



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Luciana Serelle Macedo

**BIOMONITORIZAÇÃO DE OCRATOXINA A EM
URINA DE CRIANÇAS**

Dissertação no âmbito do Mestrado em Segurança Alimentar orientada pela Professora Doutora Angelina Lopes Simões Pena e co-orientada pela Doutora Liliana J. G. Silva e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Setembro de 2019

1 2 9 0



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Biomonitorização de Ocratoxina A em urina de
crianças

Luciana Serelle Macedo

Dissertação de Mestrado em Segurança Alimentar, orientada pela Professora Doutora Angelina Lopes Simões Pena e co-orientada pela Doutora Liliana J. G. Silva e apresentada a Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra.

Setembro de 2019

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Professora Doutora Angelina Lopes Simões Pena por todo o apoio e acolhimento, bem como pela inteira disponibilidade demonstrada ao longo da realização da dissertação,

À Doutora Liliana Silva por ter aceitado ser co-orientadora deste projeto. Agradeço pelo tempo generosamente despendido desde o início das atividades experimentais, pela sua colaboração e ensinamentos transmitidos, os quais foram fundamentais para a realização deste estudo.

À Doutora Sofia Duarte pela colaboração na colheita das amostras.

À todos meus colegas e amigos de Coimbra, por toda ajuda, bons momentos, e por fazerem dessa cidade um lar para mim.

Agradeço aos meus pais e minha irmã pelo apoio constante, sem os quais não teria sido possível chegar até aqui. A motivação que constantemente me transmitiam foi imprescindível, tanto durante este trabalho como ao longo de toda a minha vida acadêmica. Obrigada por sempre acreditarem em mim.

A todos aqueles que estiveram presentes neste meu percurso, o meu sincero e profundo agradecimento.

RESUMO

A ocratoxina A (OTA) é uma micotoxina produzida por diferentes espécies de fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*. A OTA possui efeitos carcinogênicos, teratogênicos, imunossupressores, hepatotóxicos e nefrotóxicos em diversas espécies animais, tendo sido classificada como um possível carcinogênico humano pela IARC. A sua presença foi detectada a nível mundial em diversos gêneros alimentícios e amostras biológicas.

Diferentes estudos já detectaram OTA em amostras de urina humana, no entanto, relativamente à exposição da população infantil estão disponíveis poucos estudos. Sendo este subtipo populacional mais susceptível a contaminantes alimentares, nomeadamente a micotoxinas, principalmente devido ao maior consumo de alimentos por quilo de peso corporal, considerou-se relevante a biomonitorização de OTA em crianças, e caracterização do risco para a sua saúde desta população, resultante da sua exposição a esta micotoxina.

Um total de 80 amostras de urina foram coletadas de crianças saudáveis, de 2 a 13 anos ($6,1 \pm 2,5$), residentes na zona centro de Portugal. A análise das amostras de urina foi realizada por cromatografia líquida com detecção por fluorescência (LC-FD). A linearidade da OTA, avaliada em solvente (1 - 10 ng/ml) e em matriz (0,02 – 0,15 ng/ml), foi adequada com valores de r^2 de 0,9968, e de 0,9991, respectivamente. O valor do efeito matriz obtido foi de 100,23%. As percentagens de recuperação variaram entre 90% e 97%. O LOD e o LOQ foram de 0,01 e 0,019 ng/ml, respetivamente.

A OTA foi detectada em 60 amostras (75%), com concentrações variando de <LOQ a 0,052 ng/ml, numa concentração média de 0,02 ng/ml. Este foi o primeiro estudo a avaliar a exposição das crianças portuguesas à OTA, tendo evidenciado uma clara frequência de exposição. A avaliação de risco indica uma potencial preocupação, pelo que a continuação destes estudos de biomonitorização é muito importante.

Palavras chave: Ocratoxina A; biomonitorização; urina; crianças; avaliação do risco

ABSTRACT

Ochratoxin A (OTA) is a mycotoxin produced by different species of fungi of the genera *Aspergillus* and *Penicillium*. OTA has carcinogenic, teratogenic, immunosuppressive, hepatotoxic and nephrotoxic effects in several animal species and has been classified as a possible human carcinogen by IARC. Its presence has been detected worldwide in various foodstuffs and biological samples.

Different studies have already detected OTA in human urine samples, however, regarding the exposure of children just a few studies are available. As this population subtype is more susceptible to food contaminants, namely mycotoxins, mainly due to the higher food consumption per kg of body weight, it was considered relevant to biomonitor OTA in children, to better characterize their health risk resulting from their exposure.

A total of 80 urine samples were collected from healthy children, aged between 2 to 13 years (6.1 ± 2.5) residents of central Portugal. Analysis of urine samples was performed by liquid chromatography with fluorescence detection (LC-FD). The linearity of OTA, evaluated in solvent (1 - 10 ng / mL) and matrix (0.015 - 0.15 ng/mL), was adequate with R^2 values of 0.9968 and 0.9991, respectively. The matrix effect value obtained was 100.23%. The recoveries ranged from 90% to 97%. The LOD and LOQ were 0.019 and 0.02 ng/ml, respectively.

OTA was detected in 60 samples (75%), with concentrations ranging from <LOQ to 0.052 ng/ml, in an average concentration of 0.02 ng/ml. This was the first study to assess the exposure of Portuguese children to OTA, showing a clear frequency of exposure. Risk assessment indicates a potential concern, so the continuation of these biomonitoring studies is very important.

Keywords: Ochratoxin A; biomonitoring; urine; children, risk evaluation

ÍNDICE

RESUMO.....	v
ABSTRACT	vi
INTRODUÇÃO.....	1
1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
1.1 Caracterização da ocratoxina A.....	3
1.1.1 Fungos Produtores.....	3
1.1.2 Características físico-químicas	4
1.1.3 Toxicocinética.....	5
1.1.4 Toxicidade	8
1.2 Ocorrência de OTA em alimentos.....	10
1.3 Avaliação da exposição	13
1.3.1 Ingestão diária estimada.....	13
1.3.2 Biomonitorização	14
1.4 Métodos analíticos	15
2. PARTE EXPERIMENTAL.....	19
2.1 Material e Métodos	19
2.1.1 Amostragem	19
2.1.2 Reagentes e materiais.....	20
2.1.3 Preparação de Soluções.....	20
2.1.4 Extração e purificação de amostras	21
2.1.5 Detecção e quantificação	21
2.1.6 Ensaio de fortificação.....	22
2.2 Resultados e Discussão	22
2.2.1 Desempenho analítico.....	22
2.2.2 Ocorrência de OTA em urina de crianças.....	25
2.2.3 Ingestão diária provável (PDI) e avaliação do risco.....	27
CONCLUSÃO	30
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	32
ANEXOS	39

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura química da Ocratoxina A	4
Figura 2 – Biotransformação da OTA.....	7
Figura 3 – Curva de calibração de OTA em fase móvel	23
Figura 4 – Curva de calibração de OTA em matriz.....	23

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 – Espécies <i>Aspergillus</i> e <i>Penicillium</i> produtores de OTA em alimentos	3
Tabela 2 – Metodologias analíticas para determinação de OTA em urina	17
Tabela 3 – Dados antropométricos da população estudada	19
Tabela 4 – Estudo de validação da metodologia analítica para a determinação de OTA em urina	25
Tabela 5 – Níveis médio, mínimo e máximo (ng/mL) e frequência (%) de OTA nas amostras de urina	26
Tabela 6 – Ingestão diária provável ($\mu\text{g}/\text{kg pc}/\text{dia}$) e avaliação do risco	29

LISTA DE ABREVIATURAS

10-OH-OTA - 10-hidroxiocratoxina A

4-OH-OTA - 4-hidroxiocratoxina A

ACN - Acetonitrila

AFLA - aflatoxinas

Aw - atividade de água

BEN - nefropatia endêmica dos Bálcãs

CAS - Chemical Abstracts Service

CH₃COOH - Ácido acético

CHCl₃ - Clorofórmio

DNA - *deoxyribonucleic acid* (ácido desoxirribonucleico)

DON - desoxinivalenol

DRT - doença renal terminal

EDI – *estimated daily intake* (ingestão diária estimada)

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

FD - *Fluorescence Detection* (deteção por fluorescência)

FUMO - fumonisinas

H₂O - água

IAC - *Immuno Affinity Column* (coluna de imunoafinidade)

IARC - *International Agency for Research on Cancer* (Agência Internacional de Pesquisa do Cancro)

LC - *Liquid chromatography* (cromatografia líquida)

LC–ESI-MS/MS - *Liquid chromatography with electrospray ionization with tandem mass spectrometry* (cromatografia líquida acoplada a fonte de ionização por electrospray acoplada à espectrometria de massas em *tandem*)

LC-FD - *Liquid chromatography with fluorescence detection* (cromatografia líquida com detetor de fluorescência)

LC-MS/MS - *Liquid chromatography with tandem Mass spectrometry* (cromatografia líquida com deteção por massa em *tandem*)

LLE - *liquid-liquid extraction* (extração líquido-líquido)

LOD - Limite de detecção

LOQ - Limite de quantificação

ME - *Matrix effect* (efeito de matriz)

NIC - nefropatia intersticial crônica

OTA - ocratoxina A

OTB - ocratoxina B

OTC - ocratoxina C

OT-GSH - glutationa da OTA

OT α - ocratoxina α

PBS - *phosphate buffered saline* (Tampão fosfato-salino)

pc – peso corporal

PDI - *Probable Daily Intake* (Ingestão Diária Provável)

PKa - Constante de acidez

R² - Coeficiente de determinação/correlação

RDS - *relative standard deviation* (Desvio Padrão Relativo)

T_{1/2} – meia vida

TDI - *Tolerable Daily Intake* (ingestão diária tolerável)

TTU - tumores do trato urinário

UPLC–MS/MS - *Ultra performance liquid chromatography with tandem mass spectrometer* (cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a espectrometria de massa em *tandem*)

UV - Ultravioleta

ZON - zearalenona

INTRODUÇÃO

O termo micotoxina é derivado da palavra grega “mykes” que significa fungo e do latim “toxican” que significa toxina. As micotoxinas são metabólitos secundários tóxicos produzidos por algumas espécies de fungos filamentosos e que, se ingeridos pelo homem, exercem efeitos nocivos à sua saúde (IAMANAKA et. al., 2013).

O interesse em micotoxinas surgiu em 1960 quando uma micotoxicose designada de “turkey X disease”, surgiu em perús, em Inglaterra, tendo-se, posteriormente, provado que essa doença foi causada por aflatoxinas (PERAICA et. al., 1999). O período entre 1960 e 1975 foi denominado de corrida do ouro das micotoxinas, na qual diversos cientistas se juntaram na busca desses agentes toxigênicos. Atualmente mais de 300 compostos são reconhecidos como micotoxinas, dos quais aproximadamente uma dezena recebem atenção especial devido ao facto de ameaçarem a saúde humana e animal (BENETT, 2003).

O efeito tóxico das micotoxinas na saúde animal e humana é referido como micotoxicose, cuja gravidade depende da sua toxicidade, extensão da exposição, idade, estado nutricional e dos possíveis efeitos sinérgicos de outros produtos químicos aos quais o indivíduo está exposto (PERAICA et. al., 1999). O acúmulo de micotoxinas em alimentos e rações é responsável pelo aparecimento de diversos problemas na saúde humana e animal, como carcinogenicidade, mutageneidade, hepatotoxicidade, nefrotoxicidade e neurotoxicidade (BHAT & MILLER, 1991).

A contaminação dos alimentos por estas toxinas pode ocorrer durante todos os processos de produção, como no campo, antes e após a colheita, e durante o transporte e armazenamento do produto (CALDAS et.al., 2002). Estima-se que cerca de 25% das culturas, no mundo, sejam afetadas por micotoxinas a cada ano. Perdas econômicas significativas estão associadas ao seu impacto na saúde humana, na produtividade animal e no comércio nacional e internacional, emergindo como preocupação mundial (BHAT & MILLER, 1991).

Num trabalho publicado em 1993, pela Agência Internacional de Pesquisa do Cancro (IARC) (IARC, 1993), cinco toxinas fúngicas foram consideradas de maior risco para a saúde humana

e animal. Estas toxinas são: aflatoxinas (AFLA), ocratoxina A (OTA), zearalenona (ZON), desoxinivalenol (DON) e fumonisinas (FUMO).

A OTA é uma micotoxina produzida por diferentes espécies de fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*. A OTA possui efeitos carcinogênicos, teratogênicos, imunossupressores, hepatotóxicos e nefrotóxicos em diversas espécies animais, tendo sido classificada pela IARC como um possível carcinogênico humano (grupo 2B). A sua presença tem sido detectada a nível mundial em diversos gêneros alimentícios e amostras biológicas (MALIR et. al., 2016).

A avaliação da exposição humana à OTA pode ser avaliada com base na sua ocorrência em alimentos combinada com dados de consumo, e também na análise de fluidos biológicos. A eliminação na urina foi considerada a principal via de excreção de OTA do corpo humano (LI et. al., 1997). No passado, a monitorização urinária foi relativamente inexplorada devido às baixas concentrações encontradas. No entanto, desenvolvimentos recentes nas metodologias analíticas tornaram a monitorização urinária mais viável, tendo a vantagem de ser menos invasiva que a monitorização sanguínea (LI et. al., 1997).

Diferentes estudos já detectaram OTA em amostras de urina humana de adultos (PENA et. al., 2006; DUARTE et. al., 2012; RUBERT et. al., 2011). No entanto, relativamente à exposição da população infantil estão disponíveis poucos estudos (SCOTT, 2005; HEYNDRIX et. al., 2015), sendo que este subtipo populacional apresenta maior susceptibilidade a contaminantes alimentares, nomeadamente à micotoxinas, principalmente devido ao maior consumo de cereais por quilo de peso corporal, comparativamente à população geral.

O objetivo principal deste estudo consistiu na biomonitorização de OTA em urina de crianças, para uma melhor caracterização do risco para a saúde desta população, resultante da sua exposição.

I. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

I.1 Caracterização da ocratoxina A

I.1.1 Fungos produtores

As ocratoxinas são micotoxinas produzidas por alguns tipos de fungos, das quais as principais formas encontradas no ambiente são as ocratoxinas A, B e C. Elas se diferem em sua estrutura química, sendo a ocratoxina B (OTB), uma forma não clorada de ocratoxina A (OTA) e ocratoxina C (OTC), um éster etílico de OTA (HEUSSNER; BINGLE, 2015).

A OTA é a principal e mais tóxica micotoxina do grupo das ocratoxinas e é produzida por várias espécies de fungos dos gêneros *Penicillium* e *Aspergillus*. Estes fungos produzem esta micotoxina em condições ambientais distintas. O gênero *Penicillium* desenvolve-se a temperaturas inferiores a 30°, e encontra-se principalmente no norte e centro da Europa e Canadá. Em áreas mais quentes, como as regiões tropicais e subtropicais, os fungos do gênero *Aspergillus* estão mais susceptíveis ao crescimento (IAMANAKA et. al., 2013).

Na tabela I encontram-se as espécies de *Aspergillus* e *Penicillium* produtoras de OTA em alimentos, assim como as temperaturas e atividades de água (*A_w*) favoráveis ao seu desenvolvimento.

Tabela I – Espécies *Aspergillus* e *Penicillium* produtores de OTA em alimentos (MALIR et. al., 2016; WHO, 1990)

Gênero	Espécie	Temp.	A _w
<i>Aspergillus</i>	<i>A. ochraceus</i>	8-40°C	0,95-0.99
	<i>A. steynii</i>		
	<i>A. westerdijkiae</i>		
	<i>A. carbonarius</i>	30-37 °C	0,77-0.85
	<i>A. foetidus</i>		
	<i>A. niger</i>		
	<i>A. sclerotiumniger</i>		
	<i>A. lacticoffeatus</i>		
<i>A. tubingensis</i>			
<i>Penicillium</i>	<i>P. verrucosum</i>	< 30 °C	0.80
	<i>P. nordicum</i>		

O *Aspergillus ochraceus* foi o primeiro produtor de OTA identificado (VAN DER MERWE et. al., 1965). As espécies de *Aspergillus* produtoras de OTA, *A. carbonarius* e *A. niger*, crescem bem em altas temperaturas e produzem hifas e esporos pigmentados, tornando essas espécies

resistentes à luz ultravioleta (UV). O *A. carbonarius* é comumente encontrado em uvas e frutos similares que amadurecem à luz do sol e em altas temperaturas (PITT, 2002). Novas espécies de *Aspergillus* produtoras de OTA (*A. Circumdati*, *A. westerdijkiae*, *A. steynii*, *A. lacticoffeatus* e *A. sclerotioniger*) isoladas do café, foram descobertas em 2004 (FRISVAD et. al., 2004; SANSON et. al., 2004).

Entre as espécies do gênero *Penicillium*, apenas *P. verrucosum* e *P. nordicum* são conhecidas por produzir OTA. O *P. verrucosum* desenvolve-se sobretudo em cereais de zonas frias e temperadas, variando entre o norte e centro da Europa e o Canadá (PITT, 2002). Enquanto as plantas quase sempre são contaminadas por *P. verrucosum*, os produtores de OTA em carne ou queijo são derivados de *P. nordicum* (MALIR et. al., 2016).

1.1.2 Características físico-químicas

A estrutura química da OTA, apresentada na figura 1, consiste num grupo dihidroisocumarínico ligado pelo grupo 7-carboxilo a uma molécula de L-β-fenilalanina, através de uma ligação amida. Assim, quimicamente é designada por L - fenilalanina - N - [(5-cloro-3,4-di-hidro-8-hidroxi- 3-metil-1-oxo-1H-2-benzopiran-7-il) carbonil] - (R) - isocumarina (CAS, N° de registro: 303-47-9), com fórmula molecular C₂₀H₁₈O₆NCl.

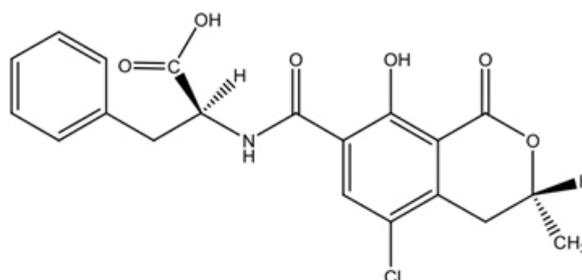


Figura 1 – Estrutura química da Ocratoxina A

A OTA é um ácido orgânico fraco com um valor de pKa de 7,1 e uma massa molar de 403,8 g.mol⁻¹. Com estrutura cristalina variando de incolor a branco, esta molécula possui uma intensa fluorescência verde sob luz UV em meio ácido e fluorescência azul em condições alcalinas (EL KHOURY & ATOUI, 2010).

Em pH ácido e neutro, o OTA é solúvel em solventes orgânicos polares (álcoois, cetonas, clorofórmio), ligeiramente solúvel em água e insolúvel em éter de petróleo e hidrocarbonetos saturados. Em condições alcalinas, esta molécula é solúvel em soluções aquosas de bicarbonato de sódio e, de forma geral, em soluções alcalinas (EL KHOURY & ATOUI, 2010).

Uma particularidade importante da OTA relaciona-se com sua elevada estabilidade, tendo sido demonstrado que possui resistência à acidez e a altas temperaturas. Esta molécula pode resistir a três horas de esterilização por vapor a alta pressão a 121 °C e, mesmo a 250 °C, a sua destruição não é completa (EL KHOURY & ATOUI, 2010). Assim, é muito difícil remover totalmente esta molécula em alimentos contaminados.

I.1.3 Toxicocinética

Tanto a toxicocinética (as mudanças de concentrações de um composto no organismo ao longo do tempo) como a toxicodinâmica (as interações dinâmicas de um composto com alvos biológicos e seus efeitos biológicos a jusante) determinam a toxicidade da OTA (RINGOT et. al., 2006).

A toxicocinética da OTA e suas implicações toxicológicas foram extensamente revisadas por vários autores. Os dados cinéticos disponíveis para ratos indicam que as diferenças de estirpe, sexo e idade na cinética da OTA podem explicar as diferentes sensibilidades sexuais e de espécies em relação à OTA (HEUSSNER & BINGLE, 2015). Os dados humanos são bastante limitados, no entanto, sexo, estação e localização geográfica parecem ser os fatores mais importantes (HEUSSNER & BINGLE, 2015).

A percentagem de OTA absorvida difere entre espécies: 66% em porcos, 56% em ratos e coelhos e 40% em frango (RINGOT et. al., 2006). Após absorção pelo trato gastrointestinal, a OTA liga-se às proteínas plasmáticas. Na maioria das espécies animais, a OTA é absorvida passivamente na sua forma não ionizada. A absorção passiva é altamente favorecida pela alta afinidade de ligação da OTA às proteínas plasmáticas. Considera-se que as variações observadas no tempo de meia-vida entre as espécies já estudadas dependem da afinidade e do grau de ligação a estas proteínas. A OTA é subsequentemente transportada através do sistema portal e distribuída para diferentes tecidos e órgãos. (RINGOT et. al., 2006). A OTA liga-se facilmente à albumina sérica e a outras macromoléculas, a fração não ligada é tão baixa quanto

0,02% em humanos, indicando uma extensão de ligação proteica de 99,98%, assim, sua meia vida em humanos é longa, cerca de 35 dias (EFSA, 2006).

A reabsorção da OTA no intestino, leva à sua reintrodução na circulação sanguínea, como consequência da reciclagem biliar, favorecendo a redistribuição sistêmica desta micotoxina para os diferentes tecidos. Além disso, a reabsorção de OTA ocorre nos túbulos proximais e distais do rim, causando sua acumulação neste órgão (RINGOT et. al., 2006).

Em muitas espécies, incluindo macacos e humanos, a principal via de excreção é a eliminação renal, enquanto que em roedores a excreção biliar parece prevalecer. A excreção biliar e a recirculação entero-hepática da OTA-glicuronídeos podem explicar a variabilidade interindividual e interespecies dos parâmetros cinéticos observados nos vários estudos (EFSA, 2006). A OTA é hidroxilada no fígado apenas em menor grau, resultando nos epímeros R e S da 4-hidroxiocratoxina A (4-OH-OTA). Em algumas espécies de animais, também foi descrita a produção de 10-hidroxiocratoxina A (10-OH-OTA). Além do metabolismo hepático, o metabolismo bacteriano no trato gastrointestinal produz o produto de clivagem, a ocratoxina α , que pode ser absorvido pelo trato gastrointestinal inferior (EFSA, 2006).

O metabolismo da OTA não foi ainda elucidado em detalhe e, atualmente, os dados sobre sua biotransformação são controversos. Em todas as espécies, a excreção fecal e urinária desempenham papéis importantes na depuração plasmática desta toxina (RINGOT et. al., 2006). No entanto, diferentes processos metabólicos podem ser encontrados em diferentes espécies animais, no Homem, plantas, enzimas, fungos, leveduras e bactérias. A OTA pode ser metabolizada nos rins, fígado e intestino, mas é preferencialmente distribuída pelos rins. As principais vias metabólicas a que a OTA está sujeita são a hidrólise, a hidroxilação, a abertura da lactona e a conjugação (WU et. al., 2011).

A biotransformação da OTA, resumida na figura 2, ocorre por via de pelo menos dois mecanismos distintos: hidrólise enzimática e indução do citocromo P450 (WU et. al., 2011). O fígado e rim são os principais órgãos de biotransformação da OTA (RINGOT et. al., 2006). A maioria das vias metabólicas reduz a toxicidade e acelera a eliminação da OTA no organismo. Em comparação com os animais, os seres humanos parecem ter baixa capacidade para o metabolismo da OTA (WU et. al., 2011).

KŐSZEGI & POÓR (2016) elucidaram quanto a biotransformação da OTA. No intestino, parte da OTA é hidrolisada a ocratoxina α ($OT\alpha$) por ação de enzimas proteolíticas e por enzimas da microflora bacteriana. Outra possibilidade da hidrólise da OTA é a abertura do anel lactona sob condições alcalinas. A 4-OH-OTA é um produto da oxidação microsossomal da toxina com baixa toxicidade, enquanto outro produto menos tóxico é a 10-OH-OTA. Além disso, a formação de outros metabólitos hidroxilados da OTA também foi observada em diferentes espécies. Alguns estudos sugerem que, após a descloração, a OTA é transformada em OTB, com menor genotoxicidade. Entre outras reações também são descritas as conjugações de sulfato, glicuronídeo, hexose e pentose (hexa/penta-OTA) e glutathione (OT-GSH) da OTA.

A maioria dos metabólitos formados (Figura 2) apresentam baixa ou nenhuma toxicidade. Os metabólitos listados abaixo foram observados em tecidos, sangue e urina de animais e/ou humanos. Além disso, estudos in vivo em animais sugerem que existem diferenças entre os sexos quanto à carcinogenicidade da OTA devido à variação da sua biotransformação. (KŐSZEGI & POÓR, 2016).

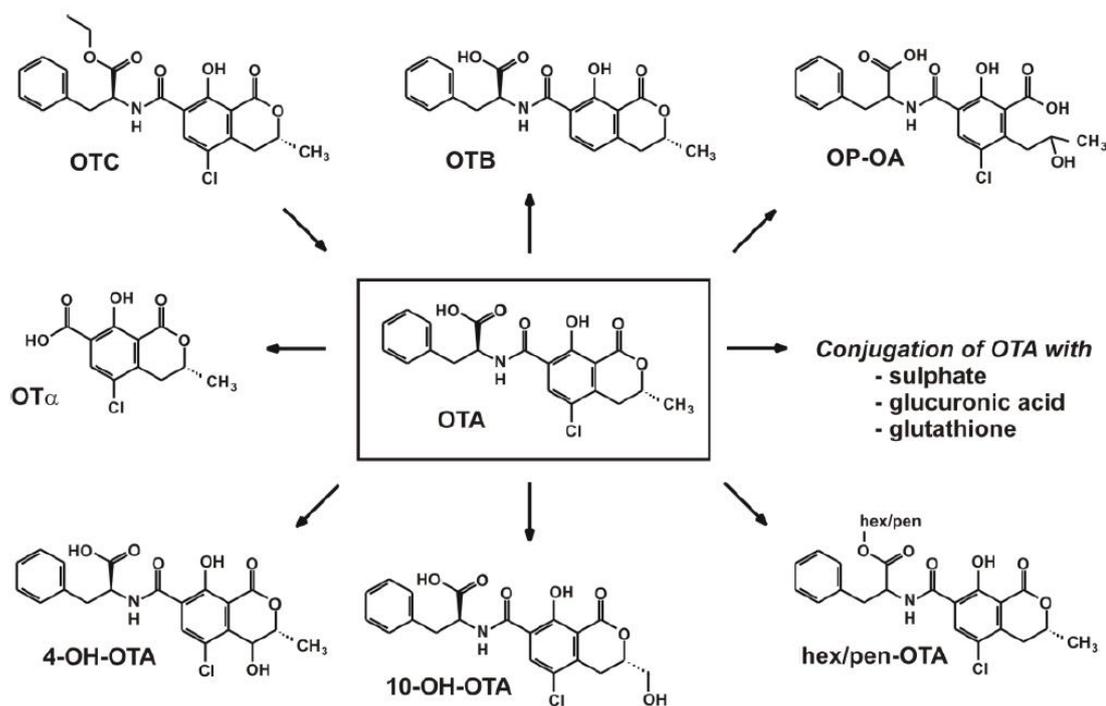


Figura 2 – Biotransformação da OTA (Kőszegi & Poór, 2016)

O perfil toxicocinético da OTA no Homem foi estudado em um voluntário humano após a ingestão de 395 ng de OTA marcada com ^3H (3,8 μCi). Um modelo aberto de dois compartimentos foi encontrado para melhor descrever os dados *in vivo*. Este modelo de dois compartimentos consistiu numa fase de eliminação e distribuição rápida ($T_{1/2}$ cerca de 20 h), seguida de uma fase de eliminação lenta (depuração renal de cerca de 0,11 ml/min) e uma semi-vida plasmática calculada de 35,55 dias. Além disso, a flutuação intra-individual dos níveis plasmáticos de OTA foi investigada em oito voluntários durante um período de dois meses. As concentrações determinadas variaram entre 0,2 e 0,9 ng de OTA/ml de plasma. Os níveis plasmáticos em alguns indivíduos permaneceram quase constantes ao longo do tempo, enquanto outros variaram consideravelmente durante o período de observação. Os autores calcularam uma depuração renal variando entre 0,093 e 0,109 ml/min (aproximadamente 0,13 l/dia), indicando que mesmo uma exposição não regular (consumo de alimentos contaminados uma vez por semana ou uma vez por mês) podem resultar em níveis sanguíneos persistentes (STUDER-ROHR et. al., 2000).

O principal analito no soro do sangue é o composto original, e apenas pequenas concentrações de metabólitos e/ou conjugados da OTA podem ser medidas (STUDER-ROHR et. al., 2000). Em contraste, a análise de amostras de urina indicou que apenas cerca de 50% da radioatividade na urina era OTA, sugerindo a presença de metabólitos de OTA (particularmente ocratoxina α) e OTA glucurônico (STUDER-ROHR et. al., 2000).

Em resumo, em todas as espécies estudadas até o momento (roedores, suínos, coelhos, peixes, aves), a cinética da OTA foi caracterizada por um modelo aberto de dois compartimentos. Nos mamíferos, os estudos toxicocinéticos revelaram geralmente uma depuração plasmática lenta e, subsequentemente, uma semi-vida longa. Dados indicam que as meias-vidas de eliminação mais longas são esperadas em humanos e primatas. As diferenças entre estas espécies parecem ser atribuídas em grande parte às diferenças no grau de ligação às proteínas plasmáticas e ao seu efeito na depuração renal, bem como à taxa de conjugação e extensão da recirculação entero-hepática (EFSA, 2006).

1.1.4 Toxicidade

O perfil toxicológico da OTA foi investigado em inúmeros estudos e também extensivamente revisado. Esses estudos demonstraram que a OTA é nefrotóxica, hepatotóxica, neurotóxica,

teratogênica, carcinogênica e imunotóxica em vários animais e in vitro, sendo a toxicidade renal e a carcinogênese os principais efeitos adversos (MALIR et. al., 2016).

O rim é considerado o principal órgão alvo para os efeitos da OTA. A OTA induziu a toxicidade renal em todas as espécies de mamíferos testadas. Estudos de curto prazo em camundongos, ratos, cães e porcos mostraram o desenvolvimento de nefropatia progressiva, condicionada pela dose e pelo tempo. Diferenças significativas entre sexo e espécie foram observadas na sensibilidade à ação nefrotóxica da OTA (EFSA, 2006).

A OTA foi avaliada quanto à carcinogênese por administração oral em camundongos e ratos. Aumentou a incidência de tumores hepatocelulares em camundongos de ambos os sexos e produziu adenomas e carcinomas de células renais em camundongos machos e em ratos de ambos os sexos (IARC, 1993). Esta micotoxina causou toxicidade renal, nefropatia e imunossupressão em diversas espécies animais. Quanto à sua carcinogenicidade há evidências suficientes em diferentes animais experimentais.

De acordo com a Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC), diversos estudos sugeriram uma correlação entre a exposição à OTA e a nefropatia endêmica dos Balcãs (BEN), além de uma correlação entre a distribuição geográfica da nefropatia endêmica dos Balcãs e a alta incidência e mortalidade por tumores do trato urinário (IARC, 1993). Todos esses dados levaram a IARC a classificar a OTA como um possível cancerígeno humano do Grupo 2B (IARC, 1993).

A associação entre a BEN e os tumores do trato urinário (TTU) também foi reconhecida no início, e o problema da BEN acabou se tornando não apenas nefrológico, mas também oncológico (CASTEGNARO et. al., 2006). Fortes evidências apoiam a hipótese de que a BEN e a TTU têm etiologia associada a micotoxinas. A população da região consome alimentos produzidos por eles mesmos, armazenados sempre no mesmo local (algumas micotoxinas, como OTA e citrinina, se desenvolvem durante o armazenamento de grãos).

As características patológicas da BEN são semelhantes à nefropatia induzida por OTA em suínos. Por outro lado, padrões de adutos de DNA semelhantes aos induzidos por OTA em rim de camundongo, rato, porco e galinha foram encontrados em tumores pélvicos, renais e de bexiga nas pessoas da referida região (CASTEGNARO et. al., 2006).

Assim, a OTA está implicada na patogênese de algumas doenças renais, incluindo a BEN, tumores renais que ocorreram em certas regiões endêmicas da Península Balcânica, e nefropatia intersticial crônica (NIC) que ocorreu na Tunísia e outros países norte-africanos. Lesões renais foram observadas nos túbulos proximais, e células epiteliais foram danificadas (a integridade da membrana foi perdida e o tamanho e a densidade da borda da escova foram reduzidos) (MALIR et. al., 2016).

Verificou-se que as micotoxinas, particularmente a OTA, contaminam 8-12% dos cereais da área de BEN na Croácia. Na Bulgária, a OTA e a citrinina foram consistentemente detectadas nos alimentos básicos (feijão e milho) das famílias afetadas em uma concentração de duas a três vezes mais elevadas ($> 10 \mu\text{g}/\text{kg}$ para OTA nos feijões, $> 25 \mu\text{g}/\text{kg}$ para OTA em milho e $> 50 \mu\text{g}/\text{kg}$ para citrinina em ambos os alimentos) do que em famílias de controle. A exposição humana à OTA foi ainda apoiada por uma maior prevalência de concentração de OTA, excedendo $2 \mu\text{g}/\text{L}$ no sangue das famílias afetadas. A OTA também tem sido encontrada com maior frequência na urina de pessoas que vivem em aldeias endêmicas de BEN do que naquelas em aldeias não endêmicas, e as maiores quantidades foram vistas em pacientes com BEN ou UTT (CASTEGNARO et. al., 2006).

Em um estudo de caso controle, verificou-se que pacientes com doença renal terminal (DRT) ou síndrome nefrítica no Egito tinham níveis significativamente mais altos de OTA urinária do que grupos de referência. Os autores especularam que a OTA pode estar envolvida na gênese da doença renal, levando à síndrome nefrítica e DRT (Wafa et al., 1998).

Uma revisão sistemática de estudos epidemiológicos sobre a OTA examinou as evidências que ligam a exposição à OTA a doenças humanas. De acordo com os autores parece não haver evidências estatisticamente significativas para os riscos à saúde humana associados à exposição à OTA, sendo necessários estudos maiores de coorte ou de caso-controle no futuro para estabelecer melhor os potenciais efeitos à saúde humana relacionados à OTA (BUI-KLIMKE e WU, 2015).

1.2 Ocorrência de OTA em alimentos

A OTA foi encontrada pela primeira vez na região dos Balcãs, no entanto, pode ser detectada a nível mundial. Pode acumular-se em alimentos para animais e na alimentação humana devido

às condições climáticas favoráveis e/ou armazenamento inadequado de alimentos em todas as etapas da cadeia alimentar. Os seres humanos são normalmente expostos à OTA, como a outras micotoxinas, por várias vias, sendo a ingestão alimentar a mais relevante. O contacto cutâneo ou exposições por inalação são de menor importância, embora, ocasionalmente, também possam desempenhar um papel importante (MALIR et. al., 2016). A OTA foi detectada em diversos géneros alimentícios por todo mundo, mais de 90 tipos de alimentos de origem vegetal e animal, incluindo o leite, contribuem para sua exposição dietética (MALIR et. al., 2016).

Um estudo realizado para avaliação da ingestão dietética da OTA pela população dos Estados-Membros da União Europeia, que contou com a participação de treze países (Itália, Dinamarca, Finlândia, França, Alemanha, Grécia, Irlanda, Noruega, Portugal, Espanha, Suécia, Bélgica e Reino Unido), entre Novembro de 1999 e Setembro de 2000, constatou contaminações em 48% das amostras analisadas. Avaliando a contribuição de cada produto alimentício ao consumo dietético médio total de OTA, os cereais e seus produtos derivados foram considerados a principal fonte de exposição humana à OTA, contribuindo com 50% da exposição. No referido estudo, vinho e café ficaram em segundo e terceiro lugar, contribuindo com cerca de 13% e 10%, respectivamente. Os outros itens alimentares foram especiarias (8%), cerveja (5%), cacau (4%), frutas secas (3%) e carne (1%) (EC SCOOP, 2002).

Os cereais e seus derivados são apontados como alimentos suscetíveis aos fungos ocratoxigênicos e, portanto, à produção de OTA, alguns autores sugerem que, se produzidos sob práticas agrícolas orgânicas, a situação se agrava devido ao uso limitado ou restrito de fungicidas (DUARTE, PENA & LINO, 2010). Para constatar este risco, Juan et. al. analisaram 83 amostras de cereais orgânicos e não orgânicos (45 de Valência, Espanha e 38 de Coimbra, Portugal) incluindo arroz, trigo, cevada, centeio, aveia e milho, comercializados em ambos os países, durante o inverno de 2005. Independentemente da origem, 72% das amostras contaminadas com OTA eram orgânicas e 28% eram não-orgânicas, o que confirmou a hipótese de que alimentos orgânicos tem maior probabilidade de estarem contaminados com micotoxinas (JUAN et. al., 2008). A exposição dietética à OTA varia consideravelmente, dependendo de diferentes fatores, dentre os quais os sistemas de processamento de alimentos devem ser considerados (DUARTE, PENA & LINO, 2010).

Devido sua persistência no organismo, a OTA também é encontrada em alimentos de origem animal, como carnes de porco e frango, e também no leite (NOGUEIRA et.al., 2006). Entre os alimentos de origem animal, foi demonstrado que o transporte da OTA de rações para animais pode ocorrer em suínos e aves de capoeira. As dietas para suínos e aves baseiam-se em cereais e subprodutos de cereais até 50-60% com base na matéria seca, e estas matérias-primas são o substrato preferido para o crescimento de *Penicillium* e *Aspergillus*. Após a absorção gastrointestinal, a OTA é distribuída via sangue, principalmente para os rins e, em concentrações mais baixas, para o fígado, músculo e gordura. Mesmo que a ração esteja contaminada com baixos níveis, a ocorrência de resíduos de OTA nos tecidos se deve à alta afinidade da toxina por proteínas, como a albumina, que permite sua acumulação nos órgãos dos animais (DUARTE, PENA & LINO, 2010).

A ocorrência de OTA em carne foi avaliada uma única vez na região central de Portugal (GUILLAMONT et. al. 2005). Foram avaliadas 38 amostras de tecido muscular, sendo 12 amostras de frango, 13 suínos e 13 de peru. Nenhuma das amostras de músculo de frango analisadas apresentou níveis positivos de OTA, ao contrário das amostras de suínos (7,7%) e de peru (30,8%). A OTA foi encontrada numa amostra de músculo suíno que continha 0,12 µg/kg, e em quatro amostras de peru, com níveis variando de 0,04 a 0,01 µg/kg (média $0,02 \pm 0,03$ µg/kg). Nenhuma das amostras continha níveis acima dos níveis máximos estabelecidos pela UE para outros alimentos. A ingestão diária estimada de OTA, nos três diferentes tecidos musculares, estava abaixo da ingestão tolerável estabelecida (120 ng/kg pc/semana).

Os bebês têm uma dieta mais restrita e geralmente consomem mais alimentos comparativamente ao seu peso corporal do que os adultos. Portanto, a significância e o potencial risco à saúde de qualquer contaminante em alimentos consumidos por crianças é maior. O estudo realizado por Alvito et. al. (2010) visou determinar a ocorrência de OTA em alimentos processados à base de cereais (farinhas) e fórmulas infantis (leite em pó) disponíveis no mercado português, entre maio e junho de 2007, ambos vendidos como origem convencional e orgânica. Das 27 amostras analisadas para OTA, dez (67%) encontravam-se contaminadas, e o conteúdo variou de 0,034 a 0,212 µg/kg. Considerando os resultados apresentados, os autores concluíram que a presença dessa micotoxina em alimentos para bebês não constitui um problema de saúde pública. Todos os resultados foram inferiores aos níveis máximos estabelecidos na legislação da UE (0,5 ng/g) para alimentos à base de cereais e

alimentos para bebês destinados a lactentes e crianças jovens e fórmulas infantis e fórmulas complementares, incluindo leite infantil e leite de transição (ALVITO et. al. 2010).

I.3 Avaliação da exposição

A avaliação da exposição humana à OTA pode ser avaliada com base na sua ocorrência em alimentos combinados e em dados de consumo, ou seja no cálculo da ingestão diária estimada (EDI), e/ou na biomonitorização de bioarcadores em fluidos biológicos.

A EDI com base nos dados de contaminação e consumo de alimentos pode ser útil em uma primeira abordagem; no entanto, a biomonitorização pode refletir a exposição efetiva e explicar variações, por exemplo, nos níveis de contaminação de alimentos, consumo de alimentos e técnicas de preparação de alimentos (SHEPHARD et al., 2013).

I.3.1 Ingestão diária estimada (EDI)

Dos dados que Portugal enviou ao estudo acima referido para avaliação da ingestão dietética de OTA pela população dos Estados-Membros da UE, a ingestão alimentar total da população foi calculada em 0,81 ng/kg pc/dia, sendo o trigo e a farinha branca (trigo) os que mais contribuíram para a exposição da população com 0,69 ng/kg pc/dia (~ 85%). Os demais alimentos foram o café (0,09 ng/kg pc/dia), o vinho (0,02 ng/kg pc/dia) e a cerveja (0,01 ng/kg pc/dia) (EC SCOOP, 2002).

No primeiro estudo de exposição e avaliação de risco da OTA para a população dos Estados Unidos, uma variedade de alimentos adquiridos em supermercados, em todo o país, foram analisados para a determinação de OTA durante um período de 2 anos. A exposição à OTA foi calculada a partir das concentrações de OTA em alimentos e dados de consumo para diferentes faixas etárias. A maioria das amostras de alimentos e bebidas avaliadas tinham OTA não detectável; no entanto, nalgumas amostras de frutas secas, cereais matinais, cereais infantis e cacau verificou-se a presença de OTA. Nos EUA, a exposição à OTA é mais alta em bebês e crianças pequenas que consomem grandes quantidades de cereais à base de aveia (MITCHELL et. al., 2017).

I.3.2 Biomonitorização

Em geral, a biomonitorização é preferível à avaliação da contaminação de alimentos, dado que variações nos métodos de preparo de alimentos, ingestão de alimentos, nível de contaminação, absorção intestinal, distribuição e excreção de toxinas levam a variações individuais na exposição que são medidas mais prontamente com um biomarcador (DUARTE, PENA & LINO, 2010).

A biomonitorização da OTA no Homem é favorecida pelo seu longo tempo de meia-vida, resultante da intensa afinidade da toxina pelas proteínas plasmáticas e da recirculação entero-hepática. Apesar de resultar em níveis sanguíneos de OTA relativamente mais altos, o biomarcador urinário de exposição à OTA é uma alternativa não invasiva, cada vez mais importante com o advento de metodologias de análise mais sensatas e precisas. Ao contrário dos biomarcadores sanguíneos comprometidos pela concentração em estado estacionário, a OTA na urina mostrou-se mais próxima do nível de consumo entre a população geral (DUARTE et al., 2012).

A determinação da OTA no sangue humano tem sido usada como um indicador da exposição humana a esta micotoxina na dieta, no entanto, a avaliação sempre foi baseada em suposições e extrapolações relativas à biodisponibilidade e taxas de depuração da OTA com base em dados de animais (EFSA, 2006). A análise da OTA em amostras de sangue humano é comprometida pelo longo tempo de meia-vida da toxina, o que leva a que uma exposição frequente na dieta resulte em uma concentração em estado estacionário. Isto é confirmado por um estudo de dieta total com 50 indivíduos, no qual amostras de dieta duplicada bem como amostras de plasma e urina foram analisadas durante um período de 30 dias (GILBERT et al., 2001). A análise dos alimentos indicou níveis de OTA que corresponderam a uma ingestão média que variou entre 0,26 e 3,54 ng/kg pc/dia ao longo dos 30 dias. A OTA foi encontrada em todas as amostras de plasma e em 46 amostras de urina. A correlação entre os níveis plasmáticos de OTA e seu consumo não foi significativa (limite de confiança de 95%). No entanto, uma correlação significativa foi encontrada entre o consumo de OTA e a sua concentração urinária (GILBERT et al., 2001).

Em Portugal, vários estudos já foram realizados sobre a presença de OTA na urina humana e no soro sanguíneo de diferentes populações adultas (DUARTE et al., 2012; LINO et al., 2008; PENA et al., 2006). Considerando as avaliações de exposição à OTA derivadas de amostras

de sangue, os níveis séricos de OTA foram avaliados em 104 amostras das cidades de Coimbra, Verride e Ereira (LINO et al., 2008). O estudo revelou uma frequência de detecção de 100%. As concentrações variaram de 0,25 a 2,49 µg/l, 0,14 a 1,91 µg/l, e 0,19 a 0,96 µg/l, para amostras de Verride, Ereira e Coimbra, respectivamente. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os sexos nos três locais estudados.

Em relação as avaliações de exposição a OTA em urina, o estudo realizado por Pena et al., analisou um total de 60 amostras de urina humana coletadas na cidade de Coimbra. A OTA foi confirmada em 42 amostras (70%), em concentrações acima do LOQ, que variaram entre 0,02 e 0,105 ng/mL (PENA et al., 2006). Já o estudo de Duarte et. al., examinou fatores relacionados à exposição à OTA na população adulta durante um período de um ano. Medidas antropométricas, estação do ano e região foram os fatores selecionados para correlação com o biomarcador de exposição à OTA. Amostras de urina de 95 habitantes de seis principais áreas geográficas portuguesas foram analisadas, e no geral, as amostras de inverno e verão dos 95 participantes apresentaram uma incidência de 87,4% e 81,1% e um nível médio de $0,022 \pm 0,015$ e $0,016 \pm 0,008$ ng/ml, respectivamente (DUARTE et al., 2012).

No que diz respeito à presença de OTA em fluidos biológicos infantis, apenas três estudos, dos Camarões (EDIAGE et al., 2012), Serra Leoa (JONSYN-ELLIS, 2000) e Bélgica (HEYNDRICKX et al., 2015), estão disponíveis. Nos três estudos utilizou-se urina das crianças para avaliar este biomarcador. Na discussão da presente dissertação estes artigos serão discutidos com maior detalhe.

I.4 Métodos analíticos

O desenvolvimento de métodos analíticos com alta sensibilidade, especificidade, viabilidade, rapidez, reprodutibilidade e facilidade de uso, além de exatidão e precisão, são essenciais na micotoxicologia para avaliar exposição humana (HAYASHI et al., 2008).

A alta sensibilidade do método analítico para análise de OTA é essencial, visto que a concentração desses analitos nas amostras de urina geralmente está presente em níveis de concentração muito baixos. Todos os estudos analisados (Tabela 2) utilizaram metodologias analíticas que se baseiam na extração e purificação seguida da detecção e quantificação com diferentes técnicas cromatográficas.

Como a OTA é um ácido fraco, a fase móvel deve ser ácida. Usualmente são utilizadas misturas de acetonitrila ou metanol com ácido fosfórico aquoso ou ácido acético. Na tabela 2 estão descritos os métodos analíticos mais usados para determinação de OTA em urina.

Na etapa de extração/purificação, a maioria dos investigadores recorre a colunas de imunoafinidade (IAC) (GILBERT et al., 2001; FAZEKAS, TAR & KOVÁCS, 2005; PENA et al., 2006; MANIQUE et al., 2008; DUARTE et al., 2009; DOMIJAN et al., 2009; AKDEMIR et al., 2010; SOLFRIZZO et al., 2011; DUARTE et al., 2012; EDIAGE et al., 2013; SHEPHARD et al., 2013; ALI, MUÑOZ, & DEGEN, 2017). Estas colunas contêm anticorpos monoclonais capazes de captar e purificar micotoxinas, e sua alta especificidade permite obter extratos limpos para posterior detecção por métodos cromatográficos (HAYASHI et al., 2008).

Outros investigadores optam pela extração líquido-líquido (LLE) com clorofórmio e ácido acético (Jonsyn-ellis, 2000), clorofórmio e isopropanol (Munoz et al., 2010; Coronel et al., 2011; Klapac et al., 2012), acetonitrila e água (Warth et al., 2014) ou acetato e ácido fórmico (Heyndrickx et al., 2015). Apenas um dos autores optou pela microextração em fase sólida (SPME) (Vatinno et al., 2008).

Quanto à etapa final do processo que envolve a determinação qualitativa e quantitativa da OTA a maioria dos investigadores recorreram a métodos analíticos como a cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por fluorescência (LC-FD) (JONSYN-ELLIS, 2000; GILBERT et al., 2001; FAZEKAS, TAR & KOVÁCS, 2005; PENA et al., 2006; MANIQUE et al., 2008; DUARTE et al., 2009; DOMIJAN et al., 2009; AKDEMIR et al., 2010; MUNOZ et al., 2010; CORONEL et al., 2011; DUARTE et al., 2012; KLAPEC et al., 2012; ALI, MUÑOZ, & DEGEN, 2017).

Alguns autores optaram por cromatografia líquida com detecção por espectrometria de massa em *tandem* (LC-MS/MS) (WARTH et al., 2014; HEYNDRICKX et al., 2015), nomeadamente utilizando como fonte de ionização *electrospray* (LC-ESI-MS/MS) (SOLFRIZZO et al., 2011; EDIAGE et al., 2013; VATINNO et al., 2008). A cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a espectrometria de massa em *tandem* (UPLC-MS/MS) foi também usada por Shephard et al. (2013).

Tabela 2 – Metodologias analíticas para determinação de OTA em urina

Matriz	Extração/ Purificação	Deteccção e Quantificação	LOD/ LOQ (ng/ml)	Referência
Urina	LLE CHCl ₃ :CH ₃ COOH (99:1, v/v)	LC-FD	0,2 / -	Jonsyn-ellis, 2000
Urina	IAC	LC-FD	- / -	Gilbert et al., 2001
Urina	IAC	LC-FD	0,004 / 0,006	Fazekas, Tar & Kovács, 2005
Urina	IAC	LC-FD	- / 0,02	Pena et al., 2006
Urina	IAC	LC-FD	- / 0,007	Manique et al., 2008
Urina	SPME	LC-ESI-MS/MS	0,3 / 0,7	Vatinno et al., 2008
Urina	IAC	LC-FD	- / 0,008	Duarte et al., 2009
Urina	IAC	LC-FD	0,005 / -	Domijan et al., 2009
Urina	IAC	LC-FD	0,006 / 0,018	Akdemir et al., 2010
Urina	LLE CHCl ₃ : isopropanol (97:3, v/v)	LC-FD	0,02 / 0,05	Munoz et al., 2010

Tabela 2 – Metodologias analíticas para determinação de OTA em urina (continuação)

Matriz	Extração/ Purificação	Deteção e Quantificação	LOD/ LOQ (ng/ml)	Referência
Urina	LLE CHCl ₃ : isopropanol (97:3, v/v)	LC-FD	0,034 / 0,112	Coronel et al., 2011
Urina	IAC	LC-ESI-MS/MS	0,03 / -	Solfrizzo et al., 2011
Urina	IAC	LC-FD	0,0024 / 0,008	Duarte et al., 2012
Urina	LLE CHCl ₃ : isopropanol (97:3, v/v)	LC-FD	0,016 / 0,053	Klapec et al., 2012
Urina	IAC	LC-ESI-MS/MS	0,2 / 0,6	Ediage et al., 2013
Urina	IAC	UPLC-MS/MS	0,002 / 0,007	Shephard et al., 2013
Urina	LLE ACN:H ₂ O (10:90, v/v)	LC-MS/MS	0,05 / 0,17	Warth et al., 2014
Urina	LLE Acetato:ác. fórmico (99:1, v/v)	LC-MS/MS	0,001 / -	Heyndrickx et al., 2015
Urina	IAC	LC-FD	0,01 / 0,02	Ali, Muñoz, & Degen, 2017

2. PARTE EXPERIMENTAL

2.1 Materiais e Métodos

2.1.1 Amostragem

Um total de 80 amostras de urina humana foram coletadas de crianças saudáveis, de 2 a 13 anos ($6,1 \pm 2,5$), residentes em Portugal. Dos 80 participantes envolvidos neste estudo, 53,75% ($n = 43$) eram do sexo feminino e 46,25% ($n = 37$) do sexo masculino. As meninas tinham idade entre 2 e 13 anos ($5,9 \pm 2,5$) e os meninos tinham entre 2 e 12 anos de idade ($6,5 \pm 2,4$). Na tabela 3 encontram-se resumidas as características antropométricas da população estudada.

Tabela 3 – Dados antropométricos da população estudada

Sexo	Amostra (n)	Peso (kg)		Idade (anos)		Altura (cm)	
		Intervalo	Média \pm SD	Intervalo	Média \pm SD	Intervalo	Média \pm SD
Feminino	53,75 (43)	[12:43]	22,6 \pm 9,4	[2:13]	5,9 \pm 2,5	[90:151]	117,6 \pm 52,3
Masculino	46,25% (37)	[12:54]	24,0 \pm 9,9	[2:12]	6,5 \pm 2,4	[90:161]	119,8 \pm 25,8
Total	100% (80)	[12:54]	23,3 \pm 9,7	[2:13]	6,1 \pm 2,5	[90:161]	118,8 \pm 44,2

As amostras foram coletadas de setembro de 2018 a fevereiro de 2019, nas regiões de Coimbra (66 amostras, 82,5%), Aveiro (6 amostras, 7,5%), Leiria (3 amostras, 3,75%), Lisboa (2 amostras, 2,5%), Porto (2 amostras, 2,5%), e Santarém (1 amostra, 1,25%). Uma vez que a primeira urina da manhã é a mais concentrada, foi solicitado aos participantes a sua recolha em copo estéril. Após a colheita, as amostras foram devidamente identificadas e encaminhadas para o laboratório e mantiveram-se congeladas ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) até à sua análise.

Os pais ou responsáveis de todas as crianças do estudo assinaram um termo informado consentindo a participação voluntária dos filhos no estudo (Anexo 1). Foram convidados também a preencher um questionário sociodemográfico (que inclui questões como peso, altura, área de residência e nível educacional dos pais) e alimentar (sobre o padrão alimentar da criança) (Anexo 2). Quer às amostras quer aos questionários foi atribuído um código para garantir o anonimato dos participantes. O estudo foi realizado de acordo com a Declaração de Helsínquia.

2.1.2 Reagentes e Materiais

Os reagentes de grau HPLC utilizados foram acetonitrilo (Carlos Erba, Milão, Itália), e o metanol (grau de pureza $\geq 99.9\%$, Chrosmasolv, Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha). O ácido acético glacial foi obtido da Panrec Química (Sal, Barcelona, Spain). A água foi obtida a partir do sistema de filtração Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, USA). As pastilhas de PBS utilizadas e o padrão de OTA foram adquiridos à Sigma Chemicals Co. (St. Louis, EUA).

Para o pré-tratamento da amostra foi utilizado bicarbonato de sódio (Pronolab, José M. Vaz Pereira, S.A.). Para purificação das amostras foram utilizadas colunas de Imunoafinidade (IAC) OchrestestTM (Viacom / Watertown, EUA); centrífuga Meditronic S-599 (Selecta, Barcelona, Espanha); misturador Vortex Retsh (Haan, Alemanha); SPE de Aschcroft (Stratforf, CT, USA) ligado a um coletor de vácuo de Macherey-Nagel (USA); Bomba Dinko (mol. D-95, 130W, 220V). Todos os solventes cromatográficos e a água foram filtrados através de um filtro de membrana de poliamida de 0,2 μm (Whatman GmbH, Dassel, Alemanha) sob vácuo e degaseificados por 15 min em banho de ultrassons (Sonorex RK 100, Berlim, Alemanha).

O aparelho de cromatografia líquida (LC) consistiu numa bomba 305 Gilson (Gilson Medical Electronics, Villiers-le-Bel, França), um injetor Rheodyne 7125 (Cotati, Califórnia, EUA), e um detector fluorimétrico (FD) (Jasco, FP-2020 Plus, Japão) operado a um comprimento de onda de excitação de 333 nm e um comprimento de onda de emissão 460 nm. A largura de banda espectral foi 10 nm para excitação e emissão.. Foi utilizada uma coluna C18-5 μm , Nucleosil 120 KS (250 x 4.6 mm d.i.).

2.1.3 Preparação de soluções

A solução de NaHCO_3 a 5% foi preparada, num balão de 500 mL, com 25 g de bicarbonato de sódio perfazendo o volume com a água bidestilada.

A fase móvel constituída por uma mistura de ACN:H₂O:CH₃COOH (49,5:49,5:1) foi filtrada através de filtros de membrana de poliamida de 0,2 µm e desgaseificada durante 15 min em banho de ultrassons.

A solução padrão stock de OTA foi preparada a 250 µg/ml, por diluição com tolueno:ácido acético (49,5:0,5 v/v). A solução intermédia foi preparada por diluição da solução padrão a 10 µg/ml com fase móvel. As soluções padrão para a curva de calibração em fase móvel foram preparados entre 1 e 10 ng/ml (1; 2; 5; 7,5; 10 ng/mL). As concentrações para a curva de calibração na matriz foram preparadas entre 0,02 e 0,15 ng/mL (0,02; 0,035; 0,075; 0,112; 0,15 ng/mL).

2.1.4 Extração e purificação de amostras

De acordo com uma metodologia analítica desenvolvida anteriormente (Duarte et al., 2012), num tubo falcon de 50 mL, 10 mL de urina humana adicionados de 10 mL de uma solução de NaHCO₃ a 5% foram centrifugados, durante 15 minutos, a 4 °C. Após centrifugação, o sobrenadante foi purificado através de uma coluna IAC OchraTest™ a uma taxa de fluxo de aproximadamente 1 gota/s. A coluna foi lavada, duas vezes, com 5 mL de água Milli-Q, e a OTA foi então lentamente eluída da coluna com 3 mL de metanol. O eluato foi evaporado à secura sob uma corrente de azoto a 50 °C e o resíduo seco foi dissolvido em 300 µl de fase móvel. Finalmente, 50 µl foram injetados na coluna HPLC.

As colunas IAC foram regeneradas, de acordo com Scott e Trucksess (1997), com 5 mL de metanol, seguido por 20 mL de solução de PBS (pH 7,4). As colunas preenchidas com solução PBS, foram armazenadas à temperatura ambiente até à próxima utilização. Esta regeneração nunca foi feita mais de uma vez.

2.1.5 Deteção e Quantificação

A análise das amostras de urina foi realizada, à temperatura ambiente, por LC-FD. Foram injetados 50µL da amostra, com a fase móvel a um fluxo de 1ml/min. Os comprimentos de onda usados foram 333 nm, para excitação, e 460 nm para a emissão.

A identificação e quantificação da OTA foi conseguida pelo método de padrão externo, através da comparação das áreas dos picos cromatográficos das amostras com as do padrão de OTA.

2.1.6 Ensaios de fortificação

Afim de avaliar a exatidão e a precisão do método, realizaram-se ensaios de fortificação. Através destes ensaios foram obtidas as percentagens de recuperação, sendo assim possível avaliar a exatidão do método para cada um dos três níveis de fortificação. A precisão do método foi analisada através da repetibilidade intra e inter-dia.

Foram efetuados três níveis distintos de fortificação, 0,02, 0,075, e 0,15 ng/ml. Para cada nível de fortificação foram efetuados três replicados. Para o efeito utilizou-se a solução padrão de OTA com concentração de 10 ng/ml. As amostras fortificadas foram sujeitas ao processo de extração e purificação e injetadas no LC-FD.

2.2 Resultados e discussão

2.2.1 Desempenho analítico

Linearidade

A avaliação da linearidade do método, em solução padrão e em matriz, foi realizada por meio de uma curva de calibração obtida através um processo de regressão linear dos mínimos quadrados da área do pico em função da concentração. A linearidade da OTA em fase móvel foi avaliada com as soluções de trabalho a cinco níveis de concentração, entre 1 e 10 ng/ml. O resultado encontrado foi apropriado, de acordo com o que se evidencia no coeficiente de correlação ($r^2=0,9968$) (Figura 3)

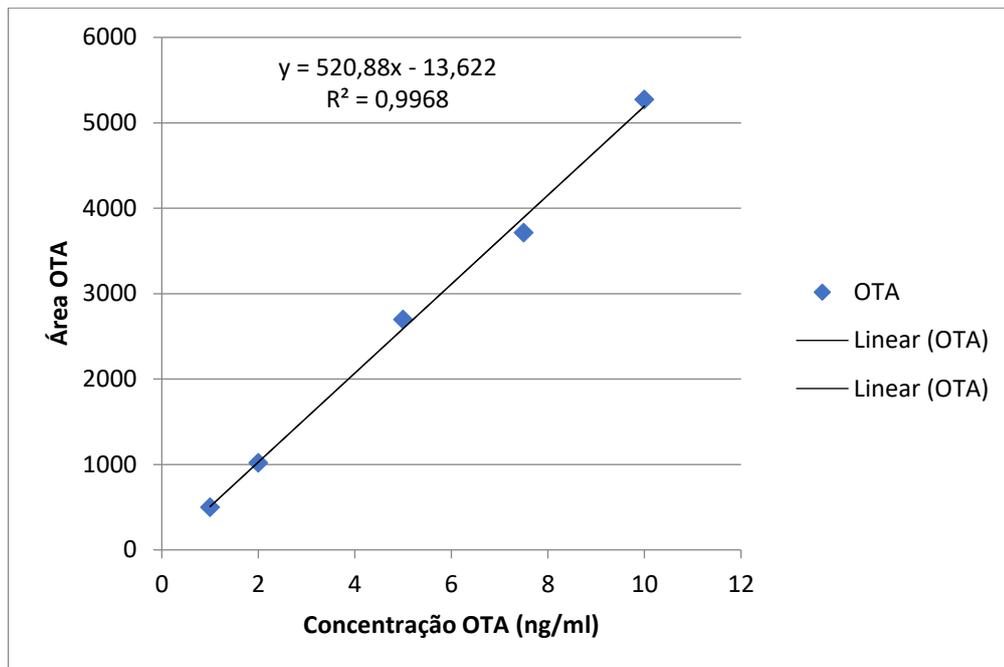


Figura 3 – Curva de calibração de OTA em fase móvel

A curva de calibração em matriz foi obtida com diferentes concentrações de OTA, entre 0,02 e 0,15 ng/ml. Verificou-se linearidade adequada, evidenciado pelo coeficiente de correlação, $r^2=0,9991$ (Figura 4).

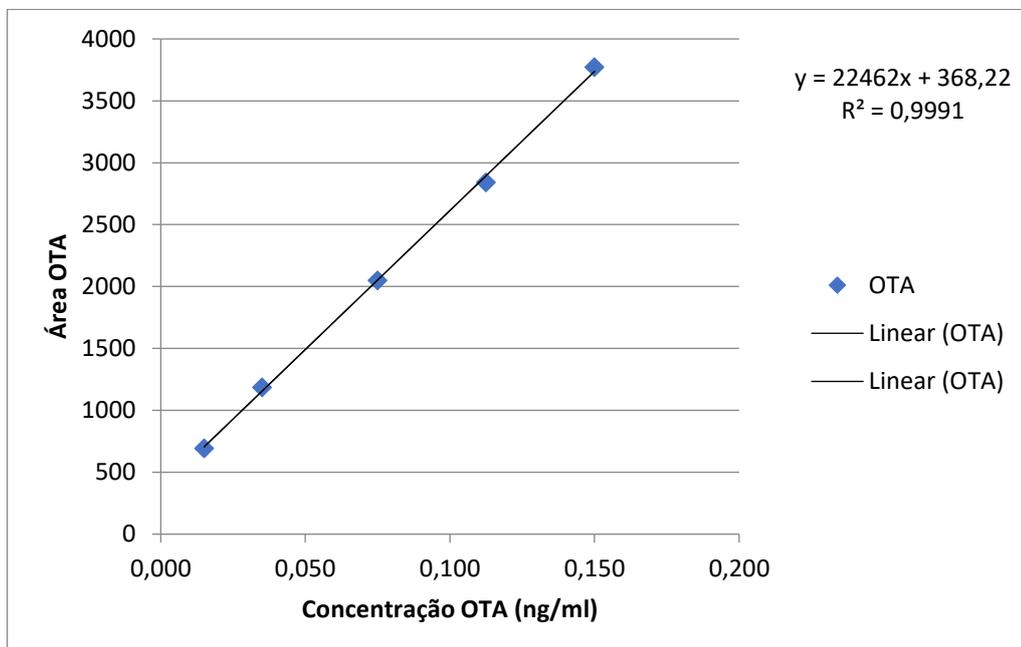


Figura 4 – Curva de calibração de OTA em matriz

Efeito-matriz

As curvas de calibração, com solução padrão em matriz, foram utilizadas para calcular o efeito de matriz (ME), associando o declive da calibração na matriz (B) que é dividido pelo declive da calibração do padrão em solvente (A). Assim, a razão $(B/A \times 100)$ foi definida como o efeito de matriz absoluto (ME %).

O valor do efeito matriz absoluto obtido foi de 100,23%. O valor obtido foi interpretado como da seguinte maneira: valores de 100% demonstram uma ausência de efeito de matriz, valores superiores a 100% indicam um aumento do sinal e abaixo de 100% uma supressão de sinais (Rubert *et al.*, 2011).

Limite de detecção e quantificação

O limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ) foram estimados através da curva de calibração em matriz como $|3.3S_{y/x}|/b$ e $|10S_{y/x}|/b$, respectivamente, onde b corresponde ao declive da curva e $S_{y/x}$ corresponde ao desvio padrão residual da função linear. Os valores obtidos foram de 0,01 ng/ml para o LOD e 0,019 ng/ml para o LOQ. Estes valores foram considerados adequados tendo em conta a matriz em análise.

Os LODs descritos na literatura, relativamente à OTA em urina de humanos, variaram entre 0.001–0.045 ng/ml, para o método de LC-MS/MS (Ahn *et al.*, 2010) e 0,1 ng/ml para o método de LC-FD (Gilbert *et al.*, 2001). Referente ao LOQ, uma pesquisa acerca da ocorrência de OTA em urina humana por LC-FD, encontrou um valor semelhante para o LOQ, de 0,02 ng/ml (Pena *et al.*, 2006). Neste contexto, o LOD e LOQ encontrados na metodologia analítica utilizada é consistente com os dos valores encontrados na literatura científica.

Exatidão e Precisão

A exatidão de um método analítico é estimada pela proximidade dos resultados de recuperação do analito obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro adicionado à amostra, utilizando-se de um mesmo procedimento experimental para uma mesma amostra por repetidas vezes (THOMPSON *et al.*, 2002). A exatidão do método foi

calculada por ensaios de fortificação a três níveis distintos, de 0,02, 0,075, e 0,15 ng/ml com três replicados para cada nível, numa amostra de urina. As recuperações médias variaram de 94,12%, 97,84% e 90,06% para os níveis de fortificação de 0,02, 0,075, e 0,15 ng/ml, respectivamente (Tabela 4).

A precisão do método utilizado foi avaliada através da repetibilidade intra-dia e inter-dia das amostras fortificadas nos três níveis citados à cima. A repetibilidade intra-dia variou entre 0,97% e 7,06% para níveis de fortificação de 0,075 e 0,15 ng/ml, respectivamente. Já a repetibilidade inter-dia variou entre 6,83% e 10,58% para 0,15 e 0,075 ng/ml, respectivamente (Tabela 4). Assim, para os três níveis de fortificação, as percentagens de recuperação foram superiores a 90% e o desvio padrão relativo foi inferior a 11%, o que demonstra adequada exatidão e precisão da metodologia analítica

Tabela 4 – Estudo de validação da metodologia analítica para a determinação de OTA em urina

Nível de fortificação (ng/ml)	Exatidão (%)	Repetibilidade intra-dia (%RSD) ^a	Repetibilidade inter-dia (%RSD) ^a
0,02	94,12	5,98	9,12
0,075	97,84	0,97	10,58
0,15	90,06	7,06	6,83

^a RDS – Desvio Padrão Relativo

2.2.2 Ocorrência de OTA em urina de crianças

Utilizando-se a metodologia descrita acima, 80 amostras de urina humana, de 80 crianças saudáveis que vivem em Portugal, foram analisadas. As amostras foram coletadas pelos responsáveis das crianças, sendo colhida a primeira urina do dia. A OTA foi detectada em 60 amostras (75%), com concentrações variando <LOQ a 0,052 ng/ml e concentração média de 0,020 ng/ml (Tabela 5). Destas, 31 (51,66%) amostras apresentavam níveis de OTA acima do LOQ.

Para comparação entre os níveis de contaminação da OTA e os dados antropométricos, amostras contaminadas com concentração entre o LOD e o LOQ, foram consideradas metade do LOQ; para amostras abaixo do LOD, metade do LOD foi considerada.

Comparando os dados por sexo, a OTA foi detectada em 78,4% das amostras do sexo masculino, com concentrações variando de <LOQ a 0,050 ng/ml e média de 0,022 ng/mL (Tabela 5). Nas amostras femininas, a OTA foi detectada em 73,8% das amostras, com concentrações variando de <LOQ a 0,052 ng/ml e média de 0,018 ng/mL (Tabela 5). Não foram encontradas diferenças significativas entre o teor e a frequência de OTA referente ao sexo das crianças.

Em relação à idade, crianças na idade pré-escolar (2-5 anos) tiveram menor média no teor no OTA detectado (0,018 ng/ml para o sexo masculino e 0,015 ng/ml para o sexo feminino) que as crianças em idade escolar (6-13 anos) (0,024 ng/ml para o sexo masculino e 0,022 ng/ml para o sexo feminino) (Tabela 5). Isto pode ser explicado pelo facto de as crianças à partir dos 6 anos de idade já se alimentam com maior frequência fora do lar, e consomem uma maior variedade de alimentos, o que pode ter influenciado neste resultado. Não foram encontradas diferenças significativas entre o teor e a frequência de OTA comparando com a idade das crianças, o seu peso ou a sua altura.

Tabela 5 – Níveis médio, mínimo e máximo (ng/mL) e frequência (%) de OTA nas amostras de urina

	Frequência%	Média	Mínimo	Máximo
Total	75,0	0,020	nd	0,052
Sexo Masculino	78,4	0,022	nd	0,050
2-5	76,9	0,019	<LOQ	0,034
6-12	79,2	0,024	<LOQ	0,050
Sexo Feminino	73,8	0,018	nd	0,052
2-5	66,6	0,015	nd	0,037
6-13	80,9	0,022	<LOQ	0,052

nd - não detectado

Em um estudo realizado com crianças da Serra Leoa, a OTA foi encontrada na urina de 21% (n=29) das amostras do sexo masculino e 31% (n=34) das amostras do sexo feminino, tendo o nível variado de 0,07 a 148 ng/ml (JONSYN-ELLIS, 2000). Em outro estudo, realizado na Bélgica, os resultados mostraram que 51% das amostras de urina de crianças estavam contaminados com OTA, sendo o nível médio de 0,079 ng/ml e máximo de 36,83 ng/ml (HEYNDRICKX et al., 2015). Finalmente, foi realizado um estudo nos Camarões para investigar a exposição à micotoxinas em crianças (n = 220, com idades entre 1,5 e 4,5 anos).

A OTA estava presente em 32% das amostras, variando entre 0,04 e 2,4 ng / mL (NJUMBE EDIAGE et al., 2013).

Em comparação, apesar de no presente estudo a frequência de OTA ter sido mais alta que as encontradas na literatura, os teores máximos e médios foram significativamente mais baixos.

A maioria dos estudos publicados foi realizada na população adulta. Em Portugal, já foram realizados estudos sobre a presença de OTA na urina humana de diferentes populações adultas (DUARTE et al., 2012; MANIQUE et al., 2008; PENA et al., 2006). No estudo de Pena et al. (2006), foram coletadas e analisadas 60 amostras de urina de adultos. Destas, 42 (70%) estavam contaminadas com concentrações acima do LOQ, com valores entre 0.02 e 0.105 ng/ml, e média de 0,038 ng/ml. Já o estudo de Manique et al. (2008) analisou amostras de urina de 30 indivíduos saudáveis, sendo duas amostras por pessoa, uma coletada na manhã e outra à tarde. Foram detectados níveis de OTA em 13 amostras da manhã e 14 amostras da tarde, com concentrações variando de 0,011 a 0,208 e 0,008 a 0,11 ng/ml, respectivamente.

No último estudo, de Duarte et al. (2012), encontraram, em geral, nas amostras de inverno e verão dos 95 participantes, uma incidência de 87,4% e 81,1% e um valor médio de $0,022 \pm 0,015$ e $0,016 \pm 0,008$ ng/ml, respectivamente. No entanto, na zona central do país, foi encontrada uma incidência de OTA variando entre 83,3% e 100% e um nível médio variando entre $0,010 \pm 0,001$ e $0,013 \pm 0,006$ ng / ml, no inverno e no verão, respectivamente. Pode-se verificar que os níveis encontrados em adultos da zona central foram aproximadamente metade dos encontrados no presente estudo com crianças.

2.2.3. Ingestão Diária Provável (PDI) e avaliação de risco

A avaliação do risco foi realizada comparando a ingestão diária provável (PDI) da OTA com a ingestão diária tolerável (TDI). O facto de a TDI ser excedida pode implicar um possível risco para a saúde da população em estudo. A PDI da OTA foi calculada usando as concentrações urinárias determinadas. A ingestão calculada foi posteriormente comparada com a TDI estabelecida pela EFSA, $0,017 \mu\text{g} / \text{kg pc} / \text{dia}$ (EFSA, 2006). A PDI ($\mu\text{g} / \text{kg pc} / \text{dia}$) foi calculada usando a seguinte equação:

$$PDI = \frac{CxVx100}{WxE}$$

Onde,

C = Concentração de OTA na urina (em ng/ml)

V = Produção diária de urina em crianças (foi considerado o volume de 1L)

W = Peso corporal reportado no questionário (em kg)

E = excreção urinária da OTA (foi considerado 50% de acordo com Heyndrickx et al. (2015) e 2,6% de acordo com Gambacorta et al. (2013)).

A falta de informação relativamente à taxa de excreção da OTA é notável (DUARTE et al., 2011), o que torna a incerteza no cálculo da PDI da OTA considerável (FAN et al., 2019). Enquanto alguns autores, com base em um estudo de exposição realizado com leitões (GAMBACORTA et al., 2013), consideram uma taxa de excreção de 2,6% (FAN et al., 2019; SOLFRIZZO et al., 2014), outros consideram uma taxa de excreção de 50% (FRANCO et al., 2019; HEYNDRICKX et al., 2015) com base no perfil toxicocinético da OTA após a ingestão de 395 ng de OH marcado com 3H por um voluntário humano (STUDER-ROHR et al., 2000).

No presente estudo, ambas as abordagens foram feitas para calcular a PDI da população em estudo e avaliar o seu risco de exposição, calculando a percentagem da PDI que excede o valor estabelecido da TDI, 0,017 µg / kg pc / dia (EFSA, 2006). Estes resultados devem ser considerados estimativas aproximadas, e não avaliações precisas de exposição, mas fornecem informações valiosas sobre a exposição das crianças em estudo (GERDING et al., 2015).

Foram realizadas duas avaliações da PDI com base em dois cenários diferentes. No primeiro, foram considerados os níveis médios de contaminação da OTA, enquanto no segundo, considerou-se o pior cenário com a maior concentração de OTA encontrada.

Como se observa na tabela 6, ao considerar uma taxa de excreção mais alta, 50%, a PDI calculada é consideravelmente menor que a TDI. De fato, considerando a contaminação média

da OTA das amostras (cenário I), a PDI é 10 vezes menor que a TDI. A percentagem da PDI que excede a TDI aumenta para cerca de 26% quando o pior cenário é considerado.

No entanto, esses números aumentam bastante quando a taxa de excreção considerada é de 2,6%. Nesse caso, o valor da PDI do primeiro cenário é de 0,033 $\mu\text{g}/\text{kg pc}/\text{dia}$ que excede o TDI em 194%; atingindo um valor de 500%, quando é considerado o pior cenário.

De qualquer modo, comparando com o estudo de Hendrickx et al. (2015) que reportaram uma PDI que excedeu em 1% a TDI estabelecida, os nossos resultados são significativamente superiores.

Tabela 6 – Ingestão diária provável ($\mu\text{g}/\text{kg pc}/\text{dia}$) e avaliação do risco.

	PDI_ER 50%	PDI_ER 2.6%	PDI_ER 50% /TDI^c (%)	PDI_ER 2.6% /TDI^c (%)
I ^a	0.0017	0.033	10	194
III ^b	0.0044	0.085	25.9	500

^a considerando a concentração média de OTA

^b considerando a concentração de OTA mais elevada

^c considerando a TDI de 0.017 $\mu\text{g}/\text{kg pc}/\text{dia}$ (EFSA, 2006)

CONCLUSÃO

A ocorrência de OTA em urina humana vem sendo relatada em diversos estudos por todo o mundo. No entanto, estudos em crianças ainda são muito escassos, apesar de estas poderem apresentar uma maior exposição à OTA devido ao peso corporal ser relativamente menor e serem grandes consumidoras de certos tipos de alimentos, resultando também em uma taxa excepcional de exposição. Este factos demonstram a relevância desta investigação.

O estudo evidenciou uma alta frequência (75%) da exposição das crianças portuguesas à OTA. A avaliação de risco com base nestes dados indica uma potencial preocupação, e devido à falta de dados de níveis tolerância de OTA na urina humana, a condução desses estudos para avaliar a segurança alimentar são altamente recomendados.

A coleta de urina é pouco invasiva, e demonstrou ser um bom marcador para acompanhamento da exposição de OTA na população infantil. É importante ainda adotar medidas preventivas e programas de controle na produção de alimentos, revendo os pontos críticos onde podem ocorrer a proliferação de fungos, com o intuito de evitar a produção de OTA e assim minimizar a exposição humana.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHN, J.; KIM, D.; KIM, H.; JAHNG, K.Y. (2010). Quantitative determination of mycotoxins in urine by LC-MS/MS. *Food Addit. Contam. Part A* 2010, 27, 1674–1682.
- AKDEMIR, C., ULKER, O. C., BASARAN, A., OZKAYA, S., & KARAKAYA, A. (2010). Estimation of ochratoxin A in some Turkish populations: an analysis in urine as a simple, sensitive and reliable biomarker. *Food and chemical toxicology*, 48(3), 877-882.
- ALI, N., MUÑOZ, K., & DEGEN, G. H. (2017). Ochratoxin A and its metabolites in urines of German adults—An assessment of variables in biomarker analysis. *Toxicology letters*, 275, 19-26.
- ALVITO, P. C., SIZOO, E. A., ALMEIDA, C. M., & VAN EGMOND, H. P. (2010). Occurrence of aflatoxins and ochratoxin A in baby foods in Portugal. *Food Analytical Methods*, 3(1), 22-30.
- BENETT, J. K. (2003). M. 2003. Mycotoxins. *Clinical Microbiology Reviews*, 16(3), 487-516.
- BHAT, R. V., & MILLER, J. D. (1991). Mycotoxins and food supply. *Food, Nutrition and Agriculture-Food for the Future.*, FAO.
- BRITO, N. M., JUNIOR, O. P. D. A., POLESE, L., & RIBEIRO, M. L. (2003). Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. *Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente*, 13.
- BUI-KLIMKE, T. R., & WU, F. (2015). Ochratoxin A and human health risk: A review of the evidence. *Critical reviews in food science and nutrition*, 55(13), 1860-1869.
- CALDAS, E. D., SILVA, S. C., & OLIVEIRA, J. N. (2002). Aflatoxinas e ocratoxina A em alimentos e riscos para a saúde humana. *Revista de Saúde Pública*, 36, 319-323.
- CASTEGNARO, M., CANADAS, D., VRABCHEVA, T., PETKOVA-BOCHAROVA, T., CHERNOZEMSKY, I. N., & PFOHL-LESZKOWICZ, A. (2006). Balkan endemic nephropathy: role of ochratoxins A through biomarkers. *Molecular nutrition & food research*, 50(6), 519-529.
- CORONEL, M. B., MARIN, S., TARRAGÓ, M., CANO-SANCHO, G., RAMOS, A. J., & SANCHIS, V. (2011). Ochratoxin A and its metabolite ochratoxin alpha in urine and

assessment of the exposure of inhabitants of Lleida, Spain. *Food and chemical toxicology*, 49(6), 1436-1442.

DOMIJAN, A. M., PERAICA, M., MARKOV, K., & FUCHS, R. (2009). Urine ochratoxin A and sphinganine/sphingosine ratio in residents of the endemic nephropathy area in Croatia. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology*, 60(4), 387-393.

DUARTE, S. C., ALVES, M. R., PENA, A., & LINO, C. M. (2012). Determinants of ochratoxin A exposure—A one year follow-up study of urine levels. *International journal of hygiene and environmental health*, 215(3), 360-367.

DUARTE, S.C., PENA, A., LINO, C.M., 2011. Human ochratoxin A biomarkers-from exposure to effect. *Critical Reviews in Toxicology* 41, 187–212.

DUARTE, S. C., PENA, A., & LINO, C. M. (2010). Ochratoxin A in Portugal: a review to assess human exposure. *Toxins*, 2(6), 1225-1249.

DUARTE, S.; BENTO, J.; PENA, A.; LINO, C. (2009). Ochratoxin A exposure assessment of the inhabitants of Lisbon during winter 2007/2008 through bread and urine analysis. *Food Addit. Contam. Part A Chem. Anal. Control. ExpoRisk. Assess.*, 26, 1411–1420.

EDIAGE, E. N., DI MAVUNGU, J. D., SONG, S., SIOEN, I., & DE SAEGER, S. (2013). Multimycotoxin analysis in urines to assess infant exposure: a case study in Cameroon. *Environment International*, 57, 50-59.

EFSA, 2006. Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in the food Chain on a Request from the Commission Related to Ochratoxin A in Food. Question N° EFSA-Q-2005-154. The EFSA Journal 365, 1–56.

EL KHOURY, A., & ATOUI, A. (2010). Ochratoxin A: general overview and actual molecular status. *Toxins*, 2(4), 461-493.

EUROPEAN COMMISSION (EC), SCOOP-task 3.2.7 (2002) - Assessment of dietary intake of Ochratoxin A by population in EU members states. Disponível em <https://ec.europa.eu>. Acesso em Maio 2018.

FAN, K., XU, J., JIANG, K., LIU, X., MENG, J., DI MAVUNGU, J.D., GUO, W., ZHANG, Z., JING, J., LI, HONGRU, YAO, B., LI, HUI, ZHAO, Z., HAN, Z., 2019. Determination of multiple

mycotoxins in paired plasma and urine samples to assess human exposure in Nanjing, China. *Environmental Pollution* 248, 865–873.

FAZEKAS, B., TAR, A., & KOVÁCS, M. (2005). Ochratoxin A content of urine samples of healthy humans in Hungary. *Acta Veterinaria Hungarica*, 53(1), 35-44.

FRANCO, L.T., PETTA, T., ROTTINGHAUS, G.E., BORDIN, K., GOMES, G.A., ALVITO, P., ASSUNÇÃO, R., OLIVEIRA, C.A.F., 2019. Assessment of mycotoxin exposure and risk characterization using occurrence data in foods and urinary biomarkers in Brazil. *Food and Chemical Toxicology* 128, 21–34.

FRISVAD, J. C., FRANK, J. M., HOUBRAKEN, J. A. M. P., KUIJPERS, A. F., & SAMSON, R. A. (2004). New ochratoxin A producing species of *Aspergillus* section *Circumdati*. *Studies in Mycology*, 50(1), 23-43.

GAMBACORTA, S., SOLFRIZZO, H., VISCONTI, A., POWERS, S., COSSALTER, A.M., PINTON, P., OSWALD, I.P., 2013. Validation study on urinary biomarkers of exposure for aflatoxin B I , ochratoxin A, fumonisin B I , deoxynivalenol and zearalenone in piglets. *World Mycotoxin Journal* 6, 299–308.

GERDING, J., ALI, N., SCHWARTZBORD, J., CRAMER, B., BROWN, D.L., DEGEN, G.H., HUMPF, H., 2015. A comparative study of the human urinary mycotoxin excretion patterns in Bangladesh , Germany , and Haiti using a rapid and sensitive LC-MS / MS approach 127–136.

GILBERT, J., BRERETON, P. AND MACDONALD, S. 2001. Assessment of dietary exposure to ochratoxin A in the UK using duplicate diet approach and analysis of urine and plasma samples. *Food Additives and Contaminants* 18: 1008-1093.

GUILLAMONT, E. M., LINO, C. M., BAETA, M. L., PENA, A. S., SILVEIRA, M. I. N., & VINUESA, J. M. (2005). A comparative study of extraction apparatus in HPLC analysis of ochratoxin A in muscle. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 383(4), 570-575.

HAYASHI, L., TAKABAYASHI, C. R., FUJII, S., RIBEIRO, R. M. R., SAMBATTI, P., GERAGE, A. C., & HIROOKA, E. Y. (2008). Avaliação da coluna de imunoafinidade em desenvolvimento para detecção de aflatoxina B1 por espectrofluorimetria. *Biosaúde*, 10(2), 91-106.

HEUSSNER, A., & BINGLE, L. (2015). Comparative ochratoxin toxicity: A review of the available data. *Toxins*, 7(10), 4253-4282.

HEYNDRICKX, E., SIOEN, I., HUYBRECHTS, B., CALLEBAUT, A., DE HENAUW, S., & DE SAEGER, S. (2015). Human biomonitoring of multiple mycotoxins in the Belgian population: Results of the BIOMYCO study. *Environment international*, 84, 82-89.

IAMANAKA, B. T., OLIVEIRA, I. S., & TANIWAKI, M. H. (2013). Micotoxinas em alimentos. *Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agrônômica*, 7, 138-161.

IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, International Agency for Research on Cancer, & World Health Organization. (1993). *Some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins* (Vol. 56). World Health Organization.

JONSYN-ELLIS, F. E. (2000). Aflatoxins and ochratoxins in urine samples of school children in Mokonde, Southern Sierra Leone. *Journal of nutritional & environmental medicine*, 10(3), 225-231.

JUAN, C.; MOLTÓ, J.C.; LINO, C.M.; MAÑES, J. Determination of ochratoxin A in organic and non-organic cereals and cereal products from Spain and Portugal. *Food Chem.* 2008, 107, 525–530

KLAPEC, T., ŠARKANJ, B., BANJARI, I., & STRELEC, I. (2012). Urinary ochratoxin A and ochratoxin alpha in pregnant women. *Food and chemical toxicology*, 50(12), 4487-4492.

KŐSZEGI, T., & POÓR, M. (2016). Ochratoxin A: molecular interactions, mechanisms of toxicity and prevention at the molecular level. *Toxins*, 8(4), 111.

LI, S., MARQUARDT, R. R., FROHLICH, A. A., VITTI, T. G., & CROW, G. (1997). Pharmacokinetics of ochratoxin A and its metabolites in rats. *Toxicology and applied pharmacology*, 145(1), 82-90.

LINO, C. M., BAETA, M. L., HENRI, M., DINIS, A. M. P., PENA, A. S., & SILVEIRA, M. I. N. (2008). Levels of ochratoxin A in serum from urban and rural Portuguese populations and estimation of exposure degree. *Food and Chemical Toxicology*, 46(3), 879-885.

- MALIR, F., OSTRY, V., PFOHL-LESZKOWICZ, A., MALIR, J., & TOMAN, J. (2016). Ochratoxin A: 50 years of research. *Toxins*, 8(7), 191.
- MANIQUE, R., PENA, A., LINO, C. M., MOLTÓ, J. C., & MAÑES, J. (2008). Ochratoxin A in the morning and afternoon portions of urine from Coimbra and Valencian populations. *Toxicon*, 51(7), 1281-1287.
- MITCHELL, N. J., CHEN, C., PALUMBO, J. D., BIANCHINI, A., CAPPOZZO, J., STRATTON, J., ... & WU, F. (2017). A risk assessment of dietary Ochratoxin a in the United States. *Food and Chemical Toxicology*, 100, 265-273.
- MUÑOZ, K., BLASZKEWICZ, M., & DEGEN, G. H. (2010). Simultaneous analysis of ochratoxin A and its major metabolite ochratoxin alpha in plasma and urine for an advanced biomonitoring of the mycotoxin. *Journal of chromatography B*, 878(27), 2623-2629.
- PENA, A., SEIFRTOVÁ, M., LINO, C., SILVEIRA, I., & SOLICH, P. (2006). Estimation of ochratoxin A in portuguese population: New data on the occurrence in human urine by high performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Food and Chemical Toxicology*, 44(9), 1449-1454.
- PERAICA, M., RADIĆ, B., LUCIĆ, A., & PAVLOVIĆ, M. (1999). Toxic effects of mycotoxins in humans. *Bulletin of the World Health Organization*, 77(9), 754.
- PITT, J. I. (2002). Biology and ecology of toxigenic *Penicillium* species. In *Mycotoxins and food safety* (pp. 29-41). Springer, Boston, MA.
- RINGOT, D., CHANGO, A., SCHNEIDER, Y. J., & LARONDELLE, Y. (2006). Toxicokinetics and toxicodynamics of ochratoxin A, an update. *Chemico-biological interactions*, 159(1), 18-46.
- RUBERT, J., SORIANO, J. M., MAÑES, J., & SOLER, C. (2011). Rapid mycotoxin analysis in human urine: a pilot study. *Food and Chemical Toxicology*, 49(9), 2299-2304.
- SAMSON, R. A., HOUBRAKEN, J. A. M. P., KUIJPERS, A. F., FRANK, J. M., & FRISVAD, J. C. (2004). New ochratoxin A or sclerotium producing species in *Aspergillus* section *Nigri*. *Stud Mycol*, 50, 45-61.

- SCOTT, P. M., & TRUCKSESS, M. W. (1997). Application of immunoaffinity columns to mycotoxin analysis. *Journal of AOAC International*, 80(5), 941-949.
- SHEPHARD, G. S., BURGER, H. M., GAMBACORTA, L., GONG, Y. Y., KRKA, R., RHEEDER, J. P., WARTH, B. (2013). Multiple mycotoxin exposure determined by urinary biomarkers in rural subsistence farmers in the former Transkei, South Africa. *Food and Chemical Toxicology*, 62, 217-225.
- HEYNDRICKX, E., SIOEN, I., HUYBRECHTS, B., CALLEBAUT, A., DE HENAUW, S., DE SAEGER, S. (2015). Human biomonitoring of multiple mycotoxins in the Belgian population: Results of the BIOMYCO study. *Environment International* 84, 82–89.
- SOLFRIZZO, M., GAMBACORTA, L., LATTANZIO, V. M., POWERS, S., & VISCONTI, A. (2011). Simultaneous LC–MS/MS determination of aflatoxin M I, ochratoxin A, deoxynivalenol, de-epoxydeoxynivalenol, α and β -zearalenols and fumonisin B I in urine as a multi-biomarker method to assess exposure to mycotoxins. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 401(9), 2831.
- STUDER-ROHR, I., SCHLATTER, J., & DIETRICH, D. R. (2000). Kinetic parameters and intraindividual fluctuations of ochratoxin A plasma levels in humans. *Archives of toxicology*, 74(9), 499-510.
- THOMPSON, M., ELLISON, S. L., & WOOD, R. (2002). Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis (IUPAC Technical Report). *Pure and Applied Chemistry*, 74(5), 835-855.
- VAN DER MERWE, K.J.; STEYN, P.S.; FOURIE, L. Ochratoxin A, a toxic metabolite produced by *Aspergillus ochraceus* Wilh. *Nature* 1965, 205, 1112–1113.
- VATINNO, R., VUCKOVIC, D., ZAMBONIN, C. G., & PAWLISZYN, J. (2008). Automated high-throughput method using solid-phase microextraction–liquid chromatography–tandem mass spectrometry for the determination of ochratoxin A in human urine. *Journal of Chromatography A*, 1201(2), 215-221.
- WAFI, E. W., YAHYA, R. S., SOBHI, M. A., ERAKY, I., EL-BAZ, M., EL-GAYAR, H. A., ... & CREPPY, E. E. (1998). Human ochratoxicosis and nephropathy in Egypt: a preliminary study. *Human & experimental toxicology*, 17(2), 124-129.

WARTH, B., PETCHKONGKAEW, A., SULYOK, M., & KRKA, R. (2014). Utilising an LC-MS/MS-based multi-biomarker approach to assess mycotoxin exposure in the Bangkok metropolitan area and surrounding provinces. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 31(12), 2040-2046.

WHO Expert Committee on Food Additives, & World Health Organization. (2002). Evaluation of certain mycotoxins in food: fifty-sixth report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) (1990) - Selected mycotoxins: ochratoxins, trichothecenes, ergot. "Environmental health criteria", 105 (1990) 27-70

WU, Q., DOHNAL, V., HUANG, L., KUCA, K., WANG, X., CHEN, G., & YUAN, Z. (2011). Metabolic pathways of ochratoxin A. *Current drug metabolism*, 12(1), 1-10.

ANEXOS

Anexo I - Formulário de consentimento



Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, Pólo das Ciências da Saúde, 3000-548 Coimbra

Formulário de Consentimento Informado para pais das crianças participantes no estudo intitulado “BIOMONITORIZAÇÃO DE AGROQUÍMICOS E MICOTOXINAS EM CRIANÇAS”

PARTE I: Página das informações

Introdução

Neste estudo pretende-se avaliar o grau de exposição das crianças Portuguesas a contaminantes como pesticidas, bisfenóis e micotoxinas. Uma vez que o estudo envolve crianças, é necessário que os seus progenitores deem a sua permissão. Contudo, não é necessário dar a permissão de imediato. Antes de decidir, poderá falar com qualquer pessoa com a qual se sinta confortável. De igual forma, se não entender alguma das palavras ou termos utilizados, poderá perguntar a quem efectua o questionário ou outro investigador presente.

Objectivo

É possível que o grau de exposição a alguns contaminantes, de origem natural (como as micotoxinas) ou artificial (como os agro-químicos) a um grupo da população vulnerável como as crianças não seja bem conhecido, pelo que é importante realizar estudos que possam, no futuro, contribuir para um conhecimento que sustente acções de prevenção, bem como apoie a regulamentação da utilização de alguns agroquímicos.

Tipo de intervenção

Recolha de urina e questionário.

Seleção de participantes

Pretende-se avaliar um grande número de crianças, em várias regiões de Portugal, a fim de que o estudo seja representativo.

Participação voluntária

Não é obrigatória a participação da criança no estudo. A qualquer momento a criança poderá abandonar o estudo.

Procedimento

No dia de recolha da amostra de urina é preenchido o questionário sociodemográfico (que inclui questões como peso, altura, área de residência) e alimentar (sobre o padrão alimentar da criança). O questionário demora cerca de 3 minutos a preencher.

Benefícios

Não existirá nenhum benefício imediato e directo, mas a participação da sua criança provavelmente irá ajudar-nos a ter um conhecimento científico mais amplo, que irá permitir a implementação de medidas adequadas de prevenção e controlo da exposição.

Pagamento

Não existirá nenhum pagamento pela participação da criança no estudo.

Confidencialidade

Não será partilhada qualquer informação da criança fora da equipa do estudo. 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.

Partilha dos resultados de investigação

No final do estudo, serão partilhados os resultados com os progenitores dos participantes (informação individual) e a comunidade científica (informação colectiva, sem identificação das crianças participantes).

Quem contactar

Em caso de alguma questão adicional, em qualquer momento do desenvolvimento do estudo, deverá ser contactada a Prof. Dr.^a Anagelina Pena, através do e-mail apena@ci.uc.pt ou telefone 239 488 400
Este trabalho foi aprovado pelo Conselho científico da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra.

PARTE II: Termo de consentimento

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. Consinto voluntariamente que o meu filho/ minha filha participe neste estudo.

Nome (legível) do pai/representante legal: _____

Assinatura do pai/ representante legal: _____

Data: ____ / ____ /2018

Se pai/representante legal iletrado:

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

Eu testemunhei a leitura exacta 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: ____/ ____/2018

Declaração do investigador que obteve consentimento

Eu li de forma exacta a página de informações ao pai/representante legal do potencial participante, e que todas as questões colocadas foram respondidas correctamente. Eu confirmo que o consentimento foi cedido livre e voluntariamente.

Uma cópia deste Formulário de Consentimento foi entregue ao pai/ representante legal do participante:

SIM

Nome (legível) do investigador que obteve consentimento: _____

A preencher conforme questionário correspondente:

Nome (próprio) da criança: _____
Código interno: _____

(Adaptado de http://www.who.int/rpc/research_ethics/informed_consent/en/)

Anexo 2 – Questionário sociodemográfico e alimentar



Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, Pólo
das Ciências da Saúde, 3000-548 Coimbra

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

Nome (próprio) da criança: _____	Recolha de urina: Data: ____/____/2018 Hora: __h__
Código interno: _____	

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: _____

DADOS SOCIO-DEMOGRÁFICOS

NÍVEL EDUCACIONAL DOS PAIS:

Pai: Ensino primário ≤12ºano Licenciatura Mestrado/
Doutoramento

Mãe: Ensino primário ≤12ºano Licenciatura Mestrado/
Doutoramento

RESIDÊNCIA: Localidade: _____ Concelho: _____ Distrito:

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

<1km 5km 10km 15km 20km >25km

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

<1km 5km 10km 15km 20km >25km

Distância da residência à **exploração animal** mais próxima:

<1km 5km 10km 15km 20km >25km

Utilização de agroquímicos (quando aplicável):

Não Sim

Se sim, no: Jardim Quintal/ horta

Se sim os seguintes agroquímicos:

<input type="checkbox"/> Fertilizantes ou adubos	<input type="checkbox"/> Fungicidas	<input type="checkbox"/> Nematicidas
<input type="checkbox"/> Herbicidas	<input type="checkbox"/> Moluscicidas	<input type="checkbox"/> Repelentes
<input type="checkbox"/> Rodenticidas	<input type="checkbox"/> Bactericidas	<input type="checkbox"/> Fumigantes
<input type="checkbox"/> Insecticidas	<input type="checkbox"/> Acaricidas	<input type="checkbox"/> 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
 <25% 50% 75% 100% Mercado/ produtores locais
 <25% 50% 75% 100% Supermercado
 <25% 50% 75% 100% Outros

LOCAL:

Cantina escolar: _____ número/ semana

Casa: _____ número/ semana

Restauração: _____ 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.

Na coluna correspondente à quantidade assinale se a porção que a criança habitualmente come é igual, maior ou menor do que a referida como porção média.

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	FREQUÊNCIA MÉDIA								QUANTIDADE			
		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 (i.e. 1 por dia)	Porção média	Menor	Igual	Maior
LACTICÍNIOS	LEITE									1 chávena = 250 ml			
	IOGURTE									Um = 125 g			
	QUEIJO									Uma fatia=30g			
	GELADO									Um ou 2 bolas			

Grupo	Alimento	FREQUÊNCIA MÉDIA								QUANTIDADE			
		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 (i.e. 1 por dia)	Porção média	Menor	Igual	Maior
GORDURAS	AZEITE									1 colher de sopa			
	MANTEIGA									1 colher de chá			

Grupo	Alimento	FREQUÊNCIA MÉDIA								QUANTIDADE			
		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 (i.e. 1 por dia)	Porção média	Menor	Igual	Maior
PÃES	PÃO BRANCO OU TOSTAS									Um ou 2 tostas			

	PÃO (OU TOSTAS) INTEGRAL, CENTEIO OU MISTURA									Um ou 2 tostas			
	BROA									1 fatia = 80 g			
	FLOCOS DE CEREAIS									1 chávena (sem leite)			
	ARROZ COZINHADO									½ prato			
	MASSAS, ESPARGUETE E MACARRÃO COZINHADOS									½ prato			

Grupo	Alimento	FREQUÊNCIA MÉDIA								QUANTIDADE			
		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 (i.e. 1 por dia)	Porção média	Menor	Igual	Maior
OVOS, CARNES E PEIXE	OVOS									Um			
	FRANGO									2 peças ou ¼ frango			
	PERU									1 porção ou duas peças			
	COELHO									1 porção = 120g			
	VACA									1 porção = 120g			
	PORCO									1 porção = 120g			
	CABRITO									1 porção = 120g			

	FÍGADO DE PORCO										1 porção = 120g			
	FÍGADO VACA										1 porção = 120g			
	FIAMBRE, CHOURIÇO, SALPICÃO, PRESUNTO										2 fatias ou 3 rodelas			
	SALSICHAS										3 médias			
	TOUCINHO E BACON										2 fatias			

Grupo	Alimento	FREQUÊNCIA MÉDIA								QUANTIDADE			
		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 (i.e. 1 por dia)	Porção média	Menor	Igual	Maior
DOCES	BOLACHAS TIPO MARIA, ÁGUA E SAL OU INTEGRAIS									3 bolachas			
	OUTRAS BOLACHAS OU BISCOITOS									3 bolachas			
	CHOCOLATE (TABLETE OU EM PÓ)									3 quadrados; 1 colher de sopa			
	SNACKS DE CHOCOLATE (MARS, TWIX, KIT KAT, ETC)									Um			

Grupo	Alimento	FREQUÊNCIA MÉDIA								QUANTIDADE			
		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 (i.e. 1 por dia)	Porção média	Menor	Igual	Maior
FRUTOS SECOS E OUTROS	AMÊNDOAS									½ chávena (descascado)			
	AVELAS									½ chávena (descascado)			
	AMENDOINS									½ chávena (descascado)			
	NOZES									½ chávena (descascado)			
	AZEITONAS									6 unidades			

Grupo	Alimento	FREQUÊNCIA MÉDIA								QUANTIDADE			
		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 (i.e. 1 por dia)	Porção média	Menor	Igual	Maior
BEBIDAS	SUMOS DE FRUTO OU NÉCTARES EMBALADOS									1 garrafa ou 1 lata			

(Adaptado de http://www.who.int/rpc/research_ethics/informed_consent/en/)