

## Exposição da população Portuguesa a micotoxinas: o contributo da biomonitorização humana

### Exposure of the Portuguese population to multiple mycotoxins: The contribute of human biomonitoring

Carla Martins<sup>1,2,3,4</sup>, Arnau Vidal<sup>5</sup>, Marthe De Boevre<sup>5</sup>, Sarah De Saeger<sup>5</sup>, Carla Nunes<sup>2,4</sup>, Duarte Torres<sup>6,7</sup>, Ana Goios<sup>6,7</sup>, Carla Lopes<sup>6,8</sup>, Ricardo Assunção<sup>1,3</sup>, Paula Alvito<sup>1,3</sup>

carla.martins@insa.min-saude.pt

(1) Departamento de Alimentação e Nutrição, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Avenida Padre Cruz, 1649-016, Lisboa, Portugal.

(2) Escola Nacional de Saúde Pública, Universidade NOVA de Lisboa, Avenida Padre Cruz, 1600-560, Lisboa, Portugal.

(3) Centro de Estudos do Ambiente e do Mar, Universidade de Aveiro, Campus Universitário de Santiago, 3810-193, Aveiro, Portugal.

(4) Centro de Investigação em Saúde Pública, Universidade NOVA de Lisboa, Avenida Padre Cruz, 1600-560, Lisboa, Portugal.

(5) Centre of Excellence in Mycotoxicology and Public Health, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Ghent University, Ottergemsesteenweg 460, B-9000, Ghent, Belgium.

(6) Unidade de Investigação em Epidemiologia, Instituto de Saúde Pública, Universidade do Porto, Rua Das Taipas 135, 4050-091, Porto, Portugal.

(7) Faculdade de Ciências da Nutrição e Alimentação, Faculty of Nutrition and Food Sciences, Universidade do Porto, Rua Dr. Roberto Frias, 4200-465, Porto, Portugal.

(8) Departamento de Saúde Pública e Ciências Forenses, Faculdade de Medicina, Universidade do Porto, Alameda Prof. Hernâni Monteiro, 4200-319, Porto, Portugal.

### \_Resumo

As micotoxinas constituem um grupo de contaminantes alimentares que poderão provocar vários efeitos tóxicos na saúde humana, entre eles efeitos estrogénicos, imunotóxicos, nefrotóxicos e teratogénicos. É por isso importante avaliar a exposição humana a estes compostos, através da análise direta dos seus biomarcadores em amostras biológicas. Em Portugal existem poucos dados disponíveis de exposição a micotoxinas obtidos em estudos de biomonitorização humana. Face a esta ausência de informação, o presente estudo teve como objetivo determinar os biomarcadores de exposição a micotoxinas em amostras de urina de 24 horas, colhidas no âmbito do Inquérito Nacional de Alimentação, Nutrição e Atividade Física da População Geral Portuguesa (2015-2016), e avaliar o risco associado a esta exposição. A determinação analítica destes compostos foi efetuada por cromatografia líquida com deteção por espectrometria de massa permitindo a deteção e quantificação simultânea de 37 biomarcadores de exposição a micotoxinas presentes na urina. Os dados obtidos foram utilizados para estimar a Ingestão Diária Provável e caracterizar o risco através da determinação do Quociente de Perigo. Os resultados obtidos revelaram a exposição da população portuguesa a zearalenona, desoxinivalenol, ocratoxina A, alternariol, citrinina e fumonisina B<sub>1</sub>. Os dados de caracterização de risco revelaram uma potencial preocupação, considerando que os valores de referência de ingestão foram excedidos em alguns participantes. A micotoxina alternariol foi identificada e quantificada, pela primeira vez, em amostras de urina num país europeu; no entanto, a caracterização do risco não foi efetuada dado não existir um valor de referência estabelecido internacionalmente. Estes resultados confirmam que a população Portuguesa está exposta a micotoxinas, reforçando a necessidade de mais estudos sobre os determinantes desta exposição.

### \_Abstract

Mycotoxins constitute a relevant group of food contaminants with several associated health outcomes such as estrogenic, immunotoxic, nephrotoxic and teratogenic effects. In Portugal, few data are available regarding human biomonitoring studies of mycotoxins. The present study

concerned the analysis of mycotoxins in 24h urine samples from 94 participants enrolled within the scope of the National Food, Nutrition, and Physical Activity Survey of the Portuguese General Population (2015-2016). The urine samples were analyzed by liquid chromatography-mass spectrometry for the simultaneous determination of 37 urinary mycotoxins' biomarkers and the obtained data were used to estimate the probable daily intake as well as to characterize the risk applying the Hazard Quotient approach. Results revealed the exposure of the Portuguese population to zearalenone, deoxynivalenol, ochratoxin A, alternariol, citrinin and fumonisin B<sub>1</sub>. Risk characterization showed a potential concern to some reported mycotoxins since the reference intake values were exceeded by some of the considered participants. Alternariol was identified for the first time in urine samples from a European country, despite the risk characterization was not performed due to lack of a reference dose, not yet internationally established. These results confirmed mycotoxins as part of the human exposome of the Portuguese population reinforcing the need for further studies regarding the determinants of exposure.

### \_Introdução

O ser humano está exposto, diariamente, a vários compostos químicos, sendo a alimentação uma das principais vias de exposição. As micotoxinas, metabolitos secundários produzidos por fungos, podem contaminar diferentes tipos de matrizes alimentares nas diversas etapas da sua produção. Estes compostos assumem particular importância em Saúde Pública, considerando os seus efeitos tóxicos nomeadamente, carcinogénicos, genotóxicos, nefrotóxicos, teratogénicos, estrogénicos e imunomoduladores (1,2). A contaminação de alimentos por micotoxinas constitui também um problema

económico, uma vez que uma grande diversidade de alimentos e matérias-primas podem ser afetados comprometendo, em algumas situações, a sua entrada na cadeia alimentar. Apesar de se conhecerem alguns casos bem documentados de intoxicações agudas por micotoxinas, a exposição crónica a baixas doses destas toxinas tem despertado a atenção de investigadores e gestores de risco dado o potencial carcinogénico destes compostos (3). Neste sentido, a *International Agency for Research on Cancer* (IARC) classificou algumas micotoxinas quanto à evidência científica que suporta o seu potencial carcinogénico em humanos, incluindo as aflatoxinas (AF) no grupo 1 (comprovada ação carcinogénica em humanos), ocratoxina A (OTA) e fumonisina B<sub>1</sub> (FB<sub>1</sub>) no grupo 2 (possível ação carcinogénica em humanos) e as toxinas de oxinivalenol (DON), zearalenona (ZEN) e citrinina (CIT) no grupo 3 (não classificados quanto à sua carcinogenicidade em humanos) (3, 4). A micotoxina DON é também associada a efeitos gastrointestinais, a ZEN e algumas toxinas de *Alternaria* são disruptores endócrinos, a OTA e a CIT são nefrotóxicas, e as fumonisinas estão associadas a defeitos do tubo neural sendo também nefrotóxicas (4). A ocorrência de micotoxinas nos alimentos habitualmente consumidos em Portugal foi descrita por diferentes autores, caracterizando-se por ser frequente, diversificada em relação aos géneros alimentícios afetados, e ocorrendo em baixas concentrações (5-10). Sendo assim, a exposição da população Portuguesa a micotoxinas através da alimentação caracteriza-se sobretudo por ser uma exposição crónica. A avaliação do risco efetuada através da referida abordagem indireta apresenta algumas limitações nomeadamente a distribuição heterogénea das micotoxinas nos alimentos, a influência dos processamentos culinários, dado não estar habitualmente refletida na avaliação de risco, bem como as variações individuais na metabolização destes compostos (11). Assim, metodologias que permitam uma avaliação da exposição de forma direta, como acontece através dos estudos de biomonitorização humana, permitem avaliar com maior exatidão se os indivíduos estão expostos a determinada substância, qual a magnitude dessa exposição e ainda a sua variação ao longo do tempo (12). De entre as amostras biológicas utilizadas em programas de biomonitorização, a urina revela-se uma das mais frequentemente

te utilizadas justificando-se pela facilidade de colheita destas amostras. Existem já diversos estudos que avaliaram a exposição a micotoxinas pela determinação de biomarcadores em amostras de urina verificando-se a ocorrência de vários biomarcadores urinários de micotoxinas e a potencial co-exposição a diferentes toxinas (13-15).

Os dados obtidos a partir de estudos de biomonitorização humana permitem caracterizar a exposição da população a diversos contaminantes, sendo também importantes para a promoção, avaliação e demonstração da eficácia de medidas preventivas em Saúde Pública baseadas na evidência, conforme enunciado na Declaração de Parma (2010) (16).

### Objetivos

O presente estudo teve como objetivos i) avaliar, pela primeira vez, a exposição da população Portuguesa a micotoxinas através do desenvolvimento de um estudo de biomonitorização humana para a determinação de 37 biomarcadores urinários, utilizando amostras de urina de 24 horas; e ii) caracterizar o risco associado à exposição determinada em i) aplicando as abordagens de dosimetria reversa e quociente de perigo.

### Material e métodos

No âmbito do Inquérito Alimentar Nacional e de Atividade Física 2015-2016 (IAN-AF) foi selecionada uma amostra de conveniência de 94 participantes para efetuar a colheita de amostra de urina de 24 horas (17). Este estudo foi aprovado pela Comissão Nacional de Proteção de Dados (Autorização nº 4940/2015) e pela Comissão de Ética do Instituto de Saúde Pública da Universidade do Porto (Decisão nº CE 16053). Os participantes formalizaram a sua participação no estudo através de Consentimento Informado e a colheita de dados decorreu sob a forma de pseudoanonimização (17).

A determinação analítica dos biomarcadores urinários de micotoxinas considerou i) um método de extração baseado em QuEChERS (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rough*); e ii) a análise por cromatografia líquida acoplado a espectrometria de massa (18). A metodologia utilizada considerou a determinação de 37 biomarcadores urinários de micotoxinas, numa

só corrida cromatográfica e com recurso a quantificação por método de padrão interno e curvas de calibração em matriz. A Ingestão Diária Provável (IDP) foi determinada através da abordagem de dosimetria reversa que permite estimar a exposição externa através da ingestão ( $\mu\text{g}/\text{kg}$  peso corporal/dia) usando os dados de biomonitorização ( $\mu\text{g}/\text{L}$ ), considerando que a exposição a micotoxinas ocorreu exclusivamente através da ingestão. Para tal, aplicou-se um método determinístico considerando a concentração do biomarcador urinário de micotoxina ( $\mu\text{g}/\text{L}$ ), o volume urinário produzido em 24 horas (L), o peso corporal (kg), a taxa de excreção para cada micotoxina (%), e o rácio de massa entre a micotoxina e o respetivo metabolito (19-20). A IDP foi determinada individualmente para cada participante.

A caracterização do risco decorrente da exposição estimada foi efetuada através da determinação do Quociente de Perigo (QP), que consiste na razão entre os níveis de Ingestão Diária Provável (IDP) e os níveis de Ingestão Diária Tolerável (IDT) para cada micotoxina (se disponível). Se o valor do QP for inferior a 1, considera-se que a exposição não representa uma preocupação em Saúde Pública (20).

Com o objetivo de representar a variabilidade nos resultados de biomarcadores urinários de micotoxinas cujos níveis foram inferiores ao Limite de Detecção do método ( $< \text{LD}$ ), recorreu-se à imputação múltipla baseada em 20 simulações, com um máximo de 100 000 iterações, por forma a imputar a esses resultados um valor entre zero e o respetivo LD. A análise estatística descritiva (medianas, percentis) foi efetuada após o processo de imputação múltipla. A normalidade dos dados foi avaliada através do teste de Shapiro-Wilk. A análise estatística foi efetuada com recurso ao *software* SPSS (versão 24).

## \_Resultados e discussão

A análise das amostras de urina de 24 horas dos 94 participantes neste estudo revelou a presença de 11, dos 37, biomarcadores urinários de micotoxinas determinados. Apenas cinco amostras (5.3 %) foram negativas para todos os biomarcadores analisados. A Tabela 1 resume os resultados obtidos na determinação de biomarcadores de micotoxinas em urinas de 24 horas.

Pela primeira vez, foi possível confirmar a exposição da população Portuguesa a micotoxinas no âmbito de um estudo de biomonitorização humana, sendo detetada a presença de DON (63%), ZEN (48%), AOH (29%), OTA (18%),  $\text{FB}_1$  (7%) e CIT (2%) nas amostras de urina de 24 horas. Verificou-se que DON e os respetivos metabolitos apresentaram a maior frequência de biomarcadores de exposição nas amostras analisadas [DON 63%, deepoxi-desoxinivalenol (DOM-1) 41%, desoxinivalenol-15-glucuronido (DON-15-GlcA) 52%, desoxinivalenol-3-glucuronido (DON-3-GlcA) 44%]. Verificou-se ainda que 78% dos participantes estão expostos a esta micotoxina. Foi também possível confirmar pela primeira vez a exposição da população Portuguesa a desoxinivalenol-3-glucosídeo (DON-3G), com 20% das amostras positivas. O metabolito zearalenona-14-glucuronido (ZEN-14-GlcA) foi determinado em 16% das amostras analisadas, estando de acordo com estudos anteriores que indicam a ZEN-14-GlcA como um dos principais metabolitos da ZEN. É de realçar ainda que se identificou pela primeira vez em amostras biológicas na Europa a micotoxina AOH.

A Tabela 2 apresenta os resultados obtidos relativamente à determinação da Ingestão Diária Provável (IDP) da população considerada, tendo estes cálculos sido feitos individualmente para cada participante. As taxas de excreção consideradas foram obtidas em estudos de intervenção em humanos (18, 22, 28), com exceção da taxa de excreção para alternariol que foi obtida num estudo em que foram utilizados modelos animais (29). A utilização de taxas de excreção obtidas em estudos com poucos indivíduos ou em estudos decorrentes de experimentação animal está associada a uma considerável incerteza; no entanto, estes são os dados atualmente disponíveis e as determinações efetuadas permitem uma abordagem preliminar para a caracterização do risco associado à exposição a micotoxinas.

Relativamente à micotoxina DON, dependendo das taxas de excreção consideradas, foi determinada uma IDP de 0,19 - 0,21  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  pc/dia (mediana). Neste sentido, cerca de 10% dos participantes ultrapassaram a Ingestão Diária Tolerável estabelecida para esta micotoxina. Os resultados estão de acordo com outros estudos efetuados na Europa (15,30)

**Tabela 1:** ↓ Resultados de biomarcadores de exposição a micotoxinas determinados em amostras de urina de 24 horas (n=94) num estudo de biomonitorização humana em Portugal.

Biomarcadores	Mediana (µg/L)	P90 (µg/L)	P95 (µg/L)	Máximo (µg/L)	> LD (%; n)	> LQ (%; n)
DON	2,51	8,72	16,80	36,31	63%; 59	63%; 59
DOM-1	0,24	2,86	4,05	5,13	41%; 39	39%; 37
DON-3G	0,34	0,84	1,20	2,09	20%; 19	7%; 7
DON-3-GlcA	0,33	11,78	18,53	34,67	44%; 41	37%; 35
DON-15-GlcA	1,73	53,76	76,61	204,17	52%; 49	51%; 48
ZEN	0,17	1,51	2,93	3,98	48%; 45	26%; 24
ZEN-14-GlcA	0,17	5,13	8,78	25,70	16%; 15	16%; 15
OTA	0,006	0,045	0,060	1,23	18%; 17	17%; 16
AOH	0,28	3,81	6,73	24,55	29%; 27	23%; 22
CIT *	0,85	–	–	1,20	2%; 2	1%; 1
FB <sub>1</sub> *	0,33	–	–	0,48	7%; 7	2%; 2

P90 = Percentil 90; P95 = Percentil 95; LD = Limite de Detecção; LQ = Limite de Quantificação; DON = Desoxinivalenol; DOM-1 = deepoxi-desoxinivalenol; DON-3G = Desoxinivalenol-glicosídeo; DON-3-GlcA = Desoxinivalenol-3-glucurónido; DON-15-GlcA = Desoxinivalenol-15-glucurónido; ZEN = Zearalenona; ZEN-14-GlcA = Zearalenona-14-glucurónido; OTA = Ocratoxina A; AOH = Alternariol; CIT = Citrinina; FB<sub>1</sub> = Fumonissina B<sub>1</sub>

\* Amostras positivas (> LD).

**Tabela 2:** ↓ Determinação da Ingestão Diária Provável (IDP) e caracterização do risco (Quociente de Perigo, QP) relativas ao estudo de biomonitorização humana em Portugal.

Micotoxinas	Taxa de Excreção			Ingestão Diária Provável (µg/Kg pc/dia)			VGI (IDT)	Quociente de Perigo (QP)			% de participantes com QP > 1
	Referência	Taxa de Excreção, %	Número de participantes	Mediana	P95	Máximo	(µg/Kg pc/dia)	Mediana	P95	Máximo	
DON	(18)	64%	20	0,21	1,58	3,62	1,00	0,21	1,58	3,62	10
	(25)	72,3%	35	0,19	1,40	3,20		0,19	1,40	3,20	
FB <sub>1</sub> *	(26)	0,08%	22	7,69	9,18	9,52	1,00	7,69	9,18	9,52	–
	(27)	0,5%	8	1,15	1,38	1,43		1,15	1,38	1,43	
CIT*	(23)	14,75%	2	0,14	0,20	0,21	0,20	0,70	1,01	1,04	–
ZEN	(22)	9,6%	1	0,08	1,43	4,35	0,25	0,32	5,70	17,39	24
OTA	(28)	2,5%	1	0,01	0,04	0,60	0,12****	0,27	2,18	35,10	14
AOH**	(29)	8,3%	***	0,07	2,05	2,45	–	–	–	–	–

VGI = Valores Guia de Ingestão; P90 = Percentil 90; P95 = Percentil 95; DON = Desoxinivalenol; ZEN = Zearalenona; OTA = Ocratoxina A; CIT = Citrinina; FB<sub>1</sub> = Fumonissina B<sub>1</sub>; AOH = Alternariol; IDT = Ingestão Diária Tolerável;

\* Micotoxinas com percentagem de amostras positivas inferior a 10% - Ingestão Diária Provável e Quociente de Perigo determinado apenas para amostras positivas (CIT, n=2; FB<sub>1</sub>, n=7). % de participantes que excederam IDT (QP > 1) não determinada.

\*\* Quociente de Perigo não determinado por ausência de valor de referência.

\*\*\* Dados obtidos num estudo em modelo animal (ratos).

\*\*\*\* O valor de Ingestão Semanal Tolerável Provisória (0,12 µg/Kg pc/semana) foi dividido por 7 para efetuar cálculo do QP.

e são corroborados pela ocorrência de DON em diversos alimentos consumidos em Portugal (5,6).

A ingestão diária provável de ZEN determinada neste estudo foi 0,08 µg/Kg pc/dia (mediana). Considerando esta IDP, 24% dos participantes ultrapassaram a Ingestão Diária Tolerável estabelecida. Estes resultados são sugestivos de um padrão de exposição diferente dos restantes países europeus (31,32), sendo particularmente importante avaliar as possíveis consequências desta realidade, recomendando-se a sua reavaliação assim que estiverem disponíveis dados mais robustos de toxicocinética.

Relativamente à OTA foi determinada uma ingestão de 0,01 µg/Kg pc/dia (mediana) em que 14% dos participantes ultrapassaram a Ingestão Diária Tolerável. Apesar de se considerar que existe alguma incerteza na conversão de concentrações urinárias de OTA em ingestão, este padrão de exposição já tinha sido anteriormente reportado em Espanha e Itália (15,32).

Por ausência de valores de referência estabelecidos para a ingestão de AOH bem como de dados de toxicocinética obtidos em estudos de intervenção em humanos, a caracterização do risco decorrente da exposição a AOH não foi determinada. No entanto, e dado o potencial de disrupção endócrina reportado anteriormente (33,34), recomenda-se a reapreciação do risco associado a esta exposição.

Relativamente à CIT e FB<sub>1</sub>, a determinação da IDP foi apenas efetuada para as amostras positivas (CIT, n=2; FB<sub>1</sub>, n=7). Os resultados determinados para a ingestão diária de FB<sub>1</sub>, considerando duas taxas de excreção diferentes, sugerem ambos uma exposição superior à Ingestão Diária Tolerável. No entanto, uma vez que a excreção urinária de FB<sub>1</sub> é baixa e com elevada variabilidade inter-individual, a interpretação destes resultados deverá ser feita com precaução. Relativamente à CIT, um dos participantes excede ligeiramente o QP (1,05), mas dado que a taxa de excreção foi determinada em apenas dois indivíduos e com elevada variabilidade, a incerteza associada deverá ser tida em conta na análise destes resultados.

## \_Conclusões

O presente estudo permitiu, pela primeira vez, avaliar a exposição da população Portuguesa a micotoxinas, através de um estudo de biomonitorização humana e com a determinação de 37 biomarcadores urinários de exposição a micotoxinas. Os resultados obtidos evidenciaram a exposição da população Portuguesa a seis micotoxinas (DON, ZEN, OTA, AOH, CIT e FB<sub>1</sub>). Os resultados obtidos enfatizam a necessidade da avaliação das possíveis consequências da exposição às micotoxinas consideradas, tendo em conta que uma percentagem considerável dos participantes excede os valores guia disponíveis para uma ingestão considerada como tolerável relativamente a três micotoxinas (DON, OTA e ZEN). No entanto, e atendendo às diferentes fontes de incerteza associadas ao presente estudo, em especial no que concerne aos dados de excreção utilizados, os resultados deverão ser analisados com precaução e reavaliados assim que estejam disponíveis novos dados de toxicocinética.

O presente estudo contribui com dados que confirmam a exposição da população Portuguesa a micotoxinas, sendo imperativo esclarecer, em estudos futuros, quais os determinantes desta exposição.

## Agradecimentos

São devidos agradecimentos à FCT/MCTES pelo apoio financeiro ao CESAM (UID/AMB/50017/2019) através de fundos nacionais. Este trabalho é financiado por fundos nacionais através da FCT – Fundação para a Ciência e Tecnologia, I.P., no âmbito do projeto earlyMYCO (PTDC/MED-TOX/28762/2017). O IAN-AF foi financiado por EEA Grants Program, Public Health Initiatives (PT06-000088SI3).

Resultados incluídos na publicação:

Martins C, Vidal A, De Boevre M, De Saeger S, Nunes C, Torres D, Goios A, Lopes C, Assunção R, Alvito P (2019) Exposure assessment of Portuguese population to multiple mycotoxins: The human biomonitoring approach. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*. 222(6):913–25. Doi: 10.1016/j.ijheh.2019.06.010



Referências bibliográficas:

- (1) Bennett JW, Klich M. Mycotoxins. *Clin Microbiol Rev.* 2003;16(3):497–516. Doi: 10.1128/CMR.16.3.497.
- (2) Marín S, Cano-Sancho G, Sanchis V, Ramos AJ. The role of mycotoxins in the human exposome: Application of mycotoxin biomarkers in exposome-health studies. *Food Chem Toxicol.* 2018;121:504–18. Doi: 10.1016/j.fct.2018.09.039
- (3) De Ruyck, K., De Boevre, M., Huybrechts, I., De Saeger, S., 2015. Dietary mycotoxins, coexposure, and carcinogenesis in humans: short review. *Mutat. Res.* 766, 32–41. Doi: 10.1016/j.mrrev.2015.07.003.
- (4) Alvito P. Alterações do estado de saúde associados à alimentação - contaminantes químicos – micotoxinas. 2014; Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa, <http://hdl.handle.net/10400.18/2283>.
- (5) Abrunhosa, L., Morales, H., Soares, C., Calado, T., Vila-Chã, A.S., Pereira, M., Venâncio, A., 2016. A review of mycotoxins in food and feed products in Portugal and estimation of probable daily intakes. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 56, 249–265. Doi: 10.1080/10408398.2012.720619.
- (6) Assunção, R., Martins, C., Vasco, E., Jager, A., Oliveira, C., Cunha, S.C., Fernandes, J.O., Nunes, B., Loureiro, S., Alvito, P., 2018. Portuguese children dietary exposure to multiple mycotoxins – an overview of risk assessment under MYCOMIX project. *Food Chem. Toxicol.* 118, 399–408. Doi: 10.1016/j.fct.2018.05.040.
- (7) Martins, C., Assunção, R., Cunha, S.C., Fernandes, J.O., Jager, A., Petta, T., Oliveira, C.A., Alvito, P., 2018. Assessment of multiple mycotoxins in breakfast cereals available in the Portuguese market. *Food Chem.* 239, 132–140. Doi: 10.1016/j.foodchem.2017.06.088.
- (8) Alvito, P.C., Sizoo, E.A., Almeida, C.M.M., van Egmond H.P., 2010. Occurrence of aflatoxins and Ochratoxin A in Baby foods in Portugal. *Food Analytical Methods* 3, 1, 22-30 Doi: 10.1007/s12161-008-9064-x.
- (9) Barreira, M.J., Alvito, P.C., Almeida, C.M.M., 2010. Occurrence of patulin in apple-based-foods in Portugal. *Food Chemistry.* 121, 3, 653–658. Doi: 10.1016/j.foodchem.2009.12.085
- (10) Assunção, R., 2017. Children exposure to multiple mycotoxins through food consumption: a holistic approach for risk assessment. Tese Doutoramento, Universidade de Évora. <http://rdpc.uevora.pt/handle/10174/21305>
- (11) Heyndrickx, E., Sioen, I., Huybrechts, B., Callebaut, A., De Henauw, S., De Saeger, S., 2015. Human biomonitoring of multiple mycotoxins in the Belgian population: results of the BIOMYCO study. *Environ. Int.* 84, 82–89. Doi: 10.1016/j.envint.2015.06.011.
- (12) Choi, J., Mørck, T.A., Polcher, A., Knudsen, L.E., Joas, A., 2015. Review of the State of the Art of Human Biomonitoring for Chemical Substances and its Application to Human Exposure Assessment for Food. EFSA supporting Publication, pp. 321 2015:EN-724.
- (13) Duarte, S., Bento, J., Pena, A., Lino, C.M., Delerue-Matos, C., Oliva-Teles, T., Morais, S., Correia, M., Oliveira, M.B.P.P., Alves, M.R., Pereira, J.A., 2010. Monitoring of ochratoxin A exposure of the Portuguese population through a nationwide urine survey - winter 2007. *Sci. Total Environ.* 408, 1195–1198. Doi: 10.1016/j.scitotenv.2009.11.048.
- (14) Ali, N., Blaszkewicz, M., Degen, G.H., 2015. Occurrence of the mycotoxin citrinin and its metabolite dihydrocitrinone in urines of German adults. *Arch. Toxicol.* 89, 573–578. Doi: 10.1007/s00204-014-1363-y.
- (15) Vidal, A., Cano-Sancho, G., Marín, S., Ramos, A.J., Sanchis, V., 2016. Multidetec-tion of urinary ochratoxin A, deoxynivalenol and its metabolites: pilot time-course study and risk assessment in Catalonia, Spain. *World Mycotoxin J.* 9, 597–612. Doi: 10.3920/WMJ2015.2006.
- (16) WHO, 2010. Parma Declaration on Environment and Health. Disponível em: [http://www.euro.who.int/\\_data/assets/pdf\\_file/0011/78608/E93618.pdf](http://www.euro.who.int/_data/assets/pdf_file/0011/78608/E93618.pdf)
- (17) Lopes, C., Torres, D., Oliveira, A., Severo, M., Guiomar, S., Alarcão, V., Ramos, E., Rodrigues, S., Vilela, S., Oliveira, L., Mota, J., Teixeira, P.J., Nicola, P.J., Soares, S., Andersen, L.F., 2018. National food, nutrition, and physical activity survey of the Portuguese general population (2015–2016): protocol for design and development. *JMIR Res. Protoc.* 7, e42. Doi: 10.2196/resprot.8990.
- (18) Vidal, A., Claeys, L., Mengelers, M., Vanhoorne, V., Vervaet, C., Huybrechts, B., De Saeger, S., De Boevre, M., 2018. Humans significantly metabolize and excrete the mycotoxin deoxynivalenol and its modified form deoxynivalenol-3-glucoside within 24 hours. *Sci. Rep.* 8, 5255. Doi: 10.1038/s41598-018-23526-9.
- (19) Horvat, M., Sarigiannis, D., Handakas, E., Karakitsios, S., Gotti, A., 2017. Report on the optimal methodology for exposure reconstruction from HBM data Deliverable Report WP 12 - from HBM to exposure. Available from: <https://www.hbm4eu.eu/deliverables/>.
- (20) Steckling, N., Gotti, A., Bose-O'Reilly, S., Chapizanis, D., Costopoulou, D., De Vocht, F., Garí, M., Grimalt, J.O., Heath, E., Hiscock, R., Jagodic, M., Karakitsios, S.P., Kedikoglou, K., Kosjek, T., Leondiadis, L., Maggos, T., Mazej, D., Polańska, K., Povey, A., Rovira, J., Schoierer, J., Schuhmacher, M., Špirić, Z., Stajniko, A., Stierum, R., Tratnik, J.S., Vassiliadou, I., Annesi-Maesano, I., Horvat, M., Sarigiannis, D.A., 2018. Biomarkers of exposure in environment-wide association studies – opportunities to decode the exposome using human biomonitoring data. *Environ. Res.* 164, 597–624. Doi: 10.1016/j.envres.2018.02.041.
- (21) EFSA, 2013. International frameworks dealing with human risk assessment of combined exposure to multiple chemicals. *EFSA J.* 11, 3313. Doi: 10.2903/j.efsa.2013.3313.
- (22) Warth, B., Sulyok, M., Berthiller, F., Schuhmacher, R., Krška, R., 2013. New insights into the human metabolism of the Fusarium mycotoxins deoxynivalenol and zearalenone. *Toxicol. Lett.* 220, 88–94. Doi: 10.1016/j.toxlet.2013.04.012.
- (23) Degen, G.H., Ali, N., Gundert-Remy, U., 2018. Preliminary data on citrinin kinetics in humans and their use to estimate citrinin exposure based on biomarkers. *Toxicol. Lett.* 282, 43–48. Doi:10.1016/j.toxlet.2017.10.006.
- (24) Gambacorta, S., Solfrizzo, H., Visconti, A., Powers, S., Cossalter, A.M., Pinton, P., Oswald, I.P., 2013. Validation study on urinary biomarkers of exposure for aflatoxin B1, ochratoxin A, fumonisin B1, deoxynivalenol and zearalenone in piglets. *World Mycotoxin J.* 6, 299–308. Doi: 10.3920/WMJ2013.1549.
- (25) Turner, P.C., White, K.L.M., Burley, V.J., Hopton, R.P., Rajendram, A., Fisher, J., Cade, J.E., Wild, C.P., 2010. A comparison of deoxynivalenol intake and urinary Deoxynivalenol in UK adults. *Biomarkers* 15, 553–562. Doi: 10.3109/1354750X.2010.495787.
- (26) Van Der Westhuizen, L., Shephard, G.S., Burger, H.M., Rheeder, J.P., Gelderblom, W.C.A., Wild, C.P., Gong, Y.Y., 2011. Fumonisin B1 as a urinary biomarker of exposure in a Maize intervention study among South African subsistence farmers. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.* 20, 483–489. Doi: 10.1158/1055-9965.EPI-10-1002.
- (27) Riley, R.T., Torres, O., Showker, J.L., Zitomer, N.C., Matute, J., Voss, K.A., Gelineau-van Waes, J., Maddox, J.R., Gregory, S.G., Ashley-Koch, A.E., 2012. The kinetics of urinary fumonisin B1 excretion in humans consuming maize-based diets. *Mol. Nutr. Food Res.* 56, 1445–1455. Doi: 10.1002/mnfr.201200166.
- (28) Studer-Rohr, I., Schlatter, J., Dietrich, D.R., 2000. Kinetic parameters and intrain-dividual fluctuations of ochratoxin A plasma levels in humans. *Arch. Toxicol.* 74, 499–510. Doi: 10.1007/s002040000157.
- (29) Puntischer, H., Hankele, S., Tillmann, K., Attakpah, E., Braun, D., Kütt, M.-L., Del Favero, G., Aichinger, G., Pahlke, G., Höger, H., Marko, D., Warth, B., 2019. First insights into Alternaria multi-toxin in vivo metabolism. *Toxicol. Lett.* 301, 168–178. Doi: 10.1016/j.toxlet.2018.10.006.
- (30) Šarkanjan, B., Warth, B., Uhlig, S., Abia, W. a., Sulyok, M., Klapac, T., Krška, R., Banjari, I., 2013. Urinary analysis reveals high deoxynivalenol exposure in pregnant women from Croatia. *Food Chem. Toxicol.* 62, 231–237. Doi: 10.1016/j.fct.2013.08.043.
- (31) Ali, N., Degen, G.H., 2018. Urinary biomarkers of exposure to the mycoestrogen zearalenone and its modified forms in German adults. *Arch. Toxicol.* 92, 2691–2700. Doi: 10.1007/s00204-018-2261-5.
- (32) Solfrizzo, M., Gambacorta, L., Visconti, A., 2014. Assessment of multi-mycotoxin exposure in southern Italy by urinary multi-biomarker determination. *Toxins* 6, 523–538. Doi: 10.3390/toxins6020523.
- (33) Solfrizzo, M., 2017. Recent advances on Alternaria mycotoxins. *Curr. Opin. Food Sci.* 17, 57–61. Doi: 10.1016/j.cofs.2017.09.012.
- (34) Dellafiora, L., Warth, B., Schmidt, V., Del Favero, G., Mikula, H., Frohlich, J., Marko D., 2018. An integrated in silico/in vitro approach to assess the xenoestrogenic potential of Alternaria mycotoxins and metabolites. *Food Chem* 248:253–261. Doi: 10.1016/j.foodchem.2017.12.013.