



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

ESTÉFANY SANTOS REDONDO

**AFLATOXINA M1 NA URINA PARA CARACTERIZAÇÃO DE  
RISCO À SAÚDE DEVIDO A EXPOSIÇÃO ALIMENTAR**

---

Londrina  
2023

ESTÉFANY SANTOS REDONDO

**AFLATOXINA M1 NA URINA PARA CARACTERIZAÇÃO DE  
RISCO À SAÚDE DEVIDO A EXPOSIÇÃO ALIMENTAR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do Título de Mestre em Ciência de Alimentos.

Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Elisa Yoko Hirooka.

Coorientador: Prof. Dr. André Luiz Buzzo Mori.

Londrina  
2023

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

R319a Redondo, Estéfany Santos.

Aflatoxina M1 na urina para caracterização de risco à saúde devido a exposição alimentar / Estéfany Santos Redondo. - Londrina, 2023.  
76 f. : il.

Orientador: Elisa Yoko Hirooka.

Coorientador: André Luiz Buzzo Mori.

Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, 2023.

Inclui bibliografia.

1. Micotoxinas - Tese. 2. Segurança de alimentos - Tese. 3. Fungos - Tese. 4. Biomarcadores - Tese. I. Yoko Hirooka, Elisa . II. Buzzo Mori, André Luiz. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos. IV. Título.

CDU 641.1

ESTÉFANY SANTOS REDONDO

# **AFLATOXINA M1 NA URINA PARA CARACTERIZAÇÃO DE RISCO À SAÚDE DEVIDO A EXPOSIÇÃO ALIMENTAR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do Título de Mestre em Ciência de Alimentos.

## **BANCA EXAMINADORA**

---

Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Elisa Yoko Hirooka  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

---

Prof. Dr. Miguel Machinski Junior  
Universidade Estadual de Maringá – UEM

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Eiko Nakagawa Itano  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 20 de dezembro de 2023.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço à Deus por ser meu alicerce, pela força e coragem de seguir meus sonhos, por tocar e abençoar este projeto. À Maria, por toda intercessão, pelo colo e amor de mãe nos momentos mais difíceis. Obrigada pelo amadurecimento construído durante este processo e todos os momentos vividos, por colocar-me exatamente onde deveria e gostaria de estar.

Agradeço à minha família, por acreditar e partilhar deste sonho comigo, por abrir mão muitas vezes dos seus objetivos pelos meus. O apoio e orações de vocês foi combustível, e sou imensamente grata. Essa conquista não é só minha, ela também é principalmente da Senhora Eliana Santos Redondo, minha mãe, exemplo de mulher, ao meu pai Deoclécio Marangoni Redondo, ao meu irmão Vitor Miguel Santos Redondo e a minha vó Maria Nadir Santos, pessoas a quem dedico este projeto.

À minha orientadora, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Elisa Yoko Hirooka, pela oportunidade, por abrir as portas de seu laboratório, pelos ensinamentos e experiências compartilhados. Ao meu coorientador, Prof. Dr. André Luiz Buzzo Mori, pela contribuição na execução das análises e na discussão dos resultados. Aos demais professores e técnicos de laboratório do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Estadual de Londrina, por todo auxílio e ensinamentos.

Aos meus amigos do Laboratório LIM, por todo apoio técnico e emocional, pelos conhecimentos compartilhados, pelas conversas e risadas. Em especial, a Tuany Marin por fornece a base de conhecimento analítico para execução deste projeto e ao Maikon Nascimento pelo olhar de químico nos meus experimentos. Aos demais amigos do Programa, que fizeram estes meses muito mais leve, e também aos amigos feitos aqui em Londrina, tenho um carinho muito grande por todos vocês.

Aos demais familiares e amigos da vida, Cibele, Luana, João Pedro, Patrícia, Maria, Thaelise, Regina, Antônia, e tantos outros, que muitas vezes compreenderam a minha distância e ausência, mas nunca deixaram de se fazer presente e vibraram junto em todas as minhas vitórias. Cada um de vocês, de alguma forma, contribuíram para minha chegada até aqui.

À UEL pela infraestrutura fornecida. Aos participantes do projeto, que dedicaram seu tempo em nome da ciência, muito obrigada a cada um, sem vocês nada disso seria possível.

“É justo que muito custe o que muito vale.”

Santa Tereza D'Ávila

REDONDO, Estéfany Santos. **Aflatoxina M1 na urina para caracterização de risco à saúde devido a exposição alimentar**. 2023. 76 f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, Brasil, 2023.

## RESUMO

As aflatoxinas (AFs) são micotoxinas relevantes na contaminação de diversos alimentos, especialmente ao nível de matérias primas oriundas de países com clima tropical úmido. O presente estudo teve como enfoque avaliar a exposição de AFs e o risco associado, em residentes brasileiros fixados em Londrina, região metropolitana considerada subtropical. Questionários foram aplicados em 334 participantes, para mapear o consumo de alimentos propícios a contaminação por AFs, compilar dados sociodemográficos e nível de informação ao tema abordado. Destes, 80 aceitaram fornecer amostras de urina e de sangue, e a responder o recordatório alimentar (R24h). O nível do biomarcador urinário AFM1 em urina foi quantificado por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector de fluorescência (HPLC-FL). Das 80 amostras, 26 foram positivas para AFM1 (32%) e apresentaram nível de 0,09 – 0,88 ng/mg de creatinina (média, 0,2 ng/mg de creatinina). Os dados foram correlacionados e maior probabilidade de ocorrência de AFM1 na urina ( $p < 0,05$ ), foi detectada em indivíduos que ingeriram milho, amendoim e produtos derivados nas 24h antecedentes a coleta. Maior ocorrência de AFM1 nos residentes também foram relacionados principalmente ao consumo regularmente mais elevado de iogurte, milho e derivados pela população ( $p < 0,05$ ). Os dados apontaram alterações significativas na média dos resultados de aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT) e globulinas dos participantes que apresentaram AFM1 positivo ( $p < 0,05$ ). Os valores médios de ingestão diária provável (IDP) variaram de  $0.004 \pm 0.004$  ug/kg de peso corporal/dia e os valores da margem de exposição (MoE) foram inferiores a 10.000, indicando potenciais riscos à saúde.

**Palavras-chave:** micotoxinas; segurança de alimentos; fungos micotoxigênicos; biomarcadores; lesão hepática.

REDONDO, Estéfany Santos. **Aflatoxin M1 in urine to characterize health risk due to food exposure**. 2023. 76 p. Dissertation (Master's in Food Science) – State University of Londrina, Londrina, PR, Brazil, 2023.

### ABSTRACT

Aflatoxins (AFs) are relevant mycotoxins in the contamination of various foods, especially raw materials from countries with a humid tropical climate. The aim of this study was to assess exposure to AFs and the associated risk in Brazilian residents living in Londrina, a metropolitan region considered to be subtropical. Questionnaires were administered to 334 participants in order to map the consumption of foods prone to PA contamination, compile sociodemographic data and level of information on the subject. Of these, 80 agreed to provide urine and blood samples and to complete a 24-hour dietary recall. The level of the urinary biomarker AFM1 in urine was quantified by high-performance liquid chromatography coupled to a fluorescence detector (HPLC-FL). Of the 80 samples, 26 were positive for AFM1 (32%) and showed a level of 0,09 – 0,88 ng/mg creatinine (mean, 0,2 ng/mg creatinine). The data was correlated and a higher probability of AFM1 occurrence in urine ( $p < 0,05$ ) was detected in individuals who had eaten corn, peanuts and derived products in the 24 hours prior to collection. The higher occurrence of AFM1 in residents was also mainly related to the population's regularly higher consumption of yogurt, corn and derivatives ( $p < 0,05$ ). The data showed significant changes in the average results of aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT) and globulins of participants who were AFM1 positive ( $p < 0,05$ ). Mean probable daily intake (PDI) values ranged from  $0.004 \pm 0.004$  ug/kg body weight/day and margin of exposure (MoE) values were less than 10.000, indicating potential health risks.

**Key-words:** mycotoxins; food safety; mycotoxigenic fungi; biomarkers; liver damage.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> -	Estrutura química das principais aflatoxinas .....	18
<b>Figura 2</b> -	Biotransformação hepática das aflatoxinas .....	21
<b>Figura 3</b> -	Localização geográfica e subdivisão regional do município de Londrina, Paraná, Brasil. A população de Londrina, Paraná e Brasil estão descritas de acordo com os dados divulgados pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), 2022.....	44
<b>Figura 4</b> -	Frequência de consumo de alimentos pertencentes ao grupo dos laticínios comumente contaminados com AFM1 pela população do estudo (n=334) .....	51
<b>Figura 5</b> -	Frequência de consumo de alimentos pertencentes ao grupo dos cereais comumente contaminados com AFB1 e AFM1 pela população do estudo (n=334).....	51
<b>Figura 6</b> -	Frequência de consumo de alimentos comumente contaminados com AFB1 e AFM1 pela população do estudo (n=334).....	52
<b>Figura 7</b> -	Cromatograma da solução padrão de AFM1 (tempo: 8,7 minutos) no sistema HPLC-FL.....	53
<b>Figura 8</b> -	Cromatograma da amostra de urina contaminada com AFM1 (tempo: 8,7 minutos).....	53

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Limites máximos tolerados de aflatoxinas em alimentos no Brasil .....	24
<b>Tabela 2</b> - Metodologia utilizada na análise dos parâmetros bioquímicos .....	48
<b>Tabela 3</b> - Características sociodemográficos dos participantes do estudo (n=334).....	49
<b>Tabela 4</b> - Consumo alimentar diário dos participantes do estudo (n=80), estratificado por sexo .....	54
<b>Tabela 5</b> - Ocorrência de AFM1 em amostras de urina com base em atributos sociodemográficos da população estudada (n=80) .....	55
<b>Tabela 6</b> - Associação entre a frequência de ingestão alimentar habitual e presença do biomarcador AFM1 entre os entrevistados (n=80).....	56
<b>Tabela 7</b> - Correlação entre o consumo alimentar nas últimas 24h e presença de AFM1 urinário (n=80) .....	56
<b>Tabela 8</b> - Impacto do AFM1 em biomarcadores associados a danos hepáticos e renais, estratificado por sexo (n=80).....	57

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µg	Micrograma
µL	Microlitro
ACT	Acetonitrila
AFB1	Aflatoxina B1
AFB2	Aflatoxina B2
AFG1	Aflatoxina G1
AFG2	Aflatoxina G2
AFM1	Aflatoxina M1
AFM2	Aflatoxina M2
AFP1	Aflatoxina P1
AFQ1	Aflatoxina Q1
AFs	Aflatoxinas
ALT	Alanina Aminotransferase
ANOVA	Análise de Variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AST	Aspartato Aminotransferase
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
FL	Fluorescência
g	Grama
GGT	Gama-Glutamil Transferase
h	Hora
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
IARC	Agência Internacional de Pesquisa em Câncer
IDP	Ingestão Diária Provável
kg	Quiilograma
LOD	Limite de Detecção
LOQ	Limite de Quantificação
mL	Mililitro
MoE	Margem de Exposição
OMS	Organização Mundial da Saúde
ng	Nanograma
UPLC-MS	Cromatografia Acoplada a Espectrometria de Massas

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>14</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>16</b>
<b>2.1</b>	<b>Objetivo Geral</b> .....	<b>16</b>
<b>2.2</b>	<b>Objetivos Específicos</b> .....	<b>16</b>
<b>3</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>17</b>
<b>3.1</b>	<b>Micotoxinas</b> .....	<b>17</b>
<b>3.2</b>	<b>Aflatoxinas</b> .....	<b>18</b>
<b>3.3</b>	<b>Mecanismo de biotransformação das aflatoxinas</b> .....	<b>19</b>
<b>3.4</b>	<b>Ocorrência de aflatoxinas em alimentos</b> .....	<b>21</b>
<b>3.5</b>	<b>Legislação Brasileira</b> .....	<b>23</b>
<b>3.6</b>	<b>Avaliação da exposição humana as aflatoxinas</b> .....	<b>24</b>
3.6.1	Biomonitorização de biomarcadores.....	24
3.6.2	AFM1 como biomarcador de exposição .....	25
<b>3.7</b>	<b>Análise de perigo / risco as aflatoxinas</b> .....	<b>26</b>
<b>3.8</b>	<b>Deteção de aflatoxinas</b> .....	<b>27</b>
3.8.1	Cromatografia em camada delgada (CCD).....	28
3.8.2	Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (UPLC-MS).....	28
3.8.3	Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) .....	28
3.8.4	Ensaio de imunoadsorção enzimática (ELISA).....	29
<b>3.9</b>	<b>Efeitos patológicos provocados pelas aflatoxinas</b> .....	<b>29</b>
3.9.1	Aflatoxinas e proteínas séricas .....	30
3.9.2	Aflatoxinas e danos hepáticos .....	30
3.9.3	Aflatoxinas e função renal.....	31
<b>3.10</b>	<b>Diagnóstico de aflatoxicose</b> .....	<b>32</b>
<b>4</b>	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>32</b>
<b>5</b>	<b>FLUXOGRAMA EXPERIMENTAL</b> .....	<b>41</b>

<b>6</b>	<b>ARTIGO: EXPOSIÇÃO HUMANA À AFLATOXINA POR DETERMINAÇÃO DO BIOMARCADOR AFM1 EM URINAS DE RESIDENTES DE LONDRINA, PARANÁ, BRASIL.....</b>	<b>42</b>
<b>6.1</b>	<b>Resumo.....</b>	<b>42</b>
<b>6.2</b>	<b>Introdução.....</b>	<b>43</b>
<b>6.3</b>	<b>Material e métodos.....</b>	<b>44</b>
6.3.1	População do estudo.....	44
6.3.2	Questionário e recordatório alimentar.....	45
6.3.3	Coleta de amostras.....	45
6.3.4	Análise de AFM1 por HPLC.....	45
6.3.6	Análise de creatinina na urina humana.....	47
6.3.7	Ingestão diária provável e margem de exposição.....	47
6.3.8	Avaliação hepática e renal.....	48
6.3.9	Análise de dados.....	48
<b>6.4</b>	<b>Resultados.....</b>	<b>49</b>
6.4.1	População do estudo.....	49
6.4.2	Conhecimento dos indivíduos sobre aflatoxinas.....	50
6.4.3	Consumo alimentar habitual (frequência) relatado pelos participantes.....	50
6.4.4	Desempenho do método analítico.....	52
6.4.5	AFM1 urinário.....	54
6.4.6	Consumo alimentar relatado pelos participantes no R24h.....	54
6.4.7	Associação entre nível do biomarcador AFM1 urinário e atributos sociodemográficos.....	54
6.4.8	Associação entre nível do biomarcador AFM1 urinário e ingestão alimentar.....	55
6.4.9	Associação entre nível do biomarcador AFM1 urinário e parâmetros bioquímicos.....	57
6.4.10	Ingestão diária provável e avaliação do risco.....	57
<b>6.5</b>	<b>Discussão.....</b>	<b>57</b>
<b>6.6</b>	<b>Conclusão.....</b>	<b>62</b>
<b>6.7</b>	<b>Referências.....</b>	<b>62</b>

<b>ANEXOS</b> .....	68
<b>ANEXO A</b> - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	68
<b>APÊNDICES</b> .....	70
<b>APÊNDICE A</b> - Questionário da pesquisa .....	70
<b>APÊNDICE B</b> - Recordatório alimentar de 24 horas (R24h) .....	75
<b>APÊNDICE C</b> - Folder Informativo .....	76

## 1 INTRODUÇÃO

As toxinas naturais microbianas são metabólitos secundários produzidos como um mecanismo de sobrevivência, podendo exercer efeitos nocivos sobre os seres humanos. Os metabólitos tóxicos produzidos por determinadas espécies de fungos são definidos como micotoxinas (CLARK et al., 2019).

A ocorrência em matrizes alimentares constitui a principal via de contaminação humana, com produção decorrente de condição ambiental favorável ao crescimento de fungo micotoxigênico. O processo pode ocorrer no campo, armazenamento e ao longo de processos industriais (SNINI, MATHIEU, 2020; ZUBROD, 2019).

As Aflatoxinas (AFs) destacam entre as micotoxinas de maior impacto, responsável por perda de qualidade e depreciação comercial de diversos produtos, além de efeito na saúde humana e animal. AFs são produzidas por fungos do gênero *Aspergillus* spp., especificamente *A. flavus*, *A. parasiticus* e *A. nomius*, sendo os análogos de maior destaque nos alimentos aflatoxina B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>), B<sub>2</sub> (AFB<sub>2</sub>), G<sub>1</sub> (AFG<sub>1</sub>) e G<sub>2</sub> (AFG<sub>2</sub>) (JECFA, 2016; FLETCHER, NETZEL, 2020).

Avaliar a exposição da população às AFs é fundamental para caracterizar o risco da população a estes contaminantes, visto que devido a suas atividades biológicas, que incluem carcinogenicidade, teratogenicidade, imunotoxicidade, neurotoxicidade, nefrotoxicidade e hepatotoxicidade, causam efeitos nocivos aos seres humanos (ALI RAJPUT et al., 2017; IARC, 2023; PITT, MILLER, 2017).

A análise pode ser feita diretamente em matrizes alimentares (exposição externa), ou então, indiretamente pela análise de biomarcadores em fluidos biológicos, geralmente urina e sangue. A avaliação da exposição externa apresenta diversas deficiências, principalmente por ser baseada em dados estatísticos e, desta forma, a análise por meio do biomonitoramento humano se torna mais precisa (AL-JAAL et al., 2019).

A aflatoxina B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>) por ser o análogo de maior toxicidade é o que recebe maior ênfase nas pesquisas. A mensuração de seus produtos de biotransformação produzidos por enzimas hepáticas, podem ser utilizados como evidência de exposição. Neste sentido, a aflatoxina M<sub>1</sub> (AFM<sub>1</sub>) recebe destaque, considerado mediante estudos um excelente biomarcador (DI GREGORIO, 2016).

Diante dos riscos que as AFs representam para os indivíduos, principalmente em países em desenvolvimento, o objetivo do presente estudo foi avaliar a exposição

e o risco às AFs em residentes do município de Londrina, Paraná, Brasil, por meio do biomarcador AFM<sub>1</sub> urinário e determinar possíveis associações entre atributos sociodemográficos, consumo alimentar, alterações hepáticas e renais.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Avaliar a exposição e o risco às aflatoxinas através do biomarcador AFM<sub>1</sub> urinário.

### **2.2 Objetivos Específicos**

- Proceder questionário para avaliar o padrão de dieta e frequência do consumo de alimentos com ênfase a contaminação por aflatoxinas pela população de Londrina-PR;
- Otimizar e validar análise de AFM<sub>1</sub> por HPLC-FL para determinar AFM<sub>1</sub> em urina;
- Calcular a Ingestão Diária Provável (IDP) e a Margem de Exposição (MoE);
- Determinar parâmetros bioquímicos séricos focados em função hepática e renal;
- Correlacionar AFM<sub>1</sub> urinário com atributos sociodemográficos, consumo alimentar e biomarcadores séricos.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Micotoxinas

Há indícios de que as micotoxinas estejam em contato com os humanos a séculos. Todavia, os estudos só iniciaram a partir de 1960, após o que se chama de “Turkey X Disease”, fato que causou a morte de milhares de perus na Inglaterra. Após alguns estudos, essas mortes foram atribuídas a rações contaminadas com uma toxina produzida pelo fungo *Aspergillus flavus*, que foi denominada aflatoxina (AF) (PITT; MILLER, 2017).

O termo micotoxina é oriundo do Grego “mykes” (fungo) e do Latim “toxicum” (toxina) e, portanto, a referida expressão significa toxina fúngica. São metabólitos secundários tóxicos produzidos por determinados fungos filamentosos pertencentes ao filo *Ascomycota*, especialmente *Aspergillus spp.*, *Penicilium spp.* e *Fusarium spp.*, os quais podem exercer efeitos nocivos, seja pela ingestão, inalação ou contato com a pele (MARIN et al., 2013).

A ingestão pode ocorrer por meio de matrizes alimentares contaminados com micotoxinas, ou então, por contaminação indireta, pelo crescimento dos fungos nos alimentos (GARCIA et al., 2012). Esse crescimento fúngico e produção de toxinas são dependentes de alguns fatores, como umidade e temperatura, com condições de crescimento específicas. Milho, trigo, cevada, arroz e amendoim são alguns exemplos de culturas geralmente afetadas (ESKOLA et al., 2020).

O processo de contaminação pode ocorrer na colheita, secagem ou ainda durante o armazenamento. Como o processamento industrial não possui a capacidade significativa de redução dos níveis, devido serem compostos químicos estáveis e termo resistentes, é preciso que medidas preventivas capazes de reduzir ao mínimo a contaminação sejam aplicadas (MARIN et al., 2013; PLEADIN; FRECE; MARKOV, 2019;).

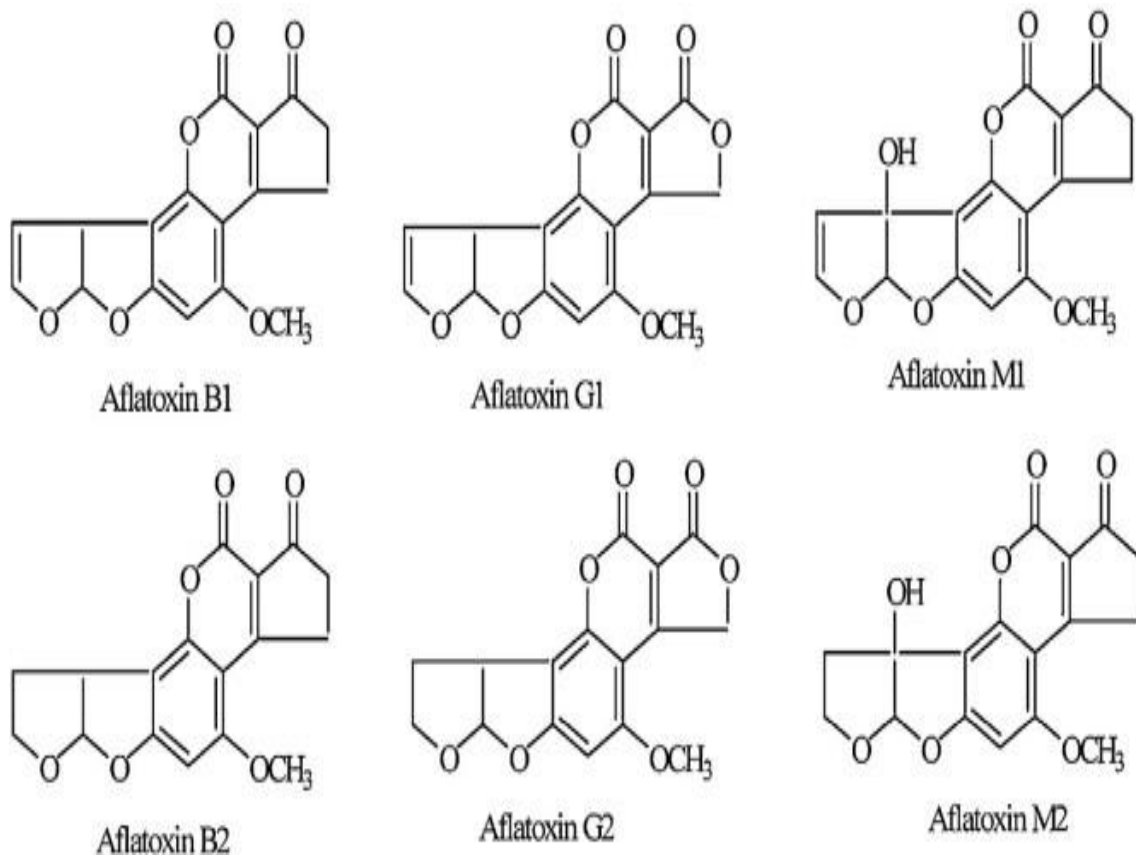
A exposição alimentar a esses contaminantes, causa efeitos nocivos à saúde, que podem ser agudo, resultando em doença ou morte em um curto período de tempo após a ingestão, ou ainda crônico, neste caso devido ao processo acumulativo de quantidades menores de toxina, onde os efeitos se manifestam ao longo de meses ou anos (TOLA; KEBEDE; YILDIZ, 2016).

### 3.2 Aflatoxinas

Dentre as micotoxinas, as AFs, são uma família de toxinas produzidas principalmente por *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* e *A. nomius*. Atualmente são as micotoxinas mais estudadas devido ao maior potencial tóxico e prevalência em produtos alimentícios. Dentre os análogos e derivados identificados, aflatoxina B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>), aflatoxina B<sub>2</sub> (AFB<sub>2</sub>), aflatoxina G<sub>1</sub> (AFG<sub>1</sub>) e aflatoxina G<sub>2</sub> (AFG<sub>2</sub>), são os de maior relevância do ponto de vista da segurança alimentar de produtos de origem vegetal (AFSAH-HEJRI et al., 2013).

Estruturalmente são derivados de difuranocumarinas fluorescentes sob luz ultravioleta, apresentando fluorescência azul para B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> e fluorescência em verde para G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub> (RAWAL; KIM; COULOMBE, 2010). A estrutura química das principais AFs pode ser vista na **Figura 1**.

**Figura 1:** Estrutura química das principais aflatoxinas.



**Fonte:** Zhang et al., 2014.

O análogo AFB<sub>1</sub> é a forma mais perigosa do grupo, devido ao efeito tóxico, mutagênico, imunotóxico, teratogênico e carcinogênico em humanos e animais, podendo afetar órgãos essenciais na biotransformação / excreção como o fígado e os rins. É classificada como cancerígena do Grupo 1A pela IARC (ORSI et al., 2017; ALVAREZ et al., 2020; IARC, 2023).

Vale salientar, que pesquisas vem relatando ainda supressão do sistema imunológico dos seres humanos, tornando-os vulneráveis a doenças infecciosas como HIV, e ainda retardo no crescimento de crianças decorrentes a exposição crônica (JOLLY et al., 2013; SMITH et al., 2015).

### **3.3 Mecanismo de biotransformação das aflatoxinas**

Biotransformação pode ser definida como o processo em que o organismo transforma por meio de reações químicas ou enzimáticas uma substância química em outro composto diferente. É o principal mecanismo para eliminação de compostos exógenos, como toxinas, que são transformadas para se tornarem mais polares e menos lipossolúveis para serem facilmente eliminadas, principalmente pela via renal (CURCI, 2009).

O processo de biotransformação das AFs está associado a ativação da toxicidade destas moléculas. Garner et al (1972) demonstrou pela primeira vez essa relação utilizando *Salmonella typhimurium* TA 1530, onde observou que devido à alta lipossolubilidade são facilmente absorvidas no trato gastrointestinal após a ingestão e distribuídas pela corrente sanguínea, afetando diferentes órgãos.

Devido à alta permeabilidade dos hepatócitos, o fígado é responsável pela biotransformação pela ação de enzimas microssômicas da família do citocromo P450 e por isso, é o órgão mais afetado (EATON et al., 1994).

A biotransformação de AFs é regida em duas fases: Na fase I, mediado principalmente pelo citocromo P450, ocorre a adição de um pequeno grupo polar contendo cargas positivas e negativas que são adicionadas a substância pelo processo de oxidação, por reações incluindo epoxidação, hidratação, hidroxilação, O-dimetilação. Na fase II, o composto formado é conjugado, tornando-se polar, facilitando a excreção pelos rins. Todavia algumas substâncias químicas podem ser convertidas em produtos reativos ou nocivos neste processo (GROSS-STEINMEYER; EATON, 2012).

A AFB<sub>1</sub> por ser um pró-carcinógeno, requer ativação metabólica para manifestar a atividade carcinogênica e mutagênica. A forma ativa AFB<sub>1</sub>- epóxido (AFBO) é formada pela epoxidação da dupla ligação do éter vinílico, presente na estrutura bi-furanóide da molécula. Possui uma alta afinidade nucleofílica e reatividade a qualquer componente celular, com ênfase ao DNA, especificamente pelo ataque nucleofílico ao átomo N7 de guanina (GROOPMAN et al., 2012; RAWAL, KIM, COULOMBE-JR, 2010).

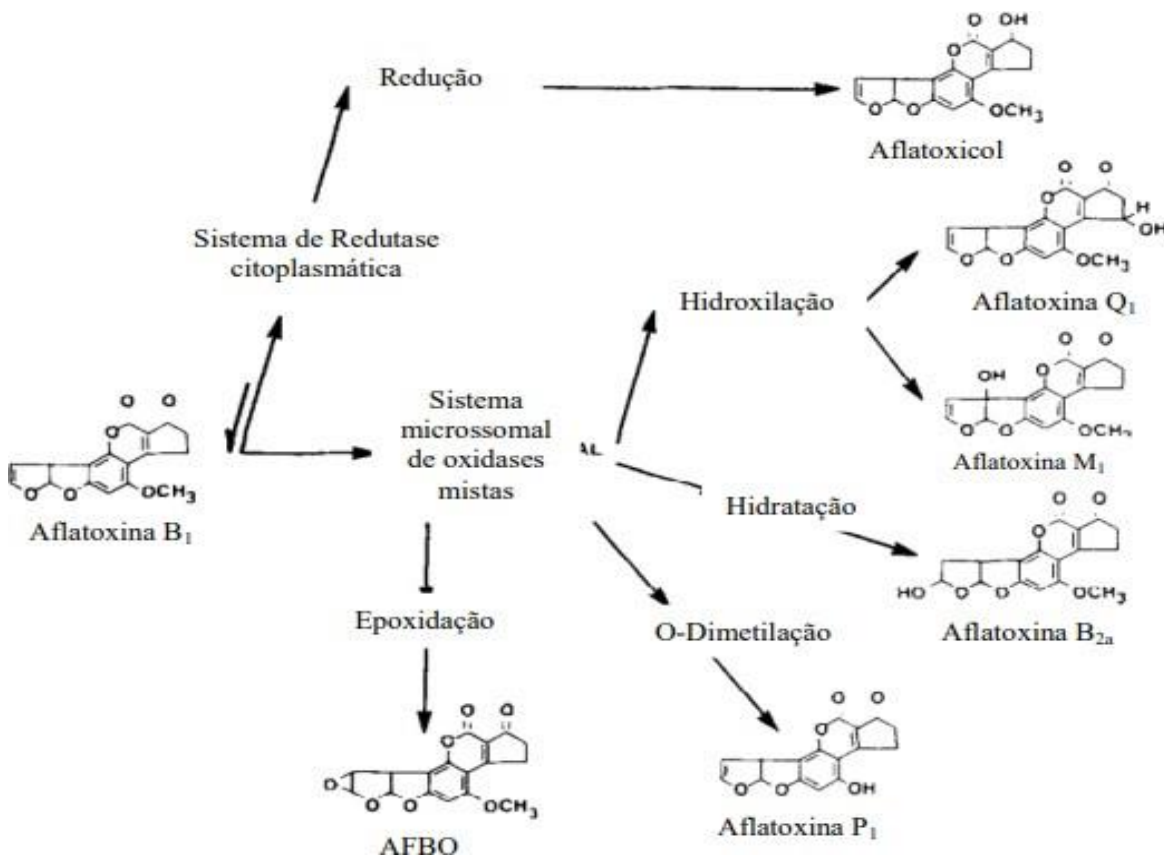
Desta forma, originam adutos como o AFB<sub>1</sub>-N7-guanina, que modificam a estrutura do DNA, e conseqüentemente, a sua atividade biológica, como inibição da síntese do RNA e na síntese proteica, iniciando assim lesões hepáticas, mutagênicas, carcinogênicas e teratogênicas (AGUILLAR; HUSSAIN; CERUTTI, 1993).

A AFB<sub>1</sub> pode ser metabolizada também por hidroxilação, processo que origina metabólitos mais polares e menos tóxicos, principalmente aflatoxina M<sub>1</sub> (AFM<sub>1</sub>) e aflatoxina Q<sub>1</sub> (AFQ<sub>1</sub>). Ou então, pode ocorrer por  $\sigma$ -demetilação, para formar aflatoxina P<sub>1</sub> (AFP<sub>1</sub>) que é menos tóxica, porém com a capacidade de ser reconvertida em composto reativo pela epoxidação (ORSI et al., 2007).

A transformação de AFB<sub>1</sub> em AFB<sub>2</sub> ocorre por hidratação de dupla ligação do anel furano terminal de AFB<sub>1</sub>. Já o sistema de redutase citoplasmática origina o aflatoxicol (AFL), que atua como reservatório, ocorrendo reconversão (EATON et al., 1994).

Vale ressaltar, que o processo de biotransformação varia consideravelmente entre as espécies animais e até mesmo entre os indivíduos da mesma espécie, desta forma a suscetibilidade de desencadear efeitos é variante conforme características interindividuais (OLIVEIRA, GERMANO, 1997). A **Figura 2** demonstra como ocorre o metabolismo de transformação da AFB<sub>1</sub> em demais análogos pelas diferentes vias no fígado.

**Figura 2:** Biotransformação hepática das aflatoxinas.



Fonte: Wong e Hsich (1980).

### 3.4 Ocorrência de aflatoxinas em alimentos

A ocorrência de AFs em alimentos brasileiros tem sido relatada principalmente em produtos como amendoim, milho e derivados, em níveis e incidências variáveis (MAGRINI; FREITAS; UEHARA-PRADO, 2011). A contaminação pode ocorrer antes e durante a colheita, no armazenamento, ou ainda, durante o processamento dos produtos (PITT; HOCKING, 2009).

A contaminação é influenciada por condições ambientais e, portanto, danos mecânicos e predominância de temperaturas e umidade relativa do ar elevadas, proporcionam o ambiente adequado para o crescimento dos fungos. Quando isso ocorre, há o risco de desenvolvimento de metabólitos secundários tóxicos, e conseqüentemente, redução na qualidade do produto (ELTARIKI, et al., 2018).

O principal problema é que geralmente as AFs estão presentes em concentrações baixas, e dificilmente causam alterações sensoriais, como sabor e odor. Desta forma, torna-se difícil a percepção pelos consumidores, por isso, limites

máximos da toxina são tolerados em alimentos destinados ao consumo humano, a fim de proteger a saúde dos consumidores (MARTINEZ; ROSERO; TABORDA, 2019).

A intoxicação nos seres humanos, designada como aflatoxicose, pode ocorrer pelo consumo de alimentos com a toxina e pelo consumo de produtos derivados de animais, que tiveram sua ração contaminada, como leite, carne e ovos. A severidade do quadro é influenciada por fatores como idade, estado nutricional, extensão da exposição e co-exposição (MAZIERO; BERSOT, 2010).

Diversos estudos vêm identificando produtos contaminados por AFs e em concentrações acima do permitido pela Legislação, indicando a necessidade de monitoramento dos níveis destes contaminantes (IHA et al., 2016; SILVA et al., 2018). No Paraná, os dados de Santos (2015) revelaram elevada frequência de AFs em amostras de amendoins, sendo que das 47 amostras analisadas, 25,5% estavam contaminadas com níveis acima do Limite Máximo Tolerado (LMT) pela Legislação (20 ng/g), variando de 36 - 832 ng/g.

No estudo de Iha et al. (2016) identificaram a presença de AFs em 71 das 100 amostras (71%) de paçoca analisadas no estado de São Paulo, variando de 0,3 a 41,8 ng/g, com 12 amostras (12%) > 20 ng/g. Silva et al. (2018), analisaram a presença de AFB<sub>1</sub> em 60 lotes do grão in-natura da região Alta Paulista e observaram a presença em concentrações de 1,13 a 29,2 ng/g, com dois lotes (3,3%) acima do LMT.

Estudos anteriores também detectaram AFM<sub>1</sub> em amostras do Brasil. No Paraná, Santos et al. (2015) verificaram AFM<sub>1</sub> em 42 amostras de leite fluido e leite em pó comercializados e verificaram a presença em 100% das amostras em níveis variando de 0,01 a 0,81 ng/g (média de 0,13 ng/g), porém nenhuma acima do LMT. Oliveira et al. (2013) analisaram 75 amostras de leite fluido em Minas Gerais e mostraram que 23 (30,7%) foram positivas para AFM<sub>1</sub> em níveis de 1 a 4,1 ng/g, todas acima do LMT pela Legislação Brasileira.

Outros alimentos, como cereais, também podem estarem contaminados (MARTINEZ; ROSERO; TABORDA, 2019). No trabalho de Andrade e Caldas (2015), 89 publicações foram recuperadas da literatura relatando dados relativos a 18.097 amostras de cereais, das quais 37,6% foram positivas para pelo menos uma AFs, com média de 13,6 ng/g. O maior nível médio observado foi para arroz, com 25,9 ng/g. Além disso, o consumo deste produto contribuiu com 41,6% do consumo total de AFs em todos os bancos de dados analisados, seguido pelo trigo (35,4%) e milho (21,2%).

De forma geral, a presença de AFs nos alimentos constituem um grande problema de saúde global devido aos seus efeitos, entretanto também exercem impactos econômicos negativos, responsáveis por grandes perdas para os países produtores, devido à rejeição de lotes inteiros (MAJEED et al., 2013).

Por isso, a detecção precoce aliadas a medidas de controle, fornecem o caminho para garantir a qualidade e segurança dos grãos, e isso só é possível, pela intensificação das pesquisas que visem a ampliação de conhecimentos técnico-científicos, sobre os riscos e proporção de exposição da população (PRESTES; ROCHA, 2019).

### 3.5 Legislação Brasileira

Em termos nacionais, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) é a responsável pela fiscalização da presença de aflatoxinas nos alimentos. Os LMT estão descritos na Instrução Normativa n° 126, de 6 de Julho de 2022, nos termos da Resolução Brasileira RDC n° 722 de 1 de Julho de 2022 (ANVISA, 2022).

Apesar das regulamentações implementadas, a regularidade na qualidade dos alimentos ainda é um problema, devido à falta de aplicação e tecnologias de detecção (WU, STACY; KENSLER, 2013). A **Tabela 1** demonstra os LMT de AFs em alimentos no Brasil.

**Tabela 1:** Limites máximos tolerados de aflatoxinas em alimentos no Brasil.

		(continua)
AFLATOXINA	ALIMENTO	LMT (ng/g)
M <sub>1</sub>	Leite fluído	0,5
	Leite em pó	5
	Queijos	2,5
B <sub>1</sub> , B <sub>2</sub> , G <sub>1</sub> , G <sub>2</sub>	Alimentos à base de cereais para alimentação infantil (lactentes e crianças de primeira infância)	1
	Amendoim (com casca, descascado, cru ou tostado), pasta de amendoim ou manteiga de amendoim	20
	Castanha-do-Brasil com casca para consumo direto	20
	Castanha-do-Brasil sem casca para consumo direto	10
	Castanha-do-Brasil sem casca para processamento posterior	15
	Castanhas, exceto Castanha-do-Brasil, incluindo nozes, pistaches, avelãs e amêndoas	10
	Cereias e produtos de cereais, exceto milho e derivados, incluindo cevada maltada	5
	<i>Myristica fragrans</i> (noz-moscada), <i>Zingiber officinale</i> (gengibre), <i>Curcuma longa</i> (cúrcuma), Misturas de especiarias que contenham uma ou mais especiarias acima indicadas	20
	Feijões e outras sementes secas das leguminosas	5

**Tabela 1:** Limites máximos tolerados de aflatoxinas em alimentos no Brasil.

AFLATOXINA	ALIMENTO	(conclusão)
		LMT (ng/g)
B <sub>1</sub> , B <sub>2</sub> , G <sub>1</sub> , G <sub>2</sub>	Fórmulas infantis para lactentes e fórmulas infantis de seguimento para lactentes e crianças de primeira infância	1
	Frutas desidratadas e secas	10
	Milho, milho em grão (inteiro, partido, amassado, moído), farinhas ou sêmolos de milho	20
	Produtos de cacau e chocolate	5
	Especiarias: <i>Capsicum spp.</i> (o fruto seco, inteiro ou triturado, incluindo pimentas, pimenta em pó, pimenta de caiena e pimentão-doce); <i>Piper spp.</i> (o fruto incluindo a pimenta	20

Fonte: Adaptado de RDC nº 722 de 2022.

### 3.6 Avaliação da exposição humana as aflatoxinas

Avaliar a exposição humana frente às AFs é fundamental e pode ser feita pela análise direta, também conhecida como “exposição externa”, baseada principalmente na ocorrência do contaminante em produtos alimentares e em dados de consumo (ESCRIVÁ et al., 2017).

Porém, há algumas limitações inerentes a essa abordagem, pelo fato de utilizar dados estatísticos sobre o consumo alimentar, peso corporal médio da população e percentual da toxina nos produtos alimentícios. O consumo dos alimentos e as condições de saúde as quais podem modificar a biodisponibilidade de toxinas da dieta, são divergentes entre os indivíduos, e conseqüentemente, a exposição do corpo humano são variantes de pessoa para pessoa (ALSHSNNAQ; YU, 2017; IAH, 2014).

Outro ponto, é que a presença dos contaminantes nos alimentos é diferente, sendo extremamente difícil obter com precisão o consumo de alimentos contaminados. Por isso, para uma estimativa mais precisa, é possível avaliar a exposição pela análise interna, que consiste na quantificação de micotoxinas em matrizes biológicas, ou seja, pelo biomonitoramento humano (HBM) (GURUSANKAR et al., 2020).

#### 3.6.1 Biomonitorização de biomarcadores

O efeito final das toxinas na saúde humana é muito variável, pois é baseado em diversos fatores, como características estruturais e toxicocinéticas, tempo e condição de exposição, características do contaminado (idade, sexo, sistema imunológico), além de outras questões como a co-exposição (VIEGAS; MARTINS,

2020; AL-JAAL et al., 2019).

Biomonitorização (HBM) é definido como um método para avaliar a exposição humana a compostos tóxicos e seus efeitos, medindo a substância, ou então, seus metabólitos e demais produtos originados nas reações de biotransformação, em fluidos biológicos. Cada fluido biológico apresenta suas vantagens e desvantagens, mas de forma geral, fornecem informações complementares e úteis para novas descobertas sobre a biodisponibilidade, metabolismo, toxicocinética e características toxicológicas das micotoxinas (ARCE-LÓPEZ et al., 2020).

Todavia, o HBM de micotoxinas ainda enfrenta alguns desafios, como a descrição de bons biomarcadores, metodologias analíticas validadas e baratas, falta de conhecimento em relação às variações interindividuais, informações suficientes sobre diferenças existentes em populações provenientes de regiões distintas e em diferentes intervalos de tempo, entre outros. Portanto, mais estudos na área são necessários, já que constitui uma importante ferramenta para melhorar a avaliação de risco, e assim, estimar a exposição humana real a substâncias tóxicas (AL-JAAL et al., 2019).

### 3.6.2 *AFM<sub>1</sub> como biomarcador de exposição*

O termo biomarcador ou então marcador biológico, pode ser definido como a capacidade de medir e avaliar substâncias e/ou seus metabólitos, em fluidos biológicos, e assim, determinar a intensidade da exposição ao contaminante, bem como seu risco a saúde humana. As três categorias aceitas de biomarcadores são: de exposição, de resposta (ou efeito tóxico) e de suscetibilidade (RYAN et al., 2005; VIDAL et al., 2018).

Os biomarcadores de micotoxinas são definidos como os compostos (toxina e/ou seus metabólitos), ou então, os produtos de sua interação com moléculas-alvo (adutos) que podem ser quantificados em fluidos biológicos e podem estar correlacionados com as micotoxinas ingeridas (MARIN et al., 2018). O monitoramento da exposição a AFs pela determinação de biomarcadores é uma metodologia bem aceita, que geralmente é feita por urina e sangue, embora possa ser feito por outras formas como cabelo, leite e fezes (TOZZI et al., 2016).

Dentre os metabólitos formados na reação de AFB<sub>1</sub> e que pode ser encontrado na urina, AFM<sub>1</sub> é considerado o principal e de maior preocupação, pois apesar de

menos potente em relação ao seu precursor apresenta efeitos cancerígenos e imunossupressores, sendo classificada no grupo 2B, como possível carcinogêneo aos humanos (IARC, 2023). É considerado um biomarcador muito sensível, de curto prazo, mas altamente eficaz (LUONGO et al., 2013).

Devido aos níveis urinários de AFM<sub>1</sub> possuírem uma boa correlação com a dose de exposição da AFB<sub>1</sub>, ao longo dos anos, estudos vem quantificando este marcador. Nyathi et al. (1987) em um estudo transversal realizado em diferentes áreas do Zimbábue, analisaram 1.200 amostras de urina por HPLC e o metabólito mais observado foi o AFM<sub>1</sub>, com uma concentração média de 4,2 ng/mL.

Rubert et al. (2011) realizaram a análise de micotoxinas e metabólitos, incluindo AFM<sub>1</sub>, na urina de 27 voluntários adultos e Ediage et al. (2013) de 220 crianças e obtiveram resultados precisos sobre a exposição da população por meio dos biomarcadores urinários. Heyndrickxa et al. (2014) realizaram uma análise semelhante, abordando adultos e crianças em larga escala na população belga e também obtiveram resultados precisos sobre a exposição.

Sanchez e Diaz (2019) avaliaram a presença de AFM<sub>1</sub> e AFM<sub>2</sub> na urina de crianças atendidas no serviço de emergência de um hospital pediátrico em Bogotá, Colômbia e verificaram uma frequência de AFM<sub>1</sub> em 41,7% das amostras, já para AFM<sub>2</sub> nenhum nível foi encontrado. Também foi realizado um levantamento sobre o consumo de alimentos susceptíveis de serem fonte de AFs e sobre variáveis sociodemográficas e a presença de AFM<sub>1</sub> na urina foi relacionada ao consumo de cereais com probabilidade de estarem contaminados com AFB<sub>1</sub>, especialmente milho e arroz.

Em um estudo mais recente, Foerster et al. (2022) realizaram um biomonitoramento de exposição no Chile e encontraram AFM<sub>1</sub> na urina de 59% (n=120) dos participantes, com 12% das amostras acima do limite de quantificação.

No Brasil, os estudos para determinação de metabólitos de AFS em fluidos biológicos são escassos. Romero et al. (2010) descreveram a excreção de AFM<sub>1</sub> na urina humana de 65 moradores do estado de São Paulo em níveis variando de 0,0018 a 0,0399 ng/mL.

### **3.7 Análise de perigo / risco as aflatoxinas**

Segundo a OMS, risco é a probabilidade de um efeito adverso ocorrer em uma

população ou subpopulação em decorrência da exposição a um agente. Já perigo se refere ao agente (biológico, físico ou químico) e/ou a propriedades de um alimento com potencial de causar algum dano à saúde. Este risco é proporcional ao grau de toxicidade do composto e da quantidade de exposição e por isso, os Comitês Científicos são os responsáveis pela avaliação de risco de cada substância, tais como o JECFA (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives) (OMS, 2007).

Segundo o *Códex Alimentarius*, a avaliação de risco consiste em quatro etapas: identificação do perigo, caracterização do perigo, avaliação da exposição e caracterização do risco. São etapas importantes, pois fornecem uma visão geral do que está ocorrendo (o que, porque, de que forma, em qual população, gravidade) e a partir disso, é possível delimitar o limite seguro de exposição, que varia conforme algumas características específicas de toxicidade (CODEX ALIMENTARIUS, 2014; DORNE, 2015).

Há substâncias sem limiar de dose para efeito adverso, pois independente da dose de exposição pode iniciar seu mecanismo de ação. É o caso das AFs, que somente na ausência de exposição é possível garantir que os indivíduos não estejam em risco. Em função desta característica, o risco é caracterizado utilizando a margem de exposição (MoE), que geralmente utiliza como referência toxicológica a BMDL<sub>10</sub> associado ao consumo estimado (JECFA, 2016).

A BMDL<sub>10</sub>, consiste no limite de confiança inferior da dose em que se observou um aumento de 10% na incidência de um determinado efeito tóxico. Como utiliza modelagem matemática da curva de dose-resposta para interpolar uma dose estimada que corresponda a um nível particular de resposta, sua aplicação elimina qualquer limitação relacionada ao experimento. Pode ser aplicada em diferentes tipos de substâncias, incluindo substâncias carcinogênicas e genotóxicas como as AFS (JENSEN; KLUXEN; RITZ, 2019).

Kuiper-Goodman (1990) avaliou os riscos da ingestão de micotoxinas com o intuito de estimar uma “dose segura”. Foi proposto a utilização da dose em que 50% dos animais desenvolvem tumor (TD50) dividida por um fator de segurança de 50.000, para obter risco de 1:100.000. Neste estudo, o valor obtido foi de 0,20 ng/kg de AFM<sub>1</sub>.

### **3.8 Detecção de aflatoxinas**

As técnicas analíticas para detecção de micotoxinas precisam ser específicas,

sensíveis e aplicáveis em um grande número de amostras. Contudo, devido as variações de estrutura e presença em diferentes matrizes, torna-se difícil utilizar uma única técnica padrão de análise. Dentre os métodos disponíveis, as técnicas rotineiramente usadas para determinação de AFs em alimentos são principalmente cromatografia em camada delgada (CCD), cromatografia acoplada a espectrometria de massas (UPLC-MS), cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e ensaio de imun absorção enzimática (ELISA) (TURNER et al., 2015).

### *3.8.1 Cromatografia em camada delgada (CCD)*

A cromatografia em camada delgada (CCD) foi um dos primeiros métodos usados para detectar AFs. Permite a triagem em grande quantidade de amostras de forma simples e barata. Entretanto, como desvantagens pode destacar-se a necessidade de pré-tratamento da amostra, o uso de quantidade elevada de solvente e a falta de automação da técnica, com baixa sensibilidade para a quantificação (COLLINS, 2010; ZHAO et al., 2016).

### *3.8.2 Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (UPLC-MS)*

A cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (UPLC-MS) é considerada uma excelente metodologia para detecção e quantificação de micotoxinas, incluindo as AFs (ZHAO et al., 2016). Essa forma de detecção permitiu o desenvolvimento de métodos de análise multiresíduos, com detecção simultânea de diferentes moléculas. Entretanto, como desvantagem destaca-se o elevado custo do equipamento de espectrometria de massas (BELOGLAZOVA et al., 2015).

### *3.8.3 Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)*

Para a detecção das AFs presentes nos alimentos, ou então, para a determinação dos biomarcadores em materiais biológicos, a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) é o método mais utilizado. Consiste em uma tecnologia capaz de detectar e quantificar baixas concentrações dos analitos de interesse com alta sensibilidade e seletividade, através de um método de separação de compostos em solução (PEREIRA, FERNANDES, CUNHA, 2014).

Os componentes a serem separados estão em uma das duas fases: fase móvel e fase estacionária. Apresenta pequenas colunas, com materiais especialmente preparados e uma fase móvel que é eluída sob altas pressões, com capacidade de realizar separações e análises quantitativas de uma ampla quantidade de compostos presentes em diversos tipos de amostras em questão de minutos (GUIMARÃES, COLLINS, 1998; LIU et al., 2023).

A análise dos análogos e dos metabólitos de micotoxinas por HPLC utiliza diferentes adsorventes, dependendo da estrutura física e química da molécula. Os detectores mais comuns são de UV-visível ou fluorescentes, que detecta por meio da presença do cromóforo (GUIMARÃES, COLLINS, 1998).

Para a detecção e quantificação de AFs que apresentam cromóforo natural em sua estrutura, normalmente utiliza-se os detectores por fluorescência, porém vale ressaltar que neste caso é preciso realizar a derivatização da amostra antes da análise. Pela intensidade dos sinais identificados nos detectores, assim como o tempo de retenção, são formulados os cromatogramas utilizados para as análises finais (TURNER et al., 2015).

#### *3.8.4 Ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA)*

O ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) se tornou popular devido ao baixo custo e facilidade de aplicação. Kits comerciais de ELISA disponíveis para detecção de micotoxinas são baseados em um sistema competitivo direto ou indireto. Destaca-se pela elevada sensibilidade, especificidade e praticidade, em que permite a análise de grande número de amostras em um curto intervalo de tempo. Tem sido muito utilizado na análise de AFs em diferentes matrizes, com resultados satisfatórios. (HAFEZ et al., 2021; LIU et al., 2023).

### **3.9 Efeitos patológicos provocados pelas aflatoxinas**

A ingestão de AFs por meio de alimentos contaminados ou excesso de exposição proporcionam diferentes efeitos adversos, que variam conforme características e estado de saúde do indivíduo (GONÇALVES; SANTANA; PELEGRINI, 2017).

### 3.9.1 Aflatoxinas e proteínas séricas

Um dos principais efeitos clínicos observados é a inibição da síntese proteica, já que a maior parte das proteínas plasmáticas (albumina e globulinas) são originadas pelos hepatócitos (STOCKHAM, SCOTT, 2011). O mecanismo consiste na inserção da toxina no núcleo do hepatócito, onde liga-se ao DNA e inibe a enzima RNA-polimerase, reduzindo a síntese de RNA-mensageiro, e conseqüentemente, causando uma diminuição na produção de proteínas (CLIFORD, REES, 1966).

Os efeitos foram observados principalmente em animais. Um dos primeiros estudos, descrito por Ghosh et al. (1990), identificou que 300 µg de AFB<sub>1</sub>/kg de ração de frangos de corte, levou a diminuição significativa de albuminas e globulinas nos animais intoxicados.

### 3.9.2 Aflatoxinas e danos hepáticos

Um dos efeitos adversos mais observados em estudos decorrentes das AFs é o desenvolvimento de danos hepáticos. Pesquisas apontam a alta incidência de carcinoma hepatocelular (CHC) em diversos países com dieta com elevado teor de AFs, sendo a segunda principal causa, atrás somente de infecção crônica pelo vírus da hepatite B (HBV) ou vírus da hepatite C (HCV). Vale salientar, que estudos demonstraram que na presença de outros fatores de risco, a exposição a AFs aumenta ainda mais o risco de desenvolver CHC (BRAY et al., 2018).

Os efeitos carcinogênicos hepáticos pelas AFs foram comprovados em vários animais, como aves e roedores, que desenvolveram a doença mesmo após pequenas concentrações da toxina, evidenciando assim seu alto poder hepatocarcinogênico. Por exemplo, Ishikawa et al. (2017) relataram que uma única dose oral de AFB<sub>1</sub> em camundongos C57BL/6, pode induzir lesões no tecido hepático, modulação de citocinas hepáticas e supressão imunológica. Vale salientar, que a presença de lesões nas estruturas dos hepatócitos pode acarretar em liberação de enzimas séricas hepáticas, as quais assumem a forma de biomarcadores (CRUZ, 2010).

Marcadores de lesão hepática são utilizados para rastrear e monitorar populações expostas a hepatotoxinas e também para caracterizar o mecanismo toxicológico subjacente ao seu efeito no fígado. A alanina aminotransferase (ALT), é uma enzima encontrada principalmente no citoplasma do hepatócito e é considerada

a enzima mais específica e sensível para danos hepáticos. Catalisa uma reação reversível envolvida na desaminação de alanina originando piruvato, que pode entrar na via da gliconeogênese ou no ciclo de Krebs (AKUYAM et al., 2017; STOCKHAM, SCOTT, 2011).

A enzima aspartato aminotransferase (AST) é uma enzima encontrada em altas concentrações no citoplasma do hepatócito e em suas mitocôndrias. É uma enzima de liberação, que catalisa uma reação reversível envolvida na desaminação de aspartato para formar oxalacetato, que pode entrar no ciclo de Krebs. Não é um marcador específico de lesões hepáticas, por isso, avalia-se a relação AST/ALT, que costumam subir e descer na mesma proporção em doenças hepáticas (MARSHALL, et al., 2016; STOCKHAM, SCOTT, 2011).

A gama glutamil transferase (GGT) é uma enzima associada à colestase e membranas celulares, que catalisa a transferência de grupos glutamil entre peptídeos e está presente em reações da glutatona. Níveis elevados de ácidos biliares no fígado e no plasma são esperadas na ocorrência de colestase e este aumento pode estimular a síntese e a liberação de GGT. Além da relação com o etilismo, também são elevadas em casos de alterações hepáticas (BAYNES; DOMINICZAK, 2015).

### *3.9.3 Aflatoxinas e função renal*

Além do fígado, outros órgãos como os rins podem ser afetados pelas AFs, ocasionando alteração no perfil renal. A avaliação pode ser feita por parâmetros sanguíneos, como a determinação das concentrações de uréia e creatinina sérica, que são os exames séricos primários apropriados para o diagnóstico inicial de lesões renais (FREITAS; VEADO; CARREGARO, 2014).

A uréia é produzida pelo fígado, como produto do metabolismo de nitrogênio e excretada pelos rins. Sua concentração sanguínea é influenciada pela ingestão de proteínas, pela taxa de excreção renal e pelo estado do fígado. Já o fosfato de creatina devido a sua instabilidade, cicliza espontaneamente para formar creatinina, a qual é liberada na urina. A produção é constante e proporcional a massa muscular corporal de cada indivíduo e, portanto, a taxa excretada por dia pode ser utilizada como um indicador de normalidade dos rins (SMITH; MARKS; LIEBERMAN, 2007).

### 3.10 Diagnóstico de aflatoxicose

A aflatoxicose em humanos tornou-se conhecida após investigações de surtos ao longo da história. Um dos primeiros surtos relatados aconteceu em 1983, no Quênia, onde 12 pessoas foram a óbito por insuficiência hepática após o consumo de alimentos contaminados (YUN-GONG et al., 2012).

Segundo a literatura, a gravidade da intoxicação é proporcional ao nível de exposição. A aflatoxicose aguda causa intoxicação grave, que pode afetar diretamente o fígado e levar o indivíduo a morte, manifestações clínicas como tremores musculares, sangue nas fezes e hipertermia podem ser observados. Em casos crônicos, os efeitos são a longo prazo e inclui alterações teratogênicas, carcinogênicas, mutagênicas e hepatotóxicas (GONG, WATSON, 2016).

O diagnóstico é baseado no histórico clínico do paciente, alterações macroscópicas e microscópicas observadas no fígado, associados a identificação e quantificação de AFs nos alimentos ou detecção de biomarcadores em fluídos biológicos (COPPOCK; JACOBSEN, 2009). Entretanto, apesar dos avanços, os custos envolvidos na realização das análises de biomarcadores permanecem altos, devido aos equipamentos analíticos e reagentes. Tal fator prejudica no diagnóstico e implica em uma condição clínica subdiagnosticada (GOMES et al. 2014).

Estudos demonstraram efeitos causados por AFs em animais, todavia não há uma conclusão da dimensão deste risco para saúde dos humanos. São necessárias mais investigações para avaliar o grau de exposição em diferentes populações, devido a diversidade cultural e hábitos alimentares (MARCHESE et al., 2018).

## 4 REFERÊNCIAS

AFSAH-HEJRI, L.; JINAP, S.; HAJEB, P.; RADU, S.; SHAKIBAZADEH, S.; A Review on Mycotoxins in Food and Feed: Malaysia Case Study. *Comprehensive. Reviews in Food Science and Food Safety*, v. 12, p. 629- 651, 2013.

AGUILLAR, F.; HUSSAIN, S.P.; CERUTTI, P. Aflatoxin B<sub>1</sub> induces the transversion of G>T in códon 249 of the p53 tumor supressor gene in human hepatocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 90, p. 8586-8590, 1993.

AKUYAM, S. A.; ABUBAKAR, A.; LAWAL, N.; YUSUF, R.; AMINU, S. M.; HASSAN, A.; MUSA, A.; BELLO, A. K.; YAHAYA, I. A.; OKAFOR, P. A. Assessment of

biochemical liver function tests in relation to age among steady state sickle cell anemia patients. **Nigerian Journal of Clinical Practice.**, v. 20, n. 11, p. 1428-1433, 2017.

ALI RAJPUT.; S. SUN, L.; ZHANG, N.; KHALIL, M. M.; GAO, X.; LING, Z.; ZHU, L., KHAN, F. A.; ZHANG, J.; QI, D.; Correction: Rajput, S.A., et al. Ameliorative Effects of Grape Seed Proanthocyanidin Extract on Growth Performance, Immune Function, Antioxidant Capacity, Biochemical Constituents, Liver Histopathology and Aflatoxin Residues in Broilers Exposed to Aflatoxin B<sub>1</sub>. **Toxins**, v. 10, n. 9, p. 366.

AL-JAAL, B.A.; JAGANJAC, M.; BARCARU, A.; HORVATOVICH, P.; LATIFF, A. Aflatoxin, fumonisin, ochratoxin, zearalenone and deoxynivalenol biomarkers in human biological fluids: A systematic review of the literature, 2001–2018. **Food Chemistry**, v. 129, p. 211-228, 2019.

AL-JAAL. B.; LATIFF, A.; SALAMA, S.; JAGANJAC, M. Mycotoxin contamination of food and feed in the Gulf Cooperation Council countries and its detection. **Toxicol**, v. 171, p. 43-50, 2019.

ALSHANNAQ, A.; YU, J. H. Occurrence, toxicity and analysis of the main mycotoxins in food. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 14, p. 632, 2017.

ALVAREZ, C. S.; HERNANDEZ, E.; ESCOBAR, K.; VILLAGRAN, C. I.; KROKERLOBOS, M. F.; RIVERA-ANDRADE, A.; SMITH, J. W.; EGNER, P. A.; LAZO, M.; FREEDMAN, N. D.; GUALLAR, E.; DEAN, M.; GRAUBARD, B. I.; GROOPMAN, J. D , RAMIREZ-ZEA, M.; MCGLYNN, K. A. Aflatoxin B<sub>1</sub> exposure and liver cirrhosis in Guatemala: a case-control study. **BMJ Open Gastroenterology**, v. 1, n. 1, 2020.

ANDRADE, P.D.; CALDAS, E. D. Aflatoxinas em cereais: ocorrência mundial e avaliação de risco dietético. **World Mycotoxin Journal**, v. 8, p. 415-431, 2015.

ARCE-LÓPEZ, B.; LIZARRAGA, E.; VETTORAZZI, A.; GONZÁLEZ-PENÑAS, E. Human biomonitoring of mycotoxins in blood, plasma and serum in recent years: a review. **Toxins**, v. 12, p. 147, 2020.

BAYNES, J. W. DOMINICZAK, M. H. **Bioquímica Médica**. 4 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, p. 636, 2015.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC nº 306, de 7 de dezembro de 2004**. Dispõe sobre o Regulamento Técnico para o gerenciamento de resíduos de serviços de saúde. Diário Oficial da União da República Federativa do Brasil, Brasília, 10 dez. 2004.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Conselho Nacional do Meio Ambiente CONAMA. (2005). **Resolução nº 358, de 29 de abril de 2005**. Dispõe sobre o tratamento e a disposição final dos resíduos dos serviços de saúde e dá outras providências. Publicada no DOU nº 84, de 4 de maio de 2005, Seção 1, p. 6365.

BRAY, F.; SOERJOMATARAM, I.; SIEGEL, R. L.; TORRE, L. A.; JEMAL, A. Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN Cancer Incidence and Mortality Estimates

Worldwide for 385 Countries. **CA: Cancer Journal for Clinicians**, v. 68, p. 394–424, 2018.

CLARK, G. C. Casewell, N. R.; ELLIOT, C. T.; HARVEY, A. L, JAMIESON, A. G.; FORTE, P. N.; TURNER, A. D. Friends or foes? Emerging impacts of biological toxins. **Trends Biochem Science**, v. 44, n. 4, p. 365-379, 2019.

CLIFORD, J. I.; REES, K. R. Aflatoxin: a site of action in the rat liver cell. **Nature**, v. 209, p. 312-313, 1966.

CODEX ALIMENTARIUS. **International Food Standards. Guidelines for the Simple Evaluation of Food Additive Intake**. 2014. Disponível em: [www.fao.org/input/download/standards/6/cxg\\_003e](http://www.fao.org/input/download/standards/6/cxg_003e). Acesso em: 30 de maio de 2022.

COPPOCK, R. W.; JACOBSEN, B. J. Mycotoxins in animal and human patients. **Toxicol Ind Health**, v. 25, p. 637-655, 2009.

CRUZ, L. C. H. **Micologia Veterinária**. 2. ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2010. 348 p.

CURCI, O. H. **Toxicologia**. Buenos Aires: Ediciones Médicas del Sur, 2009.

DAOU, R.; MAHA, H.; BOOKARI, K.; AL-KHALAF, M.; NAHLE, S.; AL-JAWALDEH, A.; KOUBAR, M.; DOUMIATI, S.; KHOURY, A. Aflatoxin B<sub>1</sub> Occurrence in Children under the Age of Five's Food Products and Aflatoxin M<sub>1</sub> Exposure Assessment and Risk Characterization of Arab Infants through Consumption of Infant Powdered Formula: A Lebanese Experience, **Toxins**, v. 14, n. 5, p. 290, 2022.

DESMARCHELIER, A.; OBERSON, J., TELLA, P.; GREMAUD, E.; SEEFELDER, W.; MOTTIER, P. Development and Comparison of Two Multiresidue Methods for the Analysis of 17 Mycotoxins in Cereals by Liquid Chromatography Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 7510-7519, 2010.

DI GREGORIO, M.C. et al. Determination of serum aflatoxin B<sub>1</sub> -lysine to evaluate the efficacy of an aflatoxin-adsorbing feed additive in pigs fed na aflatoxin B<sub>1</sub> -contaminated diet. **Mycotoxin Research**, n. 33, p. 93-102, 2017.

DORNE J. L. Em: **Investigating Combined Effects of Multiple Chemicals to support Risk Assessment-EFSA**, 2015. Disponível em: <http://www.euromixproject.eu/wpcontent/uploads/2015/07/Dorne.pdf>. Acesso em: 31/10/2022.

EATON, D. L.; GROOPMAN, J. D. The toxicology of Aflatoxins; human health, veterinary and agricultural significance. **Academic Press**, 1994.

EDIAGE, E. N, DI- MAVUNGU, J. D.; SONG, S. Q, SIOEN, I.; SAEGER, S. Multimycotoxin analysis in urines to assess infant exposure: a case study in Cameroon. **Environment International**, p. 50–59, 2013.

EFSA – European Food Safety Authority. Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in the Food Chain on a request from the Commission related to the potential increase of consumer health risk by a possible increase of the existing maximum levels for aflatoxins in almonds, hazelnuts and pistachios and derived products. **EFSA Journal**. v. 446, p. 1–127, 2007.

ELTARIKI, F.E.M.; TIWARI, K.; ARIFFIN, I.A.; ALHOOT, M.A. Genetic Diversity of Fungi Producing Mycotoxins in Stored Crops. **Journal of Pure and Applied Microbiology**, v. 12, n. 4, p. 1815-1823, 2018.

ESCRIVA, L.; FONTE G.; MANYES, L.; BERRADA, H. Studies on the presence of mycotoxins in biological samples: an overview. **Toxins**, v. 9, p. 251, 2017.

ESKOLÁ, M.; KOS G.; ELLIOT, C.T; HAJSLOVÁ, J.; MAYAR, S.; KRŠKA, R. Worldwide Contamination of Food Crops with Mycotoxins: Validity of the widely cited 'FAO Estimate' of 25%. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 60, p. 2773-2789, 2020.

FLETCHER, M. T.; NETZEL, G. Food safety and natural toxins. **Toxins**, v. 12, n. 4, p. 236, 2020.

FOERSTER, C.; MONSALVE, L.; MALDONADO, C.; CORTE, S.; FERRECCIO, C. A preliminary study on aflatoxin exposure by urine biomonitoring in Chile. **Revista de Micotoxina**, 2022.

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

FREITAS, G. C.; VEADO, J. C. C.; CARREGARO, A. B. Teste de avaliação da injúria renal precoce em cães e gatos. **Ciências Agrárias**, v. 35, n. 1, p. 411-426, 2014.

GARCIA, D.; RAMOS, A. J.; SANCHIS, V.; MARÍN, S. Predicting mycotoxins in foods: A review. **Food Microbiology**, v. 26, n. 8, p. 757-769, 2012.

GARNER, R. C.; MILLER, E. C.; MILLER, J. A. Liver microsomal metabolism of aflatoxin B<sub>1</sub> to a reactive derivative toxic to *Salmonella typhimurium* TA1530. **Cancer Research**, v. 32, p. 2058-2066, 1972.

GHOSH, R.C.; CHAUHAN, H. V. S.; ROY, S. Immunosuppression in broilers under experimental toxocosis. **Brazilian Veterinary Journal**, v. 146, p. 457-462, 1990.

GOMES, A. R.; PERERIRA C. M. P.; SALLIS, E. S. V.; PEREIRA, D. I. B.; SCHILD, A. L.; FARIA, R. O.; MEIRELES, M. C. A. 2014. Aflatoxicose em cães na região Sul do Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 34, n. 2, p. 162-166.

GONÇALVES, B.; SANTANA L.; PELEGRINI, P. Micotoxinas: uma revisão sobre as principais doenças desencadeadas no organismo humano e animal. **Revista de Saúde da Faciplac**, v. 4, n. 1, 2017.

GONG, Y. Y.; WATSON, S.; ROUTLEDGE, M. N. Aflatoxin exposure and associated human health effects, a review of epidemiological studies. **Food safety**, v. 4, n. 1, p. 1427, 2016.

GROOPMAN, J. D; TRUDEL, L. J.; DONAHUE, P. R.; MARSHAK-ROTHSTEIN, A.; GROSS-STEINMEYER, K.; EATON, D. L. Dietary modulation of the biotransformation and genotoxicity of aflatoxin B<sub>1</sub>. **Toxicology**, v. 299, p. 69-79, 2012.

GUIMARÃES, L. F. L.; COLLINS, C. H. Cromatografia líquida de alta eficiência. In: COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L. (Eds.). **Introdução a Métodos Cromatográficos**. Editora da UNICAMP:Campinas, 1998.

GURUSANKAR, R.; YENUGASHATI, N.; KRISHNAN, K.; HAYS, S.; HAINES, D.; ZIDEK, A.; KUCHTA, S.; KINNIBURGH, D.; GABOS, S.; MATTISON, D.; et al. The role of human biological monitoring in health risk assessment. **International Journal of Risk Assessment**, v. 20, p. 136-197, 2020.

HEYNDRICKXA, E.; SIOENB, I.; BELLEMANSB, M.; MAEYERB, M. DE.; CALLEBAUTC. A.; HENAUWB, S, DE.; SAEGER, S, DE. Assessment of mycotoxin exposure in the Belgian population using biomarkers: aim, design and methods of the BIOMYCO, **Food Additives & Contaminants**, v. 31, n. 5, p. 924–931, 2014.

IARC. **International Agency for Research on Cancer**. Disponível em: <https://monographs.iarc.who.int/>. Acesso em: 31/10/2022.

IHA, M. H.; MINI, C. A.; OKADA, I. A.; BRIGANTI, R. C.; TRUCKSESS. The use of regenerated immunoaffinity columns for aflatoxins B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> and G<sub>2</sub> in peanut confection. **Journal of Chromatography**. v. 1483, n. 3, p. 1-7, 2016.

IHA, M.H.; BARBOSA, C.B.; HECK, A. R.; TRUCKSESS, M.W. Aflatoxin M<sub>1</sub> and ochratoxin A in human milk in ribeirão preto-SP, Brazil. **Food Control**, v. 40, p. 310–313, 2014.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. **Métodos físico-químicos para análises de alimentos**. 4<sup>a</sup> ed. (1<sup>a</sup> Edição digital), p. 1020, 2008.

ISHIKAWA, A. T.; HIROOKA, E. Y.; SILVA, P. L. A.; BRACARENSE, A. P. F. R; L.; FLAIBAN, K. K. M. C.; AKAGI, C, Y.; KAWAMURA, O.; COSTA, M. C. C.; ITANO, E. N. Impact of a Single Oral Acute Dose of Aflatoxin B<sub>1</sub> on Liver Function/Cytokines and the Lymphoproliferative Response in C57Bl/6 Mice. **Toxins**, n. 9, p.374, 2017.

JAGER, A. V.; TEDESCO, M. P.; SOUTO, P. C. M. C.; OLIVEIRA, C. A. F. Assessment of aflatoxin intake in São Paulo, Brazil. **Food Control**, v. 33, n. 1, p. 87-92, 2013.

JECFA. **Joint Expert Committee on Food Additives. Evaluations of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA)**. Disponível em: <https://www.fao.org/food-safety/scientific-advice/jecfa/en/>.

JOLLY, P.; INUSAH, S.; LU, B.; ELLIS, W.; NYARKO, A.; PHILLIPS, T.; WILLIAMS, J. Association between high levels of aflatoxin B<sub>1</sub> and high viral load in HIV-positive people. **World Mycotoxin Journal**, v. 6, n. 3, p. 255, 2013.

KUIPER-GOODMAN, T. Uncertainties in the risk assessment of three mycotoxins: aflatoxin, ochratoxin, and zearalenone. **Canadian Journal Physiology Pharmacology**, v. 68, n. 7, p. 1017–1024, 1990.

LUONGO, D.; RUSSO, R.; BALESTRIERI, A.; MARZOCCO, S.; BÉRGAMO, P.; SEVERINO, L. In vitro study of the effects of AFB<sub>1</sub> and AFM<sub>1</sub> in the human Jurkat T lymphoblastoid cell model. **Journal Immunotoxicology**, v. 11, p. 353-358, 2013.

MAGRINI, M. J.; FREITAS, A. V. L.; UEHARA-PRADO, M. The effects of four types of anthropogenic disturbances on composition and abundance of terrestrial isopods (Isopoda: Oniscidea). **Zoologia**, v. 28, p. 63–71, 2011.

MAJEED, S.; IQBAL, M.; ASI, M. R.; IQBAL, S. Z. Aflatoxins and ochratoxin A contamination in rice, corn and corn products from Punjab, Pakistan. **Journal of Cereal Science**. v. 58, p. 446-450, 2013.

MARCHESE, S.; POLO, A.; ARIANO, A.; VELOTTO, S.; COSTANTINI, S.; SEVERINO, L. Aflatoxin B<sub>1</sub> and M<sub>1</sub>: Biological Properties and Their Involvement in Cancer Development. **Toxins**. v. 10, n. 214, 2018.

MARIN, S.; CANO-SANCHO, G.; SANCHIS, V.; RAMOS, A. J. The role of mycotoxins in the human exposome: Application of mycotoxin biomarkers in exposome-health studies. **Toxicol**. v. 121, p. 504–518, 2018.

MARIN, S.; SANCHIS, V.; VINAS, I.; CANELA, R.; MAGAN, N. Effect of water activity and temperature on growth and fumonisin B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> PRODUCTION BY *Fusarium proliferatum* and *F. moniliforme* on maize grain. **Letters in Applied Microbiology**, v. 21, p. 298-301, 2013.

MARSHALL, W. J.; LAPSLEY, M.; DAY, A. P.; AYLING, R. M. **Bioquímica clínica: aspectos clínicos e metabólicos**. 3ª ed. Rio De Janeiro: Editora Elsevier Ltda, 2016.

MARTINEZ, M. M. M.; ROSERO, M. M.; TABORDA, O. G. Occurrence, dietary exposure and risk assessment of aflatoxins in arepa, bread and rice. **Food Control**, v. 98, p. 359– 366, 2019.

MAZIERO, M. T.; BERSOT, L. dos S. Micotoxinas em alimentos produzidos no Brasil. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 12, n. 1, p. 89-99, 2010.

NYATHI, C. B. et al. A survey of urinary aflatoxin in Zimbabwe. **Int J Epidemiol**, v.16, p.516-9, 1987.

OLIVEIRA, C. A. F.; GERMANO, P. M. L. Aflatoxins in foodstuffs: current concepts on mechanisms of toxicity and its involvement in the etiology of hepatocellular carcinoma. **Revista Saúde Pública**, v. 31, n. 4, p. 417-24, 1997

OLIVEIRA, C. P.; SOARES, N. F. F.; OLIVEIRA, T. V.; BAFFA, J. J. C.; SILVA, W. A. Ocorrência de aflatoxina M<sub>1</sub> em leite fluido tratado com ultra alta temperatura (UHT) de Minas Gerais/Brasil. **Controle de Alimentos**, v. 30, p. 90-92, 2013.

ORSI, R. B.; OLIVEIRA, C. A. F.; DILKIN, P.; XAVIER, J. G.; DIREITO, G. M.; CORRÊA, B. OSTRY, V.; MALIR F.; TOMAN, J.; GROSSE, Y. Mycotoxins as Human Carcinogens—The Classification of IARC Monographs. **Mycotoxin Research**, v. 33, n. 1, p. 65-73, 2017.

ORSI, R. B.; OLIVEIRA, C. A. F.; DILKIN, P.; XAVIER, J. G.; DIREITO, G. M.; CORRÊA, B. Effects of oral administration of aflatoxin B<sub>1</sub> and fumonisin B<sub>1</sub> in rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). **Chemico-Biological Interactions**, v. 170, n. 3, p. 201-208, 2007.

PEREIRA, V. L.; FERNANDES, J. O.; CUNHA, S. C. Mycotoxins in cereals and related foods: A review of the occurrence and recent methods of analysis. **Food Science Trends technology**, v. 36, p. 96-136, 2014.

PITT, J. I.; MILLER, J. D. Uma história concisa da pesquisa de micotoxinas. Journal of **Agricultural and Food Chemistry**, v. 65, n. 33, p. 7021-7033, 2017.

PITT, J.; HOCKING, A. Fungos e deterioração de alimentos. **Blackie Academic and Professional**, 2009.

PLEADIN, J.; FRECE, J.; MARKOV, K. Mycotoxins in food and feed. **Nutricional Advanced**, v. 89, p. 297-345, 2019.

PRESTES, I. D.; ROCHA, L O.; NUNEZ, K. V. M.; SILVA, N. C. C. Main fungi and mycotoxins in corn grains and their consequences. **Scientia Agropecuaria**, v. 10, n. 4, p. 559-570, 2019.

RAWAL, S; KIM, J. E.; COULOMBE, R. Aflatoxin B<sub>1</sub> in poultry: Toxicology, metabolism and prevention. **Research in Veterinary Science**, v. 89, n. 3, p. 325–331, 2010.

ROMERO, A. C. et al. Occurrence of AFM<sub>1</sub> in urine samples of a Brazilian population and association with food consumption. **Food Control**, v. 21, n. 3, p. 554-558, 2010.

RUBERT, J.; SORIANO, J. M, MANES, J.; SOLER, C. Rapid mycotoxin analysis in human urine: a pilot study. **Food Chemical Toxicology**, v. 49, p. 2299–2304, 2011.

RYAN, P. B.; BURKE, T. A.; HUBAL. E. A. C.; CURA, J. J. Using biomarkers to inform cumulative risk assessment, v. 155, n. 5, p. 833-840, 2005.

- SANCHEZ, E. M.; DIAZ, G. J. Frequency and levels of aflatoxin M 1 in urine of children in Bogota, Colombia. **Revista de Micotoxina**, v. 35, n. 3, p. 271-278. 2019.
- SANTOS, A. L.; BANDO E.; MACHINSKI, J. M. Ocorrência de aflatoxina M<sub>1</sub> em leite bovino comercializado no estado do Paraná, Brasil. **Semina Ciências Agrárias**, v. 35, p. 371-374, 2014.
- SANTOS, J.S.DOS.; FRANCA, V. R.; KATTO, S.; SANTANA, E. H. W. Aflatoxina M<sub>1</sub> em leite pasteurizado, UHT e leite em pó comercializados em Londrina, Brasil e estimativa de exposição. **Arquivos Latinoamericanos de Nutrição**, v. 65, n. 3, p. 181-185, 2015.
- SILVA, A. R.; ZANIN, L. M. M.; ISHIKAWA, A. T.; YAMASHITA, C. R. T.; FRACALLOSSI, F. P.; AMORIM, T. M.; ITANO, E. N.; KAWAMAURA, O.; HIROOKA, E. Y. Elisa for the design of aflatoxins in the peanut production chain. **Research Agriculture**, v. 53, n. 3, p. 361-370, 2018.
- SMITH, C.; MARKS, A. D.; LIEBERMAN, M. **Bioquímica médica básica de Marks: Uma abordagem clínica**, 2ª edição, Porto Alegre: Artmed, 2007.
- SMITH, L.E.; PENDERGAST, A. J., TURNER, P. C.; MBUYA, M. N.; MUTASA, K.; KEMBO, G.; STOLTZFUS, R. J. The potential role of mycotoxins as contributors to dwarfism in the SHINE study. **Clinical Infectious Diseases**, v. 61, p. 733 – 737, 2015.
- SNINI, S. P.; MATHIEU, F. Agentes de biocontrole e compostos naturais contra fungos micotoxinogênicos. **Toxins**, v.12, n. 6, p. 353, 2020.
- SOBOLEV, V. S. Simple, rapid, and inexpensive cleanup method for quantitation of aflatoxins in important agricultural products by HPLC. National Peanut Research Laboratory. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 6, p. 2136-2141,2007.
- STECKLING, N.; GOTTI, A.; BOSE-O'REILLY, S.; CHAPIZANIS, D.; COSTOPOULOU, D. et al. Biomarkers of exposure in environment-wide association studies – opportunities to decode the exposome using human biomonitoring. **Environ Res.** n.164, p.597-624, 2018.
- STOCKHAM, S. L.; SCOTT, M. A. Enzimas. In: STOCKHAM, S. L.; SCOTT, M. A. **Fundamentos da Patologia Clínica Veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011.
- TOLA, M., KEBEDE, B., YILDIZ, F. Occurrence, importance and control of mycotoxins: A review. **Cogent Food and Agriculture**, v. 2, n. 1, p. 1–12, 2016.
- TOZZI, L.; CARBALLEDO, A.; LAVELLE, G.; DOOLIN, K.; DOYLE, M.; AMICO, F.; MCCARTHY, H.; GORMLEY, J.; LORD, A.; O'KEANE, V.; FRODL, T. Longitudinal functional connectivity changes correlate with mood improvement after regular exercise in a dose-dependent fashion. **European Journal of Neuroscience**, v. 43, n. 8, p. 10891096, 2016

TURNER, N. W.; BRAMHMBHATT, H.; SZABO-VEZSE, M.; POMA, A.; COKER, R.; PILERSKY, S. Analytical methods for mycotoxin determination: An update (2009– 2014). **Analytica Chimica Acta**. v. 901, p. 12-33, 2015.

TURNER, P. C.; BRANCO, K. L. M.; BURLEY, V. J.; HOPTON, R. P.; RAJENDRAM, A.; FISHER, J.; CADE, J. E.; WILD, C. P. A comparison of deoxynivalenol intake and urinary deoxynivalenol in UK adults. **Biomarkers**, v. 15, n. 6, p. 553–562, 2010.

VIDAL, A.; MENGELERS, M.; YANG, S.; SAEGER, S. DE.; BOEVRE, M. DE. Mycotoxin Biomarkers of Exposure: A Comprehensive Review. **Comprehensive Reviews Food Science and Food Safety**, v. 17, p. 1127-1155, 2018.

VIEGAS, S.; MARTINS, C. The usefulness of human biomonitoring in the case of assessment of exposure to mycotoxins. **Life Sciences Reference Module**, p. 1-6, 2020.

WONG, Z. A.; HSIEH, D. P. H. The comparative metabolism and toxicokinetics of aflatoxin B<sub>1</sub> in the monkey, rat and mouse. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 55, p. 115-25, 1980.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Framework for the Provision of Scientific Advice. **Food Safety and Nutrition**, 2007.

WU, F.; STACY, S. L.; KENSLER, T, W. Global risk assessment of aflatoxins in maize and peanuts: are regulatory standards adequately protective?. **Toxicology Science**, v. 135, n. 1, p. 251-259, 2013.

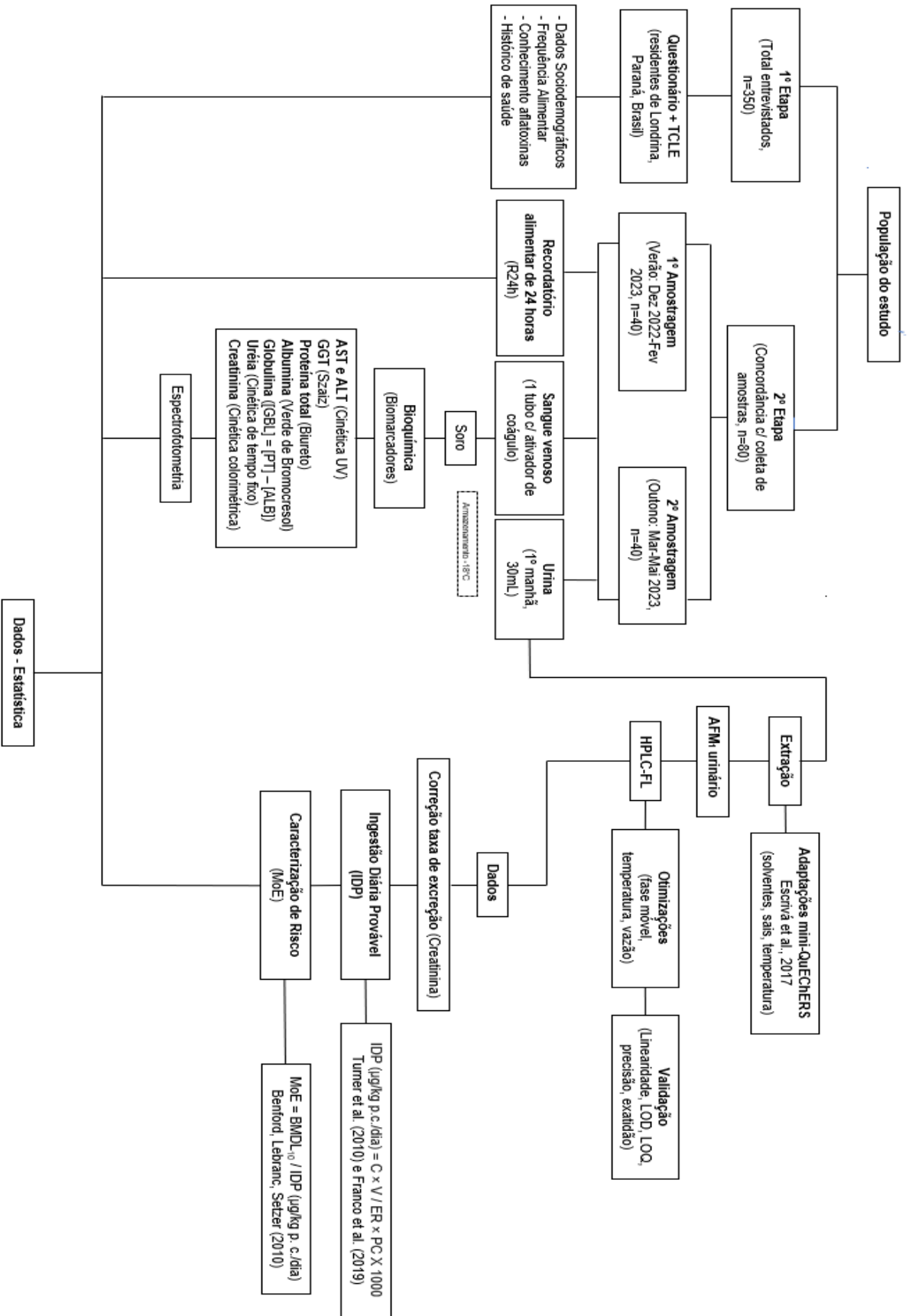
YUN-GONG, Y.; WILSON, S.; MWATHA, J.K.; ROUTLEDGE, M.N.; CASTELINO, J.M.; ZHAO, B.; KIMANI, G.; KARIUKI, C.; VENNervalD, B.J.; DUNNE, D.W.; WILD, C.P. Aflatoxin Exposure May Contribute to Chronic Hepatomegaly in Kenyan School Children. **Environmental Health Perspectives**. v. 120, n. 6, 2012.

ZHANG, X.; KUCA, K.; DOHNAL, V.; DOHNALOVÁ, V.; DOHNALOVÁ, L.; WU, Q.; WU, C. Military potential of biological toxins. **Journal of Applied Biomedicine**, p. 63-77, 2014.

ZHU, J.; ZHANG, L.; HU, X.; URINE, H.; XIAO, Y.; CHEN, J.; XU, Y.; FREMY, J.; CHU, F. S. Correlation of dietary aflatoxin B<sub>1</sub> levels with excretion of aflatoxin M<sub>1</sub> in human urine. **Cancer Research**, v. 47, n. 7, p. 1848–1852, 1987.

ZUBROD, J.; BUNDSCHUH, M.; ARTS, G.; BRUHL, C.; IMFELD, G.; KNABEL, A.; PAYRAUDEAU, S.; RASMUSSEN, J.; ROHR, J.; SCHARMULLER, A. Fungicidas - uma aula de pesticidas negligenciada?. **Environmental Science Technology**. v. 53, p. 3347–3365, 2019.

## 5 FLUXOGRAMA EXPERIMENTAL



## **6 ARTIGO: Exposição humana à aflatoxina por determinação do biomarcador AFM<sub>1</sub> em urinas de residentes de Londrina, Paraná, Brasil**

### **6.1 RESUMO**

As aflatoxinas (AFs) são micotoxinas relevantes na contaminação de diversos alimentos, especialmente ao nível de matérias primas oriundas de países com clima tropical úmido. O presente estudo teve como enfoque avaliar a exposição de AFs e o risco associado, em residentes brasileiros fixados em Londrina, região metropolitana considerada subtropical. Questionários foram aplicados em 334 participantes, para mapear o consumo de alimentos propícios a contaminação por AFs, compilar dados sociodemográficos e nível de informação ao tema abordado. Destes, 80 aceitaram fornecer amostras de urina e de sangue, e a responder o recordatório alimentar (R24h). O nível do biomarcador urinário AFM<sub>1</sub> em urina foi quantificado por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector de fluorescência (HPLC-FL). Das 80 amostras, 26 foram positivas para AFM<sub>1</sub> (32%) e apresentaram nível de 0,09 – 0,88 ng/mg de creatinina (média, 0,2 ng/mg de creatinina). Os dados foram correlacionados e maior probabilidade de ocorrência de AFM<sub>1</sub> na urina ( $p < 0,05$ ), foi detectada em indivíduos que ingeriram milho, amendoim e produtos derivados nas 24h antecedentes a coleta. Maior ocorrência de AFM<sub>1</sub> nos residentes também foram relacionados principalmente ao consumo regularmente mais elevado de iogurte, milho e derivados pela população ( $p < 0,05$ ). Os dados apontaram alterações significativas na média dos resultados de aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT) e globulinas dos participantes que apresentaram AFM<sub>1</sub> positivo ( $p < 0,05$ ). Os valores médios de ingestão diária provável (IDP) variaram de  $0.004 \pm 0.004$  ug/kg de peso corporal/dia e os valores da margem de exposição (MoE) foram inferiores a 10.000, indicando potenciais riscos à saúde.

**Palavras-chave:** micotoxinas, segurança de alimentos, fungos micotoxigênicos, biomarcadores, lesão hepática.

## 6.2 INTRODUÇÃO

A exposição humana às aflatoxinas (AFs) é uma preocupação mundial, devido ao efeito nocivo à saúde humana, principalmente ao risco de cancerígeno. Além disso, está relacionada a perda de qualidade e depreciação comercial de diversos produtos alimentícios (FLETCHER; NETZEL, 2020). Decorre principalmente pelo consumo de alimentos contaminados por fungos, especialmente *Aspergillus flavus* e *A. parasiticus*. Os análogos mais encontrados nos alimentos são a aflatoxina B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>), B<sub>2</sub> (AFB<sub>2</sub>), G<sub>1</sub> (AFG<sub>1</sub>) e G<sub>2</sub> (AFG<sub>2</sub>) (JECFA, 2016; WILD et al., 2015).

Alterações histopatológicas com presença de hepatotoxicidade após consumo de alimentos contaminados com AFs foram relatadas, indicando fator de risco para o desenvolvimento de câncer hepatocelular em seres humanos (ZUBERI et al., 2019). Este cenário está associado à biotransformação de AFB<sub>1</sub> em metabólitos altamente reativos, catalisado pelo sistema enzimático do citocromo P450 (KALEIBAR; HELAN, 2013; ZHANG et al., 2021).

No Brasil, estudos relataram a ocorrência de AFs em diferentes produtos de milho e amendoim, em níveis e prevalências variáveis (IHA et al., 2016; SILVA et al., 2018). Diante disso, a avaliação da exposição da população as AFs se torna fundamental, e pode ser realizada por meio da biomonitorização, que se baseia na análise dos metabólitos de AFs em fluidos biológicos como leite, urina e sangue (AL-JAAL et al., 2019; ARCE-LÓPEZ et al., 2020).

A aflatoxina M<sub>1</sub> (AFM<sub>1</sub>) é um metabólito hidroxilado da AFB<sub>1</sub> por enzimas hepáticas, e posteriormente, excretado na urina (ORSI et al., 2017). Apesar de menos potente em relação ao precursor, apresenta efeitos cancerígenos e imunossupressor, sendo classificada no grupo 2B como possível carcinógeno aos humanos (IARC, 2023). É considerado um biomarcador sensível de exposição de curto prazo (1-2 dias) para a AFB<sub>1</sub>, com precisão e eficácia (LUONGO et al., 2013).

A presença de AFM<sub>1</sub> no fígado, ocasiona uma potencialização da resposta inflamatória e do estresse oxidativo neste órgão. Como é o responsável pelo metabolismo de diversas biomoléculas (carboidratos, lipídios, proteínas), entende-se que a presença de AFM<sub>1</sub> pode prejudicar o funcionamento metabólico normal dos humanos (LEDDA et al., 2017; MALEKINEZHAD et al., 2021).

Diante dos riscos que as AFs e seus produtos de biotransformação representam para a saúde da população, principalmente em países em

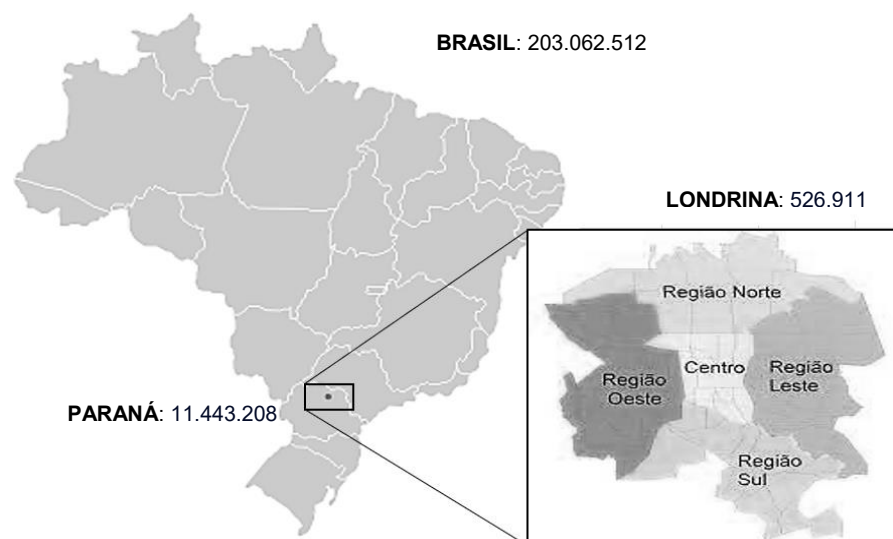
desenvolvimento, o objetivo do presente estudo foi avaliar a exposição de AFs e o risco associado, em residentes de Londrina, Paraná, Brasil, por meio do biomarcador AFM<sub>1</sub> urinário e determinar possíveis associações entre atributos sociodemográficos, consumo alimentar, alterações hepáticas e renais.

## 6.3 MATERIAL E MÉTODOS

### 6.3.1 População do estudo

A população do estudo consistiu de 334 indivíduos selecionados aleatoriamente moradores das 5 Regiões de Londrina, Paraná, Brasil. O amostral foi obtido pela fórmula  $n = N \times n_0 / N + n_0$ , descrita por Barbetta (2001). A localização geográfica e subdivisão regional do município estão ilustradas na **Figura 3**.

Os participantes preencheram inicialmente um questionário autoaplicável, após assinarem o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Ao final do questionário, todos os voluntários foram convidados a participar da segunda etapa do projeto, que consistia em fornecer amostras de sangue e urina. Destes, 80 indivíduos concordaram com a coleta de material biológico. Foram excluídos os participantes que não preencheram o questionário corretamente. A aprovação ética para este estudo foi obtida pelo Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos (COPEP) da Universidade Estadual de Londrina (UEL) (CAAE nº 5.654.031).



**Figura 3:** Localização geográfica e subdivisão regional do município de Londrina, Paraná, Brasil. A população de Londrina, Paraná e Brasil estão descritas de acordo com os dados divulgados pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), 2022.

### 6.3.2 Questionário e Recordatório Alimentar

O questionário (APÊNDICE A) foi elaborado com perguntas direcionadas a obtenção de dados sociodemográficos, laboratoriais, frequência alimentar e conhecimento populacional sobre o tema AFs. O consumo da população a alimentos suscetíveis à contaminação por AFs, foi medida por um intervalo de menos de uma vez por mês até uma vez por dia. As porções foram estimadas com base em medidas caseiras comuns aos participantes, tais como xícaras, copos e colheres.

Os participantes que voluntariaram-se a doarem as amostras de urina e sangue, responderam também a um recordatório de 24 horas (R24h) (APÊNDICE B), no qual o consumo de todos os alimentos ingeridos no dia anterior foi registrado. Dentre os itens relatados pelos indivíduos na R24h, foram selecionados alimentos inseridos nos grupos cuja contaminação por AFs tem sido mais relatada na literatura científica.

### 6.3.3 Coleta de amostras

Todos os participantes foram orientados em como proceder a coleta da primeira urina da manhã, em um recipiente de polietileno de 50 mL previamente fornecido e entregar no Laboratório de Imunorreagentes e Técnicas Moleculares (LIM), no Centro de Ciências Agrárias - UEL. Após a entrega de urina, amostras de sangue também foram coletadas em tubo com ativador de coágulo, com os participantes em jejum, seguindo as recomendações da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial (SBPC, 2010). O soro foi imediatamente separado por centrifugação. Todas as amostras foram identificadas e congeladas a  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$  até a análise.

### 6.3.4 Análise de $AFM_1$ por HPLC

#### 6.3.4.1 Método cromatográfico

A detecção e quantificação dos extratos das amostras foram realizadas por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Sistema equipado com bomba LC-20AD Shimadzu (Kyoto, Japão), detector de fluorescência Shimadzu RF-535 e coluna de fase reversa marca Phenomenex ( $250 \times 4,6\text{ mm}$ , tamanho de partícula de  $3\text{ }\mu\text{m}$ ),

volume de injeção de 10  $\mu\text{L}$ , mantidos à 40 °C. O padrão obtido (Sigma, St. Louis, MO, EUA) como AFM<sub>1</sub> cristalino purificado foi dissolvido em acetonitrila grau HPLC e sua concentração determinada por espectrofotometria de acordo com Trucksess (2005, cap. 49).

O sistema foi operado no modo isocrático com fase móvel constituída de água: acetonitrila: metanol (68:24:8, v/v/v), vazão de 1,0 mL min<sup>-1</sup> e corrida com duração de 15 min. O comprimento de onda de excitação foi 360 nm e de emissão 440 nm.

#### 6.3.4.2 Desempenho do método analítico

Para validar o método, uma amostra em branco de urina, previamente analisada pelo método descrito acima e sem níveis detectáveis de AFM<sub>1</sub>, foi enriquecida artificialmente com AFM<sub>1</sub> em diferentes concentrações (0,05; 0,1; 0,2; 0,3; 0,5; 1,0 ng/mL). A avaliação de cada ponto foi feita em triplicata. A linearidade da curva de calibração foi avaliada calculando-se o coeficiente de determinação ( $r^2$ ) e a inclinação da regressão linear.

O limite de detecção (LOD) e o limite de quantificação (LOQ) do analito foram estabelecidos através da determinação da relação sinal-ruído (S/N) em 3/1 e 10/1, respectivamente. A exatidão do método foi investigada pela recuperação. Para isso, uma amostra de urina AFM<sub>1</sub> não detectada, foi fortificada com três concentrações diferentes de solução padrão da toxina (0,07; 0,2; 0,7 ng/mL). Foram realizadas injeções em triplicata de cada nível e a recuperação considerada como a concentração de AFM<sub>1</sub> quantificada sobre a concentração adicionada.

#### 6.3.4.3 Quantificação de AFM<sub>1</sub>

A extração e purificação de amostras de urina para determinação de AFM<sub>1</sub> foram realizadas conforme descrito por Escrivá et al. (2017), com algumas modificações. As amostras de urina foram descongeladas e uma alíquota de 1 mL foi centrifugada a  $10.621 \times g$  por 3 min a 4 °C (centrífuga 5810R, Eppendorf, Alemanha) e a camada superior depositada em um tubo de centrifuga de 15 mL. Como passo seguinte, acrescentou-se 1,5 mL de acetonitrila, 0,3 g de sulfato de magnésio (MgSO<sub>4</sub>) e 0,3 mg de C18, com agitação no vortex entre as etapas.

Finalizada a extração, a solução foi agitada no vortex novamente por 1 min e centrifugada a  $4500 \times g$  por 3 min a 4°C. Posteriormente, a camada superior foi

coletada, evaporada sobre nitrogênio gasoso e reconstituído com 200 µL de fase móvel. A amostra foi derivatizada, para isso, adicionou-se 400 µL do agente derivatizante: TFA:CH<sub>3</sub>COOH:H<sub>2</sub>O (20:10:70, v/v/v), foi levada por 10 min em banho-maria a 65 °C. Em seguida, foi filtrada em filtros de membrana (PVDF de 0,22 µm).

### 6.3.6 *Análise de creatinina na urina humana*

A análise de creatinina foi realizada em amostras de urina utilizando ensaio cinético de dois pontos baseado no princípio da reação de Jaffe (VASILIADES, 1976). A concentração de creatinina obtida foi utilizada para corrigir diferenças na diluição entre os indivíduos e nas taxas de excreção, uma vez que não foi utilizada urina 24 horas, e os resultados expressos em ng de micotoxina/mg de creatinina.

### 6.3.7 *Ingestão diária provável e margem de exposição*

Segundo Turner et al. (2010) e Franco et al. (2019) a Ingestão diária provável (IDP) pode ser calculada com base nos resultados dos biomarcadores de micotoxinas detectados e quantificados na urina, através da fórmula abaixo:

$$\text{IDP } (\mu\text{g/kg pc/dia}) = C \times V / \text{ER} \times \text{PC} \times 1000 \text{ (Eq. 1)}$$

De forma que C refere-se à concentração urinária de AFM<sub>1</sub> (ng/mL), ajustada para creatinina (ng/mg de creatinina), V o volume médio de urina excretado em 24 h (1500 mL), C peso corporal (kg) de cada participante e ER constitui a taxa média de excreção urinária de AFs (%), calculada como aproximadamente 1,5% de AFM<sub>1</sub> para mulheres e 1,7% para homens (ZHU et al., 1987).

Levando em consideração o potencial carcinogênico de AFM<sub>1</sub>, o risco foi avaliado baseado na margem de exposição (MoE). A MoE foi calculada utilizando o limite de confiança inferior da dose de referência (BMDL<sub>10</sub>), que consiste em 0,25 µg/kg p.c./dia, conforme proposto por Bendord, Leblanc e Setzer (2010), dividido pelo IDP estimado, seguindo a equação abaixo:

$$\text{MoE} = \text{BMDL}_{10} / \text{IDP } (\mu\text{g/kg p. c./dia}) \text{ (Eq. 2)}$$

Um MoE  $\geq 10.000$  representa baixo risco do ponto de vista da saúde pública e MoE  $< 10.000$  representa elevado risco, e, portanto, maior preocupação (EFSA, 2013).

### 6.3.8 Avaliação hepática e renal

As amostras foram submetidas a dosagens bioquímicas de aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), gama-glutamilttransferase (GGT), proteína total, albumina, globulinas e uréia. Os resultados das concentrações de globulinas foram obtidos por meio das diferenças entre as concentrações de proteína total e de albumina ( $[GBL] = [PT] - [ALB]$ ).

As metodologias foram feitas de acordo com as recomendações dos protocolos dos kits de ensaio Bioclin e estão descritas na **Tabela 2**.

**Tabela 2:** Metodologia utilizada na análise dos parâmetros bioquímicos.

Parâmetro Bioquímico	Metodologia
AST	Cinética UV
ALT	Cinética UV
GGT	Szaiz (1996)
Albumina	Verde de Bromocresol
Proteína total	Biureto
Uréia	Cinética de tempo fixo
Creatinina	Cinética colorimétrica

AST, aspartato aminotransferase; ALT, alanina aminotransferase; Gama GT, gamaglutamilttransferase.

### 6.3.9 Análise de dados

O software Statistica v.10 (StatSoft ®, USA) foi utilizado para a análise dos dados. A análise descritiva foi feita para determinar as médias e intervalos interquartis dos analitos. As diferenças nas concentrações do biomarcador AFM<sub>1</sub> entre valores dos parâmetros bioquímicos, foram analisadas pelo Teste *t* não pareado de Student.

O teste de Qui-Quadrado com o Coeficiente de Correlação de Pearson (bicaudal) foi aplicado para avaliar a correlação entre os níveis de AFM<sub>1</sub> urinário com atributos sociodemográficas dos participantes e consumo alimentar. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

## 6.4 RESULTADOS

### 6.4.1 População do estudo

Após a triagem final totalizaram-se 334 indivíduos, 69,5% (n=232) do sexo feminino e 30,5% (n=102) do sexo masculino. Os participantes foram categorizados em relação aos seus atributos sociodemográficos e os dados estão descritos na **Tabela 3**. Predominou-se a faixa etária entre 21-30 anos (56,6%, n=189). No aspecto educação, 317 (95%) declarou ter educação básica completa.

**Tabela 3:** Características sociodemográficos dos participantes do estudo (n=334).

Variáveis	Categorias	N	%
Gênero	Masculino	102	30,5
	Feminino	232	69,5
Idade	18-20 anos	61	18,2
	21-30 anos	189	56,6
	31-40 anos	32	9,6
	41-50 anos	25	7,5
	>51 anos	27	8,1
Residência	Norte	39	11,7
	Sul	110	32,9
	Central	69	20,7
	Leste	40	12,0
	Oeste	76	22,7
Nível educacional	Ensino Fundamental Incompleto	6	1,8
	Ensino Fundamental	11	3,3
	Ensino Médio	198	59,3
	Educação Superior	44	13,2
	Pós-Graduação	75	22,4

N: número de indivíduos.

No que diz respeito ao índice médio de massa corporal (IMC), 46,1% (n=154) estava alterado, sendo 12,9% (n=43) com obesidade. Quando questionados sobre a prática de exercícios físicos, 168 (50,3%) não praticava nenhum exercício físico.

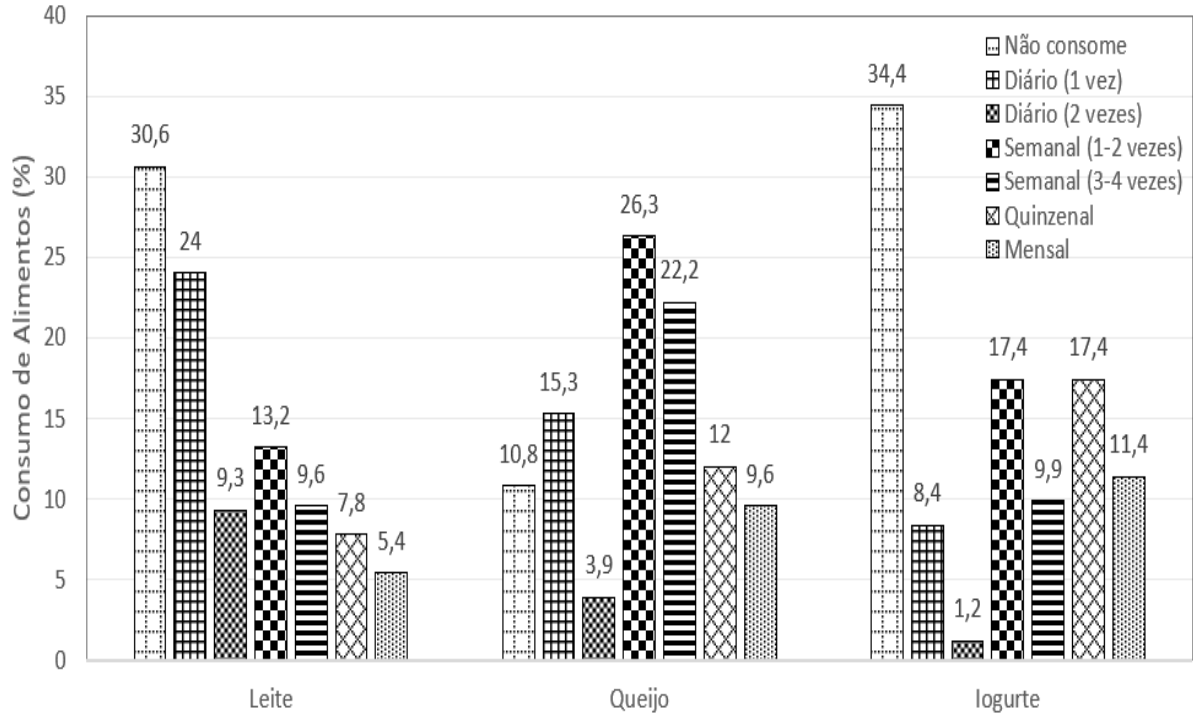
#### *6.4.2 Conhecimento dos indivíduos sobre aflatoxinas*

As respostas dadas pelos participantes no questionário mostraram claramente, que a maioria desconhecia sobre AFs e seu efeito nocivo à saúde (93,8%). A maioria dos voluntários (62,2%) também não souberam identificar os possíveis locais responsáveis pela contaminação fúngica dos alimentos. Além disso, em geral (92,4%) correlacionou a contaminação somente ao armazenamento inadequado (antes de chegar à indústria ou nas residências) e desconheciam os riscos da colheita, secagem e processamento inadequado.

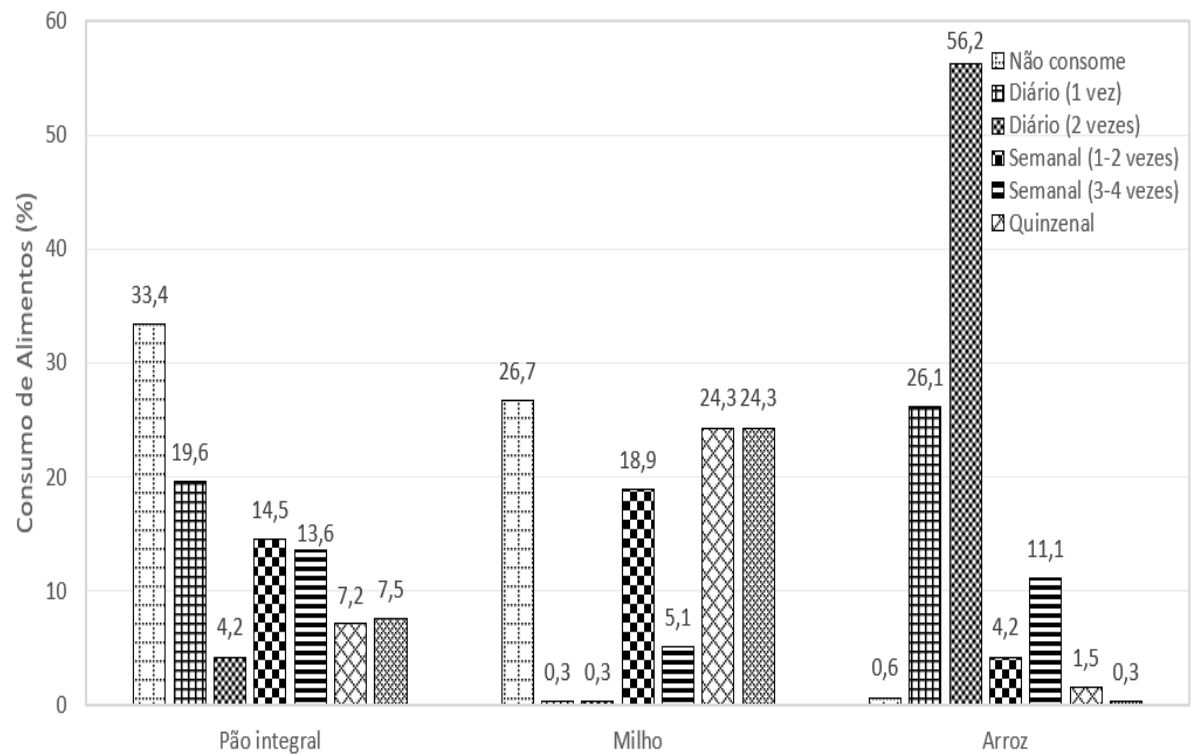
#### *6.4.3 Consumo alimentar habitual (frequência) relatado pelos participantes*

Os hábitos alimentares dos indivíduos amostrados foram avaliados. Confirmou-se que os alimentos geralmente relatados como contaminados com AFs no Brasil, também faziam parte da dieta regular dos participantes. As informações obtidas foram descritas na forma de frequência de consumo (diário, semanal, quinzenal, mensal e nunca/raramente), apresentados na **Figura 4, 5 e 6**.

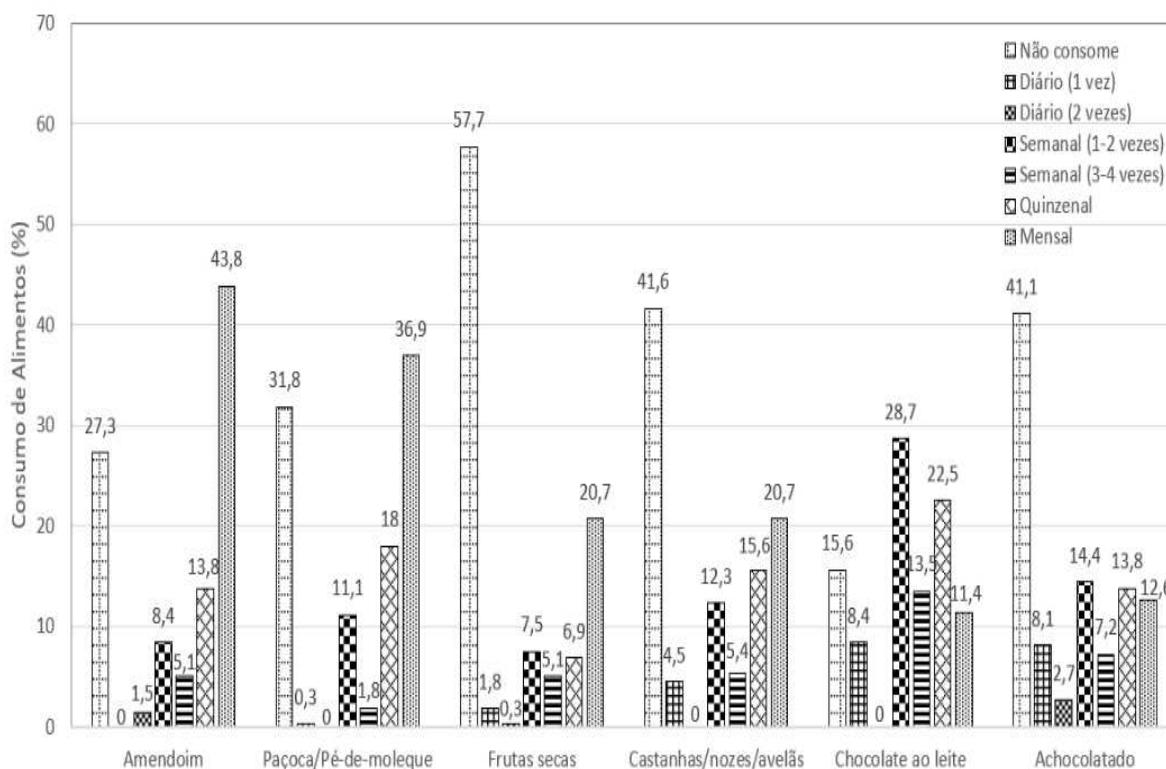
Entre os alimentos listados, arroz, pão de forma integral (grupo de cereais e derivados) e leite (grupo de laticínios), foram os mais frequentes na alimentação dos entrevistados. Em contrapartida, frutas secas obteve as menores taxas de consumo.



**Figura 4:** Frequência de consumo de alimentos pertencentes ao grupo dos laticínios comumente contaminados com AFM<sub>1</sub> pela população do estudo (n=334).



**Figura 5:** Frequência de consumo de alimentos pertencentes ao grupo dos cereais comumente contaminados com AFB<sub>1</sub> e AFM<sub>1</sub> pela população do estudo (n=334).

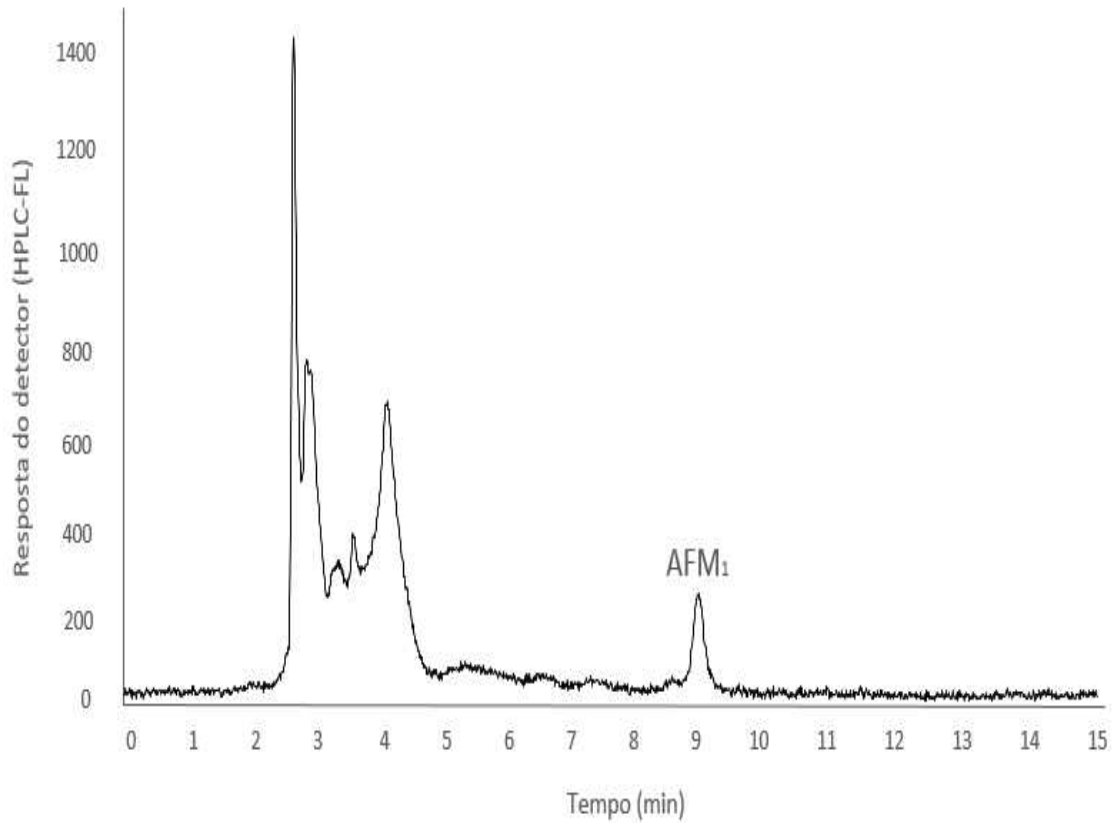


**Figura 6:** Frequência de consumo de alimentos comumente contaminados com AFB<sub>1</sub> e AFM<sub>1</sub> pela população do estudo (n=334).

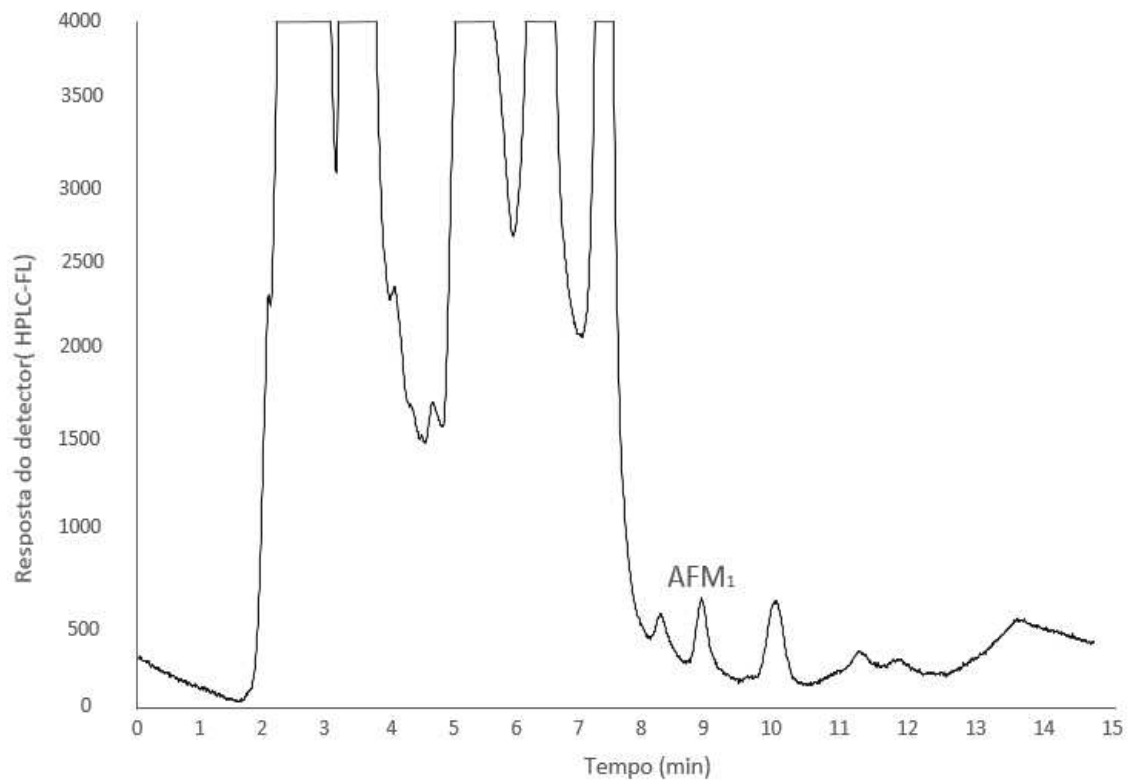
#### 6.4.4 Desempenho do método analítico

O desempenho do método utilizado para determinação de AFM<sub>1</sub> em urina foi validado no presente estudo como segue: O limite de detecção (LOD) e o limite de quantificação (LOQ) foram 0,02 e 0,05 ng/mL, respectivamente. O coeficiente de determinação ( $r^2$ ) da curva de calibração foi 0,992, o que confirmou a linearidade do gráfico.

Os valores de recuperação ficaram na faixa de 70-100% indicando que o desempenho do método analítico obedeceu às diretrizes recomendadas pelo Regulamento da Comissão Europeia n.º 401/2006 (EUROPEAN COMMISSION, 2006). O tempo de retenção de AFM<sub>1</sub> foi de 8,7 minutos. As leituras do analito foram então segregadas em dois grupos, positivo e negativo, com base na presença ou ausência de AFM<sub>1</sub> quantificável (> LOQ). O cromatograma da solução padrão de AFM<sub>1</sub> e o cromatograma de uma amostra com AFM<sub>1</sub> urinário positivo, estão representados na **Figura 7 e 8**, respectivamente.



**Figura 7:** Cromatograma da solução padrão de AFM<sub>1</sub> (tempo: 8,7 minutos) no sistema HPLC-FL.



**Figura 8:** Cromatograma da amostra de urina contaminada com AFM<sub>1</sub> (tempo: 8,7 minutos).

#### 6.4.5 AFM<sub>1</sub> urinário

Dos 334 participantes, 80 doaram amostras de urina para análise do biomarcador AFM<sub>1</sub>. Destes, 32,5% (n= 26) das amostras foram positivas para AFM<sub>1</sub> (concentrações superiores ao limite de quantificação da metodologia utilizada). As concentrações variaram de 0,09 - 0,88 ng/mg de creatinina, com média de 0,2 ng/mg de creatinina.

#### 6.4.6 Consumo alimentar relatado pelos participantes no R24h

Foi obtida a prevalência dos alimentos consumidos pelos 80 participantes nas 24 horas antecedentes a coleta, através do Recordatório Alimentar (R24h). Os alimentos foram selecionados de acordo com potencial contaminação por AFs. Os resultados são expressos em porcentagem de consumo, apresentados na **Tabela 4**.

Os voluntários consumiram no dia anterior principalmente arroz e pão, feijão e queijo. Não houve diferenças entre os sexos no consumo alimentar, com exceção de maior consumo de biscoitos entre os homens.

**Tabela 4:** Consumo alimentar diário dos participantes do estudo (n=80), estratificado por sexo.

Item Alimentar	n (%)			Teste Qui-Quadrado	p-valor
	Todos	Mulheres	Homens		
Leite	27 (33,7)	16 (29,6)	11 (42,3)	1,261	0,261
Queijos	42 (52,5)	27 (50)	15 (57,7)	0,416	0,519
logurte	13 (20)	8 (14,8)	5 (19,2)	0,251	0,616
Feijão	44 (55)	28 (51,8)	16 (61,5)	0,665	0,415
Milho e derivados	8 (10)	6 (11,1)	2 (7,7)	0,228	0,633
Castanhas	6 (7,5)	4 (7,4)	2 (7,7)	0,002	0,964
Frutas secas	6 (7,5)	3 (5,6)	3 (11,5)	0,905	0,341
Chocolate	32 (40)	23 (42,6)	9 (34,6)	0,465	0,495
Amendoim e paçoca	6 (7,5)	3 (5,6)	3 (11,5)	0,905	0,341
Arroz	57 (71,2)	37 (68,5)	20 (76,9)	0,605	0,437
Pão	56 (70)	39 (72,2)	17 (65,4)	0,390	0,532
Biscoito	21 (26,2)	10 (18,5)	11 (42,3)	5,130	0,023
Bolo	14 (17,5)	10 (18,5)	4 (15,4)	0,119	0,730
Macarrão	18 (22,5)	12 (22,2)	6 (23,1)	0,007	0,932

n: número de indivíduos. Análise estatística: Valores de p obtidos do coeficiente de correlação de Pearson (bicaudal). Nível significativo: Aqui, um valor de  $P < 0,05$  foi considerado significativo.

#### 6.4.7 Associação entre nível do biomarcador AFM<sub>1</sub> urinário e atributos sociodemográficos

Os resultados da análise de correlação entre AFM<sub>1</sub> em relação a fatores sociodemográficos são exibidos na **Tabela 5**. Associações significativas foram observadas somente entre refeições fora de casa e AFM<sub>1</sub> urinário entre os

entrevistados. A frequência do consumo alimentar fora do domicílio foi de em média 5x na semana, com maior prevalência no almoço.

Nenhuma diferença significativa ( $>0,05$ ) foi observada nas concentrações médias dos diferentes atributos. Participantes do sexo masculino e feminino apresentaram níveis significativamente semelhantes com média de  $0,25 \pm 0,2$  e  $0,22 \pm 0,1$  ng/mg creatinina, respectivamente.

**Tabela 5:** Ocorrência de AFM<sub>1</sub> em amostras de urina com base em atributos sociodemográficos da população estudada (n=80).

Atributos		AFM <sub>1</sub> Positivo n (%)	Teste Qui- Quadrado	p- valor
Sexo	Feminino	20 (37%)	1,559	0,212
	Masculino	6 (23,1%)		
Idade	18-30 anos	20 (32,3%)	0,007	0,932
	> 30 anos	6 (33,3%)		
Residência	Norte	0	5,685	0,224
	Sul	7 (24,1%)		
	Central	7 (36,8%)		
	Leste	2 (33,3%)		
	Oeste	10 (47,6%)		
Escolaridade	Ensino Médio	15 (34,9%)	1,218	0,748
	Ensino Superior	4 (40%)		
	Pós-Graduação	7 (30%)		
Índice de massa corporal	Normal	14 (34,1%)	0,104	0,747
	Alterado	12 (30,8%)		
Refeições fora de casa	Nunca/Raramente ( $\leq 1$ /semana)	1 (7,1%)	4,974	0,026
	Sim	25 (37,9%)		
Bebidas	Nunca/Raramente	15 (33,3%)	0,033	0,857
	Sim	11 (31,4%)		
Fumante	Não	24 (33,3%)	0,553	0,758
	Sim	2 (28,5%)		
Nível de conhecimento sobre Aflatoxinas	Baixo	18 (38,3%)	1,930	0,165
	Alto	8 (24,2%)		

n: número de indivíduos. Valores de p obtidos do Coeficiente de Correlação de Pearson (bicaudal). Nível significativo: Aqui, um valor de  $P < 0,05$  foi considerado significativo.

#### 6.4.8 Associação entre nível do biomarcador AFM<sub>1</sub> urinário e ingestão alimentar

A partir das informações fornecidas nos questionários de frequência alimentar foram analisadas possíveis correlações entre os níveis urinários de AFM<sub>1</sub> e o consumo alimentar habitual. Os itens alimentares foram considerados na análise de correlação de Pearson na **Tabela 6**. O consumo de milho e derivados, apresentou tendência positiva de correlação ( $p = 0,023$ ) com o nível urinário de AFM<sub>1</sub>. Foi observado correlações significativas também com o consumo alto de iogurte ( $p = 0,020$ ).

**Tabela 6:** Associação entre a frequência de ingestão alimentar habitual e presença do biomarcador AFM<sub>1</sub> entre os entrevistados (n= 80).

Item alimentar	Média da ingestão total (dia)	AFM <sub>1</sub>		Teste Qui-Quadrado	p-valor
		Positivo n (%)	Negativo n (%)		
Leite	< 85 mL (baixo)	13 (28,89%)	32 (71,11%)	0,611	0,434
	> 85 mL (alto)	13 (37,14%)	22 (62,86%)		
Queijos	< 8,5 g (baixo)	13 (30,23%)	30 (69,77%)	0,218	0,641
	> 8,5 g (alto)	13 (35,14%)	24 (64,86%)		
Iogurte	< 85 mL (baixo)	13 (24,07%)	41 (75,93%)	5,38	0,020
	> 85 mL (alto)	13 (50%)	13 (50%)		
Feijão	< 25 g (baixo)	2 (15,38%)	11 (84,62%)	2,07	0,150
	> 25 g (alto)	24 (35,82%)	43 (64,18%)		
Milho e derivados	< 8,5 g (baixo)	15 (25,42%)	44 (74,58%)	5,13	0,023
	> 8,5 g (alto)	11 (52,38%)	10 (74,14%)		
Castanhas	< 6 g (baixo)	22 (33,33%)	44 (66,67%)	0,12	0,730
	> 6 g (alto)	4 (28,57%)	10 (71,43%)		
Frutas secas	< 6 g (baixo)	23 (31,94%)	49 (68,06%)	0,101	0,750
	> 6 g (alto)	3 (37,50%)	5 (62,50%)		
Chocolate	< 10 g (baixo)	23 (35,94%)	40 (64,06%)	1,72	0,189
	> 10 g (alto)	3 (18,75%)	13 (81,25%)		
Amendoim e derivados	< 2,0 g/dia (baixo)	4 (33,33%)	8 (66,67%)	0,004	0,946
	> 2,0 g/dia (alto)	22 (32,35%)	46 (67,65%)		
Arroz	< 25 g (baixo)	0 (%)	4 (100%)	2,07	0,150
	> 25 g (alto)	26 (34,67%)	49 (65,33%)		
Pão Integral	< 20 g (baixo)	18 (31,03%)	40 (68,97%)	0,21	0,649
	> 20 g (alto)	8 (36,36%)	14 (63,64%)		
Cerveja	< 85 mL (baixo)	24 (33,33%)	48 (66,67%)	0,23	0,633
	> 85 mL (alto)	2 (25%)	6 (75%)		

n: número de indivíduos. Valores de p obtidos do Coeficiente de Correlação de Pearson (bicaudal). Nível significativo: Aqui, um valor de  $P < 0,05$  foi considerado significativo.

A partir das informações fornecidas no R24h, possíveis correlações foram analisadas entre os níveis urinários de AFM<sub>1</sub> e os alimentos consumidos no dia anterior a coleta. Os participantes do estudo que relataram a ingestão de milho, amendoim e derivados, apresentaram maiores percentuais de amostras positivas. Os dados estão representados na **Tabela 7**.

**Tabela 7:** Correlação entre o consumo alimentar nas últimas 24h e presença de AFM<sub>1</sub> urinário (n=80).

Item Alimentar	Teste Qui-Quadrado	p-valor
Amendoim e derivados	5,485	0,019
Milho e derivados	4,280	0,038
Leite e derivados	0,200	0,654
Leguminosas	0,389	0,533
Oleaginosas	2,12	0,145
Produtos de cacau e chocolate	0,085	0,770
Arroz	0,063	0,802
Soja	0,002	0,963
Frutas secas	0,741	0,389

Valores de p obtidos do Coeficiente de Correlação de Pearson (bicaudal). Nível significativo: Aqui, um valor de  $P < 0,05$  foi considerado significativo.

#### 6.4.9 Associação entre nível do biomarcador AFM<sub>1</sub> urinário e parâmetros bioquímicos

Parâmetros bioquímicos considerados padrões para o diagnóstico de alterações renais e hepáticas foram avaliados. Os participantes do sexo masculino, nos quais o AFM<sub>1</sub> urinário foi positivo, apresentaram níveis significativamente diferentes em ALT e globulinas, dos que apresentaram AFM<sub>1</sub> negativo. Nas mulheres, foi observado alteração significativa no biomarcador AST entre o grupo AFM<sub>1</sub> positivo e o grupo AFM<sub>1</sub> negativo. Os dados estratificados por sexo, são mostrados na **Tabela 8**.

**Tabela 8:** Impacto do AFM<sub>1</sub> em biomarcadores associados a danos hepáticos e renais, estratificado por sexo (n=80).

Parâmetros	Mulheres			Homens		
	AFM <sub>1</sub> (P)	AFM <sub>1</sub> (N)	p-valor	AFM <sub>1</sub> (P)	AFM <sub>1</sub> (N)	p-valor
	Média ± DP	Média ± DP		Média ± DP	Média ± DP	
Creatinina (mg/dL)	0,7 ± 0,3	0,8 ± 0,3	0,119	0,8 ± 0,4	1,0 ± 1,3	0,450
Uréia (mg/dL)	27,4 ± 6,7	26,3 ± 7,1	0,571	30,4 ± 12,7	30,4 ± 9,3	0,990
Proteínas Totais (g/dL)	7,1 ± 1,1	7,2 ± 1,0	0,784	6,2 ± 0,7	6,6 ± 2,1	0,685
Albumina (g/dL)	4,2 ± 0,7	4,1 ± 0,7	0,763	4,6 ± 1,0	4,4 ± 0,9	0,653
Globulinas (g/dL)	2,9 ± 1,1	3,2 ± 1,0	0,440	1,58 ± 0,4	2,2 ± 1,2	0,031
AST (U RF/mL)	19,4 ± 7,2	15,2 ± 7,1	0,038	23,2 ± 8,3	22,1 ± 10,3	0,816
ALT (U RF/mL)	15,5 ± 6,8	15,4 ± 6,0	0,976	20,4 ± 5,3	15,7 ± 4,7	0,050
Gama GT (U/L)	18,3 ± 10,2	24,7 ± 19,9	0,188	21,0 ± 8,2	23,2 ± 14,2	0,974

P: positivo; A: negativo. Análise estatística: Para comparar as colunas entre si, realizou-se o Teste *t* não pareado de Student (bicaudal). Nível significativo: Aqui, um valor de  $P < 0,05$  foi considerado significativo. AST, aspartato aminotransferase; ALT, alanina aminotransferase; Gama GT, gamaglutamiltransferase.

#### 6.4.10 Ingestão diária provável e avaliação do risco

As concentrações obtidas do biomarcador AFM<sub>1</sub> foram utilizadas para estimar os valores de Ingestão diária provável (IDP) da população em estudo. Os cálculos foram realizados para as amostras positivas (>LOQ). A IDP média observada neste estudo foi de  $0,004 \pm 0,004$  ug/kg de peso corporal/dia. Levando em consideração o potencial carcinogênico das AFs, avaliou-se o risco de exposição pela MoE. Os valores de MoE (102,14) para AFM<sub>1</sub> relacionados aos seus respectivos valores de IDP obtidos, foram bem abaixo do nível de referência recomendado (< 10.000).

## 6.5 DISCUSSÃO

A biomonitorização proporciona a melhor abordagem para avaliar a exposição humana as AFs. Neste estudo, foi conduzida uma análise comparativa dos níveis de AFM<sub>1</sub> na urina, com atributos sociodemográficos, consumo alimentar e alterações

hepáticas e renais, na população adulta de Londrina, Paraná, Brasil.

A detecção de AFM<sub>1</sub> em 32% das 80 amostras e a faixa de concentrações detectadas de 0,09 – 0,88 ng/mg de creatinina, com média de 0,2 ng/mg de creatinina, indicam uma exposição significativa as AFs na população deste estudo. Para colocar esta descoberta em perspectiva, os dados podem ser comparados com dados do biomarcador urinário em demais estudos.

Os estudos de Coppa et al. (2021), Jager et al. (2014) e Romero et al. (2010) confirmaram a presença de AFM<sub>1</sub> em amostras de urina de residentes do Estado de São Paulo, Brasil, com 57%, 61% e 78% das amostras positivas, respectivamente. Os resultados de Franco et al. (2019) realizado no mesmo estado, foi o estudo que obteve a menor frequência, com 12%. Portanto, o presente estudo obteve resultado (32%) dentro da faixa reportada na literatura.

Vale ressaltar, que diferentes métodos para análise de AFM<sub>1</sub> foram utilizados nos estudos descritos acima, e conseqüentemente, com diferentes limites de detecção e quantificação. É possível que um limite de detecção menor ao alcançado neste estudo (0,05 ng/mL) aumentasse a porcentagem de amostras positivas. Mesmo assim, as concentrações e intervalos médios relatados fornecem uma orientação para a exposição à AFs em demais populações.

As concentrações de AFM<sub>1</sub> identificado foram maiores do que as descritas por Jager et al. (2014) e Franco et al. (2019), que relataram valores médios de 0,0019 - 0,0127 ng/mg de creatinina e 0,0005 - 0,6400 ng/mg de creatinina, respectivamente. Todavia, Coppa et al. (2021) obteve concentrações entre 0,02 - 27,56 ng/mg de creatinina, valor bem superior ao deste estudo.

Na África, os níveis mais altos foram observados em Gana em adultos com 91,2% das amostras positivas, valor máximo de 11,56 ng/mg de creatinina e média de 1,7 ng/mg de creatinina (JOLLY et al., 2006). Em um estudo recente, Forster et al (2022), encontraram concentrações variando de 0,31 - 1,39 ng/mg de creatinina, com média de 0,66 ng/mg de creatinina, em urinas da população de Mauco, no Chile. Portanto, países com alta incidência de AFs em alimentos demonstraram maior concentração média de AFM<sub>1</sub> na urina em relação a este estudo.

Valores de AFM<sub>1</sub> sem correção de creatinina também são encontrados na literatura. Romero (2010), por exemplo, em um estudo realizado no Brasil, identificaram concentrações variando de 0,0018 – 0,399 ng/mL e média de 0,005 ng/mL. Sulaiman, Jamaluddin e Sabran (2018), na Malásia, relataram concentrações

variando de 0,65 a 5,34 ng/mL e média de 1,23 ng/mL.

De acordo com os dados de toxicocinética disponíveis, a presença de AFM<sub>1</sub> ocorrerem em níveis baixos na urina de humanos expostos (FRANCO et al., 2019). Esses compostos são rapidamente excretados na urina, com uma meia-vida biológica de cerca de 1 dia. Sua excreção urinária reflete a ingestão dietética de AFB<sub>1</sub> em média durante 1–3 dias (DOHNAL; WU; KUCA 2014; JAGER et al., 2014).

Segundo o Instituto Nacional de Meteorologia (INMET), as chuvas e temperaturas durante e antecedentes ao período das coletas, foram acima da média em quase todas as Regiões Brasileiras. Desta forma, pode ser entendido, que os produtos consumidos pelos participantes, estavam sendo armazenados em condições mais quentes e úmidas do que o habitual, propiciando a contaminação dos alimentos (INMET, 2022; INMET, 2023). É importante destacar, que a cadeia de armazenamento deve ser um ponto de implantação de medidas preventivas, capazes de reduzir ao mínimo a contaminação (PLEADIN; FRECE; MARKOV, 2019).

Conforme ilustrado na **Tabela 5**, indivíduos os quais relataram realizar mais de uma refeição fora de casa na semana, apresentavam um risco significativamente maior de ter AFM<sub>1</sub> nas suas amostras de urina em comparação com os indivíduos que realizam suas refeições preferencialmente em casa. A maior parte das refeições fora de casa eram realizadas em restaurantes universitários e comunitários. Os dados demonstram a importância do cuidado no armazenamento e manipulação dos alimentos em restaurantes e do conhecimento dos manipuladores de alimentos e da população de forma geral (LIMA; LIMA; SILVA, 2019).

Todavia, as respostas dadas pelos participantes evidenciaram uma falta de informação e consciência, das causas e efeitos do consumo de alimentos contaminados com AFs sobre as implicações a saúde. A falta de conhecimento leva ao consumo elevado de alimentos propícios a contaminação, tais como amendoim e milho, dados evidenciados no consumo alimentar rotineiro dos participantes.

O R24h aplicado, concentrou-se no consumo de vários itens durante às 24h antecedentes as coletas. Por outro lado, o questionário registrou frequência alimentar de alimentos comumente contaminados com AFs. Estas informações foram utilizadas para verificar a ingestão dietética da população e verificar correlações com os níveis do biomarcador urinário.

Foi observado pelos dados do consumo habitual, que níveis mais elevados de AFM<sub>1</sub> nos residentes podem estar relacionados com um consumo regularmente mais

elevado de iogurte ( $\geq 85$  mL/dia), milho e produtos a base de milho ( $\geq 8,5$  g/dia) pela população (**Tabela 6**).

Leite e produtos lácteos, são contaminados porque os animais consomem rações com micotoxinas, principalmente AFB<sub>1</sub>, que são metabolizadas e liberadas em seus fluídos biológicos na forma de AFM<sub>1</sub>. Devido à alta estabilidade deste metabólito, às tecnologias de processamento de leite e produtos derivados impostas não são suficientes. Existe Limite Máximo Tolerado (LMT) regulatório brasileiro para AFM<sub>1</sub> em leite de 500 ng/L, porém não há limite ainda para iogurtes e bebidas lácteas (IARC, 2022; JALILI; SCOTTER, 2015).

Através do R24h, observou que os participantes consumiam principalmente produtos à base de cereais, como arroz branco e pão, porém não houve correlação positiva destes alimentos e os níveis urinários de AFM<sub>1</sub>. Por outro lado, uma correlação positiva foi observada entre o consumo de milho, amendoim e seus derivados (**Tabela 7**).

Diversos estudos apontam milho, amendoim, bem como seus derivados, como os alimentos mais propícios a contaminação por AFs, em condições naturais, devido a mudanças nas práticas agrícolas. As ocorrências mundiais, foram bem documentadas e revisadas na literatura, com níveis variáveis e incidências de até 50% das amostras analisadas (SILVA et al., 2018; GRANADOS-CHINCHILLA et al., 2017; LEE et al., 2017; JAGER et al., 2013; MAGRINE et al., 2011).

Além disso, o estudo da associação da exposição humana ao AFM<sub>1</sub> com alterações hepáticas e renais, foi conduzido pela avaliação dos níveis séricos de marcadores bioquímicos dos participantes (**Tabela 8**). Os dados apontaram aumento significativo na média dos resultados das enzimas AST (em mulheres) e ALT (em homens), em participantes com AFM<sub>1</sub> positivo. Estas enzimas são indicativas de danos hepáticos, pois são liberadas do fígado para a corrente sanguínea quando este órgão é lesionado (SAAD-HUSSEIN et al., 2020).

Estes dados concordaram com os resultados de estudos anteriores, como de Saad-Hussein et al. (2016), que relataram nível sérico da enzima ALT e AST significativamente mais alto em indivíduos expostos à AFs quando comparado ao seu controle. Em um estudo bioquímico semelhante a este, conduzido na população residente do distrito de Faisalabad, coincidiu com a investigação atual, onde a exposição ao AFM<sub>1</sub> alterou diversos parâmetros bioquímicos, incluindo AST e ALT (AKASH et al., 2021).

Da mesma maneira, alterações foram observadas em globulinas, exibidas por uma diminuição significativa (em homens). Vale salientar, que globulinas são um grupo de proteínas que transportam diversas substâncias no sangue. Neste contexto, globulina sérica se refere a medida da divisão da proteína total pela albumina (WANG et al., 2022). Uma relação matemática que ao se apresentar diminuída pode indicar cirrose ou doença renal (CHAKRABORTY, 2015). Em estudos anteriores, a globulina em níveis baixos foi considerada um fator significativo para a patogênese de doenças hepáticas, especialmente em casos graves da doença (INAMINE; SCHNABL, 2018).

Os resultados representam claramente que a exposição ao AFM<sub>1</sub> pode perturbar o desempenho normal dos rins e do fígado. Isso condiz com estudos realizados, que indicam que são os órgãos mais afetados pelas micotoxinas em geral, por serem metabolizadas no fígado e excretadas através dos rins (ALVAREZ et al., 2020; ORSI et al., 2017).

Diante dos resultados, a estimativa de exposição a AFs e a caracterização de risco foi realizada pelos dados do biomarcador urinário em estudo. Em comparação com estudos realizados no Brasil, a média de IDP para AFM<sub>1</sub> identificado ( $0.004 \pm 0.004$  ug/kg de peso corporal/dia) foi bem semelhante ao descrito por Franco et al. (2019), que relataram valores médios de  $0.001 \pm 0.002$  ug/kg/kg de peso corporal/dia para homens e mulheres adultos.

Valores superiores foram obtidos no estudo de Coppa et al. (2021), que obteve IDP médio de  $1.58 \pm 6.84$  ug/kg de peso corporal/dia para mulheres. Os níveis de IDP médio relatados por Gerding et al (2015) entre as populações Haitiana e de Bangladesh também encontraram valores superiores, com média de 0,3 ug/kg de peso corporal/dia para ambos os sexos.

A variabilidade individual na excreção renal entre os voluntários e as taxas de excreção muito baixas de AFM<sub>1</sub> (1,5%, Zhu et al., 1987) podem introduzir incertezas nas estimativas de IDP e na caracterização de risco. Isso significa que as estimativas de risco podem não ser precisas para todos os indivíduos. Por isso, a correção de creatinina foi realizada.

O MoE de 102,14 para exposição a AFM<sub>1</sub> apresentou um valor mais preocupante do que em outro estudo realizado no Brasil (258,29) (Franco et al., 2019). Em contrapartida, os resultados foram bem inferiores ao de Coppa et al. (2019), que obteve um MoE de 1,5. Vale salientar, que os valores de MoE de todos os estudos mencionados (<10.000) indicam alto risco ao desenvolvimento de câncer

hepatocelular na população brasileira (BENFORD; LEBLANC; SETZER, 2010).

É importante ressaltar, que as pessoas da amostragem são semelhantes em termos de idade, recursos e dieta. Em um país com tanta diversidade de população e de recursos, e muitas vezes limitações de alimentos, não pode haver a generalização da exposição (WILD et al., 2015).

O biomarcador urinário avaliado é rapidamente excretado na urina, portanto os dados apresentados neste estudo são úteis para recomendações de segurança de alimentos. Essas informações podem ajudar a identificar áreas onde a exposição é mais alta e informar ações para reduzir os riscos à saúde da população, como regulamentações e educação pública, desde que as considerações feitas sejam consideradas ao interpretar os resultados (FRANCO et al, 2019).

A exposição de AFs representa um grave risco a saúde pública, principalmente em países em desenvolvimento (WILD et al., 2015). Estão presentes em diversos ingredientes base da culinária, e por isso, medidas de controle sob uma perspectiva científica e educativa carecem de serem implementadas (TONDO, 2020). A disseminação de informações, com o objetivo de auxiliar na promoção da segurança alimentar e nutricional é fundamental, visto que, acarreta impactos significativos a saúde pública (CARDOSO-FILHO; CALDAS; MURATORI, 2015).

## 6.6 CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo demonstraram que a população está exposta as AFs, através da presença de AFM<sub>1</sub> urinário, valores de IDP e MoE obtidos. As alterações bioquímicas observadas por meio dos biomarcadores séricos, indicam uma preocupação com os riscos adicionais à saúde da população. As associações significativas do consumo alimentar de milho, amendoim e derivados, com a exposição ao AFM<sub>1</sub> descritos, podem auxiliar as agências reguladoras e as indústrias alimentícias a avaliar melhor a presença de AFs nestes alimentos e o padrão de exposição em pelo menos parte da população.

## 6.7 REFERÊNCIAS

AKASH, M. S. H.; HAQ, M. E. U.; QADER, A.; KAMWAL, R. Qader, A. Biochemical investigation of human exposure to aflatoxin M1 and its association with risk factors of diabetes mellitus. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 28, p. 62907–62918, 2021.

AL-JAAL, B.A.; JAGANJAC, M.; BARCARU, A.; HORVATOVICH, P.; LATIFF, A. Aflatoxin, fumonisin, ochratoxin, zearalenone and deoxynivalenol biomarkers in human biological fluids: A systematic review of the literature, 2001–2018. **Food Chemistry**, v. 129, p. 211-228, 2019.

ALVAREZ, C. S.; HERNANDEZ, E.; ESCOBAR, K.; VILLAGRAN, C. I.; KROKERLOBOS, M. F.; RIVERA-ANDRADE, A.; SMITH, J. W.; EGNER, P. A.; LAZO, M.; FREEDMAN, N. D.; GUALLAR, E.; DEAN, M.; GRAUBARD, B. I.; GROOPMAN, J. D.; RAMIREZ-ZEA, M.; MCGLYNN, K. A. Aflatoxin B<sub>1</sub> exposure and liver cirrhosis in Guatemala: a case-control study. **BMJ Open Gastroenterology**, v. 1, n. 1, 2020.

ARCE-LÓPEZ, B.; LIZARRAGA, E.; VETTORAZZI, A.; GONZÁLEZ-PENÑAS, E. Human biomonitoring of mycotoxins in blood, plasma and serum in recent years: a review. **Toxins**, v. 12, p. 147, 2020.

BARBETTA, A. P. Estatística aplicada às ciências sociais. Florianópolis: UFSC, 2001.

BENFORD, D.; LEBLANC, J. C.; SETZER, R. W. Application of the margin of exposure (MoE) approach to substances in food that are genotoxic and carcinogenic. Example: aflatoxin B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>). **Food Chemical Toxicology**, v. 48, p. 34-41, 2010.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 2022. **Resolução de Diretoria Colegiada e RDC Nº 150, de julho de 2022**. Ministério da Saúde (MS)/Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), Diário Oficial da União.

CARDOSO-FILHO, F. D. C.; CALDAS, M. L. D.; MURATORI, M. C. S. Fungi and aflatoxins in cereals: A review. **Journal of Veterinary Science and Public Health**, v. 2, n. 2, p.122-130, 2015.

CHAKRABORTY, S. Where Did the Globulins Go?. **Clinical Chemistry**, v. 61, n. 3, p. 563–564, 2015.

COPPA, F. S. C.; CIRELLI, A. C.; GONÇALVES, B. L.; BARNABE, E. M. B.; PETTA, T.; FRANCO, L. T.; JAVANMARDI, F.; KHANEGHAH, A. M.; LEE, S. H. I.; CORASSIN, C. H.; OLIVEIRA, C. A. F. Mycotoxin occurrence in breast milk and exposure estimation of lactating mothers using urinary biomarkers in Sao Paulo, Brazil. **Environmental Pollution**, n. 279, 2021.

DOHNAL, V.; WU, Q.; KUCA, K. Metabolism of aflatoxins: key enzymes and interindividual as well as interspecies differences. **Arco Toxicol**, v. 88, p. 1635–1644, 2014.

ESCRIVA, L.; FONTE G.; MANYES, L.; BERRADA, H. Studies on the presence of mycotoxins in biological samples: an overview. **Toxins**, v. 9, p. 251, 2017.

EUROPEAN COMMISSION. Commission Regulation (EC) No 401/2006 of 23 February 2006 laying down the methods of sampling and analysis for the official control of the levels of mycotoxins in foodstuffs. **Official Journal of the European Union**, v. 70, p.12–34, 2006.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY. International frameworks dealing with human risk assessment of combined exposure to multiple chemicals. **EFSA Journal**, v. 11, n. 7, p. 1-69, 2013.

FLETCHER, M. T.; NETZEL, G. Food safety and natural toxins. **Toxins**, v. 12, n. 4, p. 236, 2020.

FOERSTER, C.; MONSALVE, L.; MALDONADO, C.; CORTÉS, S.; FERRECCIO, C. A preliminary study on aflatoxin exposure by urine biomonitoring in Chile. **Mycotoxin Research**, v. 38, n. 3, p. 185-191, 2022.

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

GERDING, J.; ALI, N.; SCHWARTZBORD, J.; CRAMER, B.; BROWN, D. L.; DEGEN, G. H.; HUMPF, H. U. 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**, n. 31, v. 3, p.127–136, 2015.

GRANADOS-CHINCHILLA, F.; MOLINA, A.; CHAVARRÍA, G.; ALFARO-CASCANTE, M.; MURILLO-WILLIAMS, A. Aflatoxins occurrence through the food chain in Costa Rica: applying the One Health approach to mycotoxin surveillance. **Food control**, v. 82, p. 217–226, 2017.

IARC. **International Agency for Research on Cancer**. Disponível em: <https://monographs.iarc.who.int/>.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Censo Brasileiro de 2022**. Rio de Janeiro: IBGE, 2022.

IHA, M. H.; BARBOSA, C. B.; OKADA, I. A.; TRUCKSESS, M. W. Occurrence of aflatoxin M1 in dairy products in Brazil. **Food Control**, v. 22, n. 12, p.1971–1974, 2011.

IHA, M. H.; MINI, C. A.; OKADA, I. A.; BRIGANTI, R. C.; TRUCKSESS. The use of regenerated immunoaffinity columns for aflatoxins B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> and G<sub>2</sub> in peanut confection. **Journal of Chromatography**. v. 1483, n. 3, p. 1-7, 2016.

INSTITUTO NACIONAL DE METEOROLOGIA DO BRASIL – INMET. **Balanço do inverno 2022 no Brasil: Análise da chuva e temperatura nos meses de junho até agosto de 2022**. Brasília - DF, 2022.

INSTITUTO NACIONAL DE METEOROLOGIA DO BRASIL – INMET. **Balanço do verão 2022/2023 no Brasil: Análise da chuva e temperatura entre dezembro de 2022 e fevereiro de 2023**. Brasília - DF, 2023.

INAMINE, T.; SCHNABL, B. Immunoglobulin A and Liver Diseases. **J Gastroenterol**, v. 53, n. 6, p. 691–700, 2018.

JAGER, A. V.; TEDESCO, M. P.; SOUTO, P. C. M. C.; OLIVEIRA, C. A. F. Assessment of aflatoxin intake in São Paulo, Brazil. **Food Control**, v. 33, n. 1, p. 87-92, 2013.

JAGER, A. V.; TONIN, F. G.; SOUTO, P. C. M. C.; PRIVATTI, R. T.; OLIVEIRA, C. A. F. Determination of urinary biomarkers for assessment of short-term human exposure to aflatoxins in São Paulo, Brazil. **Toxins**, n. 6, v. 7, p. 1996-2007, 2014.

JALILI, M.; SCOTTER, M. A review of aflatoxin M<sub>1</sub> in liquid milk. **Iran J Health Saf Environ**. n. 2, p. 283–295, 2015.

JECFA. Joint Expert Committee on Food Additives. **Evaluations of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA)**, 2017. Disponível em: <https://www.fao.org/food-safety/scientific-advice/jecfa/en/>.

JOLLY, P.; JIANG, Y.; ELLIS, W.; AWUAH, R.; NNEDU, O.; Nnedu O.; PHILLIPS, T.; WNAG, J. S.; AFRIYIE-GYAWU, E.; TANG, L.; PERSON, S.; WILLIAMS, J.; JOLLY, C. Determinants of aflatoxin levels in Ghanaians: sociodemographic factors, knowledge of aflatoxin and food handling and consumption practices. **Int J Hyg Environ Health**, n. 209, v. 4, p. 345-358, 2006.

KALEIBAR, M.T.; HELAN, J. A. A field outbreak of aflatoxicosis with high fatality rate in feedlot calves in Iran. **Comp Clin Pathol**, n. 22, p. 1155–1163, 2013.

LEDDA, C.; LORETO, C.; ZAMMIT, C.; MARCONI, A.; FAGO, L.; MATERA, S et al. Non-infective occupational risk factors for hepatocellular carcinoma: a review. **Mol Med Rep**, n. 15, v. 2, p. 511–533, 2017.

LEE, H. S.; NGUYEN-VIET, H.; LINDAHL, J.; THANH, H. M.; KHANH, T. N.; HIEN, L. T. T. et al. A survey of aflatoxin B<sub>1</sub> in maize and awareness of aflatoxins in Vietnam. **World Mycotoxin J**, v. 10, p. 195–202, 2017.

LIMA, M. L. F.; LIMA, J. S.; SILVA, M. T. Anemophilic fungi: evaluation of the air microbiota in indoor and outdoor environments. **Essence**, v. 20, n.1, p. 88-95, 2019.

LUONGO, D.; RUSSO, R.; BALESTRIERI, A.; MARZOCCO, S.; BÉRGAMO, P.; SEVERINO, L. In vitro study of the effects of AFB<sub>1</sub> and AFM<sub>1</sub> in the human Jurkat T lymphoblastoid cell model. **Journal Immunotoxicology**, v. 11, p. 353-358, 2013.

MAGRINI, M. J.; FREITAS, A. V. L.; UEHARA-PRADO, M. The effects of four types of anthropogenic disturbances on composition and abundance of terrestrial isopods (Isopoda: Oniscidea). **Zoologia**, v. 28, p. 63–71, 2011.

MALEKINEZHAD, P. ELLESTAD, L. E.; AFZALI, N.; FARHANGFAR, S. H.; OMIDI, A.; MOHAMMADI, A. Evaluation of berberine efficacy in reducing the effects of aflatoxin B<sub>1</sub> and ochratoxin A added to male broiler rations. **Poult Sci**, n. 100, v. 2, p. 797-809, 2021.

ORSI, R. B.; OLIVEIRA, C. A. F.; DILKIN, P.; XAVIER, J. G.; DIREITO, G. M.; CORRÊA, B. OSTRY, V.; MALIR F.; TOMAN, J.; GROSSE, Y. Mycotoxins as Human

Carcinogens—The Classification of IARC Monographs. **Mycotoxin Research**, v. 33, n. 1, p. 65-73, 2017.

PLEADIN, J.; FRECE, J.; MARKOV, K. Mycotoxins in food and feed. **Adv Food Nutr Res**, v. 89, p. 297-345, 2019.

ROMERO, A. C. et al. Occurrence of AFM<sub>1</sub> in urine samples of a Brazilian population and association with food consumption. **Food Control**, v. 21, n. 3, p. 554-558, 2010.

SAAD-HUSSEIN, A.; SHAHY, E. M.; SHAHEEN, W.; IBRAHIM, K. S.; MAHDY-ABDALLAH, H.; TAHA, M. M.; HAFEZ, S. F. Hepatotoxicity of aflatoxin B1 and its oxidative effects in wood dust Egyptian exposed workers. **Archives of Environmental & Occupational Health**, p. 1–6, 2020.

SAAD-HUSSEIN, A.; TAHA, M. M.; FADI, N. N.; AWAD, A. H.; MAHDY-ABDALLAH, H.; AZIZ, H.; EL-SHAMY, K. A. Effects of airborne *Aspergillus* on serum aflatoxin B1 and liver enzymes in workers handling wheat flour. **Hum Exp Toxicol**. n. 35, v. 1, p. 3–9, 2016.

SILVA, A. R.; ZANIN, L. M. M.; ISHIKAWA, A. T.; YAMASHITA, C. R. T.; FRACALOSSO, F. P.; AMORIM, T. M.; ITANO, E. N.; KAWAMAURA, O.; HIROOKA, E. Y. Elisa for the design of aflatoxins in the peanut production chain. **Research Agriculture**, v. 53, n. 3, p. 361-370, 2018.

SULAIMAM, S. H.; JAMALUDDIN, R.; SABRAN, M. R. Association between Urinary Aflatoxin (AFM<sub>1</sub>) and Dietary Intake among Adults in Hulu Langat District, Selangor, Malaysia. **Nutrients**, n. 10, v. 5, p. 460, 2018.

TONDO, E. C. **Danger in food**. Senac Publisher São Paulo. São Paulo, 2020.

TRUCKSESS, M. W. Official methods of analysis of AOAC International. **Natural Toxins**, p. 1-85, 2005.

TURNER, P. C.; BRANCO, K. L. M.; BURLEY, V. J.; HOPTON, R. P.; RAJENDRAM, A.; FISHER, J.; CADE, J. E.; WILD, C. P. A comparison of deoxynivalenol intake and urinary deoxynivalenol in UK adults. **Biomarkers**, v. 15, n. 6, p. 553–562, 2010.

VASILIADES, J. Reaction of alkaline sodium picrate with creatinine: I. Kinetics and mechanism of formation of the mono-creatinine picric acid complex. **Clin Chem**, v. 22, p. 1664-71, 1976.

WANG, J.; LIU, F.; KONG, R.; HAN, X. Association Between Globulin and Diabetic Nephropathy in Type2 Diabetes Mellitus Patients: A Cross-Sectional Study. **Endocrinol**, v. 13, 2022.

WILD, C.P.; MILLER, J. D.; GROOPMAN, J. D. Mycotoxin control in low- and middle-income countries. **International Agency for Research on Cancer**, 2015.

ZHANG, Y.; WANG, P.; KONG, Q.; COTTY, P. J. Biotransformation of aflatoxin B1 by *Lactobacillus Helveticus* FAM22155 in wheat bran by solid-state fermentation. **Food**

**Chem**, n. 341, p. 128-180, 2021.

ZHU, J.; ZHANG, L.; HU, X.; URINE, H.; XIAO, Y.; CHEN, J.; XU, Y.; FREMY, J.; CHU, F. S. Correlation of dietary aflatoxin B<sub>1</sub> levels with excretion of aflatoxin M<sub>1</sub> in human urine. **Cancer Research**, v. 47, n. 7, p. 1848–1852, 1987.

ZUBERI, Z.; EEZA, M. N.; MATYSIK, J.; BERRY, J. P.; ALIA, A. NMR-based metabolic profiles of intact Zebrafish embryos exposed to aflatoxin B<sub>1</sub> recapitulates hepatotoxicity and supports possible neurotoxicity. **Toxins**, n.15, v. 5, p.258, 2019.

## ANEXOS

### ANEXO A: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Página 1 de 2

Universidade Estadual de Londrina  
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação (PROPPG)  
Comitê de Ética em Pesquisa – CEP

#### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

Prezado(a) Colaborador(a),

Você está sendo convidado(a) a participar da pesquisa “EXPOSIÇÃO HUMANA A AFLATOXINA: AVALIAÇÃO POR INQUÉRITOS ALIMENTARES E QUANTIFICAÇÃO DE AFM1 EM AMOSTRAS DE URINA” sob responsabilidade da pesquisadora **Estéfany Santos Redondo**, como Projeto de Dissertação de Mestrado, a ser realizado no Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos na Universidade Estadual de Londrina – UEL. O objetivo da pesquisa é investigar o padrão de dieta e frequência de consumo de alimentos que naturalmente podem estar contaminados com uma substância chamada de aflatoxinas, bem como avaliar a presença destas substâncias em amostras de urina e avaliar possíveis alterações celulares significativas no sangue devido a exposição a elas.

A pesquisa será desenvolvida em duas etapas: 1ª) preenchimento de um formulário online; 2ª) para voluntários que aceitem doar uma amostra de urina e uma de sangue.

#### DADOS DO PARECER DE APROVAÇÃO

O presente projeto de pesquisa foi aprovado pelo CEP/UEL.

Emitido pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual de Londrina  
Número do parecer: 5.654.031      Data da relatoria: 20/09/2022

**1. PARTICIPAÇÃO NA PESQUISA:** Ao participar desta pesquisa, você irá responder a um formulário online com informações pessoais (contato, sexo, idade), questões sobre a frequência de consumo de alimentos, estado de saúde e hábitos de vida. Ao final do questionário, você poderá optar por fornecer ou não uma amostra de urina e uma de sangue em uma data futura para avaliação em laboratório. Caso aceite participar desta segunda etapa, os pesquisadores entrarão em contato por telefone e/ou e-mail para agendar as coletas. A amostra de urina, deverá ser coletada em um frasco estéril que será fornecido previamente e poderá ser realizada em sua residência ou no local de encontro marcado. A urina será utilizada para verificar se há ou não a presença de aflatoxinas (AFB1 e AFM1). A coleta de sangue será realizada após a entrega da urina e será feita em uma veia de seu braço, por um profissional capacitado, utilizando material descartável e estéril. O sangue será utilizado para dosar aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), gama-glutamilttransferase (GGT), albumina, globulinas, proteína total, creatinina, uréia e hormônio estimulante da tireóide (TSH). Além disso, no momento das coletas, será solicitado o preenchimento de um recordatório alimentar de 24 horas (R24h), para você descrever todos os alimentos ingeridos no dia anterior, que será utilizado para associar com os resultados das análises. Lembramos que a sua participação é voluntária, você tem a liberdade de não querer participar e pode desistir, em qualquer momento, mesmo após ter iniciado o formulário ou as coletas, sem nenhum prejuízo para você. Para isto, basta fechar o formulário que automaticamente suas respostas preenchidas até então, serão descartadas ou pode entrar em contato com os pesquisadores para que não façamos uso do seu material. As amostras fornecidas serão descartadas corretamente ao fim do projeto e não serão em hipótese alguma, utilizadas em outras pesquisas.

**2. RISCOS E DESCONFORTOS:** Os riscos e desconfortos desta pesquisa são considerados mínimos. A aplicação do questionário poderá causar desconfortos leves de origem psicológica e emocional, como a possibilidade de constrangimento, vergonha, cansaço e aborrecimento ao responder as perguntas. Isto será minimizado pelo uso de ferramenta online de formulário, podendo o voluntário participar da pesquisa no momento que julgar mais adequado e sem a interferência dos pesquisadores. Além disso, você tem a liberdade para não responder questões, nem mesmo as obrigatórias, e pode interromper o questionário a qualquer momento, para isto basta fechá-lo. Há o risco de perda dos dados obtidos por respostas através de questionário. Isto será minimizado pelo uso de computador com senha e proteção da planilha de dados com senha. Serão respeitados a privacidade e sigilo e os documentos serão devidamente armazenados em locais adequados com uso restrito apenas aos pesquisadores, os quais se responsabilizam pelo conteúdo. Caso aceite participar da segunda etapa da pesquisa, a coleta de urina poderá causar algum constrangimento, por isso, a coleta poderá ser realizada em sua residência, se assim preferir. A coleta de sangue pode causar desconforto leve, como uma pequena dor na hora da punção ou o desenvolvimento de manchas roxas (hematoma) no local da coleta, por isso, para sua minimização, será utilizado material descartável e estéril, sendo a coleta realizada por profissional qualificado. O recordatório alimentar de 24 horas também pode causar desconfortos leves de origem psicológica e emocional, que serão minimizados através da possibilidade de responder sozinho, em um local reservado. Se você precisar de algum tratamento, orientação, encaminhamento, indenização, etc., por se sentir prejudicado por causa da pesquisa, ou sofrer algum dano decorrente da mesma, o pesquisador se responsabiliza por prestar assistência integral, imediata e gratuita.

**3. BENEFÍCIOS:** Como benefícios indiretos, esta pesquisa poderá contribuir para a comunidade científica com informações sobre o nível de exposição da população as aflatoxinas, riscos a desenvolver efeitos e investigação da frequência de consumo de alimentos geralmente contaminados com a substância em estudo. Como benefício direto a pesquisa, o participante receberá um folheto informativo via e-mail, sobre o que é aflatoxinas, onde é encontrada e seus riscos a saúde, após o preenchimento do

formulário, e caso aceite participar da segunda etapa da pesquisa, o benefício direto aos participantes é ser informado se houver alteração em algum dos exames realizados (AFB1, AFM1, Aspartato aminotransferase (AST), Alanina aminotransferase (ALT), Gama-glutamilttransferase (GGT), Albumina, Proteína total, Creatinina e Uréia) visando a saúde e o bem estar.

**4. CONFIDENCIALIDADE:** Todas as informações que o Sr.(a) nos fornecer ou que sejam conseguidas por exames serão utilizadas somente para esta pesquisa. Seus dados pessoais e dados de exames ficarão em segredo e o seu nome não será divulgado e utilizado em momento algum. As amostras de urinas e sangue fornecidas serão armazenadas em freezer -80°C no Laboratório de Produção de Imunoreagentes (LIM) no Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos (DCTA) da Universidade Estadual de Londrina (DCTA-UUEL) até o final desta pesquisa, após este período as amostras serão devidamente descartadas.

**5. ESCLARECIMENTOS:** Se tiver alguma dúvida a respeito da pesquisa e/ou dos métodos utilizados na mesma, pode procurar a qualquer momento o pesquisador responsável.

**Nome do pesquisador responsável:** Estéfany Santos Redondo  
**Endereço para contato:** LIM – Laboratório de Produção de Imunoreagentes.  
 Campus Universitário – Rodovia Celso Cid, km 380 (PR 445) CEP: 86057-970 – Londrina – PR  
**Telefone para contato:** (43) 3371 4575 (Segunda à Sexta, das 9:00 às 17:00)

**6. RESSARCIMENTO DAS DESPESAS:** Caso o Sr.(a) aceite participar da pesquisa não receberá nenhuma compensação financeira ao preencher o formulário online. Caso aceite participar da segunda etapa da pesquisa e uma vez que é necessário um jejum de 12 horas antes da coleta de sangue, lhe será ofertado um pequeno café da manhã após a coleta (Chá ou Suco + Bolacha) e o ressarcimento de despesas de transporte até o local da coleta, caso seja necessário.

**7. CONCORDÂNCIA NA PARTICIPAÇÃO:** Se o Sr.(a) estiver de acordo em participar deverá eletronicamente aceitar a participar da pesquisa, que equivalerá à assinar o TCLE, que poderá ser impresso se assim desejar. Caso aceite participar da segunda etapa da pesquisa, na qual será realizada a coleta de urina e sangue, deverá preencher e assinar o Termo de Consentimento Pós esclarecido que se segue, em **duas vias**, sendo que uma via ficará com você.

<b>CONSENTIMENTO PÓS INFORMADO</b>	
<p>Pelo presente instrumento que atende às exigências legais, o Sr.(a) _____, portadora da cédula de identidade _____, inscrita no CPF _____, declara que, após leitura minuciosa do TCLE, teve oportunidade de fazer perguntas, esclarecer dúvidas que foram devidamente explicadas pelos pesquisadores, ciente dos serviços e procedimentos aos quais será submetido e, não restando quaisquer dúvidas a respeito do lido e explicado, firma seu <b>CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO</b> em participar voluntariamente desta pesquisa.</p> <p>E, por estar de acordo, assina o presente termo.</p> <p style="text-align: center;">Londrina, ____ de _____ de 20__.</p>	

\_\_\_\_\_  
Assinatura da Participante

\_\_\_\_\_  
Assinatura da Pesquisadora Responsável

**DADOS DO PARTICIPANTE**

Data de Nascimento \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Sexo  Feminino  Masculino

Celular ( \_\_ ) \_\_\_\_\_

Outros telefones ( \_\_ ) \_\_\_\_\_

Endereço \_\_\_\_\_

Cidade \_\_\_\_\_



**CEP – UEL**  
 Endereço: LABESC – Laboratório Escola de Pós-Graduação – sala 14. Campus Universitário – Rodovia Celso Cid, km 380 (PR 445) CEP: 86057-970 – Londrina – PR  
 Telefone para contato: (43) 3371-5455  
 E-mail para contato: cep268@uel.br

**CONEP - Comissão Nacional de Ética em Pesquisa**  
 Endereço: Esplanada dos Ministérios, Bloco G, Anexo B. Sala 104B. / Brasília - DF/ CEP: 70058-900 - Brasil.  
 Telefone para contato: (61) 3315-2150 / 3315-3821

## APÊNDICES

### APÊNDICE A – Questionário da pesquisa

O questionário foi aplicado pelo google forms aos participantes.

#### DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

#### TÍTULO - AVALIAÇÃO DA EXPOSIÇÃO HUMANA À AFLATOXINA POR DETERMINAÇÃO DO BIOMARCADOR AFM, EM URINAS DE RESIDENTES DO PARANÁ, BRASIL

Ano de execução: 2022/2023.

Este Questionário foi elaborado pela pesquisadora **Estéfany Santos Redondo** (estefany.santos@uel.br), mestranda em Ciência de Alimentos na Universidade Estadual de Londrina (LONDRINA - PR). Seu objetivo é contribuir para a investigação do padrão de dieta e frequência de consumo de alimentos geralmente contaminados com uma substância chamada de aflatoxinas, bem como verificar o conhecimento dos participantes.

Para participar, responda as questões abaixo. Todas as informações que fornecer-nos serão utilizadas somente para esta pesquisa. Seus dados pessoais e suas respostas ficarão em segredo e o seu nome não aparecerá em lugar nenhum, nem quando os resultados forem apresentados.

ESTIMA-SE QUE VOCÊ DEMORE ENTRE 5 E 10 MINUTOS PARA RESPONDER.

1- E-mail: .....

2- Você é maior de 18 anos?

SIM  NÃO

3- Você mora em LONDRINA/PR?

SIM  NÃO

4- SEXO

Feminino  Masculino

Outros

5- IDADE

18 à 30 anos  31 à 40 anos  41 à 50 anos

51 à 60 anos  Mais de 60 anos

6- PESO: .....

7- ALTURA: .....

8- PROFISSÃO: .....

9- Qual sua escolaridade?

Sem escolaridade  Ensino fundamental incompleto (1º Grau)  Ensino fundamental (1º Grau)  Ensino médio (2º Grau)  Superior  Pós-graduação

10- Em qual Região da cidade você mora?      11- Está realizando dieta no momento?  
( ) Norte ( ) Sul ( ) Central ( ) Oeste ( ) Leste      ( ) SIM ( ) NÃO

12- Quantas vezes na semana você costuma fazer refeições fora de casa? (por exemplo: 10): .....

13- Realiza quais refeições fora de casa?      14- Você é fumante?  
( ) Café da manhã ( ) Almoço ( ) Café da tarde ( ) Jantar      ( ) SIM ( ) NÃO

15- Consome bebidas alcoólicas com qual frequência?

( ) Não consumo ( ) Apenas em ocasiões especiais ( ) Uma vez por semana ( ) De duas a três vezes por semana ( ) Mais de três vezes por semana

16- Pratica exercícios físicos? Pode ser caminhada, academia, dança, etc.

( ) Não pratico no momento ( ) Uma vez por semana ( ) De uma a três vezes por semana ( ) Mais de três vezes por semana

17- Você apresenta ou já apresentou alguma(s) das alterações abaixo? Assinale quantas opções forem necessárias.

( ) Nunca apresentei estas alterações ( ) Hepatite (A, B, C, D, E, alcohólica, autoimune)  
( ) Cirrose Hepática ( ) Insuficiência Hepática e/ou Câncer hepático  
( ) Insuficiência Renal e/ou Câncer Renal ( ) Cálculos Renais ("pedras" nos rins)

18- Utiliza algum medicamento de uso contínuo ou está fazendo uso de algum no momento? Se sim, qual(is)?.....

Abaixo estão descritas questões referentes ao tema "aflatoxinas". Não existe resposta "certa ou errada", responda conforme o que você conhece. **É muito importante que você não tente "adivinhar a resposta".**

19- Você já tinha ouvido falar em aflatoxinas antes deste questionário?

( ) SIM ( ) NÃO

20- Na sua opinião, como ocorre a contaminação dos alimentos por aflatoxinas? Assinale quantas opções forem necessárias.

- Não sei responder
- Está associada às condições inadequadas de secagem do alimento
- Ocorre na colheita do alimento
- Ocorre no armazenamento do alimento antes de chegar na indústria
- Ocorre no processamento do alimento (na indústria)
- Está associado às condições inadequadas de armazenamento em mercados e nas residências/casas

### FREQUÊNCIA ALIMENTAR

Abaixo estão descritos alguns alimentos e entre parênteses estão as porções estimadas de consumo com base em medidas caseiras comuns, tais como xícaras, copos, colheres, etc. Assinale seu nível de consumo do referido alimento com base na porção descrita. Por exemplo, em relação ao seu consumo de amendoim (seja cru, torrado ou frito), qual sua frequência de consumo de 1 colher de sopa, que equivale a 15 gramas?

**As respostas são uma estimativa, assinale a opção que mais se assemelha a sua alimentação comum do dia a dia.**

1- Com qual frequência você costuma comer 1 colher de sopa (15 g) de AMENDOIM (frito, torrado, cru)?

- Não consumo  1 vez ao dia  2 vezes ao dia  3 a 4 vezes na semana  1 a 2 vezes na semana  A cada 15 dias  1 vez ao mês

2- Pé-de-moleque (1 unidade / 15 g)

- Não consumo  1 vez ao dia  2 vezes ao dia  3 a 4 vezes na semana  1 a 2 vezes na semana  A cada 15 dias  1 vez ao mês

3- Paçoca (1 unidade / 15 g)

- Não consumo  1 vez ao dia  2 vezes ao dia  3 a 4 vezes na semana  1 a 2 vezes na semana  A cada 15 dias  1 vez ao mês

4- Cerveja (copo de 200 mL)

- Não consumo  1 vez ao dia  2 vezes ao dia  3 a 4 vezes na semana  1 a 2 vezes na semana  A cada 15 dias  1 vez ao mês

5- Frutas desidratadas/secas (1 colher sopa/ aprox. 15 g)

Não consumo  1 vez ao dia  2 vezes ao dia  3 a 4 vezes na semana  1 a 2 vezes na semana  A cada 15 dias  1 vez ao mês

6- Leite (copo de 200 mL)

Não consumo  1 vez ao dia  2 vezes ao dia  3 a 4 vezes na semana  1 a 2 vezes na semana  A cada 15 dias  1 vez ao mês

7- Queijos (1 fatia / aprox. 20 g)

Não consumo  1 vez ao dia  2 vezes ao dia  3 a 4 vezes na semana  1 a 2 vezes na semana  A cada 15 dias  1 vez ao mês

8- Iogurtes (copo de 200 mL)

Não consumo  1 vez ao dia  2 vezes ao dia  3 a 4 vezes na semana  1 a 2 vezes na semana  A cada 15 dias  1 vez ao mês

9- Pão de forma Integral (2 fatias / aprox. 50 g)

Não consumo  1 vez ao dia  2 vezes ao dia  3 a 4 vezes na semana  1 a 2 vezes na semana  A cada 15 dias  1 vez ao mês

10- Milho em grão inteiro, amassado ou moído (1 colher de sopa / 20 g)

Não consumo  1 vez ao dia  2 vezes ao dia  3 a 4 vezes na semana  1 a 2 vezes na semana  A cada 15 dias  1 vez ao mês

11- Salgadinhos de Milho (2 xícaras /aprox. 25 g)

Não consumo  1 vez ao dia  2 vezes ao dia  3 a 4 vezes na semana  1 a 2 vezes na semana  A cada 15 dias  1 vez ao mês

2- Arroz (4 colheres de sopa. aprox. 60 g)

Não consumo  1 vez ao dia  2 vezes ao dia  3 a 4 vezes na semana  1 a 2 vezes na semana  A cada 15 dias  1 vez ao mês

13- Feijão (4 colheres de sopa. aprox. 60 g)

Não consumo  1 vez ao dia  2 vezes ao dia  3 a 4 vezes na semana  1 a 2 vezes na semana  A cada 15 dias  1 vez ao mês

14- Castanhas, amêndoas, pistaches, nozes, avelãs (1 colher de sopa)

Não consumo  1 vez ao dia  2 vezes ao dia  3 a 4 vezes na semana  1 a 2 vezes na semana  A cada 15 dias  1 vez ao mês

15- Chocolate ao leite em barra (4 quadradinhos / aprox. 25 g)

Não consumo  1 vez ao dia  2 vezes ao dia  3 a 4 vezes na semana  1 a 2 vezes na semana  A cada 15 dias  1 vez ao mês

16- Achocolatado em pó (2 colheres de sopa / aprox. 20 g)

Não consumo  1 vez ao dia  2 vezes ao dia  3 a 4 vezes na semana  1 a 2 vezes na semana  A cada 15 dias  1 vez ao mês

### Segunda Etapa do Projeto

**O preenchimento das questões anteriores deste formulário foi a primeira parte de nossa pesquisa. Na segunda etapa, precisamos de voluntários que aceitem doar uma amostra de sangue e uma de urina, do mesmo modo como é feito em laboratórios de análises clínicas para realizar exames.**

Você teria interesse em participar desta segunda etapa, doando uma amostra de sangue e uma de urina?



Entraremos em contato para explicar com mais detalhes como se dará a sua participação nesta segunda etapa e também para agendar a coleta em data futura. Mesmo se assinalar "SIM" nesta questão, você não é obrigado(a) a efetivamente a participar das coletas - fica à seu critério.

SIM  NÃO

SE ACEITA PARTICIPAR DA COLETA DE SANGUE E URINA, por gentileza, forneça seu nome e um telefone para contato.

.....

## APÊNDICE B – Recordatório alimentar de 24 horas (R24h)

 <p>UNIVERSIDADE ESTADUAL DE LONDRINA</p>	<p><b>Universidade Estadual de Londrina</b>  <b>Centro de Ciências Agrárias – CCA</b>  <b>Programa de Pós-graduação em Ciência</b>  <b>de Alimentos</b></p>	
<p><b>Quais os alimentos ingeridos um dia anterior a coleta de urina e sangue venoso?</b></p>		
<p><b>Alimento</b></p>	<p><b>Quantidade</b> (colher, fatia, xícara, copo)</p>	
1.		
2.		
3.		
4.		
5.		
6.		
7.		
8.		
9.		
10.		
11.		
12.		
13.		
14.		
15.		
16.		
17.		
18.		
19.		
20.		
21.		
22.		
23.		
24.		
25.		

## APÊNDICE C – Folder Informativo

Disponibilizado aos participantes ao final do projeto.

### Você sabe o que é AFLATOXINA?

É uma substância tóxica (também chamadas de micotoxinas) produzida por alguns fungos conhecidos como *Aspergillus*. Ilustrado na imagem abaixo:



Esses fungos gostam de crescer em ambientes quentes e úmidos, como aqui no Brasil;

A transmissão nos seres humanos ocorre principalmente com a ingestão de alimentos contaminados, mas pode acontecer também pela inalação e contato com a pele;

Contaminam diversos alimentos, os mais comuns são amendoim, milho e derivados;



**AO ENTENDER O QUE É, VOCÊ DEVE ESTAR SE PERGUNTANDO, QUAIS DANOS A AFLATOXINA PODE CAUSAR NO ORGANISMO HUMANO?**

O consumo de alimentos com níveis altos de aflatoxinas pode gerar a AFLATOXICOSE

**Que causa:**

- ✓ Dores abdominais;
- ✓ Vômitos;
- ✓ Baixa imunidade;
- ✓ Febre;
- ✓ Alergias;

À medida que pequenas quantidades de toxinas são ingeridas através dos alimentos no dia a dia, pode ocorrer complicações mais sérias

**Possíveis alterações:**

- ✓ Afeta o fígado e os rins;
- ✓ Potencial cancerígeno (câncer de fígado);
- ✓ Retardo no crescimento de crianças;
- ✓ Altera parâmetros bioquímicos e hematológicos (indicam alterações no funcionamento normal do corpo);

Trabalho de Dissertação de Mestrado em  
Ciência de Alimentos 2022-2023

Estefany Santos Redondo  
estefany.santos@uel.br



**UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA**

**COMO EVITAR?**

O ideal é que seja realizado as melhores técnicas na Produção, Armazenamento, Manipulação, Processamento e Embalagem dos produtos, para evitar o máximo a contaminação.

Por isso, existem leis que visam garantir a segurança dos alimentos para os consumidores, estabelecendo limites máximos tolerados de aflatoxinas nos alimentos.

**Enquanto consumidor é importante:**

- ✓ Selecionar os alimentos com atenção

Conhecer a procedência de cada alimento e verificar se os produtores adotam todos os cuidados necessários.

- ✓ Ficar atento ao armazenamento

Priorize ambientes frescos e secos.

- ✓ Não estocar produtos por muito tempo

Não guarde grandes quantidades de alimentos, compre só o necessário.

- ✓ Atentar ao prazo de validade

Sempre confira a data na embalagem.

- ✓ Descarte alimentos suspeitos

Jogue fora alimentos com bolor, com coloração diferente ou então grãos quebrados.