

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS-UFAM
PRO-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

NAYRA NASCIMENTO AQUINO

**Investigação da exposição nutricional as aflatoxinas em indivíduos
adultos na região amazônica: um biomonitoramento dos níveis
urinários de Aflatoxina M1**

**MANAUS
2024**

NAYRA NASCIMENTO AQUINO

**Investigação da exposição nutricional as aflatoxinas em indivíduos
adultos na região amazônica: um biomonitoramento dos níveis
urinários de Aflatoxina M1**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

ORIENTADOR: Emerson Silva Lima

COORIENTADOR: Luiz Henrique Groto Garutti

**MANAUS
2024**

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Aquino, Nayra Nascimento

A657i Investigação da exposição nutricional as aflatoxinas em indivíduos adultos na região amazônica: um biomonitoramento dos níveis urinários de Aflatoxina M1 / Nayra Nascimento Aquino . 2024

71 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Emerson Silva Lima

Coorientador: Luiz Henrique Groto Garutti

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Amazonas.

1. Aflatoxina M1. 2. Biomonitoramento. 3. Biomonitoramento. 4. Urina. 5. Exposição nutricional. I. Lima, Emerson Silva. II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

“Investigação da exposição nutricional a aflatoxinas em indivíduos adultos na região amazônica: Um biomonitoramento dos níveis urinários de aflatoxinas M1.”

DISCENTE: Nayra Nascimento Aquino

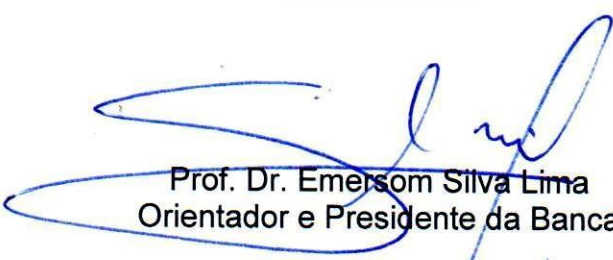
PARECER:

Esta dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas em sua forma final e definitiva pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas.

Manaus, AM, 20/09/2024.


Profa. Dra. Patrícia Danielle Oliveira de Almeida
Coordenadora do PPGCF

A mesma foi apresentada perante a banca composta pelos seguintes professores:


Prof. Dr. Emersom Silva Lima
Orientador e Presidente da Banca


Prof. Dr. Igor Rafael dos Santos Magalhães
Membro Interno


Profa. Dra. Ariane Mendonça Kluczkovski
Membro Externo

Assim diz o SENHOR: Não se glorie o sábio na sua sabedoria, nem se glorie o forte na sua força; não se glorie o rico nas suas riquezas.

Mas o que se gloriar glorie-se nisto: em me conhecer e saber que eu sou o SENHOR, que faço beneficência, juízo e justiça na terra; porque destas coisas me agrado, diz o SENHOR.

Jeremias 9:23-24

RESUMO

A exposição nutricional a aflatoxinas é considerada um problema de saúde e um risco a segurança alimentar. Por isso, o biomonitoramento de aflatoxina M1 em fluidos biológicos é útil para prevenir os efeitos deletérios desta micotoxina no organismo humano. Em regiões cuja base alimentar consiste em alimentos potencialmente contaminados por aflatoxinas, estudos de biomonitoramento são amplos, no entanto em populações da Amazônia, há necessidade de estudos clínicos que avaliem o risco de exposição às aflatoxinas, o que justifica a realização deste estudo. O objetivo do presente estudo foi investigar os níveis de exposição nutricional a aflatoxinas em humanos por meio da determinação dos níveis urinários de aflatoxina M1 (AFM1) em uma população do município de Manaus/Amazonas. Tratou-se de um estudo transversal, que analisou 37 amostras de urina de indivíduos com ou sem comorbidades, que consumiam alimentos potencialmente contaminados por aflatoxina e alimentos regionais. O estudo foi conduzido por meio de um inquérito alimentar e dosagem urinária de AFM1, analisada por meio de Ensaio Imunoenzimático Competitivo (ELISA). No estudo, 54,1% (n=20) das amostras foram positivas para a presença de AFM1 na urina. A mediana e intervalo interquartil de concentração foi 0,405 ng/ml (0,180 ng/ml e 6,835 ng/ml). Os alimentos que apresentaram associação entre o consumo e os níveis urinários positivos foram o bolo de milho ($p<0,010$) e a goma de tapioca ($p<0,023$). Indivíduos que faziam uso de vitaminas ou suplementos, apresentaram resultado negativos para AFM1, comparando com aqueles que não utilizavam ($p<0,036$). Concluimos que a exposição nutricional a aflatoxinas é um fator importante mesmo em regiões de baixa incidência de alimentos potencialmente contaminados e novos grupos alimentares podem estar sofrendo contaminação por estas aflatoxinas. Também, micronutrientes podem ser um importante mecanismo para a minimizar os efeitos deletérios das aflatoxinas no organismo humano, prevenindo os efeitos crônicos destes agentes tóxicos a longo prazo.

Palavras-chaves: Aflatoxina M1; Biomonitoramento; Alimentos, Urina; Exposição nutricional.

ABSTRACT

Nutritional exposure to aflatoxins is considered a health problem and a risk to food safety. Therefore, biomonitoring of aflatoxin M1 in biological fluids is useful to prevent the deleterious effects of this mycotoxin on the human body. In regions where the food base consists of foods potentially contaminated by aflatoxins, biomonitoring studies are extensive; however, in Amazonian environments, there is a need for clinical studies to assess the risk of exposure to aflatoxins, which justifies the performance of this study. The objective of the present study was to investigate the levels of nutritional exposure to aflatoxins in humans by determining urinary levels of aflatoxin M1 (AFM1) in a population from the city of Manaus/Amazonas. This was a cross-sectional study that analyzed 37 urine samples from individuals with and without comorbidities who consumed foods potentially contaminated by aflatoxin and regional foods. The study was conducted through a dietary survey and urinary AFM1 levels, confirmed by Competitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). In the study, 54.1% (n=20) of the samples were positive for the presence of AFM1 in urine. The median and interquartile range of concentration was 0.405 ng/ml (0.180 ng/ml and 6.835 ng/ml). The foods that had an association between consumption and positive urinary levels were corn cake ($p<0.010$) and tapioca gum ($p<0.023$). Individuals who used vitamins or supplements had a negative result for AFM1, compared to those who did not use them ($p<0.036$). We conclude that nutritional exposure to aflatoxins is an important factor even in regions with a low incidence of environmentally contaminated foods and new types of foods may be harmful if contaminated by these aflatoxins. Furthermore, micronutrients can be an important mechanism to minimize the deleterious effects of aflatoxins on the human body, preventing the toxic effects of these toxic agents in the long term.

Keywords: Aflatoxin M1; Biomonitoring; Food, Urine; Nutritional exposure.

LISTA DE SIGLAS

AF	Aflatoxina
AFB1	Aflatoxina B1
AFM1	Aflatoxina M1
AFB2	Aflatoxina B2
AFM2	Aflatoxina M2
AFG1	Aflatoxina G1
AFG2	Aflatoxina G2
ELISA	Ensaio imunoenzimático
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
FCF	Faculdade de Ciências Farmacêuticas
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
IARC	International Agency For Research On Cancer
ICA	Imunocromatográfico
LCMS/MS	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Espectroscopia de Massa
TCLE	Termo de Consentimento Livre e esclarecido
QFA	Questionário de Frequência Alimentar
RASFF	Rapid Alert System for Food and Feed
RIA	Radioimunoensaio
SPSS	Package for Social Science

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Esquema metodológico da pesquisa.....	27
Figura 2a Frequência relativa global da classificação das concentrações de AFM1 urinária.....	32
Figura 2b Faixa de concentração de AFM1 urinária na amostras positivas para AFM1.....	32
Figura 3 Frequência de consumo de alimentos de alto risco para contaminação por AFB1 e níveis urinários de AFM1 acima do limite de detecção.....	33

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Características da amostra total de indivíduos adultos residentes no município de Manaus e a detecção de AFM1 urinária.....30

Tabela 2 Frequência de consumo de alimentos com alta susceptibilidade às aflatoxinas na amostra total e associação com concentração de AFM1.....33

Tabela 3 Frequência de consumo de alimentos regionais na amostra total e associação com concentração positiva ou negativa de Aflatoxina M1 nos níveis urinários de indivíduos adultos residentes no município de Manaus.....34

Tabela 4 Frequência de consumo de grupos de alimentos nas últimas 24h e associação com a concentração positiva ou negativa de Aflatoxina M1 nos níveis urinários de indivíduos adultos residentes no município de Manaus.....35

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. OBJETIVO GERAL	14
2.1. Objetivos Específicos	14
3. REFERENCIAL TEÓRICO	15
3.1. Intoxicações alimentares	15
3.2. Fungos produtores de aflatoxinas	16
3.3. Ocorrência de aflatoxinas nos alimentos	17
3.4. Toxicidade das aflatoxinas	19
3.5. Biomonitoramento para avaliar a exposição humana a aflatoxinas	20
3.6. Ensaio imunoenzimático (ELISA)	21
4. MATERIAL E MÉTODOS	22
4.1. Desenho do estudo e população amostral	22
4.2. Critérios de inclusão e exclusão	22
4.3. Local da pesquisa	22
4.4. Procedimento de coleta de dados e da amostra biológica	22
4.5. Recepção, identificação e transporte da amostra biológica	23
4.6. Do laboratório para análise das amostras biológicas	23
4.7. Instrumento de coleta de dados	24
4.7.1. Questionário de frequência alimentar (QFA)	24
4.8. Análise dos biomarcadores para aflatoxinas a níveis urinários	24
4.8.1. Da quantificação de AFM1 nas amostras de urina	24
4.9. Variáveis do estudo	26
4.9.1. Variáveis demográficas	26
4.9.2. Variáveis dependentes	26
4.9.3. Variáveis independentes	26
4.10. Análise estatística	26
4.11. Aspectos éticos	26
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
6. CONCLUSÃO	47
7. REFERÊNCIAS	48
APÊNDICE A-TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO	59
APÊNDICE B: QUESTIONÁRIO DE FREQUÊNCIA ALIMENTAR (QFA)	62
APÊNDICE C: RECOMENDAÇÕES AO PARTICIPANTE PARA COLETA DA AMOSTRA DE URINA	65
APÊNDICE D: CARTA DE ANUÊNCIA PARA UTILIZAÇÃO DO LABORATÓRIO DE PESQUISA, BIOPHAR/UFAM	66
APÊNDICE E: APROVAÇÃO DO PROJETO DE PESQUISA PELO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA/UFAM.	67

1. INTRODUÇÃO

As aflatoxinas são micotoxinas altamente tóxicas produzidas por fungos do gênero *Aspergillus*. São produzidas principalmente por *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus*, mas algumas outras espécies, tais como *A. nomius*, *A. pseudotamarii*, *A. parvisclerotigenus*, *A. bombycis*, *A. ochraceoroseus*, *A. rambellii*, *Emericella castellata* e *E. venezuelensis* de *Nidulantes* produzem esse tipo de micotoxina (SHABER et al., 2022). Esses fungos são conhecidos por se desenvolverem naturalmente em produtos alimentícios, o que torna os seres humanos os principais expostos as aflatoxinas por ingestão de alimentos (INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER, 2012). A presença de aflatoxinas em alimentos é considerada um risco real e grave para os consumidores por sua toxicidade caracterizando-se como as toxinas microbianas de maior preocupação para a saúde pública (BENKERROUM, 2019).

As FAs contaminam uma ampla gama de alimentos de origem vegetal e animal. AFB1, AFB2, AFG1 e AFG2 são os principais contaminantes em commodities de origem vegetal, como nozes, especiarias, sementes, frutas secas e cereais. Apesar produtos dos produtos de origem animal não ser um substrato ideal para fungos produtores de aflatoxinas, metabólitos como a AFM1 e AFM2 são típicos do leite, incluindo leite materno humano (PICKOVA et al., 2021; DABUO, 2022).

Até o momento foram identificados mais de 18 tipos diferentes de aflatoxinas, as mais comuns e importantes são as aflatoxinas B1 e B2 (e seus subprodutos metabólicos, as aflatoxinas M1 e M2) e as aflatoxinas G1 e G2. Estas são as responsáveis pela contaminação de alimentos e rações (BENKERROUM, 2020). As quatro principais aflatoxinas são chamadas de B1, B2, G1 e G2 em virtude sua fluorescência sob luz UV (azul ou verde, respectivamente) e mobilidade cromatográfica relativa durante a cromatografia em camada delgada. A aflatoxina B1 e B2 são produzidas por *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*. Enquanto as aflatoxinas G1 e G2 são produzidas exclusivamente por *Aspergillus parasiticus* (SANTINI; RITIENI 2013).

Dentre as aflatoxinas, a AFB1 e seu metabólito tóxico a AFM1 são as mais estudadas e comumente relacionada à aflatoxicoses aguda e crônica, carcinogenicidade, teratogenicidade, genotoxicidade e imunotoxicidade (BENKERROUM, 2020) sendo a forma mais abundante em alimentos, rações (ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD, 1983) e produtos lácteos (BENKERROUM, 2019). No entanto, as outras

aflatoxinas não devem ser negligenciadas devido à sua toxicidade intrínseca, uma vez que podem facilmente se reverter para o AFB1 mais potente (BENKERROUM, 2020).

Assim como nos países asiáticos e africanos, os povos da Amazônia têm em seus hábitos alimentares a ingestão de alimentos de alto risco para a contaminação por aflatoxinas, além de típicos da região. Os alimentos regionais consumidos em Manaus incluem-se derivados da mandioca (*Manihotesculenta*) (como a farinha, goma/fécula de tapioca, macaxeira), cará roxo (*Dioscoreatrifida*), batata doce (*Ipomoea batatas*), açaí *in natura* (*Euterpe oleracea*) e a como a castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa*). Ressaltamos que dentre os alimentos anteriormente citados, a castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa*) é um alimento susceptível a contaminação por aflatoxinas (PACHECO et al., 2007; REIS et al., 2012; MARTINS et al., 2012; BAQUIÃO et al., 2013). Entretanto, estudos referentes a exposição alimentar as aflatoxinas por estes alimentos são escassos e se fazem necessárias para garantir a segurança alimentar de seus consumidores.

O presente trabalho então justifica-se pela necessidade de estudos que analisem o risco de exposição nutricional às aflatoxinas, na região de Manaus/Amazonas, visto que o biomonitoramento dos níveis urinários de AFM1 nesta população é relevante para fins epidemiológicos. Deste modo, o presente estudo tem como objetivo investigar a exposição nutricional as aflatoxinas em humanos por meio da determinação dos níveis urinários de AFM1 em adultos no município de Manaus/Amazonas.

2. OBJETIVO GERAL

Investigar a exposição nutricional às aflatoxinas em humanos por meio da determinação dos níveis urinários de AFM1 em adultos no município de Manaus/Amazonas.

2.1.Objetivos Específicos

- Determinar os níveis urinários de AFM1 em indivíduos adultos residentes no município de Manaus/Amazonas.

- Realizar um levantamento das possíveis vias de exposição nutricional e correlacionar com os níveis urinários de AFM1.

- Associar a concentração de aflatoxinas com o histórico de doenças hepáticas, renais e intoxicações agudas.

- Analisar a relação entre o consumo de alimentos, suplementos ou medicamentos considerados protetores para aos efeitos deletérios das aflatoxinas.

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1. Intoxicações alimentares

A segurança alimentar é um campo de conhecimento concernente à saúde coletiva, e que tem como objetivo a promoção da saúde através da minimização de riscos associados à alimentação, tendo em vista, como requisito básico a garantia do acesso a alimentos seguros e livres de perigos alimentares nocivos à saúde (ANDRADE; MOREIRA; TEXEIRA, 2020).

Globalmente, intoxicações alimentares são doenças devido o consumo de alimentos contaminados, sendo este um problema de saúde. Os principais elementos que contribuem para a contaminação são os microrganismos, principalmente os fungos, que produzem metabólitos secundários de baixo peso molecular, com propriedades tóxicas conhecidas como micotoxinas (UMESHA et al., 2017). As micotoxinas representam uma ameaça à segurança alimentar, pois a ingestão de alimentos contaminados pode induzir a manifestações clínicas em humanos e animais, os quais são denominados “micotoxicoses” (PEREIRA; SANTOS, 2011).

Dentre as micotoxinas, inclui-se as aflatoxinas, que causam efeitos deletérios à saúde humana a curto e à longo prazo. A preocupação inicial a esse tipo de contaminação deu-se em virtude da significativa presença de aflatoxinas em suplementos alimentares de animais, intensificando a preocupação com a contaminação dos alimentos para consumo humano (RUSHING; SELIM, 2019).

Os produtos alimentares considerados como fonte potencial de contaminação por aflatoxinas, são amendoins, nozes com casca, milho, arroz, cereais, frutas secas, especiarias e óleos derivados de sementes de hortaliças (DABUO, 2022). A origem dessa contaminação é natural, mas também pode derivar, ou mesmo ser incrementada, pelo armazenamento inadequado dos produtos suscetíveis. A presença de aflatoxinas nos alimentos pode ser afetada tanto por fatores bióticos (alterações climáticas, infestação de insetos) quanto os não bióticos (estresse hidro/térmico). Sendo necessárias boas práticas agrícolas, de armazenamento e processamento recomendadas para manter os níveis de micotoxinas o mais baixo possível e garantir práticas justas no comércio de alimentos (GALLO et al., 2021).

Recentemente, a contaminação por AFB1 em arroz foi relatada na Suécia, Índia, Malásia, Paquistão, Equador, Brasil, China e Canadá. Dos estudos analisados, o arroz

apresentou a terceira maior frequência de contaminação com uma média de 55,4% das amostras contaminadas com AFB1 (RUSHING; SELIM 2019).

Considerando o risco químico associado à presença destes contaminantes nos alimentos, é de extrema importância a avaliação das aflatoxinas em alimentos. Por esse motivo, limites regulatórios vigoram em alguns países para melhorar o nível de segurança alimentar. A União Europeia (UE) introduziu medidas para minimizar a presença de aflatoxinas em diversos alimentos. Os níveis máximos de aflatoxinas são estabelecidos no Regulamento (CE) n.º 915/2023, que estabelece um limite máximo de aflatoxina B1 em 2 µg/kg em cereais transformados para consumo humano, e um limite máximo da soma das aflatoxinas B1, B2, G1 e G2. Este Regulamento afeta todos os cereais que são consumidos nos países da União Europeia, independentemente da origem do cultivo (SÁNCHEZ, 2022).

No Brasil, a instrução normativa da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) nº88/2021 estabelece os limites máximos tolerados de contaminantes em alimentos, incluindo os limites máximos tolerados de micotoxinas como aflatoxina B1, B2, G1 e G2. Esses limites variam de 1 a 20 µg/kg a depender do alimento, como alimentos a base de cereais para alimentação infantil, amêndoas de cacau, amendoim e seus derivados, Castanha-do-Brasil, cereais, especiarias, feijão, frutas desidratadas/ secas, milho e seus derivados.

Segundo PICKOVA et al. (2021) alguns produtos alimentares têm apresentado uma concentração relativamente elevada de aflatoxinas, sendo superior a 1000 µg/kg, e os mais notificados no ano de 2020 a RASFF (Rapid Alert System for Food and Feed) foram o amendoim, figos secos, especiarias, arroz, várias nozes (como avelãs, amêndoas e pistaches) e especiarias. Essa concentração superior em determinados alimentos pode estar relacionada com o desenvolvimento de aflatoxicoses, que pode levar a graves problemas de saúde, em particular danos ao fígado e outros órgãos, câncer primário de fígado e até morte. Para SINGH et al. (2021) o evento da pandemia por coronavírus resultou em dificuldades socioeconômicas, além de dificuldades na gestão de alimentos, o que corrobora para o aumento no consumo de alimentos contaminados por aflatoxinas.

3.2. Fungos produtores de aflatoxinas

As aflatoxinas são substâncias químicas produzidas por fungos potencialmente micotoxigênicos pertencentes ao gênero *Aspergillus*. As espécies produtoras dessa toxina

incluem *A. flavus*, *A. parasiticus* e *A. nomius*. Essas substâncias podem facilmente contaminar uma variabilidade de alimentos sem alterar suas características organolépticas (PEREIRA; SANTOS, 2011).

As aflatoxinas são divididas em grupos conforme sua estrutura química, as mais importantes entre as identificadas até o momento, e que preocupam a economia e a saúde pública são as aflatoxinas B1 e B2 (e seus subprodutos metabólicos, as aflatoxinas M1 e M2) e as aflatoxinas G1 e G2, devido à sua alta incidência e altas toxicidades, especialmente AFB1 (COPPOCK, et al., 2018; SANTINI; RITIENI 2013).

Essas substâncias são descritas como sendo cristalinas, amarelo-claro ou incolores, mostram-se levemente solúveis em água (10-20 µg m) e em solventes como clorofórmio, dimetil sulfóxido e/ou metanol. Além disso, são termoestáveis, ou seja, resistentes a elevadas temperaturas, representando uma barreira para sua degradação nos alimentos por tratamento térmico. As aflatoxinas B1, B2, G1, G2, M1 e M2 apresentam respectivamente os seguintes pontos de fusão: 269°C, 286-289°C, 244-246°C, 237-240 °C, 299°C e 293°C. Também são caracterizadas por seu baixo peso molecular (AFB1:312, AFB2:314, AFG1:328, AFG2:330, AFM1:328 e AFM2: 330 g mol⁻¹), esses compostos são facilmente absorvidos após ingestão por possuírem estruturas lipofílicas (PIEREZAN, 2013; SILVA, 2010; MARTINS, 2015).

Os gêneros produtores das aflatoxinas incluem: *Aspergillus bombycis*, *A. nomius*, *A. parasiticus*, *A. parvisclerotigenus*, *A. pseudocaelatus*, *A. minisclerotigenes* e *A. arachidicola* que produzem todos os quatro tipos de aflatoxinas, B1, B2, G1 e G2; e *A. flavus*, *A. ochraceoroseus* e *A. rambellii* produzem apenas aflatoxina B1 e B2; e *Aspergillus pseudonomius*, *A. pseudotamarii*, *Emericellaastellata*, *E. olivicola* e *E. venezuelensis* produzem apenas aflatoxina B1.

As aflatoxinas são chamadas de B1, B2, G1 e G2 com base em sua fluorescência sob luz UV (azul ou verde) e mobilidade cromatográfica relativa durante a cromatografia em camada delgada. A ordem de toxicidade é AFB1>AFG1>AFB2>AFG2 (COPPOCK et al., 2018; SANTINI; RITIENI 2013).

3.3. Ocorrência de aflatoxinas nos alimentos

Fungos produtores de aflatoxinas podem se desenvolver em alimentos secos e oleosos, e a contaminação pode ocorrer antes e depois da colheita desses produtos. Alimentos considerados de alto risco para o desenvolvimento de aflatoxinas incluem

amendoim, nozes, milho, arroz, figos, uvas, passas e outros alimentos secos, especiarias e óleos vegetais crus e grãos de cacau. Alimentos como a mandioca também são suscetíveis a fungos aflatoxicogênicos (WILLIAMS et al., 2004). O leite pode ser contaminado por AFB1, originário de aflatoxinas presentes na ração animal, e gerar derivados contaminados, como a manteiga (PICKOVA et al., 2021). No entanto, os produtos com maior risco de contaminação por aflatoxinas são milho, amendoim e caroço de algodão (SANTINI; RITIENE 2012, RUSHING; SELIM 2019).

Dos alimentos de alto risco para contaminação por aflatoxinas, o milho tem as maiores concentrações observadas de AFB1. E particular destaque são os estudos na Croácia, Paquistão e República Democrática do Congo, que mostraram níveis máximos de AFB1 >1000 µg/kg (2072, 1405,3 e 1401,45 µg/kg, respectivamente) (DABUO et al., 2022). Para a investigação na República Democrática do Congo, as amostras foram avaliadas após a colheita, durante o transporte e, por último, no mercado. A incidência de infecção por AFB1 aumentou consideravelmente entre milho recém-colhido (32%) e amostras de mercado (100%), o que pode indicar uma contaminação durante seu armazenamento.

Amendoins são mais comumente identificados como contaminados, mas outras variedades como pistaches e avelãs também mostraram contaminação. Para o amendoim em estudos de SUN et al. (2011) que investigaram a ocorrência de AFB1 em alimentos em três áreas diferentes na China, as mostras de amendoim mostraram 100% de contaminação por AFB1, embora as concentrações fossem baixas (até 0,7 µg/kg). Um estudo no Japão descobriu que dez de vinte e uma amostras de manteiga de amendoim continham níveis detectáveis de AFB1, embora as concentrações não excedessem 2,59 µg/kg. Em contrapartida, amostras de amendoim não processadas que também foram analisadas no estudo não mostraram nenhuma contaminação por aflatoxina (KUMAGAI et al., 2008).

O arroz teve a terceira maior frequência de contaminação com uma média de 55,4% das amostras contaminadas com AFB1. No Brasil, um estudo analisou 187 amostras de arroz para aflatoxinas e cepas de fungos produtoras de aflatoxinas. Nessas amostras, 383 cepas de fungos *Aspergillus* foram identificadas com 17% dessas cepas sendo capazes de produzir aflatoxinas do tipo B. Aproximadamente 14% das amostras de arroz apresentaram contaminação por aflatoxina com AFB1 variando de 0-63,32 µg/kg (KATSURAYAMA et al., 2018).

Especiarias (incluindo cominho, pimenta-do-reino e vagens/pó de pimenta) apesar

de menos estudadas, provaram ser uma fonte potencial de exposição à AFB1. Estas tiveram a segunda maior frequência média de contaminação (64,4%) e uma concentração máxima média de AFB1 de 25,4 µg/kg (ALI et al., 2015). Frutas secas (como figos, passas, groselhas, passas, ameixas, tâmaras e damascos) apresentaram a segunda menor frequência (36,0%) e valor máximo médio de 16,3 µg/kg (HESHMATI et al., 2017)

3.4. Toxicidade das aflatoxinas

As doenças causadas pelo consumo de aflatoxinas são chamadas de aflatoxicoses, dividindo-se em agudas e crônicas. A aflatoxicose aguda acontece após a ingestão de altas quantidades de aflatoxinas e seus sintomas podem iniciar-se após um período de 6 horas, enquanto que a aflatoxicose crônica é caracterizada como uma exposição prolongada que resulta em alterações patológicas (PEREIRA; SANTOS, 2011). Em resumo, a aflatoxicose aguda resulta em morte e a aflatoxicose crônica resulta em câncer, supressão imunológica e outras condições patológicas "lentas" (HSIEH, 1993).

Quanto a valores precisos da concentração de aflatoxina necessários para causar aflatoxicose, os mesmos ainda não foram confirmados; no entanto, com a ajuda de alguns estudos, estima-se que geralmente 1000 µg/kg de concentração de aflatoxina em alimentos pode causar toxicidade por aflatoxina em humanos (WHO, 2018).

Embora a concentração necessária para causar aflatoxicose em humanos seja uma estimativa, está bem estabelecido que tal dose é altamente variável dependendo de muitos fatores, incluindo idade, sexo, estado de saúde e nutricional, presença ou ausência de doenças subjacentes e outros fatores (hepatite viral crônica, alcoolismo, tabagismo, cirrose, exposição a microcistinas hepatotóxicas) e é menor em jovens, como comprovado pelas maiores taxas de mortalidade dessa faixa etária em surtos de aflatoxicose (WILLIAMS et al., 2004; CHAO et al., 1981; KAMALA et al., 2016).

Após avaliação de estudos epidemiológicos publicados, a Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC) conclui que existe uma forte ligação entre o consumo de AFB1 e a ocorrência de câncer, além de evidências suficientes em humanos para classificar as aflatoxinas como cancerígenas. Das aflatoxinas, a AFB1 é a mais carcinogênica das aflatoxinas e está bem documentada como agente causador de carcinoma hepatocelular, bem como de supressão do crescimento, modulação do sistema imunológico e desnutrição (INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER, 2012).

Estudos em animais e humanos demonstraram diversos efeitos resultante da

exposição a aflatoxinas como os resultados de ZHOU et al. (2019) confirmando a hepatotoxicidade causada por AFB1 in vivo em camundongos. A nefrotoxicidade de AFB1 relatada in vivo em frangos de corte (ŚLIŻEWSKA et al., 2019) e ratos (OWUMI et al., 2020). A neurotoxicidade do AFB1 observada in vitro em astrócitos humanos e in vivo em uma célula glial em peixe-zebra (PARK et al., 2020). A imunossupressão de AFB1 demonstrada in vitro em macrófagos alveolares de suínos (PANG et al., 2020). A toxicidade pulmonar de AFB1 observada in vivo em ratos albinos machos (EL-SAYED et al., 2021) A toxicidade gastrointestinal de AFB1 descrita in vivo em ratos (AKINRINDE et al., 2019) porcos (PU et al., 2021) e galinhas (HERNÁNDEZ-RAMÍREZ et al., 2020). Efeitos citotóxicos e/ou genotóxicos de AFB1 relatados in vitro na linhagem de células de hepatoma masculino leghorn (LMH) (CHOI et al., 2020), na linhagem de células de carcinoma hepatocelular de fígado (HepG2) (TADEE et al., 2020), células de fígado de rato e de búfalo (BRL-3A) (WANG et al., 2020), células epiteliais mamárias bovinas (BME) (WU et al., 2021), e a linhagem de células de queratinócitos humanos (HaCaT) (DEY et al., 2020). A citotoxicidade em células BME também foi observada in vitro no caso de AFM1 (WU et al., 2021). A embriotoxicidade de AFB1 foi relatada in vitro em embriões bovinos (JIANG et al., 2020).

Em crianças, a exposição de aflatoxinas vem sendo vinculada a hepatomegalia crônica (YUN-GONG et al., 2012). Problemas nutricionais, como a desnutrição está associada a exposição crônica a AFB1, constatada pelo elevado nível de aflatoxina no sangue ou na urina quando comparadas com crianças do grupo controle, que eram saudáveis ou com outras formas de desnutrição. Essa desnutrição e o retardo de crescimento em crianças pode ser consequência dos danos no intestino provocado por essas toxinas, que podem resultar na má absorção de alguns nutrientes. Além disso, essa alteração deixa o organismo mais suscetível a patógenos intestinais e a infecções (MUPUNGA et al., 2017).

Perante esses dados da literatura, comprova-se que medidas que garantem o acesso a alimentos seguros e de qualidade são essenciais para prevenir intoxicações alimentares, evitando o surgimento de doenças que afetam desde animais a adultos e crianças, principalmente em países em desenvolvimento ou mais pobres.

3.5. Biomonitoramento para avaliar a exposição humana a aflatoxinas

A detecção e quantificação de aflatoxinas atualmente está bem desenvolvida por

meio de novas tecnologias, permitindo o monitoramento com mais precisão às exposições individuais por esse contaminante. A exposição a curto prazo às aflatoxinas em humanos pode ser monitorada através dos níveis séricos e urinários dos catabólitos de toxinas por meio de biomarcadores (GROOPMAN et al., 1992; JAGER et al., 2016; LEONG et al., 2012; MYKKÄNEN et al., 2005; BATTILANI et al., 2016; FERRI et al., 2020).

O biomonitoramento de AFs tem como biomarcadores o aduto AF-N7-guanina e AFM1 que são usados para determinar a exposição a curto prazo a AFB1 e são excretados na urina e leite materno, por sua vez a exposição crônica pode ser verificada pelos níveis de adutos de albumina-aflatoxina no plasma ou no soro (ROUTLEDGE; GONG 2011). Investigações epidemiológicas que aplicaram estes biomarcadores confirmaram que a contaminação por AFB1 em suplementos alimentares aumenta o risco da população em desenvolver carcinoma hepatocelular (WOGAN et al. 2012; TURNER et al. 2012).

Dentre os métodos de monitoramento tem-se disponíveis os métodos imunoquímicos (como radioimunoensaio (RIA), ensaio imunoenzimático (ELISA) e ensaio imunocromatográfico (ICA). Outras alternativas baseadas em imunossensores eletroquímicos, biossensores, matrizes de sensores e sensores microfluidos são descritas na literatura (SHABBER et al., 2022). No entanto a mais recente e avançada técnica é a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), acoplada a espectroscopia de massa, denominada (LCMS/MS), a qual é cada vez mais usada por laboratórios de pesquisa ou controle (BENKERROUM et al., 2020).

3.6. Ensaio imunoenzimático (ELISA)

O ELISA é um método de baixo custo e de fácil execução disponível comercialmente e comumente utilizado em laboratórios de pesquisa e médicos (OSTADRAHIMI et al., 2014). Esta técnica baseia-se em reações de antígenos e anticorpos e dependem de sua especificidade de ligação, permitindo a quantificação da quantidade total de aflatoxinas (SANTINI; RITIENI 2013). Nesse tipo de ensaio os anticorpos são imobilizados em placas de microtitulação de poliestireno de 96 poços e são baseados em um processo competitivo envolvendo antígeno marcado com uma enzima (peroxidase de rábano) e detectado por uma reação colorimétrica por meio de substratos cromogênicos (THIRUMALA-DEVI et al., 2002).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Desenho do estudo e população amostral

Estudo foi classificado como transversal, prospectivo e quantitativo. O estudo avaliou 37 indivíduos expostos a alimentos potencialmente contaminados por aflatoxinas e de alimentos característicos da região norte do Brasil. Tanto indivíduos expostos quanto não expostos foram avaliados quanto a níveis detectáveis de AFM1 urinária.

Como desfecho avaliou-se os níveis de AFM1 encontrados na amostra biológicas comparando o perfil dos hábitos nutricionais. A avaliação da exposição foi conduzida por meio de um questionário de frequência alimentar seguido da determinação dos níveis AFM1 por teste laboratorial em urina simples.

4.2. Critérios de inclusão e exclusão

Ser maior de 18 anos, de ambos os sexos, com ou sem comorbidade e adeptos a dietas livres e restritivas (vegetarianos e veganos). Foram excluídos do estudo pacientes grávidas e indígenas.

4.3. Local da pesquisa

O estudo recrutou voluntários aleatórios da comunidade acadêmica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas, e pessoas externas interessadas a participarem da pesquisa. O intuito foi ter uma amostra heterogênea, selecionando indivíduos de diferentes localidades da cidade de Manaus.

O recrutamento dos indivíduos foi por meio de uma reunião prévia abordando os objetivos do estudo, os riscos e benefícios. Para aqueles que aceitaram foi apresentado o Termo de Esclarecimento Livre e Esclarecido (TCLE). No ato do aceite do TCLE, forneceu-se o frasco coletor de urina para coleta da amostra biológica (1 amostra), a qual foi entregue no dia subsequente.

4.4. Procedimento de coleta de dados e da amostra biológica

A coleta de dados iniciou-se após a aprovação da pesquisa pelo comitê de ética em pesquisa (CEP) em janeiro de 2023. A pesquisa iniciou com a aplicação do Consentimento livre e Esclarecido (TCLE) (apêndice A) e posteriormente com a coleta de dados do questionário de frequência alimentar (apêndice B).

No ato da entrega do frasco coletor de urina, o participante foi orientado que a coleta da urina seria realizada em casa, respeitando as técnicas assépticas da coleta de urina (conforme as orientações do Apêndice C). A urina a ser colocada no frasco é a urina de jato médio. Para coletar a urina de jato médio, o participante foi instruído a rejeitar o primeiro jato (o qual limpa o canal da uretra) da micção e coletar o jato seguinte (jato médio) (NAKAME, 1980).

4.5. Recepção, identificação e transporte da amostra biológica

A entrega das amostras de urina ocorreu em sala reservada nas dependências da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (FCF), no laboratório Biophar. No ato da recepção da amostra o pesquisador, utilizou os equipamentos de proteção individual necessários para a recepção da amostra. As amostras foram armazenadas temporariamente em bandejas até o prosseguimento da análise. A identificação das amostras foi realizada utilizando as iniciais do nome dos indivíduos, enumeradas com algarismos arábicos em ordem crescente (exemplo: NNA001).

O processamento das amostras para realização da análise de aflatoxinas M1 foi no laboratório do grupo de pesquisa a qual este estudo encontra-se inserido. Após a determinação de aflatoxina M1 urinária as amostras foram descartadas, conforme as recomendações da RDC nº222/2018, para amostras que não contêm e nem são suspeitas de conter agentes da classe de risco 4, e nem apresentem relevância epidemiológica e risco de disseminação, ou microrganismo causador de doença emergente que se torne epidemiologicamente importante ou cujo mecanismo de transmissão seja desconhecido ou com suspeita de contaminação com príons.

4.6. Do laboratório para análise das amostras biológicas

O laboratório de pesquisa denominado Biophar, o qual as amostras biológicas (urina) deste projeto de pesquisa foram analisadas, encontra-se sob coordenação do docente Dr. Emerson Silva Lima. Este laboratório situa-se no prédio da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, primeiro andar, ala Sul da UFAM. Este é dotado de sistema de segurança o qual somente os integrantes do grupo de pesquisa possuem autorização de entrada (o que garante o sigilo do tratamento das amostras). Este laboratório é dotado de geladeira para armazenamento temporário das amostras, caso seja necessário, bancadas impermeáveis de fácil limpeza, pia com água corrente, espectrofotômetro, centrífuga e outros materiais

necessários para a realização das análises da amostra. A carta de anuência para realização das análises biológicas nas dependências deste laboratório encontra-se em anexo D.

4.7. Instrumento de coleta de dados

4.7.1. Questionário de frequência alimentar (QFA)

Produtos alimentares que são uma fonte potencial de contaminação por aflatoxinas, como milho e outros cereais, arroz, especiarias, nozes, frutas secas, frutas desidratadas, leite fresco, queijo fresco e queijo duro, outros produtos lácteos serão o foco principal do QFA.

O QFA seguiu as recomendações de GERDING et al. (2014) para o preenchimento do QFA, os quais são preenchidos com informações sobre os hábitos nutricionais de curto e longo prazo (recordação de 24 horas, recordação de 30 dias) para levar em consideração a variedade toxicocinética dos diferentes biomarcadores. De acordo com GERDING et al. (2014) é válido questionar os participantes quanto a sua preferência por produtos orgânicos e o consumo de carnes e laticínios.

O QFA aplicado na população em estudo encontra-se disponível no apêndice B. Ressaltamos que este questionário leva também em consideração hábitos nutricionais regionais específicos da população da região norte do Brasil.

4.8. Análise dos biomarcadores para aflatoxinas a níveis urinários

A quantificação dos níveis de AFM1 na urina foram determinados por um ensaio imunoenzimático (ELISA) competitivo, disponível comercialmente como AFM1 ELISA (KIT E-TO-E007), da Elabscience Biotechnology. O teste possui um limite de detecção de 0,5 ppb (ng/mL) de aflatoxina M1 em amostras de urina simples.

4.8.1. Da quantificação de AFM1 nas amostras de urina

4.8.1.1. Do teste para análise laboratorial

O teste laboratorial dispõe dos seguintes reagentes: Solução de anticorpo de trabalho, substrato A, substrato B, solução de parada (solution stop), tampão concentrado de lavagem, tampão de reconstituição e HRP conjugado (Elabscience Biotechnology, 2018).

4.8.1.2. Preparo dos reagentes e soluções

Solução1 (Tampão de reconstituição): Preparou-se o tampão de reconstituição

diluindo com água deionizada, na proporção 1:1 (v:v)

Solução 2 (Tampão de lavagem): Diluiu-se o tampão de lavagem concentrado com água deionizada na proporção 1:19 (v:v).

4.8.1.3. Preparação da Amostra de Urina

Utilizou-se 50 µl da amostra clarificada (centrifugada a 4000rpm por 5 minutos). Em seguida foi misturado 900 µl da Solução 1 com 50 µl da amostra clarificada. Para a análise foi utilizado 50 µl do sobrenadante.

4.8.1.4. Procedimento de Análise

Adição da Amostra: 50 µl da amostra foi adicionada em cada no poço, e em seguida 50 µl do HRP Conjugado, seguido de 50 µl da solução de trabalho de anticorpo, isolando-se a placa com selante, oscilando por 5 segundos suavemente para misturar bem, deixando incubar a 25°C por 30 minutos protegido da luz.

Lavagem: retirando a placa selante desprezou-se o líquido de cada poço, adicionando 300 µl do tampão de lavagem (solução 2) em cada poço procedeu-se a lavagem repetindo por 5 vezes em intervalos de 30 segundos. Após a lavagem inverteu-se a placa contra pape absorvente limpo e grosso, para retirada de excessos.

Revelação da cor: 50 µl de Reagente de substrato A em cada poço foi adicionado, seguido de 50 µl do Reagente de Substrato B, movimentando suavemente por 5 segundos para misturar bem. Nessa etapa o período de incubação foi de 15 minutos a 25°C protegido da luz.

Parada da Reação: Nesta etapa 50 µl da solução de interrupção (solution stop) é adicionado em cada poço, movimentando suavemente para misturar por completo.

Medição da Absorbância: A absorbância foi determinada para cada poço em um comprimento de onda de 450 nm com um leitor de microplacas. Esta etapa foi concluída em até 10 minutos após a parada da reação, que é o período de viabilidade da reação.

Interpretação dos resultados: previamente a interpretação dos dados foi construída uma curva de calibração (escala semi-log) conforme as instruções do fabricante, com padrões líquidos (1ml) de AFM1 disponibilizados no Kit nas seguintes concentrações: 0,0ppb, 0,05ppb, 0,15ppb, 0,45ppb, 1,35ppb, 4,05ppb. Nessa curva o eixo Y é composto pela absorbância das amostras (%) e o eixo y pela cocentrações do padrões (ppb). As concentrações de AFM1 nas amostras, foram determinadas observando absorbância

encontrada com sua respectiva concentração na curva padrão.

4.9. Variáveis do estudo

4.9.1. Variáveis demográficas

Sexo (feminino ou masculino), Idade (em anos), altura e peso.

4.9.2. Variáveis dependentes

Presença de biomarcadores para aflatoxina M1 na urina, doença renal e hepática.

4.9.3. Variáveis independentes

Consumo de alimentos fonte de contaminação, tipo de dieta, consumo de alimentos e/ou suplementos e uso de medicamentos.

4.10. Análise estatística

Os dados foram armazenados em planilha Excel da Microsoft® e analisados com o software Statistical Package for Social Science – SPSS, versão 21.0 e programa estatístico R (4.4.1, 2024), R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. A normalidade da distribuição dos dados quantitativos foi verificada com o Teste de Kolmogorov-Smirnov e a medida da concentração de AFM1 na urina apresentou distribuição não paramétrica, sendo descrita por mediana e intervalo interquartil; demais medidas tinham distribuição normal e foram descritas por média e desvio padrão. As variáveis categóricas foram apresentadas na forma de valores absolutos e relativos. Para a comparação entre medidas numéricas foi utilizado o teste T de Student, e para a associação entre variáveis categóricas, os testes Qui-quadrado de Pearson e Exato de Fischer. Foram consideradas significativas as análises com $p < 0,05$.

4.11. Aspectos éticos

Pesquisa aprovada pelo Comitê de Ética sob CAAE nº 64129022.4.0000.5020 em 05 de dezembro de 2022 (conforme Apêndice E).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados e discussão da presente dissertação serão apreentadas na forma de um manuscrito elaborado com os dados coletados a ser submetido ao jornal *“International Journal of Hygiene and Environmental Health”*

Association between urinary levels of aflatoxin M1 and consumption of dry and oilseed foods in Amazon

Associação entre níveis urinários de aflatoxina M1 e consumo de alimentos secos e oleaginosos na Região Amazônica

Nayra Nascimento Aquino 1, Luiz Henrique Groto Garutti², Ariane Mendonça Kluczkowski, Emersom Silva Lima 3 *

1 Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Amazonas, Av. Gen. Rodrigo Otavio, 6200, Coroado, CEP 69077-000, Manaus-AM, Brasil.

*Correspondência: eslima@ufam.edu.br

RESUMO

A exposição nutricional a aflatoxinas é considerado um problema de saúde e um risco a segurança alimentar. O biomonitoramento de aflatoxina M1 em fluidos biológicos é útil para prevenir os efeitos deletérios desta micotoxina no organismo humano. Em regiões cuja base alimentar consiste em alimentos potencialmente contaminados por aflatoxinas, estudos de biomonitoramento são necessários para avaliar o risco de exposição às aflatoxinas. O objetivo do presente estudo foi investigar os níveis de exposição nutricional a aflatoxina M1 em humanos por meio da determinação dos níveis urinários em indivíduos potencialmente expostos por alimentos secos, derivados de oleaginosas. Tratou-se de um estudo transversal, que analisou 37 amostras de urina de indivíduos com ou sem comorbidades. O estudo foi conduzido por meio de um inquérito alimentar e a aflatoxina M1 (AFM1) urinária foi analisada por meio de Ensaio Imunoenzimático Competitivo (ELISA). Neste estudo 54,1% (n=20) das amostras foram positivas para a presença de AFM1 na urina, a mediana e intervalo interquartil de concentração foi 0,405 ng/ml (0,180 ng/ml e 6,835 ng/ml). Os alimentos que apresentaram associação entre o consumo e os níveis urinários positivos foram o bolo de milho ($P<0,010$) e goma de tapioca ($P<0,023$). Indivíduos que faziam uso de vitaminas ou suplementos, apresentaram resultado negativos para AFM1, enquanto aqueles que não utilizavam ($P<0,036$). O percentual de positividade foi menor quando comparado a estudos realizados em países cuja base nutricional consiste em alimentos de alto risco para contaminação por AFB1. O estudo serviu como ponto de partida para pesquisas que avaliem níveis de AFM1 em fluidos biológicos em indivíduos da região amazônica, indicando quais alimentos regionais podem ser potenciais fontes de contaminação da população nessa região.

Palavras-chaves: Biomonitoramento, aflatoxina M1, imunoensaio enzimático, urina, exposição nutricional.

Introdução

A exposição a micotoxinas provenientes de alimentos podem desencadear sérios riscos à saúde, o que tem sido uma preocupação de saúde pública global (Yan et al., 2020). Dentre as micotoxinas, a de maior preocupação a saúde pública devido seu potencial carcinogênico, destaca-se as aflatoxinas, em especial a aflatoxina B1 (AFB1) (Benkerroum, 2019; Ostry et al., 2017).

A aflatoxina B1 é a mais nociva e estudada, e o consumo em grandes quantidades em um tempo muito curto produz insuficiência hepática aguda e manifesta-se como febre, náuseas, vômitos, dor abdominal, sangramento, problemas de digestão, edema, alterações mentais e coma (Dakhal et al., 2023; Benkerroum, 2020; Dabuo et al., 2022; Zhou et al., 2019). Os efeitos tóxicos do consumo de pequenas quantidades de aflatoxinas durante um período prolongado podem resultar em carcinogenicidade, teratogenicidade, genotoxicidade, imunotoxicidade. (Benkerroum, 2020; Wang et al., 2020), nefrotoxicidade (Ślizewska et al., 2019), neurotoxicidade (Park et al., 2020) e toxicidade gastrointestinal (Akinrinde et al., 2019).

Acredita-se também que a presença de aflatoxinas no organismo interfere na absorção de micronutrientes, na síntese proteica e no metabolismo enzimático, favorecendo a desnutrição infantil, retardo no crescimento e doenças como a Kwashiorkor (Benkerroum, 2020). Além disso, os danos intestinais causados pela toxina deixam o organismo mais suscetível a patógenos intestinais e a infecções (Mupunga et al., 2017).

A avaliação de um caso suspeito de toxicidade por aflatoxina pode ser feita medindo o nível de aflatoxina em alimentos consumidos pelo paciente ou os metabólitos da aflatoxina no corpo do paciente (Dakhal et al., 2023). Um biomarcador para avaliar a exposição nutricional a aflatoxinas é a aflatoxina M1 (AFM1) que consiste em um metabólito hidroxilado da AFB1 que pode ser dosado na urina (Turner et al., 2012; Wogan et al., 2012). Conforme Zhu et al. (1987) esse biomarcador teve correlações estatisticamente significativas entre a ingestão alimentar de AFB1 e a excreção urinária do metabólito. A quantificação desse biomarcador tem sido útil em estudos epidemiológicos para avaliar a relação entre a exposição a aflatoxinas e risco de doença (Turner et al., 2012; Wogan et al., 2012). Apesar dos estudos epidemiológicos que avaliam a exposição nutricional às aflatoxinas concentrarem-se em regiões em desenvolvimento como na África Subsaariana, (Benkerroum, 2020) estudos em outras regiões ainda são escassos, demonstrando a necessidade de avaliar a exposição nutricional.

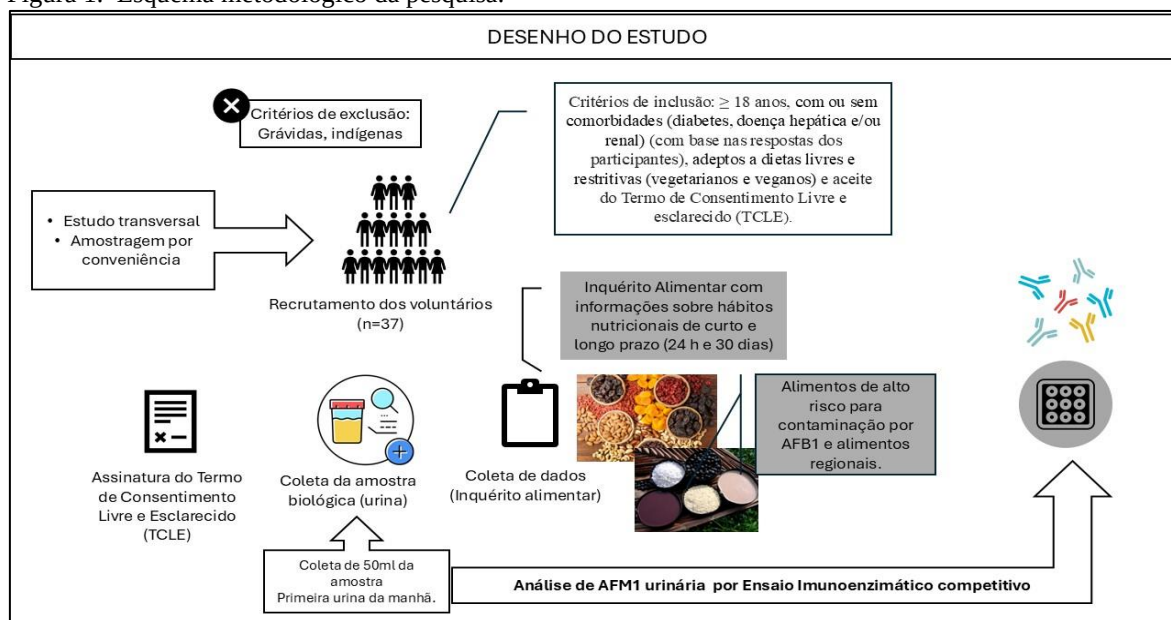
Perante o exposto, constata-se que as aflatoxinas são uma grande ameaça à segurança alimentar e mais pesquisas ajudariam a entender a sua incidência e correlações com os alimentos e outras doenças, abordando adequadamente seus efeitos negativos na saúde pública e economia (Dabuo et al., 2022), o que justifica a realização deste estudo. Deste modo, o presente estudo teve como objetivo, investigar os níveis de exposição nutricional a AFM1 em humanos por meio da determinação dos níveis urinários em uma população do município de Manaus/Amazonas.

Materiais e Métodos

Desenho do estudo

O estudo avaliou 37 indivíduos expostos a alimentos potencialmente contaminados por aflatoxinas e de alimentos característicos da região norte do Brasil. Tanto indivíduos expostos como não expostos foram avaliados quanto a níveis detectáveis de AFM1 urinária. Um esquema geral do estudo encontra-se na figura 1.

Figura 1. Esquema metodológico da pesquisa.



Recrutamento dos participantes e coleta das amostras

O recrutamento dos participantes e coleta de dados iniciou-se após a aprovação da pesquisa pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal do Amazonas, sob o número 64129022.4.0000.5020 (Apêndice D). Os participantes eram provenientes de diferentes localidades da cidade de Manaus, Amazonas. Os critérios de inclusão incluíram: idade (≥ 18 anos), com ou sem comorbidades (diabetes, doença hepática e/ou renal) (com

base nas respostas dos participantes), adeptos a dietas livres e restritivas (vegetarianos e veganos) e aceite do Termo de Consentimento Livre e esclarecido (TCLE). Foram excluídos do estudo pacientes grávidas e indígenas. Os frascos de coletas foram entregues um dia antes da coleta da amostra, junto a orientações de coleta. A avaliação da exposição nutricional a AFM1 foi conduzida por meio de um questionário de frequência alimentar seguido da determinação dos níveis de aflatoxina M1 por teste laboratorial em urina simples.

Questionário de Frequência Alimentar (QFA)

O QFA utilizado neste estudo consistiu em um recordatório alimentar com informações sobre os hábitos nutricionais das últimas 24 horas anteriores a coleta da amostra biológica e a frequência de consumo semanal em uma escala de uma a sete vezes por semana, ou maior que oito vezes na semana. Ressaltamos que as informações foram oriundas de uma alta declaração dos participantes fornecidas no ato da coleta da amostra.

O QFA seguiu as recomendações de Gerding et al. (2014) que considera informações sobre os hábitos nutricionais de curto e longo prazo (recordação de 24 horas, recordação de 30 dias). O QFA contemplou os alimentos considerados altamente susceptíveis a contaminação por AFM1, como: o milho e seus derivados, arroz, derivados de trigo, oleaginosas, nozes, cereais, especiarias, laticínios, frutas secas, derivados do trigo, especiarias e bebidas como cerveja, cevada e café. Ressaltamos que este questionário considera hábitos nutricionais específicos da população da região norte do Brasil.

Procedimento de coleta da amostra biológica

O recomendado aos participantes foi coletar preferencialmente a primeira urina da manhã, sendo solicitado uma amostra de aproximadamente 50ml. As amostras recepcionadas foram analisadas dentro das primeiras 4 horas, para manter a viabilidade do biomarcador e após as análises as amostras foram descartadas. O processamento das amostras foi realizado no laboratório de pesquisa Biophar da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas (UFAM).

Da quantificação de aflatoxina M1 na urina

Os níveis urinários de AFM 1 foram medidos usando um ensaio imunoenzimático competitivo (ELISA). Os kits ELISA para AFM1 (Catálogo nº E-TO-E007) foram adquiridos da Elabscience Bionovation Inc., EUA. As amostras de urina foram clarificadas previamente a análise e centrifugadas a 4000rpm por 5 minutos (Eppendorf, 5804R, Hamburgo, GER). Previamente a solução de lavagem concentrada 20x e o tampão de

reconstituição foram diluídos em uma proporção 1:19 e 1:1 (v:v), respectivamente. 900 µl do tampão de reconstituição foram misturados com 50 µl da amostra clarificada em cada poço. Para a análise foi utilizado 50 µl do sobrenadante da mistura anterior e em seguida adicionou-se 50 µl do HRP Conjugado, seguido de 50 µl da solução de trabalho de anticorpo. A placa foi selada, e oscilada por 5 segundos suavemente para misturar bem, deixando incubar a 25°C por 30 minutos protegido da luz. Após esse procedimento foi realizado a lavagem de cada poço com 300 µl do tampão de lavagem. O procedimento de lavagem foi repetido por 5 vezes em intervalos de 30 segundos. Para revelação da reação foi adicionado 50 µl de Reagente de substrato A, seguido de 50 µl do Reagente de Substrato B, movimentando suavemente por 5 segundos para misturar bem. A placa ficou em incubação por 15 minutos a 25°C protegido da luz. Mais tarde, 100 µL de solução de parada foram adicionados aos poços para encerrar a reação enzimática. Em até 10min, da parada da reação, a absorbância foi medida a 450 nm em um leitor de microplacas (Beckman Coulter® DTX800, Indianópolis, EUA). O nível de AFM1 nas amostras foi calculado a partir de uma curva de calibração, com padrões com concentrações conhecidas de AFM1: 0,0ppb, 0,05ppb, 0,15ppb, 0,45ppb, 1,35ppb, 4,05ppb. Os dados de absorbância, proveniente de cada concentração foram plotados em software (OriginPro® 2022, v.9.9.0.225 (SR1) x64) para se obter uma escala semi-log, para determinar as concentrações das amostras analisadas. O teste possui um limite de detecção de 0,5 ppb (ng/mL) de AFM1 em amostras de urina simples.

Análise Estatística

Os dados foram armazenados em planilha Excel da Microsoft® e analisados com o software Statistical Package for Social Science – SPSS, versão 21.0 e programa estatístico R (4.4.1, 2024), R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. A normalidade da distribuição dos dados quantitativos foi verificada com o Teste de Kolmogorov-Smirnov e a medida da concentração de AFM1 na urina apresentou distribuição não paramétrica, sendo descrita por mediana e intervalo interquartil; demais medidas tinham distribuição normal e foram descritas por média e desvio padrão. As variáveis categóricas foram apresentadas na forma de valores absolutos e relativos. Para a comparação entre medidas numéricas foi utilizado o teste T de Student, e para a associação entre variáveis categóricas, os testes Qui-quadrado de Pearson e Exato de Fischer. Foram consideradas significativas as análises com $p < 0,05$.

Resultados

Foram avaliados 37 adultos com média de idade de $40,4 \pm 14,3$ anos (intervalo de 22 a 70 anos), peso de $70,0 \pm 15,0$ kg (intervalo de 49 a 104 kg) e IMC de $26,5 \pm 4,6$ (intervalo de 19,5 a 37,7 kg/m²).

Em relação às comorbidades, 10,8% tinham DM, 5,4% doença renal e 2,7%, alguma doença hepática. Minoritariamente apresentavam intolerância ou alergia alimentar (16,2%), faziam uso de medicamentos (13,5%) ou de vitaminas/suplementos (13,5%). A maioria declarou ter uma dieta livre (100,0%), não ser vegetariana (100,0%) e 24,3% consumiam alimentos orgânicos.

Como possíveis sintomas de aflatoxicose, 2,8% apresentaram vômito, 10,8% diarreia, 8,1% tremores musculares 8,1% dor abdominal e 2,7% febre. Nenhum avaliado apresentou sangue nas fezes, conforme autodeclaração dos participantes.

Através da determinação dos níveis urinários de AFM1, a maioria dos avaliados foi classificada como positiva (54,1%). Na comparação entre as características da amostra e a detecção de AFM1 na urina, indivíduos que faziam uso de vitaminas ou suplementos, mais frequentemente, apresentaram resultado negativo para AFM1, enquanto aqueles que não utilizavam, foram positivados para a presença urinária da toxina ($p=0,036$). Demais associações não foram estatisticamente significativas (Tabela 1).

Tabela 1
Características da amostra total de indivíduos adultos residentes no município de Manaus (AM) e segundo a detecção de Aflatoxina M1 nos níveis urinários (N=37).

Detecção de Aflatoxina M1				
Características	Níveis urinários			P
	Amostra Total N (%)	Negativo	Positivo	
		ng/ml <0,05 N=17 N (%)	ng/ml ≥0,05 N=20 N (%)	
Sociodemográfica				
Idade em anos (média±DP)	40,4±14,3	39,2±12,5	41,3±15,8	0,667a
Antropométricas				
Peso em kg (média±DP)	70,0±15,0	69,6±16,9	70,3±13,6	0,896a
Altura em cm (média±DP)	162,2±10,1	163,1±9,9	161,5±10,4	0,634a
IMC em kg/m2 (média±DP)	26,5±4,6	26,1±5,4	26,9±4,0	0,596a
Clínicas				
Diabete Mellitus				0,315b
Não	33 (89,2)	14 (82,4)	19 (95,0)	
Sim	4 (10,8)	3 (17,6)	1 (5,0)	
Doença Renal				0,489b
Não	35 (94,6)	17 (100,0)	18 (90,0)	
Sim	2 (5,4)	0 (0,0)	2 (10,0)	
Doença Hepática				
Não	36 (97,3)	17 (100,0)	19 (95,0)	0,999b
Sim	1 (2,7)	0 (0,0)	1 (5,0)	

Intolerância/alergia alimentar				0,999b
Não	31 (83,8)	14 (82,4)	17 (85,0)	
Sim	6 (16,2)	3 (17,6)	3 (15,0)	
Estilo de vida				
Uso de medicamentos				0,159b
Não	32 (86,5)	13 (76,5)	19 (95,0)	
Sim	5 (13,5)	4 (23,5)	1 (5,0)	
Uso de vitaminas/suplementos				0,036c
Não	24 (64,9)	8 (47,1)	16 (80,0)	
Sim	13 (35,1)	9 (52,9)	4 (20,0)	
Dieta				
Livre				£
Não	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	
Sim	37 (100,0)	17 (100,0)	20 (100,0)	
Vegetariana				£
Não	37 (100,0)	17 (100,0)	20 (100,0)	
Sim	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	
Alimentos orgânicos				0,052b
Não	28 (75,7)	10 (58,8)	18 (90,0)	
Sim	9 (24,3)	7 (41,2)	2 (10,0)	
Sintomas de AFM1 aguda				
Vômito				0,459b
Não	36 (97,3)	16 (94,1)	20 (100,0)	
Sim	1 (2,7)	1 (5,9)	0 (0,0)	
Diarreia				0,609b
Não	33 (89,2)	16 (94,1)	17 (85,0)	
Sim	4 (10,8)	1 (5,9)	3 (15,0)	
Tremores musculares				0,234b
Não	34 (91,9)	17 (100,0)	17 (85,0)	
Sim	3 (8,1)	0 (0,0)	3 (15,0)	
Sangue nas fezes				£
Não	37 (100,0)	17 (100,0)	20 (100,0)	
Sim	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	
Dor abdominal				0,234b
Não	34 (91,9)	17 (100,0)	17 (85,0)	
Sim	3 (8,1)	0 (0,0)	3 (15,0)	
Febre				0,459b
Não	36 (97,3)	16 (94,1)	20 (100,0)	
Sim	1 (2,7)	1 (5,9)	0 (0,0)	
Náuseas				0,999b
Não	34 (91,9)	16 (94,1)	18 (90,0)	
Sim	3 (8,1)	1 (5,9)	2 (10,0)	

p: a: Teste T de Student; b: Teste Exato de Fischer; c: Teste Qui-quadrado de Pearson. £: Dados não permitem a análise estatística.

DP: Desvio padrão; IMC: Índice de Massa Corporal; AFM1: Aflatoxina M1.

Entre os positivos para AFM1 (n=20), a mediana e intervalo interquartil de concentração foi 0,405 ng/ml (0,180 ng/ml e 6,835 ng/ml). A distribuição das faixas de concentração de AFM1 e a frequência da classificação da concentração de AFM1 em ng/ml na urina dos pacientes, estão representadas na figura 2.

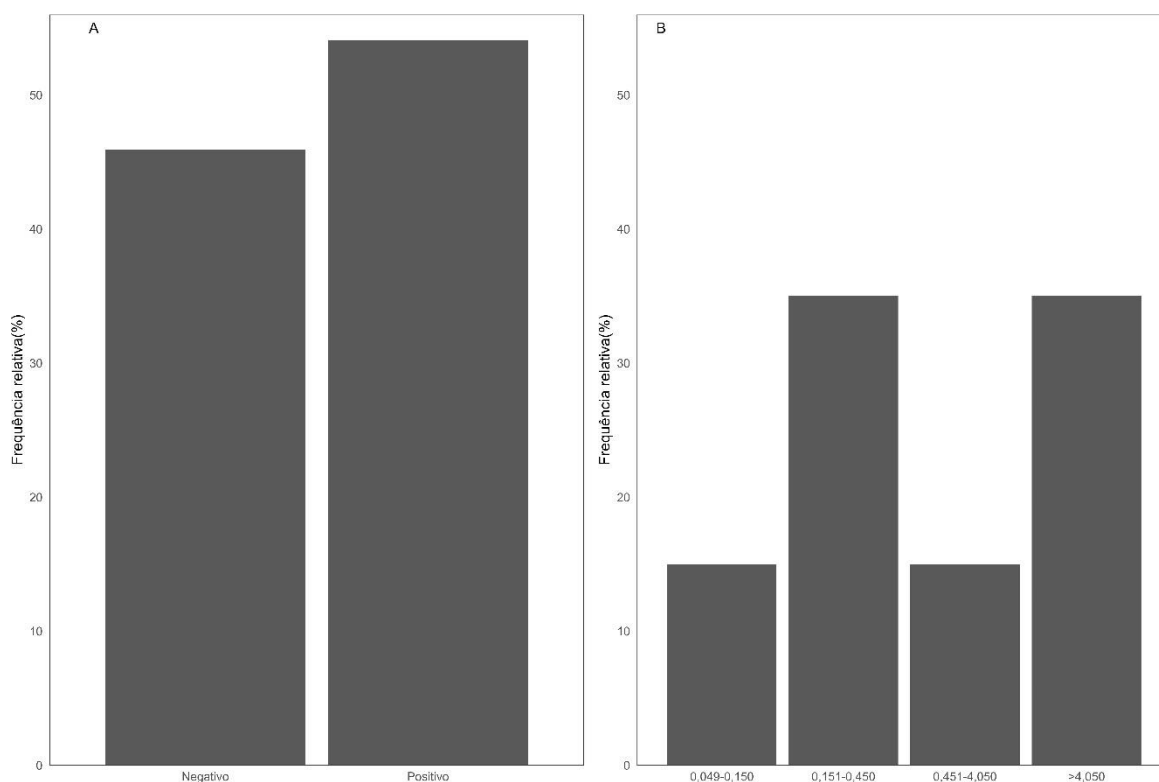


Figura 2. Frequência relativa global da classificação das concentrações de AFM1 urinária na população em estudo n=37 (A) e Faixa de concentração de AFM1 urinária na amostra de indivíduos adultos positivos residentes no município de Manaus (B), Amazonas, Brasil.

Para os alimentos com alta susceptibilidade à AFM1, as periodicidades de consumo mais frequentes foram: castanha, uma vez (28,6%) e três vezes por semana (28,6%); amendoim, uma vez por semana (70,0%); derivados amendoim, uma vez por semana (75,0%); mix de nozes, uma vez por semana (50,0%); queijo coalho, três vezes por semana (31,3%); mix de frutas secas, três (37,5%) e quatro vezes por semana (37,5%); cereais de milho, uma vez por semana (50,0%); cuscuz, uma vez por semana (52,4%); pipoca, uma vez por semana (73,7%); bolo de milho, uma vez por semana (66,7%); milho cozido, uma vez por semana (75,0%); barra de cereais, duas vezes por semana (57,1%); e granola, uma vez por semana (30,8%).

Na associação da frequência de consumo alimentar com a detecção de AFM1 na urina, indivíduos que consumiam bolo de milho uma vez por semana apresentaram resultado negativo para AFM1, enquanto aqueles que consumiam duas ou três vezes na semana foram positivos para a toxina ($p=0,010$). Perante esse achado, concluímos que a frequência de consumo deste alimentos independe dos níveis de AFM1 urinária detectados, podendo relacionar-se com a quantidade do alimento que foi consumido. No entanto, para confirmar essa hipótese, a quantidade diária do alimento juntamente com a determinação

de AFB1 no alimento consumido pelos indivíduos seria necessários. Para os demais alimentos associações não foram estatisticamente significativas, deste modo não estão descritos na tabela 2.

Tabela 2

Frequência de consumo de bolo de milho na amostra total e associação com concentração positiva ou negativa da toxina nos níveis urinários de indivíduos adultos residentes no município de Manaus (AM) N=37.

Alimentos Frequência semanal	Detecção de Aflatoxina M1 Níveis urinários			p
	Amostra Total N (%)	Negativo ng/ml<0,05 N=17 N (%)	Positivo ng/ml≥0,05 N=20 N (%)	
Bolo de milho N=12				0,010
Uma vez	8 (66,7)	7 (100,0)	1 (20,0)	
Duas vezes	2 (16,7)	0 (0,0)	2 (40,0)	
Três vezes	2 (16,7)	0 (0,0)	2 (40,0)	
Quatro vezes	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	
Cinco vezes	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	
Seis vezes	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	
Sete vezes	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	

p: Teste Exato de Fischer.

Avaliando a associação entre a frequência de consumo dos alimentos de alto risco para contaminação por aflatoxinas em uma escala de consumo frequente, moderado e raro e os níveis de AFM1 acima do limite de detecção, indivíduos que consumiram raramente amendoim e granola apresentaram resultados positivos para AFM1 ($p=0,003$) (Figura 3). Para este tipo de análise associações com outros alimentos de alto risco para contaminação por aflatoxinas não foram significativas.

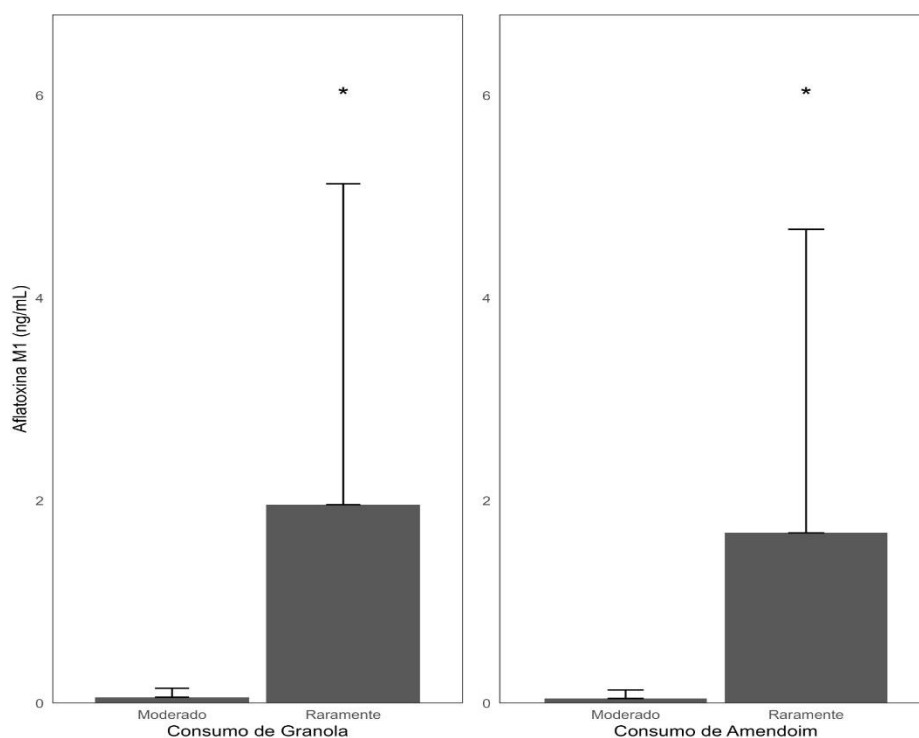


Figura 3. Frequência de consumo de alimentos de alto risco para contaminação por AFB1 e níveis urinários de AFM1 acima do limite de detecção. Para ambos os alimentos indivíduos com consumo infrequente apresentaram associação significativa com níveis detectáveis de AFM1 urinária. 3A. Consumo de granola (*p=0,033). 3B. Consumo de amendoim (*p=0,033). Raramente: 0 a 2 vezes por semana; Moderado: 3 a 5 vezes por semana. Teste T de Student; ANOVA de primeira ordem.

Para os alimentos regionais, as periodicidades de consumo mais frequentes foram: macaxeira, uma vez por semana (40,0%); farinha, sete vezes por semana (29,2%); açaí, uma vez por semana (46,2%); tucumã, uma vez por semana (40,0%); e goma de tapioca, uma vez por semana (35,5%).

Na associação da frequência de consumo alimentar com a detecção de AFM1 na urina, indivíduos que consumiam goma de tapioca duas vezes por semana apresentaram resultado positivo para AFM1, enquanto aqueles que consumiam quatro vezes na semana foram negativos para a toxina (p=0,023). Demais associações não foram estatisticamente significativas (Tabela 3).

Tabela 3

Frequência de consumo de alimentos regionais na amostra total e associação com concentração positiva ou negativa de Aflatoxina M1 nos níveis urinários de indivíduos adultos residentes no município de Manaus (AM) N=37.

Alimentos Frequência semanal	Detecção de Aflatoxina M1 Níveis urinários			P
	Amostra Total N (%)	Negativo ng/ml<0,05 N=17 N (%)	Positivo ng/ml≥0,05 N=20 N (%)	
Macaxeira N=15				0,803

Uma vez	6 (40,0)	3 (42,9)	3 (37,5)	
Duas vezes	4 (26,7)	1 (14,3)	3 (37,5)	
Três vezes	4 (26,7)	2 (28,6)	2 (25,0)	
Quatro vezes	1 (6,7)	1 (14,3)	0 (0,0)	
Cinco vezes	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	
Seis vezes	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	
Sete vezes	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	
Farinha N=24				0,070
Uma vez	2 (8,3)	2 (22,2)	0 (0,0)	
Duas vezes	6 (25,0)	3 (33,3)	3 (20,0)	
Três vezes	1 (4,2)	0 (0,0)	1 (6,7)	
Quatro vezes	2 (8,3)	0 (0,0)	2 (13,3)	
Cinco vezes	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	
Seis vezes	2 (8,3)	2 (22,2)	0 (0,0)	
Sete vezes	7 (29,2)	2 (22,2)	5 (33,3)	
Oito ou mais vezes	4 (16,7)	0 (0,0)	4 (26,7)	
Açaí N=13				0,790
Uma vez	6 (46,2)	2 (50,0)	4 (44,4)	
Duas vezes	2 (15,4)	0 (0,0)	2 (22,2)	
Três vezes	3 (23,1)	2 (50,0)	1 (11,1)	
Quatro vezes	1 (7,7)	0 (0,0)	1 (11,1)	
Cinco vezes	1 (7,7)	0 (0,0)	1 (11,1)	
Seis vezes	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	
Sete vezes	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	
Tucumã N=10				0,300
Uma vez	4 (40,0)	1 (33,3)	3 (42,9)	
Duas vezes	3 (30,0)	0 (0,0)	3 (42,9)	
Três vezes	1 (10,0)	1 (33,3)	0 (0,0)	
Quatro vezes	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	
Cinco vezes	1 (10,0)	1 (33,3)	0 (0,0)	
Seis vezes	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	
Sete vezes	1 (10,0)	0 (0,0)	1 (14,3)	
Goma de Tapioca N=31				0,023
Uma vez	11 (35,5)	3 (23,1)	8 (44,4)	
Duas vezes	5 (16,1)	0 (0,0)	5 (27,8)	
Três vezes	5 (16,1)	2 (15,4)	3 (16,7)	
Quatro vezes	8 (25,8)	6 (46,2)	2 (11,1)	
Cinco vezes	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	
Seis vezes	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	
Sete vezes	2 (6,5)	2 (15,4)	0 (0,0)	

p: Teste Exato de Fischer.

A frequência de consumo, nas últimas 24h, foi de 24,3% de alimentos regionais, 16,2% de laticínios e 13,5% de derivados de milho. Indivíduos com resultado positivo, mais frequentemente não consumiram laticínios nas últimas 24h, enquanto aqueles com resultado negativo, haviam feito consumo destes alimentos ($p=0,005$). O consumo de alimentos regionais e derivados do milho não foram associados com o resultado do exame toxicológico (Tabela 4).

Tabela 4

Frequência de consumo de grupos de alimentos nas últimas 24h e associação com a concentração positiva ou negativa de Aflatoxina M1 nos níveis urinários de indivíduos adultos residentes no município de Manaus (AM) n=37.

Grupos de alimentos Frequência semanal	Detecção de Aflatoxina M1 Níveis urinários			p
	Amostra Total N (%)	Negativo ng/ml<0,05 N=17 N (%)	Positivo ng/ml≥0,05 N=20 N (%)	
Regionais				0,052
Não	28 (75,7)	10 (58,8)	18 (90,0)	
Sim	9 (24,3)	7 (41,2)	2 (10,0)	
Laticínios				0,005
Não	31 (83,8)	11 (64,7)	20 (100,0)	
Sim	6 (16,2)	6 (35,3)	0 (0,0)	
Derivados do milho				0,159
Não	32 (86,5)	13 (76,5)	19 (95,0)	
Sim	5 (13,5)	4 (23,5)	1 (5,0)	

p: Teste Exato de Fischer

Discussão

Encontramos associações significativas entre os consumidores de derivados do milho (bolo de milho) e goma de tapioca (derivado da *Manihot esculenta* Crantz) e a detecção de AFM1 urinária, considerando os níveis de positividade das amostras. Por sua vez, considerando os níveis urinários acima do limite de detecção (0,05ng/ml), encontramos associação relevante entre indivíduos que consumiam de forma infrequente amendoim e granola (mix de cereais, amendoim, castanhas e frutas secas) e níveis maiores da AFM1 urinária quando comparados aqueles com consumiam de forma regular, o que indica a presença de uma outra fonte de contaminação não avaliada neste estudo.

Um diferencial nesse estudo foi que além de investigar o consumo de alimentos considerados de alto risco para contaminação por aflatoxina B1, incluiu-se no inquerito alimentar alimentos típicos da região norte do Brasil. Dentre estes, a goma de tapioca um derivado da *Manihot esculenta* Crantz, um tipo de farinha da dieta amazônica, utilizado na culinária local. Para este alimentos não existe estudos brasileiros que correlacionem o seu consumo e níveis detectáveis de AFM1 em fluidos biológicos. E em nosso estudo, os níveis de AFM1 urinária teve uma associação significativa com o consumo deste alimento. Esse achado pode relacionar-se a origem do produto, que é desprovida de processamento industrial ou outro controle de qualidade que venha minimizar a contaminação por aflatoxinas.

Um exemplo de evidência que comprova que derivados da mandioca podem ser susceptíveis a contaminação por fungos aflatoxicogênicos, consiste no estudo de (Gnonlonfin et al., 2012), que ao analisar a microflora de um derivado da *Manihot esculenta* Crantz verificou o crescimento de mais de vinte tipos de espécies fúngicas,

incluindo o fungo aflatoxicogênico *Aspergillus flavus*. No entanto, para essa análise não foram detectadas aflatoxinas nas amostras do alimento.

Em uma análise inédita de aflatoxinas em goma de tapioca comercializada na cidade de Manaus, Brasil, 29,7% das amostras coletadas no comércio local, apresentaram contaminação por aflatoxina G1. Neste estudo, o percentual de umidade correlacionou-se com a presença de AFLG1, enquanto Aw não teve efeito sobre AFL. Além desses fatores, a goma de tapioca é um alimento rico em carboidratos, o que pode facilitar a contaminação secundária por micotoxinas (Kluczkowski et al., 2024).

No que refere-se a investigação da exposição dietética a micotoxinas em humanos, (Kouadio et al., 2014), em uma população na Costa do Marfim, verificou uma correlação entre biomarcadores (aflatoxinas, fumonisinas, acratoxina A e Desoxinivalenol), e o consumo de alimentos selecionados, como o milho, o amendoim, milho e o attiéké (sêmola de mandioca). Essa correlação demonstrou que níveis detectáveis de biomarcadores para micotoxinas versus a frequência de consumo estavam fortemente ligados à exposição a AFB1 e ocratoxina A. Neste estudo, a incidência de AFM1 urinária foi de 40% com níveis de até 14,1 ng/ml nas amostras positivas.

A ocorrência de micotoxinas em alimentos também foi confirmada por Franco et al.(2019) em um estudo que analisou amostras de alimentos em uma população rural no Sul do Brasil. Neste estudo, todos os tipos de alimentos apresentaram amostras positivas contendo pelo menos um tipo de micotoxina acima do limite de quantificação, dentre os alimentos, 100% de farinha de milho e 94% do fubá de milho estavam contaminados. Entretanto aflatoxinas foram detectadas em apenas duas amostras de farinha de milho (10%).

Ainda sobre a diversidade fúngica nos alimentos de alto risco para a contaminação por aflatoxinas, Santos et al. (2015) relata em uma análise em amostras de granola no nordeste do Brasil, que 60% das amostras coletadas apresentavam aflatoxinas, e isso pode relacionar-se a composição do alimento, uma vez que a granola é constituída por diferentes cereais como aveia, passas, trigo e seus derivados, o que pode favorecer o crescimento de fungos preexistentes. Entretanto fatores como as condições de armazenamento e controle de umidade podem evitar o crescimento fúngico e a posterior contaminação por aflatoxinas.

Ezekiel et al. (2020) ao analisar perfis e níveis de contaminação por micotoxinas em alimentos prontos para consumo com baixo teor de umidade como bolinhos de

queijo, garri (alimento à base de mandioca), granola e pipoca na Nigéria, observou-se que no garri, bolinhos de queijo, pipoca e granola foram detectados 1, 6, 12 e 23 micotoxinas, respectivamente. Neste estudo a granola foi considerada uma potencial preocupação para a saúde pública, sendo encontrado exclusivamente neste alimento aflatoxinas, citrinina, di-hidrocitrinona, eniatinas A e A1 e ocratoxinas A e B.

Quanto aos níveis detectáveis de AFM1 urinária em indivíduos que consumiam de forma infrequente granola, mais estudos são necessários para avaliar esta população sob uma dieta controlada avaliando tanto o grau de exposição pelo biomarcador urinário, quanto à análise da microflora e quantificação toxicológica de aflatoxinas no alimento.

Outro contraponto neste estudo, consiste que apesar da castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa*), ser considerada um substrato potencial para a produção de aflatoxinas (Pacheco et al., 2007; Reis et al., 2012; Martins et al., 2012; Baquião et al., 2013) essa oleaginosa não demonstrou ser uma fonte de exposição dietética nesta população. Reis et al. (2012) destaca que a presença de fungos não implica necessariamente por contaminação de micotoxinas e em seus estudos a contaminação por aflatoxinas foi maior nas cascas da castanha-do-Brasil do que nas amêndoas. Entretanto a alta frequência de *Aspergillus* nas amêndoas, indica que este alimento é um bom substrato para o crescimento fúngico. Em um estudo controlado realizado em voluntários na região amazônica não houve relação estatística entre os indivíduos consumidores de castanha-do-Brasil e seus derivados com os níveis de AFM1 urinária (Kluczkowski et al., 2020; Higashioka et al., 2021). Em nossa população a não associação entre o consumo da castanha-do-Brasil e os níveis de AFM1 urinária pode estar relacionado ao baixo consumo pelo grupo populacional estudado.

A mediana de AFM1 urinária na população em estudo foi de 0,405 ng/ml (0,180 ng/ml e 6,835 ng/ml) e um percentual de detecção de 54% (20 amostras). Para fins de comparação, atualmente existe quatro estudos brasileiros que avaliaram a exposição nutricional a aflatoxina por meio de AFM1 urinária, cujos níveis médios de concentração foram de $1,3 \pm 1,5 \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1}$ e 61% de positividade (Jager et al., 2014), $0,37 \pm 0,23$ a $1,70 \pm 2,88 \text{ pg/mg}^{-1}$ de creatinina em 4 tempos de amostragem, cujo percentual nesses diferentes pontos variou de 50% a 70% de positividade (Jager et al., 2016), $5,96 \pm 6,39 \text{ pg/mL}$ e 65% de positividade (Romero et al., 2010) e 10% de amostras positivas com uma variação de 2,75-70,41 ng/mL no estudo de Kluczkowski et al. (2020).

Na presente avaliação a mediana de AFM1 urinária foi inferior quando comparados

aos estudos citados anteriormente, exceto o percentual descrito por Kluczkovski et al. (2020). Esse resultado pode relacionar-se a características próprias da população em estudo que possuem hábitos alimentares diferenciados ou ao tipo de amostragem, que neste estudo foi do tipo único.

No que tange o biomonitoramento urinário de AFM1 na região amazônica, o percentual de positividade dos níveis urinários de AFM1 foram superiores aos de Kluczkovski et al. (2020). A hipótese que sugerimos para essa diferença, consiste que a população estudada por Kluczkovski et al. (2020), estava sob uma dieta controlada quanto ao consumo de castanha-do-Brasil, e pelo fato deste alimento ser rico em selênio, este nutriente pode ter gerado um efeito protetor frente a exposição alimentar a aflatoxinas (Higashioka et al., 2021). No entanto mais estudos são necessários para validar esta premissa.

Em outros biomonitoramentos de exposição à aflatoxinas realizados na América do Sul, destacamos os estudos realizado no Chile e na Colômbia. No Chile, a ocorrência de AFM1 urinária em uma coorte populacional MAUCO ($n = 120$) foi de 59% dos participantes ($>$ limite de detecção) e a média das amostras quantificáveis foi de $0,66 (\pm 0,35)$ ng/mg de creatinina ajustada, variando de 0,31 a 1,39 ng/mg de creatinina (Foerster et al., 2022). Na Colômbia a frequência do AFM1 na urina foi investigada em crianças e a concentração média nas amostras positivas foi de $16 \text{ pg mL}^{-1} \pm 10,7 \text{ pg mL}^{-1}$, com um percentual de 41,7% de amostras positivas (Sánchez; Diaz 2019).

Em um outro cenário o consumo de alimentos contaminados com AFB1 é maior em países do Sudeste Asiático em comparação com países desenvolvidos da Europa Ocidental (Ali et al., 2016). Em um estudo numa coorte da zona urbana de Bangladesh relatou um percentual menor, (46%) de amostras quantificáveis para AFM1 nas amostras de urina analisadas, com um intervalo de 31–348 pg/ml. A mediana e a concentração média de AFM1 na urina foi de 61 e $80 \pm 60 \text{ pg/mL}$, respectivamente. Conforme os autores, a AFM1 urinária não apresentou correlações significativas com os dados de frequência alimentar ou idade, sexo e índice de massa corporal dos participantes, no entanto deve-se levar em consideração a representatividade da amostra nesse estudo. (Ali et al., 2016).

Na China foi aonde encontrou-se uma gama mais ampla de níveis urinários de AFM1 em uma média de 51,5 (intervalo LOD-4900) pg/mL em uma coorte masculina e uma média de 50,3 (intervalo LOD-500) pg/mL em mulheres grávidas na província de Zheijiang (Sun et al., 2013). A ocorrência e o nível de AFM1 em amostras de urina de

residentes urbanos e rurais em Terengganu, Malásia, foi de 84 amostras foram positivas (40,8%) na faixa de 0,07 a 5,53 ng/ml (média=0,589 ng/ml).

Apesar de que em regiões na qual a população depende de alimentos à base de cereais e nozes ser verificada exposições mais elevadas às aflatoxinas e uma maior propensão à contaminação do que em populações com dietas diversificadas (IARC, 2015), o percentual de positividade desse estudo foi maior quando comparados com os valores de (Sun et al., 2013; Ali et al., 2016; Ahmand et al., 2020). Essa positividade maior, pode indicar uma exposição a curto prazo a aflatoxinas B1 (que é o que indica o metabólito urinário, AFM1) (Routledge; Gong, 2011) não somente aos alimentos de alto risco, assim como também o de origem regional, gerando um efeito somatório à exposição dietética a AFB1.

Ressaltamos que o tipo de população contribui para os resultados de estudos que investigam a prevalência e a exposição a aflatoxina B1 (Schleicher et al., 2013). E que comparar os dados das concentrações e prevalências de AFM1 em regiões de alto e baixo risco para aflatoxinas com os níveis urinários de aflatoxinas pode ser enganoso, porque vários métodos analíticos com diferentes limites de detecção e quantificação são aplicados neste tipo de estudo (Ali et al., 2017).

Este estudo também avaliou de forma subjetiva, com base nas informações fornecidos pelos participantes, sintomas que poderiam relacionar-se a uma possível aflatoxicose, entretanto não foi verificada relação estatisticamente significativa entre o consumo de alimentos fonte de contaminação para AFB1 e os níveis urinários encontrados nesta população. O que indica que as manifestações clínicas patológicas a longo prazo ou nas últimas 24h encontradas nesse estudo são de etiologia desconhecida.

Por outro lado, também avaliamos os participantes quanto ao uso de polivitamínicos. E preliminarmente indivíduos que faziam uso de algum tipo de suplementação, apresentaram resultados negativos. Recentemente, um estudo que avaliou o efeito terapêutico de produtos naturais e suplementos dietéticos sobre a nefropatia induzida por aflatoxina, demonstrou que a curcumina, resveratrol, diosmina, morin, esculina, fucoidans, selenometionina, vitamina E, o licopeno e algumas formulações fitoterápicas e probióticos, tinham a propriedade de atenuar os danos renais induzidos por AFM1 (Ofori-Atta., 2024). Deste modo, nosso achado contribui e serve preliminarmente como ponto de partida para estudos moleculares que avaliem efeitos protetores de suplementos frente a efeitos negativos das aflatoxinas a longo prazo.

Conclusão

O biomonitoramento de aflatoxinas em fluidos biológicos é de grande valia para rastrear a exposição dietética a aflatoxinas, conhecer o perfil epidemiológico de diferentes populações e prevenir os agravos a saúde relacionado a estas micotoxinas. Nossos resultados demonstraram percentuais baixos quando comparados a países na qual os estudos apontam um maior índice de contaminação, como os países asiáticos e africanos. O que encorajam novos estudos, visto que nossos resultados indicam uma exposição dietética à aflatoxina B1 e níveis de AFM1 acima do limite de detecção foram quantificáveis.

Constatamos que níveis urinários de AFM1 positivos podem indenpender da frequência de consumo de alimentos considerados de alto risco para contaminação por AFB1. E que novos alimentos conforme a cultura local da população em estudo podem estar sofrendo contaminação por aflatoxinas, seja em sua origem ou por meio de contaminação secundária.

Dados preliminares referente ao efeito protetor de polivitamínicos frente aos efeitos deletérios da aflatoxinas podem ser considerados neste estudo e servir como ponto de partida para estudos moleculares de suplementos e produtos naturais frente aos efeitos das aflatoxinas sobre o organismo humano.

Conflito de Interesses

Os autores declaram não haver conflito de interesses.

Agradecimentos

Os autores gostariam de agradecer à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas – FAPESAM e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq pelo apoio financeiro e bolsas. Agradecemos também aos funcionários do Centro Analítico da UFAM pela disponibilização de sua infraestrutura.

Referências

- Ahmad, F.N., Jamaluddin, R., Mohd E. N. 2020 Screening of the aflatoxin M1 metabolite in urine samples of residents in Terengganu, Malaysia. *Toxicon* 186, 120-125. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2020.07.022>
- Akinrinde, A. S., Adebisi, O., Asekun, A. 2020. Amelioration of Aflatoxin B1-induced gastrointestinal injuries by Eucalyptus oil in rats. *Journal of Complementary and Integrative Medicine* 17(1), 20190002. <https://doi.org/10.1515/jcim-2019-0002>.

- Ali, N., Hossain, K., Blaszkewicz, M., Khaled, H., Degen, G. H. 2017. Determination of aflatoxin M1 in urine samples indicates frequent dietary exposure to aflatoxin B1 in the Bangladeshi population. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 220(2), 271-281. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2016.11.002>.
- Ali, N., Hossain, K., Blaszkewicz, M., Rahman, M., Mohanto, N. C., Alim, A., Degen, G. H. 2016. of aflatoxin M1 in urines from rural and urban adult cohorts in Bangladesh. *Arch Toxicol.* 90(7),1749-55. <https://doi.org/10.1007/s00204-015-1601-y>
- Baquião, A. C., De Oliveira, M. M. M., Reis, T. A., Zorzete, P., Atayde, D. D., Corrêa, B. 2013. Monitoring and Determination of Fungi and Mycotoxins in Stored Brazil Nuts, *Journal of Food Protection* 76(8),1414-1420. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-13-005>.
- Benkerroum N. 2019. Retrospective and Prospective Look at Aflatoxin Research and Development from a Practical Standpoint. *Int J Environ Res Public Health* 16(19), 3633. <https://doi.org/10.3390/ijerph16193633>.
- Benkerroum N. 2020. Aflatoxins: Producing-Molds, Structure, Health Issues and Incidence in Southeast Asian and Sub-Saharan African Countries. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 17(4), 1215. <https://doi.org/10.3390/ijerph17041215>
- Dabuo, B., Wesome, A. E., Koomson, O. G., Akantibila, M., Gbati, A. D. 2022. Aflatoxins: Toxicity, Occurrences and Chronic Exposure. IntechOpen. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.105723>. Acesso em: 2 de mai. 2024.
- Dhakal A., Hashmi M. F., Sbar E. Aflatoxin Toxicity. 2023. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 Jan-. PMID: 32491713.<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557781/>.
- Ezekiel, C., Oyedele, M O. A., Kraak, b., Ayeni, K. I., Sulyok, m., Houbraken, J., Ktska, R. 2020. Fungal Diversity and Mycotoxins in Low Moisture Content Ready-To-Eat Foods in Nigeria *Front. Microbiol.* (11). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00615>.
- Foerster, C., Monsalve, L., Maldonado, C., Cortés, S., Ferreccio, C. 2022. A preliminary study on aflatoxin exposure by urine biomonitoring in Chile. *Mycotoxin Res.* 38(3),185-19. <https://doi.org/10.1007/s12550-022-00459-x>.
- Franco, L. T., Petta, T., Rottinghaus, E. G., Bordin, K., Gomes, G. A., Alvito, P., Assunção, R., Oliveira, C. A. F.A 2019. 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. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0278691519301747>. Acesso em: 15 de Marc. 2023.
- Gerding, J.; Cramer, B.; Humpf, H. U. 2014, Determination of mycotoxin exposure in Germany using an LC-MS/MS multibiomarker approach. *Mol Nutr Food Res.* 58(12), 2358-2368. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201400406>.
- Gnonlonfin, J. B., Adjovi, C. S.Y., Katerere, D. E., Shephard, G. S., Sanni, S., Brimer, L.2012.Mycoflora and absence of aflatoxin contamination of commercialized cassava chips in Benin, West Africa. *Food Control* (23) 2, 333-337. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.07.026>.

Higashioka, K. M., Kluczkowski, A. M., Lima, E. S., Lucas, S. A. C. Biomonitoring aflatoxin B1 exposure of residents from the Amazon region: a pilot study. *World Mycotoxin Journal* 14(13), 319-326. <https://doi.org/10.3920/WMJ2020.2627>.

Jager, A. V., Tonin, F. G., Baptista, G. Z., Souto, P. C., Oliveira, C. A. 2016. Assessment of aflatoxin exposure using serum and urinary biomarkers in São Paulo, Brazil: A pilot study. *Int J Hyg Environ Health* 219(3), 294-300. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2015.12.003>

Jager, A. V., Tonin, F. G., Souto, P. C., Privatti, R. T., Oliveira, C. A. 2014. Determination of urinary biomarkers for assessment of short-term human exposure to aflatoxins in São Paulo, Brazil. *Toxins (Basel)* 6(7), 1996-2007. <https://doi.org/10.3390/toxins6071996>.

Kluczkowski, A. M., Luiz, D., Barroncas, J., Silva, A., Torres, T. V., Lima, E., Correa, L., Junior, S K. 2024. Aflatoxins in Tapioca Gum Marketed in Manaus-AM-Brazil. *Journal of Food Research* (13), 1. <https://doi.org/10.5539/jfr.v13n2p1>.

Kluczkowski, A., Kluczkowski-Junior, A., Braga, S., Lima, E., Viana, S., Xavier, L. 2020. Health risk assessment of Brazil nut consumption by aflatoxin biomarker in urine samples. *African Journal of Food Science*. 14 (5). 128-133. <https://doi.org/10.5897/AJFS2020.1935>.

Kouadio, J. H., Lattanzio, V. M., Ouattara, D., Kouakou, B., Visconti, A. 2014. Assessment of Mycotoxin Exposure in Côte d'Ivoire (Ivory Coast) Through Multi-Biomarker Analysis and Possible Correlation with Food Consumption Patterns. *Toxicol Int.* 21(3):248-257. <https://doi.org/10.4103/0971-6580.155336>.

Martins, M., Pacheco, A. M., Lucas, A. C. S., Andrello, A., Appoloni, C., Junior, J. 2012. Brazil nuts: Determination of natural elements and aflatoxin. *Acta Amazon* 42(1), 157–164. <https://doi.org/10.1590/S0044-59672012000100018>.

Mupunga, I., Mngqawa, P., Katerere, D. R. 2017. Peanuts, Aflatoxins and Undernutrition in Children in Sub-Saharan Africa. *Nutrients* 9(12), 1287. <https://doi.org/10.3390/nu9121287>

Ofori-Attah, E., Hashimoto, M., Oki, M.; Kadowaki, D. 2024. Therapeutic Effect of Natural Products and Dietary Supplements on Aflatoxin-Induced Nephropathy. *Int. J. Mol. Sci.* 25(5), 2849. <https://doi.org/10.3390/ijms25052849>.

Ostry, V., Malir, F., Toman, J. et al. 2017. Mycotoxins as human carcinogens—the IARC Monographs classification. *Mycotoxin Res.* 33, 65–73. <https://doi.org/10.1007/s12550-016-0265-7>

Pacheco, A. M., Scussel, V. M. 2007. Selenium and aflatoxin levels in raw Brazil nuts from the Amazon basin. *J Agric Food Chem.* 55(26), 1087-11092. <https://doi.org/10.1021/jf072434k>.

Park, S., Lee, Jin-Young., You, S., Song, G., Lim, W. 2020. Neurotoxic effects of aflatoxin B1 on human astrocytes in vitro and on glial cell development in zebrafish in vivo. *Journal of Hazardous Materials.* (386), 121639. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2019.121639>.

Reis, T. A., Oliveira, T. D., Baquião, A; C., Gonçalves, S. S., Zorzete, P., Corrêa B. 2012. Mycobiota and mycotoxins in Brazil nut samples from different states of the Brazilian Amazon region. *Int J Food Microbiol.* 159(2), 61-8. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.08.005>.

Romero, A. de C., Ferreira, T. R. B., C.T. Dias., Calori-Domingues, M. A., daGloria, E. M. 2010. Occurrence of AFM1 in urine samples of a Brazilian population and association with

food consumption. Food Control 21(4), 554-558. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2009.08.004>.

Sánchez, E.M., Diaz, G.J. 2019. Frequency and levels of aflatoxin M₁ in urine of children in Bogota, Colombia. *Mycotoxin Res* 35(3), 271–278. <https://doi.org/10.1007/s12550-019-00355-x>.

Santos, M. R. R., Filho, F. C. C., Calvet, R. M., R. R., Andrade, Pires, R. M. C., Pereira, M. M. G., Costa, A. P. R., Muratori, M. C. S. 2015. Aflatoxin B1 in commercial granolas. *Jornal Africano de Pesquisa em Microbiologia*, 9(50), 2391-2395. <https://doi.org/10.5897/AJMR2015.7633>

Schleicher, R.L.; McCoy, L.F.; Powers, C.D.; 2013. Sternberg, M.R.; Pfeiffer, C.M. Serum concentrations of an aflatoxin-albumin adduct in the National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) 1999–2000. *Clin. Chim. Acta*, 423, 46–50.

Schwartzbord, J., Severe, L., Brown, D. 2016. Detection of trace aflatoxin M1 in human urine using a commercial ELISA followed by HPLC. *Biomarkers* 22(1), 1-4. <https://doi.org/10.1080/1354750X.2016.1203998>.

Śliżewska, K., Cukrowska., B., Smulikowska, S., Cielecka-Kuszyk, J. 2019- The Effect of Probiotic Supplementation on Performance and the Histopathological Changes in Liver and Kidneys in Broiler Chickens Fed Diets with Aflatoxin B₁. *Toxins* 11(2), 112. <https://doi.org/10.3390/toxins11020112>.

Sun, Z., Chen, T., Thorgeirsson, S., Zhan, Q., Chen, J., Park, J. H., Lu, P., Hsia, C. C., Wang, N., Xu, Lingling., Lu, H., Zhu, Y., Lu, J., Ni, Z., Zhang, Q., Wu, Y., Liu, G., Wu, Sun, Z., Qu, C., Gail, M. G. 2013. Dramatic reduction of liver cancer incidence in young adults: 28 year follow-up of etiological interventions in an endemic area of China, *Carcinogenesis* 34(8), 1800–1805, <https://doi.org/10.1093/carcin/bgt007>

Turner, P. C.; Flannery, B.; Isitt, C.; Ali, M.; Pestka, J. The role of biomarkers in evaluating human health concerns from fungal contaminants in food. *Nutr Res Rev*, 25(1),162-179. <https://doi.org/10.1017/S095442241200008X>.

Wang, X., Li, L., Zhang, G. 2020. Quercetin protects the buffalo rat liver (BRL-3A) cells from aflatoxin B1-induced cytotoxicity via activation of Nrf2-ARE pathway. *World Mycotoxin Journal* 13(2), 299-312. <https://doi.org/10.3920/WMJ2019.2465>

Wogan, G. N.; Kensler, T. W.; Groopman, J. D. 2012. Present and future directions of translational research on aflatoxin and hepatocellular carcinoma. A review. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess* 29(2), 249-257. <https://doi.org/10.1080/19440049.2011.563370>

Yan, Y., Li, G., Di., Jianghua, L.,, Xiuting, L., Pengjie L., Na. H., Honglun, L, Yongning W. 2020. Recent advances on toxicity and determination methods of mycotoxins in foodstuffs. *Trends in Food Science & Technology* 96, 233-252. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.12.021>.

Zhou, H.,Wang, J., Ma, L., Chen, L., Guo, Y., Zhang, Y., Dai, H., Yu, Y. 2019. Oxidative DNA damage and multi-organ pathologies in male mice subchronically treated with aflatoxin B. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 186. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.109697>.

Zhu, J Q., Zhang, L. S., Hu, X., XIAO, Y., Chen, J.S., Xu, Y. C., Fremy, J., Chu, F. S.

Correlation of dietary aflatoxin B1 levels with excretion of aflatoxin M1 in human urine. Cancer Res, v.47, n. 7, p.1848–1852,1987.

6. CONCLUSÃO

Em síntese, concluímos que a população estudada está sujeita a exposição nutricional a aflatoxinas, achado refletido nos níveis de AFM1 urinária quantificados.

Entretanto, constatamos que não somente os alimentos potencialmente contaminados por aflatoxinas são responsáveis pelos níveis de AFM1 detectados, mas também novos grupos alimentares até aqui não classificados como tal.

Apesar do risco de exposição a aflatoxinas, esse inquérito alimentar associado aos níveis de AFM1 urinária e sinais clínicos, não demonstrou qualquer indício de aflatoxicose.

Por fim, verificamos que micronutrientes podem ser fatores importantes para minimizar os efeitos deletérios das aflatoxinas no organismo humano. Também, mais ensaios moleculares são necessários para avaliar esse efeito protetor observado.

Tratou-se de um estudo pioneiro na região apontando alguns alimentos como o bolo de milho e a goma de tapioca como alimentos potencialmente toxigênicos e potenciais indutores da contaminação por Aflatoxina B1.

7. REFERÊNCIAS

- AHMAD, M. M.; ALI, A.; HAMID, R.; JAVED, S.; ABDIN, M. Z. *Aspergillus parasiticus* from aflatoxin-contaminated peanuts and their differentiation using PCR-RFLP. **Annals of Microbiology**, v. 64, p. 1597-1605, 2014. Disponível em: <https://annalsmicrobiology.biomedcentral.com/articles/10.1007/s13213-014-0803-5>. Acesso em: 06 jun. 2022.
- AKINRINDE, A. S.; ADEBIYI, O. E.; ASEKUN, A. Amelioration of Aflatoxin B1-Induced Gastrointestinal Injuries by Eucalyptus Oil in Rats. **J. Complement. Integr. Med**, v. 17, n. 1, p. 111, 2019. Disponível em: <https://www.degruyter.com/document/doi/10.1515/jcim-2019-0002/html>. Acesso em: 15 jul. 2022.
- ALI, et al. Determination of aflatoxin M1 in urine samples indicates frequent dietary exposure to aflatoxin B1 in the Bangladeshi population. **Int J Hyg Environ Health**, v.220, n. 2, p. 271-281, 2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27914868/>. Acesso em: 15 de Marc. 2023.
- ALI, et al. Occurrence of aflatoxin M1 in urine of rural and urban adults cohorts in bangladesh. **Arch Toxicol**, v. 90, n. 7, p. 1749-1755, 2015. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26391179/>. Acesso em: 15 de Marc. 2023.
- ANDRADE, P. I.; MOREIRA, L. Q.; TEXEIRA, E. M. B. Segurança alimentar e serviços de alimentação-Revisão de literatura. **Brazilian Journal of Development**. v. 6, n.7, p. 42237-42246, 2020. Disponível em: <https://ojs.brazilianjournals.com.br/ojs/index.php/BRJD/article/view/12477>. Acesso em: 05 Apr.2023.
- BAQUIÃO, A. C., DE OLIVEIRA, M. M. M., REIS, T. A., ZORZETE, P., ATAYDE, D. D., CORRÊA, B. Monitoring and Determination of Fungi and Mycotoxins in Stored Brazil Nuts, *Journal of Food Protection*, v.76, n.8, p.1414-1420, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-13-005>. Acesso em: 28 jul. 2024.
- BATTILANI, P.; TOSCANO, P.; VAN DER FELS-KLERX, H. J.; MORETTI, A.; CAMARDO LEGGIERI, M.; BRERA, C.; RORTAIS, A.; GOUMPERIS, T.; ROBINSON, T. Aflatoxin B1 contamination in maize in Europe increases due to

climate change. **Sci. Rep.**, v. 6, n. 24328, p. 1-7 2016. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/srep24328>. Acesso em: 28 jun. 2022.

BENKERROUM, N. Aflatoxins: Producing-Molds, Structure, Health Issues and Incidence in Southeast Asian and Sub-Saharan African Countries. **Int J Environ Res Public Health**. v. 17, n. 4, p. 2020. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7068566/>. Acesso em: 7 jun. 2022.

BENKERROUM, N. Retrospective and Prospective Look at Aflatoxin Research and Development from a Practical Standpoint. **Int. J. Ambiente. Res. Saúde pública**. v. 16, n. 19, p. 3633, 2019. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31569703/>. Acesso em: 7 jun. 2022.

BRASIL. Ministério da Saúde. ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Instrução normativa nº 88 de 26 de março de 2021, que estabelece os limites máximos tolerados (LMT) de contaminantes em alimentos. Diário Oficial da União, Poder Executivo, Brasília, DF, 31 de mar. 2021.

BRASIL. Ministério da Saúde. ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Resolução de Diretora Colegiada- RDC nº 222, de 28 de março de 2018. Regulamenta as Boas Práticas de Gerenciamento dos Resíduos de Serviços de Saúde e dá outras providências. Diário Oficial da União, Poder Executivo, Brasília, DF, 08 de mai. 2018.

CHAO, T. C.; MAXWELL, S. M.; WONG, S. Y. Um surto de aflatoxicose e envenenamento por ácido bórico na Malásia: Um estudo clínico-patológico. **J. Pathol**, v. 164, n. 3, p. 225-233, 1991. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/path.1711640307>. Acesso em: 18 jul. 2022.

CHOI, S.Y.; KIM, T.H.; HONG, M. W.; PARK, T. S.; LEE, H.; LEE, S. J. Transcriptomic Alterations Induced by Aflatoxin B1 and Ochratoxin A in LMH Cell Line. **Poult. Sci**, v. 99, n. 11, p. 5265-5274, 2020. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7647754/>. Acesso em: 15 jul. 2022.

COPOOCK, R. W.; CHRISTIAN, R.; JACOBSEN, J. B. Aflatoxins. **Veterinary Toxicology**. p. 983-994, 2018. Disponível em:

https://www.researchgate.net/publication/323618581_Aflatoxins. Acesso em: 15 de jun. 2022.

DABUO, B.; WESOME AVOGO, E.; KOOMSON, O. G.; AKANTIBILA, M.; GBATI, A. D. 2022. Aflatoxins: Toxicity, Occurrences and Chronic Exposure. IntechOpen. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.105723>. Acesso em: 2 de mai. 2024.

DEY, D. K.; KANG, S. C. Aflatoxin B1 Induces Reactive Oxygen Species-Dependent Caspase-Mediated Apoptosis in Normal Human Cells, Inhibits Allium Cepa Root Cell Division, and Triggers Inflammatory Response in Zebrafish Larvae. **Sci Total Environ**, v. 737, n. 1, 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32512299/>. Acesso em: 17 jul. 2022.

EL-SAYED, M. H.; AHMED, A. A. N.; ABDELLATIF, N. A.; ANANI, M.; FAREED, S. A.; EL-SHAFEI, D. A.; ALAA EL-DIN, E. A. Amelioration of Pulmonary Aflatoxicosis by Green Tea Extract: An in Vivo Study. **Toxicol**, v. 15, n. 189, p. 48-55, 2021. Disponível em: [https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0041-0101\(20\)30453-0](https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0041-0101(20)30453-0). Acesso em: 10 jul. 2022.

FERRI, et al. Association between Urinary Levels of Aflatoxin and Consumption of Food Linked to Maize or Cow Milk or Dairy Products. **Int. J. Environ. Res. Public Health**, v. 17, n. 7, p. 251, 2020. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1660-4601/17/7/2510#cite>. Acesso em: 28 jun. 2022.

FOERSTER et al. A preliminary study on aflatoxin exposure from urine biomonitoring in Chile. **Mycotoxin Res**, v. 38, n. 3, p185-191, 2022. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35641685>. Acesso em 15 de Mar. 2023.

FRANCO, et al. Mycotoxin exposure assessment and risk characterization using food occurrence data and urinary biomarkers in Brazil. **Food and Chemical Toxicology**, v.128, p. 21-34, 2019. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0278691519301747>. Acesso em: 15 de Marc. 2023.

GALLO, P. et al. Contamination by Aflatoxins B/G in Food and Commodities Imported in Southern Italy from 2017 to 2020: A Risk-Based Evaluation. **Toxins**, v. 13,

n. 6, p. 2021. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2072-6651/13/6/368/htm>. Acesso em: 10 jun. 2022.

GERDING, J.; CRAMER, B.; HUMPF, H. U. Determination of mycotoxin exposure in Germany using an LC-MS/MS multibiomarker approach. **Mol Nutr Food Res**, v. 58, n. 12, p. 2358-2368, 2014. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/mnfr.201400406>. Acesso em 20 jul. 2022.

GROOPMAN, J. D.; HALL, A. J.; WHITTLE, H.; HUDSON, G. J.; WOGAN, G. N.; MONTESANO, R.; WILD, C. P. Molecular dosimetry of aflatoxin-N7-guanine in human urine obtained in The Gambia, West Africa. **Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev**, v. 1, n. 3, p. 221–227, 1992. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1339082/>. Acesso em: 28 jun. 2022.

HERNÁNDEZ-RAMÍREZ, J. O.; NAVA-RAMÍREZ, M. J.; MERINO-GUZMÁN, R.; TÉLLEZ-ISAÍAS, G.; VÁZQUEZ-DURÁN, A.; MÉNDEZ-ALBORES, A. The Effect of Moderate-Dose Aflatoxin B1 and *Salmonella Enteritidis* Infection on Intestinal Permeability in Broiler Chickens. **Mycotoxin Res**, v. 36, n. 1, p. 31-39, 2020. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12550-019-00367-7>. Acesso em: 15 jul. 2022.

HESHMATI, A.; ZOHREVAND, T.; KHANEGHAH, A. M.; MOZAFFARI, N. A. S.; SANT'ANA, A. S. Co-occurrence of aflatoxins and ochratoxin A in dried fruits in Iran: Dietary exposure risk assessment. **Food and Chemical Toxicology**, v. (106), p.202-208, 2017, Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.05.046>. Acesso em 29 de Agost. 2024.

HSIEH, D. P. H. A. W.; WONG, J. J. **The Toxicology of Aflatoxins**, 1ª ed.; Elsevier: Nova York, NY, EUA, p. 73-88, 1993.

International Agency for Research on Cancer. Chemical Agents and Related Occupations; IARC Press: Lyon, France, p. 225-248, 2012.

JAGER, A. V.; TONIN, V. F. G.; BAPTISTA, G. Z.; SOUTO, P. C. M. C.; OLIVEIRA, C. A. F. Assessment of aflatoxin exposure using serum and urinary biomarkers in São Paulo, Brazil: A pilot study. **Int. J. Hyg. Environ. Health**, v. 219, n. 3, p. 294–300, 2016. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1438463915001601?via%3Dihub>. Acesso em: 28 jun. 2022.

JIANG, Y.; HANSEN, P. J.; XIAO, Y.; AMARAL, T. F.; VYAS, D.; ADESOGAN, A. T. Aflatoxin Compromises Development of the Preimplantation Bovine Embryo through Mechanisms Independent of Reactive Oxygen Production. **J. Dairy Sci**, v. 102, n. 11, p. 10506-10513, 2019. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022030219308082>. Acesso em: 17 jul. 2020.

KAMALA, A.; SHIRIMA, C.; JANI, B.; BAKARI, M.; SILLO, H.; RUSIBAMAYILA, N.; DE SAEGER, S.; KIMANYA, M.; GONG, Y. Y.; SIMBA, A. Surto de uma aflatoxicose aguda na Tanzânia durante 2016. **Micotoxina Mundial Journal**, v. 11, n. 3, p. 311-320, 2018. Disponível em: <https://www.wageningenacademic.com/doi/10.3920/WMJ2018.2344>. Acesso em: 18 jul. 2022.

KATSURAYAMA, A.M.; MARTINS, L.M.; IAMANAKA, B.T.; FUNGARO, M.H.P.; SILVA, J.J.; FRISVAD, J.C.; PITT, J.I.; TANIWAKI, M.H. Occurrence of *Aspergillus* section *Flavi* and aflatoxins in Brazilian rice: From field to market. **Int. J. Food Microbiol**, v. (266), p. 213-. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.12.008>. Acesso em: 29 Ago. 2024.

KUMAGAI, S.; NAKAJIMA, M.; TABATA, S.; ISHIKURO, E.; TANAKA, T.; NORIZUKI, H.; ITOH, Y.; AOYAMA, K.; FUJITA, K.; KAI, S.; SATO, T.; SAITO, S.; YOSHIIKE, N.; SUGITA-KONISHI, Y. Aflatoxin and ochratoxin A contamination of retail foods and intake of these mycotoxins in Japan. **Food Addit. Contam. - Part A Chem. Anal. Control. Expo. Risk Assess**, v. (25), 1101–1106, Disponível em: <https://doi.org/10.1080/02652030802226187>.

LEONG, Y. H.; LATIFF, A. A.; AHMAD, N. I.; ROSMA, A. Exposure measurement of aflatoxins and aflatoxin metabolites in human body fluids. A short review. **Mycotoxin Res**, v. 28, n. 2, p. 79–87, 2012. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12550-012-0129-8>. Acesso em: 28 jun. 2022.

MALVIYA, R.; BANSAL, V.; PAL, O. P.; SHARMA, P. K. High performance liquid chromatography: A short review. **J. Glob. Pharma Technol**, v. 2, n. 5, p. 22-266,

2010. Disponível em: https://www.researchgate.net/profile/Rishabha-Malviya/publication/235987484_High_performance_liquid_chromatography_A_short_review/links/02e7e5153e680408ac000000/High-performance-liquid-chromatography-A-short-review.pdf. Acesso em: 19 jul. 2022.

MANOEL MARTINS, L. Ocorrência de fungos e aflatoxinas, cinética da degradação de aflatoxinas durante a torração e modelagem probabilística do risco de exposição pelo consumo de amendoim. Campinas, 2015.

MARTINS, M.; PACHECO, A. M.; LUCAS, A. C. S.; ANDRELLO, A.; APPOLONI, C.; JUNIOR, J. Brazil nuts: Determination of natural elements and aflatoxin. **Acta Amazon**, v. 42, n.1, p.157–164, 2012. <https://doi.org/10.1590/S0044-59672012000100018>.

MENEZES A.C.P., SOUSA, W. C., OLIVEIRA FILHO, J. G., CASTRO, C. F. S. Efecto antifúngico por el aceite esencial de las hojas y tallos de *Schinus molle* sobre *Aspergillus* sp. **Revista Cubana de Farmacia**, v. 53, n.3, p. e399, 2020. Disponível em: <https://revfarmacia.sld.cu/index.php/far/article/view/399/355>. Acesso em: 05 Apr. 2023.

MUPUNGA, I.; MNGQAWA, P.; KATERERE, D.R. Peanuts, Aflatoxins and Undernutrition in Children in Sub-Saharan Africa. **Nutrients**, v.9, n.1287, 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5748738/>. Acesso em: 05 Apr. 2023.

MYKKÄNEN, H.; ZHU, H.; SALMINEN, E.; JUVONEN, R.O.; LING, W.; MA, J.; POLYCHRONAKI, N.; KEMILÄINEN, H.; MYKKÄNEN, O.; SALMINEN, S.; EL-NEZAMI, H. Fecal and urinary excretion of aflatoxin B1 metabolites (AFQ1, AFM1 and AFB-N7-guanine) in young Chinese males. **Int J Cancer**, v. 15, n. 6, p. 879-84, 2005. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ijc.20951>. Acesso em: 28 jun. 2022.

NAKAMAE, D. D. et al. Exame de urina: todo o rigor na colheita de amostras. **Rev. Esc. Enf. USP**, v. 14, n. 1, p. 51-57, 1980. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/reeusp/a/bCcF5fsyk9y6SJDRKkcV6tC/abstract/?lang=pt>. Acesso em: 25 out. 2022.

OSTADRAHIMI, A.; ASHRAFNEJAD, F.; KAZEMI, A.; SARGHEINI, N.; MAHDAVI, R.; FARSHCHIAN, M.; MAHLUJI, S. Aflatoxin in raw and salt-roasted nuts (pistachios, peanuts and walnuts) sold in markets of Tabriz, Iran. **Jundis hapur J Microbiol**, v. 7, n. 1, p. 8674, 2014. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4138677/>. Acesso em: 30 jun. 2022.

OWUMI, S.; NAJOPHE, E. S.; FAROMBI, E. O.; OYELERE, A. K. Gallic Acid Protects against Aflatoxin B1-Induced Oxidative and Inflammatory Stress Damage in Rats Kidneys and Liver. **J. Food Biochem**, v. 44, n. 8, 2020. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/jfbc.13316>. Acesso em: 10 jun. 2022.

PACHECO, A. M.; SCUSSEL, V. M. Selenium and aflatoxin levels in raw Brazil nuts from the Amazon basin. **J Agric Food Chem**, v.55(26), p.1087-11092, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/jf072434k>. Acesso em: 5 de mai. 2024.

PANAMERICANA DE LA SALUD. Micotoxinas Washington, 1983. Disponível em: <https://iris.paho.org/handle/10665.2/38501?locale-attribute=es>. Acesso em: 10 jun. 2022.

PANG, V. F.; CHIANG, C. F.; CHANG, C.C. The in Vitro Effects of Aflatoxin B1 on Physiological Functions of Swine Alveolar Macrophages. **Vet. Med. Sci**, v. 6, n. 4, p. 919-925, 2020. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7738744/>. Acesso em: 10 jun. 2022.

PARK, S.; LEE, J. Y.; YOU, S.; SONG, G.; LIM, W. Neurotoxic Effects of Aflatoxin B1 on Human Astrocytes in Vitro and on Glial Cell Development in Zebrafish in Vivo. **J. Hazard**, v. 15, n. 386, 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31787402/>. Acesso em: 12 jun. 2022.

PEREIRA, K.C.; SANTOS, C.F. Micotoxinas e seu potencial carcinogênico. Ensaio e Ciências Biológicas, Ágrarias e da Saúde, Campo Grande, v.15, n.4, p 147-165, 2011. Disponível em: <https://ensaioseciencia.pgsskroton.com.br/article/view/2868>. Acesso em: 05 Apr. 2023.

PICKOVA, D.; OSTRY, V.; MALIR, F. A Recent Overview of Producers and Important Dietary Sources of Aflatoxins. **Toxins**, v. 13, n. 3, p 186, 2021. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2072-6651/13/3/186/htm>. Acesso em: 10 jul. 2022.

PIEREZAN, F. Aflatoxicoses em Bovinos. Santa Maria, 2013.

PU, J.; YUAN, Q.; YAN, H.; TIAN, G.; CHEN, D.; HE, J.; ZHENG, P.; YU, J.; MAO, X.; HUANG, Z.; LUO, J.; LUO, Y.; YU, B. Effects of Chronic Exposure to Low Levels of Dietary Aflatoxin B1 on Growth Performance, Apparent Total Tract Digestibility and Intestinal Health in Pigs. **Animals**, v. 11, n. 2, p. 336, 2021. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7911249/>. Acesso em 15jul. 2022.

REIS, T. A.; OLIVEIRA, T. D.; BAQUIÃO, A; C.; GONÇALVES, S. S.; ZORZETE, P.; CORRÊA B. Mycobiota and mycotoxins in Brazil nut samples from different states of the Brazilian Amazon region. **Int J Food Microbiol**, v.159, n.2, p. 61-68, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.08.005>. Acesso em: 5 de mai.2024.

RUSHING, B. R.; SELIM, M. I. Aflatoxin B1: A review on metabolism, toxicity, occurrence in food, occupational exposure, and detoxification methods. **Food Chem Toxicol**. V. 124, p 81-100, 2019. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30468841/>. Acesso em: 10 jun. 2022.

SÁNCHEZ, R. I.; GARCÍA, R. L.; LOR, G. E.; ALBARRÁN, M. I. Simultaneous determination of aflatoxins B1, B2, G1 and G2 in commercial rices using immunoaffinity column clean-up and HPLC-MS/MS. **Food Chemistry**, v. 395, p. 19, 2022. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35820271/>. Acesso em: 05 jul. 2022.

SANTIAGO, M.; STROBEL, S. Thin layer chromatography. In *Methods in Enzymology*; Academic Press: Cambridge, MA, USA, 2013; Volume 533, pp. 303–324. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B978-0-12-420067-8.00024-6>. Acesso em: Acesso em: 20 jul. 2022.

SANTINI, A., RITIENI, A. Aflatoxins: risk, exposure and remediation. In: RAZZAGHI-ABYANEH, M., editor. Aflatoxins - Recent Advances and Future Prospects [Internet]. London: Intech Open; 2013. Disponível em: <https://www.intechopen.com/chapters/39957>. Acesso em: 07 jun. 2022.

SCHWARTZBORD, J.; SEVERE, L; BROWN, D. Detection of trace aflatoxin M1 in human urine using a commercial ELISA followed by HPLC. **Biomarkers**, v. 22, n.1.

2016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27319431/>. Acesso em: 29 Mrc. 2023.

SHABEER, S.; ASAD, S.; JAMAL, A.; ALI, A. Aflatoxin Contamination, Its Impact and Management Strategies: An Updated Review. *Toxins*, v. 14, n.5, p. 307, 2022. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2072-6651/14/5/307/htm>. Acesso em: 20 jul. 2022.

SILVA CRUZ, J.V.D. Ocorrência de aflatoxinas e fumonisinas em produtos à base de milho e milho utilizado como ingrediente de ração para animais de companhia, comercializadas na região de Pirassununga, Estado de São Paulo. São Paulo, 2010. Disponível em: <https://teses.usp.br/teses/disponiveis/74/74131/tde-29092010-141119/pt-br.php>. Acesso em: 05 Apr. 2023.

SINGH, et., al. Untangling the multi-regime molecular mechanism of verbenol-chemotype *Zingiber officinale* essential oil against *Aspergillus flavus* and aflatoxin B₁. *Sci Rep*, v. 11, n. 6832, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-021-86253-8>. Acesso em: 10 jun.2022.

ŚLIŻEWSKA, K.; CUKROWSKA, B.; SMULIKOWSKA, S.; CIELECKA-KUSZYK, J. The Effect of Probiotic Supplementation on Performance and the Histopathological Changes in Liver and Kidneys in Broiler Chickens Fed Diets with Aflatoxin B₁. *Toxins*, v. 11, n. 2, p. 112, 2019. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2072-6651/11/2/112>. Acesso em: 10 jun. 2022.

STUBBLEFIELD, R. D.; CAIS, A. C.; RICARDO, J. L.; SHOTWELL, O. L. Fate of aflatoxins in tissues, fluids and excrements from cows dosed orally with aflatoxin B₁. *Sou. J. Vet. Res*, v. 44, p. 1750-1752, 1983.

SULAIMAN, S. H.; JAMALUDDIN, R; SABRAN, M. R. Association between Urinary Aflatoxin (AFM₁) and Food Consumption among Adults in Hulu Langat District, Selangor, Malaysia. *Nutrients*, v.10, n. 4, p. 460, 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29642443/>. Acesso em: 15 de Jan. 2023.

TADEE, A.; MAHAKUNAKORN, P.; PORASUPHATANA, S. Oxidative Stress and Genotoxicity of Co-Exposure to Chlorpyrifos and Aflatoxin B₁ in HepG2 Cells. *Toxicol. Ind. Health*, v. 36, n. 5, p. 336-345, 2020. Disponível em: https://journals.sagepub.com/doi/10.1177/0748233720928169?url_ver=Z39.88-

2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub%20%20pubmed. Acesso em: 17 jul. 2022.

THIRUMALA-DEVI, K.; MAYO, M. A.; HALL, A. J.; CRAUFURD, P. Q.; WHEELER T. R.; WALIYAR, F.; SUBRAHMANYAM, A.; REDDY, D. V. Development and application of an indirect competitive enzyme-linked immunoassay for aflatoxin M1 in milk and milk-based confectionery. **J Agric Food Chem**, v. 50, n. 4, p. 933-937, 2002. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/jf011139b>. Acesso em: 02 ago. 2022.

TURNER, P. C.; FLANNERY, B.; ISITT, C.; ALI, M.; PESTKA, J. The role of biomarkers in evaluating human health concerns from fungal contaminants in food. **Nutr Res Rev**, v. 25, n. 1, p. 162-179, 2012. Disponível em: <https://www.cambridge.org/core/journals/nutrition-research-reviews/article/role-of-biomarkers-in-evaluating-human-health-concerns-from-fungal-contaminants-in-food/A2D6FDA161C6AAF949F12208D64F15A4>. Acesso em: 02 Ago. 2022.

UMESHA, S.; MANUKUMAR, H. M.; CHANDRASEKHAR, B.; SHIVAKUMARA, P.; KUMAR, J. S.; RAGHAVA, S.; AVINASH, P.; SHIRIN, M.; BHARATHI, T. R.; RAJINI, S. B.; NANDHINI, M.; VINAYA, R. G. G.; SHOBHA, M.; PRAKASH, H. S. Aflatoxins and food pathogens: impacto biologicamente ativo aflatoxina e seu controle. **J Sci Food Agric**, v. 97, n. 6, p. 1698-1707, 2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27859342/>. Acesso em: 03 de Ago. 2022.

WANG, X.; LI, L.; ZHANG, G. Quercetin Protects the Buffalo Rat Liver (BRL-3A) Cells from Aflatoxin B1-Induced Cytotoxicity via Activation of Nrf2-ARE Pathway. **World Mycotoxin J**, v.13, n. 2, p. 299-312, 2020. Disponível em: <https://www.wageningenacademic.com/doi/pdf/10.3920/WMJ2019.2465>. Acesso em: 17 jul. 2022.

WILD, C. P.; GONG, Y. Y. Mycotoxins and human disease: a largely ignored global health issue. **Carcinogenesis**, v. 31, n. 1, p. 71-82, 2010. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2802673/>. Acesso em: 02 Ago. 2022.

WILLIAMS, J. H.; PHILLIPS, T. D.; JOLLY, P. E.; STILES, J. K.; JOLLY, C. M.; AGGARWAL, D. Aflatoxicose humana em países em desenvolvimento: Uma revisão de toxicologia, exposição, potenciais consequências para a saúde e intervenções. **Sou.**

J. Clin. Nutr, v. 80, n. 5, p. 1106-1122. Disponível em: <https://academic.oup.com/ajcn/article-lookup/doi/10.1093/ajcn/80.5.1106>. Acesso em: 17 jul. 2022

WOGAN, G. N.; KENSLER, T. W.; GROOPMAN, J. D. Present and future directions of translational research on aflatoxin and hepatocellular carcinoma. A review. **Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess**, v. 29, n. 2, p. 249-257, 2012. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21623489/>. Acesso em: 02 Ago. 2022.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Aflatoxins; WHO: Geneva, Switzerland, 2018. Disponível em: https://www.who.int/foodsafety/FSDigest_Aflatoxins_EN.pdf. Acesso em: 17 jul. 2022.

WU, K.; JIA, S.; ZHANG, J.; ZHANG, C.; WANG, S.; RAJPUT, S. A.; SUN, L.; QI, D. Transcriptomics and flow cytometry reveals the cytotoxicity of aflatoxin B₁ and aflatoxin M₁ in bovine mammary epithelial cells. **Ecotoxicol Environ Saf**, v. 209, 2021. Disponível em: [https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0147-6513\(20\)31659-6](https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0147-6513(20)31659-6). Acesso em: 18 jul. 2022.

ZHOU, H.; WANG, J.; MA, L.; CHEN, L.; GUO, T.; ZHANG, Y.; DAI, H.; YU, Y. Oxidative DNA Damage and Multi-Organ Pathologies in Male Mice Subchronically Treated with Aflatoxin B₁. **Ecotoxicol Environ Saf**, v. 30, n. 186, p. 1-10, 2019. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31629905/>. Acesso em: 10 jun. 2022.

ZHU, J Q.; ZHANG, L. S.; HU, X.; XIAO, Y.; CHEN, J.S.; XU, Y. C.; FREMY, J.; CHU, F. S. Correlation of dietary aflatoxin B₁ levels with excretion of aflatoxin M₁ in human urine. **Cancer Res**, v.47, n. 7, p.1848–1852,1987.



APÊNDICE A-TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO

Poder Executivo
Ministério da Educação
Universidade Federal do Amazonas
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

O(A) Sr(a) está sendo convidado a participar do projeto de pesquisa **HÁBITOS ALIMENTARES E NÍVEIS URINÁRIOS DE AFLATOXINA M1 EM INDIVÍDUOS ADULTOS DE MANAUS, AMAZONAS**, cujo pesquisador responsável é NAYRA NASCIMENTO AQUINO. Os objetivos do projeto são determinar os níveis urinários de AFM1 em indivíduos adultos residentes na região amazônica; realizar um levantamento das possíveis vias de exposição nutricional e correlacionar com os níveis urinários de AFM1; associar a presença de aflatoxinas com o histórico de doenças hepáticas, renais e intoxicações agudas; analisar a relação entre o consumo de alimentos, suplementos ou medicamentos considerados protetores para aos efeitos deletérios das aflatoxinas.

O(A) Sr(a) está sendo convidado para esta pesquisa, pois a investigação da exposição humana por subprodutos de origem fúngica são úteis para conhecer os níveis de segurança alimentar e a presença desta no organismo humano.

O(A) Sr(a). tem de plena liberdade de recusar-se a participar ou retirar seu consentimento, em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma para o tratamento que recebe nesta unidade de ensino (Faculdade de Ciências Farmacêuticas/UFAM).

Caso aceite participar sua participação consiste em fornecer dados de seus hábitos alimentares, por meio de um questionário de frequência alimentar (QFA) e de uma amostra de urina simples, coletada pelo próprio participante.

Toda pesquisa com seres humanos envolve riscos aos participantes. Nesta pesquisa os riscos para o(a) Sr.(a) são inerentes ao ato da coleta da urina, o que pode gerar contato com possíveis micro-organismo da própria microbiota. Quanto a desconfortos, os mesmos são os comuns dos exames laboratoriais de rotina, que consiste no ato de coletar o jato da urina, que pode vir a extravasar do frasco coletor e sujar as mãos. Para minimizar o risco biológico, recomendamos a lavagem das mãos com água e sabão, após a coleta da urina. Quanto ao vazamento de informações acerca de dados do participante que possa resultar em sua identificação, salienta-se que serão tomadas medidas para manter todos os dados dos participantes sob sigilo e anonimato. Ressalta-se ainda que o processamento dos dados

será realizado em ambiente restrito, restringindo o acesso a esses dados apenas ao pesquisador responsável direto por esta pesquisa.

Também são esperados os seguintes benefícios com esta pesquisa como desvendar e/ou entender casos de surtos por intoxicações alimentares, bem como futuramente entender os aspectos clínicos das aflatoxicoses.

Se julgar necessário, o(a) Sr(a) dispõe de tempo para que possa refletir sobre sua participação, consultando, se necessário, seus familiares ou outras pessoas que possam ajudá-los na tomada de decisão livre e esclarecida.

Garantimos ao(à) Sr(a), e seu acompanhante quando necessário, o ressarcimento das despesas devido sua participação na pesquisa, ainda que não previstas inicialmente., como o ressarcimento de gastos referente a transporte.

Também estão assegurados ao(à) Sr(a) o direito a pedir indenizações e a cobertura material para reparação a dano causado pela pesquisa ao participante da pesquisa. Asseguramos ao(à)Sr(a) o direito de assistência integral gratuita devido a danos diretos/indiretos e imediatos/tardios decorrentes da participação no estudo ao participante, pelo tempo que for necessário.

Garantimos ao(à) Sr(a) a manutenção do sigilo e da privacidade de sua participação e de seus dados durante todas as fases da pesquisa e posteriormente na divulgação científica

O(A) Sr(a). pode entrar em contato com o pesquisador responsável Nayra Nascimento Aquino a qualquer tempo para informação adicional no endereço Av. General Rodrigo Otávio Jordão Ramos, Nº 6200, Bairro Coroado 1, Manaus, CEP: 69080-900, e pelo email: nayra.ita@gmail.com.

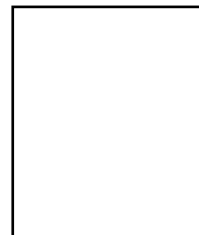
O(A) Sr(a). também pode entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal do Amazonas (CEP/UFAM) e com a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP), quando pertinente. O CEP/UFAM fica na Escola de Enfermagem de Manaus (EEM/UFAM) - Sala 07, Rua Teresina, 495 – Adrianópolis – Manaus – AM, Fone: (92) 3305-1181 Ramal 2004, E-mail: cep@ufam.edu.br. O CEP/UFAM é um colegiado multi e transdisciplinar, independente, criado para defender os interesses dos participantes da pesquisa em sua integridade e dignidade e para contribuir no desenvolvimento da pesquisa dentro de padrões éticos.

Este documento (TCLE) será elaborado em duas VIAS, que serão rubricadas em todas as suas páginas, exceto a com as assinaturas, e assinadas ao seu término pelo(a) Sr(a)., ou por seu representante legal, e pelo pesquisador responsável, ficando uma via com cada um.

CONSENTIMENTO PÓS-INFORMAÇÃO

Li e concordo em participar da pesquisa.

Manaus, ____/____/____



IMPRESSÃO DACTILOSCÓPICA

Assinatura do Participante

Assinatura do Pesquisador Responsável

APÊNDICE B: QUESTIONÁRIO DE FREQUÊNCIA ALIMENTAR (QFA)



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Código do voluntário
Nº XXX000

Data: ____/____/____

Questionário de Frequência e Recordatório Alimentar
AS RESPOSTAS SERÃO TRATADAS DE FORMA ANÔNIMA E CONFIDENCIAL

Instruções: Por favor responder com X o questionário abaixo.

PARTE 1: Conhecendo o participante		
1.	Identificação (Iniciais do nome e número de identificação) (ex: XXX000)	
2. Idade:	3. Peso:	4. Altura:
5.	Condições pré-existentes	Sim Não Diabetes: ☐ ☐ Patologia hepática: ☐ ☐ Patologia Renal: ☐ ☐ Se sim para alguma patologia, por favor cite: Sim Não Intolerância ou Alergia alimentar: ☐ ☐ Está usando algum medicamento? ☐ ☐ Se sim para algum para algum medicamento, por favor cite: Está usando alguma dessas vitaminas? Vitamina C ☐ Zinco Quelato ☐ Vitamina D ☐ Selênio ☐ Polivitamínico ☐ Complexo B ☐ Coenzima Q10 ☐ Magnésio quelato ☐ Ômega 3 ☐ Outros: Frequentemente apresenta os seguintes episódios? Naúseas ☐ Vômitos ☐ Tremores musculares ☐ Sangue nas fezes ☐ Dor abdominal ☐ Febre ☐ Diarreia ☐

PARTE 2

QUESTIONÁRIO DE FREQUÊNCIA ALIMENTAR (QFA)

Tipo de dieta: ☐ livre ☐ vegetariana ☐ vegana									
Consumo de alimentos orgânicos: ☐ sim ☐ não									
Com que frequência você consome por SEMANA os seguintes alimentos?									
FREQUÊNCIA		Número de vezes do consumo por semana							
		1	2	3	4	5	6	7	8 ou mais
Produtos à base de milho	Cereais de milho								
	Cuscuz								
	Pipoca								
	Bolo de milho								
	Milho cozido								
Produtos à base de arroz e cereais	Arroz								
	Arroz Integral								
	Barra de cereais								
	Granola simples ou mista								
Nozes	Castanha-do-Brasil (amêndoa ou pedaços)								
	Castanha de caju								
	Amendoim								
	Derivados do amendoim (pasta, paçoca, etc)								
	Mix de nozes anteriores								
Especiarias	Pimenta do reino								
	Páprica								
	Cominho								
	Gengibre								
Leite e derivados	Queijo fresco								
	Leite industrializado								
	Leite bovino fresco								
	Manteiga								
Alimentos regionais	Goma de Tapioca e seus derivados								
	Farinha de mandioca (d'água, branca ou ovinha)								
	Tucumã								
	Açaí								
	Batata-doce								
	Cará roxo								
	Macaxeira cozida								
Proteína animal	Peixe								
	Frango								
	Carne Bovina								
Derivados do trigo	Pão refinado (tipo francês, forma, bola)								
	Pão integral								
	Biscoitos/bolachas								
Bebidas diversas	Cevada								
	Café								
	Cerveja								
	Vinho								
	Bebida a base de guaraná em pó								
Frutas	Uva-passa								

secas	Ameixa-seca								
	Mix de frutas secas								
	Damasco-seco								
Recordatório alimentar de 24 horas:									
Refeição/ Horário	Alimentos/Preparações	Quantidades (medidas caseiras)							
CAFÉ DA MANHÃ:									
ALMOÇO:									
JANTAR:									
CEIA:									
Outra refeição:									

APÊNDICE C: RECOMENDAÇÕES AO PARTICIPANTE PARA COLETA DA AMOSTRA DE URINA

Antes de iniciar o procedimento, realizar a lavagem das mãos com água corrente e sabão.

Higienize a genitália com água e sabão (conforme as ilustrações a baixo).

Enxugue com papel toalha.

Comece a urinar no vaso sanitário.

Sem interromper a micção, pegue o frasco coletor e colete aproximadamente 2 dedos de urina.

Despreze o restante de urina no vaso sanitário.

Feche o frasco coletor e leve ao local da coleta imediatamente.



Fonte: <https://www.labivangarcia.com.br/instrucoes-de-coleta>



Fonte: <https://www.labivangarcia.com.br/instrucoes-de-coleta>

APÊNDICE D: CARTA DE ANUÊNCIA PARA UTILIZAÇÃO DO LABORATÓRIO DE PESQUISA, BIOPHAR/UFAM



Poder Executivo
Ministério da Educação
Universidade Federal do Amazonas
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas



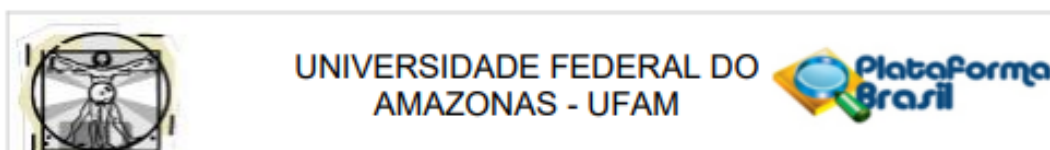
TERMO DE ANUÊNCIA

Declaramos para os devidos fins que estamos de acordo com a execução do projeto de pesquisa intitulado "HÁBITOS ALIMENTARES E NÍVEIS URINÁRIOS DE AFLATOXINA MI EM INDIVÍDUOS ADULTOS DE MANAUS, AMAZONAS", sob a coordenação e a responsabilidade do(a) pesquisador(a) Prof(a). Dr. Emerson Silva Lima, a ser executado no laboratório de pesquisa de Atividade Biológica, Biophar, localizado na Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Assumimos também o compromisso de apoiar o desenvolvimento da referida pesquisa a ser realizada neste laboratório, no período de junho de 2022 a dezembro de 2023, após a devida aprovação no Sistema CEP/CONEP.

Manaus, 02 de Novembro de 2022.

Emerson Silva Lima
Pesquisador em produtividade 1D do CNPq
Laboratório de Atividade Biológica
Faculdade de Ciências Farmacêuticas-UFAM

APÊNDICE E: APROVAÇÃO DO PROJETO DE PESQUISA PELO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA/UFAM.



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: HÁBITOS ALIMENTARES E NÍVEIS URINÁRIOS DE AFLATOXINA M1 EM INDIVÍDUOS ADULTOS DE MANAUS, AMAZONAS

Pesquisador: NAYRA NASCIMENTO AQUINO

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 64129022.4.0000.5020

Instituição Proponente: Fundação Universidade do Amazonas

Patrocinador Principal: FUND COORD DE APERFEICOAMENTO DE PESSOAL DE NIVEL SUP

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 5.792.836

Apresentação do Projeto:

Informações retiradas do documento PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_2009815.pdf
23/11/2022 15:34:06:

As aflatoxinas são micotoxinas altamente tóxicas produzidas por fungos do gênero *Aspergillus*. As aflatoxinas são produzidas principalmente por *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus*, mas algumas outras espécies, tais como *A. nomius*, *A. pseudotamarii*, *A. parvisclerotigenus*, *A. bombycis*, *A. ochraceoroseus*, *A. rambellii*, *Emericella astellata* e *E. venezuelensis* de *Nidulans* produzem esse tipo de micotoxina (AHMAD et al., 2014). Esses fungos são conhecidos por se desenvolverem naturalmente em produtos alimentícios, o que torna os seres humanos os principais expostos a aflatoxinas através da ingestão de alimentos (INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER, 2012).

Deste modo, a presença de aflatoxinas em alimentos é considerada um risco real e grave para os consumidores por sua toxicidade (SANTINI; RITIENI 2013), caracterizando-se como as toxinas microbianas de maior preocupação para a saúde pública (BENKERROUM, 2019). Os alimentos mais contaminados são amendoins, nozes com casca, milho, arroz, cereais, frutas secas, especiarias e óleos derivados de sementes de hortaliças. Como muitas dessas sementes também são usadas para alimentar animais, a contaminação secundária também é possível através do leite e produtos lácteos; entretanto, não há acúmulo de aflatoxinas na carne, pois seu catabolismo é bastante

Endereço: Rua Teresina, 4950

Bairro: Adrianópolis

CEP: 69.057-070

UF: AM

Município: MANAUS

Telefone: (92)3305-1181

E-mail: cep.ufam@gmail.com



UNIVERSIDADE FEDERAL DO
AMAZONAS - UFAM



Continuação do Parecer: 5.792.836

rápido (HSIEH; WONG, 1993; STUBBLEFIELD et al., 1983).

Até o momento foram identificados mais de 18 tipos diferentes de aflatoxinas, mas as mais comuns e importantes são as aflatoxinas B1 e B2 (e seus subprodutos metabólicos, as aflatoxinas M1 e M2) e as aflatoxinas G1 e G2. Estas são as responsáveis pela contaminação de alimentos e rações. As quatro principais aflatoxinas são chamadas de B1, B2, G1 e G2 em virtude sua fluorescência sob luz UV (azul ou verde, respectivamente) e mobilidade cromatográfica relativa durante a cromatografia em camada delgada. A aflatoxina B1 e B2 são produzidas por *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*. Enquanto as aflatoxinas G1 e G2 são produzidas exclusivamente por *Aspergillus parasiticus* (SANTINI; RITIENI 2013).

Dentre as aflatoxinas, a AFB1 é a mais estudada e mais comumente relacionada à aflatoxicose aguda e crônica, carcinogenicidade, teratogenicidade, genotoxicidade e imunotoxicidade (BENKERROUM, 2020) sendo a forma mais abundante em alimentos e rações (ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD, 1983). Enquanto isso, a aflatoxina M1 é de especial preocupação para a segurança dos produtos lácteos, porque geralmente é transportada no leite de animais lactantes alimentados com alimentos contaminados com aflatoxina B1, além de sua alta toxicidade e potencial carcinogenicidade em humanos (BENKERROUM, 2019). No entanto, as outras aflatoxinas não devem ser negligenciadas devido à sua toxicidade intrínseca, uma vez que podem facilmente se reverter para o AFB1 mais potente (BENKERROUM, 2020). Diante do impacto da contaminação de determinados alimentos para consumo humano por aflatoxinas e sua relação com a patogênese de doenças hepáticas, cancerígenas e toxicoses agudas ou crônicas, estudos complementares são necessários para investigar níveis de aflatoxinas em matrizes biológicas. Partindo desse pressuposto, o presente estudo tem como objetivo, avaliar a exposição alimentar para aflatoxinas em humanos por meio da determinação dos níveis urinários em uma população do município de Manaus.

Objetivo da Pesquisa:

Informações retiradas do documento PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_2009815.pdf
23/11/2022 15:34:06:

Objetivo Primário:

- Investigar o nível de exposição alimentar a aflatoxinas M1 em humanos por meio da determinação dos níveis urinários em uma população do município de Manaus/Amazonas.

Objetivos Secundários:

Endereço: Rua Teresina, 4950

Bairro: Adrianópolis

CEP: 69.057-070

UF: AM

Município: MANAUS

Telefone: (92)3305-1181

E-mail: cep.ufam@gmail.com

- Averiguar a relação do consumo de alimentos, incluindo regionais, quanto a presença de níveis urinários de aflatoxina M1.
- Associar a presença de aflatoxinas com o histórico de doenças hepáticas, renais e intoxicações agudas.
- Analisar o consumo de alimentos, suplementos ou medicamentos considerados protetores para aos efeitos deletérios das aflatoxinas.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Informações retiradas do documento PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_2009815.pdf
23/11/2022 15:34:06:

Risco: O presente estudo apresenta risco mínimo aos participantes envolvidos, pois não expõe os participantes a um risco físico invasivo. As amostras serão coletadas pelo próprio participante por meio de técnica asséptica e indolor. Além da amostra biológico, serão coletadas apenas informações referentes a dados sociodemográficos e hábitos alimentares utilizando como instrumento de pesquisa um questionário de frequência alimentar. Quanto ao vazamento de informações acerca de dados do paciente, hábitos alimentares e dos achados referentes as suas amostras biológicas que possam resultar na identificação dos participantes, salienta-se que serão tomadas medidas para manter todos os dados dos participantes sob sigilo e anonimato. Ressalta-se ainda que o processamento dos dados seja realizado em ambiente restrito, restringindo o acesso a esses dados apenas ao pesquisador responsável direto por esta pesquisa. Em caso de uma eventual publicação dos resultados da pesquisa, nenhum dado pessoal individual dos participantes da pesquisa será revelado, mantendo sigilo a todos os envolvidos, respeitando os direitos dos pacientes previstos pela Resolução nº 466/2012, aprovada pelo Plenário do Conselho Nacional de Saúde (CNS).

Benefícios: Quanto aos benefícios, a avaliação da exposição humana a aflatoxinas por meio de alimentos possivelmente contaminados, contribui para desvendar e/ou entender casos de surtos por intoxicações alimentares, bem como futuramente entender os aspectos clínicos das aflatoxicoses.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se da terceira versão do projeto de pesquisa que foi submetida para avaliação do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Amazonas em 23/11/2022 pela pesquisadora Nayra Nascimento Aquino, mestranda no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da

Endereço: Rua Teresina, 4950

Bairro: Adrianópolis

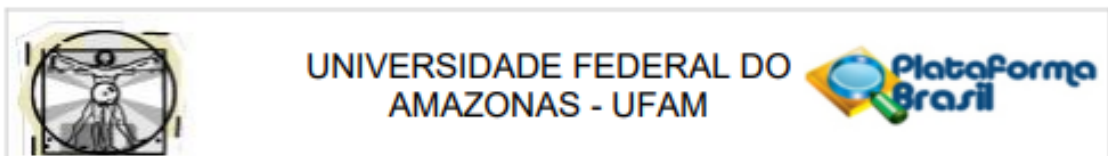
UF: AM

Município: MANAUS

Telefone: (92)3305-1181

CEP: 69.057-070

E-mail: cep.ufam@gmail.com



Continuação do Parecer: 5.792.836

Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas.

No documento PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_2009815.pdf 23/11/2022 15:34:06: trata-se de um estudo de coorte, prospectivo e quantitativo. O número amostral será por conveniência num total de 90 indivíduos. A coleta de dados iniciará em período definido após a liberação da pesquisa pelo comitê de ética em pesquisa (CEP). Iniciando-se com a aplicação do Consentimento livre e Esclarecido (TCLE) (apêndice A). Após a concessão do TCLE será aplicado um questionário de frequência alimentar (apêndice B), para coletar informações referentes à exposição dos pacientes aos alimentos fontes de contaminação por aflatoxinas. Posteriormente será realizada a coleta das amostras de urina nos voluntários selecionados. Critérios de inclusão: Serão incluídos na pesquisa maiores 18 anos, de ambos os sexos, com ou sem comorbidade e adeptos a dietas livres e restritivas (vegetarianos e veganos). Critérios de exclusão: Serão excluídos do estudo pacientes grávidas e indígenas.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

FOLHA DE ROSTO: ADEQUADA. Apresentada no arquivo Folha_de_rosto_nayraaquino.pdf 16/09/2022 15:43:29

INSTRUMENTO DE COLETA DE DADOS: ADEQUADO. Apresentado como apêndice do arquivo Projeto_Pesquisadetalhado2.docx 03/11/2022 20:59:09

TCLE: ADEQUADO. Apresentado no arquivo TCLE_modificadoCEP1.docx 03/11/2022 20:54:51

TERMO DE ANUÊNCIA: ADEQUADO. Apresentados nos arquivos SEI_UFAM_1164188_Carta_de_anuencia.pdf 16/09/2022 16:06:07 e Termodeanuencia_biophar.pdf 04/11/2022 10:49:55.

Recomendações:

Este CEP analisa os aspectos éticos da pesquisa com base nas Resoluções 466/2012-CNS, 510/2016-CNS e outras complementares. A aprovação do protocolo neste Comitê NÃO SOBREPÕE eventuais restrições ao início da pesquisa estabelecidas pelas autoridades competentes, devido à pandemia de COVID-19. O pesquisador (a) deve analisar a pertinência do início, segundo regras de sua instituição ou instituições/autoridades sanitárias locais, municipais, estaduais ou federais.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O comitê de ética da UFAM analisou o presente projeto e entendeu que o mesmo está dentro das

Endereço: Rua Teresina, 4950

Bairro: Adrianópolis

UF: AM

Telefone: (92)3305-1181

Município: MANAUS

CEP: 69.057-070

E-mail: cep.ufam@gmail.com

normas do comitê e das normas vigentes do Conselho Nacional de Saúde/Ministério da Saúde estando o mesmo APROVADO, lembrando ao pesquisador principal da obrigatoriedade de cumprir o cronograma e o envio do relatório final na data prevista. Caso a pesquisa não seja concluída no prazo estipulado, o pesquisador deve enviar o relatório parcial.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este CEP analisa os aspectos éticos da pesquisa com base nas Resoluções 466/2012-CNS, 510/2016-CNS e outras complementares. A aprovação do protocolo neste Comitê NÃO SOBREPÕE eventuais restrições ao início da pesquisa estabelecidas pelas autoridades competentes, devido à pandemia de COVID-19. O pesquisador(a) deve analisar a pertinência do início, segundo regras de sua instituição ou instituições/autoridades sanitárias locais, municipais, estaduais ou federais.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_2009815.pdf	23/11/2022 15:34:06		Aceito
Outros	Cartaresposta_Pendencias2.doc	23/11/2022 15:33:13	NAYRA NASCIMENTO AQUINO	Aceito
Outros	Carta_Resposta_Pendencias.docx	04/11/2022 10:54:31	NAYRA NASCIMENTO AQUINO	Aceito
Outros	FinanciamentoPROCAD.pdf	04/11/2022 10:51:41	NAYRA NASCIMENTO AQUINO	Aceito
Outros	Termodeanuencia_biophar.pdf	04/11/2022 10:49:55	NAYRA NASCIMENTO AQUINO	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Pesquisadetalhado2.docx	03/11/2022 20:59:09	NAYRA NASCIMENTO AQUINO	Aceito
Brochura Pesquisa	Projeto_Pesquisa_BrochuraV2.docx	03/11/2022 20:57:28	NAYRA NASCIMENTO AQUINO	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_modificadoCEP1.docx	03/11/2022 20:54:51	NAYRA NASCIMENTO AQUINO	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	SEI_UFAM_1164188_Carta_de_anuenci a.pdf	16/09/2022 16:06:07	NAYRA NASCIMENTO AQUINO	Aceito

Endereço: Rua Teresina, 4950

Bairro: Adrianópolis

UF: AM

Telefone: (92)3305-1181

Município: MANAUS

CEP: 69.057-070

E-mail: cep.ufam@gmail.com

Continuação do Parecer: 5.792.836

Orçamento	orcamento_financeiro.docx	16/09/2022 16:00:46	NAYRA NASCIMENTO AQUINO	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto_nayraaquino.pdf	16/09/2022 15:43:29	NAYRA NASCIMENTO AQUINO	Aceito
Cronograma	Cronograma.docx	01/09/2022 16:40:24	NAYRA NASCIMENTO AQUINO	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

MANAUS, 05 de Dezembro de 2022

Assinado por:
Eliana Maria Pereira da Fonseca
(Coordenador(a))

Endereço: Rua Teresina, 4950

Bairro: Adrianópolis

UF: AM

Município: MANAUS

Telefone: (92)3305-1181

CEP: 69.057-070

E-mail: cep.ufam@gmail.com