *et al.*, 2019; Turner, Subrahmanyam e Piletsky, 2009). Independente da sua fonte de exposição, apresentam efeitos tóxicos para os animais e humanos, tornando-as um risco para a Saúde Pública (Abrunhosa *et al.*, 2016).

A presença do fungo no G.A. não significa que a toxina esteja também presente, assim como a ausência do fungo não significa a ausência da toxina (Turner, Subrahmanyam e Piletsky, 2009).

ZEA é uma lactona do ácido 6-[10-hidroxi-6-oxo-trans-1-undecenil]-b-resorcíclico cuja fórmula química é  $C_{18}H_{22}O_5$  como apresentada na figura 2 (Ropejko e Twarużek, 2021):

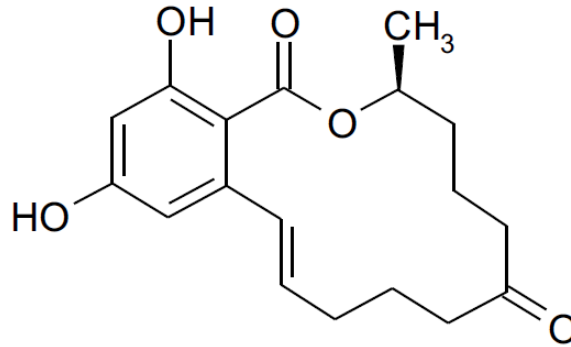


Figura 2-Estrutura química de ZEA (Ropejko e Twarużek, 2021)

Do ponto de vista estrutural, a ZEA é uma micotoxina estrogénica não-esteróide cuja estrutura molecular se assemelha à estrutura dos estrogénios endógenos como o 7- $\beta$ -estradiol, 17- $\beta$ -estradiol, estrona e estriol (Ropejko e Twarużek, 2021).

A micotoxina ZEA é produzida pela espécie fúngica *Fusarium spp* nomeadamente *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. cerealis*, *F. equiseti*, *F. crookwellense*, *F. semitectum*, *F. verticillioides*, *F. sporotrichioides*, *F. oxysporum* e *F. acuminatum* (Ropejko e Twarużek, 2021). O género *Fusarium* infeta principalmente a cultura do milho (Al-Jaal et al., 2019).

A produção desta micotoxina é favorecida em climas temperados e quentes (Ropejko e Twarużek, 2021).

Sob condições favoráveis, a contaminação fúngica e eventual produção de micotoxinas nos cereais e grãos pode ocorrer durante a fase de cultivo, colheita, armazenamento ou processamento de alimentos (Buszewska-Forajta, 2020). No caso da ZEA, a sua acumulação acentua-se na fase de pré-colheita, no entanto, também se verifica após a colheita, na presença de más condições de armazenamento (Rogowska et al., 2019). Habschied et al. (2011) demonstrou que, de modo geral, a 20 °C os teores de ZEA são consideravelmente maiores tanto no farelo como no gérmen e farinha de cevada. Adicionalmente, a produção de ZEA diminui com o aumento da atividade de água na farinha de cevada (Habschied et al., 2011). Em relação ao pH, verifica-se que o pH alcalino favorece a acumulação de ZEA sob baixa temperatura de incubação (15 °C) e o máximo de produção de ZEA foi verificado a pH igual a 7 e aw igual 0,995 e 0,950, independente da temperatura (Mahato et al., 2021). Martins e Martins, (2002) observou que a produção de ZEA no milho é favorecida quando incubada a 28 °C e depois a 12 °C, sendo que o seu teor atingiu o seu pico no 35° dia.

A ZEA é um composto fracamente polar que se apresenta como cristais brancos com massa molar de 318,364 g/mol (Ropejko e Twarużek, 2021).

A absorção máxima de radiação ultravioleta, em metanol, ocorre a 235-236 nm ( $\epsilon=29\ 200-29\ 700\ \text{dm}^3/\text{mol}\cdot\text{cm}$ ), 274 nm ( $\epsilon=13\ 040-13\ 909\ \text{dm}^3/\text{mol}\cdot\text{cm}$ ) e 316 nm ( $\epsilon=5870-6020\ \text{dm}^3/\text{mol}\cdot\text{cm}$ ) (Rogowska *et al.*, 2019; EFSA, 2016)). Em relação à fluorescência em metanol, esta ocorre com excitação a 315 nm e emissão a 460 nm (EFSA, 2016).

Esta micotoxina apresenta ponto de ebulição entre os 164-165 °C e apesar de ser insolúvel em água, dissolve-se bem em soluções alcalinas como o benzeno, acetonitrilo, acetona ou álcoois (Ropejko e Twarużek, 2021).

A ZEA é termoestável e dificilmente se degrada durante a moagem, extrusão, armazenamento, aquecimento e processos de pasteurização. No entanto ocorre alguma degradação na exposição a radiação ultravioleta e em ambiente alcalino (Rogowska *et al.*, 2019).

O conhecimento das características químicas e físicas dos fungos produtores e das micotoxinas permite aos produtores e operadores evitar as condições que contribuem para a sua formação, o que pode ser difícil algumas vezes (Turner, Subrahmanyam e Piletsky, 2009).

## **1.5 Aspectos toxicocinéticos**

Os fungos do género *Fusarium*, perante condições ambientais favoráveis ao seu crescimento, desenvolvem-se em culturas agrícolas produzindo micotoxinas como é o caso da ZEA.

A forma predominante de entrada de ZEA no organismo humano e animal é a administração oral, quer seja de forma direta através do consumo de cereais ou produtos derivados de cereais contaminados, quer seja de forma indireta através da ingestão de produtos de origem animal como a carne, ovos e leite (provenientes de animais que consumiram alimentação contaminada) (Abdolmaleki *et al.*, 2021).

De acordo com estudos *in vivo*, a ZEA é rapidamente e extensamente absorvida após administração oral (EFSA, 2016).

A ZEA é distribuída principalmente pelo fígado, tendo sido demonstrado que também percorre outros órgãos do corpo humano como os rins, intestino, órgãos do sistema reprodutivo – útero, ovários e testículos – e ainda os tecidos adiposos (Rai, Das e Tripathi, 2020).

O mecanismo de ação da ZEA nos organismos vivos envolve a competição com os estrogénios endógenos pelo local de ligação nos REs (Rai, Das e Tripathi, 2020).

A biotransformação/metabolismo da ZEA nos humanos ocorre principalmente nas células intestinais e no fígado (EFSA, 2011; Ropejko e Twaruzek, 2021). O processo de metabolização da ZEA pode ser dividido em duas fases. Na fase I, a ZEA pode ser reduzida enzimaticamente, hidroxilada pelo citocromo recombinante humano P450 e por microsossomas hepáticos humanos (consultar figura 3) ou sofrer conjugação com ácido glucurónico ou sulfato (EFSA, 2011; Rai, Das e Tripathi, 2020) (consultar figura 4).

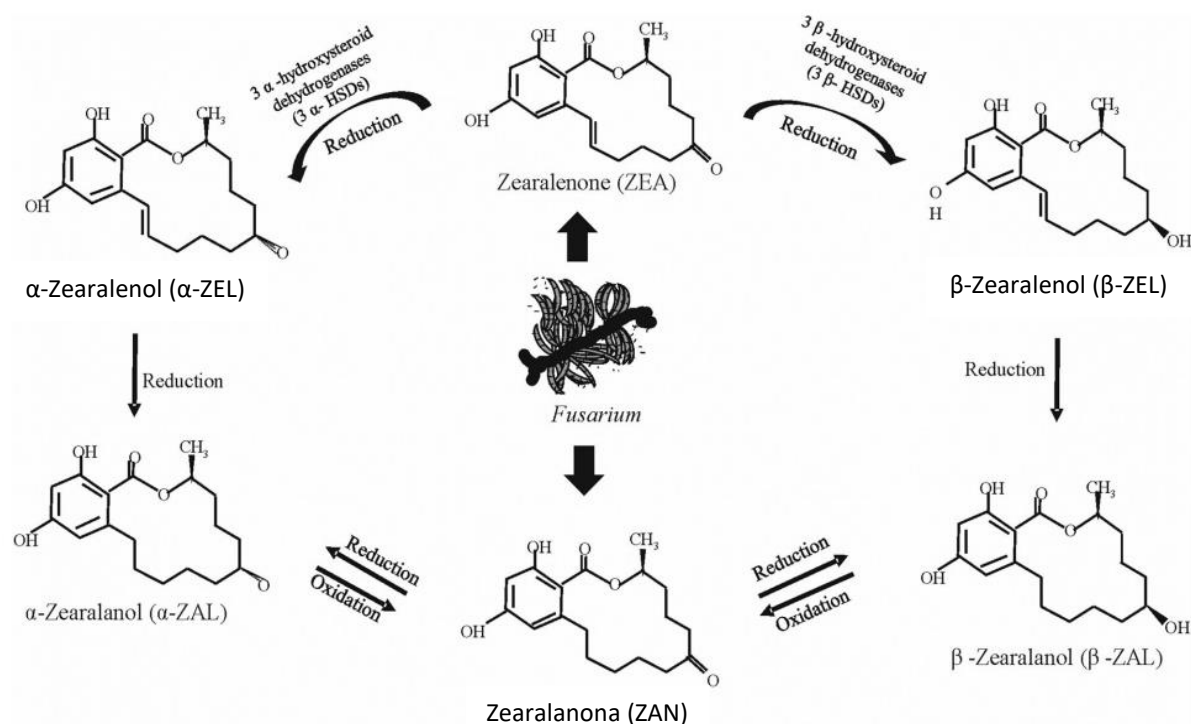


Figura 3-ZEA e os seus metabolitos resultantes da redução enzimática (adaptado de Rai, Das e Tripathi, 2020)



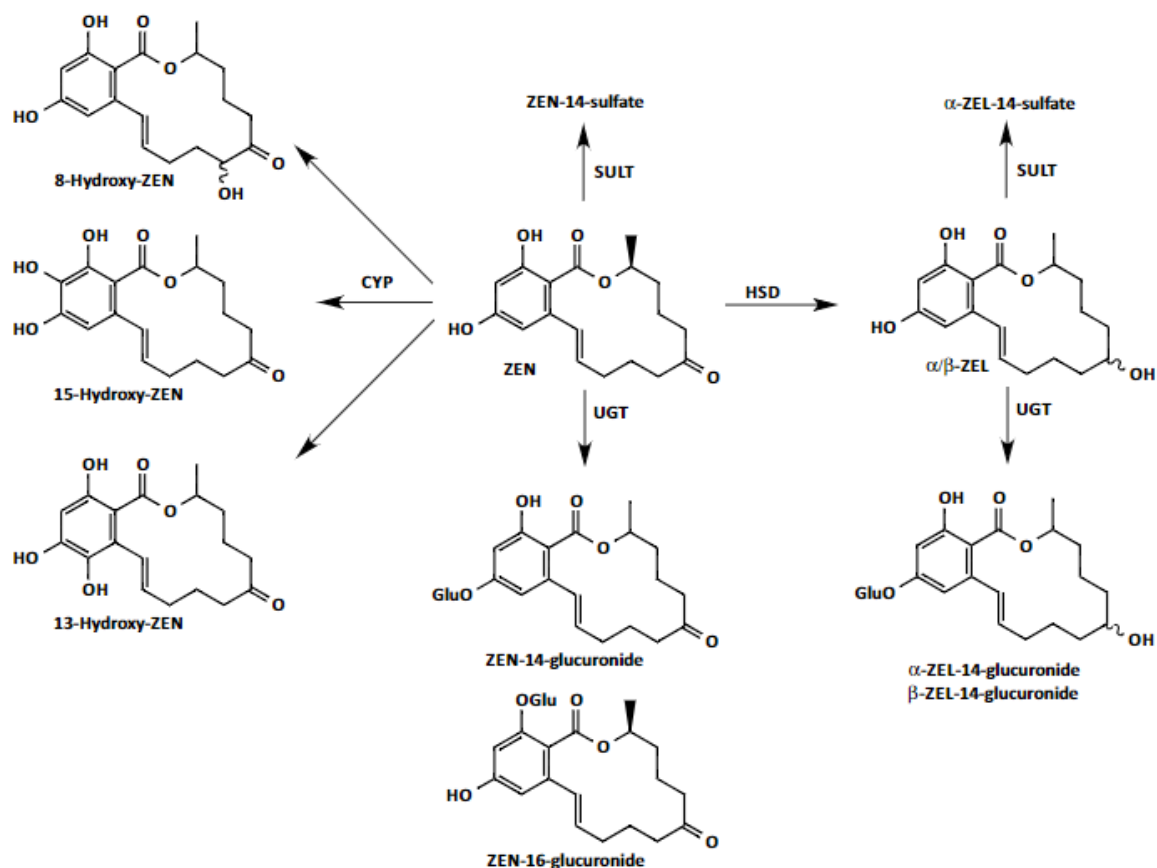


Figura 4-Vias de biotransformação da ZEA e respectivos metabolitos resultantes (adaptado de Mally, Solfrizzo e Degen, 2016)

A reação de redução da ZEA catalisada pelas enzimas 3 $\alpha$  e 3 $\beta$ -hidroxiesteroide desidrogenases (HSDs) produz  $\alpha$ -Zearalenol ( $\alpha$ -ZEL) e  $\beta$ -Zearalenol ( $\beta$ -ZEL), respetivamente, e quantidades menores de  $\alpha$ -Zearalanol ( $\alpha$ -ZAL),  $\beta$ -Zearalanol ( $\beta$ -ZAL) (EFSA, 2011) e ZAN (Rai, Das e Tripathi, 2020) (consultar figura 4). Os metabolitos reduzidos de ZEA apresentam também atividade estrogénica, sendo que  $\alpha$ -ZEL apresentam maior atividade que a própria ZEA e  $\beta$ -ZEL tem menor afinidade de ligação com os REs que a ZEA (EFSA, 2011). Ainda, em comparação com o próprio 17 $\beta$ -estradiol,  $\alpha$ -ZEL e ZEA apresentam, aproximadamente, 10 vezes e 600 vezes menos atividade estrogénica, respetivamente (Lorenz *et al.*, 2019). A produção de metabolitos reduzidos varia consoante a espécie animal e entre os indivíduos. A título de exemplo, nos suínos a biotransformação da ZEA produz preferencialmente  $\alpha$ -ZEL, enquanto nas vacas é produzido  $\beta$ -ZEL em maior quantidade. Em relação ao ser humano, verificou-se que são produzidas quantidades significativas de ambos os metabolitos reduzidos, sendo que  $\alpha$ -ZEL supera  $\beta$ -ZEL (EFSA, 2011).

Outra via de biotransformação da ZEA é a hidroxilação realizada pelo citocromo P450 e pelos microssomas hepáticos humanos que demonstrou ser uma fase secundária (EFSA,

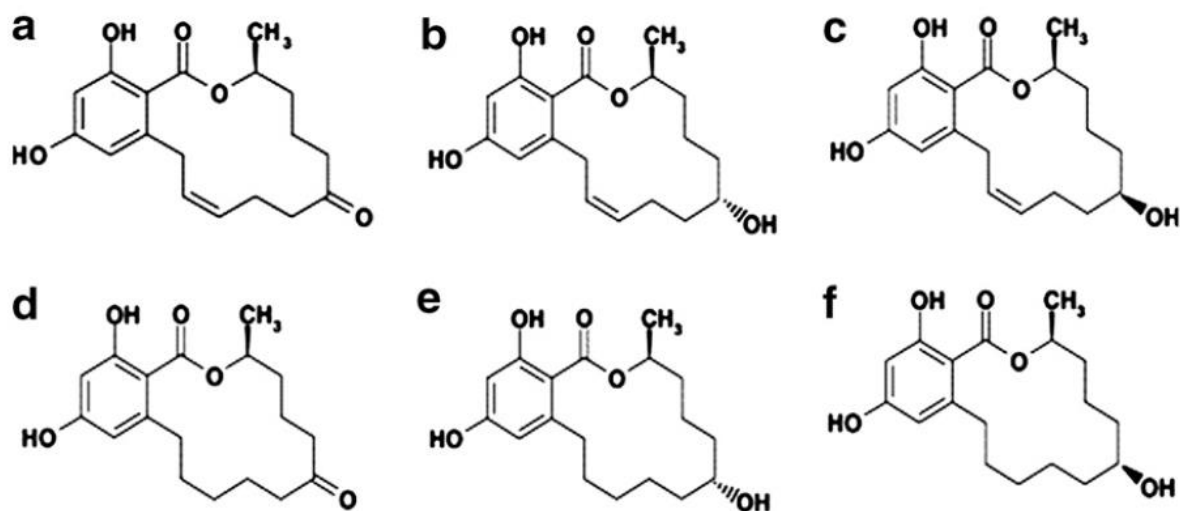


Figura 5-Estrutura química de ZEA e os seus metabolitos: (a)Zearalenona(ZEA), (b) $\alpha$ -Zearalenol( $\alpha$ -ZEL), (c) $\beta$ -Zearalenol( $\beta$ -ZEL), (d)Zearalanona(ZAN), (e) $\alpha$ -Zearalanol( $\alpha$ -ZAL) e (f) $\beta$ -Zearalanol( $\beta$ -ZAL) (adaptado de Zinedine *et al.*, 2007)

2016; Lorenz *et al.*, 2019) (consultar figura 4). A hidroxilação pode ocorrer em várias posições da molécula de ZEA, podendo ser caracterizada como hidroxilação alifática (se ocorrer nas posições carbono 6 e 8) ou aromática (se ocorrer nas posições 13 e 15) (EFSA, 2011). Os catecóis são os metabolitos mais importantes e são originados pela hidroxilação aromática da ZEA (EFSA, 2011; Rai, Das e Tripathi, 2020). Os catecóis podem ser ainda oxidados e formar quinonas que conseguem interferir no ciclo redox, modificar a estrutura das macromoléculas, induzir a formação das espécies de oxigénio reativas e provocar danos no ácido desoxirribonucleico DNA (do Inglês *Deoxyribonucleic acid*) em experimentação animal (EFSA, 2011, 2016; Rai, Das e Tripathi, 2020).

Adicionalmente, a própria ZEA e os metabolitos da fase I podem ser transformados através da reação de fase II que consiste na conjugação com ácido glucurónico ou sulfato, catalisada pelas enzimas uridina difosfato-glucuronosiltransferases (UGTs) e sulfotransferases (SULTs), respetivamente (EFSA, 2011) (consultar figura 4). Pfeiffer *et al.*, 2010 realizaram a incubação *in vitro* da ZEA e dos seus metabolitos -  $\alpha$ -ZEL,  $\beta$ -ZEL,  $\alpha$ -ZAL,  $\beta$ -ZAL e ZAN – (consultar figura 5) em microsomas hepáticos de bovino, suíno, rato e de humano e, também, em microsomas intestinais de humano, onde foram conjugados com ácido glucurónico. Os autores do estudo observaram que todos os microsomas conjugaram a ZEA e os seus metabolitos no carbono 14 e no carbono 16, formando 14- e 16-O-glucuronídeo, respetivamente. E, que todos os microsomas formaram 7-O-glucuronídeo, conjugando todos os compostos à exceção de ZEA e ZAN (Pfeiffer *et al.*, 2010). No homem, o glucuronídeo mais provável de se formar a partir da ZEA e dos seus metabolitos é o 14-O-glucuronídeo (Pfeiffer *et al.*, 2010).

Foi verificado que a reação de conjugação ocorre em outros órgãos extra-hepáticos do ser humano e animais, para além do fígado e intestino (EFSA, 2011). Desta forma, os derivados da reação de conjugação da fase II podem ser encontrados em alimentos com origem animal (Lorenz *et al.*, 2019).

Em relação ao processo de excreção, a maioria das espécies animais excreta ZEA pelas fezes e urina (Rai, Das e Tripathi, 2020), contudo também foi observada presença de ZEA no leite de bovinos (EFSA, 2016). A eliminação de ZEA pelos mamíferos pela via entero-hepática pode resultar na reabsorção dos seus glucuronídeos excretados pela bÍlis promovendo a retenção prolongada de ZEA e dos seus metabolitos na circulação sanguínea que, consequentemente, amplia a duração dos efeitos tóxicos resultantes (Gromadzka *et al.*, 2008; Rai, Das e Tripathi, 2020).

No ser humano, apenas se verificou a excreção de ZEA e dos metabolitos pela urina; a título de exemplo, após a ingestão de uma única dose de 100 mg de ZEA por um voluntário masculino foi recuperado cerca de 10% da concentração de ZEA na urina de 24 h (Warth *et al.*, 2013).

Assim, a ZEA e os seus metabolitos podem ser excretados, pela urina, na forma conjugada ou na forma não conjugada, sendo que a taxa de excreção e o composto químico excretado varia consoante a espécie e a idade (Mally, Solfrizzo e Degen, 2016).

## **1.6 Aspectos toxicodinâmicos**

De acordo com a Agência Internacional de Investigação do Cancro (IARC – do Inglês *International Agency for Research on cancer*), a ZEA está incluída no grupo 3, ou seja, esta micotoxina não é classificável como carcinogénica para os humanos.

A gravidade da toxicidade das micotoxinas depende do tipo de micotoxina, da dose e da duração de exposição, dos aspetos farmacocinéticos e dos eventuais efeitos sinérgicos na presença de outras micotoxinas (Abrunhosa *et al.*, 2016; Al-Jaal *et al.*, 2019). Para além das características inerentes às micotoxinas, a gravidade dos efeitos também depende da idade, do género, do estado de saúde e do sistema imune do animal ou ser humano (Al-Jaal *et al.*, 2019). A toxicidade das micotoxinas também depende da sensibilidade dos organismos às mesmas, e segundo a EFSA, os suínos e os cães são as espécies animais mais sensíveis à ZEA, seguidos pelos ovinos, gado bovino e aves (EFSA, 2017).

A ZEA apresenta baixa toxicidade aguda, no entanto uma exposição longa pode causar risco para a saúde (Rai, Das e Tripathi, 2020).

A capacidade tóxica desta micotoxina deve-se à competição com os estrogénios endógenos pelo local de ligação nos REs dada as suas semelhanças estruturais (Rai, Das e Tripathi, 2020). Assim, a ZEA é DE (Rogowska *et al.*, 2019) e apresenta toxicidade no sistema reprodutor e no sistema imunológico e também apresenta hepatotoxicidade, hematotoxicidade e genotoxicidade (Buszewska-Forajta, 2020).

Em relação ao **sistema reprodutor**, a ação da ZEA reduz os níveis de progesterona, estradiol e testosterona por causa da redução da atividade estrogénica endógena; reduz a fertilidade, provoca perturbações nos órgãos genitais femininos e masculinos e no ciclo éstrico, e reduz a concentração de esperma e a sua viabilidade (Abrunhosa *et al.*, 2016; Buszewska-Forajta, 2020; Ropejko e Twarużek, 2021; Mahato *et al.*, 2021; EFSA, 2016; Rai, Das e Tripathi, 2020). Também existem evidências de que a ação de ZEA provoca a fragmentação do DNA e aberrações cromossómicas, e a formação de micronúcleos e de aductos no DNA em experimentação animal (EFSA, 2011; Ropejko e Twarużek, 2021; Mahato *et al.*, 2021; Rai, Das e Tripathi, 2020).

O **dano no fígado** causado pela ZEA resulta no aumento dos níveis de fosfatase alcalina, aspartato aminotransferase e alanina aminotransferase e na redução da proteína total e albumina em várias espécies animais (Ropejko e Twarużek, 2021; EFSA, 2016; Rai, Das e Tripathi, 2020).

Quanto à **imunotoxicidade**, verifica-se uma diminuição na contagem de leucócitos, citocinas pró-inflamatórias, imunoglobulinas M (IgM) e G (IgG), dos linfócitos B, T e *natural killer* (NK) (Mahato *et al.*, 2021; Rai, Das e Tripathi, 2020).

Por fim, e no que diz respeito à **carcinogenicidade** desta micotoxina, há registos de hepatocarcinomas, carcinoma do endométrio, cancro da mama resultante da estimulação do crescimento das células *Michigan Cancer Foundation-7* (MCF-7) - células do cancro da mama humano que contêm REs (Rai, Das e Tripathi, 2020).

A partir dos vários estudos foi possível concluir que a exposição a baixas doses de ZEA induz a atividade carcinogénica enquanto a exposição a doses elevadas de ZEA provoca stress oxidativo, dano no DNA, degeneração mitocondrial, perturbação do ciclo celular e finalmente apoptose celular (Rai, Das e Tripathi, 2020).

## 1.7 Ocorrência e dados do RASFF

O sistema de alerta rápido para os géneros alimentícios e produtos alimentares foi criado em 1979, sendo que Portugal apenas aderiu em 1986, aquando da adesão à UE. A CE

sentiu a necessidade de atualizar o âmbito do sistema de alerta rápido perante as crises alimentares atuais. O sistema anterior incluía os G.A., mas não os alimentos para animais. Com o objetivo sempre de melhorar a segurança dos G.A. e dos alimentos para animais, e proteger a Saúde Pública, o Regulamento CE nº 178/2002, apresenta a atualização do sistema de alerta rápido para géneros alimentícios e de alimentos para animais (RASFF). Neste sentido, o RASFF é uma “*rede para a notificação de riscos diretos ou indiretos para a saúde humana, ligados a géneros alimentícios ou alimentos para animais*” que permite vigiar os riscos sanitários e nutricionais (CE, 2002).

Estima-se que, mundialmente, cerca de 25 % da produção de cereais é afetada por micotoxinas. Segundo os dados do RASFF, as micotoxinas representam um dos riscos com maior incidência, resultando na perda de mil milhão de toneladas métricas de G.A. e produtos alimentares (Iqbal, 2021).

Com base nos relatórios anuais do RASFF, foi possível reunir os dados relativos às notificações sobre micotoxinas entre os anos 2017 e 2021.

Primeiramente, em relação ao número de notificações realizadas pelos Estados-Membros (EM) sobre os perigos nos G.A., as micotoxinas ocupam o 9º lugar nos anos 2020 e 2019, o 8º lugar em 2018, e o 11º lugar no ano 2017. Quanto às notificações realizadas pelos Estados não Membros, as micotoxinas posicionam-se no segundo lugar em 2020, no primeiro lugar nos anos 2019 e 2018, e no segundo lugar em 2017 (EC, 2017, 2018, 2019, 2020).

No que diz respeito ao número de notificações realizadas pelos EM e Estados não Membros sobre os perigos na alimentação para animais, as micotoxinas ocupam o terceiro lugar em 2020 e 2019, e o segundo lugar em 2018 e 2017 (EC, 2017, 2018, 2019, 2020).

Adicionalmente, a partir da comparação entre o número de notificações sobre micotoxinas em G.A. nos vários anos, é possível verificar a subida do número entre 2017 e 2018, e a partir de 2018, o declínio desse mesmo número até 2021, onde houve de novo um aumento (consultar figura 6) (EC, 2017, 2018, 2019, 2020, 2021)

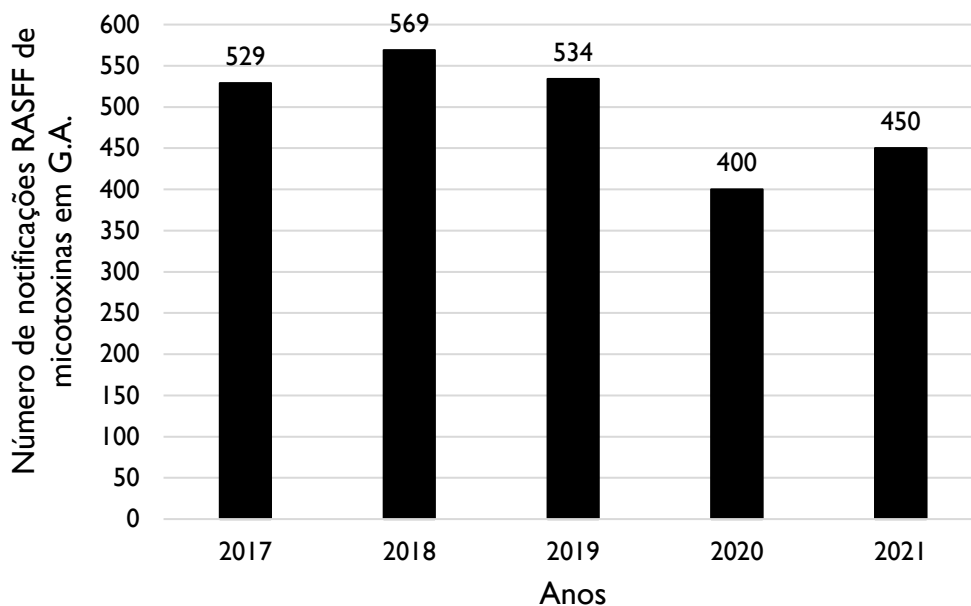


Figura 6-Comparação do número de notificações de micotoxinas em G.A. entre 2017 e 2021

Em relação à alimentação para animais, o número de notificações tem vindo a reduzir desde 2018. Não existem dados disponíveis sobre o ano 2017 (consultar figura 7) (EC, 2017, 2018, 2019, 2020, 2021).

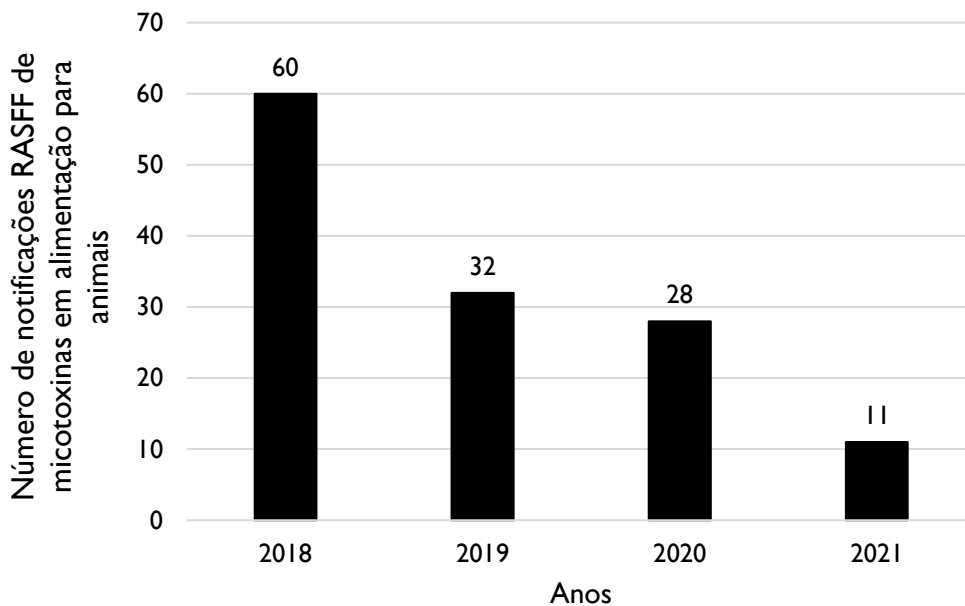


Figura 7-Comparação do número de notificações de micotoxinas em alimentação para animais entre 2018 e 2021

O número de notificações sobre micotoxinas na alimentação para animais é significativamente menor (dezenas) que o número de notificações em G.A. (centenas) (EC, 2017, 2018, 2019, 2020, 2021).

Portugal notificou a presença de micotoxinas 11 vezes em 2017, 17 vezes em 2018, e 6 vezes em 2019. Não existe dados sobre 2020 e 2021 (EC, 2017, 2018, 2019, 2020, 2021).

O estudo realizado por Gruber-Dorninger, Jenkins e Schatzmayr (2019) reúne os dados sobre a presença de diversas micotoxinas em amostras de alimento para animais em diversos países. Foi possível observar que 88 % das amostras analisadas apresentavam pelo menos uma micotoxina. As micotoxinas produzidas pelo género fúngico *Fusarium* como o DON, as FUM e a ZEA foram encontradas em 64 %, 60 % e 45 % das amostras, respetivamente, que corresponde à maior prevalência nas amostras analisadas, no referido estudo, em comparação com outras toxinas. A ZEA foi detetada em amostras de milho (44 %), grãos de soja (36 %) e produtos à base de soja (61 %), trigo (33 %) e cevada (20 %), e no arroz (34 %). Demonstrou ser a micotoxina com maior prevalência nos grãos de soja e produtos à base de soja (Gruber-Dorninger, Jenkins e Schatzmayr, 2019).

Para além da análise da presença de micotoxinas em função das amostras alimentares, o estudo de Gruber-Dorninger, Jenkins e Schatzmayr (2019) abrange também a análise da presença de micotoxinas em função das regiões geográficas. Assim, na Europa, foi observado que a ZEA contaminou 28,9 %, 36,3 %, 42,5 % e 45 % das amostras do norte da Europa, sul da Europa, Europa oriental e Europa central, respetivamente. Relativamente às concentrações de ZEA nas amostras, foram estimados para o norte da Europa, Europa central, sul da Europa e Europa oriental, valores de 35, 40, 44 e 15 µg/kg, respetivamente. Relativamente a outros continentes, verificou-se que o leste da Ásia foi a região com maior prevalência de ZEA (58,2 %), no entanto, a Oceânia foi a região que apresentou maior concentração de ZEA nas amostras (105 µg/kg) (Gruber-Dorninger, Jenkins e Schatzmayr, 2019).

Mais tarde, também o estudo realizado por Ropejko e Twarużek (2021) reúne os dados relativos à presença de ZEA em várias amostras de alimentos para animais, de diferentes países do mundo. Com base na análise descritiva, observaram que as amostras de milho, feijão, grão e misturas de alimentação para porcos de engorda apresentavam pelo menos 77 % das amostras contaminadas por ZEA. Por outro lado, as amostras de trigo, ervilhas, cevada, cerveja e fórmula infantil a partir de leite de vaca apresentavam menor frequência de contaminação, com percentagem de amostras contaminadas abaixo dos 12 % (Ropejko e Twarużek, 2021).

Em relação ao teor de ZEA, as amostras de milho, grãos de milho, alimentação para animais fibrosa e mistura de alimentação para porcos de engorda, e a alimentação para peixes apresentava os maiores teores de ZEA. Estes dados confirmam a suscetibilidade dos grãos e alimentação para animais quanto à exposição de ZEA (Ropejko e Twarużek, 2021).

Os fungos são capazes de produzir várias categorias de micotoxinas pelo que existe elevada probabilidade de mais de uma classe de micotoxinas ocorrer, em simultâneo, nos G.A. e alimentos para animais (Iqbal, 2021).

O estudo realizado por Gruber-Dorninger, Jenkins e Schatzmayr (2019) revela, ainda, dados importantes sobre a coocorrência de micotoxinas. De todas as amostras analisadas para a possível presença de, pelo menos, três micotoxinas foi observado que 64 % das amostras apresentavam combinação de, pelo menos, duas micotoxinas (Gruber-Dorninger, Jenkins e Schatzmayr, 2019).

Foi então observado, que ZEA e DON coocorriam em 48 % e 39 % das amostras de alimentação para a animais completamente preparada e de milho, respetivamente. No caso da combinação de ZEA e FUM, foi detetada em 43 % e 37 % das amostras de alimentação para a animais completamente preparada e de milho, respetivamente (Gruber-Dorninger, Jenkins e Schatzmayr, 2019).

Adicionalmente, a combinação de ZEA e DON com maior prevalência foi observada no trigo, com uma deteção em 28 % das amostras. A maioria das amostras de milho, trigo, cevada, soja e produtos à base de soja, e arroz apresentavam contaminação por ZEA, o que confirma a facilidade com que as espécies fúngicas *Fusarium sp.* se desenvolvem nestas categorias de cereais (Gruber-Dorninger, Jenkins e Schatzmayr, 2019).

Em comparação com as matérias primas destinadas a ser incorporadas em alimento para animais, a alimentação para animais completamente preparada apresentava maior percentagem de amostras positivas para a presença de todas as micotoxinas. Dado que a alimentação para animais é uma mistura de cereais, é espectável que a coocorrência de micotoxinas seja mais elevada que nas matérias primas destinadas a serem incorporadas em alimento para animais (Gruber-Dorninger, Jenkins e Schatzmayr, 2019).

Para além da ocorrência de micotoxinas a nível individual nos cereais e grãos, e da coocorrência com outras micotoxinas existem outras questões importantes que dizem respeito à ocorrência de micotoxinas modificadas (metabolitos resultantes de reações químicas das micotoxinas parentais), de micotoxinas mascaradas e de micotoxinas emergentes (Iqbal, 2021).

## **1.8 Análise de risco: Avaliação, Gestão e Comunicação de risco**

A presença de micotoxinas como substâncias indesejáveis nos G.A. e na alimentação para animais tem demonstrado ser inevitável dado que a sua ocorrência decorre de forma



natural. Em resultado, a exposição dos animais e dos humanos a estes contaminantes torna-se também inevitável (EFSA, 2012). A fim de proteger a Saúde Pública e manter ou melhorar a Segurança dos Alimentos, a legislação alimentar europeia necessita de análises de risco nas quais se possa basear para adotar medidas para o devido efeito (CE, 2002).

A análise do risco é uma abordagem sistemática, estruturada e com base em dados científicos com o objetivo de investigar a natureza do risco e as suas características e estimar o nível de risco a que a população suscetível possa estar exposta (ISO, 2018)

A análise do risco engloba 3 componentes: a avaliação do risco, seguida pela gestão do risco e finalizando com a comunicação do risco (consultar figura 8).

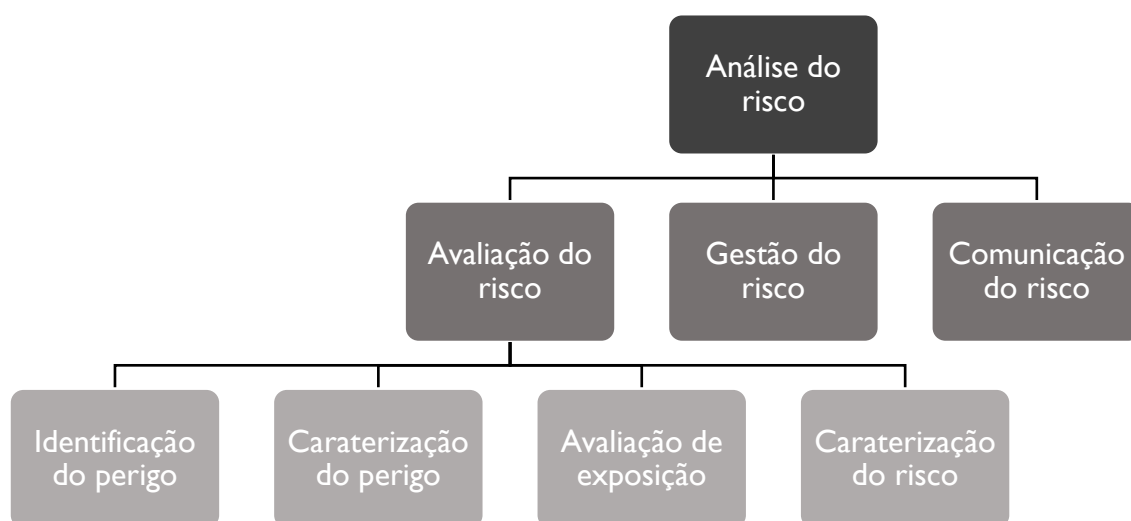


Figura 8-Composição do processo de análise do risco

A avaliação do risco decide quais os riscos que necessitam de tratamento e qual a melhor abordagem para tal, considerando as medidas de controlo que possam já existir (ISO, 2018). Para além disso, os avaliadores de risco estabelecem a probabilidade de ocorrência de um efeito adverso na saúde do indivíduo ou da população exposta, tomando em consideração fatores de risco, como a idade, sexo, etnia, situação social e económica, habilitação literária, e convicções culturais e pessoais. Os resultados da avaliação fornecem informação crucial para a gestão do risco, enquanto que os objetivos da gestão do risco mobilizam a avaliação do risco. Deste modo, apesar de ambas as fases estarem ligadas, devem ser realizadas de forma separada (Farokhzadian, Dehghan Nayeri, 2015).

A avaliação do risco é constituída por quatro etapas: identificação do perigo, caraterização do perigo, avaliação da exposição e caracterização do risco (consultar figura 8).

A identificação do perigo consiste em encontrar, reconhecer e descrever a natureza do perigo (químico, físico, biológico, alimentos irradiados ou perigo transgénico) com

potencial de causar dano na saúde pública, animal e/ou ambiental (ISO, 2018; Pascarella *et al.*, 2021) e determinar se a exposição ao perigo pode causar efeitos adversos na saúde humana (Berglund, Elinder e Järup, 2001).

A identificação do perigo baseia-se em testes *in vivo* ou *in vitro*, na relação entre a estrutura molecular e a atividade da molécula, e em estudos em seres humanos e em animais (Berglund, Elinder e Järup, 2001).

A caracterização do perigo é responsável pela descrição dos efeitos adversos que o perigo pode causar na saúde do consumidor (FAO e WHO, 2019).

Nesta fase, no caso dos perigos químicos, é estabelecida a relação dose-resposta que relaciona a magnitude de exposição (dose) ao perigo e a gravidade e/ou frequência dos efeitos adversos (resposta) (FAO e WHO, 2019). Para a interpretação da relação dose-resposta, é necessário considerar os fatores relacionados com o perigo, com a matriz alimentar e com o organismo hospedeiro que podem influenciar a resposta do organismo humano à exposição (FAO e WHO, 2003).

A partir da relação dose-resposta, é possível definir o limiar de exposição que representa a dose até à qual não existem efeitos adversos resultantes no organismo. Doses superiores ao limiar de exposição provocarão efeitos adversos (Ochoa, 2018).

Consoante o tipo de substância química, os limiares de exposição determinados são diferentes. No caso das substâncias com limiar de dose para efeito adverso, existem dois cenários:

- Para substâncias químicas não adicionadas intencionalmente aos alimentos, como por exemplo, os contaminantes, os limiares preferencialmente estabelecidos são a TDI (Ingestão Diária Tolerável, do Inglês *Tolerable Daily Intake*) e a ARfD (dose de referência aguda). Sendo que dentro deste grupo, caso se trate de exposição cumulativa, devem ser consideradas a Ingestão Tolerável Semanal (TWI - do Inglês *Tolerable Weekly Intake*) ou Ingestão Tolerável Mensal (TMI - do Inglês *Tolerable Monthly Intake*);
- Por outro lado, para as substâncias intencionalmente (por via antropogénica) utilizadas na cadeia alimentar, como os medicamentos veterinários usados na produção animal e os pesticidas usados na agricultura, para além da Ingestão diária aceitável (ADI - do Inglês *Acceptable Daily Intake*), também pode ser necessário identificar a ARfD (Barlow, 2016).

Para extrapolar os resultados obtidos com animais em laboratório para os humanos, divide-se por exemplo o NOAEL (do Inglês *No Observe Adverse Effect Level*) ou o LOAEL (do Inglês *Lowest Observable Adverse Effect Level*) pelo fator de segurança (FS):

$$TDI = \frac{p. e. NOAEL \text{ ou } LOAEL}{FS}$$

Normalmente, é usado um FS de 100 para a extrapolação para os seres humanos (10x para extrapolação interespecie x 10x para variações intraespécies). Caso não seja possível determinar o NOAEL, pode ser usado o LOAEL, porém deve ser adicionado um FS de 2, perfazendo um FS total de 200 (Barlow, 2016).

No caso das substâncias sem limiar de dose para efeito adverso, as substâncias carcinogênicas e genotóxicas incluindo certos pesticidas e medicamentos veterinários, não é estabelecido um limiar de exposição porque deve ser assumido que, para qualquer dose de exposição, estas substâncias provocam efeitos adversos (Barlow, 2016).

A terceira etapa, a avaliação da exposição, permite estimar a exposição total de um contaminante através da ingestão ou de outra fonte relevante. A combinação dos dados obtidos na avaliação de exposição com os dados sobre os hábitos alimentares das populações permite determinar a população ou subgrupo da população mais exposto ao perigo e com maior risco de exposição e identificar os G.A. que podem contribuir para a exposição da população em estudo (FAO e WHO, 2019).

A avaliação de exposição compara o valor da PDI (Ingestão Diária Provável, do Inglês *Probable Daily Intake*) calculado e a respectiva TDI tabelada pela EFSA. A PDI é calculada pela seguinte equação:

$$PDI (\mu g/kg \text{ p.c./dia}) = \frac{C \times V}{W \times E}$$

Equação 1-Cálculo da ingestão diária provável

Sendo que C corresponde à média da concentração do biomarcador ZEA detetado na urina em  $\mu g/L$ , V representa o volume de urina excretado pelas crianças durante 24 horas em L, W expressa a média do peso corporal das crianças em estudo em kg e finalmente E corresponde à taxa de excreção associada á ZEA em percentagem (Carballo *et al.*, 2021).

A avaliação da exposição a substâncias químicas, nomeadamente a micotoxinas, pode ser efetuada de duas maneiras.

A abordagem indireta (Martins *et al.*, 2019) permite avaliar a exposição externa de uma população (Louro *et al.*, 2019) às micotoxinas através da combinação da estimativa da concentração dos contaminantes nos alimentos e os dados sobre os hábitos alimentares da população (Al-Jaal *et al.*, 2019). A avaliação indireta da exposição apresenta algumas limitações

nomeadamente a distribuição heterogénea das micotoxinas nos alimentos (Martins *et al.*, 2019), a imprecisão dos dados de consumo fornecidos pelos participantes e a ausência da indicação do consumo de lanches (que também representam uma fonte de exposição) (Al-Jaal *et al.*, 2019).

A avaliação da exposição interna (Choi *et al.*, 2017) de forma direta estima a ingestão das micotoxinas ou dos seus metabolitos (Al-Jaal *et al.*, 2019) e/ ou avalia os efeitos biológicos provocados no corpo humano (Choi *et al.*, 2017) através da quantificação dos biomarcadores (Al-Jaal *et al.*, 2019) em amostras biológicas humanas como o sangue, urina, leite materno, saliva, entre outros (Pena *et al.*, 2022). Os biomarcadores podem ser de exposição (biomarcadores de dose interna ou de dose biológica efetiva) e/ou de efeito (Berglund, Elinder e Järup, 2001). Esta abordagem é aprofundada no capítulo 1.8.1.

A escolha do(s) método(s) para monitorização depende do propósito do estudo e da quantidade e qualidade da informação disponível. É recomendado combinar dois ou mais métodos para obter informação mais detalhada e garantir a robustez dos resultados (Berglund, Elinder e Järup, 2001).

A última etapa da avaliação de risco é a caracterização do risco que a partir da informação obtida nas três etapas prévias fornece informação sobre a possibilidade de um agente apresentar um risco significativo para a saúde da população humana exposta. Para isso, a exposição da população em estudo é comparada com o limite seguro de exposição (dose referência de exposição). Assim, existe risco para a saúde da população em estudo quando a exposição ultrapassa o limite seguro. A informação obtida nesta etapa é muito útil na gestão de risco e no momento de fazer decisões em relação ao possível risco (Farokhzadian, Dehghan Nayeri, 2015).

Com base nos resultados da avaliação do risco, os gestores de risco são responsáveis pela definição e implementação de ações e decisões políticas. A gestão do risco tem como objetivo mitigar o risco de modo a proteger os consumidores, animais, plantas e/ou ambiente (ISO, 2018).

Por fim, a comunicação do risco consiste no intercâmbio interativo entre avaliadores e gestores do risco, consumidores, empresas do sector alimentar e do sector dos alimentos para animais, a comunidade universitária e outras partes interessadas, de informações e pareceres relativos a perigos e riscos, e de noções relativas à perceção do risco pelas partes envolvidas, durante todo o processo de análise do risco. Esta componente inclui a explicação dos resultados da avaliação do risco e da base das decisões de gestão dos riscos, de forma clara e adequada ao público alvo (Farokhzadian, Dehghan Nayeri, 2015; ISO, 2018).

O painel de peritos em Contaminantes da Cadeia Alimentar (CONTAM) da EFSA realça o risco da presença de contaminantes para a saúde animal e humana através da ingestão de alimentos de origem animal contaminados (como a carne, mel, leite e ovos), ou através da transferência dos materiais em contacto com os produtos alimentares (EFSA, 2012). Assim, o painel CONTAM tem a capacidade de desenvolver análises de risco a pedido dos países importadores ou dos países exportadores (Adamchick e Perez, 2020).

O painel CONTAM efetua avaliações de risco com base em informações científicas que estão disponíveis ao acesso público – por exemplo, artigos revisados e publicados em revistas científicas, relatórios oficiais nacionais apresentados pelos EM da União Europeia, ou avaliações de risco realizadas por organizações internacionais como a WHO. No fundo, o painel CONTAM pretende avaliar se a exposição a um determinado contaminante representa risco para a população europeia ou para um subgrupo específico da população (EFSA, 2012).

### **1.8.1 Biomonitorização humana**

Os estudos de Biomonitorização Humana (HBM – do Inglês *Human Biomonitoring*) são um bom exemplo da abordagem direta da avaliação de exposição (Martins *et al.*, 2019).

Nos estudos de HBM, a escolha do biomarcador a ser analisado numa dada amostra biológica é crucial para a qualidade e pertinência dos resultados obtidos. O biomarcador deve ser válido, fiável e relevante para o estudo (Martins *et al.*, 2019). Para a seleção do biomarcador é importante conhecer os efeitos da exposição do biomarcador a longo e curto período de tempo, assim como entender se o método analítico é sensível o suficiente para a deteção do biomarcador, interpretar a sua relação dose-resposta e se é adequado ao perfil toxicocinético do composto original (Al-Jaal *et al.*, 2019; Mally, Solfrizzo e Degen, 2016).

Os estudos de HBM devem utilizar matrizes biológicas acessíveis e adequadas ao perfil toxicocinético do composto em investigação como a urina, sangue, cabelo, unhas (Duarte, Pena e Lino, 2011), leite materno, saliva (Pena *et al.*, 2022) entre outras. A urina é frequentemente utilizada uma vez que é uma amostra não-invasiva, rápida e fácil de recolher, o que favorece a aceitabilidade dos participantes (Duarte, Pena e Lino, 2011).

A HBM é uma técnica de monitorização importante porque considera as várias fontes e vias de exposição (oral, dérmica e por inalação) (Duarte, Pena e Lino, 2011) no processo de avaliação assim como as características individuais e os hábitos de vida de cada indivíduo (Pena *et al.*, 2022). Também permite detetar exposições químicas emergentes e alterações nas vias de exposição de substâncias conhecidas; identificar grupos populacionais e indivíduos mais

vulneráveis ao contaminante em estudo (Pena *et al.*, 2022), atendendo à variabilidade regional e temporal (Mally, Solfrizzo e Degen, 2016); identificar padrões de exposição (Pena *et al.*, 2022); e estabelecer o intervalo de confiança (Mally, Solfrizzo e Degen, 2016) e a carga corporal total – quantidade total de contaminante acumulado no corpo (Martins *et al.*, 2019).

Relativamente às limitações da HBM, existe a possibilidade da quantificação dos metabolitos em detrimento da quantificação dos compostos originais e, também, o facto da quantificação dos biomarcadores em tecidos ou fluídos mais acessíveis poder não representar a verdadeira concentração do composto nos órgãos-alvo (Louro *et al.*, 2019).

O projeto europeu HBM4EU, que inclui Portugal, define uma lista de substâncias químicas perigosas prioritárias onde estão incluídas as micotoxinas (Schoeters e Lange, 2021).

As tabelas 1 e 2 reúnem alguns estudos de HBM relativos à presença e quantificação de ZEA em amostras de urina de crianças e adultos.

Os estudos HBM cuja população em estudo incluía apenas as crianças são escassos e, por isso, também foram reunidos estudos que abrangem adultos.

Apesar de alguns estudos mencionados também quantificarem os metabolitos de ZEA, as tabelas 1 e 2 apenas referem apenas os dados relativos à própria ZEA.

Na revisão pela literatura, a metodologia analítica preferencialmente utilizada foi a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa (LC-MS/MS), tendo sido apenas encontrado um estudo que utilizou o ELISA (Ensaio de Imunoabsorção Enzimática, do Inglês *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) (Asci *et al.*, 2014). Naturalmente, as técnicas analíticas escolhidas nos estudos têm diferentes sensibilidades para a deteção e quantificação da micotoxina originando diferentes resultados. Neste caso, como apenas foi possível encontrar um estudo que utiliza a ELISA, e apesar de não ser adequado, foram comparados os dados obtidos a partir das diferentes técnicas. Assim, os estudos de (Asci *et al.*, 2014; Föllmann *et al.*, 2016; Gratz *et al.*, 2020; Li *et al.*, 2018; Shephard *et al.*, 2013; Solfrizzo, Gambacorta e Visconti, 2014; Warth *et al.*, 2013, 2014) apresentam as maiores frequências de contaminação de ZEA.

A ausência de alguns dados como o limite de deteção (LOD) e o limite de quantificação (LOQ) em alguns estudos dificulta a comparação da sensibilidade dos métodos analíticos. No entanto, perante os valores de LOD existentes, é possível verificar que as LC-MS/MS utilizada nos estudos (Föllmann *et al.*, 2016; Shephard *et al.*, 2013; Warth *et al.*, 2013) foram as técnicas mais sensíveis.

Em relação à concentração de ZEA, os estudos (Bandera *et al.*, 2011; Carballo *et al.*, 2021; Ezekiel *et al.*, 2014) apresentam os maiores valores.

As amostras da primeira urina da manhã foram priorizadas na procura de estudos, no entanto também foram considerados dois estudos que utilizaram amostras pontuais (Föllmann *et al.*, 2016; Wallin *et al.*, 2015) e outros dois que utilizaram amostras de 24h (Martins *et al.*, 2019; Warth *et al.*, 2013).

Tabela 1-Ocorrência de ZEA em amostras de urina de crianças e adultos reportadas em vários estudos

País (ano)	População em estudo	Frequência de contaminação de ZEA (%)	Técnica analítica	LOD/LOQ (µg/L)	Concentração média ± Desvio padrão (µg/L)	Intervalo de contaminação [mín; máx] (µg/L)	Referência bibliográfica
Turquia (2010-2012)	Raparigas entre os 4-8 anos: GC, PTG e ICPPG <sup>a</sup>	63 (≈81) (inclui as amostras de todos os grupos)	ELISA	0,05 / SI	GC: 0,075±0,062	SI	(Asci et al., 2014)
New Jersey (SI)	Raparigas saudáveis entre os 9-10 anos	90 (55,2)	HPLC-MS/MS	0,05 / SI	1,82±4,80	[0,05; 33,12]	(Bandera et al., 2011)
Reino Unido (2004)	Crianças saudáveis entre os 2-6 anos	21 (100)	LC-MS/MS	0,016 / 0,033	0,09	[0,03; 0,25]	(Gratz et al., 2020)
Bélgica (2013-2014)	Crianças entre os 3-12 anos	ND	LC-MS/MS	ND	ND	ND	(Heyndrickx et al., 2015)
Itália (2011)	Indivíduos entre os 3-85 anos	52 (100)	LC-MS/MS UPLC-MS/MS	LC: SI / 0,8 UPLC: SI / 0,007	0,057±0,023	[SI; 0,120]	(Solfrizzo, Gambacorta e Visconti, 2014)
China (2016)	Indivíduos entre os 0 e 84 anos	214 (71,10)	LC-MS/MS	0,05 / 0,02	0,24	[<LOQ; 3,7]	(Li et al., 2018)
Tailândia (SI)	Indivíduos entre 10 e 76 anos	ND	LC-MS/MS	0,4 / 0,6	ND	ND	(Warth et al., 2014)

NOTAS: SI- sem informação; ND – não detetado; GC-Grupo de controlo sem patologias endócrinas, PTG-Grupo com telarca precoce e ICPPG-Grupo com puberdade precoce idiopática central, HPLC-Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (*do Inglês High Performance Liquid Chromatography*), MS-Espetrometria de Massa (*do Inglês Mass Spectrometry*), LC-Cromatografia Líquida (*do Inglês Liquid Chromatography*), UPLC-Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (*do Inglês Ultra High Performance Liquid Chromatography*); Em todos os estudos foi utilizado a primeira urina da manhã dos participantes.



Tabela 2-Ocorrência de ZEA em amostras de urina de adultos reportada em vários estudos

País (ano)	População em estudo	Frequência de contaminação de ZEA (%)	Técnica analítica	LOD/LOQ (µg/L)	Concentração média ± Desvio padrão (µg/L)	Intervalo de contaminação [mínimo-máximo] (µg/L)	Referência bibliográfica
Espanha (2019)	Adultos entre os 18-65 anos	16 (40)	LC-ESI-qTOF-MS	0,33 / 1	6,7±7	[<LOQ; 29,01]	(Carballo <i>et al.</i> , 2021)
Haiti (2012, 2013 e 2014)	Adultos saudáveis	ND	LC-MS/MS	0,15 / 0,3	ND	ND	(Gerding <i>et al.</i> , 2015)
Suécia (2010-2011)	Adultos	92 (37)	LC-MS/MS (IAC)	SI / 0,01	0,09±0,07	[0,01; 12,00]	(Wallin <i>et al.</i> , 2015)
Transkei (SI)	Mulheres entre os 19-97 anos	54 (100)	LC-MS/MS	0,002 / 0,007	0,204±0,456	[0,012; 3,15]	(Shephard <i>et al.</i> , 2013)
Alemanha (SI)	Adultos	GC: 13 GH: 12 GM: 5 (100) para os três grupos	LC-MS/MS (IAC)	0,002 / 0,005	GC 0,031±0,023 GH 0,042±0,026 GM 0,035±0,028	GC [0,007; 0,09] GH [0,004; 0,1] GM [0,006; 0,08]	(Föllmann <i>et al.</i> , 2016)
Áustria (SI)	Um único homem com 27 anos	1 (100)	LC-MS/MS	0,2 / 0,3	0,39	[0,30; 0,59]	(Warth <i>et al.</i> , 2013)
Nigéria (2011)	Homens e mulheres com ≥ 20 anos e, crianças e jovens com ≤ 19 anos	1 (0,8)	LC-MS/MS	0,4 / 0,6	0,3	[SI; 0,3]	(Ezekiel <i>et al.</i> , 2014)
Tunísia (SI)	Mulheres	1 (2,4)	UHPLC-MS/MS	0,03 / 0,1	[>LOD; <LOQ]	[>LOD; <LOQ]	(Belhassen <i>et al.</i> , 2014)
Portugal 2015-2016 <sup>a</sup>	Adultos	54 (57)	LC-MS/MS	0,2 / 0,8	1,30±SI	[SI; 11,51]	(Martins <i>et al.</i> , 2019)

Portugal 2015-2016 <sup>b</sup>		45 (48)			0,17±SI	[SI; 3,98]	
------------------------------------	--	---------	--	--	---------	------------	--

NOTAS: ND – não detetado; SI- sem informação; GC-grupo de controlo, GH-grupo apenas com homens participantes e GM-grupo apenas com mulheres participantes; ESI-Ionização por Eletrospray (*do Inglês Electrospray Ionization*), qTOF-(*do Inglês Quadrupole-Time of Flight*), IAC-colunas de imunoafinidade (*do Inglês Immunoaffinity Columns*), UHPLC-Cromatografia líquida de Ultra Eficiência (*do Inglês Ultra High Performance Liquid chromatography*); O estudo realizado por (Carballo *et al.*, 2021), (Shephard *et al.*, 2013) e (Ezekiel *et al.*, 2014) utilizaram a primeira urina da manhã dos participantes. O estudo de (Wallin *et al.*, 2015) e de (Föllmann *et al.*, 2016) utilizaram amostras pontuais, enquanto que o estudo de (Warth *et al.*, 2013) utilizou a urina de 24h. O estudo (Martins *et al.*, 2019) utilizou a primeira urina da manhã<sup>(a)</sup> e urina de 24h<sup>(b)</sup> como amostras.

## 1.9 Metodologias analíticas

No mercado estão disponíveis vários métodos analíticos validados para a determinação de ZEA em amostras de urina, incluindo métodos baseados em técnicas cromatográficas (Li *et al.*, 2018) e em imunoenaios.

Dependendo do método utilizado para a determinação, um passo de extração e purificação da amostra pode ou não ser necessário. O passo de extração tem como objetivo remover os interferentes presentes na amostra para evitar a contaminação do aparelho analítico e não afetar a determinação (Lu *et al.*, 2020). Quanto à purificação, esta permite concentrar o analito de interesse facilitando a posterior detecção do analito (Zhang *et al.*, 2018).

A SPE (Extração em Fase Sólida, do Inglês *Solid Phase Extraction*) é uma técnica eficiente para a extração seletiva de analitos apresentando diversas vantagens como a obtenção de elevadas taxas de recuperação, a compatibilidade das colunas com os instrumentos de análise de alimentos, a facilidade de automatização das colunas e o uso de volumes reduzidos de solvente (AG, [s.d.]). No entanto o seu custo e tempo de execução são elevados (Lu *et al.*, 2020). De forma sucinta, a SPE consiste na adsorção e retenção do analito de interesse na fase sólida da coluna, que é depois lavada para remover os interferentes. Na maioria dos casos o eluato é evaporado até secar e reconstituído com solução-tampão (Meneely *et al.*, 2011). A velocidade de fluxo é um fator importante durante a SPE dado que se for muito rápida pode reduzir a taxa de recuperação e no caso de ser lenta pode favorecer a presença de impurezas no extrato (AG, [s.d.]). Njumbe Ediage *et al.* (2013) recorreram a SPE para a extração de várias micotoxinas e metabolitos, incluindo a ZEA, em amostras de urina humana.

A purificação através de colunas de afinidade é simples e apresenta elevada seletividade e capacidade de purificação (Lu *et al.*, 2020), no entanto a desnaturação dos anticorpos mesmo na presença de baixa concentração de solvente orgânico, a possibilidade de ocorrer interações entre os anticorpos e outras moléculas e o custo elevado são desvantagens desta técnica (Pereira 2014). O princípio deste método é a ligação seletiva do analito ao anticorpo presente na fase estacionária da coluna enquanto os interferentes são removidos. De seguida, o analito é eluído pela adição de um solvente orgânico como por exemplo o metanol (Alshannaq e Yu, 2017). Posteriormente, a evaporação do solvente permite a obtenção do analito concentrado (Nolan *et al.*, 2019). Rubert *et al.* (2011) e Solfrizzo *et al.* (2011) utilizaram esta técnica num estudo de análise a várias micotoxinas, incluindo a ZEA, presente em amostras de urina humana.

Outra técnica de preparação da amostra é o método “*dilute and shoot*” que consiste na extração e diluição da amostra sem necessidade de purificação da mesma. O facto da purificação não ser necessária também representa uma desvantagem dado que a concentração do analito pode estar tão diluída que impossibilita a deteção pelo aparelho analítico, pelo que é recomendado o uso de técnicas de deteção de alta sensibilidade (Lu *et al.*, 2020). Warth *et al.* (2012) utilizaram esta técnica para a deteção de vários metabolitos de micotoxinas em amostras de urina sem o passo de purificação do extrato.

Investigadores verificaram que os métodos de SPE e de purificação por colunas de imunoafinidade são mais sensíveis e apresentam maiores taxas de deteção do que o método “*dilute and shoot*” (Ali e Degen, 2018).

Em relação á deteção de ZEA, os métodos cromatográficos como a LC e GC (Cromatografia gasosa, do Inglês *Gas Chromatography*) acoplados com um detetor de MS permitem uma análise quantitativa de ZEA, enquanto que a técnica de cromatografia em camada delgada (TLC-do Inglês *thin layer chromatography*) e as técnicas imunológicas tal como o ELISA apenas revelam a presença ou ausência de ZEA (análise qualitativa) e/ou fornecem uma aproximação da concentração do analito (análise semi-quantitativa) (Pereira, Fernandes e Cunha, 2014; EC, 2012). Neste sentido, vários autores recomendam a confirmação dos resultados positivos para a presença do analito fornecidos por ELISA e quantificação da respetiva concentração com um método complementar como LC-MS/MS ou HPLC (Zhang *et al.*, 2018).

O imunoensaio enzimático ELISA é aplicado na segurança alimentar como uma técnica de triagem, deteção e quantificação de contaminantes em amostras biológicas e alimentares, através da interação anticorpo-antígeno. Os kits baseados na técnica ELISA estão comercialmente disponibilizados para um vasto leque de micotoxinas reguladas, nomeadamente a Zearalenona (Anfossi, Giovannoli e Baggiani, 2016). O imunoensaio ELISA é um método popular na comunidade científica face à sua rápida e simples aplicação associada ao baixo custo, comparativamente aos métodos cromatográficos, e à sua facilidade de automatização (Motta e Duarte, 2010; Zhang *et al.*, 2018). A elevada seletividade da interação anticorpo-antígeno favorece significativamente a especificidade desta técnica (Li *et al.*, 2017). No entanto, o imunoensaio apresenta algumas desvantagens como a possibilidade de detetar compostos estruturalmente semelhantes, quer sejam outras toxinas ou componentes da matriz, com afinidades semelhantes para o anticorpo (Pereira, Fernandes e Cunha, 2014) e a necessidade de confirmação através de técnicas de cromatografia líquida para evitar o risco de resultados falsos-positivos (Kos *et al.*, 2016).

A LC-MS/MS é uma técnica amplamente utilizada na determinação de micotoxinas incluindo a ZEA cujo acoplamento ao espectrómetro de massa permite uma elevada sensibilidade e seletividade sem necessidade de derivatização da amostra (Iqbal, 2021). Dado não ser necessário a derivatização da amostra nem o passo de purificação, o tempo de execução é reduzido. Com base na sua relação massa/carga, a MS fornece informação sobre a estrutura química do analito (Alshannaq e Yu, 2017). Em comparação com o método convencional de LC, a utilização de UPLC ou HPLC melhora a capacidade de separação, o tempo de execução, a resolução e a sensibilidade (Pereira, Fernandes e Cunha, 2014).

## 1.10 Legislação

Os países desenvolvidos têm vindo a beneficiar da evolução agrícola, tecnológica, científica e alimentar, permitindo o controlo mais apertado da contaminação dos campos agrícolas e dos alimentos (Abrunhosa *et al.*, 2016), todavia não evita completamente a referida contaminação e, conseqüentemente a ação tóxica das micotoxinas nos organismos vivos.

Por outro lado, nos países em desenvolvimento o controlo de qualidade alimentar, as tecnologias de produção e as condições de armazenamento são pobres ou inexistentes, fatores que favorecem a exposição a micotoxinas (Al-Jaal *et al.*, 2019). Além disso, o clima nestes países é quente (Al-Jaal *et al.*, 2019) e a população apresenta uma alimentação monótona, normalmente baseada em cereais e produtos derivados de cereais que são os alimentos preferenciais para o desenvolvimento de fungos e micotoxinas (Braun *et al.*, 2022).

Face ao risco que a contaminação por micotoxinas representa para a saúde do consumidor e para a qualidade dos alimentos, vários países adotaram os limites máximo toleráveis estabelecidos pela JECFA, FAO/WHO e CE (Al-Jaal *et al.*, 2019). Os limites diferem de país para país, consoante o seu estado de desenvolvimento, a sua perspetiva quanto ao nível de contaminação considerado seguro para a saúde pública, e os interesses económicos relacionados com as culturas locais (Abrunhosa *et al.*, 2016).

A CE tem a responsabilidade de harmonizar as diferenças dos teores máximos admissíveis de micotoxinas presentes nos G.A. ou nos alimentos para animais nas legislações dos EM da UE para garantir o bom funcionamento do comércio interno. Paralelamente, os EM também recorrem ao comércio internacional pelo que no estabelecimento dos referidos teores, a CE também deve atender às normas internacionais (p.e. *Codex Alimentarius*), de modo a que a disparidade entre os valores estabelecidos pelos EM e não-Membros da EU não seja tão grande que impeça o comércio internacional (CE, 2002).

No caso específico da ZEA, dado o seu impacto, está definida e em vigor regulamentação em 16 países, incluindo alguns países asiáticos como a Coreia do Sul, a Tailândia e a China (Rai, Das e Tripathi, 2020).

A EFSA concluiu que a exposição de ZEA não apresenta suscetibilidade em relação a nenhum género sexual, no entanto foi verificado que o grupo etário mais jovem (crianças e adolescentes) apresenta maior exposição a ZEA comparado com os adultos e idosos, que foi explicado pelo consumo de maior volume de alimento por kg de peso corporal, pelos mais jovens (EFSA, 2011).

O Regulamento (CE) N° 1881/2006 da Comissão, de 19 de Dezembro de 2006, fixa os teores máximos de certos contaminantes presentes nos G.A., incluindo para a ZEA (consultar tabela 3).

Tabela 3-Legislação da ZEA em G.A. na UE, adaptado do Regulamento (CE) N° 1881/2006 da Comissão, de 19 de Dezembro de 2006

	<b>Nome do produto</b>	<b>Teor máx µg/kg</b>
1	Cereais não transformados <sup>a,b</sup> , com exceção do milho	100
2	Milho não transformado <sup>a</sup>	200 <sup>c</sup>
3	Cereais destinados ao consumo humano direto, farinha de cereais, sêmola enquanto produto final comercializado para consumo humano direto e gérmen, com exceção dos géneros alimentícios referidos nos pontos 4, 7 e 8	75
4	Milho destinado ao consumo humano direto, farinha de milho, sêmola de milho, <i>grits</i> , gérmen de milho e óleo de milho refinado <sup>d</sup>	200 <sup>c</sup>
5	Pão (incluindo pequenos produtos de panificação), produtos de pastelaria, bolachas, refeições leves à base de cereais e cereais para pequeno-almoço, com exceção de refeições leves à base de milho e cereais para pequeno-almoço à base de milho	50
6	Refeições leves à base de milho e cereais para pequeno-almoço à base de milho	50 <sup>c</sup>
7	Alimentos à base de cereais transformados (com exceção de alimentos transformados à base de milho) e alimentos para bebés destinados a lactentes e crianças jovens <sup>e,f</sup>	20
8	Alimentos transformados à base de milho destinados a lactentes e crianças jovens <sup>e,f</sup>	20 <sup>c</sup>

NOTAS: <sup>a</sup> Os teores máximos aplicam-se aos cereais não transformados introduzidos no mercado para uma primeira fase de transformação; <sup>b</sup> O teor máximo aplica-se aos cereais colhidos e tomados a cargo, a partir da campanha de comercialização de 2005/2006, em conformidade com o Regulamento (CE) n° 824/2000 da Comissão, de 19 de Abril de 2000 (JO L 100 de 20.4.2000, p. 31), com a última redação que lhe foi dada pelo Regulamento (CE) n° 1068/2005 (JO L 174 de 7.7.2005, p. 65); <sup>c</sup> O teor máximo é aplicável a partir de 1 de Julho de 2007; <sup>d</sup> Esta categoria inclui igualmente produtos similares com outras denominações, como a semolina; <sup>e</sup> G.A. enumerados nesta categoria, tal como definidos na Diretiva 96/5/CE, Euratom da Comissão, de 16 de Fevereiro de 1996 destinados a lactentes e crianças jovens (JO L 49 de 28.2.1996, p. 17), com a última redação que lhe foi dada pela Diretiva 2003/13/CE (JO L 41 de 14.2.2003, p. 33); <sup>f</sup> O teor máximo refere-se à matéria seca. A matéria seca é determinada em conformidade com o Regulamento (CE) n° 401/2006.

A Diretiva 2002/32/EC do Parlamento Europeu e do Conselho de 7 de Maio de 2002 relativa às substâncias indesejáveis nos alimentos para animais define os teores máximos para

as substâncias indesejáveis em produtos destinados a alimentação para animais, dos quais não consta os teores para a ZEA. Neste sentido, a Recomendação (UE) 2016/1319 da Comissão de 29 de Julho de 2016 que altera a Recomendação 2006/576/EC no que diz respeito ao DON, à ZEA e à OTA nos alimentos para animais de companhia recomenda valores de orientação para a ZEA (consultar tabela 4).

Tabela 4-Legislação de ZEA em produtos destinados à alimentação animal adaptado do Recomendação (UE) 2016/1319 Da Comissão de 29 de julho de 2016 que altera a Recomendação 2006/576/CE

<b>Categoria dos produtos</b>	<b>Nome do produto</b>	<b>Valor de orientação em µg/kg de alimento para animais para um teor de humidade de 12 %</b>
Matérias-primas para alimentação animal <sup>(a)</sup>	Cereais e produtos à base de cereais <sup>(b)</sup> com exceção dos subprodutos do milho	2000
	Subprodutos do milho	3000
Alimentos compostos para:	Leitões, marrãs (porcas jovens), cachorros, gatinhos, cães e gatos para reprodução	100
	Cães e gatos adultos, exceto para reprodução	200
	Marrãs e suínos de engorda	250
	Vitelos, vacas leiteiras, ovelhas (incluindo borregos) e cabras (incluindo cabritos)	500

NOTAS:<sup>a</sup> O termo «Cereais e produtos à base de cereais» inclui não apenas as matérias-primas para alimentação animal enumeradas no capítulo I «Grãos de cereais e seus subprodutos», da lista das matérias-primas para alimentação animal referida na parte C do anexo do Regulamento (UE) n.º 68/2013 da Comissão, de 16 de janeiro de 2013, relativo ao Catálogo de matérias-primas para alimentação animal (JO L 29 de 30.1.2013, p. 1)., mas também outras matérias-primas para alimentação animal derivadas de cereais, em particular de forragens de cereais e alimentos grosseiros.

As legislações referidas anteriormente não estabelecem teores máximos para a soma de micotoxinas diferentes. Este aspeto deve ser previsto na legislação futura, visto que a possibilidade de coocorrência das várias micotoxinas na mesma matriz pode resultar em efeitos aditivos ou sinérgicos entre si (Iqbal, 2021)

## 1.11 Processos de controlo

A Recomendação 2006/583/CE da Comissão, de 17 de Agosto de 2006, enumera vários fatores que favorecem a infeção de cereais e produtos à base de cereais por fungos do género *Fusarium sp.* e a contaminação pelas respetivas micotoxinas, e também menciona estratégias preventivas e métodos de controlo:

- I. Rotação das culturas utilizando culturas que não sejam hospedeiras das espécies *Fusarium* (como por exemplo batata, beterraba entre outras) para diminuir o inóculo do terreno;

2. Utilização de plantas híbridas ou variedades de plantas mais adequadas para o solo, as condições climáticas e as práticas agronómicas empregues de modo a reduzir o stress da planta tornando-as menos suscetíveis às infeções fúngicas;
3. Planeamento de culturas:
  - a. Evitar as condições climáticas que prolonguem o amadurecimento das culturas no campo, antes da colheita, e
  - b. Evitar densidade de plantação excessiva;
4. Gestão dos solos e das culturas:
  - a. Remover, destruir ou enterrar os resíduos de culturas velhas ou infetadas, como as lavouras,
  - b. Lavrar a terra deixando uma superfície irregular ou uma cama de sementes grosseira que favoreça a infiltração de água e minimize a erosão dos solos e dos respetivos nutrientes,
  - c. Adequar a rega à fase de desenvolvimento da planta para evitar o stress da planta e fornecer nutrientes às plantas,
  - d. Aplicação de fungicidas, inseticidas e herbicidas aprovados e registados, e
  - e. Evitar a acama das culturas;
5. Colheita:
  - a. Antes da colheita, avaliar a qualidade dos cereais, separando as porções de cereais que se suspeite ou que se tenha a certeza que estão infetados e remover os grãos engelhados e pequenos, ou danificados porque há indicação de que contêm maiores teores de micotoxinas,
  - b. Colher os cereais quando o teor de humidade adequado é atingido,
  - c. Caso o ponto anterior não seja possível, os cereais devem ser secos dado que o adiamento da colheita de cereais já infetados pode aumentar o teor de micotoxinas,
  - d. Garantir que todo o equipamento necessário para a colheita está operacional e,
  - e. Evitar danificar o cereal mecanicamente e o seu contacto com o solo;
6. Secagem:
  - a. Antes da secagem, evitar armazenar cereais húmidos e arejá-los, evitar empilhar os cereais por períodos prolongados,
  - b. Reduzir ao máximo o período entre a colheita e a secagem,



- c. Os operadores devem tomar conhecimento do teor de humidade que os cereais devem conter, após a secagem,
  - d. Não misturar lotes de cereais com risco de contaminação diferentes e,
  - e. Após a secagem, transferir os cereais para outra instalação ou silo;
7. Armazenamento:
- a. Garantir que os sacos para armazenar os cereais estão limpos, secos e são empilhados em paletes ou então que se coloca uma camada impermeável entre os sacos e o chão,
  - b. No local de armazenamento, arejar os cereais,
  - c. Controlar o teor de humidade e a temperatura dos cereais durante o armazenamento,
  - d. Remover as porções de cereais visivelmente infetados e,
  - e. Aplicar de forma uniforme, em todos os lotes, inseticidas, fungicidas e conservantes que não interfiram nem danifiquem os cereais;
8. Transporte após armazenamento:
- a. Limpar, desinfetar e secar os contentores de transporte,
  - b. Utilizar contentores cobertos ou estanques ou oleados de cobertura para proteger os cereais do aumento da humidade, contentores à prova de insetos e roedores ou tratá-los com repelentes de insetos e roedores e,
  - c. Evitar flutuações de temperatura e eventual condensação à superfície dos grãos.

A identificação destes princípios permite orientar os EM no controlo e gestão da Segurança dos Alimentos e elaborar códigos de boas práticas agrícolas (BPAs) e de fabrico (BPFs) dos cereais destinados à alimentação humana e animal (CE, 2007).

Em complemento às BPAs e BPFs, o sistema de Análise de Perigos e Pontos de Controlo Críticos (*HACCP-do Inglês Hazard Analysis and Critical Control Points*) tem o objetivo de identificar perigos alimentares e estabelecer medidas de controlo ao longo da cadeia. Os produtores e operadores devem reger-se pelos princípios que constituem o HACCP, são eles:

1. Análise de perigos e identificação de medidas de controlo,
2. Determinação dos pontos críticos de controlo (PCCs),
3. Estabelecimento de limites críticos,
4. Estabelecimento de um sistema de monitorização do controlo de PCCs,
5. Adoção de ações corretivas quando necessário,
6. Verificação do plano de ação do sistema e

7. Documentação de todos os procedimentos realizados com base no HACCP (CAC, FAO e WHO, 2020).

Como mencionado anteriormente, a ocorrência de micotoxinas, nomeadamente as micotoxinas produzidas pelos fungos *Fusarium spp*, é imprevisível e inevitável, pelo que as estratégias de prevenção e controlo apenas permitem minimizar a respetiva contaminação (Daou *et al.*, 2021; EFSA, 2012).

Caso se verifique a presença de micotoxinas nos alimentos, após aplicação dos métodos preventivos, devem ser adotados métodos de descontaminação convencionais ou inovadores. A estabilidade química e térmica das micotoxinas (Alshannaq e Yu, 2017) torna a sua eliminação dos alimentos através de processos convencionais como a cozedura, fervura, assadura, fritura e pasteurização um desafio (Alshannaq e Yu, 2017). De maneira a tentar ultrapassar essa dificuldade, têm sido desenvolvidos processos de descontaminação e destoxificação (Abrunhosa *et al.*, 2016).

Os processos de descontaminação e destoxificação disponíveis dividem-se em métodos físicos, químicos e microbiológicos (Abrunhosa *et al.*, 2016). Os referidos processos permitem recuperar os produtos contaminados e evitar perdas económicas (Abrunhosa *et al.*, 2016; Rogowska *et al.*, 2019). Todavia, não são economicamente viáveis, podem causar a perda de nutrientes e das propriedades organoléticas dos alimentos e produzir produtos de degradação tóxicos (Abdolmaleki *et al.*, 2021). Neste sentido, a comunidade científica tem mostrado maior interesse nos processos microbiológicos uma vez que são processos eficazes, relativamente baratos, seguros. Para além disso, não alteram o sabor dos alimentos nem o valor nutricional do pasto e a ligação das micotoxinas com os microrganismos produz metabolitos menos tóxicos (Rogowska *et al.*, 2019).

Os métodos físicos incluem lavagem, triagem, descasque dos grãos, moagem, irradiação com ultravioleta ou radiação gama, tratamento com calor, aplicação de adsorventes inorgânicos inertes (Buszewska-Forajta, 2020) e cozedura de extrusão (Rogowska *et al.*, 2019).

A aplicação de adsorventes inorgânicos como, por exemplo, zeólitos, argila de bentonite, carvão ativado, caulinita, minerais de aluminossilicato e óxido de grafite modificado, e de outro tipo de adsorventes como organo-montmorilonita modificado (OMTs), fluído gástrico sintético e os fluídos corporais sintéticos, tem-se mostrado vantajosa na eliminação de toxinas. Bai *et al.* (2018) demonstraram que o óxido de grafite modificado adsorveu 23,75 mg/g da concentração de ZEA em óleo de milho para consumo (Buszewska-Forajta, 2020). A adsorção por ação do óxido de grafite modificado mostrou ser mais eficaz do que a adsorção usando carvão ativado, sob as mesmas condições (Rogowska *et al.*, 2019). O adsorvente

organo-montmorillonita apresenta a vantagem de remover em simultâneo duas micotoxinas com propriedades físico-químicas diferentes. Wang et al. (2018b) observou que OMts modificados foram capazes de adsorver Aflatoxinas B1 (substância polar) e ZEA (substância fracamente polar e hidrofóbica) (Buszewska-Forajta, 2020). O estudo realizado por Markovica et al. (2017) avaliou a capacidade de adsorção de minerais de zeolite nomeadamente organo-filipsita e organo-clinoptilolita. Foi observado que organo-filipsita adsorveu 6,86 mg/g de ZEA e organo-clinoptilolita removeu 5,73 mg/g de ZEA. De seguida modificaram a superfície dos organozeolitos e verificaram que a capacidade de adsorção aumentou. Sprynskyy et al. (2012) estudou a influência de talco e da terra diatomácea na adsorção de ZEA a partir do fluido gástrico sintético (SGF) e do fluido corporal sintético (SBF). Concluiu que o uso de talco melhora a adsorção de ZEA, registando os seguintes valores: 73 % ZEA-talco no SGF e 54 % ZEA-talco no SBF, e 53 % ZEA-Terra diatomácea no SGF e 42 % ZEA-Terra diatomácea no SBF (Rogowska et al., 2019).

Finalmente Ruy et al. (1999) verificou que a cozedura de extrusão reduz a concentração de ZEA em 83 % em alimentos à base de cereais (Rogowska et al., 2019).

Os métodos químicos baseiam-se na utilização de compostos químicos como o hipoclorito de sódio, dióxido de enxofre, peróxido de hidrogénio, amoníaco e ozono que reagem e degradam as micotoxinas (Buszewska-Forajta, 2020). De seguida, as sementes ou grãos são lavados com solução de carbonato de sódio ou água para remover as toxinas (Rogowska et al., 2019).

No caso de ZEA, foi observado que 10 % de peróxido de hidrogénio ( $H_2O_2$ ) a 80 °C durante 16 h degradou 85 % de ZEA. No entanto, este estudo não apresenta informação sobre os possíveis produtos de degradação e a sua toxicidade (Buszewska-Forajta, 2020).

McKenzie et al. (1997) reportou que concentrações elevadas de ozono permitem eliminar completamente a ZEA em 15 segundos, sem produção de produtos de degradação (Rogowska et al., 2019).

Por último, os métodos microbiológicos baseiam-se no uso de microrganismos probióticos que se ligam e metabolizam as micotoxinas em metabolitos menos tóxicos (Rogowska et al., 2019).

A bactéria do ácido láctico mostra-se ser promissora na destoxificação de substâncias xeno-estrogénicas tal como Mokoena et al., (2005) demonstrou. Este estudo conferiu que as bactérias ácido-lácticas reduziram a concentração de ZEA em 68,2 % (Rogowska et al., 2019).

Para além desta bactéria, várias estirpes da bactéria *Lactobacillus* como a *L. rhamnosus*, *L. plantarum*, *L. acidophilus* e *L. pentosus* também podem ser utilizadas com o mesmo objetivo.

Estudos demonstraram que *L. rhamnosus*, *L. plantarum* e *L. pentosus* são capazes de ligar 80, 90 e 83,17 % da concentração de ZEA, respectivamente (Buszewska-Forajta, 2020; Rogowska et al., 2019).

Em relação ao processo de adsorção com auxílio a *Lactococcus lactis*, este divide-se em 2 fases. A fase inicial é rápida e neutraliza 90 % de ZEA em 20 minutos (Rogowska et al., 2019) e a segunda fase é mais lenta e baseia-se na difusão espontânea da ZEA na parede celular da bactéria (Buszewska-Forajta, 2020).

Król et al., (2018) verificaram que 88 % de ZEA ligava-se à bactéria *Bifidobacterium sp* (Rogowska et al., 2019).

Outras bactérias que se mostram promissoras são as estirpes de *Rhizopus*, *Pseudomonas spp*, *Bacillus cereus* e *Bacillus subtilis*. Wang et al., (2018c) mostraram que *Bacillus cereus* é capaz de realizar uma destoxificação eficaz da ZEA, *in vitro* e *in vivo*, eliminando 100 % de ZEA numa concentração de 100 mg/L em meio de cultura e 89,1% da mesma concentração de ZEA mas num meio que simula o fluído gástrico (Rogowska et al., 2019).

Outro tipo de microrganismo que pode ser utilizado na descontaminação dos alimentos são as leveduras, como *Saccharomyces cerevisiae* modificada que é capaz de ligar 80 % de ZEA às suas paredes celulares enquanto que a forma não modificada tem capacidade de adsorção inferior (Rogowska et al., 2019).

## **PARTE EXPERIMENTAL**

## I Justificação e Objetivo do estudo

A capacidade da ZEA provocar um vasto leque de efeitos adversos nos animais e humanos devido às suas propriedades tóxicas e a dificuldade na prevenção da sua produção ou da sua descontaminação contribuem para a gravidade do risco que a ZEA representa para a Saúde Pública e para a Segurança Alimentar.

A via principal de exposição de ZEA é através do consumo de cereais ou produtos derivados de cereais contaminados, ou através da ingestão de produtos de origem animal, como carne, ovos e leite, com origem em animais que consumiram alimentos contaminados por ZEA (Abdolmaleki *et al.*, 2021).

Pelo que antecede, pretendeu-se realizar um estudo de HBM que permite a avaliação de exposição à ZEA nas crianças, com os seguintes objetivos específicos:

- Determinar os níveis de ZEA em amostras de urina recolhidas, por imunoensaio enzimático ELISA,
- Avaliar o risco de exposição à ZEA por parte das crianças com idade entre os cinco e os 12 anos e
- Identificar os fatores antropométricos e socio-demográficos, características individuais e os hábitos alimentares determinantes para a exposição das crianças.



## **2 Materiais e Métodos**

Este estudo obteve a aprovação do Conselho Científico da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra e da Comissão de Ética e Bem-estar Animal da Escola Universitária Vasco da Gama (EUVG) (Parecer nº 2019/001) e respeitou o previsto na Declaração de Helsínquia (World Medical Association, 2013), na Convenção de Oviedo (1997), e a demais legislação nacional e europeia em vigor. Todos os participantes e respetivos tutores legais foram informados sobre o objetivo e metodologias do estudo e ainda sobre a garantia de confidencialidade ao abrigo da Lei 58/2019, de 8 de Agosto (consultar ANEXO I). Depois de informados, todos os tutores legais dos participantes assinaram um termo de consentimento escrito, formalizando a sua aceitação (consultar ANEXO I).

### **2.1 Amostragem**

No período decorrente entre 15 e 17 de Março de 2022, foram recolhidas 42 amostras de urina (por conveniência) de crianças entre os cinco e 12 anos de idade, residentes no distrito de Santarém, especificamente nas freguesias de Almeirim (n=32), Fazendas de Almeirim (n=2), Benfica do Ribatejo (n=2), Foros de Benfica (n=1), Alpiarça (n=2), Frade de Cima (n=1), Parreira (n=1) e Achete (n=1).

A recolha da amostra foi feita por micção voluntária da criança, de modo autónomo ou com assistência do tutor. Depois de recolhida a primeira urina da manhã, após descartar o primeiro jato, as amostras foram refrigeradas e protegidas da luz. Uma vez no laboratório, foram congeladas de imediato até à data de análise no laboratório de Toxicologia da EUVG, em Coimbra.

Foram considerados como critérios de exclusão, crianças não saudáveis com idade inferior a cinco anos e superior a 12 anos, ausência de assinatura do tutor na declaração de consentimento informado e ausência do preenchimento do questionário.

### **2.2 Dados sociodemográficos e hábitos alimentares**

As amostras foram recolhidas juntamente com um questionário (consultar ANEXO II). Este questionário é composto por três partes: I- Dados antropométricos e características individuais; II- Dados socio-demográficos e III- Dados relativos à alimentação



Os dados antropométricos considerados foram o gênero, a idade, o peso e a altura da criança, assim como se realizou alguma medicação na semana anterior à colheita e, nesse caso qual a medicação (consultar ANEXO II).

Os dados socio-demográficos considerados foram relativos ao nível educacional dos pais e ao local de residência da criança (consultar ANEXO II).

Adicionalmente, os tutores dos participantes preencheram um questionário semi-quantitativo de frequência alimentar relativo aos hábitos de consumo da criança nos sete dias anteriores à colheita da amostra (consultar ANEXO III). Os grupos de alimentos incluídos nesta parte do questionário foram os laticínios, o pão e os cereais, os ovos, carne e peixe, os vegetais, os doces e os frutos secos.

### **2.3 Determinação analítica de ZEA**

A determinação de ZEA em amostras de urina foi realizada pelo imunoenensaio enzimático ELISA de formato competitivo, de acordo com o livro de instruções do fabricante do kit comercial RIDASCREEN® Zearalenon (R-Biopharm, AG, Alemanha).

O kit disponibiliza a placa de microtitulação com os poços revestidos com anticorpos específicos para a ZEA, as soluções-padrão de ZEA de 0, 50, 150, 450, 1350 e 4050 ppt, o conjugado concentrado enzima peroxidase-ZEA, o substrato contendo peróxido de ureia, o cromogéneo contendo tetrametilbenzidina, a solução STOP com 1 N de ácido sulfúrico e a solução tampão para diluição da amostra e do conjugado. Foram seguidas todas as instruções do fabricante sobre o armazenamento de todos os componentes do kit.

Para além dos materiais e reagentes fornecidos pelo kit, foram ainda utilizadas pipetas de precisão (20, 100, 200 e 1000 µL), pipetas graduadas (10, 5 e 1 mL), água destilada, agitador vórtex (UniEquip, Munique, Alemanha), tubos de ensaio, estufas (Memmert®, Büchenbach, Alemanha) e leitor de microplacas de ELISA espectrofotométrico (Stat Fax 4200, Flórida, USA).

No dia da execução prática, as amostras foram descongeladas para proceder à sua preparação e os reagentes mantidos na temperatura ambiente (20-25 °C), antes de serem usados. Para isso 0,5 mL de amostra de urina foi diluída em 3 mL de solução tampão de acetato de 50 mM e pH 4,8. Em cada tubo de ensaio foi adicionado também 8 µL de solução de glucuronidase/arilsulfatase de *Helix pomatia* (Merck, Referência: 4114) e de seguida agitou-se e procedeu-se à incubação das soluções durante 3 h a 37 °C.

Após a incubação, o próximo passo foi a purificação da urina hidrolisada com recurso às colunas C18 da RIDA® (R-Biopharm AG®, Darmstadt, Alemanha) a um fluxo de 1 gota

por segundo. Neste sentido, lavou-se as colunas com 3 mL de metanol (100 %) e equilibrou-se com 2 mL 20 mM de solução tampão Tris pH 8,5/ metanol numa proporção de 80/20 (v/v). De seguida, verteu-se 3,5 mL de urina hidrolisada e lavou-se a coluna com 2 mL 20 mM de solução tampão Tris pH 8,5/metanol numa proporção 80/20 (v/v). Lavou-se as colunas com 3 mL de metanol (40 %) e secou-se com fluxo de azoto durante 1 minuto. Depois eluiu-se a amostra com 1 mL de metanol (80 %) lentamente (15 gotas por minuto) e sujeitou-se o eluato ao banho-maria a 60 °C de modo a evaporar. Por fim, redissolveu-se o resíduo seco em 50 µL de metanol e 450 µL de solução tampão para diluição da amostra, e agitou-se cuidadosamente.

Para o desenvolvimento do ensaio ELISA competitivo, foi utilizada uma placa com 96 micropoços para o número total de amostras e para o número de soluções-padrão, em duplicado (42 amostras x 2 + 6 soluções-padrão x 2 = 96 micropoços).

Nos respetivos micropoços foram adicionados 50 µL das soluções-padrão e das amostras previamente preparadas. De seguida, em todos os micropoços, foi adicionado 50 µL de conjugado de ZEA com a enzima peroxidase diluída e agitados manualmente, tendo sido, posteriormente, incubados durante 2 horas à temperatura ambiente (20-25 °C), sem exposição à luz.

Após o período de incubação, sucedeu-se o processo de lavagem com água destilada (250 µL), repetido três vezes, que permitiu remover de forma completa os reagentes em excesso. De seguida, em todos os micropoços adicionou-se 50 µL de substrato (que contém peróxido de ureia) e 50 µL de cromogénio (que contém tetrametilbenzidina), agitou-se manualmente e procedeu-se à incubação durante 30 minutos à temperatura ambiente (20-25 °C), sem exposição à luz direta. Após a ligação do cromogénio específico ao conjugado enzimático, observou-se a mudança de cor do cromogénio para a cor azul.

Por fim, para interromper a reação do substrato com a enzima, adicionou-se 100 µL de solução Stop que contém 1 N de ácido sulfúrico agitando manualmente, resultando na alteração da cor para amarelo. A seguir efetuou-se a medição de absorvância a 450 nm no leitor de microplacas de ELISA espectralfotométrico. O conjugado enzima-toxina-substrato-cromogénio ligado aos anticorpos de revestimento produz cor na solução, pelo que, quanto mais intensa for essa cor, maior a concentração do conjugado e menor a concentração de ZEA livre. Tal como refere o manual do kit, a absorção de luz é inversamente proporcional à concentração de ZEA livre nos micropoços, ou seja, quanto mais conjugado estiver presente (substância absorvente) e, em consequência, menor concentração de ZEA livre, maior será a intensidade de luz absorvida (absorvância).

Para a determinação da concentração de ZEA, foi aplicado o software RIDA®SOFT Win (Referência: Z9999).

## 2.4 Avaliação de risco

O Comitê Conjunto de Especialistas FAO/OMS em Aditivos Alimentares estabeleceu, em 2000, o valor para a ingestão diária máxima tolerável provisória (PMTDI) da ZEA de 0,5 µg/kg p.c. e o Painel Científico sobre os Contaminantes da Cadeia Alimentar da EFSA, estabeleceu, em 2011, o valor para a TDI da ZEA de 0,25 µg/kg p.c. (EFSA, 2011, 2016).

O painel CONTAM, a partir de um estudo com leitões fêmea, realizado por Döll *et al.* (2003), conclui que 10,4 µg/kg p.c./dia seria o valor de NOAEL para a ZEA (EFSA, 2016). O valor de TDI (0,25 µg/kg p.c.) deriva, então, do valor de NOAEL e do valor do fator de incerteza, 40 (4 para as diferenças inter-espécie do perfil toxicocinético e 10 para a variabilidade inter-humana) (EFSA, 2011). Este valor de TDI tem sido mantido porque o painel CONTAM não identificou novos estudos que indicassem que teores inferiores a 10,4 µg/kg p.c./dia provocassem efeitos adversos (EFSA, 2016).

A avaliação de exposição a ZEA foi realizada comparando o valor da PDI calculado e a respectiva TDI tabelada pela EFSA. A PDI foi calculada através da seguinte equação:

$$PDI (\mu\text{g}/\text{kg p.c./dia}) = \frac{C \times V}{W \times E}$$

Equação 1-Cálculo da ingestão diária provável

Sendo que C corresponde à média da concentração do biomarcador ZEA detetado na urina em µg/L, V representa o volume de urina excretado pelas crianças durante 24 horas em L, W expressa a média do peso corporal das crianças em estudo em kg e finalmente E corresponde à taxa de excreção associada à ZEA em percentagem (Carballo *et al.*, 2021).

O quociente de perigo (QP) que consiste na razão entre PDI e TDI permite caracterizar o risco. Assim se o QP for inferior a um, a exposição não representa uma preocupação para a Saúde Pública (Martins *et al.*, 2019).

## 2.5 Análise estatística

Os dados foram editados e categorizados no Microsoft® Excel (Microsoft Office Casa e Estudantes versão 2016) juntamente com a análise descritiva preliminar e a análise estatística foi realizada usando o Microsoft Excel e o Software estatístico R. Dado a distribuição não

normal dos dados, foi utilizado o teste não-paramétrico Wilcoxon que permite a comparação de duas amostras dependentes. O valor  $p$  do teste considerado foi  $p < 0,05$ .

### 3 Resultados e Discussão

#### 3.1 Teores de ZEA nas amostras de urina e determinantes de exposição

Durante a pesquisa pela literatura (consultar tabela 1), verificou-se a existência de apenas um estudo (Asci *et al.*, 2014) sobre a avaliação de exposição a ZEA utilizando o método imunoenzimático ELISA. No entanto, este estudo apenas considerou raparigas turcas, entre quatro e oito anos, com PTG (Grupo com telarca precoce) e ICPPG (Grupo com puberdade precoce idiopática central). Assim, o presente trabalho é o primeiro estudo que utiliza o método ELISA para avaliação de exposição a ZEA a crianças portuguesas entre os cinco e os 12 anos.

Os resultados da maioria dos estudos analisados neste trabalho foram obtidos por LC-MS/MS (consultar tabela 1 e 2) e, apesar de não ser o mais adequado, foram comparados com os resultados obtidos por ELISA no presente estudo porque são os dados disponíveis.

No presente estudo, foram analisadas 42 amostras de urina, 32 (76,19 %) das quais apresentaram teores de ZEA superiores ao LOD (50 ng/L), com concentração média de  $0,19 \pm 0,24$   $\mu\text{g/L}$  e valor máximo de  $1,28$   $\mu\text{g/L}$ .

A quantidade de estudos existentes na literatura relacionados com a exposição de ZEA apenas em crianças também é escassa. Em comparação com os estudos compilados na tabela 1, considerando rapazes e raparigas, a concentração média no presente trabalho ( $0,19 \pm 0,24$   $\mu\text{g/L}$ ) foi maior que a concentração média registada no Reino Unido (Gratz *et al.*, 2020) ( $0,09 \pm 0,11$   $\mu\text{g/L}$ ) e na Bélgica (Heyndrickx *et al.*, 2015), onde nem sequer foi detetada ZEA nas amostras (consultar tabela 1). No caso específico das raparigas verifica-se que a concentração média de amostras positivas no presente trabalho ( $0,18 \pm 0,11$   $\mu\text{g/L}$ ) encontra-se acima da concentração média registada na Turquia (Asci *et al.*, 2014) ( $0,08 \pm 0,06$   $\mu\text{g/L}$ ) e abaixo da concentração média registada na Nova Jérquia (Bandera *et al.*, 2011) ( $1,82 \pm 4,80$   $\mu\text{g/L}$ ).

Em comparação com os estudos realizados em adultos mencionados na tabela 2, verificou-se que a população do Haiti (Gerding *et al.*, 2015) ( $<0,15$   $\mu\text{g/L}$ ), da Suécia (Wallin *et al.*, 2015) ( $0,09 \pm 0,07$   $\mu\text{g/L}$ ), da Alemanha (Föllmann *et al.*, 2016) ( $0,03 \pm 0,02$   $\mu\text{g/L}$ ) e da Tunísia (Belhassen *et al.*, 2014) ( $<0,03$   $\mu\text{g/L}$ ), estiveram menos expostas a ZEA do que a população de crianças analisada neste estudo. Estes resultados podem ser explicados com o facto de os mais jovens consumirem maior volume de alimento por kg de peso corporal, em relação aos adultos, tal como a EFSA conclui (Mally, Solfrizzo e Degen, 2016). O contrário se verifica em relação à população de Espanha (Carballo *et al.*, 2021) ( $6,7 \pm 7$   $\mu\text{g/L}$ ), de Transquei – África do Sul (Shephard *et al.*, 2013) ( $0,20 \pm 0,46$   $\mu\text{g/L}$ ), da Áustria (Warth *et al.*, 2013) ( $0,39$   $\mu\text{g/L}$ ), da

Nigéria (Ezekiel *et al.*, 2014) ( $0,3 \pm SI \mu\text{g/L}$ ) (SI-sem informação) e de Portugal (Martins *et al.*, 2019) ( $1,30 \pm SI \mu\text{g/L}$ ).

O LOD do kit utilizado para a determinação de ZEA em urina é de 50 ng/L. Na literatura, os LODs descritos nos três estudos realizados anteriormente apenas em crianças (consultar tabela 1) são de 16 ng/L (Gratz *et al.*, 2020) e 50 ng/L (Asci *et al.*, 2014; Bandera *et al.*, 2011), pelo que o LOD referente a este estudo se assemelha ao estudo realizado na Turquia (Asci *et al.*, 2014) e em Nova Jérсия (Bandera *et al.*, 2011), mas é superior ao LOD descrito no estudo realizado no Reino Unido (Gratz *et al.*, 2020).

A concentração mais baixa registada neste estudo foi de  $0,06 \mu\text{g/L}$  que corresponde a duas amostras, sendo uma de uma criança residente no concelho da Chamusca e a outra do concelho de Almeirim. Os teores inferiores ao LOD (50 ng/L) correspondem a crianças residentes no concelho de Almeirim. Contudo, o concelho de Almeirim, correspondente à residência de 75% (n=24) dos participantes, inclui a criança a que corresponde o maior teor de ZEA ( $1,28 \mu\text{g/L}$ ).

Analisando o nível educacional, verificou-se que à medida que o nível educacional dos pais aumenta, o teor de ZEA também aumenta, ainda que não seja estatisticamente significativo (consultar tabela 5). Nenhum dos estudos realizados anteriormente discriminou o nível educacional dos pais.

O sexo feminino apresenta maior frequência de amostras com teor de ZEA detetável (37,5 %). Por outro lado, o sexo masculino regista um teor médio de ZEA superior ( $0,20 \pm 0,29 \mu\text{g/L}$ ) e maior valor máximo determinado ( $1,28 \mu\text{g/L}$ ). Contrariamente o sexo feminino apresenta o valor mínimo mais baixo ( $0,06 \mu\text{g/L}$ ) (consultar tabela 5). Dos quatro estudos realizados apenas em crianças, somente Gratz *et al.* (2020) relacionou os teores de ZEA com o género, no entanto não verificou diferença estatística entre raparigas e rapazes. Quanto aos estudos cuja população em estudo inclui crianças e adultos, apenas três dispõem dessa relação. Assim, (Föllmann *et al.*, 2016) descreve teores médios de ZEA superiores para o sexo masculino, à semelhança do presente estudo. Contrariamente, (Li *et al.*, 2018) e (Wallin *et al.*, 2015) descrevem valores superiores para o sexo feminino.

Em relação à idade das crianças, verificou-se que a concentração de ZEA diminui com o aumento da idade (consultar tabela 5).

O grupo cujas alturas variam entre 130 e 139 cm apresenta a concentração média mais elevada de ZEA ( $0,25 \pm 0,39 \mu\text{g/L}$ ) com um valor máximo de  $1,28 \mu\text{g/L}$ . Por outro lado, ao grupo de crianças com altura igual ou superior a 150 cm corresponde o teor médio mais baixo de ZEA ( $0,12 \pm 0,07 \mu\text{g/L}$ ) (consultar tabela 5).

No que diz respeito ao peso corporal, o maior teor médio ( $0,32 \pm 0,44 \mu\text{g/L}$ ) e o maior valor máximo ( $1,28 \mu\text{g/L}$ ) correspondem ao grupo cujo peso varia entre os 18 e 29 kg (consultar tabela 5). Verificou-se que o teor de ZEA diminui com o aumento do peso. Este resultado pode ser explicado pelo facto de as crianças consumirem maior volume de alimento por kg de peso corporal.

Aferiu-se que, quanto à origem dos produtos alimentares consumidos, o teor de ZEA aumenta com o aumento da percentagem de produtos caseiros ou de produtos locais consumidos e com a diminuição da percentagem de produtos comprados em superfícies comerciais consumidos (consultar tabela 5). Uma possível explicação pode ser que os operadores das empresas do setor alimentar e do setor dos alimentos para animais estão sensibilizados para a presença de micotoxinas pelo que devem cumprir a legislação em vigor e implementar medidas de prevenção e de controlo das micotoxinas (CE, 2006), ao contrário dos produtores de alimentos para consumo próprio.

À exceção do gelado, o presente estudo não verificou nenhuma correlação estatística significativa entre os teores urinários de ZEA e os determinantes de exposição estudados ( $p > 0,05$ ). Na literatura poucos são os estudos que investigam a presença de ZEA em gelados. Assim, Zhang *et al.* (2014) detetou ZEA numa amostra de goma Xantana ( $6 \pm 0,6 \text{ ng/g}$ ) que pode ser utilizada como aditivo para melhorar a consistência de gelados, lacticínios, entre outros. O cacau pode ser um ingrediente de gelado (Abreu *et al.*, 2020). NVWA (2011) detetou ZEA em duas amostras de cacau ( $n=33$ ) ( $62$  e  $90 \mu\text{g/kg}$ ) e Spanjer e Kaandorp (2013) também detetou ZEA numa única amostra de cacau ( $n=66$ ) ( $120 \mu\text{g/kg}$ ) (López *et al.*, 2016). Investigadores detetaram a presença de ZEA em amostra de farinha (teores entre 1 e  $24 \mu\text{g/kg}$ ) que é um ingrediente do gelado de massa de bolo (Sabillón e Bianchini, 2016). A ocorrência de ZEA nos gelados pode ter origem no leite utilizado, potencialmente contaminado. Flores-Flores *et al.* (2015) reuniu estudos sobre a ocorrência de ZEA em amostras de leite bovino na Hungria, Reino Unido, Egípto e China, reportando teores até  $12,5 \mu\text{g/kg}$ . Na China, Huang *et al.* (2014), quantificou teores de ZEA em leite bovino até  $20,5 \text{ ng/kg}$ .

Tabela 5-Teores de ZEA ( $\mu\text{g/L}$ ) na urina de acordo com algumas variáveis consideradas no questionário

Variáveis		Amostras positivas, n (%)	Média das concentrações $\pm$ Desvio padrão ( $\mu\text{g/L}$ )	Intervalo de concentrações [mín-máx] ( $\mu\text{g/L}$ )
Localidade	Almeirim	27 (84,38)	$0,15 \pm 0,13$	[0,06; 1,28]

	Alpiarça, Chamusca e Santarém	5 (15,63)	0,09±0,02	[0,06; 0,12]
Nível educacional do pai	Ensino primário	4 (12,5)	0,09±0,03	[0,08; 0,28]
	≤12º ano	21 (65,63)	0,14±0,11	[0,06; 1,28]
	Licenciatura, Mestrado ou Doutoramento	7 (21,88)	0,16±0,15	[0,07; 0,47]
Nível educacional da mãe	Ensino primário	1 (3,13)	0,28	[0,28]
	≤12º ano	14 (43,75)	0,16±0,14	[0,07; 0,47]
	Licenciatura, Mestrado ou Doutoramento	17 (53,13)	0,20±0,30	[0,06; 1,28]
Género	Masculino	20 (62,5)	0,20±0,29	[0,06; 1,28]
	Feminino	12 (37,5)	0,17±0,11	[0,07; 0,46]
Idade (anos)	5-8	8 (25)	0,29±0,42	[0,07; 1,28]
	9-10	15 (46,88)	0,16±0,15	[0,06; 0,55]
	11-12	9 (28,13)	0,14±0,08	[0,07; 0,27]
Altura (cm)	114-130	6 (18,75)	0,16±0,15	[0,075; 0,46]
	131-139	8 (25)	0,27±0,42	[0,06; 1,28]
	140-149	12 (37,5)	0,18±0,16	[0,06; 0,55]
	≥150	6 (18,75)	0,12±0,07	[0,08; 0,27]
Peso corporal (kg)	18-29	7 (21,88)	0,32±0,44	[0,66; 1,28]
	30-39	15 (46,88)	0,15±0,11	[0,66; 0,47]
	40-61	10 (31,25)	0,15±0,15	[0,06; 0,55]
Produtos caseiros/produtos local	0 %	4 (12,5)	0,09±0,03	[0,07; 0,12]
	<25 %	11 (34,38)	0,15±0,09	[0,06; 0,47]
	50 %	12 (37,5)	0,17±0,18	[0,07; 0,55]
	>75 %	5 (15,63)	0,36±0,52	[0,06; 1,28]
Produtos comprados em superfícies comerciais	<25 %	4 (12,5)	0,41±0,58	[0,06; 1,28]
	50 %	7 (21,88)	0,16±0,17	[0,08; 0,55]
	75 %	14 (43,75)	0,17±0,14	[0,06; 0,47]
	100 %	7 (21,88)	0,12±0,07	[0,07; 0,28]

Relativamente à curva padrão obtida pelo software RIDA®SOFT Win (Art. No. Z9999), verificou-se um valor médio do coeficiente de variação (CV) de 5,1%, sendo o valor



mais elevado de 14,7% indo ao encontro com os valores de referência de 20% estabelecidos para ensaio de ligação de ligantes que incluem a técnica de ELISA (FDA, 2018).

### **3.2 Ingestão diária provável e Avaliação de risco**

Por causa da ausência de consenso sobre a taxa de excreção de ZEA urinária em humanos (Mally, Solfrizzo e Degen, 2016), para avaliar o risco foram determinados diferentes cenários de exposição, considerando o teor mínimo, médio e máximo de ZEA detetada na urina e utilizando o peso corporal médio das crianças participantes para cada grupo etário (consultar tabela 6). Como mencionado anteriormente, o presente estudo obteve concentrações urinárias de ZEA maiores que as concentrações reportadas em dois estudos de HBM realizados em crianças (Gratz *et al.*, 2020; Heyndrickx *et al.*, 2015).

De acordo com a tabela 6, o pior cenário do grupo etário dos cinco aos oito anos apresenta valores superiores a um, representando um risco para a Saúde Pública, segundo (Martins *et al.*, 2019).

Assumindo o volume de urina excretado pelas crianças de 1,5 L, se 8,3 % da ZEA ingerida for absorvida como descrito por (Gerding *et al.*, 2015), o resultado de QP para as crianças entre cinco e oito anos, no pior cenário, é de 4,01. Por outro lado, para um volume de urina excretado de um L e taxa de excreção de 8,3%, o resultado de QP para as crianças de cinco a oito anos, no pior cenário, é de 2,6728.

Se considerarmos todos os grupos etários, os valores de QPs, no melhor cenário, estão compreendidos entre 0,01 e 0,22, independentemente da taxa de excreção. Assim, ainda que não representem um risco segundo a abordagem de QP (Martins *et al.*, 2019), o risco estimado deve ser visto como preocupante dado se tratar de um grupo vulnerável que são as crianças.

Tabela 6-Cálculo do melhor, pior e cenário médio para cada grupo etário, baseado no peso corporal médio de cada grupo

Volume de urina excretado pelas crianças (L)					1					1,5				
Taxa de excreção (%)					8,3	9,4	10	20	36,8	8,3	9,4	10	20	36,8
Idade	5-8 anos (23,08 kg)	Melhor cenário	Teor mín ZEA = 0,07 µg/L	PDI µg/kg p.c./dia	0,0365	0,0323	0,0303	0,0152	0,0082	0,0548	0,0484	0,0455	0,0227	0,0124
				QP	0,146	0,1292	0,1212	0,0608	0,0328	0,2192	0,1936	0,182	0,0908	0,0496
		Cenário médio	Teor médio ZEA = 0,29 µg/L	PDI µg/kg p.c./dia	0,1514	0,1337	0,1256	0,0628	0,0341	0,2271	0,2005	0,1885	0,0942	0,0512
				QP	0,6056	0,5348	0,5024	0,2512	0,1364	0,9084	0,802	0,754	0,3768	0,2048
		Pior cenário	Teor máx ZEA = 1,28 µg/L	PDI µg/kg p.c./dia	0,6682	0,5899	0,5546	0,2773	0,1507	1,0023	0,885	0,8319	0,4159	0,2261
				QP	2,6728	2,3597	2,2184	1,1092	0,6028	4,0092	3,54	3,3276	1,6636	0,9044
	9-10 anos (39,67 kg)	Melhor cenário	Teor mín ZEA = 0,06 µg/L	PDI µg/kg p.c./dia	0,0182	0,0161	0,0151	0,0076	0,0041	0,0273	0,0241	0,0227	0,0113	0,0062
				QP	0,0728	0,0644	0,0604	0,0304	0,0164	0,1092	0,0964	0,0908	0,0452	0,0248
		Cenário médio	Teor médio ZEA = 0,16 µg/L	PDI µg/kg p.c./dia	0,0486	0,0429	0,0403	0,0202	0,011	0,0729	0,0644	0,0605	0,0302	0,0164
				QP	0,1944	0,1716	0,1612	0,0808	0,0438	0,2916	0,2576	0,242	0,1208	0,0656
		Pior cenário	Teor máx ZEA = 0,55 µg/L	PDI µg/kg p.c./dia	0,167	0,1475	0,1386	0,0693	0,0377	0,2506	0,2212	0,208	0,104	0,0565
				QP	0,6682	0,59	0,5546	0,2773	0,1507	1,0022	0,885	0,8319	0,4159	0,226
	11-12 anos (37,55 kg)	Melhor cenário	Teor mín ZEA = 0,07 µg/L	PDI µg/kg p.c./dia	0,0225	0,0198	0,0186	0,0093	0,0051	0,0337	0,0297	0,028	0,014	0,0076
				QP	0,0898	0,0793	0,0744	0,0372	0,0203	0,1348	0,119	0,1119	0,0559	0,0304
		Cenário médio	Teor médio ZEA = 0,14 µg/L	PDI µg/kg p.c./dia	0,0449	0,0397	0,0373	0,0186	0,0101	0,0674	0,0595	0,0559	0,028	0,0152
				QP	0,1797	0,1587	0,1491	0,0746	0,0405	0,2695	0,238	0,2237	0,1119	0,0608
		Pior cenário	Teor máx ZEA = 0,27 µg/L	PDI µg/kg p.c./dia	0,0866	0,0765	0,0719	0,036	0,0195	0,1299	0,1147	0,1079	0,0539	0,0293
				QP	0,3465	0,306	0,2876	0,1438	0,0782	0,5198	0,459	0,4314	0,2157	0,1172

A tabela 7 reúne os valores de PDI referenciados na literatura, indicando também os valores considerados de volume de urina excretado por dia e a taxa de excreção correspondente. O valor de QP correspondente ao estudo de Ezekiel *et al.* (2014) é notavelmente superior a um pelo que, do ponto de vista europeu, o risco é elevado para a população deste estudo.

Tabela 7-Valores de PDI indicados na literatura

País	População em estudo	PDI (µg/kg p.c.)	QP	V urina (L/dia)	Taxa de excreção (%)	Referência
Nigéria	Crianças, jovens e adultos	11,8	47,2	1,5	9,4	(Ezekiel <i>et al.</i> , 2014)
China	Indivíduos 0-84 anos	0,024	0,096	1,5	36,8	(Li <i>et al.</i> , 2018)
Itália	Indivíduos 3-85 anos	0,015	0,06	1,5	36,8	(Solfrizzo, Gambacorta e Visconti, 2014)
Haiti	Adultos Haiti e Bangladesh	0,03	0,12	1,5	8,3	(Gerding <i>et al.</i> , 2015)
Áustria	1 homem com 27 anos	0,02	0,08	2,42	9,4	(Warth <i>et al.</i> , 2013)

A estimativa da exposição com base na ZEA excretada na urina apresenta incertezas no que diz respeito à escassez de dados sobre a taxa de excreção de ZEA urinária em humanos (Mally, Solfrizzo e Degen, 2016). As taxas de excreção dependem da forma como a ZEA e os seus metabolitos são excretados, na forma livre ou na forma conjugada, mas também depende da espécie, idade e sexo da população em estudo (Ali e Degen, 2018). Neste sentido, são necessários estudos adicionais quanto ao perfil toxicocinético da ZEA em humanos (Gambacorta *et al.*, 2013).

#### 4 Análise crítica

Dado que as crianças são um grupo vulnerável, de modo geral, a qualquer perigo alimentar porque o volume de alimento consumido por kg de peso corporal é superior ao dos adultos, o presente estudo é relevante para a Segurança Alimentar e Segurança dos Alimentos (Heyndrickx *et al.*, 2015). No entanto, a amostra populacional não é representativa deste grupo etário devido ao seu tamanho reduzido e à distribuição localizada da residência das crianças. Ainda assim, foi possível retirar algumas conclusões em relação aos outros fatores determinantes.

A realização de um estudo de HBM permitiu avaliar a exposição da população à ZEA, comparando a PDI com a TDI estabelecida pela EFSA, porém verificou-se algumas limitações. A utilização de taxas de excreção obtidas em estudos com poucos indivíduos ou em estudos decorrentes de experimentação animal está associada a uma considerável incerteza, pois não considera a possível influência da idade, género e dose de exposição, no entanto, estes são os dados disponíveis até ao momento. Assim, futuramente, um novo estudo deveria ser realizado quando estivessem disponíveis novos dados do perfil toxicocinético da ZEA. Adicionalmente, a utilização de um valor estimativo do volume de urina excretado contribui para a incerteza associada ao resultado de PDI, no entanto o facto de ter sido utilizado o peso corporal verdadeiro das crianças representa uma vantagem deste estudo (Martins *et al.*, 2019).

Outra perspetiva para um estudo futuro seria, no caso da ZEA que é considerada uma micotoxina com taxa de excreção rápida (Martins *et al.*, 2019), recolher mais que uma amostra de urina por participante para quantificar a exposição ao longo do tempo e avaliar a exposição individual de forma mais precisa (Heyndrickx *et al.*, 2015).

O imunoensaio ELISA é uma técnica muito robusta na deteção de ZEA, e a realização do passo de purificação da amostra aumentou a sensibilidade da técnica e permitiu a obtenção de frequências de deteção superiores. No entanto, é recomendado complementar esta técnica com LC para confirmar os resultados (Zhang *et al.*, 2018). A escassez de estudos que utilizam a ELISA para a determinação de ZEA tornou difícil a comparação dos resultados.

## 5 Conclusão

Existem vários estudos que reportam a ocorrência de ZEA na urina humana, no entanto a quantidade de estudos realizados em crianças é escassa, apesar da sua vulnerabilidade. O presente estudo é o primeiro estudo de HBM que avalia a exposição a ZEA nas crianças entre os cinco e os 12 anos através do imunoensaio enzimático ELISA.

De modo geral, foram analisadas 42 amostras de urina, 32 (76,19%) das quais continham a presença de ZEA. A concentração média de ZEA foi de  $0,19 \pm 0,24$   $\mu\text{g/L}$  e um valor máximo de  $1,28$   $\mu\text{g/L}$ . À exceção do gelado, não foi verificado nenhuma correlação estatística significativa entre os teores de ZEA e os dados antropométricos, sociodemográficos, características individuais e os hábitos de consumo considerados.

Os teores médios mais elevados de ZEA foram observados para o sexo masculino ( $0,20 \pm 0,29$   $\mu\text{g/L}$ ), para as crianças com altura entre os 130 e 139 cm ( $0,25 \pm 0,39$   $\mu\text{g/L}$ ), para as crianças com peso entre os 18 e 29 kg ( $0,32 \pm 0,44$   $\mu\text{g/L}$ ) e para as crianças cujos progenitores são licenciados, mestres ou doutores ( $0,16 \pm 0,15$   $\mu\text{g/L}$  no caso dos pais e  $0,20 \pm 0,30$   $\mu\text{g/L}$  no caso das mães).

Adicionalmente, foi possível verificar uma proporcionalidade direta entre o teor de ZEA e o nível educacional dos progenitores e a percentagem de vezes que produtos caseiros ou de produtores locais foram consumidos. O contrário foi verificado para a idade e o peso das crianças,

Devido à incerteza existente em relação ao perfil toxicocinético desta micotoxina em humanos, foram desenhados vários cenários considerando os diferentes volumes de urina e as taxas de excreção referidos na literatura. Dependendo do cenário, o quociente de perigo variou entre 0,01 e 4,01 apontando a ZEA como uma preocupação para a Saúde Pública e alertando para a necessidade de estimativas das taxas de excreção de ZEA mais robustas.

A utilização da urina como amostra de biomonitorização facilita a participação das crianças no estudo porque é uma amostra não invasiva.

A exposição humana e animal às micotoxinas é um dos principais problemas de Saúde de origem alimentar, nomeadamente a ZEA que provoca diversas doenças. O controlo e monitorização de micotoxinas são ferramentas importantes na avaliação da exposição de humanos e animais, identificando grupos vulneráveis e possível fontes de exposição e reforçando a Segurança dos Alimentos e a Segurança Alimentar (Abrunhosa *et al.*, 2016).

## Referências bibliográficas

- ABDOLMALEKI, Khadije *et al.* - The mycotoxins in edible oils: An overview of prevalence, concentration, toxicity, detection and decontamination techniques. **Trends in Food Science and Technology**. . ISSN 09242244. 115:December 2020 (2021) 500–511. doi: 10.1016/j.tifs.2021.06.057.
- ABREU, Daiane Cássia Pereira *et al.* - Methodology development based on “dilute and shoot” and QuEChERS for determination of multiple mycotoxins in cocoa by LC-MS/MS. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**. . ISSN 16182650. 412:8 (2020) 1757–1767. doi: 10.1007/s00216-020-02390-5.
- ABRUNHOSA, Luís *et al.* - A Review of Mycotoxins in Food and Feed Products in Portugal and Estimation of Probable Daily Intakes. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**. . ISSN 15497852. 56:2 (2016) 249–265. doi: 10.1080/10408398.2012.720619.
- ADAMCHICK, Julie; PEREZ, Andres M. - Choosing awareness over fear: Risk analysis and free trade support global food security. **Global Food Security**. . ISSN 22119124. 26:April (2020) 100445. doi: 10.1016/j.gfs.2020.100445.
- AG, R-Biopharm - RIDA ® C18 column C18 columns for solid phase extraction Art. No.: R2002. 49:0 ([s.d.]).
- AL-JAAL, Belqes Ahmad *et al.* - Aflatoxin, fumonisin, ochratoxin, zearalenone and deoxynivalenol biomarkers in human biological fluids: A systematic literature review, 2001–2018. **Food and Chemical Toxicology**. . ISSN 18736351. 129:January (2019) 211–228. doi: 10.1016/j.fct.2019.04.047.
- ALI, Nurshad; DEGEN, Gisela H. - Urinary biomarkers of exposure to the mycoestrogen zearalenone and its modified forms in German adults. **Archives of Toxicology**. . ISSN 14320738. 92:8 (2018) 2691–2700. doi: 10.1007/s00204-018-2261-5.
- ALSHANNAQ, Ahmad; YU, Jae Hyuk - Occurrence, toxicity, and analysis of major mycotoxins in food. **International Journal of Environmental Research and Public Health**. . ISSN 16604601. 14:6 (2017). doi: 10.3390/ijerph14060632.
- ANFOSSI, Laura; GIOVANNOLI, Cristina; BAGGIANI, Claudio - Mycotoxin detection. **Current Opinion in Biotechnology**. . ISSN 18790429. 37:2016) 120–126. doi: 10.1016/j.copbio.2015.11.005.
- ASCI, A. *et al.* - Urinary zearalenone levels in girls with premature thelarche and idiopathic central precocious puberty. **Minerva Pediatrica**. . ISSN 00264946. 66:6 (2014) 571–578.
- BANDERA, Elisa V. *et al.* - Urinary mycoestrogens, body size and breast development in New

Jersey girls. **Science of the Total Environment**. . ISSN 00489697. 409:24 (2011) 5221–5227. doi: 10.1016/j.scitotenv.2011.09.029.

BAPTISTA, Paulo; VENÂNCIO, Armando - **Os perigos para a segurança alimentar no processamento de alimentos**. ISBN 9729909938.

BARLOW, S. M. - Risk Assessment of Foods and Chemicals in Foods. Em **Encyclopedia of Food and Health** [Em linha]. 1. ed. [S.l.] : Elsevier Ltd., 2016 Disponível em WWW:<URL:http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-384947-2.00597-3>. ISBN 9780123849533. p. 653–658.

BELHASSEN, H. *et al.* - Validation of a UHPLC-MS/MS method for quantification of zearalenone,  $\alpha$ -zearalenol,  $\beta$ -zearalenol,  $\alpha$ -zearalanol,  $\beta$ -zearalanol and zearalanone in human urine. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**. . ISSN 1873376X. 962:2014) 68–74. doi: 10.1016/j.jchromb.2014.05.019.

BENKERROUM, Noredine - Retrospective and prospective look at aflatoxin research and development from a practical standpoint. **International Journal of Environmental Research and Public Health**. . ISSN 16604601. 16:19 (2019). doi: 10.3390/ijerph16193633.

BERGLUND, Marika; ELINDER, Carl-Gustaf; JARUP, Lars - **Human Exposure Assessment: An Introduction** [Em linha] Disponível em WWW:<URL:https://apps.who.int/iris/handle/10665/70570>.

BRAUN, Dominik *et al.* - Mycotoxin-mixture assessment in mother-infant pairs in Nigeria: From mothers' meal to infants' urine. **Chemosphere**. . ISSN 18791298. 287:September 2021 (2022). doi: 10.1016/j.chemosphere.2021.132226.

BULGARU, Cristina Valeria *et al.* - Zearalenone and the Immune Response. **Toxins**. . ISSN 20726651. 13:4 (2021) 1–20. doi: 10.3390/toxins13040248.

BUSZEWSKA-FORAJTA, Magdalena - Mycotoxins, invisible danger of feedstuff with toxic effect on animals. **Toxicon**. . ISSN 18793150. 182:January (2020) 34–53. doi: 10.1016/j.toxicon.2020.04.101.

CAC, Codex Alimentarius Commission; FAO, Food And Agriculture Organization Of The United Nations; WHO, World Health Organization - **General Principles of Food Hygiene CXC 1-1969** [Em linha] Disponível em WWW:<URL:http://repositorio.unan.edu.ni/2986/1/5624.pdf>. ISBN 9789586991285.

CARBALLO, Dionisia *et al.* - Assessment of human exposure to deoxynivalenol, ochratoxin A, zearalenone and their metabolites biomarker in urine samples using LC-ESI-qTOF. **Toxins**. . ISSN 20726651. 13:8 (2021) 1–10. doi: 10.3390/toxins13080530.

CASALS-CASAS, Cristina; DESVERGNE, Béatrice - Endocrine disruptors: From endocrine to

metabolic disruption. **Annual Review of Physiology**. . ISSN 00664278. 73:2011) 135–162. doi: 10.1146/annurev-physiol-012110-142200.

CE, Comissão Europeia - **Livro Branco sobre a Segurança dos Alimentos** [Em linha] Disponível em WWW:<URL:https://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/PDF/?uri=CELEX:51999DC0719&from=ES>.

CE, Comissão Europeia - REGULAMENTO (CE) N.º 178/2002 DO PARLAMENTO EUROPEU E DO CONSELHO de 28 de Janeiro de 2002 que determina os princípios e normas gerais da legislação alimentar, cria a Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos e estabelece procedimentos em matéria. **Jornal Oficial das Comunidades Europeias**. 31:2002) 1–24.

CE, Comissão Europeia - Regulamento (CE) n.º 1881/2006 da Comissão de 19 de Dezembro de 2006 que fixa os valores máximos de certos contaminantes presentes em géneros alimentícios. **Jornal Oficial da União Europeia**. 2006:8 (2006) L 364/5-L 364/24.

CE, Comissão Europeia - RECOMENDAÇÃO DA COMISSÃO de 17 de Agosto de 2006 relativa à prevenção e à redução de toxinas Fusarium em cereais e produtos à base de cereais. **Jornal Oficial das Comunidades Europeias**. 2006:2007) 35–40.

CE, Comissão Europeia - Pacto Ecológico Europeu. **Comissão Europeia**. 2019) 1–27.

CERVELLIN, Gianfranco; LONGOBARDI, Ugo; LIPPI, Giuseppe - One holy man, one eponym, three distinct diseases. St. Anthony's fire revisited. **Acta Biomedica**. . ISSN 25316745. 92:1 (2021) 1–8. doi: 10.23750/abm.v92i1.9015.

CHEN, Mei-Fang - Consumer trust in food safety - A multidisciplinary approach and empirical evidence from Taiwan. **Risk Analysis**. . ISSN 02724332. 28:6 (2008) 1553–1569. doi: 10.1111/j.1539-6924.2008.01115.x.

CHOI, Judy *et al.* - Identification of exposure to environmental chemicals in children and older adults using human biomonitoring data sorted by age: Results from a literature review. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**. . ISSN 1618131X. 220:2 (2017) 282–298. doi: 10.1016/j.ijheh.2016.12.006.

CONNOLLY, L.; ROPSTAD, E.; VERHAEGEN, S. - In vitro bioassays for the study of endocrine-disrupting food additives and contaminants. **Trends in Analytical Chemistry**. . ISSN 01659936. 30:2 (2011) 227–238. doi: 10.1016/j.trac.2010.10.009.

DAOU, Rouaa *et al.* - Mycotoxins: Factors influencing production and control strategies. **AIMS Agriculture and Food**. . ISSN 24712086. 6:1 (2021) 416–447. doi: 10.3934/AGRFOOD.2021025.

DUARTE, Sofia Cancela; PENA, Angelina; LINO, Celeste Matos - Human ochratoxin A



biomarkers-from exposure to effect. **Critical Reviews in Toxicology**. . ISSN 10408444. 41:3 (2011) 187–212. doi: 10.3109/10408444.2010.529103.

EC, European Commission - REGULAMENTO (CEE) N° 315/1993 DO CONSELHO de 8 de Fevereiro de 1993 que estabelece procedimentos comunitários para os contaminantes presentes nos géneros alimentícios. **Jornal Oficial das Comunidades Europeias**. 2 (1993) 3.

EC, European Commission - REGULATION ( EU ) No 278 / 2012 of 28 March 2012 amending Regulation ( EC ) No 152 / 2009 as regards the determination of the levels of dioxins and polychlorinated biphenyls Having regard to the Treaty on. **official Journal of the European Union**. 278 (2012) 8–22.

EC, European Commission - **The Rapid Alert System for Food and Feed (RASFF) Annual Report 2017**. ISBN 978-92-79-80317-8 ISSN.

EC, European Commission - The Rapid Alert System for Food and Feed (RASFF) Annual Report 2018. **Luxembourg: Publications Office of the European Union 2019**. 2018) 49.

EC, European Commission - **The Rapid Alert System for Food and Feed (RASFF) Annual Report 2019** [Em linha] Disponível em WWW:<URL:http://www.ssrn.com/abstract=1152122>. ISBN 9789279054778.

EC, European Commission - Farm to Fork Strategy. For a Fair, Healthy and Environmentally-Friendly Food System. **DG SANTE/Unit 'Food information and composition, food waste'**. 2020) 23.

EC, European Commission - **The Rapid Alert System for Food and Feed (RASFF) Annual Report 2020** [Em linha] Disponível em WWW:<URL:http://www.ssrn.com/abstract=1152122>. ISBN 978-92-76-34377-6.

EC, European Commission - The Rapid Alert System for Food and Feed (RASFF) Annual Report 2021. **Luxembourg: Publications Office of the European Union 2022**. 2021). doi: 10.2875/328358.

EFSA CONTAM PANEL (EFSA PANEL ON CONTAMINANTS IN THE FOOD CHAIN), Helle Katrine *et al.* - Risks for animal health related to the presence of zearalenone and its modified forms in feed. **EFSA Journal**. . ISSN 18314732. 15:7 (2017). doi: 10.2903/j.efsa.2017.4851.

EFSA, European Food Safety Authority - Scientific Opinion on the risks for public health related to the presence of zearalenone in food. **EFSA Journal**. . ISSN 18314732. 9:6 (2011) 1–124. doi: 10.2903/j.efsa.2011.2197.

EFSA, European Food Safety Authority - Risk assessment of contaminants in food and feed. **EFSA Journal**. . ISSN 18314732. 10:10 (2012) 1–12. doi: 10.2903/j.efsa.2012.s1004.

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

EFSA, European Food Safety Authority - The European Union One Health 2020 Zoonoses Report. **EFSA Journal**. . ISSN 18314732. 19:12 (2021) 324. doi: 10.2903/j.efsa.2021.6971.

EFSA, Panel On Contaminants In The Food Chain (CONTAM) - Scientific Opinion on Ergot alkaloids in food and feed. **EFSA Journal**. 10:7 (2012). doi: 10.2903/j.efsa.2012.2798.

EUROPEAN COURT OF AUDITORS - Chemical hazards in our food: EU food safety policy protects us but faces challenges. 287:02 (2019).

EZEKIEL, Chibundu N. *et al.* - Mycotoxin exposure in rural residents in northern Nigeria: A pilot study using multi-urinary biomarkers. **Environment International**. . ISSN 18736750. 66:2014) 138–145. doi: 10.1016/j.envint.2014.02.003.

FAO *et al.* - **The State of Food Security and Nutrition in the World 2022. Repurposing food and agricultural policies to make healthy diets more affordable** [Em linha]. FAO, IFAD, UNICEF, WFP and WHO. 2022. The State of Food Security and Nutrition in the World 2022. Repurposing food and agricultural policies to make healthy diets more affordable. Rome, FAO. : [s.n.] Disponível em WWW:<URL:https://doi.org/10.4060/cc0639en>. ISBN 9789251364994.

FAO, Food And Agriculture Organization Of The United Nations; WHO, World Health Organization - Hazard Characterization for Pathogens in Food and Water: Guidelines. Em **Microbiological Risk Assessment series, no. 3** [Em linha] Disponível em WWW:<URL:http://www.who.int/foodsafety/publications/micro/pathogen/en/%5Cnhttp://www.who.int/entity/foodsafety/publications/micro/en/pathogen.pdf?ua=1>.

FAO, Food And Agriculture Organization Of The United Nations; WHO, World Health Organization - **Codex Alimentarius Commission - Procedural manual twenty-seventh edition**. ISBN 9780128126882.

FAO, Organização Das Nações Unidas Para Alimentação E Agricultura - Declaração de Roma Sobre a Segurança Alimentar Mundial e Plano de Acção da Cimeira Mundial da Alimentação. Em [Em linha] [Consult. 28 fev. 2022]. Disponível em WWW:<URL:https://www.fao.org/3/w3613p/w3613p00.htm>.

FAROKHZADIAN, DEGHAN NAYERI, Borhani .. - **Requirements on Clinical Risk Management Systems in Hospitals**

FDA, Food And Drug Administration - Bionalytical Method Validation: Guidance for Industry. **Biopharmaceutics**. 2018) 138–159. doi: 10.1201/9780203026427-15.

FDA, Food And Drug Administration - **Physical Hazards | FDA** [Em linha], atual. 2022. [Consult. 5 set. 2022]. Disponível em WWW:<URL:https://www.fda.gov/animal-veterinary/biological-chemical-and-physical-contaminants-animal-food/physical-hazards>.

FLORES-FLORES, Myra Evelyn *et al.* - Presence of mycotoxins in animal milk: A review. **Food Control**. . ISSN 09567135. 53:2015) 163–176. doi: 10.1016/j.foodcont.2015.01.020.

FÖLLMANN, Wolfram *et al.* - Biomonitoring of Mycotoxins in Urine: Pilot Study in Mill Workers. **Journal of Toxicology and Environmental Health - Part A: Current Issues**. . ISSN 10872620. 79:22–23 (2016) 1015–1025. doi: 10.1080/15287394.2016.1219540.

GAMBACORTA, S. *et al.* - Validation study on urinary biomarkers of exposure for aflatoxin B1, ochratoxin A, fumonisin B1, deoxynivalenol and zearalenone in piglets. **World Mycotoxin Journal**. . ISSN 18750796. 6:3 (2013) 299–308. doi: 10.3920/WMJ2013.1549.

GERDING, Johannes *et al.* - A comparative study of the human urinary mycotoxin excretion patterns in Bangladesh, Germany, and Haiti using a rapid and sensitive LC-MS/MS approach. **Mycotoxin Research**. . ISSN 18671632. 31:3 (2015) 127–136. doi: 10.1007/s12550-015-0223-9.

GORE, A. C. *et al.* - EDC-2: The Endocrine Society's Second Scientific Statement on Endocrine-Disrupting Chemicals. **Endocrine Reviews**. . ISSN 0163769X. 36:6 (2015) 1–150. doi: 10.1210/er.2015-1010.

GRATZ, Silvia W. *et al.* - Multimycotoxin Exposure Assessment in UK Children Using Urinary Biomarkers - A Pilot Survey. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. . ISSN 15205118. 68:1 (2020) 351–357. doi: 10.1021/acs.jafc.9b03964.

GREET, Schoeters; ROSA, Lange - **Scoping documents for 2021 for the first and second second round HBM4EU priority substances Deliverable Report D4.9 WP4- Prioritisation and input to the Annual Work Plan Work Package Leader**

GROMADZKA, K. *et al.* - Zearalenone and its metabolites: occurrence, detection, toxicity and guidelines. **World Mycotoxin Journal**. . ISSN 1875-0710. 1:2 (2008) 209–220. doi: 10.3920/wmj2008.x015.

GRUBER-DORNINGER, Christiane; JENKINS, Timothy; SCHATZMAYR, Gerd - Global mycotoxin occurrence in feed: A ten-year survey. **Toxins**. . ISSN 20726651. 11:7 (2019). doi: 10.3390/toxins11070375.

GRZYBOWSKI, Andrzej; PAWLIKOWSKA-ŁAGÓD, Katarzyna; POLAK, Agnieszka - Ergotism and Saint Anthony's fire. **Clinics in Dermatology**. . ISSN 18791131. 39:6 (2021)

- 1088–1094. doi: 10.1016/j.clindermatol.2021.07.009.
- GUARNOTTA, Valentina *et al.* - Impact of Chemical Endocrine Disruptors and Hormone Modulators on the Endocrine System. **International Journal of Molecular Sciences**. . ISSN 14220067. 23:10 (2022). doi: 10.3390/ijms23105710.
- HABSCHIED, K. *et al.* - Distribution of zearalenone in malted barley fractions dependent on *Fusarium graminearum* growing conditions. **Food Chemistry**. . ISSN 03088146. 129:2 (2011) 329–332. doi: 10.1016/j.foodchem.2011.04.064.
- HEYNDRICKX, Ellen *et al.* - Human biomonitoring of multiple mycotoxins in the Belgian population: Results of the BIOMYCO study. **Environment International**. . ISSN 18736750. 84:2015) 82–89. doi: 10.1016/j.envint.2015.06.011.
- HUANG, L. C. *et al.* - Simultaneous determination of aflatoxin M1, ochratoxin A, zearalenone and  $\alpha$ -zearalenol in milk by UHPLC-MS/MS. **Food Chemistry**. . ISSN 03088146. 146:2014) 242–249. doi: 10.1016/j.foodchem.2013.09.047.
- IQBAL, Shahzad Z. - Mycotoxins in food, recent development in food analysis and future challenges; a review. **Current Opinion in Food Science**. . ISSN 22147993. 42:2021) 237–247. doi: 10.1016/j.cofs.2021.07.003.
- ISO, International Organization For Standardization - **ISO 31000:2018(en), Risk management — Guidelines** [Em linha], atual. 2018. [Consult. 4 set. 2022]. Disponível em WWW:<URL:https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso:31000:ed-2:vl:en>.
- JENKINS, Sarah C.; HARRIS, Adam J. L.; OSMAN, Magda - What drives risk perceptions? Revisiting public perceptions of food hazards associated with production and consumption. **Journal of Risk Research**. . ISSN 14664461. 24:11 (2021) 1450–1464. doi: 10.1080/13669877.2020.1871057.
- KABIR, Eva Rahman; RAHMAN, Monica Sharfin; RAHMAN, Imon - A review on endocrine disruptors and their possible impacts on human health. **Environmental Toxicology and Pharmacology**. . ISSN 18727077. 40:1 (2015) 241–258. doi: 10.1016/j.etap.2015.06.009.
- KAHN, Linda G. *et al.* - Endocrine-disrupting chemicals: implications for human health. **The Lancet Diabetes and Endocrinology**. . ISSN 22138595. 8:8 (2020) 703–718. doi: 10.1016/S2213-8587(20)30129-7.
- KOS, Jovana *et al.* - Comparison of ELISA, HPLC-FLD and HPLC-MS/MS methods for determination of aflatoxin M1 in natural contaminated milk samples. **Acta Chimica Slovenica**. . ISSN 15803155. 63:4 (2016) 747–756. doi: 10.17344/acsi.2016.2451.
- LI, Chenglong *et al.* - High-throughput and sensitive determination of urinary zearalenone and metabolites by UPLC-MS/MS and its application to a human exposure study. **Analytical and**

**Bioanalytical Chemistry**. . ISSN 16182650. 410:21 (2018) 5301–5312. doi: 10.1007/s00216-018-1186-4.

LI, Yong Fang *et al.* - Immunochemical techniques for multianalyte analysis of chemical residues in food and the environment: A review. **Trends in Analytical Chemistry**. . ISSN 18793142. 88:2017) 25–40. doi: 10.1016/j.trac.2016.12.010.

LIAO, Chuanhui; LUO, Yu; ZHU, Weiwei - Food safety trust, risk perception, and consumers' response to company trust repair actions in food recall crises. **International Journal of Environmental Research and Public Health**. . ISSN 16604601. 17:4 (2020). doi: 10.3390/ijerph17041270.

LIU, Jundi; APPLGATE, Todd - Zearalenone (ZEN) in Livestock and Poultry: Dose, Toxicokinetics, Toxicity and Estrogenicity. **Toxins**. 12:6 (2020) 377.

LOGRIECO, Antonio F. *et al.* - The mycotox charter: Increasing awareness of, and concerted action for, minimizing mycotoxin exposure worldwide. **Toxins**. . ISSN 20726651. 10:4 (2018). doi: 10.3390/toxins10040149.

LÓPEZ, P. *et al.* - A mycotoxin-dedicated total diet study in the Netherlands in 2013: Part II-occurrence. **World Mycotoxin Journal**. . ISSN 18750796. 9:1 (2016) 89–108. doi: 10.3920/WMJ2015.1906.

LORENZ, Nicole *et al.* - A critical evaluation of health risk assessment of modified mycotoxins with a special focus on zearalenone. **Mycotoxin Research**. . ISSN 18671632. 35:1 (2019) 27–46. doi: 10.1007/s12550-018-0328-z.

LOURO, Henriqueta *et al.* - Human biomonitoring in health risk assessment in Europe: Current practices and recommendations for the future. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**. . ISSN 1618131X. 222:5 (2019) 727–737. doi: 10.1016/j.ijheh.2019.05.009.

LU, Qian *et al.* - Modified mycotoxins in foodstuffs, animal feed, and herbal medicine: A systematic review on global occurrence, transformation mechanism and analysis methods. **Trends in Analytical Chemistry**. . ISSN 18793142. 133:2020) 116088. doi: 10.1016/j.trac.2020.116088.

MACHADO NARDI, Vinicius Antonio *et al.* - A meta-analytic review of food safety risk perception. **Food Control**. . ISSN 09567135. 112:September 2019 (2020) 107089. doi: 10.1016/j.foodcont.2020.107089.

MAHATO, Dipendra Kumar *et al.* - Occurrence, impact on agriculture, human health, and management strategies of zearalenone in food and feed: A review. **Toxins**. . ISSN 20726651. 13:2 (2021) 1–24. doi: 10.3390/toxins13020092.

- MALLY, Angela; SOLFRIZZO, Michele; DEGEN, Gisela H. - Biomonitoring of the mycotoxin Zearalenone: current state-of-the art and application to human exposure assessment. **Archives of Toxicology**. . ISSN 14320738. 90:6 (2016) 1281–1292. doi: 10.1007/s00204-016-1704-0.
- MARTINS, C. *et al.* - Exposure assessment of Portuguese population to multiple mycotoxins: The human biomonitoring approach. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**. . ISSN 1618131X. 222:6 (2019) 913–925. doi: 10.1016/j.ijheh.2019.06.010.
- MARTINS, Carla *et al.* - Exposição da população Portuguesa a micotoxinas : o contributo da biomonitorização humana. **Observações\_Boletim Epidemiológico**. Special Issue 11 (2019) 33–38.
- MARTINS, M. Lígia; MARTINS, H. Marina - Influence of water activity, temperature and incubation time on the simultaneous production of deoxynivalenol and zearalenone in corn (*Zea mays*) by *Fusarium graminearum*. **Food Chemistry**. . ISSN 03088146. 79:3 (2002) 315–318. doi: 10.1016/S0308-8146(02)00147-4.
- MASSART, F.; SAGGESE, G. - Oestrogenic mycotoxin exposures and precocious pubertal development. **International Journal of Andrology**. . ISSN 01056263. 33:2 (2010) 369–376. doi: 10.1111/j.1365-2605.2009.01009.x.
- MENEELY, Julie P. *et al.* - Current methods of analysis for the determination of trichothecene mycotoxins in food. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**. . ISSN 01659936. 30:2 (2011) 192–203. doi: 10.1016/j.trac.2010.06.012.
- MORGAVI, D. P.; RILEY, R. T. - An historical overview of field disease outbreaks known or suspected to be caused by consumption of feeds contaminated with *Fusarium* toxins. **Animal Feed Science and Technology**. . ISSN 03778401. 137:3–4 (2007) 201–212. doi: 10.1016/j.anifeedsci.2007.06.002.
- MOTTA, Thiago Pereira; DUARTE, Kelia Maria Roncato - ELISA na detecção de aflatoxinas em alimentos. **PUBVET, Londrina**. 4:42 (2010).
- NAN, Mina; XUE, Huali; BI, Yang - Contamination, Detection and Control of Mycotoxins in Fruits and Vegetables. **Toxins**. 2022) 1–30.
- NETO, António - **Avaliação de perigos físicos numa em-presa do ramo alimentar**
- NJUMBE EDIAGE, Emmanuel *et al.* - Multimycotoxin analysis in urines to assess infant exposure: A case study in Cameroon. **Environment International**. . ISSN 18736750. 57–58:2013) 50–59. doi: 10.1016/j.envint.2013.04.002.
- NOLAN, Philana *et al.* - Current trends in rapid tests for mycotoxins. **Food Additives and**

**Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment.** . ISSN 19440057. 36:5 (2019) 800–814. doi: 10.1080/19440049.2019.1595171.

OCHOA, Ricardo - **Design of Studies and Risk Management in Toxicologic Pathology: Addressing Risks in Product Discovery and Development** [Em linha]. [S.l.] : Elsevier Inc., 2018 Disponível em WWW:<URL:http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-809841-7.00007-1>. ISBN 9780128098424.

PAEK, Hye-Jin; HOVE, Thomas - Risk perceptions and risk characteristics risk and risk perception: Definitions and dimensions. **Oxford Research Encyclopedia of Communication.** March (2017) 1–15.

PASCARELLA, Giacomo *et al.* - Risk analysis in healthcare organizations: Methodological framework and critical variables. **Risk Management and Healthcare Policy.** . ISSN 11791594. 14:2021) 2897–2911. doi: 10.2147/RMHP.S309098.

PAVLOVIĆ, Nikola M. - Balkan endemic nephropathy - Current status and future perspectives. **Clinical Kidney Journal.** . ISSN 20488505. 6:3 (2013) 257–265. doi: 10.1093/ckj/sft049.

PENA, Angelina *et al.* - Human biomonitoring of selected hazardous compounds in Portugal: Part II—lessons learned on mycotoxins. **Molecules.** . ISSN 14203049. 27:1 (2022) 1–13. doi: 10.3390/molecules27010130.

PERAICA, Maja; RAŠIĆ, Dubravka - The impact of mycotoxicoses on human history. **Arh Hig Rada Toksikol.** . ISSN 00041254. 63:4 (2012) 513–518. doi: 10.2478/10004-1254-63-2012-2259.

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

PETTOELLO-MANTOVANI, Massimo *et al.* - Ensuring Safe Food for Infants: The Importance of an Integrated Approach to Monitor and Reduce the Risks of Biological, Chemical, and Physical Hazards. **Journal of Pediatrics.** . ISSN 10976833. 229:2021) 315-316.e2. doi: 10.1016/j.jpeds.2020.10.074.

PFEIFFER, Erika *et al.* - Glucuronidation of zearalenone, zearanol and four metabolites in vitro: Formation of glucuronides by various microsomes and human udp-glucuronosyltransferase isoforms. **Molecular Nutrition and Food Research.** . ISSN 16134133. 54:10 (2010) 1468–1476. doi: 10.1002/mnfr.200900524.

PITT, John I.; DAVID MILLER, J. - A Concise History of Mycotoxin Research. **Journal of Agricultural and Food Chemistry.** . ISSN 15205118. 65:33 (2017) 7021–7033. doi: 10.1021/acs.jafc.6b04494.

RAI, Ankita; DAS, Mukul; TRIPATHI, Anurag - Occurrence and toxicity of a fusarium mycotoxin, zearalenone. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**. . ISSN 15497852. 60:16 (2020) 2710–2729. doi: 10.1080/10408398.2019.1655388.

ROGOWSKA, A. *et al.* - Zearalenone and its metabolites: Effect on human health, metabolism and neutralisation methods. **Toxicon**. . ISSN 18793150. 162:February (2019) 46–56. doi: 10.1016/j.toxicon.2019.03.004.

ROMA, Júlio César - Os objetivos de desenvolvimento do milênio e sua transição para os objetivos de desenvolvimento sustentável. **Ciência e Cultura**. . ISSN 0009-6725. 71:1 (2019) 33–39. doi: 10.21800/2317-66602019000100011.

ROPEJKO, Karolina; TWARUŻEK, Magdalena - Zearalenone and Its Metabolites-General Overview, Occurrence, and Toxicity. **Toxins**. . ISSN 20726651. 13:1 (2021). doi: 10.3390/toxins13010035.

RUBERT, Josep *et al.* - Rapid mycotoxin analysis in human urine: A pilot study. **Food and Chemical Toxicology**. . ISSN 02786915. 49:9 (2011) 2299–2304. doi: 10.1016/j.fct.2011.06.030.

SABILLÓN, Luis; BIANCHINI, Andréia - From field to table: A review on the microbiological quality and safety of wheat-based products. **Cereal Chemistry**. . ISSN 00090352. 93:2 (2016) 105–115. doi: 10.1094/CCHEM-06-15-0126-RW.

SALVADOR, Nádia Bastos *et al.* - Zearalenona em chás e plantas medicinais destinadas à preparação de infusões. (2018).

SANTERAMO, Fabio Gaetano; LAMONACA, Emilia - Objective risk and subjective risk: The role of information in food supply chains. **Food Research International**. . ISSN 18737145. 139:November 2020 (2021) 109962. doi: 10.1016/j.foodres.2020.109962.

SANTOS, Marcelo C. DOS *et al.* - Mycotoxins and their potential as warfare agents. **Revista Virtual de Química**. . ISSN 19846835. 6:3 (2014) 761–778. doi: 10.5935/1984-6835.20140046.

SARKANJ, Bojan; SARKANJ, Ivana Dodlek; SHAMTSYAN, Mark - Mycotoxins in food - How to prevent and what to do when things go bad. **E3S Web of Conferences**. . ISSN 22671242. 215:2020) 1–11. doi: 10.1051/e3sconf/202021501004.

SHEPHARD, Gordon S. *et al.* - Multiple mycotoxin exposure determined by urinary biomarkers in rural subsistence farmers in the former Transkei, South Africa. **Food and Chemical Toxicology**. . ISSN 02786915. 62:2013) 217–225. doi: 10.1016/j.fct.2013.08.040.

SIEGRIST, Michael; ÁRVAI, Joseph - Risk Perception: Reflections on 40 Years of Research. **Risk Analysis**. . ISSN 15396924. 40:2020) 2191–2206. doi: 10.1111/risa.13599.



- SOLFRIZZO, Michele *et al.* - Simultaneous LC-MS/MS determination of aflatoxin M<sub>1</sub>, ochratoxin A, deoxynivalenol, de-epoxydeoxynivalenol,  $\alpha$  and  $\beta$ -zearalenols and fumonisin B<sub>1</sub> in urine as a multi-biomarker method to assess exposure to mycotoxins. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**. . ISSN 16182642. 401:9 (2011) 2831–2841. doi: 10.1007/s00216-011-5354-z.
- SOLFRIZZO, Michele; GAMBACORTA, Lucia; VISCONTI, Angelo - Assessment of multi-mycotoxin exposure in southern Italy by urinary multi-biomarker determination. **Toxins**. . ISSN 20726651. 6:2 (2014) 523–538. doi: 10.3390/toxins6020523.
- STEFANO, Vita DI *et al.* - Mycotoxin contamination of animal feedingstuff: detoxification by gamma-irradiation and reduction of aflatoxins and ochratoxin A concentrations. **Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment**. . ISSN 19440057. 31:12 (2014) 2034–2039. doi: 10.1080/19440049.2014.968882.
- TURNER, Nicholas W.; SUBRAHMANYAM, Sreenath; PILETSKY, Sergey A. - Analytical methods for determination of mycotoxins: A review. **Analytica Chimica Acta**. . ISSN 00032670. 632:2 (2009) 168–180. doi: 10.1016/j.aca.2008.11.010.
- VIEIRA, J. - 2000-2015 Objetivos de Desenvolvimento do Milénio. **Ingenium**. II Série:150 (2015) 38–42. ISSN 0870-5968.
- WALLIN, S. *et al.* - Biomonitoring of concurrent mycotoxin exposure among adults in Sweden through urinary multi-biomarker analysis. **Food and Chemical Toxicology**. . ISSN 18736351. 83:2015) 133–139. doi: 10.1016/j.fct.2015.05.023.
- WARTH, Benedikt *et al.* - Development and validation of a rapid multi-biomarker liquid chromatography/tandem mass spectrometry method to assess human exposure to mycotoxins. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**. . ISSN 09514198. 26:13 (2012) 1533–1540. doi: 10.1002/rcm.6255.
- WARTH, Benedikt *et al.* - New insights into the human metabolism of the Fusarium mycotoxins deoxynivalenol and zearalenone. **Toxicology Letters**. . ISSN 03784274. 220:1 (2013) 88–94. doi: 10.1016/j.toxlet.2013.04.012.
- WARTH, Benedikt *et al.* - Utilising an LC-MS/MS-based multi-biomarker approach to assess mycotoxin exposure in the Bangkok metropolitan area and surrounding provinces. **Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment**. . ISSN 19440057. 31:12 (2014) 2040–2046. doi: 10.1080/19440049.2014.969329.
- WORLD MEDICAL ASSOCIATION - Declaration of Helsinki, ethical principles for scientific

requirements and research protocols. **Bulletin of the World Health Organization**. 79:4 (2013) 373.

YLI-MATTILA, Tapani; SUNDHEIM, Leif - Fumonisin in African Countries. **Toxins**. 14:6 (2022) 419. doi: 10.3390/toxins14060419.

ZHANG, Kai *et al.* - Screening multimycotoxins in food-grade gums by stable isotope dilution and liquid chromatography/tandem mass spectrometry. **Journal of AOAC International**. . ISSN 10603271. 97:3 (2014) 889–895. doi: 10.5740/jaoacint.13-263.

ZHANG, Lei *et al.* - A review of current methods for analysis of mycotoxins in herbal medicines. **Toxins**. . ISSN 20726651. 10:2 (2018). doi: 10.3390/toxins10020065.

ZINEDINE, Abdellah *et al.* - Review on the toxicity, occurrence, metabolism, detoxification, regulations and intake of zearalenone: An oestrogenic mycotoxin. **Food and Chemical Toxicology**. . ISSN 02786915. 45:1 (2007) 1–18. doi: 10.1016/j.fct.2006.07.030.

## ANEXOS

### ANEXO I

CONSENTIMENTO INFORMADO, LIVRE E ESCLARECIDO PARA PARTICIPAÇÃO NO ESTUDO  
INTITULADO

#### “BIOMONITORIZAÇÃO DE AGROQUÍMICOS E MICOTOXINAS EM CRIANÇAS”

DE ACORDO COM A ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE<sup>1</sup>, A DECLARAÇÃO DE HELSÍNQUIA<sup>2</sup> E  
A CONVENÇÃO DE OVIEDO<sup>3</sup>

**Investigador Principal:** Professora Doutora Angelina Pena

**Organização do I.P.:** Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

**NOTA PRÉVIA:** *Leia com atenção a seguinte informação. Se achar que algo está incorreto ou que não está claramente explicado, solicite mais informações ao investigador presente. Antes de decidir, poderá falar com qualquer pessoa com a qual se sinta confortável. Se concordar com a proposta que lhe é apresentada, valide o presente documento assinando o Termo de Consentimento.*

#### PARTE I: PÁGINA DAS INFORMAÇÕES

##### Introdução

O presente estudo é conduzido pelo LAQV-REQUIMTE, Laboratório de Bromatologia e Farmacognosia, na Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, e pelo Centro de Investigação Vasco da Gama (CIVG)/ Escola Universitária Vasco da Gama (EUVG), no âmbito da investigação na biomonitorização de pesticidas, bisfenóis, poluentes, micotoxinas e outros contaminantes nas populações.

O grau de exposição a alguns contaminantes, de origem natural (como as micotoxinas) ou artificial (como os agro-químicos) de um grupo da população vulnerável como as crianças não é atualmente conhecido, não sendo por isso possível relacioná-los com outros fatores de saúde ou doença.

##### Objetivo

O objetivo do presente projeto é analisar amostras de urina de criança e quantificar a eventual presença de contaminantes de origem natural e artificial, que reflitam a exposição a estes contaminantes por parte de crianças.

##### Tipo de intervenção

Recolha de urina por micção não invasiva e voluntária da criança, de modo autónomo ou com assistência do tutor, e preenchimento de questionário pelo tutor.

##### Seleção de participantes

Os participantes incluídos no estudo devem cumprir os seguintes critérios: serem saudáveis; com idade inferior a 12 anos (inclusive).

##### Procedimento

A recolha da urina é realizada por micção voluntária da criança, de modo autónomo ou com assistência do tutor, conforme o procedimento descrito pelo Profissional de Saúde ou membro da Equipa de Investigação. Deve ser recolhida a primeira urina da manhã, após descartar o primeiro jacto. Após a recolha, a amostra é refrigerada e entregue pelo tutor do participante até 24 horas após a colheita, na Faculdade de Farmácia da Universidade de

Coimbra e na Escola Universitária Vasco da Gama (EUVG). No dia de recolha da amostra de urina é também preenchido pelo tutor o questionário, sobre a criança, composto por 3 partes: I. Dados antropométricos e características individuais; II. Dados sociodemográficos e III. Dados relativos à alimentação. O questionário demora cerca de 3 minutos a preencher.

### **Condições de Participação**

A participação no presente estudo é voluntária e facultativa. A qualquer momento o participante poderá abandonar o estudo, sem qualquer prejuízo.

### **Benefícios**

Não existirá nenhum benefício imediato e direto para o participante, sob a forma de pagamento ou de outras contrapartidas.

### **Confidencialidade e partilha dos resultados de investigação**

A confidencialidade dos participantes é garantida ao abrigo da Lei 58/2019, de 8 de agosto, relativo à proteção das pessoas singulares:

- O questionário e a amostra serão identificadas por um código, com um número correspondente, que não será do conhecimento de ninguém, para além da equipa de investigação.

- Será garantida a confidencialidade e anonimato no tratamento dos dados, assegurando que nunca será tornada pública a identificação dos participantes em nenhum momento da investigação ou em nenhuma publicação que eventualmente se venha a produzir.

Os dados e amostras recolhidos servirão para a elaboração deste trabalho científico, sem prejuízo de poderem vir a ser incluídos em estudos retrospectivos e prospetivos relacionados com o tema. No final dos estudos, serão partilhados os resultados com os participantes (informação individual) e a comunidade científica (informação coletiva, sem identificação dos participantes).

### **Quem contactar**

Em caso de alguma questão adicional, em qualquer momento do desenvolvimento do estudo, deverá ser contactada a Prof. Dr.<sup>a</sup> Angelina Pena, através do e-mail [apena@ci.uc.pt](mailto:apena@ci.uc.pt) ou telefone 239 488 400

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética e Bem-Estar Animal da Escola Universitária Vasco da Gama (CEBEA-EUVG), em 29 de Novembro de 2019

<sup>1</sup> [http://www.who.int/rpc/research\\_ethics/informed\\_consent/en/](http://www.who.int/rpc/research_ethics/informed_consent/en/)

<sup>2</sup> Declaração de Helsínquia <https://www.wma.net/policies-post/wma-declaration-of-helsinki-ethical-principles-for-medical-research-involving-human-subjects/>

<sup>3</sup> Convenção de Oviedo <https://dre.pt/web/guest/pesquisa//search/235127/details/maximized>

## **PARTE II: Termo de consentimento**

Declaro que:

*Fui questionado sobre a possibilidade de participação do meu filho/ minha filha no estudo de biomonitorização de agroquímicos e micotoxinas em crianças.*

*Li a informação anterior ou a informação anterior foi-me lida.*

*Tive a oportunidade de colocar questões e, se eventualmente coloquei questões, foram respondidas satisfatoriamente.*

*Foi-me garantida a possibilidade de, em qualquer altura, recusar participar neste estudo sem qualquer tipo de consequências.*

*Recebi o material necessário para a recolha da amostra de urina: frasco estéril de 100mL com tampa estanque e etiqueta de identificação.*

*Tomei conhecimento do(s) procedimento(s) a adotar antes, durante e após a recolha de urina, bem como do local onde devo entregar a amostra de urina.*

*Assim, consinto voluntariamente que o meu filho/ minha filha participe neste estudo e permito a utilização dos dados e amostras que, de forma voluntária, forneço, confiando que apenas serão utilizados para os fins indicados e nas garantias de confidencialidade e anonimato que me são dadas pela equipa de investigação.*

**Nome (legível) do tutor legal da criança:** \_\_\_\_\_

**Assinatura do tutor legal da criança:** \_\_\_\_\_

**Data:** \_\_\_\_/ \_\_\_\_/20\_\_

**Se tutor legal iletrado:**

(será assinado por uma testemunha, letrada, selecionada pelo participante e sem relação com a equipa de investigação)

*Eu testemunhei a leitura exata do formulário de consentimento ao pai/representante legal do potencial participante, o qual teve oportunidade de colocar questões. Eu confirmo que o mesmo concedeu o consentimento livremente.*

**Nome (legível) da testemunha:** \_\_\_\_\_

**Assinatura da testemunha:** \_\_\_\_\_

**Data:** \_\_\_\_/ \_\_\_\_/20\_\_

**Declaração do investigador/ colaborador da investigação que obteve consentimento**

Eu li de forma exata a página de informações ao potencial participante ou seu tutor legal, e que todas as questões colocadas foram respondidas corretamente. Eu confirmo que o consentimento foi cedido livre e voluntariamente.

Uma cópia deste Formulário de Consentimento foi disponibilizada ao participante ou seu tutor legal.

**Nome (legível) do investigador/ colaborador da investigação que obteve consentimento:**

\_\_\_\_\_  
**Assinatura do investigador/ colaborador da investigação:**

**Data:** \_\_\_\_/ \_\_\_\_/20\_\_

A preencher conforme questionário correspondente:  
Nome (próprio) da criança: \_\_\_\_\_  
Código interno: \_\_\_\_\_

**ANEXO II**  
**Questionário para pais das crianças participantes no estudo intitulado**  
**“BIOMONITORIZAÇÃO DE AGROQUÍMICOS E MICOTOXINAS EM**  
**CRIANÇAS”**

Nome (próprio) da criança: \_\_\_\_\_

Código interno: \_\_\_\_\_

Recolha de urina:

Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/20\_\_

Hora: \_\_\_\_h\_\_\_\_

Nota prévia: perguntas relativas à criança participante no estudo

**DADOS ANTROPOMÉTRICOS E SAÚDE**

Sexo:  Feminino  Masculino

Idade: \_\_\_\_\_ anos

Peso: \_\_\_\_ Kg

Altura: \_\_\_\_ cm

Medicação na última semana:  Não  Sim: qual: \_\_\_\_\_

Exposição a fumo de tabaco:  Não  Sim

**DADOS SOCIODEMOGRÁFICOS**

NÍVEL EDUCACIONAL DOS PAIS:

**Pai:**  Ensino primário  ≤12ºano  Licenciatura  Mestrado/ Doutorado

**Mãe:**  Ensino primário  ≤12ºano  Licenciatura  Mestrado/ Doutorado

RESIDÊNCIA: Localidade: \_\_\_\_\_ Concelho: \_\_\_\_\_ Distrito:

Distância da residência à **indústria/ zona industrial** mais próxima:

≤100m  500m  ≥1km

Distância da residência ao **campo agrícola (cultivado)** mais próximo:

≤100m  500m  ≥1km

Distância da residência à **autoestrada/via rápida** mais próxima:

≤100m  500m  ≥1km

Utilização de **agroquímicos** (quando aplicável):

Não  Sim

Se sim, no:  Jardim  Quintal/ horta

Se sim, os seguintes agroquímicos:

Pesticida  Fungicidas  Herbicidas

Outros, quais: \_\_\_\_\_

**DADOS ALIMENTAÇÃO**

Responder com base na alimentação da criança nos **últimos sete (7) dias**:

ORIGEM dos alimentos consumidos:

<25%  50%  75%  100% Caseiro/ Produtores locais

<25%  50%  75%  100% Superfícies comerciais/ Supermercado

LOCAL:

Casa: \_\_\_\_\_ número/ semana

Restauração/ Cantinas escolares: \_\_\_\_\_ número/ semana

### QUESTIONÁRIO ALIMENTAR:

---

Este questionário tem como objectivo avaliar uma potencial correlação entre o consumo de determinados alimentos e os níveis de agroquímicos e micotoxinas presentes na urina da criança.

Procure responder às questões de uma forma sincera, indicando aquilo que realmente a criança comeu e não o que pensa que seria correcto comer.

O questionário pretende identificar o consumo de alimentos da última semana, i.e. dos últimos sete dias previamente à recolha de urina. Assim para cada alimento, deve assinalar, preenchendo com um X a respectiva opção, quantas vezes por semana, a criança comeu em média, cada um dos alimentos referidos nesta lista, ao longo da última semana (sete dias). Não se esqueça de assinalar na opção respectiva os alimentos que a criança nunca come, ou come menos de 1 vez por semana.

Não se esqueça de ter em conta as vezes que o alimento é consumido sozinho e aquelas em que é adicionado a outros alimentos ou pratos (exemplo: os ovos das omeletas, etc).

Nos **últimos sete (7) dias** qual foi a **frequência** e a **quantidade** consumida de (assinale com X):

Grupo	Alimento (porção média)	FREQUÊNCIA MÉDIA							
		Nunca ou < 1 semana	1 por semana	2 por semana	3 por semana	4 por semana	5 por semana	6 por semana	≥7 por semana
LACTÍCIOS	LEITE (1 chávena = 250 ml)								
	IOGURTE (Um = 125 g)								
	QUEIJO (Uma fatia=30g)								
	GELADO (Um ou 2 bolas)								

Grupo	Alimento (porção média)	FREQUÊNCIA MÉDIA							
		Nunca ou < 1 semana	1 por semana	2 por semana	3 por semana	4 por semana	5 por semana	6 por semana	≥7 por semana
PÃO E CEREAIS	PÃO BRANCO OU TOSTAS (1-2 UNIDADES)								
	PÃO (OU TOSTAS) INTEGRAL OU OUTROS (1-2 UNIDADES)								
	BROA (1 fatia = 80 g)								
	FLOCOS DE CEREAIS (1 chávena sem leite)								
	ARROZ e MASSAS (½ prato)								



Grupo	Alimento (porção média)	FREQUÊNCIA MÉDIA							
		Nunca ou < 1 semana	1 por semana	2 por semana	3 por semana	4 por semana	5 por semana	6 por semana	≥7 por semana
OVOS, CARNES E PEIXE	OVOS (1 UNIDADE)								
	AVES (FRANGO E PERÚ) (2 peças ou ¼ frango)								
	VACA (1 porção = 120g)								
	PORCO (1 porção = 120g)								
	OUTRAS CARNES (1 porção = 120g)								
	ENCHIDOS E FUMADOS (e.g. FIAMBRE, CHOURIÇO, SALPICÃO, PRESUNTO, SALSICHAS, TOUCINHO, BACON) (2 fatias ou 3 rodelas)								
	PEIXE ((1 porção = 120g)								

Grupo	Alimento (porção média)	FREQUÊNCIA MÉDIA							
		Nunca ou < 1 semana	1 por semana	2 por semana	3 por semana	4 por semana	5 por semana	6 por semana	≥7 por semana
VEGETAIS	SOPA (1 prato)								
	LEGUMES/ SALADAS (1 porção)								
	FRUTA (4 peças)								

Grupo	Alimento (porção média)	FREQUÊNCIA MÉDIA							
		Nunca ou < 1 semana	1 por semana	2 por semana	3 por semana	4 por semana	5 por semana	6 por semana	≥7 por semana
DOCES	BOLACHAS (3 unidades)								
	CHOCOLATE E DERIVADOS (3 quadrados; 1 colher de sobremesa)								

Grupo	Porção média (porção média)	FREQUÊNCIA MÉDIA							
		Nunca ou < 1 semana	1 por semana	2 por semana	3 por semana	4 por semana	5 por semana	6 por semana	≥7 por semana
FRUTOS SECOS	½ chávena (descascados)								

(v.6.Out.2019)

(Adaptado de [http://www.who.int/rpc/research\\_ethics/informed\\_consent/en/](http://www.who.int/rpc/research_ethics/informed_consent/en/))