

## Exposição precoce a micotoxinas: o contributo dos projetos MYCOMIX e earlyMYCO

### Early-life exposure to mycotoxins: the contribution of MYCOMIX and earlyMYCO projects

Paula Alvito<sup>1,2</sup>, Patricia Bastos-Amador<sup>3</sup>, Elsa L. Duarte<sup>4</sup>, Manuela Ferreira<sup>3,5</sup>, Carla Nunes<sup>6</sup>, Carla Martins<sup>1,2,6</sup>, Ricardo Assunção<sup>1,2,6</sup>

paula.alvito@insa.min-saude.pt

(1) Departamento de Alimentação e Nutrição, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal

(2) Centro de Estudos do Ambiente e do Mar, Universidade de Aveiro, Aveiro, Portugal

(3) Centro Champalimaud, Fundação Champalimaud, Lisboa, Portugal

(4) Instituto Mediterrâneo para a Agricultura, Ambiente e Desenvolvimento, Universidade de Évora, Évora, Portugal

(5) Centro de Neurociências e Biologia Celular, Universidade de Coimbra, Coimbra, Portugal

(6) Centro de Investigação em Saúde Pública. Escola Nacional de Saúde Pública, Universidade NOVA de Lisboa, Lisboa, Portugal

### Resumo

A exposição a contaminantes químicos nos primeiros 1000 dias de vida tem sido associada a alterações de saúde, constituindo um domínio emergente de pesquisa fundamental para o conhecimento do exposoma humano. As micotoxinas produzidas por fungos integram a lista de contaminantes químicos tóxicos presentes nos alimentos e têm efeitos carcinogénicos, nefrotóxicos, hepatotóxicos e imunossupressores. A mucosa intestinal é a primeira barreira biológica encontrada pelos alimentos contaminados por micotoxinas após a ingestão, sendo pouco conhecidos os potenciais efeitos decorrentes de uma exposição humana precoce a estes contaminantes. Estudos recentes obtidos no âmbito do projeto MYCOMIX evidenciaram que as crianças portuguesas até aos 3 anos estão expostas a múltiplas micotoxinas através do consumo de alimentos à base de cereais, o que constitui um risco potencial para a sua saúde. Este estudo revelou a ocorrência de ocratoxina A, zearalenona e deoxinivalenol em, respetivamente, 65%, 48% e 44% das amostras analisadas, confirmando a exposição das crianças a várias micotoxinas através da alimentação. Em virtude da toxicidade associada a estes contaminantes e à particular vulnerabilidade deste grupo populacional, estes resultados abrem novas perspetivas de investigação e reforçam a necessidade de avaliar a exposição precoce das crianças a micotoxinas e o seu potencial impacto na saúde, o que constitui o principal objetivo do projeto earlyMYCO.

### Abstract

Exposure to hazardous chemicals during the first 1000 days of life has been linked to an increased risk of a number of health disorders. Early-life exposure to chemicals is an emerging research field that needs to be explored to contribute to the understanding of human exposome. Mycotoxins are food chemical contaminants, well known for their carcinogenic, nephrotoxic, hepatotoxic and immunosuppressive effects. Intestinal mucosa is the first biological barrier encountered by ingested mycotoxins and potential consequences of an early-life exposure to these compounds is poorly documented. Recent studies obtained under the MYCOMIX project showed that Portuguese children up to 3 years old are exposed to multiple mycotoxins through consumption of cereal-based foods, which constitutes a potential health threat. This study revealed the occurrence of ochratoxin A, zearalenone and

deoxynivalenol in, respectively, 65%, 48% and 44% of the analyzed samples, confirming children exposure to several mycotoxins through food. Given the toxicity of these compounds and that children are a particularly vulnerable group, there is an urgent need to assess the impact of early-life exposure to mycotoxins and their potential impact on human health, which is the main goal of earlyMYCO project.

### Introdução

A exposição a contaminantes nos primeiros 1000 dias de vida tem sido associada a alterações de saúde, constituindo um domínio emergente de pesquisa (1). Os primeiros 1000 dias de vida, que incluem os primeiros três anos de vida, desde o momento da conceção até aos dois anos de idade, constituem um período determinante durante o qual ocorrem processos cruciais de desenvolvimento e crescimento da criança. O que acontece durante este período é fundamental para a saúde do lactente e criança, mas também a longo prazo para a saúde do futuro adulto, afetando o seu desenvolvimento imunitário, metabólico e a sua microbiota residente. Os avanços na investigação têm demonstrado que a exposição a determinados compostos durante a vida pré-natal ou pós-natal poderá estar associada ao desenvolvimento de doenças que incluem asma, leucemia, obesidade, doenças cardiovasculares, entre outras (2). É, pois, urgente avaliar o impacto da exposição precoce a contaminantes, como as micotoxinas, na saúde humana.

As micotoxinas são toxinas naturais produzidas por fungos, resistentes ao processamento industrial e culinário e podem



ter consequências para a saúde humana, estando associadas a efeitos carcinogénicos, nefrotóxicos, hepatotóxicos, estrogénicos e imunotóxicos (3,4). Uma das principais vias de exposição a estes contaminantes é a alimentação pelo que se torna importante avaliar o seu impacto no trato gastrointestinal (TGI) (5). O intestino constitui o maior compartimento do sistema imunitário representando 70% das defesas imunológicas do organismo e é a primeira barreira de defesa do indivíduo encontrada pelos contaminantes presentes nos alimentos ingeridos, tais como as micotoxinas (6). Devido à sua prevalência em produtos alimentares, as micotoxinas podem afetar a homeostase intestinal, efeito muitas vezes negligenciado, podendo determinar os estados de saúde e doença (7).

### **\_Objetivos**

Neste estudo pretendeu-se quantificar os teores de 13 micotoxinas em 52 amostras de alimentos à base de cereais, destinados ao consumo para crianças, analisadas no âmbito do projeto MYCOMIX e apresentar os objetivos do projeto earlyMYCO, a fim de contribuir para avaliar os níveis de exposição de crianças a micotoxinas, durante o seu desenvolvimento e numa fase precoce da vida.

### **\_Materiais e métodos**

Para o estudo da ocorrência de micotoxinas em alimentos infantis, foram adquiridos entre 2014 e 2015, em supermercados da Área Metropolitana de Lisboa, 52 cereais e produtos derivados, comercializados principalmente para crianças: 26 cereais pequeno-almoço, 20 cereais infantis e seis bolachas. Posteriormente, procedeu-se à determinação analítica de 13 micotoxinas nestes produtos, nomeadamente, aflatoxinas (AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub>, AFG<sub>2</sub>, AFM<sub>1</sub>), ocratoxina A (OTA), fumonisinas (FB<sub>1</sub>, FB<sub>2</sub>), tricotecenos (DON, nivaleol-NIV; toxina T-2 e toxina HT-2) e zearalenona (ZEN). A determinação analítica foi efetuada por diferentes técnicas cromatográficas: as aflatoxinas e a OTA foram determinadas por cromatografia líquida de alta eficiência com deteção por fluorescência (HPLC-FLD), os tricotecenos por cromatografia gasosa com deteção por espectrometria de massa (GC-MS), e as fumonisinas e zearalenona por cromatogra-

fia líquida com deteção por espectrometria de massa (LC-MS/MS), conforme descrito em Martins e colaboradores (8).

### **\_Resultados e discussão**

A **tabela 1** refere a percentagem de amostras positivas (teores superiores ao limite de deteção) e valores médios (µg/kg) para cada toxina nas categorias de cereais pequeno-almoço, cereais infantis e bolachas. Foram identificadas todas as toxinas analisadas com exceção da AFG<sub>2</sub> e das toxinas T-2 e HT-2. Quarenta e nove das 52 amostras (94%) apresentaram pelo menos uma das toxinas analisadas. O presente estudo revelou a ocorrência de OTA, ZEN e DON, respetivamente, em 65%, 48% e 44% das amostras analisadas, com teores médios máximos de 95,9 µg/kg para a DON, sendo a totalidade dos valores encontrados inferiores aos legislados (quando existentes). Estes resultados confirmam a presença de micotoxinas nos produtos alimentares vendidos na Área Metropolitana de Lisboa, no período de tempo reportado, sugerindo uma exposição das crianças estudadas a várias micotoxinas, através do consumo dos alimentos à base de cereais analisados. As micotoxinas detetadas incluíram AFTs (sobretudo AFB<sub>1</sub>), OTA e FMs, DON, ZEN e NIV, considerados, respetivamente, como cancerígenos (grupo 1), possíveis cancerígenos (grupo 2B), e sem evidência de carcinogenicidade para humanos (grupo 3), conforme classificação da Agência Internacional de Investigação em Cancro (IARC, na sigla em inglês) (9).

Os resultados obtidos no âmbito do projeto MYCOMIX – Estudo exploratório dos efeitos tóxicos de misturas de micotoxinas em alimentos para crianças e potencial impacto na saúde (<https://www.youtube.com/watch?v=CsKaz3mt2J4>), e apresentados nesta tabela, revelaram que as crianças portuguesas até aos 3 anos de idade estão expostas a múltiplas micotoxinas através do consumo de alimentos à base de cereais (12), o que constitui um risco potencial para a sua saúde. Os resultados de avaliação da exposição e a caracterização do risco indicaram que, embora os teores de micotoxinas detetados nos alimentos analisados fossem inferiores aos legislados, a presença de algumas micotoxinas, nomeadamente de aflatoxinas (sobretudo a aflatoxina B<sub>1</sub>, um dos



Tabela 1: Ocorrência de micotoxinas em alimentos para crianças à base de cereais, comercializados na Área Metropolitana de Lisboa e analisados no âmbito do projeto MYCOMIX.

Micotoxinas	Cereais pequeno-almoço (n=26)				Cereais infantis (n=20)				Bolachas (n=6)				Nº total de amostras (n=52)
	Amostras positivas (%)	Média (µg/kg)	Máximo (µg/kg)	Teor máximo admissível (µg/kg) (10)	Amostras positivas (%)	Média (µg/kg)	Máximo (µg/kg)	Teor máximo admissível (µg/kg) (10)	Amostras positivas (%)	Média (µg/kg)	Máximo (µg/kg)	Teor máximo admissível (µg/kg) (10)	
AFB <sub>1</sub>	19 (73%)	0,036	0,130	2,0	0	ND	ND	0,10	0	ND	ND	2,0	19 (37%)
AFB <sub>2</sub>	12 (46%)	0,007	0,011	–	1 (5%)	NA	0,002	–	0	ND	ND	–	13 (25%)
AFG <sub>1</sub>	1 (4%)	NA	0,017	–	2 (10%)	0,014	0,016	–	0	ND	ND	–	3 (6%)
AFG <sub>2</sub>	0	ND	ND	–	0	ND	ND	–	0	ND	ND	–	0
AFM <sub>1</sub>	3 (12%)	0,017	0,024	–	8 (40%)	0,068	0,190	–	0	ND	ND	–	11(21%)
AFTs	19 (73%)	NA	NA	–	9 (45%)	NA	NA	–	0	NA	NA	–	28 (54%)
OTA	18 (69%)	0,047	0,100	3,0	10 (50%)	0,061 (11)	0,263 (11)	0,50	6 (100%)	0,086	0,134	3,0	34 (65%)
FB <sub>1</sub>	15 (58%)	22,00	67,00	–	7 (35%)	0,44	0,86	–	0	ND	ND	–	22 (42%)
FB <sub>2</sub>	10 (39%)	5,10	14,00	–	0	ND	ND	–	0	ND	ND	–	10 (19%)
FMs	15 (58%)	NA	NA	200	7 (35%)	NA	NA	–	0	NA	NA	–	22 (42%)
ZEN	19 (73%)	1,20	5,61	50	6 (30%)	0,48	0,98	20	0	ND	ND	50	25 (48%)
DON	16 (62%)	95,9	207,8	500	4 (20%)	41,8	71,0	200	3 (50%)	43,8	73,3	500	23 (44%)
NIV	1 (4%)	NA	27,1	–	0	ND	ND	–	0	ND	ND	–	1 (2%)
T-2	0	ND	ND	–	0	ND	ND	–	0	ND	ND	–	0
HT-2	0	ND	ND	–	0	ND	ND	–	0	ND	ND	–	0

ND, não detetado; NA, não aplicável; AFM<sub>1</sub>, aflatoxina M<sub>1</sub>; AFB<sub>1</sub>, aflatoxina B<sub>1</sub>; AFB<sub>2</sub>, aflatoxina B<sub>2</sub>; AFG<sub>1</sub>, aflatoxina G<sub>1</sub>; AFG<sub>2</sub>, aflatoxina G<sub>2</sub>; AFTs, aflatoxinas; OTA, ocratoxina A; FB<sub>1</sub>, fumonisina B<sub>1</sub>; FB<sub>2</sub>, fumonisina B<sub>2</sub>; FMs, fumonisinas; DON, deoxinivalenol; NIV, nivalenol; T-2, toxina T-2; HT-2, toxina HT-2; ZEN, zearalenona.

mais potentes hepatotóxicos conhecidos), poderiam estar associadas a um risco significativo para a saúde das crianças (12,13).

Verificou-se ainda que os valores mais elevados de ingestão diária eram atribuídos à micotoxina desoxinivalenol (DON), que se sabe ter efeitos imunológicos e gastrointestinais, o que reforça a necessidade de avaliar o impacto das micotoxinas no TGI, em particular em populações vulneráveis como as crianças.

A toxicidade das micotoxinas detetadas nos produtos alimentares, associada ao facto de as crianças constituírem uma faixa particularmente vulnerável da população, conduziu à necessidade urgente de desenvolver um novo projeto que visasse avaliar o impacto na saúde da exposição precoce das crianças a estes contaminantes químicos. Neste sentido, está em curso o projeto earlyMYCO – Exposição precoce a micotoxinas e potencial impacto na saúde. Segundo a hipótese colocada no projeto, a exposição a micotoxinas tem impacto no desenvolvimento do sistema imunitário intestinal do feto e



do lactente, na defesa intestinal contra agentes patogénicos e no estabelecimento da microbiota intestinal. Assim, este projeto irá integrar a avaliação da exposição a micotoxinas de pares mãe-filho(s) através da biomonitorização, avaliação do impacto de micotoxinas no sistema imunitário intestinal e microbiota intestinal através de ensaios toxicológicos *in vivo* (em murganhos/ratinhos), e caracterização do risco e impacto na saúde associados à exposição a estes contaminantes, reunindo dados toxicológicos de exposição e *in vivo*. Estes tópicos constituirão os três principais pilares deste projeto, conforme ilustrado no quadro conceptual (figura 1).

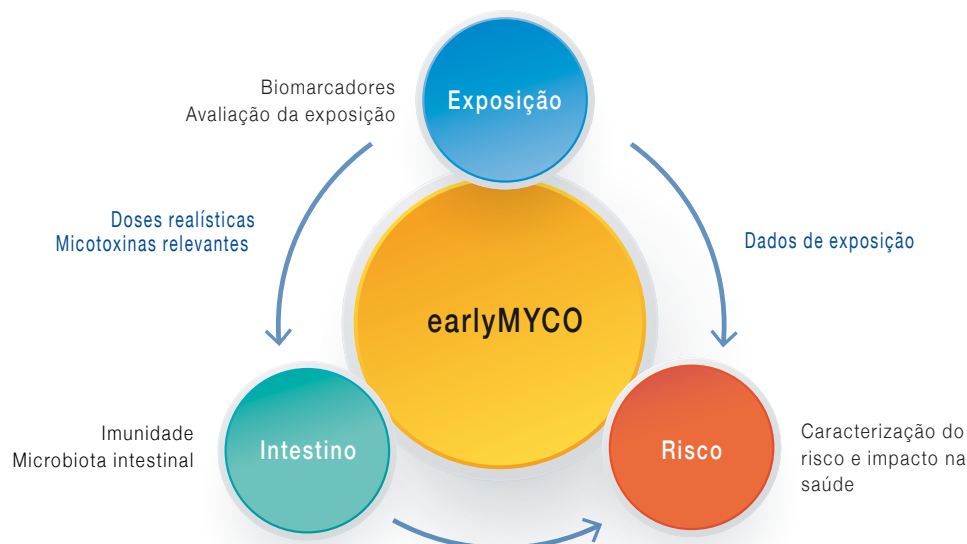
Por forma a avaliar esta hipótese, o projeto earlyMYCO pretende responder a várias questões: i) estarão as grávidas e lactentes até aos 6 meses de idade expostos a micotoxinas? ii) Esta exposição representa um risco para a sua saúde? iii) A exposição precoce a micotoxinas produz alterações no desenvolvimento do sistema imunitário gastrointestinal? e iv) Qual é a carga de doença (*burden of disease*) atribuída a esta exposição? Para responder a estas questões, serão desenvolvidas atividades em cinco domínios: i) recrutamento de grávidas e lactentes, colheita de alimentos e amostras biológicas; ii) avaliação da exposição a micotoxinas na população recrutada; iii) ensaios experimentais *in vivo* para avaliar os

efeitos da exposição precoce a micotoxinas no sistema imunitário gastrointestinal; iv) abordagem metagenómica para avaliar os efeitos da exposição precoce a micotoxinas na microbiota intestinal; e v) integração final dos dados epidemiológicos e experimentais para caracterizar o risco e impacto na saúde associado à exposição precoce a micotoxinas.

### \_Conclusões

Os resultados obtidos no âmbito do projeto MYCOMIX confirmaram a exposição das crianças portuguesas a várias micotoxinas, como AFTs (sobretudo AFB<sub>1</sub>), OTA e FMs, DON, ZEN e NIV, compostos classificados pela IARC relativamente à sua atividade carcinogénica em humanos. Face à toxicidade associada a estas micotoxinas, investigação futura deverá permitir confirmar o cenário obtido neste projeto. Adicionalmente, o projeto MYCOMIX identificou a DON como a micotoxina com valores mais elevados de ingestão diária através do consumo de produtos à base de cereais. Dada a associação habitualmente identificada entre a exposição a esta micotoxina e os efeitos para a saúde, estes resultados sugerem uma possível ocorrência de alterações ao nível do sistema imunitário e gastrointestinal nos indivíduos expostos. As crianças constituem uma população particularmente vulnerável, pelo

Figura 1: ↓ Descrição conceptual do Projeto earlyMYCO.





que a sua proteção deverá constituir uma prioridade relativamente à implementação de medidas de proteção da saúde pública. Os resultados obtidos abrem assim novas perspectivas para a investigação da exposição humana a micotoxinas e o seu impacto na saúde num período precoce da vida, objetivo do presente projeto earlyMYCO.

#### Financiamento:

Projeto MYCOMIX, financiado pela Fundação para a Ciência e a Tecnologia (PTDC/DTP-FT0/0417/2012).

Este trabalho é financiado por fundos nacionais através da Fundação para a Ciência e a Tecnologia, no âmbito do projeto earlyMYCO (PTDC/MEDTOX/28762/2017) e do CESAM (UIDP/50017/2020+UIDB/50017/2020).

#### Artigo baseado no original publicado em:

Assunção R, Martins C, Vasco E, Jager A, Oliveira C, Cunha SC, Fernandes JO, Nunes B, Loureiro S, Alvito P. *Portuguese children dietary exposure to multiple mycotoxins – An overview of risk assessment under MYCOMIX project*. Food Chem Toxicol. 2018;118:399-408. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.05.040>

#### Referências bibliográficas:

- (1) Moore TG, Arefadib N, Deery A, et al. The First Thousand Days: an Evidence Paper. Parkville, Victoria: Centre for Community Child Health, Murdoch Children's Research Institute, 2017. <https://goo.gl/Foaw1C>
- (2) Arbuckle TE, Fraser WD, Fisher M, et al. Cohort profile: the maternal-infant research on environmental chemicals research platform. Paediatr Perinat Epidemiol. 2013;27(4):415-25. <https://doi.org/10.1111/ppe.12061>
- (3) Bennett JW, Klich M. Mycotoxins. Clin Microbiol Rev. 2003;16(3):497-516. <https://doi.org/10.1128/cmr.16.3.497-516.2003>
- (4) Alvito P. Alterações Do Estado de Saúde Associadas à Alimentação: Contaminação Química - Micotoxinas. Lisboa: Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo, 2014. <http://repositorio.insa.pt/handle/10400.18/2757>
- (5) Alassane-Kpembi I, Pinton P, Oswald IP. Effects of Mycotoxins on the Intestine. Toxins (Basel). 2019;11(3):159. Published 2019 Mar 13. <https://doi.org/10.3390/toxins11030159>
- (6) Grenier B, Applegate TJ. Modulation of intestinal functions following mycotoxin ingestion: meta-analysis of published experiments in animals. Toxins (Basel). 2013;5(2):396-430. <https://doi.org/10.3390/toxins5020396>
- (7) Assunção R, Alvito P, Kleiveland CR, et al. Characterization of in vitro effects of patulin on intestinal epithelial and immune cells. Toxicol Lett. 2016;250-251:47-56. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2016.04.007>
- (8) Martins C, Assunção R, Cunha SC, et al. Assessment of multiple mycotoxins in breakfast cereals available in the Portuguese market. Food Chem. 2018;239:132-140. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.06.088>
- (9) Ostry V, Malir F, Toman J, et al. Mycotoxins as human carcinogens-the IARC Monographs classification. Mycotoxin Res. 2017;33(1):65-73. <https://doi.org/10.1007/s12550-016-0265-7>
- (10) União Europeia. Regulamento (CE) n.o 1881/2006 da Comissão, de 19 de Dezembro de 2006, que fixa os teores máximos de certos contaminantes presentes nos géneros alimentícios. JO 20.12.2006:L 364/5-24. <http://data.europa.eu/eli/reg/2006/1881/oj>
- (11) Assunção R, Martins C, Dupont D, et al. Patulin and ochratoxin A co-occurrence and their bioaccessibility in processed cereal-based foods: a contribution for Portuguese children risk assessment. Food Chem Toxicol. 2016;96:205-14. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2016.08.004>
- (12) Assunção R, Martins C, Vasco E, et al. Portuguese children dietary exposure to multiple mycotoxins - An overview of risk assessment under MYCOMIX project. Food Chem Toxicol. 2018;118:399-408. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.05.040>
- (13) Assunção R, Vasco E, Nunes B, et al. Single-compound and cumulative risk assessment of mycotoxins present in breakfast cereals consumed by children from Lisbon region, Portugal. Food Chem Toxicol. 2015;86:274-81. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2015.10.017>