UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

CAROLINA FERNANDA SENGLING CEBIN COPPA

**Avaliação da exposição às micotoxinas e caracterização do risco à saúde de
lactantes em Pirassununga/SP**

Pirassununga

2019

CAROLINA FERNANDA SENGLING CEBIN COPPA

**Avaliação da exposição às micotoxinas e caracterização do risco à saúde de
lactantes em Pirassununga/SP**

Versão corrigida

Tese apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Ciências da Engenharia de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Augusto Fernandes de Oliveira

Ficha catalográfica elaborada pelo
Serviço de Biblioteca e Informação, FZEA/USP,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

C785a Coppo, Carolina Fernanda Sengling Cebin
Avaliação da exposição às micotoxinas e
caracterização do risco à saúde de lactantes em
Pirassununga/SP / Carolina Fernanda Sengling Cebin
Coppo ; orientador Carlos Augusto Fernandes
Oliveira. -- Pirassununga, 2019.
180 f.

Tese (Doutorado - Programa de Pós-Graduação em
Engenharia de Alimentos) -- Faculdade de Zootecnia
e Engenharia de Alimentos, Universidade de São
Paulo.

1. Micotoxinas. 2. Ocorrência. 3. Alimentos. 4.
Leite materno. 5. Urina. I. Oliveira, Carlos
Augusto Fernandes , orient. II. Título.

CAROLINA FERNANDA SENGLING CEBIN COPPA

**Avaliação da exposição às micotoxinas e caracterização do risco à saúde de lactantes em
Pirassununga/SP**

Tese apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Ciências da Engenharia de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Augusto Fernandes de Oliveira

Data de Aprovação: ____/____/____

Banca Examinadora:

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Presidente da Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

AGRADECIMENTOS

Meu maior agradecimento e gratidão é à Deus, por me conceder saúde para trilhar todas as oportunidades que Ele colocou em meu caminho!

Ao meu orientador, Prof. Dr. Carlos Augusto Fernandes de Oliveira, pela paciência em me orientar e solucionar as minhas dúvidas durante todo o meu Doutorado, obrigada pelo meu projeto de pesquisa que, com certeza, não me proporcionou somente um crescimento profissional, mas com certeza um aprendizado pessoal! Minha sincera gratidão por tudo!

À Eliana Maria Bianchini Barnabé, por me acolher na Unidade Materno Infantil de Pirassununga, para a realização de todas as coletas das amostras de leite materno, urina e alimentos de todas as voluntárias do estudo. Obrigada por sua amizade e por me tratar com tanto zelo! E obrigada à todas as funcionárias que me acolheram de braços abertos, levarei cada uma de vocês no meu coração!!

À todas as mães que participaram desta pesquisa, sou grata à cada uma delas!

Ao meu marido, Eduardo Lechner Coppa, pelo companheirismo e amizade durante esta caminhada. Com você ao meu lado, tudo se torna mais leve! Obrigada por me incentivar e me apoiar em minhas decisões!

À minha mãe Maria Bernadete Sengling, se cheguei até aqui, devo à ela, por me educar e não medir esforços para fazer o melhor por mim. Obrigada por tudo!

À minha filha Júlia que, ainda na minha barriga durante a finalização do Doutorado, me dá ainda mais forças para alcançar os meus objetivos e a certeza de que por ela também, cheguei até aqui! Obrigada por me fazer sentir o que é o maior amor do mundo!

À minha amiga, Bruna Leonel Gonçalves, por sua amizade e companheirismo, não só profissional, mas em todos os momentos! Obrigada por tornar os meus dias mais alegres com suas risadas e os dias mais leves com suas palavras sinceras! Gratidão por ter você em minha vida!

À Amanda Cirelli pela amizade, cumplicidade e empenho, sempre de bem com a vida e disposta a ajudar. Sou grata por ter te conhecido!!

À Larissa Franco, Samuel Ferreira, Sarah Lee e à todos do laboratório de Microbiologia e Micotoxilogia de alimentos pela amizade, ajuda e risadas! Vocês estarão sempre em meu coração!

Ao Prof. Dr. Carlos Humberto Corassin e à Roice Rosim pela convivência e pela ajuda com os problemas que surgiram durante o Doutorado.

À Tânia Petta, por todo o suporte dado em solucionar problemas de validação dos métodos de análise.

À Liz Mary, do CENA/USP pelo suporte e ajuda com as análises de alimentos no moinho criogênico.

À FAPESP (Processo nº 2017/12956-2), pela concessão da bolsa de Doutorado.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

À todos os funcionários e professores da FZEA/USP que fizeram parte desta caminhada durante os 4 anos de Doutorado! Levarei cada pedacinho deste campus em meu coração!

À todos que, de alguma forma estiveram presentes em minha vida para que a conclusão desta pesquisa fosse possível e à todos que não citei aqui, mas que estão em meu coração e tem minha eterna gratidão!!! O meu muito obrigada por tudo!!!

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota.” [Madre Teresa de Calcutá]

ABSTRACT

COPPA, C. F. S. C. **Exposure assessment and health risk characterization of mycotoxins in lactating women from Pirassununga/SP**. 2019. 180 p. PhD Science Dissertation – School of Animal Science and Food Engineering, University of São Paulo, Pirassununga, 2019.

Mycotoxins are secondary metabolites produced by naturally occurring fungi in foods that can cause a wide variety of toxic effects on vertebrates, including humans. Lactating women constitute an important risk group considering not only the potential toxic effects of mycotoxins, but also the possibility of excretion of mycotoxin residues in breast milk. This study aimed to evaluate the exposure and risk characterization of lactating women ($N = 74$) from Pirassununga, Sao Paulo, Brazil, to aflatoxins (AFs), fumonisins (FBs), ochratoxin A (OTA) and zearalenone (ZEN) through food analysis versus consumption data and mycotoxin biomarkers in urine and breast milk. The volunteers provided samples of food stored and available at their homes from April 2018 to August 2019, totaling 184 samples. All samples were analyzed by mass spectrometry-coupled liquid chromatography (LC-MS/MS). The concentrations of AFs, OTA, ZEN and FBs exceeded their respective MPL in 11 (6%), 3 (2%), 8 (4%) and 5 (3%) samples, respectively. Twenty-eight samples (15%) were contaminated with two or three types of mycotoxins. Corn products contributed for the highest mean probable daily intakes (PDI) of AFs, ZEN and FBs (0.119 ± 0.193 , 0.325 ± 0.097 and 2.936 ± 1.541 $\mu\text{g/kg b.w./day}$, respectively), while wheat-based products contributed for the highest PDI value of OTA (0.035 ± 0.028 $\mu\text{g/kg b.w./day}$). The Margin of Exposure (MoE) based on food data for AFs (3.72) showed high exposure risk ($\text{MoE} < 10,000$), and Hazard Quotient (HQ) obtained for OTA (24.66), ZEN (4.24) and total FBs (5.01) also indicated a non-tolerable risk ($\text{HQ} > 1$) for these mycotoxins through food consumption. Mean PDI values based on urinary biomarkers were 1.58, 1.09, 5.07 and 0.05 $\mu\text{g/kg b.w./day}$ for AFM₁, DON, OTA and ZEN, respectively. $\text{HQ} > 1$ was observed for OTA (316.79) and DON (1.09). The MoE value for AFM₁ (1.50) based on the urinary-based PDI also indicated potential health risks. AFM₁ was not detected in breast milk. However, 6.7% of samples analyzed contained FBs and OTA at mean levels of 5.0 and 1.3 ng/mL, respectively. Although a low incidence of mycotoxins was observed in breast milk, results of this trial indicate high exposure levels of lactating women to dietary mycotoxins in the studied area.

Keywords: Mycotoxins. Occurrence. Food. Breast milk. Urine. Biomarkers. Risk assessment. LC-MS/MS analysis.

RESUMO

COPPA, C. F. S. C. **Avaliação da exposição às micotoxinas e caracterização do risco à saúde de lactantes em Pirassununga/SP**. 2019. 180 p. Tese de Doutorado – Universidade de São Paulo, Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Pirassununga, 2019.

Micotoxinas são metabólitos secundários produzidos por fungos que ocorrem naturalmente nos alimentos, capazes de causar uma grande variedade de efeitos tóxicos em vertebrados, incluindo seres humanos. Mulheres em aleitamento constituem um importante grupo de risco considerando não apenas os efeitos tóxicos potenciais das micotoxinas, mas também a possibilidade de excreção de resíduos de micotoxinas no leite materno. Este trabalho teve como finalidade avaliar a exposição e caracterizar o risco à saúde de mulheres lactantes ($N = 74$) de Pirassununga, São Paulo, Brasil, às aflatoxinas (AFs), fumonisinas (FBs), ocratoxina A (OTA) e zearalenona (ZEA) através de análise de alimentos versus dados de consumo e biomarcadores de micotoxinas na urina e no leite materno. As voluntárias forneceram amostras de alimentos armazenados e disponíveis em suas residências entre abril de 2018 à agosto de 2019, totalizando 184 amostras. Todas as amostras foram analisadas por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS/MS). As concentrações de AFs, OTA, ZEA e FBs excederam seus respectivos LMT em 11 (6%), 3 (2%), 8 (4%) e 5 (3%) amostras, respectivamente. Vinte e oito amostras (15%) foram contaminadas com dois ou três tipos de micotoxinas. Produtos à base de milho contribuíram para os maiores valores de ingestão diária provável (IDP) para AFs, ZEA e FBs (0.119 ± 0.193 , 0.325 ± 0.097 e 2.936 ± 1.541 $\mu\text{g/kg p.c./dia}$, respectivamente), enquanto que produtos à base de trigo contribuíram para o maior valor de IDP para OTA (0.035 ± 0.028 $\mu\text{g/kg p.c./dia}$). O valor da Margem de Exposição (MoE) baseada nos dados em alimentos para AFs (3,72) demonstrou alto risco de exposição (MoE < 10.000), e o Quociente de Risco (QR) obtido para OTA (24,66), ZEA (4,24) e FBs totais (5,01) também indicou um risco não tolerável (QR > 1) para essas micotoxinas através do consumo dos produtos alimentícios investigados. Os valores médios de IDP baseados em biomarcadores urinários foram 1,58, 1,09, 5,07 e 0,05 $\mu\text{g/kg p.c./dia}$ para AFM₁, DON, OTA e ZEA, respectivamente. Valores de QR > 1 foram observados para OTA (316,79) e DON (1,09). O valor da MoE para AFM₁ (1,50) calculada em relação ao valor de IDP obtido em amostras de urina, também indicou riscos potenciais à saúde. AFM₁ não foi detectada no leite materno. No entanto, 6,7% das amostras apresentaram FBs e OTA em concentrações médias de 5,0 e 1,3 ng/mL, respectivamente. Embora uma baixa incidência de micotoxinas tenha sido observada

no leite materno, os resultados do presente estudo indicam uma alta exposição de mulheres em lactação da área estudada às micotoxinas através da dieta.

Palavras-chave: Micotoxinas. Ocorrência. Alimentos. Leite materno. Urina. Biomarcadores. Avaliação de risco. Análise por CLAE-EM/EM.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estruturas químicas das aflatoxinas B ₁ , B ₂ , G ₁ e G ₂	18
Figura 2 - Estrutura química da ocratoxina A.	23
Figura 3 - Estrutura química das fumonisinas.	24
Figura 4 - Estrutura química da zearalenona (a) e seus metabólitos, α -zearalenol (R ₁ =OH e R ₂ =H) e β -zearalenol (R ₁ =H e R ₂ =OH) (b).	26
Figura 5 - Estrutura química do deoxinivalenol (DON).	28
Figura 6 - Fluxograma da pesquisa bibliográfica, critérios de inclusão e exclusão e coleta de dados.	78

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Níveis máximos permitidos para micotoxinas em alimentos para consumo humano, em diferentes países.....	37
Quadro 2 - Estudos sobre biomarcadores urinários para exposição às múltiplas micotoxinas em populações humanas.....	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Incidências de AFM ₁ no leite materno em diferentes países.....	41
Tabela 2 - Incidências de OTA no leite materno em diferentes países.	44
Tabela 3 - Ocorrência de aflatoxina M ₁ no leite materno em diferentes países de 2008 à fevereiro de 2019.	82
Tabela 4 - Ocorrência de OTA no leite materno em diferentes países de 2008 à fevereiro de 2019.	86
Tabela 5 - Regulamentos para micotoxinas em alimentos destinados ao consumo infantil em vários países.....	90
Tabela 6 - Ocorrência de micotoxinas em fórmulas infantis em diferentes países de 2008 à fevereiro de 2019.	91
Tabela 7 - Ocorrência de micotoxinas em produtos à base de frutas em diferentes países de 2008 à fevereiro de 2019.	93
Tabela 8 - Ocorrência de micotoxinas em produtos à base de cereais em diferentes países de 2008 à fevereiro de 2019.	95
Tabela 9 - Parâmetros analíticos do espectrômetro de massas para determinação de micotoxinas em arroz, feijão, trigo, milho e produtos derivados.....	126
Tabela 10 - Ocorrência de micotoxinas em amostras de alimentos consumidas por lactantes de Pirassununga, Brasil.	130
Tabela 11 - Co-ocorrência de micotoxinas em amostras de alimentos consumidas por lactantes de Pirassununga, estado de São Paulo, Brasil.	131
Tabela 12 - Ingestão diária provável (IDP) com base nos níveis de micotoxinas em alimentos consumidos por mulheres lactantes em Pirassununga, estado de São Paulo, Brasil.	132
Tabela 13 - Caracterização do risco de micotoxinas através da determinação do Quociente de Risco (HQ) e Margem de Exposição (MoE), com base nos dados de ocorrência em alimentos consumidos por lactantes em Pirassununga, estado de São Paulo, Brasil.....	134
Tabela 14 - Parâmetros de desempenho do método analítico para determinação de micotoxinas no leite.	151
Tabela 15 - Parâmetros de desempenho do método para determinação de biomarcadores de micotoxinas em amostras de urina.	152
Tabela 16 - Níveis de micotoxinas em amostras de leite materno (N=74) de lactantes voluntárias do município de Pirassununga/SP.	154

Tabela 17 - Níveis de micotoxinas em amostras de urina ($N=74$) de mulheres lactantes de Pirassununga, São Paulo, Brasil.	154
Tabela 18 - Ingestão diária provável (IDP) de micotoxinas com base nos respectivos níveis urinários de mulheres lactantes de Pirassununga, São Paulo, Brasil ¹	155
Tabela 19 - Caracterização do risco de micotoxinas através da determinação do Quociente de Perigo (HQ) com base nos dados de ocorrência em biomarcadores urinários de mulheres lactantes de Pirassununga, São Paulo, Brasil ¹	156
Tabela 20 - Caracterização do risco de aflatoxinas através da determinação da Margem de Exposição (MoE), com base nos dados de ocorrência em biomarcadores urinários de lactantes de Pirassununga, São Paulo, Brasil ¹	156

SUMÁRIO

1 Introdução	15
1.1 Objetivos Gerais	17
1.2 Revisão de Literatura	17
1.2.1 Características e efeitos tóxicos das principais micotoxinas	17
1.2.1.1 Aflatoxinas	17
1.2.1.2 Ocratoxina A	21
1.2.1.3 Fumonisinias	23
1.2.1.4 Zearalenona	25
1.2.1.5 Deoxinivalenol	27
1.2.2 O problema da exposição humana às aflatoxinas	28
1.2.3 Exposição humana à AFM ₁ no leite	31
1.2.4 Exposição humana às demais micotoxinas	34
1.2.5 Avaliação da exposição infantil às micotoxinas alimentares	38
1.2.6 Exposição de lactantes às micotoxinas no leite materno	39
1.2.6.1 Aflatoxina M ₁	39
1.2.6.2 Demais micotoxinas	42
1.2.7 Biomarcadores de exposição às micotoxinas	45
1.2.8 Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS/MS)	51
1.2 Referências	55
2 Capítulo 1: Ocorrência de micotoxinas no leite materno, produtos à base de frutas e fórmula infantil à base de cereais: uma revisão	73
2.1 Introdução	74
2.2 Estratégia de busca	77
2.2.1 Coleção de dados	77
2.2.2 Critérios de inclusão e exclusão	77
2.3 Prevalência de micotoxinas no leite materno	79

2.3.1 Aspectos fisiológicos da síntese do leite materno e excreção de micotoxinas	79
2.3.2 Prevalência de aflatoxina M ₁	80
2.3.3 Prevalência de ocratoxina A	85
2.3.4 Prevalência de outras micotoxinas.....	87
2.4 Prevalência de micotoxinas em alimentos infantis	88
2.4.1 Aspectos regulatórios das micotoxinas em alimentos infantis	88
2.4.2 Prevalência de micotoxinas na fórmula infantil	89
2.4.3 Prevalência de micotoxinas em produtos à base de frutas	92
2.4.4 Prevalência de micotoxinas em produtos à base de cereais	93
2.5 Avaliação da exposição e caracterização de risco de micotoxinas na dieta de bebês e crianças pequenas	99
2.6 Desafios e implicações de múltiplas micotoxinas em alimentos para bebês	100
2.7 Considerações finais	101
3 Capítulo 2: Avaliação da exposição alimentar e da caracterização de risco de mulheres lactantes às micotoxinas: Estudo de caso do Estado de São Paulo, Brasil	119
3.1 Introdução	121
3.2 Material e Métodos	123
3.2.1 Reagentes e soluções	123
3.2.2 Amostragem.....	123
3.2.3 Preparo das amostras	124
3.2.4 Condições da cromatografia líquida e do espectrômetro de massas.....	124
3.2.5 Questionário de Frequência Alimentar	127
3.2.6 Caracterização de risco	127
3.3 Resultados e discussão.....	128
3.3.1 Ocorrência de micotoxinas em amostras de alimentos.....	128
3.3.2 Estimativa da ingestão de micotoxinas e caracterização de risco.....	131
3.4 Conclusão.....	134

4 Capítulo 3: Ocorrência de micotoxinas no leite materno e caracterização de risco de mulheres lactantes utilizando biomarcadores urinários no Brasil.....	139
4.1 Introdução	140
4.2 Material e métodos.....	142
4.2.1 Informações básicas do estudo	142
4.2.2 Amostragem.....	143
4.2.3 Questionário de Frequência Alimentar	143
4.2.4 Reagentes e soluções	144
4.2.5 Preparo das amostras de urina	144
4.2.6 Preparo das amostras de leite materno.....	145
4.2.7 Condições da cromatografia líquida e do espectrômetro de massas	146
4.2.8 Desempenho dos métodos analíticos	146
4.2.9 Análises de creatinina em urina humana	148
4.2.10 Avaliação da exposição (estimativas de ingestão diária provável) e caracterização de risco.....	148
4.3 Resultados	150
4.3.1 Desempenho dos métodos analíticos	150
4.3.2 Ocorrência de micotoxinas no leite materno	153
4.3.3 Ocorrência de biomarcadores de micotoxinas em urina humana	154
4.3.4 Estimativa da exposição às micotoxinas através de níveis urinários.....	155
4.3.5 Caracterização de risco	155
4.4 Discussão e conclusão	157
4.4.1 Desempenho dos métodos analíticos	157
4.4.2 Biomarcadores de micotoxinas no leite materno	158
4.4.3 Biomarcadores de micotoxinas em urina humana	160
4.4.4 Estimativa da exposição às micotoxinas através de níveis urinários.....	160
4.4.5 Caracterização de risco	161

5 Considerações finais	168
ANEXOS	170

1 Introdução

As micotoxinas são metabólitos secundários produzidos por alguns fungos filamentosos que podem causar efeitos adversos sobre os seres humanos e várias espécies animais, resultando em doenças e até em perdas econômicas (ZAIN, 2011). Os principais fungos toxigênicos pertencem aos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*, e as classes de micotoxinas produzidas por esses gêneros são as aflatoxinas (*Aspergillus*), ocratoxinas (*Aspergillus* e *Penicillium*), tricotecenos e fumonisinas (*Fusarium*) (BRYDEN, 2007). Em regiões onde o clima é quente e úmido, a produção de micotoxinas ocorre mais frequentemente devido às condições favoráveis para o seu desenvolvimento, mas, em zonas temperadas, também pode ocorrer a produção de algumas micotoxinas (Council for Agricultural Science and Technology - CAST, 2003). Fatores como a disponibilidade de substrato, infestação por insetos ou outros animais, atividade de água e condições de armazenamento, como temperatura e umidade, levam à contaminação por fungos (BHATNAGAR; YU; ERLICH, 2002; MAGAN; ALDRED, 2007).

A contaminação por micotoxinas em alimentos representa um problema grave para a saúde pública, uma vez que podem originar uma variedade de efeitos tóxicos que levam a doenças crônicas e alguns episódios agudos (WILD; GONG, 2010). As mulheres grávidas exigem uma atenção especial devido à capacidade teratogênica de algumas micotoxinas e a maior susceptibilidade das crianças aos seus efeitos tóxicos. Os bebês são considerados mais suscetíveis a diferentes toxinas em relação aos adultos devido ao menor peso corporal, maiores taxas metabólicas, menor capacidade de desintoxicar e por desenvolvimento incompleto de alguns órgãos e tecidos (ETZEL, 2006). Quando as mães ingerem alimentos contaminados, as micotoxinas podem ser transferidas para o leite materno e expor os bebês aos seus efeitos tóxicos (JONSYN, 1999; HASSAN et al., 2006; BIASUCCI et al. 2011). A exposição dos lactentes à AFM₁ é uma situação muito preocupante porque esta micotoxina é cancerígena, de acordo com estudos disponíveis na literatura. Embora outras micotoxinas possam ser excretadas no leite, a exposição infantil às outras micotoxinas é mais provável que ocorra no momento da introdução de alimentos para bebês na dieta. Em Portugal, Alvito et al. (2010) observaram a co-ocorrência de aflatoxinas e ocratoxina A em alimentos para bebês e patulina em alimentos à base de maçã (BARREIRA; ALVITO; ALMEIDA 2010). Outro problema é a falta de estudos que demonstrem os efeitos pré-natais e pós-natais sobre a saúde dos seres humanos. Geralmente, a capacidade de biotransformação de carcinogênicos em recém-nascidos é mais lenta do que em adultos, resultando em maior tempo de circulação de produtos químicos (SADEGHI et al., 2009).

A exposição infantil às micotoxinas foi avaliada com base na ingestão de alimentos, também conhecida como "exposição externa" ou "dose oral". O método mais comum de avaliação da ingestão dietética baseia-se na ocorrência do contaminante em produtos alimentares e nos dados de consumo. Vários relatórios sobre a ocorrência de micotoxinas no leite humano e nos alimentos para bebês indicaram possíveis riscos para a saúde das crianças (ASSUNÇÃO et al., 2015, MILIĆEVIĆ; ŠKRINJAR; BALTIĆ, 2010). Devido às limitações inerentes a essa abordagem, os biomarcadores foram propostos como uma alternativa adequada, para uma avaliação mais precisa da exposição ao nível individual. Os biomarcadores de soro para aflatoxinas têm sido usados para avaliar a exposição dos lactentes em estudos epidemiológicos em países da África (HEYNDRICKX et al., 2015). A formação de micotoxinas não é um processo contínuo, porém, deve-se levar em consideração que se no ambiente existir um fungo capaz de produzir a toxina, esta estará presente no alimento e, ainda que o fungo esteja ausente no alimento, a toxina pode estar presente e ativa (FERREIRA et al., 2006).

Dado o exposto, o conhecimento sobre a exposição às micotoxinas em leite materno e de como contribui para a carga de doenças causada por micotoxinas, é de grande importância para fornecer informações úteis e precisas para a avaliação de risco às micotoxinas em populações humanas infantis. Neste contexto, o presente trabalho teve a finalidade de avaliar a exposição de lactantes às principais micotoxinas que podem ocorrer na dieta, bem como caracterizar o risco associado a esta exposição através da análise dos alimentos e da determinação de biomarcadores na urina e no leite materno de voluntárias do município de Pirassununga, Estado de São Paulo.

1.1 Objetivos

O objetivo geral desta pesquisa foi avaliar a exposição de mulheres lactantes às principais micotoxinas que ocorrem nos alimentos no Brasil (aflatoxinas, fumonisinas, ocratoxina A, zearalenona e deoxinivalenol), bem como caracterizar o risco à saúde, através da análise dos alimentos e da determinação de biomarcadores de exposição às micotoxinas mencionadas na urina e no leite materno de lactantes voluntárias da região de Ribeirão Preto, Estado de São Paulo, por meio dos seguintes objetivos específicos:

- a. Aplicação de metodologia analítica previamente validada para a determinação simultânea de 9 micotoxinas [aflatoxinas (B_1 , B_2 , G_1 e G_2), fumonisinas (FB_1 e FB_2), ocratoxina A (OTA), zearalenona (ZEA) e deoxinivalenol (DON)] em produtos alimentícios (arroz, feijão, trigo, amendoim, milho e derivados), consumidos pelas voluntárias do estudo;
- b. Aplicação de metodologia analítica previamente validada para a determinação simultânea de biomarcadores de micotoxinas na urina das voluntárias do estudo, como se segue: aflatoxinas (M_1 , P_1 , Q_1), FB_1 , OTA, DON, DOM-1, ZEA, α -ZOL e β -ZOL;
- c. Validação de metodologia analítica (com exceção de AFM_1 , cujo método já estava validado) para a determinação simultânea de resíduos de micotoxinas (FB_1 , OTA, DON, DOM-1, ZEA, α -ZOL e β -ZOL) em leite, e determinação dos níveis dessas micotoxinas no leite das voluntárias do estudo;
- d. Determinação da ingestão diária provável das micotoxinas pelas lactantes, estimada a partir das concentrações das micotoxinas nos alimentos versus dados de consumo e através dos biomarcadores urinários, bem como caracterizar o risco à saúde associado.

1.2 Revisão de Literatura

1.2.1 Características e efeitos tóxicos das principais micotoxinas

Embora tenham sido identificados mais de 300 metabólitos secundários tóxicos produzidos por fungos, as principais micotoxinas que ocorrem nos alimentos são aflatoxinas, ocratoxina A (OTA), fumonisinas, zearalenona (ZEA), deoxinivalenol (DON) e patulina (PAT) (MURPHY et al., 2006).

1.2.1.1 Aflatoxinas

As aflatoxinas são metabólitos secundários produzidos por certos fungos do gênero *Aspergillus*, os quais podem causar efeitos hepatotóxicos e cancerígenos em animais e seres humanos, por exposição através da ingestão de alimentos contaminados, especialmente grãos e cereais, como milho, trigo, amendoim, entre outros (OLIVEIRA et al., 2009). De acordo com Moss (1998), foram identificados cerca de dezoito tipos diferentes de aflatoxinas, mas apenas a aflatoxina B₁ (AFB₁), aflatoxina B₂ (AFB₂), aflatoxina G₁ (AFG₁) e aflatoxina G₂ (AFG₂) foram detectadas como contaminantes naturais nos alimentos, como a AFB₁, considerada a mais tóxica. As aflatoxinas são solúveis em solventes, como o metanol, benzeno e clorofórmio, têm baixo peso molecular e um amplo espectro de toxicidade (FERREIRA et al., 2006; MIDIO; MARTINS, 2000). De acordo com a Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (International Agency for Research on Cancer - IARC), a AFB₁ é considerada um carcinógeno do Grupo 1, responsável pela formação do carcinoma hepatocelular em humanos (ZAIN, 2011; BARKAI-GOLAN, 2008). A Figura 1 apresenta as estruturas químicas das aflatoxinas:

Figura 1 - Estruturas químicas das aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂.

Fonte: ANDRADE, P. D. **Aflatoxinas e ocratoxina A na dieta de lactentes e adultos: desenvolvimento de metodologia e avaliação da exposição**. 2012. 116 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade de Brasília, Faculdade de Ciências da Saúde, Brasília, 2013; INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. **Some traditional**

herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene. Lyon: IARC, 2002. (IARC Monograph on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, v. 82).

Os compostos apresentados na Figura 1 se caracterizam por sua elevada toxicidade e, na saúde animal, espécies domésticas ou de experimentação são sensíveis aos seus efeitos tóxicos, onde o fígado é o principal órgão atingido (OSWEILER, 1990). A AFB₁ é a que apresenta maior poder toxigênico, seguida da G₁, B₂ e G₂ (COULOMBE, 1991). No que diz respeito à saúde pública, as aflatoxinas estão envolvidas na etiologia do câncer hepático no homem, justamente devido à ingestão de alimentos contaminados (BOSCH; PEERS, 1991; IARC, 1987). Ainda há evidências de sua associação com outras doenças, como a síndrome de Reye (ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD, 1983) e o kwashiorkor (HENDRICKSE, 1991).

Alguns fatores, como toxicidade composta, período de permanência de toxinas no organismo, concentração, peso corporal, entre outros, têm impactos muito sérios para a saúde em seres humanos e animais (KUIPER-GOODMAN, 1991; BENNETT; KLICH, 2003). De acordo com Dales e Miller (2002), embora a maioria das ocorrências de micotoxicoses tenham sido associadas à ingestão de alimentos contaminados, verificou-se que as micotoxinas podem estar presentes no ar (contaminação por inalação) e também gerar doenças (MILIĆEVIĆ; ŠKRINJAR; BALTIĆ, 2010).

Em animais, como as aves, por exemplo, as aflatoxinas podem causar danos ao fígado, além de prejuízos na produtividade e eficiência reprodutiva, maior suscetibilidade às doenças, redução na produção de ovos e qualidade abaixo do esperado da carcaça. Já os suínos, são menos sensíveis em relação às aves (IAMANAKA, 2010). No gado, os primeiros sintomas são atribuídos à redução de peso, danos ao fígado e rim, além de afetar a produção de leite (IAMANAKA, 2010).

A doença causada pela ingestão de alimentos contaminados com aflatoxinas é conhecida como aflatoxicose, a qual pode ser aguda (quando há o dano direto no fígado, podendo causar até a morte), ou crônica (risco de câncer) (ANDRADE, 2012). Os sinais de intoxicação por aflatoxinas vão depender de sua concentração no alimento, tempo de ingestão e tipo da aflatoxina (DOERR; HAMILTON, 1983).

Segundo Bhat, Ravishankar e Karim (2010) e Oliveira e Germano (1997) foram identificados cerca de 18 diferentes tipos de aflatoxinas, sendo as de maior interesse médico-sanitário as aflatoxinas B₁ (AFB₁), B₂ (AFB₂), G₁ (AFG₁) e G₂ (AFG₂). Estas toxinas são

resultantes do metabolismo fúngico, no entanto, aflatoxicol, AFM₁, AFM₂ e AFQ₁ são produtos resultantes da biotransformação hepática da AFB₁ (SPINOSA; GÓRNIK; PALERMO-NETO, 2008). A biotransformação da AFB₁ é considerada uma forma de desintoxicação, uma vez que os efeitos tóxicos dos metabólitos derivados são menores que os da AFB₁ (OLIVEIRA; CORASSIN, 2014; SPINOSA; GÓRNIK; PALERMO-NETO, 2008).

De acordo com a Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC), as aflatoxinas se classificam no Grupo 1, pois estudos já comprovaram evidências, tanto em animais quanto em humanos, das propriedades carcinogênicas desta classe de contaminantes (IARC, 1993). De acordo com Oliveira e Germano (1997) e Ogido (2003), há um grande número de especialistas que dizem que a AFB₁ é, na verdade, um pró-carcinogênico, o qual necessita de ativação metabólica para manifestar seus efeitos tóxicos.

Após a ingestão de AFB₁, esta é biotransformada no fígado pelo sistema enzimático do citocromo P450, e as principais reações envolvidas neste processo são hidroxilação, oxidação e demetilação. O produto considerado altamente tóxico, cancerígeno e mutagênico, é AFB₁-8,9-epóxido (AFBO). A AFM₁ também é considerada tóxica, mas AFP₁, AFQ₁ e AFB₂ são praticamente não tóxicas (WU et al., 2009). Quando o processo de biodegradação ocorre, o produto AFBO pode se ligar às macromoléculas das células, principalmente ao material genético, como proteínas e DNA, resultando em adutos com ácidos nucleicos (MURPHY et al., 2006).

A ingestão de AFB₁ por animais em lactação através de alimentos contaminados leva à excreção de AFM₁ no leite (PARK; POHLAND, 1986). Isso se torna um problema sério para a saúde pública porque o leite mostrou ser um veículo para a introdução de AFM₁ na dieta humana. A possível presença desta micotoxina no leite e nos produtos lácteos é preocupante, uma vez que esses alimentos são consumidos por crianças, que são mais suscetíveis aos efeitos das toxinas (SHUNDO et al., 2009). A AFM₁ é o principal produto hidroxilado da AFB₁ produzida no fígado pelo citocromo P450 1A2 (CYP1A2) e é excretado na urina e fezes, leite de vaca leiteira e, também, no leite materno de mulheres potencialmente expostas às aflatoxinas através de alimentos contaminados (IARC, 2002).

Estudos conduzidos por Blunden et al. (1991) demonstraram que as aflatoxinas estavam presentes em tecidos de crianças com síndrome de Kwashiorkor e Reye, doença caracterizada por encefalopatia e deterioração visceral, resultando em um aumento do fígado e edema cerebral. Kwashiorkor está associada às aflatoxinas, causando uma forma de desnutrição protéico-energética e alguns sintomas estão associados aos efeitos patológicos da micotoxina em animais (ZAIN, 2011). Além disso, em outro estudo publicado por Turner et al. (2003), houve uma associação com os níveis reduzidos de imunoglobulina secretora A (IgA) em crianças gambianas e exposição às aflatoxinas.

Campagnollo et al. (2016) publicaram uma extensa revisão sobre a ocorrência mundial de AFM₁ em leite comercial e produtos lácteos, concluindo que a incidência global de AFM₁ é alta, embora em baixos níveis de contaminação.

Como as aflatoxinas são genotóxicas, não há consumo diário máximo tolerável (TDI) recomendado para esses compostos. Portanto, limites de tolerância para aflatoxinas nos gêneros alimentícios foram adotados em todo o mundo em níveis tão baixos quanto possível. Os regulamentos de aflatoxina em vários países estabelecem níveis de até 30 µg/kg para AFB₁ ou aflatoxinas totais (AFB₁ + AFB₂ + AFG₁ + AFG₂) em amendoim, milho e outros cereais destinados ao consumo humano (OLIVEIRA et al., 2014). Para a AFM₁ no leite, os Estados Unidos e os países europeus adotaram os limites de tolerância de 0,5 µg/L e 0,05 µg/L, respectivamente (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION, 2004). São estabelecidos regulamentos estritos para AFB₁ (máximo: 0,1 µg/kg) em alimentos à base de cereais processados e alimentos para bebês e crianças pequenas e para AFM₁ em fórmulas para lactentes e fórmulas de seguimento (máximo: 0,025 µg/kg) na Europa (EUROPEAN COMMISSION, 2006).

1.2.1.2 Ocratoxina A

De acordo com Pittet (1998), a OTA é uma micotoxina nefrotóxica e nefrocarcinogênica produzida pelo *Penicillium verrucosum* em climas temperados ou frios e por espécies do gênero *Aspergillus* em partes mais quentes e tropicais do mundo, os quais podem contaminar o café, cacau, feijão e frutos secos (European Food Safety Authority - EFSA, 2006; World Health Organization - WHO, 2008). A ocratoxicose é a doença causada pela exposição à OTA, sendo como seu principal alvo o rim. Diversos estudos epidemiológicos demonstram que a OTA pode estar envolvida na patogênese de várias formas de nefropatias humanas, além do câncer de rim (IARC, 1993; MARQUARDT; FROHLICH, 1992; RINGOT et al., 2006). A principal

preocupação em relação a essa micotoxina é a falta de estudos epidemiológicos em humanos, já que é considerada uma substância cancerígena e, alguns estudos relataram que a OTA é rapidamente absorvida após a administração oral em várias espécies animais (VETTORAZZI; GONZÁLEZ-PEÑAS; LÓPEZ de CERAIN, 2014). Segundo Koynarski et al. (2007) e Galvano, Galofaro e Galvano (1996), as alterações degenerativas das células epiteliais do fígado e dos rins poderia ser explicado pela via de eliminação de OTA através desses órgãos e que a exposição infantil a essa micotoxina pode ter início durante o pré-natal.

Segundo Borchers et al. (2010), a absorção de OTA ocorre na parte superior do trato gastrointestinal, variando entre 40-66% em várias espécies animais. No sangue, pode permanecer ligada às proteínas e se espalhar para os rins, músculos e fígado, e ter uma meia-vida estipulada em 35 dias. Nos ruminantes, a OTA é rapidamente degradada por microorganismos no rúmen à ocratoxina α (OT α) e à fenilalanina (BOUDRA; MORGAVI, 2006). No entanto, a OTA pode ser excretada sem metabolização em leite de não ruminantes, animais em lactação expostos à toxina em alimentos, especialmente no leite materno (MICCO et al., 1991; NAVAS; SABINO; RODRIGUEZ-AMAYA, 2005; AFSHAR et al., 2013). A toxicidade da OTA é motivo de preocupação para a saúde pública, uma vez que possui um potencial carcinogênico para os seres humanos e ainda há a falta de estudos que demonstrem os mecanismos tóxicos desta micotoxina. Além disso, os animais que permaneceram expostos a longo prazo à OTA apresentaram incidência de tumores, aumentando a preocupação com a exposição humana, já que foi classificada pelo IARC como um possível carcinógeno humano (grupo 2B). A contaminação por OTA pode causar alterações degenerativas nas células epiteliais dos rins e do fígado, provavelmente devido à eliminação da OTA através desses órgãos (KOYNARSKI et al., 2007; AFSHAR et al., 2013).

A Figura 2 apresenta a estrutura química da OTA:

Figura 2 - Estrutura química da ocratoxina A.

Fonte: ARAUJO, L. **Validação de um método para detecção simultânea de zearalenona, ocratoxina A e aflatoxina B₁ e avaliação do efeito do processamento do pão sobre os níveis destas micotoxinas.** 2014. 51p. Trabalho de conclusão de curso (Engenharia de Alimentos) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Porto Alegre, 2014.

O TDI máximo de OTA é de 17 ng/kg de peso corporal/dia (Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos, 2006) e o nível de tolerância estabelecido para a OTA em produtos alimentares em muitos países está na faixa de 2,0 a 10,0 µg/kg. No entanto, um limite inferior de 0,5 µg/kg foi adotado na Europa para alimentos processados à base de cereais e alimentos para bebês e crianças pequenas (EUROPEAN COMMISSION, 2006).

1.2.1.3 Fumonisinhas

As fumonisinas são produzidas por *Fusarium verticillioides* e *Fusarium proliferatum*, os principais contaminantes do milho e seus derivados (BOLGER et al., 2001). A fumonisina B₁ (FB₁) é a micotoxina mais tóxica deste grupo, a qual foi considerada pelo IARC (2002) como um possível carcinógeno para humanos (Grupo 2B) e, por isso, alguns estudos mostraram que a exposição às fumonisinas pode levar ao câncer de esôfago (RICHARD, 2007). De acordo com o IARC (2002), demonstrou-se que a FB₁ é hepatotóxica e nefrotóxica em todos os estudos conduzidos com animais. Assim, de acordo com Magoha et al. (2014), a exposição do leite materno às fumonisinas através de mães que foram expostas às micotoxinas através de alimentos, pode ter o mesmo efeito em lactentes com menos de 6 meses de idade.

A fumonisina B₁ pode ser encontrada em mais de 70% das amostras contaminadas com fumonisinas, seguida da FB₂ e FB₃, porém, em níveis menores (FANELLI et al., 2013). A FB₁ se caracteriza por um pó branco higroscópico solúvel em água, acetonitrila ou metanol, é estável

em acetonitrila-água (1:1) e instável em metanol, além de ser, na maioria das vezes, resistente às temperaturas de processamento de alimentos e à luz (IARC, 2002).

Em relação ao mecanismo de toxicidade das fumonisinas, há hipóteses de que estas micotoxinas interferem no metabolismo dos esfingolipídeos, mas esta explicação ainda não foi totalmente elucidada (BORDIN, 2015). Os esfingolipídeos são uma classe de lipídeos que podem ser encontrados nas células eucariotas, os quais tem como função, regular as funções celulares. Cerca de 300 esfingolipídeos já foram identificados e são caracterizados por possuírem uma longa cadeia principal, conhecida como base esfingóide (STOCKMANN-JUVALA; SAVOLAINEN, 2008). Nos mamíferos, a Esfingosina (So) e a Esfinganina (Sa), são as bases esfingóides mais comuns. Geralmente, a concentração de So pode variar de três a cinco vezes maior em relação à de Sa, sendo que a manutenção de baixas concentrações de So e Sa são importantes, já que estes compostos possuem uma atividade biológica intrínseca significativas (RILEY et al., 2001; SILVA et al., 2008).

Na Figura 3, é possível verificar a estrutura química das fumonisinas:

Figura 3 - Estrutura química das fumonisinas.

Fonte: BORDIN, K. **Avaliação de biomarcadores de exposição humana à fumonisina B₁ nos alimentos em municípios dos estados de São Paulo e Santa Catarina, Brasil.** Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo, Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Pirassununga, 2015.

De acordo com Riley et al. (1994) e Stockmann-Juvala e Savolainen (2008), estudos demonstraram que a FB₁ pode ser nefrotóxica em ratos e coelhos. Já em humanos, segundo o

WCRF (2014), o câncer esofágico é considerado o oitavo tipo de câncer mais comum no mundo. O uso do tabaco, o vírus do papiloma humano (HPV), consumo de bebidas alcoólicas e obesidade podem estar relacionados à doença (World Cancer Research Fund International - WCRF, 2014).

Em um estudo de Kimanya et al. (2010), foi relatado uma associação inversa entre o crescimento linear e a exposição às fumonisinas em crianças com idades entre 6 – 8 meses, as quais foram expostas a níveis acima do limite de ingestão diária de 2 mg/kg de peso corporal, estabelecido pelo JECFA (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives). A exposição das mães às fumonisinas por meio de alimentos contaminados pela micotoxina, poderia causar o mesmo efeito às crianças lactentes, que deveriam ser alimentadas exclusivamente com o leite materno. Em um estudo realizado por Magoha et al. (2014), os autores avaliaram a contaminação da fumonisina (FB₁) no leite materno e a exposição de crianças lactentes menores de 6 meses em Rombo, no norte da Tanzânia. Foram coletadas para o estudo cerca de 131 amostras de leite de mães lactantes dessa região e, destas, 58 (44,3%) estavam contaminadas com FB₁, sendo que 10,3% estavam acima do limite de 200 ppb para as fumonisinas na alimentação dos lactentes. De acordo com Cherkani-Hassani, Mojemmi e Mouane (2016), o estudo descrito é o primeiro acerca da contaminação de FB₁ e exposição de crianças à micotoxina no leite materno.

A biodisponibilidade oral de FB₁ em várias espécies animais testadas é inferior a 6% (MARTINEZ-LARRANAGA et al., 1999). Embora seja esperada uma menor excreção de níveis detectáveis de FB₁ do que AFM₁ ou OTA no leite, Magoha et al. (2014) observaram resíduos de FB₁ no leite materno de mães que foram expostas a dietas contaminadas com FB₁, na Tanzânia. Com base nos efeitos nefrotóxicos da FB₁, a Organização Mundial de Saúde (WHO) (2002) recomendou um TDI máximo provisório de 2,0 µg/kg de peso/dia corporal. Os regulamentos europeus para a fumonisina em alimentos à base de milho estabelecem limites de tolerância que variam de 400 a 2.000 µg/kg, com exceção de alimentos processados à base de milho e alimentos para bebês e crianças pequenas (200 µg/kg) (EUROPEAN COMMISSION, 2006).

1.2.1.4 Zearalenona

A zearalenona (ZEA) é uma micotoxina produzida por algumas espécies de *Fusarium*, principalmente por *F. graminearum* e *F. culmorum*, os quais se ligam de maneira competitiva aos receptores de estrogênio, ocasionando distúrbios reprodutivos e disfunção estrogênica em

animais e seres humanos (BORUTOVA et al., 2012; SCHOEVEERS et al., 2012). Após a ingestão de alimentos contaminados com ZEA, esta é absorvida rapidamente e metabolizada em seguida no intestino ou no fígado, onde sofre hidroxilação, ocasionando a formação de seus metabólitos α - e β -ZOL, os quais são conjugados com ácido glicurônico, facilitando sua excreção na urina (BORCHERS et al., 2010). Geralmente, a ocorrência dessa micotoxina se dá de acordo com as condições climáticas, apresentando maior incidência em estações mais frias e úmidas (DOKO et al., 1996; WHITLOW; HAGLER JUNIOR, 1999). Segundo Jay (2005), alimentos como o milho, cevada, trigo, aveia e gergelim são os mais susceptíveis à contaminação por ZEA.

A Figura 4 apresenta a estrutura química da ZEA e seus metabólitos:

Figura 4 - Estrutura química da zearalenona (a) e seus metabólitos, α -zearalenol ($R^1=OH$ e $R^2=H$) e β -zearalenol ($R^1=H$ e $R^2=OH$) (b).

Fonte: BENNETT, J. W.; KLICH, M. Mycotoxins. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 16, p.497-516, 2003; BOEIRA, S. P. **Caracterização de efeitos tóxicos decorrentes da exposição aguda à micotoxina zearalenona em camundongos**. 2012. 101p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Pampa, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Itaqui, RS, 2012.

A ZEA apresenta efeitos sobre a reprodução e a indução do hiperestrogenismo, sendo os suínos mais sensíveis à estes efeitos. Nestas espécies de animais, o estrogenismo foi relatado na década de 1920, no centro-oeste dos Estados Unidos (BOEIRA, 2012), onde foi observada uma condição de inchaço da vagina das fêmeas jovens e inchaço do prepúcio em machos devido ao consumo de milho com alta concentração de umidade. Com a substituição do milho mofado por milhos de melhor qualidade, os animais se recuperavam, porém, se a exposição ao milho

contaminado continuasse, era possível verificar eversão do útero e infecções secundárias que levavam à morte de muitos animais (BOEIRA, 2012).

A ZEA, como já foi dito, pode ser encontrada em diversos substratos, como trigo, milho, cevada, silagem, arroz e sorgo, entretanto, o milho é o alimento mais suscetível à contaminação pelos fungos do gênero *Fusarium* (KUMMAR; BASU; RAJENDRAN, 2008). As condições de umidade e presença de oxigênio são fatores determinantes para a produção dessa micotoxina (SANTIN, 2005).

A ZEA e seus metabólitos competem efetivamente com estrogênios esteróides endógenos, como 17 β -estradiol para os locais de ligação específicos de receptores de estrogênio. Os isômeros α são cerca de 10 vezes mais ativos em relação aos outros e as diferenças na produção de isômeros α ou β explicam diferenças na sensibilidade à ZEA entre espécies animais (OLIVEIRA et al., 2014). Embora a ZEA tenha causado câncer de fígado hepático em animais experimentais, o IARC (2002) considerou que os dados toxicológicos limitados disponíveis para ZEA não eram suficientes para avaliar sua carcinogenicidade para os seres humanos, classificando a toxina como Grupo 3. Um TDI provisório para ZEA de 0,5 $\mu\text{g/kg}$ de peso corporal / dia foi estabelecido pelo Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (2000). O limite máximo permitido para a ZEA em alimentos à base de cereais processados e alimentos para bebês e crianças pequenas é de 20 $\mu\text{g/kg}$ (EUROPEAN COMMISSION, 2006).

1.2.1.5 Deoxinivalenol

O deoxinivalenol (DON) é geralmente produzido por *F. graminearum*, podendo coexistir com a ZEA em alimentos como o milho, aveia, cevada e trigo (RICHARD, 2007). É um tricoteceno do grupo B e tem sido relatado na ocorrência de micotoxicoses em humanos e animais de criação (LAMARDO; NAVAS; SABINO, 2006). A baixa ingestão ou até mesmo moderada dessa micotoxina pode provocar reações como náuseas, diarreia, redução da eficiência nutricional, lesões no trato gastrointestinal e perda de peso em animais. Já em doses altas, sua ingestão pode acarretar em vômitos, redução do ganho de peso devido a aversão à comida e problemas na regulação do sistema imunológico (MARESCA, 2013; WU et al., 2015). Crianças que consomem alimentos altamente contaminados com DON, podem estar sujeitas a vômitos horas depois da ingestão (SHERIF; SALAMA; ABDEL-WAHAB, 2009).

Estudos demonstraram também, que o DON pode inibir o DNA, o RNA e a síntese protéica (BONY et al., 2006; HASSAN et al., 2015; PAYROS et al., 2016). Para diminuir o

risco de toxicidade causada pela micotoxina, o Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA), estabeleceram um limite de ingestão diária aceitável (IDA) de 1 µg/kg de peso corporal/dia (JECFA, 2010). O limite de tolerância para DON em alimentos processados à base de cereais e alimentos para bebês e crianças pequenas é de 200 µg/kg (EUROPEAN COMMISSION, 2006). Além disso, o DON está relacionado na redução do desempenho reprodutivo de diferentes espécies animais, interferindo no desenvolvimento de embriões e redução da ingestão alimentar (YU et al., 2017). Na Figura 5, pode-se verificar a estrutura química do DON:

Figura 5 - Estrutura química do deoxinivalenol (DON).

Fonte: YU, M. et al. Mechanism of deoxynivalenol effects on the reproductive system and fetus malformation: current status and future challenges. **Toxicology in Vitro**, v. 41, p. 150-158, 2017.

O DON é uma micotoxina muito estável em pH entre 1 e 10 e à temperatura de 150°C, durante o processamento e/ou cozimento dos alimentos (LAUREN; SMITH, 2001). Apresenta um problema significativo para as indústrias agropecuárias em todo mundo, devido sua maior incidência em cereais (YU et al., 2017). Em animais, se ingerido em baixas doses, como em suínos, por exemplo, pode acarretar em perda de peso e aversão à comida (PEREIRA, 2014).

1.2.2 O problema da exposição humana às aflatoxinas

Como apresentado anteriormente, há uma significativa preocupação em relação à exposição humana às aflatoxinas, devido a esta micotoxina apresentar elevada toxicidade e por verificar maior ocorrência em diversos cereais, como milho, amendoim, nozes, trigo, feijão, entre outros (CRUZ, 2010). A falta de Boas Práticas Agrícolas, condições de temperatura e

umidade, favorecem o desenvolvimento de fungos toxigênicos, principalmente no milho, grão que possui um alto teor de carboidratos, oferecendo um ótimo substrato para os fungos e microrganismos (MAGAN; ALDRED, 2007).

No Brasil, o Ministério da Saúde, através da Resolução RDC nº 274, estabeleceu juntamente com o Ministério da Agricultura, um limite máximo de 20 µg/kg, somando-se $B_1+B_2+G_1+G_2$, válido para amendoim (com casca, descascado, cru ou tostado), pasta de amendoim (ou manteiga de amendoim) e milho em grão (inteiro, partido, amassado, moído, farinhas e sêmolos) e 50 µg/kg para ração animal (BRASIL, 2002; CRUZ, 2010).

Segundo Brera, Miraglia e Colatosti (1998), a exposição humana às micotoxinas através do consumo de alimentos contaminados é um problema de saúde pública em todo o mundo, já que a incidência de aflatoxinas não ocorre somente em países em desenvolvimento. As micotoxinas influenciam no agronegócio, interferem e podem impedir a exportação, reduzem a produtividade animal e agrícola e, conseqüentemente, afetam a saúde humana (CRUZ, 2010). Além disso, há também os prejuízos econômicos em toda a cadeia de produção, desde a produção primária, até os processadores e comerciantes de alimentos. Os fungos toxigênicos são responsáveis por prejuízos de milhões de dólares por ano para a saúde humana, animal e produtos agrícolas ((HUSSEIN; BRASEL, 2001).

Muriuki e Siboe (1995) relataram a contaminação de farinha de milho com AFB₁ e AFB₂, no Quênia. Foram coletadas 40 amostras de farinha, de 3 marcas distintas da região de Nairobi, embaladas em sacos de 90 kg. As 3 marcas estavam contaminadas com AFB₁ e AFB₂ (0,4-20 µg/kg). De acordo com os autores, o resultado demonstrou uma elevada exposição da população às aflatoxinas, considerando uma taxa de consumo de 0,4 kg/pessoa/dia. Em um outro estudo conduzido por Gong et al. (2004), foi realizado um estudo longitudinal por um período de 8 meses em Benin, na África Ocidental, para a avaliação da exposição das aflatoxinas no crescimento de crianças. A pesquisa foi desenvolvida devido à elevada exposição de crianças da África Ocidental às aflatoxinas. Cerca de 200 crianças de 16 a 37 meses de idade foram recrutadas para o estudo, em quatro aldeias (duas com alta e duas com baixa exposição às aflatoxinas – 50 crianças por vila). As crianças que não estavam mais em fase de aleitamento apresentaram maior incidência de AF-alb em relação às que estavam parcialmente em aleitamento, sendo que o principal alimento para o desmame era mingau à base de milho. Não houve uma associação entre os níveis de AF-alb e micronutrientes, sugerindo que a exposição às aflatoxinas não foi acompanhada de uma deficiência nutricional geral. Porém, houve uma correlação negativa entre a AF-alb e o aumento da altura durante o acompanhamento dos 8

meses de pesquisa, onde verificou-se uma redução média de 1,7 cm no crescimento das crianças. Este estudo teve como objetivo avaliar o conhecimento e as práticas dos produtores de lácteos urbanos, a fim de alertá-los sobre a presença de aflatoxinas nos alimentos e no leite, para determinar a prevalência e quantificar os níveis de AFB₁ e AFB₂ nos mesmos (KANG'ETHE; LANG'A, 2009).

Kachapulula et al. (2017), quantificaram as aflatoxinas em amostras de milho e amendoim, na região da Zâmbia, para avaliar a associação dos agentes carcinogênicos presentes com a imunossupressão da população. Foram avaliadas 334 amostras de milho e amendoim de 27 distritos, sendo que 17% das amostras dos mercados continham aflatoxina com o limite acima do permitido na Zâmbia (10 µg/kg). Para o amendoim, a concentração da micotoxina chegou a 39 µg/kg e, para o milho, 16 µg/kg, sendo que o armazenamento inadequado dos grãos aumentou em mais de 1000 vezes os níveis de aflatoxinas (31°C, 100% umidade, 1 semana). A aplicação de limites regulatórios sobre as concentrações de aflatoxinas em alimentos é a causa da perda de mercados dos produtos agrícolas e a renda reduzida (VAN EGMOND; SCHOTHORST; JONKER, 2007; WU, 2014). A interação das condições climáticas com os sistemas de cultivo e a composição das comunidades de fungos, pode influenciar tanto a etiologia de contaminação quanto o potencial de medidas de recuperação (COTTY; PROBST; JAIME-GARCIA, 2008; PROBST; SCHULTHESS; COTTY, 2010). No distrito de Kisumu, no Quênia, Okoth e Ohingo (2004), pesquisaram os riscos de contaminação das crianças da região através da ingestão de farinhas utilizadas para desmame. As amostras foram coletadas de 242 famílias do distrito de Kisumu e um questionário foi utilizado para informações das mães sobre os tipos de alimentos utilizados para o desmame, manuseio e armazenamento. Foram avaliados o estado nutricional das crianças (peso e altura) e, foi constatado que 31% das crianças estavam desnutridas. 29% das amostras de alimentos à base de cereais estavam contaminadas com aflatoxinas, com concentração variando entre 2 a 82 mg/kg.

De acordo com a pesquisa realizada por Iamanaka et al. (2007), 62 amostras de frutas secas comercializadas em São Paulo e importadas do Chile, Argentina, Turquia e Irã foram quantificadas quanto à incidência de aflatoxinas. Cerca de 58% das amostras de figo seco apresentaram níveis de aflatoxinas, sendo que as demais amostras não ultrapassaram 2 ppb, somente uma com 1500 ppb de AFB₁. 3 amostras de uvas passas brancas (16%), das 19 avaliadas, continham aflatoxinas, porém com um limite não superior a 2 ppb.

Caldas, Silva e Oliveira (2002) avaliaram 366 amostras de amendoim, castanhas, milho e farinhas obtidas no comércio do Distrito Federal, no Brasil. As aflatoxinas estavam presentes

em 19,6% das amostras, sendo que o amendoim e derivados apresentaram maior incidência de contaminação (34,7%), com cerca de 1.706 ppb de aflatoxinas totais (MAZIERO; BERSOT, 2010). Em 2002, Rodríguez-Amaya e Sabino realizaram uma pesquisa no período de 1991-2002, para avaliar a ocorrência de micotoxinas em alimentos no Brasil, o que levou à publicação de uma revisão bibliográfica sobre o tema. As aflatoxinas nos amendoins e produtos derivados continuam sendo um problema sério (SABINO; RODRÍGUEZ-AMAYA, 1993). A incidência de aflatoxinas em milho, alimento considerado mais suscetível à contaminação pela micotoxina, foi menor, ocorrendo casualmente.

Outra pesquisa publicada por González et al. (2008) verificou a presença de micotoxinas em amostras de amendoim coletadas em diferentes etapas da produção. 32% das amostras estavam contaminadas com AFB₁ e AFB₂, com concentrações entre 3,79 a 125,07 ppb e 0,07 a 2,3 ppb, respectivamente. Segundo Diniz (2002), a ocorrência de aflatoxinas é mais elevada no amendoim devido à afinidade do *Aspergillus flavus* por este grão, principalmente quando as condições de umidade e temperatura se tornam favoráveis para o seu crescimento.

Oliveira et al. (2010) realizaram uma avaliação da excreção de resíduos de AFB₁ em ovos de galinhas poedeiras jovens, as quais foram alimentadas com rações contaminadas com AFB₁, por um período de 8 semanas. 96 galinhas com 20 semanas de idade foram distribuídas aleatoriamente em 4 grupos experimentais (sendo 24 aves por grupo), com rações contendo 0 (controle), 100 µg, 300 µg ou 500 µg de AFB₁/kg de alimento. A produção de ovos e o peso médio dos mesmos não foram afetados nos grupos que receberam rações contaminadas com AFB₁. Os resíduos da micotoxina foram identificados somente nos ovos das galinhas que se alimentaram de rações com 500 µg de AFB₁/kg de alimento, em níveis que variaram de 0,05 a 16 µg/kg, média de 10 µg/kg. Através dos resultados, os autores concluíram que o índice de transmissão da AFB₁ dos ovos foi de aproximadamente 5000:1, ressaltando a preocupação e a importância do controle dos níveis da micotoxina em rações para galinhas poedeiras.

1.2.3 Exposição humana à AFM₁ no leite

O leite e os produtos lácteos são considerados alimentos fundamentais na dieta humana, porém, podem ser os principais alimentos para a exposição à AFM₁, já que esta micotoxina pode ser encontrada nestes produtos após os animais ingerirem ração ou silagem contaminada com AFB₁. O problema se torna maior, pois, a micotoxina não é eliminada em processos de pasteurização, resfriamento e/ou congelamento (CARVAJAL et al., 2003). Quando ocorre a ingestão de AFB₁, nos animais ocorre o processo de biotransformação, ou seja, a AFB₁ sofre

uma reação de hidroxilação e transforma-se em AFM₁, a qual se conjuga com o ácido glicurônico e sulfatos, podendo ser excretada na bile, urina e leite (HUSSEIN; BRASEL, 2001). No Brasil, por exemplo, devido ao potencial da micotoxina em desenvolver o carcinoma hepatocelular em humanos, o nível de tolerância da AFM₁ é de 0,5 µg/kg (BRASIL, 2011). Já na União Européia, o limite é de 0,05 µg/kg (EUROPEAN COMMINNION, 2001; SANTOS; BANDO; MACHINSKI JUNIOR, 2014).

De acordo com Oliveira et al. (2014), a AFM₁ pode ser detectada no leite algumas horas após a ingestão do alimento contaminado, sendo eliminada cerca de 2 a 3 dias após o mesmo ser retirado da dieta do indivíduo (OLIVEIRA; CORASSIN, 2014). A presença de resíduos da micotoxina no leite e em produtos lácteos é, sem dúvida, preocupante para a saúde pública, levando-se em consideração o potencial de exposição às aflatoxinas da população através da dieta. Por isso, vários países estabeleceram níveis máximos de AFM₁ no leite e seus derivados, embora outras micotoxinas também podem ser excretadas no leite. No mundo todo, em especial na União Européia, há algumas regulamentações rigorosas para a concentração máxima tolerável de AFB₁ em ingredientes e rações para as vacas leiteiras (OLIVEIRA et al., 2014; GONÇALVES et al., 2015).

Shundo et al. (2009) investigaram a presença de AFM₁ em amostras de leite em pó, leite pasteurizado e leite UHT na cidade de São Paulo. Das 125 amostras analisadas, 119 (95,2%) foram positivas para AFM₁, em níveis que variaram de 10 – 200 ng/kg de leite. Oliveira et al. (2010) determinaram a incidência de AFB₁ em rações e AFM₁ no leite de propriedades do estado de São Paulo. Cerca de 40% das rações continham AFB₁ e 36,7% das amostras de leite foram positivas para AFM₁, sendo que em apenas uma amostra foi detectado um nível acima do limite de tolerância estabelecido no Brasil. Este estudo demonstrou que mesmo as concentrações das micotoxinas apresentarem-se baixas nas rações e no leite, a elevada frequência de AFB₁ e AFM₁ nas amostras avaliadas demonstra a necessidade do controle e monitoramento para a prevenção da contaminação dos alimentos destinados ao gado leiteiro.

Trombete et al. (2014) reportaram em seu estudo a ocorrência de AFM₁ em amostras de queijo parmesão ralado comercializados na região metropolitana do Rio de Janeiro. A micotoxina foi detectada em 18 (60%) das amostras analisadas, sendo que o maior valor foi de 0,69 µg/kg. Apenas 8 (26,7%) das amostras de queijo parmesão apresentaram níveis de AFM₁ acima do limite de tolerância adotados pela Comissão Européia (0,25 µg/kg), oferecendo um perigo em potencial para a saúde pública. Cerca de 73 amostras de leite e 24 produtos lácteos foram avaliados por Santini et al. (2013) a fim de se verificar a presença de AFM₁ nas mesmas,

na Sicília, Itália. A micotoxina foi detectada em 92% das amostras de leite cru com concentração abaixo de 5,0 ng/L, 7% entre 5,0 – 10,0 ng/L e 1% na faixa de 10,0 – 20,0 ng/L. Para os produtos lácteos analisados, a incidência de AFM₁ foi de 42%, sendo que 83% apresentaram níveis abaixo de 5,0 ng/L e 17% estavam entre 10 – 20 ng/L.

Em um estudo realizado por Jager et al. (2016), os autores avaliaram a exposição humana de voluntários de Pirassununga, São Paulo, à AFB₁ e AFM₁ por meio da dieta dos indivíduos. Os alimentos foram recolhidos das casas dos participantes e os resultados demonstraram contaminação para as duas micotoxinas avaliadas. AFB₁ e AFM₁ foram detectadas em 20% de amostras de cereais e 36% em produtos lácteos, respectivamente. Sadeghi et al. (2009) encontraram 78% de amostras de leite pasteurizado contaminados com AFM₁ no Irã. Para o controle e avaliação dos alimentos consumidos pelos indivíduos, é entregue a eles um questionário de frequência alimentar (QFA) e assim também com as mulheres em lactação, para verificar quais foram os alimentos mais consumidos por elas e que conduziram a um elevado nível de contaminação no leite materno.

Gonzalez et al. (2005) determinaram a ocorrência de AFM₁ em leite comercializado em alguns municípios do Estado de São Paulo. Na pesquisa, foram analisadas 43 amostras de leite comercial, coletadas em 27 municípios do Estado. A micotoxina foi detectada em 17 (39,5%) das amostras, sendo que 64,7% apresentaram concentrações acima do limite máximo permitido pela legislação, que é de 0,5 µ/L. Santos, Bando e Junior (2014), estudaram a ocorrência de AFM₁ no leite comercializado no Estado do Paraná. 82 amostras de leite pasteurizado, coletadas entre março/2010 maio/2011 em 11 municípios do Estado do Paraná. A micotoxina não foi detectada em nenhuma das amostras analisadas. Segundo os autores, mesmo com os resultados obtidos, é necessário a realização de uma inspeção efetiva da micotoxina para garantir a segurança, qualidade e integridade da saúde da população. Na Síria, Ghanem e Orfi (2009), pesquisaram a incidência da contaminação de AFM₁ em amostras de leite coletadas em mercados do país. O trabalho demonstrou que das 126 amostras de leite coletadas, as quais eram leite cru de vaca (74 amostras), leite cru de ovelha (23), leite cru de cabra (11), leite de vaca pasteurizado (10) e leite em pó (8), 80% estavam contaminadas com diferentes níveis de AFM₁, variando de >20 a 765 ng/L. Cerca de 80% das amostras de leite de vaca pasteurizado contaminadas com a micotoxina ultrapassaram o limite de tolerância europeu, com concentrações entre 89 e 765 ng/L. Já para as amostras de leite cru de vaca, ovino e caprino, as porcentagens de contaminação acima do limite de tolerância europeu foram de 59, 24 e 14%,

respectivamente. O leite em pó apresentou apenas uma amostra contaminada, com concentração de 12 ng/L.

1.2.4 Exposição humana às demais micotoxinas

A preocupação em relação à exposição humana às micotoxinas não diz respeito somente às aflatoxinas. Muitas micotoxinas podem estar presentes nos alimentos e, quando um indivíduo ingere um material contaminado, pode estar sujeito às mais diversas reações, afetando a sua saúde. Neste tópico, será abordado estudos realizados acerca da exposição humana às micotoxinas em alimentos.

No estudo realizado por Almeida et al. (2007), os autores investigaram a ocorrência de OTA no café instantâneo brasileiro. As amostras de café foram coletadas em mercados da cidade de São Paulo, Brasil, no período de agosto a dezembro de 2004. Das 82 amostras analisadas, 81 (98,8%) continham OTA, com concentrações de 0,17 a 6,29 ng/g. Kawashima, Vieira e Valente Soares (2007), avaliaram a presença de fumonisina B₁ (FB₁) e OTA em amostras de cerveja fabricadas no Brasil. A FB₁ foi analisada em 58 amostras de cerveja provenientes de 30 fábricas localizadas em 9 Estados. A micotoxina foi encontrada em 25 amostras de cerveja, em concentrações de 1 a 40 ng/mL. Para a OTA, foram analisadas 123 amostras oriundas de 36 fábricas localizadas em 5 Estados. Identificaram-se 5 amostras contaminadas com OTA em concentrações de 1 a 18 ng/mL.

Em outra pesquisa, Kawashima e Soares (2006) realizaram levantamentos da ocorrência de micotoxinas em alimentos, realizados nas regiões Sul e Sudeste do Brasil. Os autores analisaram a ocorrência de FB₁, AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂, OTA e ZEA em 74 amostras de produtos à base de milho, no Recife – PE, entre 1999 a 2001. A FB₁ estava presente em 94,6% das amostras (20 a 8600 µg/kg) e apenas 5 amostras continham AFB₁ (20 µg/kg). 2 amostras ultrapassaram o limite de 20 µg/kg para a somatória das aflatoxinas AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂. As aflatoxinas AFG₁ e AFG₂, OTA e ZEA não foram detectadas em nenhuma das amostras. Mallmann et al. (2001) investigaram os níveis de contaminação por FB₁ em cereais e alimentos do sul do Brasil. 407 amostras foram obtidas de diferentes armazéns locais e indústrias de alimentos para animais, entre janeiro de 1996 e junho de 1998. Os níveis de FB₁ ficaram entre 0,086 a 78,92 µg/g, encontrando-se maiores concentrações da micotoxina em arroz (14,21 µg/g), milho (78,92 µg/g), trigo (24,35 µg/g), aveia (0,17 µg/g) e cevada (2,43 µg/g). Em farelo de soja, não foram encontrados níveis da micotoxina. De acordo com os

resultados obtidos no trabalho, como esses alimentos são consumidos em grandes quantidades, a contaminação através da FB₁ representa uma ameaça potencial para a saúde pública e animal.

Milanez, Valente-Soares e Baptista (2006) estudaram a avaliação dos tricotecenos deoxinivalenol (DON), nivalenol (NIV), diacetoxiscirpenol (DAS) e as toxinas T2 e HT2 em 78 produtos à base de milho, na cidade de São Paulo. Apenas 2 amostras estavam contaminadas (1 de milho moído, com 55 ppb de T2) e 767 ppb de HT2) e a outra de farinha de milho, a qual apresentou traços de DON e NIV. DAS não foi encontrado em nenhuma das amostras. A ocorrência de aflatoxinas AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂, OTA e ZEA foi avaliada em 121 amostras de alimentos à base de milho coletadas no comércio da Cidade de Maringá, Paraná. Três amostras (2,5%) foram positivas para AFB₁ (8 a 59 ppb), duas (1,7%) para AFB₂ (2,4 ppb), uma (0,8%) para OTA (64 ppb) e uma (0,8%) para ZEA (448 ppb). A maior frequência positiva e maior concentração encontrada de AFB₁ foi para milho pipoca (8,3%, 59 ppb) (SEKIYAMA et al., 2005; MAZIERO; BERSOT, 2010).

Em outra pesquisa realizada por Scudamore e Patel (2000), os autores verificaram a presença de aflatoxinas, OTA, ZEA e fumonisinas em amostras de milho importadas do Reino Unido. O trabalho avaliou 140 amostras de milho bruto. A concentração máxima de OTA encontrada foi de 1,5 µg/kg, ZEA e fumonisinas foram detectadas em praticamente todas as amostras, com cerca de 41,7% do milho contendo mais de 100 µg/kg de ZEA e 48% das amostras contendo mais de 1000 µg/kg de fumonisinas. Foi realizada uma limpeza inicial das amostras brutas, reduzindo as concentrações de aflatoxinas em 40% e 32%, as fumonisinas. Em um estudo feito por Scott (1996), o autor analisou a incidência de micotoxinas transmitidas em grãos para a produção de cerveja. Na pesquisa, AFB₁, OTA, ZEA, DON e FB₁ e FB₂ foram adicionadas em vários estágios do processo de fabricação da cerveja. Os resultados demonstraram que as micotoxinas (ou seus metabólitos) podem ser transmitidas de grãos contaminados para a cerveja, onde verificou-se que as micotoxinas no produto final podem ter origem do grão maltado ou de seus complementos. Foram altas incidências de aflatoxinas e ZEA em cervejas locais fabricadas na África, porém, as aflatoxinas não foram encontradas em cervejas europeias. A ZEA e o α -e β -ZOL não foram detectados em cervejas canadenses e europeias. A OTA foi encontrada com uma concentração >1 ng/mL na cerveja e o DON, que sobrevive ao processo de produção da cerveja, foi detectado com elevada incidência em cervejas canadenses e europeias, com concentrações >200 ng/mL. Já as FB₁ e FB₂ ocorreram de forma limitada nas amostras.

Vendl et al. (2010) pesquisaram a ocorrência de micotoxinas em alimentos à base de cereais, em mercados de varejo do Reino Unido e da Áustria. 84 amostras (25 grupos de produtos) de alimentos à base de cereais foram analisadas quanto à presença de DON, ZEA e seus respectivos metabólitos (deoxinivalenol-3-glucopiranosídeo, 3-acetil-deoxinivalenol, zearalenol-4-glucopiranosídeo, alfa-zearalenol, beta-zearalenol, alfa-zearalenol-4-glucopiranosídeo, beta-zearalenol-4-glucopiranosídeo e zearalenona-4-sulfato). DON foi detectado em 8 amostras, ZEA em 7 e deoxinivalenol-3-glucopiranosídeo em 2 grupos. Zearalenona-4-sulfato foi o metabólito mais abundante, encontrado em 13 compósitos, porém, em baixas concentrações. Os outros metabólitos não foram encontrados em nenhuma das matrizes, o que, provavelmente, poderiam estar em baixas concentrações, não oferecendo tanto perigo para a saúde da população, porém, merecem cuidado e atenção. As maiores concentrações de micotoxinas foram encontradas nas amostras de cereais para café da manhã, com 254 ng/g de DON, 6 ng/g de zearalenona-4-sulfato e 44 ng/g de ZEA.

O Quadro 1 apresenta os limites máximos de micotoxinas em alimentos, para o consumo humano em vários países:

Quadro 1 - Níveis máximos permitidos para micotoxinas em alguns alimentos para consumo humano, em diferentes países.

País	Micotoxina	Alimento	Nível máximo (µg/kg)
União Européia	B ₁ , B ₂ , G ₁ , G ₂	Cereais em geral, frutas secas, condimentos	4
	M ₁	Leite fluido	0,05
	ZEA	Alimentos à base de cereais processados e alimentos para bebês e crianças pequenas	20
	Fumonisinás	Alimentos à base de milho	400 – 2000
		Alimentos processados à base de milho e alimentos para bebês e crianças pequenas	200
	OTA	Alimentos processados à base de cereais e alimentos para bebês e crianças pequenas	< 0,5
	DON	Alimentos processados à base de cereais e alimentos para bebês e crianças pequenas	200
Argentina	B ₁		5
	B ₁ , B ₂ , G ₁ , G ₂	Amendoim, milho e derivados	20
	M ₁	Produtos lácteos	0,5
Brasil	M ₁	Leite fluido	0,5
		Leite em pó	5
		Queijos	2,5
	B ₁ , B ₂ , G ₁ , G ₂	Cereais e produtos de cereais (exceto milho e derivados)	5
		Feijão	5
		Castanhas (exceto castanhas do Brasil)	10
		Milho, amendoim e derivados	20
	OTA	Cereais e produtos de cereais, incluindo cevada malteada; feijão	10
		Alimentos a base de cereais para alimentação infantil (lactentes e crianças de primeira infância)	2
	DON	Arroz beneficiado e derivados	750
	Fumonisinás (B ₁ +B ₂)	Milho de pipoca	2000
	ZEA	Alimentos a base de cereais para alimentação infantil (lactentes e crianças de primeira infância)	20

Estados Unidos	M ₁	Leite fluído	0,5
	DON	Alimentos prontos de trigo	1000
Mercosul	B ₁ , B ₂ , G ₁ , G ₂	Milho, farelo de milho, amendoim e subprodutos	20
	B ₁ , B ₂ , G ₁ , G ₂	Amendoim, milho Alimentos infantis	30 3
Uruguai	M ₁	Leite fluido e produtos lácteos	0,5
	ZEА	Milho e cevada, sucos de fruta,	200
	PAT	arroz, cevada, café e milho	50
	OTA		50

Fonte: Adaptado de: FONSECA (2013) ¹apud DI CASTRO (2014)

1.2.5 Avaliação da exposição infantil às micotoxinas alimentares

A avaliação da exposição a qualquer contaminante alimentar é geralmente avaliada com base na ingestão de alimentos (ou alimentos para animais), também conhecida como "exposição externa" ou "dose oral". O método mais comum de avaliação da ingestão alimentar baseia-se na ocorrência do contaminante em produtos alimentares e nos dados de consumo (JUDSON et al., 2009). Assim, estudos de ingestão alimentar fornecerão informações sobre o conteúdo de micotoxinas ingeridas por indivíduos através da dieta. No entanto, a avaliação da exposição pode ser afectada pela biodisponibilidade do composto alimentar. É importante lembrar que apenas uma certa fração do composto atinge a corrente sanguínea e é capaz de exercer efeitos tóxicos, o que representa a "exposição interna". A exposição interna é, obviamente, inferior à externa, o que leva a fatores de confusão na avaliação de risco. A dose biológica eficaz é quantificável com a ajuda de estudos farmacocinéticos, estudos *in vitro* ou modelos animais, enquanto a avaliação de risco é descrita por estudos epidemiológicos em humanos (VERSANTVOOR et al, 2005).

Durante os primeiros meses de vida, é essencial verificar a exposição dos lactentes às micotoxinas através da amamentação e este monitoramento deve continuar até a introdução de alimentos complementares, como alimentos à base de cereais e alimentos para bebês (JUAN et al., 2014). Após o nascimento, as fórmulas infantis fazem parte da dieta do recém-nascido, sendo indispensáveis, pois atuam como substitutos do leite materno (MEUCCI et al., 2010). Em

¹ FONSECA, H. Legislação sobre micotoxinas. Piracicaba, 2013. Disponível em: <<http://www.micotoxinas.com.br>>. Acesso em: 20 mar. 2014.

comparação com os adultos, as crianças estão constantemente expostas a micotoxinas, uma vez que consomem uma dieta restrita, cheia de cereais. Portanto, a avaliação da frequência de exposição às micotoxinas em crianças é de grande importância, especialmente em áreas onde os riscos de contaminação são maiores (KUIPER-GOODMAN, 2004). A gravidade pode ser calculada de acordo com os termos de exposição diária (EDI), por unidade de peso corporal, geralmente apresentado em $\mu\text{g} / \text{kg}$ de peso corporal / dia, comparado com a ingestão diária tolerável (TDI) através de estudos toxicológicos (BLANKSON; MILL-ROBERTSON, 2016).

1.2.6 Exposição de lactantes às micotoxinas no leite materno

1.2.6.1 Aflatoxina M₁

O leite materno fornece aos bebês benefícios indispensáveis para a saúde, sendo reconhecido como o alimento mais completo para a nutrição das crianças, conferindo efeitos positivos para o organismo como crescimento, imunidade e desenvolvimento (HEALTHY, 2013, Centro de Controle e Prevenção de Doenças, Atlanta, Geórgia, EUA). A AFM₁ pode ser detectada no leite materno cerca de 12 à 24 horas após o consumo de alimentos contaminados. Além disso, essa micotoxina diminui rapidamente com o tempo, tornando-se não detectável após 3 dias da interrupção do consumo de alimentos contaminados (BATTACONE et al., 2009). A AFM₁ é resistente às elevadas temperaturas utilizadas na autoclavagem e em processos de pasteurização (AWASTHI et al., 2012), necessitando-se do desenvolvimento rápido de estratégias para a redução dos níveis da aflatoxina durante a produção do leite e produtos lácteos, principalmente durante o armazenamento (MALEKI et al., 2015).

A exposição dos lactentes à AFM₁ é uma situação muito preocupante pois essa micotoxina apresentou efeitos carcinogênicos em todas as espécies testadas. Outro grave problema é a escassez de estudos que demonstrem o efeito pré-natal e pós-natal sobre a saúde das crianças. Geralmente, a capacidade de biotransformação de compostos tóxicos, incluindo carcinógenos, em recém-nascidos é mais lenta do que em adultos, resultando em um maior tempo de circulação dos produtos químicos (SADEGHI et al., 2009). Em um estudo realizado por Galvano et al. (2008), 82 amostras de leite humano foram coletadas no Banco de Leite, em um Hospital da Itália, para a avaliação de AFM₁ e ocratoxina A (OTA). Cerca de 5% das amostras de leite materno continham AFM₁ e 74%, OTA. Além da coleta do leite, os autores também entregaram um questionário às mães para verificar o consumo de vários alimentos, os quais foram consumidos durante a gravidez e a lactação. Com os resultados obtidos, foi possível verificar que a incidência das micotoxinas no leite materno está relacionada com os hábitos

alimentares das mães avaliadas, sugerindo-se, portanto, outras investigações acerca dos possíveis efeitos dessas toxinas, segundo os autores. Gürbay et al. (2010) detectaram AFM₁ e AFB₁ em amostras de leite materno de mães na Turquia. Os níveis médios de AFM₁ estavam entre 60,90 – 299,99 ng/L de leite e AFB₁, entre 94,50 – 4123,80 ng/L de leite, valores determinados pelos autores por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). De acordo com esse estudo, verificou-se a exposição das mães e dos recém-nascidos à AFM₁ e AFB₁, necessitando-se de pesquisas mais avançadas sobre a contaminação por micotoxinas em alimentos, além de estratégias para prevenção.

No Brasil, estudos abordando a incidência de AFM₁ no leite materno são muito limitados, com apenas 4 trabalhos publicados. Iha et al. (2014) determinaram a contaminação de AFM₁ no leite materno, na cidade de Ribeirão Preto, São Paulo, utilizando 100 amostras de leite humano coletadas no Banco de Leite local. O limite de detecção para a micotoxina avaliada foi de 0,3 ng/L. Duas amostras continham AFM₁ com nível acima de 0,3 ng/L de leite, sendo que o trabalho demonstrou que as crianças da região estudada em fase de amamentação apresentaram exposição à AFM₁. No estudo realizado por Navas, Sabino e Rodriguez-Amaya (2005), amostras de leite materno foram coletadas no Banco de Leite do Hospital de São Paulo para a determinação de AFM₁ nas mesmas. De um total de 50 amostras, uma continha AFM₁ a 0,024 ng/mL de leite. Como a incidência da micotoxina foi baixa nas amostras analisadas, os autores sugeriram que o estudo fosse estendido a outros bancos de leite, na cidade de São Paulo.

A Tabela 1 apresenta os estudos disponíveis na literatura acerca da investigação de AFM₁ no leite materno em diversos países, cujos resultados demonstram a preocupação quanto à exposição das crianças às micotoxinas, ressaltando a importância de aprofundar e apurar maiores dados sobre este assunto no Brasil. Como a AFM₁ é excretada no leite materno, as crianças recém-nascidas ficam potencialmente expostas aos efeitos das aflatoxinas, acarretando em perda de peso, retardo no crescimento e doenças infecciosas (KHLANGWISSET; SHEPHARD; WU, 2011), por isso, vários estudos vêm sendo realizados. Porém, como apresentado na Tabela 1, no Brasil há poucos dados na literatura que permitem avaliar a exposição das crianças às toxinas.

Tabela 1 - Incidências de AFM₁ no leite materno em diferentes países.

País	Amostras analisadas (N)	Amostras positivas		Concentração		Referência
		n	%	Faixa (ng/L)	Média (ng/L)	
Austrália	73	14	19	5.0 – 614.0	71.0	El-Nezami et al. (1995)
Brasil	50 ¹	1	2	24	-	Navas et al. (2005)
Brasil	224 ¹	0	0	-	-	Andrade et al. (2013)
Brasil	100 ¹	2	2	0.3 – 0.8	0.5	Iha et al. (2014)
Colômbia	50	45	90	0.9 – 18.5	5.2	Díaz e Sánchez (2015)
Egito	120	66	55	0.02 – 2.1	0.3	El Sayed et al. (2002)
Egito	388	140	36	10.3 – 21.4	13.5	Polychronaki et al. (2006)
França	42	0	0	-	-	Wild et al. (1987)
Itália	82	4	5	7.0 – 140.0	55.3	Galvano et al. (2008)
Irã	160	157	98	0.3 – 26.7	8.2	Sadeghi et al. (2009)
Irã	182 ²	20	11	5.1 – 8.1	6.9	Mahdavi et al. (2010)
Irã	87	24	28	0.1 – 4.9	0.6	Rafiei et al. (2014)
Irã	85	72	85	2.0 – 10.0	5.9	Maleki et al. (2015)
Malásia	102	0	0	-	-	Shuib et al. (2017)
México	112	100	89	3.0 – 34.2	12.1	Cantú-Cornelio et al. (2016)
Nigéria	50	41	82	3.5 – 35.0	NI	Adejumo et al. (2013)
Serra Leoa	113	35	31	0.2 – 99.0	0.8	Jonsyn et al. (1995)
Tailândia	11	5	45	9.0 – 1079.0	664.0	El-Nezami et al. (1995)
Turquia	61	8	13	5.1 – 6.9	5.6	Keskin et al. (2009)

Turquia	75	75	100	NI	60.9 – 300.0	Gürbay et al. (2010)
Turquia	73	18	25	1.3 – 6.0	3.0	Atasever et al. (2014)
Emirados Árabes	445	443	99	2.0 – 3000.0	67.5	Saad et al. (1995)
Emirados Árabes	140	129	92	53.0 – 3400.0	560.0	Abdulrazzaq et al. (2003)
Zimbábue	54	6	11	14.0 – 50.0	NI	Wild et al. (1987)

NI: Não informado.

¹ Todas as amostras coletadas em um banco de leite humano.

² Amostras coletadas em áreas rurais ($n=91$) e urbanas ($n=91$); Apenas as áreas rurais apresentaram amostras positivas para aflatoxina M₁.

Fonte: Própria autoria.

A AFM₁ é resistente aos processos de pasteurização, suportando até a esterilização (ABDULRAZZAQ et al. 2003). Segundo a Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) (2005), nos Bancos de Leite Humano são realizados processos de pasteurização a 62,5°C por 30 minutos, embora não seja suficiente para eliminá-la, fazendo com que estejam presentes também nos leites que são distribuídos às crianças de Unidades de Terapia Intensiva Neonatal, que recebem recém-nascidos prematuros, geralmente.

1.2.6.2 Demais micotoxinas

Muitos estudos apontam maior preocupação na detecção de AFM₁ e OTA no leite materno, mas ainda não há nenhum trabalho disponível na literatura acerca de outras micotoxinas presentes no leite humano, como também há a ausência de maiores dados referentes a esse tema no Brasil, se tornando, portanto, um agravante para a saúde pública, principalmente para as crianças lactentes.

No Brasil, poucos estudos apresentaram a ocorrência de OTA em leite humano. No trabalho realizado por Navas, Sabino e Rodriguez-Amaya (2005), os autores conseguiram detectar duas amostras de leite materno contaminadas com OTA (0,011 e 0,024 ng/mL), das 50 que foram coletadas no Hospital de São Paulo, Brasil. Apesar de a ocorrência de OTA no leite materno ter se apresentado baixa, os autores sugeriram que a pesquisa se estendesse a outros Bancos de Leite de demais localidades, a fim de averiguar possíveis exposições de mães e crianças à micotoxina. Em outro estudo realizado por Iha et al. (2014), na cidade de Ribeirão Preto – SP, Brasil, 100 amostras de leite humano foram coletadas no Banco de Leite local e 66

(66%) estavam contaminadas com OTA, sendo que 32 estavam acima do limite de detecção (> 0,8 ng/L) e 34 estavam no intervalo de 0,8 – 21 mg/L.

De acordo com um trabalho publicado por Cherkani-Hassani, Mojemmi e Mouane (2016), estudos ao redor do mundo relataram a ocorrência de outras micotoxinas que podem estar presentes no leite materno (além da AFM₁ e OTA). Alguns países estabelecem limites em regulamentos que foram criados justamente para proteger a população dos efeitos tóxicos das micotoxinas presentes nos alimentos. Rubert et al. (2014) coletaram amostras de leite humano em Valência (Espanha) com o objetivo de se estudar um método quantitativo para analisar simultaneamente 27 micotoxinas. O método utilizado foi o QuEChERS, que é um método de modificação aplicado para averiguar micotoxinas em alimentos e na urina. Metabólitos de ZEA, HT-2, DON e T-2 triol foram detectados no leite humano, demonstrando riscos de exposição de mães e bebês às micotoxinas. Em outro trabalho realizado por Andrade, Silva e Caldas (2013), os autores otimizaram e validaram uma metodologia para a análise simultânea das aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂ e OTA no leite materno. As amostras de leite foram coletadas em Bancos de Leite Humano no Distrito Federal, Brasília, Brasil e, das 224 amostras, apenas 2 continham AFB₂ com níveis de 0,005 ng/mL. O estudo demonstrou que os bebês lactentes não apresentaram riscos de exposição às aflatoxinas e OTA, porém, seria interessante realizar mais estudos para averiguar outras possíveis micotoxinas presentes no leite materno. Neste estudo, para quantificar as micotoxinas, foi utilizado o método LLE-LTP, baseado na extração líquido-líquido, com baixa temperatura e a fase orgânica separada por congelamento. A detecção e quantificação foram realizadas por cromatografia líquida, detector de fluorescência e espectrometria de massa.

Como já mencionando anteriormente, a grande preocupação acerca de micotoxinas presentes no leite materno é a de que os estudos se limitam apenas em AFM₁ e OTA, o que leva a indisponibilidade de pesquisas na literatura em relação à presença de outras micotoxinas. É o caso da ZEA e do DON, pois até o momento, não há dados disponíveis de estudos realizados sobre a ocorrência dessas micotoxinas em leite humano. A Tabela 2 apresenta os dados disponíveis na literatura acerca da ocorrência de OTA no leite materno em diversos países:

Tabela 2 - Incidências de OTA no leite materno em diferentes países.

País	Amostras analisadas (N)	Amostras positivas		Concentração		Referência
		n	%	Faixa (ng/L)	Média (ng/L)	
Brasil	50 ¹	2	4	11 – 24	20	Navas et al. (2005)
Brasil	224 ¹	0	0	-	-	Andrade et al. (2013)
Brasil	100 ¹	66	66	0.8 – 21	4	Iha et al. (2014)
Chile	11	11	100	44 – 184	106	Munoz et al. (2010)
Chile	50	40	80	10 – 186	52	Munoz et al. (2014)
Egito	120	43	36	5070 – 45010	21100	El Sayed et al. (2002)
Alemanha	36	4	11	17 – 30	NI	Gareis et al. (1988)
Itália	50	9	18	1700 – 6600	4190	Micco et al. (1991)
Itália	82	61	74	5 – 405	30	Galvano et al. (2008)
Itália	57	45	79	1 – 75	10	Biasucci et al. (2011)
Irã	136	5	4	5 – 16	NI	Afshar et al. (2013)
Irã	87	84	97	1.6 – 60	25	Dehghan et al. (2014)
Noruega	115	38	33	10 – 130	43	Skaug et al. (1998)
Noruega	80	17	21	10 – 182	30	Skaug et al. (2001)
Polônia	78	40	51	22 – 26	19	Karwowska et al. (2004)
Serra Leoa	113	40	35	200 – 337000	7900	Jonsyn et al. (1995)
Eslováquia	76	23	30	2 – 60	NI	Dostal et al. (2008)
Suécia	40	23	58	10 – 40	NI	Breitholtz- Emanuelsson et al. (1994)
Suíça	40	4	10	5 – 14	NI	Zimmerli e Dick (1995)
Turquia	75	75	100	621 – 13111	NI	Gürbay et al. (2009)

NI: Não informado. ¹ Todas as amostras coletadas em um banco de leite humano.

Fonte: Própria autoria.

Como pode-se observar na Tabela 2, após a AFM₁, a OTA é a micotoxina que chama mais a atenção para sua detecção no leite materno, de acordo com estudos realizados em diversos países. Entretanto, há registro da incidência de outras micotoxinas no leite humano no Brasil. A maior preocupação em relação à presença de micotoxinas no leite materno é que a transferência das mesmas para o leite se dá por meio do consumo de alimentos contaminados

e, conseqüentemente, a exposição dos lactentes ocorre através da amamentação, embora possam ser transferidas também pela placenta, durante a gravidez (ULASZEWSKA et al., 2011). Segundo Jonker et al. (2005), Van Herwaarden e Schinkel (2006), é provável que a excreção de micotoxinas para o leite materno esteja relacionada à proteína BCRP (Breast Cancer Resistance Protein), resistente ao câncer de mama e, por fazer parte da família transportadora de efluxo dependentes de ATP, pode ser responsável pela excreção de vários xenobióticos para o leite humano.

As características bioquímicas do leite, como baixo pH e elevado teor de lipídios, se comparado ao plasma, conduzem a esta ocorrência. Além disso, a composição do leite materno muda ao longo de algumas semanas pós-parto (coloostro/leite de transição/leite maduro) e durante o esvaziamento da mama (leite inicial/leite final) (TONON, 2013). Estes fatores contribuem para a excreção de substâncias xenobióticas para o leite humano (ITO; LEE, 2003). Outro fator que aumenta a excreção de micotoxinas para o leite materno se deve à variação do conteúdo lipídico durante a lactação (POLYCHRONAKI et al., 2006). As informações sobre a toxicocinética de compostos químicos no leite materno ainda são incompletas (LANDRIGAN et al., 2002; TONON, 2013).

1.2.7 Biomarcadores de exposição às micotoxinas

Considerando os riscos à saúde humana relacionados à ingestão de micotoxinas na dieta, torna-se necessário verificar a exposição às micotoxinas encontradas com maior frequência nos alimentos, tanto das mães lactantes quanto dos bebês recém-nascidos, através do leite materno. Os dados disponíveis sobre a toxicocinética de várias micotoxinas em modelos animais, bem como em seres humanos, indicam que a exposição às micotoxinas pode ser medida por biomarcadores em urina humana. Biomarcadores de exposição e efeito para as aflatoxinas têm sido validados em estudos detalhados em animais e humanos. A relação dose-resposta entre os níveis de AFM₁ e AFB₁-N⁷-guanina e incidência do tumor de fígado foi primeiramente estabelecida em experimentos com animais (GROOPMAN; KENSLER, 1993). O aduto de AFB-N⁷-guanina é o produto de ligação entre a aflatoxina-exo-8,9-epóxido, metabólito de AFB₁ altamente reativo, sendo excretado na urina. Em outro estudo mais antigo, realizado por Zhu et al. (1987), a AFM₁ foi utilizada para avaliar a ingestão de aflatoxinas, conseguindo encontrar uma relação entre as concentrações de aflatoxinas ingeridas e a excreção de AFM₁ na urina. Os níveis urinários de AFM₁ possuem uma boa correlação com a dose de exposição de AFB₁ (BANDO et al., 2007). Ambos biomarcadores foram validados e são empregados como

biomarcadores de exposição recente (2-3 dias) à AFB₁ através da dieta (GAN et al., 1988; GROOPMAN et al., 1992a, 1992b). Adicionalmente, a AFB₁-N⁷-guanina é considerada como um biomarcador de dose biologicamente eficaz de AFB₁, sendo que níveis elevados estão associados ao alto risco de câncer no fígado (QIAN et al., 1994).

Alguns trabalhos têm relatado a ocorrência de aflatoxinas em alimentos no Brasil, principalmente em amendoim e milho, porém, níveis de AFM₁ também têm sido descritos em leite, mas em concentrações abaixo do limite de 0,50 g/L, estabelecido pela Anvisa (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) (JAGER et al., 2016). A avaliação da exposição humana através de biomarcadores foi relatada em poucos estudos no Brasil. Romero et al. (2010) descreveram a excreção de AFM₁ na urina humana em Piracicaba, São Paulo, em níveis que variaram de 1,8 à 39,9 pg/mL. No trabalho realizado por Jager et al. (2014), os autores investigaram a exposição humana a curto prazo às aflatoxinas, em Pirassununga, São Paulo. 61% das amostras de urina foram positivas para AFM₁ (0,19 – 12,7 pg/mg de creatinina). Jager et al. (2016) relataram a exposição dos residentes de Pirassununga, São Paulo, às aflatoxinas B₁ e M₁, por meio da determinação do soro AFB₁-lisina e dos biomarcadores urinários (AFM₁ e AFB₁-N⁷-guanina). Nos alimentos avaliados, consumidos pelos participantes do estudo, 38 amostras de cereais (28%) e 31 amostras de leite (36%) continham AFB₁ e AFM₁, respectivamente. Entretanto, AFM₁ foi detectada em 74 amostras de urina (65%), com médias variando entre 0,37 – 1,70 pg/mg de creatinina. Diante dos relatos expostos, tem-se a confirmação da necessidade de mais estudos utilizando biomarcadores urinários para estimar a exposição da população às aflatoxinas.

No Brasil, ainda não foram publicados trabalhos para avaliar a exposição das mães lactantes às aflatoxinas através da urina, utilizando os biomarcadores. Esta avaliação é necessária em termos de problema de saúde pública, pois tendo em vista o que foi apresentado, há incidência de AFB₁ em alimentos e AFM₁ em leite e produtos lácteos, além da presença dessa micotoxina na urina, gerando preocupação quanto à exposição dos recém-nascidos não apenas para as aflatoxinas citadas, mas também a possível exposição às outras toxinas ainda não detectadas, as quais podem conduzir sérios riscos à saúde das crianças.

Polychronaki et al. (2006) estudaram os níveis e a frequência de AFM₁ no leite materno como biomarcador de exposição das mães no Egito. 36% das amostras de leite materno analisadas foram positivas para AFM₁ e no trabalho reportado por Sadeghi et al. (2009), os autores verificaram a exposição dos lactentes à AFM₁ e das mães lactantes à AFB₁, em Teerã, no Irã, utilizando a AFM₁ no leite materno como um biomarcador para a exposição à AFB₁.

Das 160 amostras de leite humano, 157 estavam contaminadas com AFM₁, nas concentrações de 0,3 – 26,7 ng/kg. El-Nezami et al. (1995) estudaram a exposição de crianças em fase de amamentação à AFM₁ e das mães à AFB₁, utilizando AFM₁ no leite materno como um biomarcador para a exposição à AFB₁, em Vitoria (Austrália) e na Tailândia. AFM₁ foi encontrada em 11 amostras de leite materno (de 73 amostras totais) de Vitoria e em 5 provenientes da Tailândia (de 11 amostras totais), em concentração média de 0,071 ng/mL e 0,664 ng/mL, respectivamente.

Para verificar a exposição de indivíduos às outras micotoxinas (fumonisinas, OTA, ZEA e DON), também são utilizados os biomarcadores. Para as fumonisinas, dois biomarcadores de exposição das mesmas estão sendo investigados, que no caso é a própria fumonisina na urina e alterações dos níveis de esfinganina e esfingosina na urina e no sangue (TURNER; NIKIEMA; WILD, 1999). A urina é considerada o melhor material biológico para analisar a fumonisina livre.

No trabalho descrito por Shetty e Bhat (1998), os autores descreveram um método utilizando cromatografia líquida de alta eficiência para detectar e quantificar a FB₁ na urina de humanos. Infelizmente, a detecção da micotoxina não foi possível devido à escassez de metodologias atuais, áreas de baixo risco de contaminação ou baixo consumo diário de milho pela população local (TURNER; NIKIEMA; WILD, 1999). Já a esfinganina e a esfingosina, em trabalho publicado por Solfrizzo et al. (2004), foram detectadas na urina de indivíduos que consumiram elevadas quantidades de milho em áreas do norte da Argentina e sul do Brasil, sendo essas amostras comparadas com as coletadas na Argentina Central e Itália, localidades que tiveram menos consumo do milho. Os autores concluíram na pesquisa que os níveis de esfinganina e esfingosina apresentaram-se maiores para o grupo de voluntários que consumiram mais milho. Qiu e Liu (2001), também avaliaram os níveis de esfinganina e esfingosina na urina de indivíduos que consumiram cereais contaminados com FB₁, antes e após 30 dias ao consumo. O metabolismo dos esfingolipídeos, segundo o trabalho, pode ser afetado pela FB₁, portanto, análises de esfinganina e esfingosina na urina podem ser utilizados como biomarcadores para verificar a exposição humana à FB₁. Ainda de acordo com Bando et al. (2007), mais estudos são necessários para verificar a detecção e validação das substâncias citadas como biomarcadores de exposição às fumonisinas.

Em relação aos biomarcadores de exposição à OTA, há poucos trabalhos na literatura que sugerem a aplicação dos mesmos. De acordo com Gilbert, Brereton e Macdonald (2001), a OTA possui uma meia-vida longa no sangue, aproximadamente 35 dias, devido a sua ligação

com as proteínas do plasma. Os níveis plasmáticos podem ser medidos facilmente, porém, demonstram fraca correlação com ingestões individuais de OTA, enquanto que em níveis urinários, mesmo baixos, apresentam melhor correlação com o consumo.

Para o DON, também não há disponibilidade de muitos estudos na literatura que reportem dados de avaliação de biomarcadores de exposição à essa micotoxina na urina. Em um trabalho publicado por Meky et al. (2001), estudou-se o metabolismo do DON para se estabelecer um biomarcador de exposição humana. As cobaias receberam uma dose única e sua distribuição pelos fluidos foi monitorada por 72 horas. Após este período, o DON e seus metabólitos foram detectados no plasma dos ratos (cerca de 9% ligados às proteínas plasmáticas). 37% do DON administrado às cobaias foram excretados na urina de forma conjugada com ácido glicurônico, sendo o maior metabólito urinário. De acordo com estudos em animais, o metabólito epóxido de DON (DOM-1) e o conjugado glicuronídeo podem ser utilizados como possíveis biomarcadores de exposição ao DON.

A ZEA pode ser reduzida pelo metabolismo dos mamíferos correspondente α - e β -zearalenol (α - e β -ZOL), formando um conjugado de ácido glicurônico. Poucos estudos estão disponíveis acerca da excreção de ZEA na urina em seres humanos (BALDWIN et al., 2011). Em um estudo realizado por Warth et al. (2012), amostras de urina foram obtidas de voluntários camaroneses e ZEA-GlcA foi detectada em algumas amostras, com uma concentração máxima de 31 $\mu\text{g/L}$.

O desenvolvimento de novas técnicas analíticas trouxe contribuições importantes para a abordagem de biomarcadores multi-micotoxinas, como a medição de dados mais realistas em relação à exposição às micotoxinas, já que uma mistura das mesmas deve ocorrer em condições de campo adequadas e a aplicação potencial em avaliações de risco às micotoxinas, combinadas com seus possíveis efeitos de interação. No entanto, a preparação da amostra continua sendo um desafio para o desenvolvimento de métodos de análise de multi-micotoxinas, devido à ampla gama de propriedades químicas das diferentes micotoxinas e seus metabólitos (SONG et al., 2013).

Em uma pesquisa realizada por Solfrizzo et al. (2011), os autores descreveram um método multi-micotoxina na urina. No trabalho, foram analisadas FB₁, AFM₁, OTA, DON, DOM-1, α - e β -zearalenol, baseando-se na limpeza de amostras por colunas de imunoafinidade multi-anticorpo (IAC) e extração da fase sólida (SPE). Já em outro trabalho realizado por Warth et al. (2012), foi desenvolvido um método multi-biomarcador, baseado em uma abordagem “dilute and shoot” (sem preparação de amostra, além da centrifugação e diluição), para 15

micotoxinas (FB₁, AFM₁, OTA, DON, DON-3-GlcA, DOM-1, ZEA, α - e β -zearalenol. Em decorrência destas descobertas, o desenvolvimento rápido de métodos analíticos para múltiplas micotoxinas na urina necessita de estudos adicionais para a validação dos biomarcadores, pois precisam fornecer uma estimativa exata da capacidade dessa medida, a fim de prever a exposição real às micotoxinas (OLIVEIRA, 2016, p. 59-60)

É possível verificar que a exposição pode ser afetada pela concentração da micotoxina nos alimentos contaminados, por sua biodisponibilidade e duração da exposição. Estudos complementares são necessários para que seja feita uma relação entre as concentrações das micotoxinas encontradas na urina humana e os níveis reais das múltiplas micotoxinas ingeridas por meio da dieta, pois isso contribuirá para avaliações futuras acerca da exposição de micotoxinas e a ocorrência de doenças na população (OLIVEIRA, 2016).

O Quadro 2 apresenta alguns resultados de estudos realizados sobre os biomarcadores de exposição às múltiplas micotoxinas encontradas na urina humana.

Quadro 2 - Estudos sobre biomarcadores urinários para exposição às múltiplas micotoxinas em populações humanas.

País/Região	Micotoxinas avaliadas	Principais resultados	Referência
Suécia	DON, NIV, FB ₁ , FB ₂ , ZEA, OTA, AFM ₁ , DOM-1, α -ZOL E β -ZOL.	252 amostras de urina foram analisadas, utilizando o método multi-biomarcador LC-MS/MS. Foi encontrada a exposição simultânea a mais de uma micotoxina ($N=173$, 69%). Em uma amostra detectou-se o número máximo de micotoxinas (DON, ZEA, FB ₁ , FB ₂ e OTA) e a maioria continha entre 1 à 3 micotoxinas diferentes. Não houveram diferenças entre homens e mulheres quanto à concentração das micotoxinas.	WALLIN et al. (2015)
Bélgica	AFB ₁ , AFB ₂ , AFG ₁ , AFG ₂ , AFM ₁ , FB ₁ , FB ₂ , FB ₃ , HFB ₁ , OTA e OT α , T-2, HT-2, DON, DON-3GlcA, DON-15GlcA, DOM-1, DOMGlcA, 3ADON, 3ADON15GlcA, 15ADON, 15ADON3GlcA, DAS, FusX, ZEA, ZEA14GlcA, α -ZEL, α -ZEL7GlcA, α -ZEL14GlcA, ZEL, β -ZEL14GlcA, CIT, HO-CIT.	Crianças ($N=155$) e adultos ($N=239$) foram selecionados para o estudo. As amostras de urina foram analisadas quanto à presença de 33 biomarcadores potenciais, através de dois métodos LC-MS/MS validados. Das 33 micotoxinas, 9 foram detectadas, sendo o DON, OTA e CIT mais encontrados. O DON-15GlcA foi detectado em todas as amostras de urina e o DON-3GlcA em 91% de crianças e 77% de adultos. OTA contaminou 51% e 35% das amostras de urina de crianças e adultos, respectivamente. CIT e seu metabólito, em 72 e 6% de crianças e 59 e 12% em adultos. α -ZEL e β -ZEL14GlcA, detectados em uma e em duas amostras de adultos, respectivamente.	HEYNDRIKX et al. (2015)
Camarões	AFM ₁ , FB ₁ , FB ₂ , OTA, DON, DOM-1, DON-3-GlcA, DON-15-GlcA, NIV, toxina T-2, toxina HT-2, ZEA, ZEA-14-GlcA, α - e β -ZOL.	As amostras ($N=175$) foram analisadas por “dilute and shoot”, através do método LC-ESI-MS / MS, avaliando 15 micotoxinas e seus metabólitos. A exposição humana às múltiplas micotoxinas foi encontrada em 18% das amostras de urina estudadas.	ABIA et al. (2013)

Nigéria	AFM ₁ , FB ₁ , OTA, DON, DOMGlcA, FB ₂ , DOM-1, ZEA, ZEA-14-GlcA, α - e β -ZOL, toxina T-2, toxina HT-2 e NIV.	19 crianças, 20 adolescentes e 81 adultos (N=120) participaram do estudo. OTA, AFM ₁ e FB ₁ estavam presentes em 50,8% das amostras de urina, sendo os biomarcadores mais frequentes, pois foram detectados em todas as categorias de idade.	EZEKIEL et al. (2014)
África do Sul/ Transkei	AFM ₁ , FB ₁ , FB ₂ , OTA, DON, DOM-1, DON-3-GlcA, DON-15-GlcA, NIV, toxina T-2, toxina HT-2, ZEA, ZEA-14-GlcA, α - e β -ZOL.	Foram coletadas amostras (N=53) de voluntários da região do estudo, as quais foram analisadas pelo método LC-MS/MS. Os níveis urinários de FB ₁ , DON, DON-3GlcA, DON-15-GlcA, NIV, ZEA, OTA, α - e β -ZOL foram encontrados nas amostras dos participantes. A ocorrência de FB ₁ foi correlacionada com os dados de consumo de milho; a relação com os dados de ingestão de alimentos ajuda a adquirir maiores conhecimentos para validar novos biomarcadores de exposição humana.	SHEPHARD et al. (2013)

Fonte: Própria autoria.

Como apresentado, ainda é necessária a correlação de maiores dados e estudos quanto a ingestão de alimentos da população, assim, através da monitoração da dieta dos indivíduos será possível aprimorar o conhecimento desse tema e validar novas metodologias para a utilização de biomarcadores de exposição humana às micotoxinas citadas, futuramente.

1.2.8 Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS/MS)

Segundo Snyder, Kirkland e Dolan (2010), a cromatografia líquida é um dos vários métodos cromatográficos utilizados para a separação e a análise de combinações químicas, onde os compostos são separados ao passar a mistura através de uma coluna que retém alguns compostos por um período maior que outros. Sua aplicabilidade é praticamente universal e poucos compostos são excluídos da possibilidade de separação por LC, além da grande diversidade de equipamentos, colunas e outros materiais disponíveis comercialmente. Estas condições têm ampliado o uso da técnica e proporcionado que a maioria dos laboratórios tenham acesso à esse tipo de análise.

Os métodos para multi-análitos estão se tornando cada vez mais necessários devido às diversas micotoxinas que ocorrem simultaneamente no mesmo alimento. A aplicação de técnicas de espectrometria de massas de cromatografia líquida (LC-MS) vem sendo muito reconhecida, pois permite o monitoramento simultâneo de várias micotoxinas diferentes, além de oferecer vantagens em relação à elevada seletividade e sensibilidade, redução substancial do tratamento de amostras, quantificação simultânea e confirmação da identidade em níveis regulados (NÚÑEZ et al., 2015). Ainda que as metodologias LC-MS para a determinação de micotoxinas simples ou múltiplas sejam utilizadas em análises de rotina em laboratórios de controle, até o momento nenhum método oficial ou padrão para micotoxinas é baseado em LC-MS (GIROLAMO et al., 2017). Devido à necessidade de métodos LC-MS padronizados para a detecção de micotoxinas, a Comissão Europeia (CE) aprovou um mandato (M/520) para a padronização de métodos de análise para micotoxinas nos alimentos. Com este mandato, a CE convidou o Comitê Europeu de Normalização (CEN) à estabelecer normas europeias e especificações técnicas para o desenvolvimento de onze métodos de análise padronizados para micotoxinas em alimentos. Seis deles foram solicitados especificamente para LC-MS (CE, 2013).

No trabalho descrito por Rubert et al. (2014), os autores verificaram a ocorrência de 35 micotoxinas de leite materno, as quais foram avaliadas por meio de um método baseado na extração QuEChERS e detecção UHPLC-HRMS, o qual permite a detecção de micotoxinas-alvo para avaliar a qualidade da alimentação inicial de recém-nascidos. O método desenvolvido possibilita a detecção das micotoxinas e de seus metabólitos. No estudo, ZEA, NEO, NIV, ENA, ENA₁, ENB, ENB₁ foram detectados como micotoxinas não metabolizadas. Já os metabólitos DOM, HT-2, T-2 triol e ZEA estavam presentes nas amostras, supostamente. HT-2, α - e β -ZOL foram identificados devido à disponibilidade do padrão analítico. ZEA foi encontrada em 37% das amostras, em concentrações de 2,1 à 14,3 ng/mL e seus metabólitos, α - e β -ZOL, identificados em uma amostra (16,7 e 39,8 ng/mL, respectivamente). HT-2 demonstrou um maior nível de concentração para os tricotecenos do tipo A (62,5 ng/mL); T-2 triol foi detectado em uma amostra e NIV ocorreu em 9% das amostras (Tricoteceno do tipo B) e DOM estava presente em 3% das amostras. Diante dos resultados, o método multi-micotoxinas demonstrou ser uma excelente ferramenta para a identificação de micotoxinas e seus metabólitos, demonstrando a necessidade de maiores estudos sobre a ocorrência dessas substâncias em fluidos biológicos e seu impacto na saúde humana. São necessários ainda, investigações mais profundas e o fornecimento de novas recomendações alimentares para as

mulheres durante a gestação e a amamentação, a fim de garantir uma melhor qualidade para a alimentação dos bebês.

Em outro estudo publicado por Ezekiel et al. (2014), a exposição humana às micotoxinas na população rural no norte da Nigéria foi investigada, utilizando biomarcadores urinários. A pesquisa avaliou 120 voluntários, através do método LC-MS/MS, sendo que 8 analitos foram identificados em 50,8% das amostras de urina. OTA, AFM₁ e FB₁ foram as micotoxinas que ocorreram com maior frequência. Lattanzio et al. (2011) utilizaram o método LC-MS/MS para estudar o perfil de excreção do DON em amostras de urina de ratos e humanos. Determinou-se a detecção simultânea de todos os metabólitos investigados e níveis de DON foram encontrados, na faixa de 0,003 – 0,008 µg/mL em humanos saudáveis. Já para o DON e o DOM-1, entre 1,9 – 4,9 µg/mL e 1,6 – 5,9 µg/mL, respectivamente, na urina de ratos administrados com as micotoxinas. A pesquisa demonstrou que a técnica LC-MS/MS é sensível e seletiva para a detecção direta e a caracterização de metabólitos de DON em matrizes mais complexas.

Em um estudo publicado por Wang e Li (2015), os autores realizaram uma triagem rápida de micotoxinas em leite líquido e em pó, utilizando o método SPE-UPLC-MS/MS e a quantificação dos efeitos da matriz durante toda a corrida cromatográfica, sendo que quatro micotoxinas foram avaliadas na pesquisa (OTA, ZEA, AFB₁ e AFM₁). O limite de detecção (LOD) para as micotoxinas nas amostras de leite líquido e em pó foram de 0,05 – 2 ng/L e 0,25 – 10 ng/kg, respectivamente e o limite de quantificação (LOQ) para as mesmas foram de 0,1 – 5 ng/L e 0,5 – 25 ng/kg para leite líquido e em pó, respectivamente.

Huang et al. (2014) realizaram uma determinação simultânea de AFM₁, OTA, ZEA e α -ZOL em leite, através da metodologia de LC-MS/MS. O LOD das micotoxinas permaneceram na faixa de 0,003 – 0,015 µg/kg, sendo os coeficientes de correlação obtidos entre 0,001 – 1,00 µg/kg das micotoxinas, juntamente com uma boa recuperação (87 à 109%). As taxas detectadas das micotoxinas foram de 16,7% para 96,7% em leite cru, leite líquido e amostras de leite em pó, coletadas nas fazendas leiteiras e de supermercados de Pequim. Pôde-se concluir no trabalho que o método LC-MS/MS é interessante e adequado para a determinação simultânea de AFM₁, OTA, ZEA e α -ZOL no leite, por exemplo.

Jia et al. (2014) estudaram a ocorrência de multi-micotoxinas em produtos lácteos (leite em pó, leite e iogurte) utilizando LC-MS/MS de quadrupolo de ionização. As recuperações de extração foram de 86,6 – 113,7%, com um coeficiente de variação <6,2%. Foram avaliados 58 compostos foram detectados na faixa de concentração de 0,001 – 100 µg/kg, com coeficiente de correlação >0,99. O LOD para os analitos estiveram entre 0,001 – 0,92 µg/kg. De acordo

com a pesquisa, o método foi executado com sucesso na triagem de micotoxinas em amostras comerciais de produtos lácteos, além de ser vantajoso para identificar rapidamente diferentes contaminantes de alimentos.

Na pesquisa realizada por Gerding, Cramer e Humpf (2014), foi avaliada a exposição da população alemã às micotoxinas, utilizando um método de multi-biomarcadores urinários LC-MS/MS de 101 participantes do estudo. Foi documentado um questionário de frequência alimentar dos voluntários para correlacionar a exposição às micotoxinas com hábitos nutricionais individuais. Foi investigada a presença de 23 biomarcadores urinários por meio de espectrometria líquida acoplada à espectrometria de massas. 6 micotoxinas e metabólitos urinários (DON, DON-3-GlcA, zearalenona-14-O-glucuronida, T-2 toxina, enniatina B e dihidrocitrinona) em 87% das amostras, únicas ou com co-ocorrência. Somente DON e DON-3-GlcA foram detectáveis em quantidades quantificáveis. Calculou-se uma ingestão diária média provisória de 0,52 µg DON/kg de peso corpóreo, o que revelou exposições máximas, acima da ingestão diária aceitável para o DON na população alemã, segundo os autores.

Huybrechts et al. (2015) utilizaram o método LC-MS/MS para avaliar a incidência de micotoxinas na urina humana. Cerca de 32 biomarcadores foram medidos quantitativamente ou semi-quantitativamente em 32 amostras de urina de voluntários belgas. Todas as amostras de urina continham DON-15-GlcA e estavam presentes também, DON-3-GlcA e o de-epoxdeoxinivalenol-glucuronido (90 e 25%, respectivamente). Já o DON foi detectado em 60% das amostras, em concentrações menores. GlcA de DON foram os principais biomarcadores detectados para a exposição ao deoxinivalenol. A OTA foi encontrada em 70% das amostras e a citrinina, em 90% das amostras, ambas em pg/mL.

1.2 Referências

- ABDALLA, E. A. M. A.; ALY S. E.; NEAMAT-ALLAH, A. A. human exposure to mycotoxins in Egypt. **Mycotoxin Research**, Heidelberg, v.18, n.1, p. 23-30, 2002.
- ABDULRAZZAQ, Y. M et al. Aflatoxin M₁ in breast milk of UAE women. **Annals of Tropical Paediatrics**, London, v. 23, n. 3, p. 173–179, 2003.
- ABIA, W. A. et al. Bio-monitoring of mycotoxin exposure in Cameroon using a urinary multi-biomarker approach. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 62, p. 927-934, 2013.
- ADEJUMO, O. et al. Correlation between aflatoxin M₁ content of breast milk, dietary exposure to aflatoxin B₁ and socioeconomic status of lactating mothers in Ogun State, Nigeria. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 56, p. 171–177, 2013.
- AFSHAR, P. et al. Occurrence of ochratoxin A and aflatoxin M₁ in human breast milk in Sari, Iran. **Food Control**, Guildford, v. 31, p. 525-529, 2013.
- ALMEIDA, A. P. et al. Ochratoxin A in Brazilian instant coffee. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 38, p. 300-303, 2007.
- ALVITO, P. C. et al. Occurrence of aflatoxins and ochratoxin A in baby foods in Portugal. **Food Analytical Methods**, New York, v. 3, p. 22–30, 2010.
- ANDERSON, G. H. Human milk feeding. **Pediatric Clinics of North America**, Philadelphia, v. 32, p. 335-353, 1985.
- ANDRADE, P. D. **Aflatoxinas e ocratoxina A na dieta de lactentes e adultos: desenvolvimento de metodologia e avaliação da exposição**. 2012. 116 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade de Brasília, Faculdade de Ciências da Saúde, Brasília, 2013.
- ANDRADE, P. D.; SILVA, J. L. G.; CALDAS, E. D. Simultaneous analysis of aflatoxins B₁, B₂, G₁, G₂, M₁ and ochratoxin A in breast milk by high-performance liquid chromatography/fluorescence after liquid–liquid extraction with low temperature purification (LLE–LTP). **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1304, p. 61-68, 2013.
- ARAUJO, L. **Validação de um método para detecção simultânea de zearalenona, ocratoxina A e aflatoxina B₁ e avaliação do efeito do processamento do pão sobre os níveis destas micotoxinas**. 2014. 51p. Trabalho de conclusão de curso (Engenharia de Alimentos) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Porto Alegre, 2014.
- ASSUNÇÃO, R. et al. Single-compound and cumulative risk assessment of mycotoxins present in breakfast cereals consumed by children from Lisbon region, Portugal. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 86, p. 274–281, 2015.
- ATASEVER, M. et al. Assessment of aflatoxin M₁ in maternal breast milk in Eastern Turkey. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 66, p. 147–149, 2014.
- AWASTHI, V. et al. Contaminants in milk and impact of heating: an assessment study. **Indian Journal of Public Health**, Calcutta, v. 56, n. 1, p. 95-99, 2012.
- BALDWIN, T. T. et al. The current state of mycotoxin biomarker development in humans and animals and the potential for application to plant systems. **World Mycotoxin Journal**, Wageningen, v. 4, n. 3, p. 257–270, 2011.

- BANDO, E. et al. Biomarcadores para avaliação da exposição humana às micotoxinas. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, Rio de Janeiro, v. 43, n. 3, p. 175-180, 2007.
- BARKAI-GOLAN, R. Aspergillus mycotoxins. In: _____. **Mycotoxins in fruits and vegetables**. San Diego: Academic Press, 2008. p. 408.
- BARREIRA, M. J.; ALVITO, P.; ALMEIDA, C. M. M. Occurrence of patulin in apple-based-foods in Portugal. **Food Chemistry**, London, v. 121, n. 3, p. 653–658, 2010.
- BATES, C. J.; PRENTICE, A. Breast milk as a source of vitamins, essential minerals and trace elements. **Pharmacology & Therapeutics**, Oxford, v. 62, p. 193-198, 1994.
- BATTACONE, G. et al. The transfer of aflatoxin M₁ in milk of ewes fed diet naturally contaminated by aflatoxins and effect of inclusion of dried yeast culture in the diet. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 92, n. 10, p. 4997-5004, 2009.
- BAUER, J.; GAREIS, M. Ochratoxin A in der Nahrungsmittelkette. **Zoonoses and Public Health**, Berlin, v. 34, n. 1-10, p. 613–627, 1987.
- BENNETT, J. W.; KLICH, M. Mycotoxins. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 16, p.497-516, 2003.
- BERQUÓ, E. S.; SOUZA, J. M. P.; GOTLIEB, S. L. D. **Bioestatística**. São Paulo, EPU, 1981.
- BHAT, R.; RAVISHANKAR, V. R.; KARIM, A. A. Mycotoxins in food and feed: present status and future concerns. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, Chicago, v. 9, p. 57–81, 2010.
- BHATNAGAR, D.; YU, J.; ERLICH, K. C. Toxins of filamentous fungi. **Chemical Immunology and Allergy**, Basel, v. 81, p. 167-206, 2002.
- BIASUCCI, G. et al. The presence of ochratoxin A in cord serum and in human milk and its correspondence with maternal dietary habits. **European Journal of Nutrition**, Heidelberg, v. 50, n. 3, p. 211-218, 2011.
- BLANKSON, G. K.; MILL-ROBERTSON, F. C. Aflatoxin contamination and exposure in processed cereal-based complementary foods for infants and young children in greater Accra, Ghana. **Food Control**, Guildford, v. 64, p. 212-217, 2016.
- BLUNDEN, G. et al. Mycotoxins in food. **Medical Laboratory Scientist**, v. 48, p. 271-282, 1991.
- BOEIRA, S. P. **Caracterização de efeitos tóxicos decorrentes da exposição aguda à micotoxina zearalenona em camundongos**. 2012. 101p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Pampa, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Itaquí, RS, 2012.
- BOLGER, M. C. R. D. et al. Fumonisin: safety evaluation of certain mycotoxins in food. **WHO Food Additives Series**, Geneve, v. 47, p. 103–279, 2001.
- BONY, S. et al. Genotoxicity assessment of deoxynivalenol in the Caco-2 cell line model using the Comet assay. **Toxicology Letters**, Amsterdam, v. 166, p. 67–76, 2006.

BORCHERS, A. et al. Food safety. **Clinical Reviews in Allergy & Immunology**, Totowa, v. 39, p. 95–141, 2010.

BORDIN, K. **Avaliação de biomarcadores de exposição humana à fumonisina B1 nos alimentos em municípios dos estados de São Paulo e Santa Catarina, Brasil**. Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo, Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Pirassununga, 2015.

BORUTOVA, R. et al. Co-occurrence and statistical correlations 389 between mycotoxins in feedstuffs collected in the Asia-Oceania in 2010. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 178, n. 3-4, p. 190-197, 2012.

BOSCH, F. X.; PEERS, F. Aflatoxins: data on human carcinogenic risk. In: O'NEILL, I.K.; CHEN, J.; BARTSCH, H. (Ed.). *Relevance to human cancer of N-nitroso compounds, tobacco smoke and mycotoxins*. Lyon: IARC, 1991. p. 48-53. (IARC Scientific Publications, 105).

BOUDRA, H.; MORGAVI, D.P. Development and validation of a HPLC method for the quantitation of ochratoxins in plasma and raw milk. **Journal of Chromatography B**, Amsterdam, v. 843, p. 295-301, 2006.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC 07/2011**, de 22 de fevereiro de 2011 da ANVISA. Estabelece limites para micotoxinas em alimentos, principalmente em grãos. Portal da Anvisa de 22 de fevereiro de 2011.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Recomendações técnicas para o funcionamento de bancos de leite humano**. 3. ed. Brasília: Secretaria de Políticas de Saúde, 1998.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Resolução RDC nº 274, da ANVISA, de 15 de outubro de 2002. Estabelece limites de tolerância para aflatoxinas em amendoim, milho e derivados. **Diário Oficial da União**, Seção I, Brasília, 16 de outubro de 2002.

Brasil. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Município que promove a amamentação promove a saúde**. Prêmio Bibi Vogel. Pacto nacional pela redução da mortalidade materna e neonatal. Brasília; 2005.

BRERA, C.; MIRAGLIA, M.; COLATOSTI, M. Evaluation of the impact of mycotoxins on human health: Sources of errors. **Microchemical Journal**, New York, v. 59, n. 1, p. 45-49, 1998.

BRYDEN, W. L. Mycotoxins in the food chain: human health implications. **Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition**, v. 16, n. 1, p. 95-101, 2007.

CALDAS, E. D.; SILVA, S. C.; OLIVEIRA, J. A. Aflatoxinas e ocratoxina A em alimentos e riscos para a saúde humana. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 36, n. 3, p. 319-323, 2002.

CAMPAGNOLLO, F. B.; GANEV, K. C.; KHANEGHAH, A. M.; PORTELA, J. B.; CRUZ, A. G. GRANATO, D. CORASSIN, C. H. OLIVEIRA, C. A. F.; SANT'ANA, A. S. The occurrence and effect of unit operations for dairy products processing on the fate of aflatoxin M₁: a review. **Food Control**, Guildford, v. 68, p. 310-329, 2016.

CANTÚ-CORNELIO, F. et al. Occurrence and factors associated with the presence of aflatoxin M₁ in breast milk samples of nursing mothers in central Mexico. **Food Control**, Guildford, v. 62, p. 16–22, 2016.

CARDOSO, M. A.; STOCCO, P. R. Desenvolvimento de um questionário quantitativo de frequência alimentar em imigrantes japoneses e seus descendentes residentes em São Paulo, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, São Paulo, v. 16, p. 107-114, 2000.

CARVAJAL, M. et al. Aflatoxin in pasteurized and ultrapasteurized milk with different fat content in Mexico. **Journal of Food Protection**, Des Moines, Ames, v. 66, n. 10, p. 1885-1892, 2003.

COUNCIL FOR AGRICULTURAL SCIENCE AND TECHNOLOGY. **Mycotoxins: risks in plant, animal and human systems**. Ames: CAST, 2003. 191 p. (Task Force Report, 139).

CHANGBUMRUNG, S. et al. Aflatoxins M₁ and M₂ in breast milk. **Journal of Nutrition Association of Thailand**, Bangkok, v. 38, p. 15-26, 1999.

CHERKANI-HASSANI, A.; MOJEMMI, B.; MOUANE, N. Occurrence and levels of mycotoxins and their metabolites in human breast milk associated to dietary habits and other factors: a systematic literature review, 1984-2015. **Trends in Food Science & Technology**, Cambridge, v. 50, p. 56-69, 2016.

CHU, S. F. Recent progress on analytical techniques for mycotoxins in feedstuffs. **Journal of Animal Science**, Cambridge, v. 70, p. 3950-3963, 1992.

COKER, R. D. **Mycotoxins: the silent threat to human and animal health**. Greenwich: Procurement and Business Services Department, University of Greenwich, 1999.

COTTY, P. J.; PROBST, C.; JAIME-GARCIA, R. Etiology and management of aflatoxin contamination. In: LESLIE, J. F.; BANDYOPADHYAY, R.; VISCONTI, A. (Eds.) **Mycotoxins: detection methods, management, public health and agricultural trade**. Wallingford: CABI, 2008. p. 287-299.

COULOMBE, R. A. **Aflatoxins**. In: SHARMA, R. P.; SALUNKLE, D. K. (Ed.) **Mycotoxins and phytoalexins**. Boca Raton: CRC Press, 1991. p. 103-143.

CRUZ, J. V. S. **Ocorrência de aflatoxinas e fumonisinas em produtos à base de milho e milho utilizado como ingrediente de ração para animais de companhia, comercializados na região de Pirassununga, Estado de São Paulo**. 2010. 73p. Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo, Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Pirassununga, 2010.

DALES, R. E.; MILLER, J. D. Airborne microorganisms and disease residential buildings related illness: epidemiologic and case-related evidence. In: FLANNIGAN, B.; SAMSON, R. A.; MILLER, J. D. (Ed.) **Microorganisms in home and indoor work environments**. London: Taylor & Francis, 2002. p. 83-99.

DEHGHAN, P. et al. Prevalence of ochratoxin A in human milk in the Khorrambid town, Fars province, South of Iran. **Jundishapur Journal of Microbiology**, v. 7, n. 7, p. 112-120, 2014.

DEVINCENZI, U. M.; MATTAR, M. J. G.; CINTRA, E. M. Nutrição no primeiro ano de vida. In: SILVA, S. M. C. S.; Mura, J. D. **Tratado de alimentação, nutrição e dietoterapia**. São Paulo: Roca, 2007. p. 319-345.

DI CASTRO, I. C. **Aspectos sobre as micotoxinas na produção de suínos**. Trabalho de conclusão de curso (Graduação) - Universidade Federal de Goiás, Escola de Veterinária e Zootecnia, Goiânia, 2014.

DIAZ, G. J.; SÁNCHEZ, M. P. Determination of aflatoxin M₁ in breast milk as a biomarker of maternal and infant exposure in Colombia. **Food Additives & Contaminants: Part A**, Abingdon, v. 32, n. 7, p. 1192-1198, 2015.

DINIZ, S.P.S.S. **Micotoxinas**. Campinas: Livraria e Editora Rural, 2002.

DOERR, J. A.; HAMILTON, P. B. Effects of low level chronic aflatoxicosis in broiler chickens. **Poultry Science**, Champaign, v.62, p.1971-1977, 1983.

DOKO, M. B. et al. Natural co-occurrence of fumonisins and zearalenone in cereals and cereal-based foods from Eastern and Southern Africa. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 44, n. 10, p. 3240-3243, 1996.

DOSTAL, A. et al. Results of the first studies of occurrence of ochratoxin A in human milk in Slovakia. **Bratisl Lek Listy**, v. 109, n. 6, p. 276-278, 2008.

EL-NEZAMI, H. S. et al. Aflatoxin M₁ in human breast milk samples from Victoria, Australia and Thailand. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 33, n. 3, p. 173-179, 1995.

ENGELHARDT, H.; HASS, P. Possibilities and limitations of SFE in the extraction of aflatoxin B₁ from food matrices. **Journal of Chromatographic Science**, Niles, v. 31, n. 1, p. 13-19, 1993.

ETZEL, R. A. What the primary care pediatrician should know about syndromes associated with exposures to mycotoxins, **Current Problems in Pediatric and Adolescent Health Care**, Orlando, v. 36, n. 8, p. 282-305, Set. 2006.

EURACHEM. **The fitness for purpose of analytical methods**: a laboratory guide to method validation and related topics. Teddington, UK: LGC, 1998.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY. Opinion of the scientific panel on contaminants in the food chain on a request from the commission related to ochratoxin A in food. **EFSA Journal**, v. 365, p. 1-56, 2005.

EZEKIEL, C. N. et al. Mycotoxin exposure in rural residents in northern Nigeria: a pilot study using multi-urinary biomarkers. **Environment International**, New York, v. 66, p. 138-145, 2014.

FANELLI, F. et al. Relationship between fumonisin production and FUM gene expression in *Fusarium verticillioides* under different environmental conditions. **Food Additives & Contaminants: Part A**, Abingdon, v. 30, n. 2, p. 365-371, 2013.

FERREIRA, H. et al. Aflatoxinas: um risco a saúde humana e animal. **Ambiência - Revista do Centro de Ciências Agrárias e Ambientais**, Guarapuava, v. 2, p. 113-127, 2006.

FISBERG, R. M. et al. **Inquéritos alimentares**: métodos e bases científicos. Barueri: Manole, 2005.

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ. **Normas técnicas Rede BLH-BR para bancos de leite humano**: pasteurização de leite humano ordenhado- BLH-IFF/NT- 34.05. Disponível em <<http://www.fiocruz.br/redeblh/media/pasteuriza.pdf>>. Acesso em: 12 fev. 2011. In: TONON,

K. M. **Avaliação da micoflora contaminante e micotoxinas em leite humano e alimentos infantis para lactentes e crianças de primeira infância por LC-MS/MS.** 2013. 129p. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal de Santa Catarina, 2013.

GALVANO, F.; GALOFARO, V.; GALVANO, G. Occurrence and stability of aflatoxin M₁ in milk and milk products: a worldwide review. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 59, n. 10, p. 1079-1090, 1996.

GALVANO, F. et al. Maternal dietary habits and mycotoxin occurrence in human mature milk. **Molecular Nutrition and Food Research**, Weinheim, v. 52, p. 496-501, 2008.

GAN, L. S. et al. Serum albumin adducts in the molecular epidemiology of aflatoxin carcinogenesis: correlation with aflatoxin B₁ intake and urinary excretion of aflatoxin M₁. **Carcinogenesis**, Oxford, v. 9, p. 1323-1325, 1988.

GAREIS, M. et al. Determination of ochratoxin A in human milk. **Zeitschrift fuer Lebensmittel Untersuchung und Forschung**, v. 186, p. 114-117, 1988.

GERDING, J.; CRAMER, B.; HUMPF, H. U. Determination of mycotoxin exposure in Germany using an LC-MS/MS multibiomarker approach. **Molecular Nutrition & Food Research**, Weinheim, v. 58, n. 12, p. 2358-2368, 2014.

GHANEM, I.; ORFI, M. Aflatoxin M₁ in raw, pasteurized and powdered milk available in Syrian market. **Food Control**, Guildford, v. 20, v. 6, p. 603-605, 2009.

GIACOMELLI, L. et al. Relevant physicochemical factors in chromatographic separation of *Alternaria alternata* mycotoxins. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 370, n. 1, p. 79-89, 1998.

GILBERT, J.; BRERETON, P.; MACDONALD, S. Assessment of dietary exposure to ochratoxin A in the UK using a duplicate diet approach and analysis of urine and plasma samples. **Food Additives & Contaminants**, London, v. 18, n. 12, p. 1088-1093, 2001.

GIROLAMO, A. et al. Performance evaluation of LC-MS/MS methods for multi-mycotoxin determination in maize and wheat by means of international Proficiency Testing. **Trends in Analytical Chemistry**, Amsterdam, v. 86 p. 222-234, 2017.

GONÇALEZ, G. et al. Ocorrência de aflatoxina M₁ em leite bovino comercializado em alguns municípios do Estado de São Paulo. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 72, p. 435-438, 2005.

GONÇALVES, B. L. **Uso de fontes de *Saccharomyces cerevisiae* na redução da excreção de aflatoxina M₁ no leite de vacas leiteiras.** 2016. 81 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo, Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Pirassununga, 2016.

GONÇALVES, B. L. et al. The in vitro ability of different *Saccharomyces cerevisiae*-based products to bind aflatoxin B₁. **Food Control**, Guildford, v. 47, p. 298-300, 2015.

GONG, Y et al. Postweaning exposure to aflatoxin results in impaired child growth: a longitudinal study in Benin, West Africa. **Environmental Health Perspectives**, Research Triangle Park, v. 112, n. 13, p. 1334-1338, 2004.

GROOPMAN, J. D. et al. Molecular dosimetry of aflatoxin-N7-guanine in human urine obtained in The Gambia. West Africa. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, Philadelphia, v. 1, p. 221–227, 1992a.

GROOPMAN, J. D. et al. Molecular dosimetry of urinary aflatoxin-DNA adducts in people living in Guangxi Autonomous Region, People's Republic of China. **Cancer Research**, Baltimore, v. 52, p. 45–52, 1992b.

GROOPMAN, J. D.; KENSLER, T. W. Molecular biomarkers for human chemical carcinogen exposures. **Chemical Research in Toxicology**, Washington, v. 6, n. 6, p. 764–770, 1993.

GURBAY, A. et al. Exposure of newborns to aflatoxin M₁ and B₁ from mothers' breast milk in Ankara, Turkey. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 48, p. 314–319, 2010.

GÜRBAY, A. et al. Ochratoxin A: is it present in breast milk samples obtained from mothers from Ankara, Turkey. **Journal of Applied Toxicology**, Chichester, v. 30, p. 329–333, 2009.

HASSAN, A. M. et al. Does aflatoxin as an environmental mycotoxin adversely affect the renal and hepatic functions of Egyptian lactating mothers and their infants? A preliminary report. **International Urology and Nephrology**, Budapest, v. 38, n. 2, p. 339–342, 2006.

HASSAN, Y. I. et al. A novel peptide-binding motifs inference approach to understand deoxynivalenol molecular toxicity. **Toxins**, Basel, v. 7, n. 6, p. 1989–2005, 2015.

HEALTHY People 2010 final review. Hyattsville, USA: CDC/Centers for Disease Control and Prevention, 2013.

HENDRICKSE, R. G. Kwashiorkor: the hypothesis that incriminates aflatoxins. **Pediatrics**, v. 88, n. 2, p. 376–379, 1991.

HEYNDRIKX, E. et al. Human biomonitoring of multiple mycotoxins in the Belgian population: results of the BIOMYCO study. **Environment International**, New York, v. 84, p. 82–89, 2015.

HOLCOMB, M. et al. Determination of aflatoxins in food products by chromatography. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 624, n. 1–2, p. 341–352, 1992.

HUANG, L. C. et al. Simultaneous determination of aflatoxin M₁, ochratoxin A, zearalenone and a-zearalenol in milk by UHPLC–MS/MS. **Food Chemistry**, London, v. 146, p. 242–249, 2014.

HUSSEIN, H. S.; BRASEL, J. M. Toxicity, metabolism and impact of mycotoxins on humans and animals. **Toxicology**, New York, v. 167, p. 101–134, 2001.

HUYBRECHTS, B. et al. Fast and sensitive LC-MS/MS method measuring human mycotoxin exposure using biomarkers in urine. **Archives of Toxicology**, New York, v. 89, n. 11, p. 1993–2005, 2015.

IAMANAKA, B. T. **Micotoxinas em alimentos**. Seminário de Contaminantes em Alimentos, 4., Campinas, 2010. (Palestra). Disponível em: <http://www.ital.sp.gov.br/ccqa/eventos/pos_evento/2010/iv-conali-01-e-02-de-setembro/micotoxinas_beatriz%20iamanaka.pdf>. Acesso em: 20 jul 2017.

- IAMANAKA, B. T. et al. Aflatoxigenic fungi and aflatoxins occurrence in sultanas and dried figs commercialized in Brazil. **Food Control**, Guildford, v. 18, p. 454–457, 2007.
- IHA, M. H. et al. Aflatoxin M₁ and ochratoxin A in human milk in Ribeirão Preto-SP, Brazil. **Food Control**, Guildford, v. 40, p. 310-313, 2014.
- INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. **Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene**. Lyon: IARC, 2002. (IARC Monograph on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, v. 82).
- INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. **Some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins**. Lyon: IARC, 1993. (Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, v. 56).
- INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. **Overall evaluations of carcinogenicity: an updating of IARC monographs volumes 1 to 42**. Lyon, IARC, 1987. (Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, Supplement 7).
- ITO, S.; LEE, A. Drug excretion into breast milk: an overview. **Advanced drug delivery reviews**, Amsterdam, v. 55, n. 5, p. 617-627, 2003.
- JAGER, A. et al. Assessment of aflatoxin exposure using serum and urinary biomarkers in São Paulo, Brazil: a pilot study. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, Jena, v. 219, n. 3, p. 294-300, 2016.
- JAGER, A. V. et al. Determination of urinary biomarkers for assessment of short-term human exposure to aflatoxins in São Paulo, Brazil. **Toxins**, Basel, v. 6, p. 1996-2007, 2014.
- JAY, J. M. **Microbiologia de alimentos**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.
- JIA, W. et al. Multi-mycotoxin analysis in dairy products by liquid chromatography coupled to quadrupole orbitrap mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1345, p. 107-114, 2014.
- JOINT FAO/WHO EXPERT COMMITTEE ON FOOD ADDITIVES. **Summary Report of the Seventy-second Meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives**. Rome: JEFCA, 2010.
- JONKER, J. W. et al. The breast cancer resistance protein BCRP (ABC G2) concentrates drugs and carcinogenic xenotoxins into milk. **Nature Medicine**, New York, v. 11, p. 127-129, 2005.
- JONSYN, F. E.; MAXWELL, S. M.; HENDRICKSE, R. G. Ochratoxin A and aflatoxins in breast milk samples from Sierra Leone. **Mycopathologia**, Den Haag, v. 131, p. 121 – 126, 1995.
- JONSYN, F. Intake of aflatoxins and ochratoxins by infants in Sierra Leone: possible effects on the general health of these children. **Journal of Nutrition and Environmental Medicine**, v. 9, p. 15-22, 1999.
- JUAN, C. et al. Presence of mycotoxin in commercial infant formulas and baby foods from Italian market. **Food Control**, Guildford, v. 39, p. 227-236, 2014.
- JUDSON, R. et al. The toxicity data landscape for environmental chemicals. **Environmental Health Perspectives**, Research Triangle Park, v. 117, n. 5, p. 685-695, 2009.

- KACHAPULULA, P. W. et al. Aflatoxin contamination of groundnut and maize in Zambia: observed and potential concentrations. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 122, n. 6, p. 1471-1482, 2017.
- KANG'ETHE, E. K.; LANG'A, K. A. Aflatoxin B₁ and M₁ contamination of animal feeds and milk from urban centers in Kenya. **African Health Sciences**, Kampala, v. 9, n. 4, p. 218-260, 2009.
- KARWOWSKA, W. et al. Qualitative and quantitative analysis of filamentous fungi in air, food and ochratoxin A in human milk. **Polish Journal of Food and Nutrition Sciences**, Olsztyn, v. 13, p. 41-44, 2004.
- KAWASHIMA, L. M.; SOARES, L. M. V. Incidência de fumonisina B₁, aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂, ocratoxina A e zearalenona em produtos de milho. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n. 3, p. 516-521, 2006.
- KAWASHIMA, L. M.; VIEIRA, A. P.; SOARES, L. M. V. Fumonisin B₁ e ocratoxina A em cervejas fabricadas no Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 27, n. 2, 2007.
- KESKIN, Y. et al. Detection of aflatoxin M₁ in human breast milk and raw cow's milk in Istanbul, Turkey. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 72, n. 4, p. 885-889, 2009.
- KHLANGWISSET, P.; SHEPHARD, G. S.; WU, F. Aflatoxins and growth impairment: a review. **Critical Reviews in Toxicology**, Boca Raton, v. 41, n. 9, p. 740-755, 2011.
- KIMANYA, M. E. et al. Fumonisin exposure through maize in complementary foods is inversely associated with linear growth of infants in Tanzania. **Molecular Nutrition and Food Research**, Weinheim, v. 54, n. 11, p. 1659-1667, 2010.
- KOLDOVSKY, O. Hormones in milk. **Vitamins and Hormones**, New York, v. 50, p. 77-86, 1995.
- KOS, G.; LOHNINGER, H.; KRŠKA, R. Fourier transform mid-infrared spectroscopy with attenuated total reflection (FT-IR/ATR) as a tool for the detection of *Fusarium fungi* on maize. **Vibrational Spectroscopy**, Amsterdam, v. 29, p. 115-119, 2002.
- KOYNARSKI, V. et al. Experimental coccidiosis provoked by *Eimeria acervulina* in chicks simultaneously fed on ochratoxin A contaminated diet. **Research in Veterinary Science**, London, v. 82, p. 225-231, 2007.
- KUIPER-GOODMAN, T. Risk assessment and risk management of mycotoxins in Food. In: Mogan, N.; Olsen, M. (Ed.) **Mycotoxins in food, detection and control**. New York: CRC Press; Cambridge: Wood head Publishing Limited. 2004. pp. 3-31.
- KUIPER-GOODMAN, T. Risk assessment to humans of myco-toxins in animal-derived food products. **Vetinary and Human Toxicology**, Manhattan, USA, v. 33, p. 325-333, 1991.
- KUMMAR, V.; BASU, M. S.; RAJENDRAN, T. P. Mycotoxin research and mycoflora in some commercially important agricultural commodities. **Crop Protection**, Guildford, v. 27, p. 891-905, 2008.
- KUNZ, C. et al. Nutritional and biochemical properties of human milk, part I: general aspects, proteins and carbohydrates. **Clinics in Perinatology**, Philadelphia, v. 26, p. 307-333, 1999.

LAMARDO, L. C. A.; NAVAS, A. A.; SABINO, M. Desoxinivalenol (DON) em trigo e farinha de trigo comercializados na cidade de São Paulo. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 65, n. 1, p. 32-35, 2006.

LAMOUNIER, J. A.; VIEIRA, G. O.; GOUVÊA, L. C. Composição do leite humano: fatores nutricionais. In: Rego, J. D. **Aleitamento materno**. Rio de Janeiro: Atheneu, 2001. p. 47-58.

LANDRIGAN, P. J. et al. Chemical contaminants in breast milk and their impacts on children's health: an overview. **Environmental Health Perspectives**, Research Triangle Park, v. 110, n. 6, p. A313-A315, 2002.

LATTANZIO, V. M. T. et al. LC-MS/MS characterization of the urinary excretion profile of the mycotoxin deoxynivalenol in human and rat. **Journal of Chromatography B**, Amsterdam, v. 879, p. 707-715, 2011.

LATTANZIO, V. M. T. et al. Simultaneous determination of aflatoxins, ochratoxin A and *Fusarium* toxins in maize by liquid chromatography / tandem mass spectrometry after multitoxin immunoaffinity cleanup. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, London, v. 21, p. 3253-3261, 2007.

LATTANZIO, V. M. T.; VISCONTI, A. Liquid chromatography-mass spectrometry analysis of mycotoxins in food, In: Núñez, O. et al. (Ed.) *Fast liquid-chromatography-mass spectrometry methods for food and environmental analysis*. London: **Imperial College Press**, London, UK, 2015. p. 549-579.

LAUREN, D. R.; SMITH, W. A. Stability of the *Fusarium* mycotoxins nivalenol, deoxynivalenol and zearalenone in ground maize under typical cooking environments. *Food Additives & Contaminants*, London, v. 18, n. 11, p. 1011-1016, 2001.

LIN, L.; ZHANG, J.; WANG, P.; WANG, Y.; CHEN, J. Recent Developments in the Screening of Atoxigenic *Aspergillus flavus* towards Aflatoxin Biocontrol. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 815, p. 3-20, 1998.

LIN, L. et al. Thin-layer chromatography of mycotoxins and comparison with other chromatographic methods. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 815, p. 3-20, 1998.

MACY, I. G. Composition of human colostrum and milk. **American Journal of Diseases of Children**, Chicago, v. 78, p. 589-603, 1949.

MAGAN, N.; ALDRED, D. Post-harvest control strategies: minimizing mycotoxins in the food chain. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 119, p. 131-139, 2007.

MAGAN, N.; OLSEN, M. **Mycotoxins in food: detection and control**. Boca Raton: Woodhead Publishing, 2004.

MAGOHA, H. et al. Fumonisin B₁ contamination in breast milk and its exposure in infants under 6 months of age in Rombo, Northern Tanzania. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 74, p. 112-116, 2014.

MAHDAVI, R. et al. Determination of aflatoxin M₁ in breast milk samples in Tabriz-Iran. **Maternal and Child Health Journal**, New York, v. 14, p. 141-145, 2010.

- MALEKI, F. et al. Exposure of infants to aflatoxin M₁ from mother's breast milk in Ilam, Western Iran. **Osong Public Health and Research Perspectives**, Seoul, v. 6, n. 5, p. 283-287, 2015.
- MALLMANN, C. A. et al. Fumonisin B₁ levels in cereals and feeds from southern Brazil. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 68, n. 1, p. 41-45, 2001.
- MARESCA, M. From the gut to the brain: journey and pathophysiological effects of the food-associated trichothecene mycotoxin deoxynivalenol. **Toxins**, Basel, v. 5, n. 4, p. 784-820, 2013.
- MARQUARDT, R. R.; FROHLICH, A. A. A review of recent advances in understanding ochratoxicosis. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 70, n. 12, p. 3968-3988, 1992.
- MARTINEZ-LARRANAGA, M. R. et al. Toxicokinetics and oral bioavailability of fumonisin B₁. **Veterinary and Human Toxicology**, Manhattan, v. 41, n. 6, p. 357-362, 1999.
- MAZIERO, M. T.; BERSOT, L. S. Micotoxinas em alimentos produzidos no Brasil. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v. 12, n. 1, p. 89-99, 2010.
- MEKY, F.A. et al. Deoxynivalenol-induced immunomodulation of human lymphocyte proliferation and cytokine production. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 39, n. 8, p. 827-836, 2001.
- MEUCCI, V. et al. Mycotoxin detection in infant formula milks in Italy. **Food Additives and Contaminants**, London, vol. 27, n. 1, p. 64-71. 2010
- MICCO, C. et al. Contamination of human milk with ochratoxin A. In: Castegnaro, M. et al. **Mycotoxins, endemic nephropathy and urinary tract tumor**. Lyon: IARC, 1991. p. 105-108. (IARC Scientific Publications, v. 115).
- MIDIO, A. F.; MARTINS, D. I. **Toxicologia de alimentos**. São Paulo: Varela, 2000.
- MILANEZ, T. V.; VALENTE-SOARES L. M.; BAPTISTA, G. G. Occurrence of trichothecene mycotoxins in Brazilian corn-based food products. **Food Control**, Guildford, v. 17, p. 293-298, 2006.
- MILIĆEVIĆ, D. R.; ŠKRINJAR, M.; BALTIC, T. Real and perceived risks for mycotoxin contamination in foods and feeds: challenges for food safety control. **Toxins**, Basel, v. 2, p. 572-592, 2010.
- MOSS, M. O. Recent studies of mycotoxins. **Journal of Applied Microbiology Symposium**, Oxford, UK, v. 84, n. 27, p. 62S-72S, 1998.
- MUNOZ, K. et al. Exposure of neonates to ochratoxin A: first biomonitoring results in human milk (colostrum) from Chile. **Mycotoxin Research**, Heidelberg, v. 26, p. 59-67, 2010.
- MUNOZ, K. et al. Exposure of infants to ochratoxin A with breast milk. **Archives of Toxicology**, New York, v. 88, p. 837-846, 2014.
- MURIUKI, G. K.; SIBOE, G. M. Maize flour contaminated with toxigenic fungi and mycotoxins in Kenya. **African Journal of Health Sciences**, Kampala, v. 2, n. 1, p. 236-241, 1995.
- MURPHY, P. A. et al. Food mycotoxins: an update. **Journal of Food Science**, Champaign, v. 71, p. 51-65, 2006.

NAVAS, S. A.; SABINO, M.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Aflatoxin M₁ and ochratoxin A in a human milk bank in the city of São Paulo, Brazil. **Food additives and contaminants**, London, v. 22, n. 5, p. 457–62, 2005.

NEVILLE, M. C. et al. Lactation and neonatal nutrition: defining and refining the critical questions. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, v. 17, n. 2, p. 167-188, 2012.

OGIDO, R. **Efeitos da exposição prolongada de aflatoxina B₁ e fumonisina B₁ em codornas**: avaliação de parâmetros de desempenho e qualidade dos ovos. 2003. 103 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo, Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Pirassununga, 2003.

OKOTH, S. A.; OHINGO, M. Dietary aflatoxin exposure and impaired growth in young children from Kisumu District, Kenya: cross sectional study. **African Journal Health Science**, v. 11, p. 43-54, 2004.

OLIVEIRA, C. A. F.; CORASSIN, C. H. Aflatoxins. In: DUARTE, S. C.; LINO, C. M.; PENA, A. L. S. (Ed.). **Mycotoxins and their Implications in food safety**. London: Future Science Ltd., 2014. v. 1, p. 6-19.

OLIVEIRA, C. A. F. et al. Determinação de aflatoxina B₁ em rações e aflatoxina M₁ no leite de propriedades do Estado de São Paulo. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 30, p. 221-225, 2010.

OLIVEIRA, C. A. F. Multiple biomarker approach of mycotoxins and its contribution for the exposure assessment. In: ALVITO, P. et al. (Eds.). **Food contaminants and human health - Challenges in chemical mixtures**. Lisboa: National Institute of Health Doutor Ricardo Jorge, 2016. p. 57-62.

OLIVEIRA, C. A. F.; GERMANO, P. M. L. Aflatoxinas: conceitos sobre mecanismos de toxicidade e seu envolvimento na etiologia do câncer hepático celular. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 31, n. 4, p. 417-424, 1997.

OLIVEIRA, C. A. F. et al. Determination of aflatoxins in peanut products in the northeast region of São Paulo, Brazil. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 10, p. 174-183, 2009.

OLIVEIRA, C. A. F. et al. Determinação de aflatoxina B₁ em rações e aflatoxina M₁ no leite de propriedades do Estado de São Paulo. **Food Science & Technology**, London, v. 30, n. 1, p. 221-225, 2010.

OLIVEIRA, C. A.; GERMANO, P. M. L.; BIRD, C.; PINTO, C. A. Immunochemical assessment of aflatoxin in milk powder consumed by infants in São Paulo, Brazil. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 14, p. 7-10, 1997.

OLIVEIRA, C.A.F. et al. Animal health: mycotoxins. In: **ENCYCLOPEDIA of Agriculture and Food Systems**. 2nd ed. Oxford, UK: Elsevier, 2014. pp. 358-377.

ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD. **Micotoxinas**. Washington: OPAS, 1983. (Critérios de Salud Ambiental, 11).

OSWEILER, G. D. Mycotoxins and livestock: what role do fungal toxins play in illness and production losses? **Veterinary Medicine**, Lenexa, v. 85, n. 1, p. 89-94, 1990.

- PARK, D. L.; POHLAND, A. E. A rationale for the control of aflatoxin in animal feeds. In: STEYN, P. S.; VLEGGAR, R. (Ed.). **Mycotoxins and phycotoxins**. Amsterdam: Elsevier, 1986. p. 473- 482.
- PASSANHA, A.; CERVATO-MANCUSO, A. M.; PINTO e SILVA, M. E. M. Elementos protetores do leite materno na prevenção de doenças gastrintestinais e respiratórias. **Revista Brasileira de Crescimento e Desenvolvimento Humano**, São Paulo, v. 20, n. 2, p. 251-260, 2010.
- PAYROS, D. et al. Toxicology of deoxynivalenol and its acetylated and modified forms. **Archives of Toxicology**, New York, v. 90, p. 2931-2957, 2016.
- PEOPLE'S REPUBLIC OF CHINA. MINISTRY OF HEALTH. **National food safety standard: maximum levels of mycotoxins in foods**. Beijing: Ministry of Health, 2011.
- PEREIRA, L. T. P. **Desoxinivalenol em farinha de trigo: otimização de método analítico, validação e ocorrência**. 2014. 134 p. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Ciências Farmacêuticas Departamento de Alimentos e Nutrição, Araraquara, 2014.
- PESTKA, J. Deoxynivalenol: mechanisms of action, human exposure, and toxicological relevance. **Archives of Toxicology**, New York, v. 84, p. 663-679, 2010.
- PESTKA, J. J.; ABOUZIED, M. N.; SUTIKNO. Immunological assays for mycotoxin detection. **Food Technology**, Chicago, v. 49, n.2, p.102-107, 1995.
- PITTET, A. Natural occurrence of mycotoxins in foods and feeds: an updated review. **Revista de Medicina Veterinária**, v. 149, n. 6, p. 479-492, 1998.
- POLYCHRONAKI, N. et al. Determinants of aflatoxin M₁ in breast milk in a selected group of Egyptian mothers. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 23, n. 7, p. 700-708, 2006.
- PROBST, C.; SCHULTHESS, F.; COTTY, P. J. Impact of *Aspergillus* section Flavi community structure on the development of lethal levels of aflatoxins in Kenyan maize (*Zea mays*). **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 108, n. 2, p. 600–610, 2010.
- QIAN, G. S. et al. A follow-up study of urinary markers of aflatoxin exposure and liver cancer risk in Shanghai. People's Republic of China. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, Philadelphia, v. 3, p. 3-10, 1994.
- QIU, M.; LIU, X. Determination of sphinganine, sphingosine and Sa/So ratio in urine of humans exposed to dietary fumonisin B₁. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 18, n. 3, p. 263-269, 2001.
- RAFIEL, H. et al. The concentration of aflatoxin M₁ in the mothers' milk in Khorrambid City, Fars, Iran. **Advanced Biomedical Research**, v. 3, n. 1, p. 152, 2014.
- REINHARD, H.; ZIMMERLI, B. Reversed-phase liquid chromatographic behavior of the mycotoxins citrinin and ochratoxin A. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 862, n. 2, p. 147-159, 1999.
- RIBANI, M. et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, São Paulo, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

- RIBEIRO, L. C.; KUZUHARA, J. S. W. Lactação. In: SILVA, S. M. C. S.; MURA, J.D.´AP. **Tratado de alimentação, nutrição e dietoterapia**. São Paulo: Roca, 2007. p. 293-318.
- RICHARD, J. L. Some major mycotoxins and their mycotoxicoses: an overview. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 119, p. 3-10, 2007.
- RILEY, R. T.; WANG, E.; MERRILL, A.H. Liquid-chromatographic determination of sphinganine and sphingosine – use of the free sphinganine-to-sphingosine ratio as a biomarker for consumption of fumonisins. **Journal of AOAC International**, Arlington, v. 77, p. 533-540, 1994.
- RILEY, R. T. et al. Sphingolipid perturbations as mechanisms for fumonisin carcinogenesis. **Environmental Health Perspectives**, Research Triangle Park, v. 2, p. 301-308, 2001.
- RILEY, R. T. et al. Evidence for fumonisin inhibition of ceramide synthase in humans consuming maize-based foods and living in high exposure communities in Guatemala. **Molecular Nutrition and Food Research**, Weinheim, v. 59, p. 2209-2224, 2015.
- RINGOT, D. et al. Toxicokinetics and toxicodynamics of ochratoxin A: an update. **Chemico-Biological Interactions**, Limerick, v.159, n. 1, p. 18-46, 2006.
- ROMERO, A. C. et al. Occurrence of AFM₁ in urine samples of a Brazilian population and association with food consumption. **Food Control**, Guildford, v. 21, p. 554-558, 2010.
- ROCH, O. G. et al. The validation of a solid phase clean-up procedure for the analysis of aflatoxins in groundnut cake using HPLC. **Food Chemistry**, London, v. 52, p. 93-98, 1995.
- RODRÍGUEZ-AMAYA, D. B.; SABINO, M. Mycotoxin research in Brazil: the last decade in review. **Brazilian Journal Microbiology**, São Paulo, v.33, p.1-11, 2002.
- RUBERT, J. et al. Evaluation of mycotoxins and their metabolites in human breast milk using liquid chromatography coupled to high resolution mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 820, p. 39-46, 2014.
- SAAD, A. M.; ABDELGADIR, A. M.; MOSS, M. O. Exposure of infants to aflatoxin M₁ from mothers' breast milk in Abu Dhabi, UAE. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 12, p. 255–261, 1995.
- SABINO, M. et al. Ocorrência de aflatoxina B₁ em produtos alimentícios e rações animais, consumidos no Estado de São Paulo e em várias outras regiões do Brasil, no período de 1980 a 1987. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 48, n. 1-2, p. 81-85, 1988.
- SABINO, M.; RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Mycotoxin research in Brazil. **Ciência e Cultura**, São Paulo, v. 45, n. 1, p. 359-371, 1993.
- SADEGHI, N. et al. Incidence of aflatoxin M₁ in human breast milk in Tehran, Iran. **Food Control**, Guildford, v. 20, n. 1, p. 75-78, 2009.
- SANTIN, E. **Mould growth and mycotoxin production**. The Mycotoxin Blue Book. Nottingham, UK: Nottingham University Press, p. 225-234, 2005.
- SANTINI, A. et al. Aflatoxin M₁ in raw, UHT milk and dairy products in Sicily (Italy). **Food Additives & Contaminants: Part B**, London, v. 6, n. 3, p. 181-186, 2013.

- SANTOS, A. L.; BANDO, E.; MACHINSKI JUNIOR, M. Ocorrência de aflatoxina M₁ em leite bovino comercializado no Estado do Paraná, Brasil. **Seminário: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 35, n. 1, p. 371-374, jan./fev. 2014.
- SAVO, V. L.; GIMENO, S. G.; Reproducibility and validity of a food frequency questionnaire. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 36, p. 505-512, 2002.
- SAY, B. et al. The effect of lactational mastitis on the macronutrient content of breast milk. **Early Human Development**, Amsterdam, v. 98, p. 7-9, 2016.
- SCHOEVERS, E. J. et al. Transgenerational toxicity of zearalenone in pigs. **Reproductive Toxicology**, Hoboken, v. 34, n. 1, p. 110-119, 2012.
- SCOTT, P. M. Effects of processing and detoxification treatments on ochratoxin A: introduction. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 13, p. 19-21, 1996.
- SCOTT, P. M. Mycotoxin methodology. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 12, n. 3, p. 395-403, 1995.
- SCUDAMORE, K. A.; PATEL, S. Survey for aflatoxins, ochratoxin A, zearalenone and fumonisins in maize imported into the United Kingdom. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 17, n. 5, p. 407-416, 2000.
- SEKIYAMA, B. L. et al. Aflatoxins, ochratoxin A and zearalenone in maize-based food products. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 36, p. 289-294, 2005.
- SHEPHARD, G. S. et al. Multiple mycotoxin exposure determined by urinary biomarkers in rural subsistence farmers in the former Transkei, South Africa. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 62, p. 217-225, 2013.
- SHERIF, S. O.; SALAMA, E. E.; ABDEL-WAHHAB, M. A. Mycotoxins and child health: the need for health risk assessment. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, Jena, v. 212, n. 4, p. 347-368, 2009.
- SHETTY, P. H.; BHAT, R. V. Sensitive method for the detection of fumonisin B₁ in human urine. **Journal of Chromatography. B, Biomedical Sciences Applications**, Amsterdam, v. 705, n. 1, p. 171-173, 1998.
- SHUIB, N. S. et al. Natural occurrence of aflatoxin M₁ in fresh cow milk and human milk in Penang, Malaysia. **Food Control**, Guildford, v. 73, p. 966-970, 2017.
- SHUNDO, L. et al. Estimate of aflatoxin M₁ exposure in milk and occurrence in Brazil. **Food Control**, Guildford, v. 20, p. 655-657, 2009.
- SILVA, M. et al. Effect of the time interval from harvesting to the pre-drying step on natural fumonisin contamination in freshly harvested corn from the State of Paraná, Brazil. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 25, n. 5, p. 642-649, 2008.
- SILVA, R. C. et al. Composição centesimal do leite humano e caracterização das propriedades físico-químicas de sua gordura. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 7, p. 1535-538, 2007.
- SKAUG, M. A.; WIGNAND, E.; STORMER, F.C. Ochratoxin A in airborne dust and fungal conidia. **Mycopathologia**, Den Haag, v. 151, p. 93-98, 2001.

- SKAUG, M. A.; STORMER, F. C.; SAUGSTAD, O. D. Ochratoxin A: a naturally occurring mycotoxin found in human milk samples from Norway. **Acta Paediatrica**, Oslo, v. 87, p. 1275-1278, 1998.
- SLATER, B. et al. Validation of a semi-quantitative adolescent food frequency questionnaire applied at a public school in Sao Paulo, Brazil. **European Journal of Clinical Nutrition**, London, v. 57, n. 5, p. 629-635, 2003.
- SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; DOLAN, J. W. **Introduction to modern liquid chromatography**. 3rd ed. New Jersey: Wiley, 2010.
- SOLFRIZZO, M. et al. Comparison of urinary sphingolipids in human populations with high and low maize consumption as a possible biomarker of fumonisin dietary exposure. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 21, n. 11, p. 1090-1095, 2004.
- SOLFRIZZO, M. et al. Simultaneous LC-MS/MS determination of aflatoxin M₁, ochratoxin A, deoxynivalenol, de-epoxydeoxynivalenol, α and β -zearalenols and fumonisin B₁ in urine as a multi-biomarker method to assess exposure to mycotoxins. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Heidelberg, v. 401, n. 9, p. 2831-2841, 2011.
- SONG, S. et al. Development and application of salting-out assisted liquid/liquid extraction for multi-mycotoxin biomarkers analysis in pig urine with high performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1292, p. 111-120, 2013.
- SØRENSEN, L. K.; ELBÆK, T. H. Determination of mycotoxins in bovine milk by liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, Amsterdam, v. 820, p. 183-196, 2005.
- SPINOSA, H. S.; GORNIK, S. L.; PALERMO-NETO, J. **Toxicologia aplicada à medicina veterinária**. Barueri, SP: Manole, 2008.
- STANKER, L. H. et al. Development and partial characterization of high-affinity monoclonal antibodies for botulinum toxin type A and their use in analysis of milk by sandwich ELISA. **Journal of Immunological Methods**, Amsterdam, v. 336, n. 1, p. 1-8, 2008.
- STOCKMANN-JUVALA, H.; SAVOLAINEN, K. A review of the toxic effects and mechanisms of action of fumonisin B₁. **Human & Experimental Toxicology**, Hampshire, v. 27, n. 11, p. 799-809, 2008.
- SULIÖK, M. et al. The feasibility of the “dilute-and-shoot” approach for the accurate quantitative determination of mycotoxins by LC-MS/MS. In: **MycoRed International Conference**, Martina, Apulia, 2013. **Book of Abstracts**. S.l.: ISM, 2013. p. 203.
- TENA, D. et al. Lactational mastitis caused by *Streptococcus lactarius*. **Diagnostic Microbiology & Infectious Disease**, New York, v. 85, n.4, p. 490-492, 2016.
- TONON, K. M. **Avaliação da micoflora contaminante e micotoxinas em leite humano e alimentos infantis para lactentes e crianças de primeira infância por LC-MS/MS**. 2013. 129 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Florianópolis, 2013.

TROMBETE, F. et al. Aflatoxin M₁ contamination in grated parmesan cheese marketed in Rio de Janeiro –Brazil. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 57, p. 269-273, 2014.

TURNER, N. W.; SUBRAHMANYAMB, S.; PILETSKY, S. A. Analytical methods for determination of mycotoxins: a review. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 632, p. 168-180, 2009.

TURNER, P. C et al. Modification of immune function through exposure to dietary aflatoxin in Gambian children. **Environmental Health Perspectives**, Research Triangle Park, v. 111, p. 217-220, 2003.

TURNER, P. C.; NIKIEMA, P.; WILD, C. P. Fumonisin contamination of food: progress in development of biomarkers to better assess human health risks. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 443, n. 1-2, p. 81-93, 1999.

ULASZEWSKA, M. M. et al. The effect of waste combustion on the occurrence of polychlorinated dibenzo-p-dioxins (PCDDs), polychlorinated dibenzofurans (PCDFs) and polychlorinated biphenyls (PCBs) in breast milk in Italy. **Chemosphere**, Oxford, v. 82, n. 1, p. 1-8, 2011.

UNICEF. Oficina de Uruguay, RUANDI, Ministerio de Salud Pública. **Programa Nacional de Salud de la Niñez**. Encuesta de lactancia, estado nutricional y alimentación complementaria en niños menores de 24 meses atendidos por servicios público y mutuales de Montevideo e interior del país / María Isabel Bove, Florencia Cerutti. – Montevideo; 2007.

VALENTA, H. Chromatographic methods for the determination of ochratoxin A in animal and human tissues and fluids. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 815, n. 1, p. 75-92, 1998.

VAN EGMOND, H. P.; SCHOTHORST, R. C.; JONKER, M. A. Regulations relating to mycotoxins in food. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Heidelberg, v. 389, p.147–157, 2007.

VAN HERWAARDEN, A. E.; SCHINKEL, A. H. The function of breast cancer resistance protein in epithelial barriers, stem cells and milk secretion of drugs and xenotoxins. **Trends in Pharmacological Sciences**, Amsterdam, v.27, n. 1, p.10-16, 2006.

VENDL, O. et al. Occurrence of free and conjugated *Fusarium* mycotoxins in cereal-based food. **Food Additives and Contaminants Part A: Chemistry, Analysis, Control, Exposure Risk Assessment**, v. 27, p. 1148–1152, 2010.

VETTORAZZI, E.; GONZÁLEZ-PEÑAS, A.; LÓPEZ DE CERAIN. Ochratoxin A kinetics: a review of analytical methods and studies in rat model. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 72, p. 273-288, 2014.

WALLIN, S. et al. Biomonitoring of concurrent mycotoxin exposure among adults in Sweden through urinary multi-biomarker analysis. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 83, p. 133-139, 2015.

WANG, X.; LI, P. Rapid screening of mycotoxins in liquid milk and milk powder by automated size-exclusion SPE-UPLC–MS/MS and quantification of matrix effects over the whole chromatographic run. **Food Chemistry**, London, v. 173, p. 897-904, 2015.

- WARTH, B. et al. Development and validation of a rapid multi-biomarker liquid chromatography/tandem mass spectrometry method to assess human exposure to mycotoxins. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, Chichester, v. 26, n. 13, p. 1533-1540, 2012.
- WHITLOW, L. W.; HAGLER JUNIOR, W. M. Mycotoxins in dairy cattle. In: MOLIN, R; VALENTINI, M. L. **Simpósio Sobre Micotoxinas em Grãos**. São Paulo: Fundação Cargil, 1999. p. 151-181.
- WILD, C. P.; GONG, Y. Y. Mycotoxins and human disease: a largely ignored global health issue. **Carcinogenesis**, Oxford, v. 31, n. 1, p. 71-82, 2010.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Evaluation of certain mycotoxins in food: fifty-sixth report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. JOINT FAO/WHO EXPERT COMMITTEE ON FOOD ADDITIVES, 56., 2001, Geneva. Report... Geneve: WHO, 2002.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **The global burden of disease: 2004 update**. Geneva: WHO, 2008.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Safety evaluation of certain food additives and contaminants. Geneve: WHO, 1996. (Food Additives Series, 40).
- WU, F.; GROOPMAN, J. D.; PESTKA, J. J. Public health impacts of foodborne mycotoxins. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 5, p. 351-372, 2014.
- WU, L. et al. Growth performance, serum biochemical profile, jejunal morphology, and the expression of nutrients transporter genes in deoxynivalenol (DON)-challenged growing pigs. **BMC Veterinary Research**, v. 11, p. 144-154, 2015.
- WU, Q. et al. Biological degradation of aflatoxins. **Drug Metabolism Reviews**, New York, v. 41, p. 1-7, 2009.
- YOUNG, J. C.; GAMES, D. E. Supercritical fluid chromatography of *Fusarium* mycotoxins. **Journal of Chromatography**, Amsterdam, v. 627, p. 247-254, 1992.
- YU, M. et al. Mechanism of deoxynivalenol effects on the reproductive system and fetus malformation: current status and future challenges. **Toxicology in Vitro**, Oxford, v. 41, p. 150-158, 2017.
- ZAIN, M. E. Impact of mycotoxins on humans and animals. **Journal of Saudi Chemical Society**, v. 15, n. 2, p.129-144, 2011.
- ZHU, J, Q. et al. Correlation of dietary aflatoxin B₁ levels with excretion of aflatoxin M₁ in human urine. **Cancer Research**, Baltimore, v. 47, p. 1848-1852, 1987.
- ZIMMERLI, B.; DICK, R. Determination of ochratoxin A at the ppt level in human blood, serum, milk and some foodstuffs by high-performance liquid chromatography with enhanced fluorescence detection and immunoaffinity column cleanup: methodology and Swiss data. **Journal of chromatography B**, Amsterdam, v. 666, p. 85-99, 1995.
- ZIVKOVIC, A. M. et al. Human milk glycomicrobiome and its impact on the infant gastrointestinal microbiota. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States**, Washington, v. 108, p. 4653-4658, 2011.

2 Capítulo 1: Ocorrência de micotoxinas no leite materno, produtos à base de frutas e fórmula infantil à base de cereais: uma revisão

Carolina Fernanda S. C. Coppa

Universidade de São Paulo/ Departamento de Engenharia de Alimentos, Pirassununga, São Paulo, Brasil

E-mail: carolinacebin@usp.br

Amin Mousavi Khaneghah^b, Paula Alvito^{c,d}, Ricardo Assunção^{c,d}, Carla Martins^{c,d,e}, Ismail Eş^f,
Bruna Leonel Gonçalves^a, Diane Valganon de Neeff^a, Anderson S. Sant'Ana^b, Carlos Humberto
Corassin^a, Carlos Augusto Fernandes Oliveira^a

^a Departamento de Engenharia de Alimentos, Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos,
Universidade de São Paulo, Pirassununga, São Paulo, Brasil

^b Departamento de Ciência dos Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade de
Campinas (UNICAMP), Campinas, São Paulo, Brasil

^c Departamento de Alimentos e Nutrição, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa,
Portugal

^d CESAM, Centro de Estudos Ambientais e Marinhos, Universidade de Aveiro, Campus Universitário de
Santiago, Aveiro, Portugal

^e Universidade Nacional de Saúde Pública da NOVA, Universidade NOVA de Lisboa, Lisboa, Portugal

^f Departamento de Engenharia de Materiais e Bioprocessos, Faculdade de Engenharia Química,
Universidade de Campinas (UNICAMP), Campinas, São Paulo, Brasil

Este artigo foi publicado na **Trends in Food Science & Technology** (ISSN: 0924-2244, Vol. 92, pp. 81-93, Outubro, 2019. doi: 10.1016/j.tifs.2019.08.014).

Manuscrito recebido: 26 de Março, 2019; revisado: 13 de Agosto, 2019; aceito: 15 de Agosto, 2019 (ANEXO E).

Resumo

Fundamentação: O leite materno é considerado um segmento alimentar essencial para crianças de até 6 meses; no entanto, pode ser contaminado com algumas micotoxinas, como a aflatoxina M₁ (AFM₁) e a ocratoxina A (OTA) como consequência da ingestão de micotoxinas na dieta por mulheres em aleitamento. Além disso, a saúde dos bebês pode ser ameaçada devido à exposição simultânea a uma mistura de micotoxinas, principalmente devido aos seus potenciais efeitos sinérgicos.

Escopo e abordagem: Uma visão geral da prevalência de micotoxinas no leite materno e nas fórmulas para lactentes, produtos à base de cereais, como dietas rotineiras de lactentes nos últimos 10 anos, além dos riscos associados à saúde foram apresentados. Nesse sentido, as citações relevantes publicadas em bancos de dados internacionais, como PubMed e Science direct de 2008 a 2019 foram selecionados com o auxílio de uma abordagem de revisão sistemática.

Principais resultados e conclusões: A alta prevalência de AFM₁ e OTA no leite materno relatada em vários países destacaram a extensão da ocorrência de micotoxinas na dieta de mulheres lactantes. Além disso, as taxas de exposição de lactentes às micotoxinas no leite materno e em fórmulas infantis gerou uma margem de exposição menor que 10.000, indicando sérios problemas de saúde pública. Assim, etapas de controle durante o processamento e distribuição de fórmulas infantis são necessárias para reduzir a exposição de mulheres lactantes e lactentes às micotoxinas. Estudos adicionais são recomendados para avaliar a saúde dos bebês quantos aos riscos da exposição às múltiplas micotoxinas em alimentos infantis.

Palavras-chave: Micotoxina. Prevalência. Leite materno. Comida infantil. Revisão sistemática. Produto à base de cereais. Produto à base de frutas. Contaminação.

2.1 Introdução

Entre os grupos populacionais vulneráveis submetidos à exposição às micotoxinas, as mulheres grávidas e crianças atraíram atenção notável devido aos efeitos teratogênicos de algumas micotoxinas (MURPHY et al., 2006), além da maior suscetibilidade de bebês e crianças pequenas aos seus efeitos tóxicos (LANDRIGAN et al., 2002; RAIOLA et al., 2015; SHERIF; SALAMA; ABDEL-WAHAB, 2009). Geralmente, a capacidade de biotransformação de xenobióticos em recém-nascidos é mais lenta que nos adultos, resultando

em uma maior circulação de produtos químicos ingeridos através da dieta (SADEGHI et al., 2009). Portanto, bebês (crianças com menos de 12 meses) são mais suscetíveis às micotoxinas e aos seus efeitos adversos quando comparados com adultos, devido ao seu desenvolvimento e do sistema de desintoxicação, bem como menor massa corporal e taxas mais altas do metabolismo (ETZEL, 2006; FAKHRI et al., 2019a). Desde a exposição de bebês em lactação aos efeitos tóxicos de micotoxinas nos estágios iniciais da vida, após as mulheres em aleitamento ingerirem alimentos contaminados, vários tipos de micotoxinas podem ser transferidas de forma inalterada ou metabolizada para o leite materno (BIASUCCI et al., 2011; FAKHRI et al., 2019a; HASSAN et al., 2006a). Deste modo, a avaliação da frequência da exposição às micotoxinas em crianças é de grande importância, especialmente em áreas com maior risco de contaminação por micotoxinas (KUIPER-GOODMAN, 2004).

O leite materno é considerado um alimento essencial para bebês de até 6 meses, pois fornece alguns nutrientes indispensáveis para a saúde e para o desenvolvimento corporal e mental dos bebês (DA SILVA et al., 2007; FAKHRI et al., 2019a, 2019b). Como o leite materno é o primeiro alimento ingerido pelo recém-nascido, também pode ser considerado a primeira via de exposição às micotoxinas (WARTH et al., 2016). Além disso, a exposição pode ocorrer também quando as fórmulas para lactentes e outros produtos alimentares são introduzidos na dieta dos bebês. Ainda, a co-ocorrência de micotoxinas em fórmulas infantis, alimentos à base de frutas e alimentos à base de cereais produzidos para o consumo infantil também é possível, levando a riscos adicionais à saúde devido aos efeitos sinérgicos de algumas micotoxinas (ALASSANE-KPEMBI et al., 2017; ALVITO et al., 2010; AMIRAHMADI et al., 2017; ASSUNÇÃO et al., 2016; RAIOLA et al., 2015). A exposição à AF durante o início da infância tem sido associada a deficiências no crescimento causada pela inibição da síntese protéica resultante de alterações físicas que podem levar à má absorção de nutrientes, como o zinco, além de algumas funções da barreira intestinal serem prejudicadas (LOMBARD, 2014; SMITH; STOLTZFUS; PRENDERGAST, 2012; WU; GROOPMAN; PESTKA, 2014).

Na literatura, as micotoxinas mais comuns, como as aflatoxinas (AF), ocratoxina A (OTA), patulina (PAT), fumonisinas (FB), zearalenona (ZEA) e deoxinivalenol (DON) atraíram maior atenção em produtos alimentares (ABRUNHOSA et al., 2016; BENNETT; KLICH, 2003; MURPHY et al., 2006; OTEIZA et al., 2017), as quais são produzidas por algumas espécies de fungos toxigênicos como *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* e *Alternaria* (BRYDEN, 2007; MAJEED et al., 2017; RASTEGAR et al., 2017).

Entre elas, vinte tipos diferentes de AF foram identificados, embora somente a AFB₁, AFB₂, AFG₁ e AFG₂ são freqüentemente relatadas como os principais contaminantes de produtos alimentícios (HESHMATI et al., 2019; KHANEGHAH et al., 2019). A AFB₁ é o composto mais tóxico, sendo classificado como Grupo 1 (cancerígeno), pela Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (MAHMOOD FASHANDI; ABBASI; MOUSAVI KHANEGHAH, 2018; OSTRY et al., 2017). A OTA é uma micotoxina nefrotóxica que também exibe efeitos imunotóxicos, teratogênicos, carcinogênicos e talvez neurotóxicos (AL-HAZMI, 2010; CLARK; SNEDEKER, 2006; MAJEED et al., 2017), pertencendo ao grupo 2B (possivelmente cancerígeno para o ser humano), de acordo com a Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (OSTRY et al., 2017). A exposição à OTA é motivo de grande preocupação, uma vez que HASSAN et al. (2006b) encontraram uma associação significativa entre a presença de OTA e altos níveis urinários de $\beta 2$ microglobulina e microalbumina em mães lactantes do Egito. Mais recentemente, DE SANTIS et al. (2019) descreveram um possível papel da OTA na patobiologia do autismo. PAT exibe uma grande variedade de efeitos em animais de laboratório, incluindo imunotoxicidade, congestão pulmonar, ulceração do trato gastrointestinal, efeitos genotóxico, teratogênico e efeitos cancerígenos (ASSUNÇÃO et al., 2016; PUEL; GALTIER; OSWALD, 2010). Vinte e oito FBs estruturalmente relacionadas foram isoladas e identificadas, embora a FB₁ seja o composto mais predominante e tóxico identificado, sendo classificada como Grupo 2B pela Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (OSTRY et al., 2017). Resultados obtidos dentro de estudos em animais sugeriram que a exposição às FBs perturba o metabolismo esfingolipídico, resultando no aumento da permeabilidade intestinal e, conseqüentemente, no aumento adicional do risco de infecção devido à imunidade da mucosa alterada (SMITH et al., 2012). A ZEA se liga competitivamente aos receptores de estrogênio, levando à anomalias estrogênicas em animais e síndromes generativas, especialmente em suínos e humanos (BORUTOVA et al., 2012; SCHOEVERS et al., 2012). Pesquisas recentes demonstraram que a exposição pré-natal à ZEA em ratos pode afetar desenvolvimentos maternos e fetais, podendo levar à problemas reprodutivos (GAO et al., 2017). Além disso, a ZEA faz parte do Grupo 3 (não classificado quanto à sua carcinogenicidade em humanos) (OSTRY et al., 2017). Os principais efeitos tóxicos do DON foram observados em células eucarióticas: inibição da síntese de ácidos nucléicos e proteínas e mau funcionamento das mitocôndrias. No entanto, a exposição ao DON tem sido associada ao comprometimento do crescimento, sistema imunológico comprometido, diarreia e vômito devido à inibição da síntese de proteínas e aumento das citocinas sistêmicas (LOMBARD,

2014; SMITH et al., 2012). DON foi categorizado no Grupo 3 (não classificado quanto à sua carcinogenicidade em humanos) (OSTRY et al., 2017). Os riscos potenciais à saúde dos bebês e crianças pequenas devido à exposição às micotoxinas únicas ou múltiplas foram documentadas por várias investigações (ASSUNÇÃO et al., 2015, 2018; MARTINS et al., 2018; MILIĆEVIĆ; ŠKRINJAR; BALTIĆ, 2010). Consequentemente, o conhecimento da prevalência de micotoxinas no leite materno e o consumo de alimentos destinados à lactentes é crucial para o fornecimento de dados para a avaliação de estudos de riscos. Nesse contexto, o objetivo do presente estudo foi fornecer uma visão geral sobre os dados publicados nos últimos 10 anos sobre a prevalência de micotoxinas no leite materno, fórmulas infantis, frutas e produtos à base de cereais para bebês, para avaliar a exposição mundial de crianças de até 1 ano.

2.2 Estratégia de busca

Pesquisas bibliográficas, critérios de inclusão e exclusão e coletas de dados foram realizadas com base no protocolo Cochrane (HIGGINS JPT, 2011), conforme é apresentado na Figura 6. Estudos relevantes publicados de 2008 à fevereiro de 2019 foram selecionados após a realização de uma pesquisa sistemática na literatura nos bancos de dados PubMed, Science direct e Google Scholar, usando os seguintes termos-chave: “Aflatoxina” OU “Ocratoxina A” OU “Fumonisina” OU “Zearalenona” OU “Deoxinivalenol” OU “Patulina” OU “Micotoxinas” E “Leite materno” OU “Leite humano” OU “Leite materno” OU “Mães em aleitamento” OU “Fórmula infantil ”OU“ À base de frutas ”OU“ À base de cereais ”.

2.2.1 Coleção de dados

Após a triagem, 2480 artigos foram avaliados para elegibilidade. Dois mil quatrocentos e sete artigos foram excluídos da avaliação inicial devido à duplicação ou baseado em seu título e conteúdo abstrato. Finalmente, 73 artigos preencheram os critérios de inclusão e foram incluídos na revisão.

2.2.2 Critérios de inclusão e exclusão

Durante a triagem primária, após a exclusão de artigos inadequados devido aos conteúdos irrelevantes, os textos completos de artigos potencialmente elegíveis foram baixados. Em seguida, as citações foram examinadas para inclusão e critérios de elegibilidade final. Os

critérios de inclusão foram: (1) Dados descritivos da seção transversal, (2) Artigo em texto completo disponível, (3) Estudos de pesquisa originais, (4) expressão exata do tamanho total da amostra e amostras positivas, (5) definiu o tipo de produto examinado e (6) métodos analíticos precisos mencionados. Além disso, para evitar qualquer erro no processo de tradução e também na clareza de expressão dos dados, com base em estudos de meta-análise publicados anteriormente em ciência dos alimentos (CHERKANI-HASSANI; MOJEMMI; MOUANE, 2016; MOUSAVI KHANEGHAH; FAKHRI; SANT'ANA, 2018a; MOUSAVI KHANEGHAH et al., 2018b), apenas artigos publicados no idioma inglês foram incluídos. As citações que não atenderam a esses critérios foram excluídos. Além disso, as listas de referência das citações recuperadas foram também verificadas.

Figura 6 - Fluxograma da pesquisa bibliográfica, critérios de inclusão, exclusão e coleta de dados.

Fonte: Própria autoria.

2.3 Prevalência de micotoxinas no leite materno

2.3.1 Aspectos fisiológicos da síntese do leite materno e excreção de micotoxinas

A contaminação do leite materno ocorre principalmente através do consumo de alimentos contaminados pelas mães em aleitamento, transferindo assim os contaminantes para o leite e conseqüentemente levando à exposição das crianças. É provável que a excreção de toxinas, incluindo micotoxinas no leite materno, pode estar relacionada à proteína de resistência ao câncer de mama (BCRP) (JONKER et al., 2005), a qual faz parte da família de transportadores de efluxo dependente de ATP para excreção de vários xenobióticos no leite materno (VAN HERWAARDEN; SCHINKEL, 2006). Embora a toxicocinética dos compostos químicos no leite materno não é ainda totalmente esclarecida (LANDRIGAN et al., 2002), sabe-se que o menor pH e maior concentração lipídica no leite, quando em comparação com o plasma, pode contribuir para a excreção de substâncias tóxicas no leite materno (ITO; LEE, 2003). Uma vez excretadas no leite, as micotoxinas podem ser particionadas em diferentes fases do leite, de acordo com suas propriedades físico-químicas. Por exemplo, a AFM₁ é predominantemente distribuída na porção de leite desnatado associada com caseína por interações hidrofóbicas (CAMPAGNOLLO et al., 2016).

A AFM₁ é a micotoxina mais estudada no leite materno, seguida pela OTA. Tendo em vista a falta de informações sobre outras micotoxinas, apenas os dados de prevalência de AFM₁ e OTA no leite materno foram relatados na presente revisão. No entanto, a AFB₁ não metabolizada, AFB₂, AFG₁ ou AFG₂ foram ocasionalmente relatadas em amostras coletadas do Egito (POLYCHRONAKI et al., 2007), Itália (GALVANO et al., 2008), Turquia (GÜRBAY et al., 2010) e no Brasil (ANDRADE; SILVA; CALDAS, 2013). No entanto, a AFM₁ pode ser detectada no leite materno cerca de 12–24 h após o consumo de alimentos contaminados com AFB₁; os níveis diminuem rapidamente com o tempo, se a ingestão de AFB₁ for interrompida, sendo indetectável após 3 dias de retirada (BATTACONE et al., 2009). Uma faixa de 0,09 a 0,43% da aflatoxina ingerida, como a AFM₁ pode ser excretada no leite materno (AZARIKIA; MAHDAVI; NIKNIAZ, 2018; ZARBA et al., 1992). Embora a OTA possa ser transferida para o leite materno de mulheres que consumiram alimentos contaminados com OTA, a transição A, taxa de OTA dos alimentos para o leite materno, permanece indeterminada (MUÑOZ et al., 2014).

A prevalência de micotoxinas no leite materno é altamente dependente dos hábitos alimentares das mães, embora poucos estudos publicados considerassem fontes alimentares primárias envolvidas na transferência de micotoxinas para o leite. Entre eles, algumas

investigações tentaram categorizar, usando um questionário de frequência alimentar (QFA) para as mães, a fim de determinar os principais alimentos como fontes de micotoxinas na dieta materna e sua posterior transferência para o leite. MAHDAVI et al. (2010) não observaram níveis detectáveis de AFM₁ em amostras de leite materno de áreas urbanas, no Irã, eles encontraram 22% das amostras coletadas em áreas rurais contaminadas com AFM₁, enquanto os níveis de contaminação estiveram associados ao consumo de leite de vaca produzido localmente. GALVANO et al. (2008) pesquisaram a presença de AFM₁ e OTA em 82 amostras de leite materno na Itália e AFM₁ e OTA foram detectadas em 5% e 74% das amostras, respectivamente, enquanto os níveis de OTA foram associados ao consumo de pão, produtos de panificação e carne suína curada. Uma extensa revisão sobre a prevalência mundial de resíduos de micotoxinas em leite materno concluiu que os hábitos alimentares maternos, sociodemográficos e variações sazonais foram os principais aspectos relacionados às altas concentrações de AFM₁ no leite materno (CHERKANI-HASSANI et al., 2016).

Os estudos sobre a prevalência de micotoxinas no leite materno foram realizados em amostras individuais de leite coletadas de mães em aleitamento ou em amostras de leite a granel provenientes de bancos de leite humano (HMB). No caso do HMB, o leite materno passa por um processo de pasteurização realizado a 62,5°C por 30 minutos, o qual não é capaz de eliminar as micotoxinas presentes no leite (WISEMAN et al., 1983). Além disso, a grande preocupação com a contaminação por micotoxinas no HMB é o fato de que o leite é usado para alimentar crianças em unidades de terapia intensiva neonatal, que geralmente recebem recém-nascidos prematuros (FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ, 2005).

2.3.2 Prevalência de aflatoxina M₁

Os dados de prevalência de AFM₁ no leite materno descritos em estudos realizados de 2008 a fevereiro de 2019 estão apresentados na Tabela 3. Os dados disponíveis de vários países, incluindo Brasil, Colômbia, Líbano, Malásia, Paquistão e Portugal indicam que os níveis de AFM₁ no leite materno estavam abaixo do limite de tolerância de AFM₁ no leite de vaca adotado em países europeus (50 ng/L) (CAMPAGNOLLO et al., 2016; RAHMANI et al., 2018; EUROPEAN COMMISSION, 2006). No entanto, menores prevalências (4-5%) e altos níveis de AFM₁ foram relatados em amostras de leite materno coletadas na Itália (GALVANO et al., 2008) e Sérvia (RADONIĆ et al., 2017). Em particular, RADONIĆ et al. (2017) detectaram AFM₁ em amostras de colostro (36%) e leite materno (100%) de mães em aleitamento na Sérvia, em altos níveis que variaram de 58 a 570 ng/L, confirmando uma alta exposição dos

recém-nascidos à AFM₁. Níveis extremamente altos de AFM₁ no leite materno foram observados no Egito (200–19.000 ng/L) (TOMERAK et al., 2011), Sudão (7–2561 ng/L) (ELZUPIR et al., 2012), Nigéria (1–601 ng/L) (ANTHONY; OJOCHENEMI; MULUNDA, 2016) e Iraque (100-3010 ng/L) (QADIR; ALI, 2014). Altas frequências de ocorrência também foram relatadas por AZARIKIA; MAHDAVI; NIKNIAZ (2018), que detectaram AFM₁ em 100% das amostras no Irã, na faixa de até 14 ng/L. Esses resultados indicam que a prevalência geral de AFM₁ no leite materno é altamente variável, com porcentagens de amostras positivas variando até 100%, o que pode estar associado à variações na contaminação de alimentos por micotoxinas e hábitos alimentares das mães em diferentes países (CHERKANI-HASSANI; MOJEMMI; MOUANE, 2016). É importante considerar que as diferenças na prevalência e nos níveis relatados de AFM₁ entre os diferentes estudos também pode estar relacionado às diferenças dos métodos analíticos utilizados, resultando em diferentes limites de detecção (LOD) ou quantificação (LOQ) de AFM₁ (BIASUCCI et al., 2011). Em particular, a AFM₁ no leite materno foi frequentemente avaliada por kits de ensaio à base de enzimas imunossorventes (ELISA) (AZARIKIA; MAHDAVI; NIKNIAZ, 2018; TOMERAK et al., 2011) desenvolvidos e validados para leite animal e aplicados diretamente ao leite humano, que é uma matriz muito diferente, sem relatos de valores de LOD ou LOQ. As técnicas mais frequentemente usadas para detecção de AFM₁ no leite materno com a preparação da amostra é baseada principalmente em cromatografia líquida acoplada a um detector de fluorescência (HPLC/FD) e, mais recentemente, acoplado à espectrometria de massa (LC-MS/MS) (WARTH et al., 2016). Essas técnicas podem fornecer valores de LOD extremamente baixos, portanto, podem ser observadas altas frequências de amostras positivas em alguns estudos (DIAZ; SÁNCHEZ, 2015; EALEGBE et al., 2017; MAGOHA et al., 2014a).

Os dados apresentados destacam a necessidade de pesquisas mais avançadas a respeito da contaminação por AF em alimentos consumidos pelas mães, bem como estratégias para prevenir os efeitos potencialmente tóxicos da AFM₁ em crianças.

Tabela 3 - Ocorrência de aflatoxina M₁ no leite materno em diferentes países (dados de 2008 à fevereiro de 2019).

País	Amostras analisadas (N)	Amostras positivas		LOD (ng/L)	Concentração		Método Analítico	Referência
		<i>n</i>	%		Variação (ng/L)	Média (ng/L)		
<i>África:</i>								
Camarões	62	3	5	NR	5 – 62	NR	HPLC/FD	(TCHANA; MOUNDIPA; TCHOUANGUEP, 2010)
Nigéria	120	17	14	NR	2 – 187	NR	HPLC/FD	(OLUWAFEMI, 2012)
Nigéria	50	41	82	10	4 – 35	NR	HPLC/FD	(ADEJUMO et al., 2013)
Nigéria	40	31	77	1	1 – 601	66	HPLC/FD	(ANTHONY; OJOCHENEMI; MULUNDA, 2016)
Nigéria	100	82	82	10	NR	57	HPLC/FD	(EALEGBE et al., 2017)
Egito	150	98	65	NR	200 – 19,000	7,100	ELISA	(TOMERAK et al., 2011)
Egito	125	87	70	NR	7 – 329	74	ELISA	(EL-TRAS; EL-KADY; TAYEL, 2011)
Quênia	67 ¹	38	57	NR	< 1 – 4	< 1	ELISA	(KANG’ETHE et al., 2017)
	98 ²	85	87	NR	< 1 – 48	8	ELISA	
	21 ¹	2	9	NR	< 1 – 1	1	HPLC/FD	
	18 ²	4	22	NR	1 – 153	11	HPLC/FD	
Sudão	94	51	54	13	7 – 2,561	401	HPLC/FD	(ELZUPIR et al., 2012)
Tanzânia	143	143	100	5	10 - 550	70	HPLC/FD	(MAGOHA et al., 2014a)
<i>América:</i>								
Brasil	224 ³	0	0	30 ⁴	-	-	LC-MS/MS	(ANDRADE; SILVA; CALDAS, 2013)

Brasil	100 ³	2	2	< 1	< 1 – 1	< 1	HPLC/FD	(IHA et al., 2014)
Brasil	94	5	5	4	13 – 25	18	HPLC/FD	(ISHIKAWA et al., 2016)
Brasil	86 ³	0	0	6.25	0	0	LC-MS/MS	(TONON et al., 2018)
Colômbia	50	45	90	0.6	1 – 19	5	HPLC/FD	(DIAZ; SÁNCHEZ, 2015)
Equador	78	67	86	0.5	17 – 458	45	HPLC/FD	(ORTIZ et al., 2018)
México	112	100	89	NR	3 – 34	12	ELISA	(CANTÚ-CORNELIO et al., 2016)
<i>Ásia:</i>								
Irã	160	157	98	NR	< 1 – 27	8	ELISA	(SADEGHI et al., 2009)
Irã	182 ⁵	20	11	NR	5 – 8	7	ELISA	(MAHDAVI et al., 2010)
Irã	132	8	6	NR	7 – 11	9	ELISA	(GHIASIAN; MAGHSOOD, 2012)
Irã	80	1	1	NR	7	7	ELISA	(JAFARIAN-DEHKORDI; POURRADI, 2013)
Irã	87	24	28	NR	< 1 – 5	1	ELISA	(DEHGHAN et al., 2014)
Irã	85	72	85	NR	2 – 10	6	ELISA	(MALEKI et al., 2015)
Irã	88	88	100	NR	< 1 – 14	3	ELISA	(AZARIKIA; MAHDAVI; NIKNIAZ, 2018)
Irã	250	39	16	2.3	11 – 40	5	HPLC/FD	(JAFARI et al., 2017)
Iraque	20	16	80	NR	100 – 3,010	NR	TLC	(QADIR; ALI, 2014)
Jordânia	80	80	100	NR	10 – 137	68	ELISA	(OMAR, 2012)
Líbano	43 ⁶	41	95	NR	< 1 – 8	4	ELISA	(ELARIDI et al., 2017)
	68 ⁷	63	93	NR	< 1 – 8	5	ELISA	

Malásia	102	0	0	13	-	-	HPLC/FD	(SHUIB et al., 2017)
Paquistão	125	94	75	NR	< 1	NR	ELISA	(KHAN et al., 2018)
<i>Europa:</i>								
Chipre	50	40	80	5	5 – 28	8	ELISA	(KUNTER et al., 2017)
Itália	82	4	5	3	7 – 140	55	HPLC/FD	(GALVANO et al., 2008)
Portugal	67	22	33	NR	0 – 11	7	ELISA	(BOGALHO et al., 2018)
Sérvia	10	6	60	2	5 – 50	10	ELISA	(KOS et al., 2014)
Sérvia	55 ⁸	22	36	NR	NR	370	ELISA	(RADONIĆ et al., 2017)
	5 ⁹	5	100	NR	58 – 570	NR	ELISA	
Turquia	61	8	13	5	5 – 7	6	HPLC/FD	(KESKIN et al., 2009)
Turquia	75	75	100	5	61 – 300	NR	HPLC/FD	(GÜRBAY et al., 2010)
Turquia	70	9	13	NR	NR	6	ELISA	(UYAR et al., 2014)
Turquia	73	18	25	NR	1 – 6	3	ELISA	(ATASEVER et al., 2014)
Turquia	74	66	89	NR	10 – 80	19	ELISA	(KILIÇ ALTUN; GÜRBÜZ; AYAĞ, 2017)

¹ Amostras coletadas no município de Nandi.

² Amostras coletadas no município de Makueni.

³ Todas as amostras foram coletadas em um banco de leite humano.

⁴ Limite de quantificação.

⁵ Amostras coletadas em áreas rurais (n = 91) e urbanas (n = 91); somente áreas rurais tiveram amostras positivas para aflatoxina M₁.

⁶ Amostras coletadas durante o outono-inverno.

⁷ Amostras coletadas durante as estações primavera-verão.

⁸ Amostras de colostro (3º dia de lactação).

⁹ Amostras de leite materno (4-8 meses após o parto).

NR - Não reportado. LOD - Limite de detecção. HPLC/FD - cromatografia líquida de alta eficiência/detector de fluorescência. LC-MS/MS - Espectrometria líquida acoplada à espectrometria de massas. ELISA - Ensaio de imunoabsorção enzimática.

Fonte: Própria autoria.

2.3.3 Prevalência de ocratoxina A

Comparando com AFM₁, um menor número de estudos foi realizado globalmente para detectar níveis de OTA no leite humano nos últimos 10 anos, conforme apresentado na Tabela 4. Os dados disponíveis indicam altas frequências (30–100%) de amostras positivas com baixos níveis de OTA (1–75 ng/L) em leite materno coletado no Brasil, Irã, Itália e Eslováquia. Contudo, altas concentrações de OTA (até 186 ng/L) foram encontradas em amostras de leite materno coletadas no Chile (MUÑOZ et al., 2010, 2014). Níveis extremamente altos foram relatados em 100% das amostras analisadas por ELISA no Irã (KAMALI et al., 2017) e na Turquia (análises por HPLC/FD) (GÜRBAY et al., 2009), variando de 110 a 7340 ng/L e 621 a 13111 ng/L, respectivamente. Em uma das investigações conduzidas na Itália (GALVANO et al., 2008), a variação da concentração de OTA no leite materno foi de 5 a 405 ng/L. Um estudo anterior realizado na Noruega indicou que os níveis de OTA no leite humano eram fortemente correlacionados com o consumo de patê e torta de fígado (SKAUG et al., 2001). Apesar de todas essas diferenças entre os níveis e as concentrações relatadas acerca da prevalência de OTA, pode postular-se que a forte correlação com a localização geográfica e, mais importante, hábitos alimentares, cultura culinária e dieta estão entre os fatores efetivos na concentração de OTA em leite humano (CHERKANI-HASSANI; MOJEMMI; MOUANE, 2016). Não há dados publicados na década passada sobre a prevalência de OTA no leite materno de mulheres em aleitamento em países africanos. No entanto, a OTA foi encontrada no leite humano em altas concentrações (200-337000 ng/L) em 35% das amostras testadas em Serra Leoa (JONSYN; MAXWELL; HENDRICKSE, 1995), destacando a necessidade de mais estudos para estimar a exposição à OTA de mães lactantes às dietas alimentares no continente africano.

Tabela 4 - Ocorrência de OTA no leite materno em diferentes países (dados de 2008 à fevereiro de 2019).

País	Amostras analisadas (N)	Amostras positivas		LOD (ng/L)	Concentração		Método Analítico	Referência
		n	%		Variação (ng/L)	Média (ng/L)		
América:								
Brasil	224 ¹	0	0	30 ²	-	-	LC-MS/MS	(ANDRADE; SILVA; CALDAS, (2013)
Brasil	100 ¹	66	66	1	1 – 21	4	HPLC/FD	(IHA et al., 2014)
Brasil	86 ¹	0	0	125	-	-	LC-MS/MS	(TONON et al., 2018)
Chile	11	11	100	10	44 – 184	106	HPLC/FD	(MUÑOZ et al., 2014)
Chile	50	40	80	10	10 – 186	52	LC-MS	(MUÑOZ et al., 2010)
Ásia:								
Irã	136	5	4	NR	5 – 16	NR	HPLC/FD	(AFSHAR et al., 2018)
Irã	87	84	97	NR	2 – 60	25	ELISA	(DEHGHAN et al., 2014)
Irã	84	84	100	NR	110 – 7,340	1,990	ELISA	(KAMALI et al., 2017)
Europa:								
Itália	82	61	74	2	5 – 405	30	HPLC/FD	(GALVANO et al., 2008)
Itália	57	45	79	1	1 – 75	10	HPLC/FD	(BIASUCCI et al., 2011)
Eslováquia	76	23	30	NR	2 – 60	NR	HPLC/FD	(DOSTAL et al., 2008)
Turquia	75	75	100	10	621 – 13,111	NR	HPLC/FD	(GÜRBAY et al., 2009)
Turquia	70	34	49	NR	NR	30.0	ELISA	(UYAR et al., 2014)
Turquia	90	90	100	NR	761 – 1,724	1,046	ELISA	(DINLEYICI et al., 2018)

NR: Não relatado.

¹ Todas as amostras coletadas em um banco de leite humano.

² Limite de quantificação.

NR - Não reportado. LOD - Limite de detecção. HPLC/FD - cromatografia líquida de alta eficiência/detector de fluorescência. LC-MS/MS – Espectrometria líquida acoplada à espectrometria de massas. ELISA - Ensaio de imunoabsorção enzimática.

Fonte: Própria autoria.

2.3.4 Prevalência de outras micotoxinas

Como foi afirmado anteriormente, comparado com os dados disponíveis sobre prevalência de AFM₁ e OTA, há pouca informação sobre a presença de outras micotoxinas no leite materno. MAGOHA et al. (2014b) avaliaram a contaminação de FB₁ em 131 amostras de leite materno em Rombo, norte da Tanzânia. Os autores confirmaram FB₁ em amostras utilizando sistema de cromatografia líquida de alta eficiência acoplado ao espectrômetro de massas com uma ionização ortogonal por eletropulverização, observando que 58 amostras (44%) estavam contaminadas com FB₁ com níveis de 6–471 µg/L, dos quais 10% estavam acima do limite de tolerância de 200 µg/L estabelecido para as fumonisinas em alimentos destinados a lactentes. RUBERT et al. (2014) desenvolveram um método para analisar simultaneamente 27 micotoxinas no leite materno baseada em uma extração rápida, fácil, barata, eficiente e segura (QuEChERS), técnica combinada com espectrometria de massas de alta resolução, que foi aplicada à investigação das concentrações de micotoxinas em 35 amostras de mulheres lactantes em Valência (Espanha). De acordo com o estudo, ZEA foi a micotoxina detectada com maior frequência, em 13 amostras (37%) com níveis de 2 a 14 µg/L. Os autores também relataram que outras fusariotoxinas, incluindo nivalenol (NIV), HT-2 e eniatinas (A, A1, B, B1) foram quantificados em baixos níveis utilizando as respectivas curvas padrão em 2, 7, 6 e 2 amostras, respectivamente, demonstrando a exposição prévia das mães às micotoxinas na dieta e ao risco potencial para os seus bebês. Recentemente, BRAUN et al. (2018) desenvolveram um ensaio altamente sensível e avaliaram múltiplas micotoxinas (AFs, ZEA, DON, OTA e micotoxinas emergentes) e seus metabólitos usando LC-MS/MS. Os LOQs resultantes variaram de 0,009 a 2,9 ng/mL, e a maioria das recuperações de extração dos analitos foi de até 116%. O método foi aplicado a 75 amostras de leite materno coletadas no estado de Ogun, uma região da Nigéria. A maioria das amostras analisadas não mostrou contaminação por micotoxinas, exceto beauvericina (56%), eniatina B (9%), OTA (15%) e AFM₁ (1%). Beauvericina foi relatada pela primeira vez no leite materno, em concentrações de até 0,019 ng/mL.

2.4 Prevalência de micotoxinas em alimentos infantis

2.4.1 Aspectos regulatórios das micotoxinas em alimentos infantis

Os regulamentos relativos aos níveis de micotoxinas nos alimentos foram adotados globalmente, visando reduzir a exposição alimentar às micotoxinas de todas as idades e grupos de consumidores. Como as aflatoxinas são classificadas como compostos genotóxicos, não há ingestão diária máxima tolerável (IDT) recomendada para esses compostos. Portanto, limites de tolerância para aflatoxinas em alimentos foram adotados em níveis baixos. Para o OTA, uma ingestão semanal máxima tolerável de 120 ng/kg peso corporal/semana foi estabelecida pela EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (2006). Com base nos efeitos nefrotóxicos da FB₁, um teste provisório da IDT máxima de 2000 ng/kg de peso corporal/dia foi recomendado pela WORLD HEALTH ORGANIZATION (2002). Os valores de IDT máxima provisória recomendados para ZEA (EFSA, 2011), DON (JOINT FAO/WHO EXPERT COMMITTEE ON FOOD ADDITIVES, 2001) e PAT (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 1995) são 250 ng/kg de peso corporal/dia, 1000 ng/kg de peso corporal/dia e 400 ng/kg de peso corporal/dia, respectivamente. Esses valores de orientação baseados em guias de saúde são geralmente estabelecidos, levando-se em consideração os dados de adultos. Recentemente, a EFSA preparou orientações para a avaliação dos riscos de substâncias presentes nos alimentos destinados para lactentes com menos de 16 semanas de idade, seguindo uma solicitação da *European Commission* (HARDY et al., 2017). O Comitê Científico da EFSA destacou várias especificidades dessa faixa etária, refletindo sua vulnerabilidade particular, como por exemplo, funções gástricas, pancreáticas e biliares não desenvolvidas totalmente ao nascer; absorção de substâncias, em geral, pode ser mais lenta em bebês com menos de 16 semanas de idade do que nos mais velhos; e, bebês mostram um padrão único de desenvolvimento para isoformas enzimáticas individuais envolvidas nas fases I e II do metabolismo, com capacidade reduzida ao nascimento. Para substâncias não adicionadas intencionalmente (por exemplo, contaminantes) aos alimentos para crianças desta faixa etária, a EFSA concluiu que a sua presença em alimentos destinando para bebês deve ser evitada o máximo possível. Para explicar as diferenças entre a população adulta e os bebês, em particular os mais jovens, deve-se considerar um fato adicional de três, caso haja dados disponíveis sobre a excreção ou metabolismo de uma substância não adicionada intencionalmente aos alimentos (HARDY et al., 2017).

Como mencionados anteriormente, os efeitos toxicológicos das micotoxinas podem ser considerados mais ameaçadores para os bebês do que para os adultos. Como mostrado na

Tabela 5, a fim de eliminar os possíveis riscos relacionados à ingestão de micotoxinas através do consumo de produtos alimentares, regulamentos rigorosos para limitar o nível aceitável de micotoxinas usadas em alimentos infantis foram estabelecidos em aproximadamente 20 países. Nesse contexto, os países da União Européia (UE) estabeleceram limites de 25 ng/kg para AFM₁ em fórmulas para lactentes e fórmulas de transição, 100 ng/kg para AFB₁, 200.000 ng/kg para DON, 20.000 ng/kg para ZEA, 200.000 ng/kg para fumonisinas e 500 ng/kg para OTA em cereais e alimentos infantis e 10.000 ng/kg para PAT em produtos à base de maçã e alimentos infantis (EUROPEAN COMMISSION; REGULATION, 2006). Além da UE, diferentes órgãos reguladores em países asiáticos como China, Coreia do Sul e Taiwan também estabeleceram alguns limites para micotoxinas entre diferentes produtos alimentícios infantis (ANUKUL; VANGNAI; MAHAKARNCHANDKUL, 2013). Embora os limites para aflatoxinas, DON e fumonisinas em ambos os alimentos processados e não processados foram estabelecidos pelo FDA, curiosamente, não há limites para a OTA (MALIR et al., 2016). Além disso, um limite específico para micotoxinas em alimentos infantis não foi recomendado pelo FDA (FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2016). No Canadá, os limites para a OTA em alimentos infantis e DON em produtos de trigo foram estabelecidos em 500 ng/kg e 1.000.000 ng/kg, respectivamente (HEALTH CANADA; BUREAU, 2009).

2.4.2 Prevalência de micotoxinas na fórmula infantil

Embora o aleitamento materno exclusivo seja recomendado para bebês (0–6 meses) (WHO, 2018), há circunstâncias em que são necessários substitutos do leite para suprir os requisitos nutricionais de bebês (BOUÉ et al., 2017). Nesse contexto, as fórmulas infantis desempenham um papel importante, como um produto alimentar singular para bebês nos estágios iniciais da vida. Assim, neste cenário, esses produtos não devem estar contaminados por micotoxinas (MEUCCI et al., 2010). No entanto, a prevalência de micotoxinas em fórmulas para lactentes em diferentes países nos últimos 10 anos (dados de 2008 à 2019) foi apresentada, de acordo com a Tabela 6. Altos níveis de AFB₁ (até 87400 ng/kg), OTA (até 3200 ng/kg) e FB (FB₁ + FB₂) (até 672900 ng/kg) foram relatados entre amostras de fórmulas infantis coletadas de Burkina Faso (WARE et al., 2017), embora apenas a AFB₁ foi encontrada com uma alta frequência (84%) (LOQ: 1,0 µg/kg). Na Coreia do Sul, OK et al. (2014) observaram que cerca de 25% das amostras estavam contaminadas com altos níveis de ZEA (3300–17600 ng/kg). AFM₁, AFB₁, e OTA são as principais micotoxinas detectadas em fórmulas infantis em países europeus (Itália, Portugal e Turquia), bem como em continentes americanos (Brasil e Canadá).

Amostras positivas atingiram uma maior prevalência de AFM₁ (44%) com uma concentração de 46 ng/kg (LOQ: 0,021 µg/kg) em uma pesquisa realizada no Brasil (ISHIKAWA et al., 2016), no entanto, a IDT era muito inferior ao valor permitido pela legislação (500 ng/kg), de acordo com as diretrizes brasileiras (ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2011), porém acima do limite recomendado pela Comissão Européia (CE) (25 ng/kg).

Tabela 5 - Regulamentos para micotoxinas em alimentos destinados ao consumo infantil em vários países.

País	Produto alimentício	Micotoxina	Limite (ng/kg)	Referência
Brasil		Total AF ^a	1.000	(ANVISA.
	Alimentos à base de cereais e alimentos para bebês	OTA	2.000	AGÊNCIA
		ZEA	20.000	NACIONAL DE
		DON	200.000	VIGILÂNCIA
	Alimentos à base de milho e alimentos para crianças	FB ^b	200.000	SANITÁRIA, 2011)
Canadá	Fórmula infantil	Total AF ^a	1.000	
	Alimentos para bebês	OTA	500	(BUREAU, 2009)
China	Suco de maçã	PAT	50	(YUAN et al., 2010)
	Produtos à base de maçã	PAT	25	
		AFB ₁	100	
		FB ^b	200.000	(UNIÃO
União Européia ^c	Alimentos à base de cereais e alimentos para crianças	OTA	500	EUROPÉIA, 2006)
		ZEA	20.000	
		DON	200.000	
	Fórmula infantil e fórmula de acompanhamento	AFM ₁	25	
	Produtos à base de maçã e alimentos para bebês	PAT	10.000	

^a Soma das aflatoxinas B₁, B₂, G₁, e G₂.

^a Soma das fumonisinas B₁ e B₂.

^c Estados membros da UE: Áustria, Bélgica, Dinamarca, Finlândia, França, Alemanha, Grécia, Irlanda, Itália, Luxemburgo, Holanda, Portugal, Espanha, Suécia, Reino Unido.

AFB₁ - Aflatoxina B₁. OTA - Ocratoxina A. ZEA - Zearalenona. DON – Deoxinivalenol.

Fonte: Própria autoria.

A AFB₁ foi relatada apenas no estudo de (ALVITO et al., 2010), em uma amostra (14% das amostras analisadas), apresentando concentração de 0,003 µg/kg e LOQ de 0,004 µg/kg. A maior prevalência de OTA foi registrada em 72% (LOQ: 0,006 µg/L) em um estudo italiano (MEUCCI et al., 2010), enquanto a maior concentração de OTA foi de 0,886 µg/kg (LOQ: 0,5 µg/kg) em um estudo canadense de KOLAKOWSKI et al. (2016). De acordo com os regulamentos da UE para micotoxinas, não há limites máximos estabelecidos para AFB₁ e OTA em fórmulas infantis. No entanto, estudos de Portugal, Itália e Turquia relataram a presença de AFB₁ e OTA em fórmulas infantis.

Tabela 6 - Ocorrência de micotoxinas em fórmulas infantis em diferentes países de 2008 à fevereiro de 2019.

País	Amostras analisadas (N)	Micotoxina	Amostras positivas		LOD (ng/kg)	Concentração		Método Analítico	Referência
			<i>n</i>	%		Variação (ng/kg)	Média (ng/kg)		
<i>África:</i>									
Burkina Faso	199	AFB ₁	16	84	300	< LOD – 87.400	3.800	HPLC	(WARE et al., 2017)
	199	OTA	7	8	50	< LOD – 3.200	100		
	199	FB ₁ + FB ₂	15	2	5.000	< LOD – 672.900	30.300		
			3						
<i>América:</i>									
Brasil	16	AFM ₁	7	44	3	< LOD – 46	24	HPLC	(ISHIKAWA et al., 2016)
Canadá	416	OTA	57	14	40	< LOD - 886	145	LC-MS/MS	(KOLAKOWSKI et al., 2016)
<i>Ásia:</i>									
Coréia do Sul	36	ZEA	9	25	2.500	3.300 – 17.600	NR	UHPLC	(OK et al., 2014)
<i>Europa:</i>									
Itália	185	OTA	13	72	1	< LOD – 690	88	HPLC	(MEUCCI et al., 2010)
		AFM ₁	3	1	3	< LOD – 15	14		
			2						

Itália	13	AFM ₁	0	0	15	NA	NA	LC- MS/MS	(JUAN et al., 2014)
Portugal	7	AFM ₁	1	14	4	< LOD –	NR	HPLC	(ALVITO et al., 2010)
		AFB ₁	3	43	1	41	NR		
		OTA	3	43	9	< LOD –	NR		
					3	< LOD –			
					136				
Turquia	62	AFM ₁	5	8	5	< LOD –	18	HPLC	(KABAK, 2012)
		OTA	12	19	6	22	20		
						< LOD –			
						184			

NR - Não reportado. NA - Não aplicável. LOD - Limite de detecção. HPLC - Cromatografia líquida de alta eficiência. UHPLC - Cromatografia líquida de alta performance. LC-MS/MS - Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas.

AFB₁ - aflatoxina B₁. AFM₁ - Aflatoxina M₁. OTA - Ocratoxina A. ZEA - Zearalenona.

Fonte: Própria autoria.

2.4.3 Prevalência de micotoxinas em produtos à base de frutas

A prevalência de micotoxinas em produtos à base de frutas em diferentes países nos últimos 10 anos (2008–2019) está apresentada na Tabela 7. Produtos à base de frutas, principalmente produtos à base de maçã, são frequentemente ingeridos pelas crianças devido ao seu sabor e textura (BARREIRA; ALVITO; ALMEIDA, 2010). No entanto, algumas micotoxinas, como a PAT, podem causar danos à saúde de bebês e crianças pequenas caso tenham uma alta ingestão diária dessa micotoxina (HAMMAMI et al., 2017). De acordo com a Tabela 7, a PAT foi a única micotoxina detectada em produtos à base de frutas entre os diferentes países, exceto em um estudo na Síria, que relatou OTA em níveis de 19–156 ng/kg em 33% das amostras analisadas (DAROUJ; MASSOUH; GHANEM, 2016). A maior prevalência de PAT (100%) (LOQ: 5 µg/kg) foi relatada no Catar (HAMMAMI et al., 2017), enquanto cerca de 50% das amostras analisadas suprimiram o limite tolerável de 10000 ng/kg, definido pelas diretrizes europeias (Tabela 5). A maior concentração de PAT (67300 ng/kg), foi relatada na China (YUAN et al., 2010), enquanto que os níveis máximos de PAT permitidos em sucos de maçã e produtos sólidos de maçã (Tabela 5) na China são 50 µg/L e 25 µg/L, respectivamente (YUAN et al., 2010).

Tabela 7 - Ocorrência de micotoxinas em produtos à base de frutas em diferentes países de 2008 à fevereiro de 2019.

País	Amostras analisadas (N)	Micotoxina	Amostras positivas		LOD (ng/kg)	Concentração		Método Analítico	Referência
			n	%		Variação (ng/kg)	Média (ng/kg)		
<i>Ásia:</i>									
China	30	PAT	1 9	63	1.200	< LOD – 67.300	9.300	HPLC	(YUAN et al., 2010)
Síria	12	OTA	4	33	50	19 – 156	93	HPLC	(DAROUJ; MASSOUH; GHANEM, 2016)
Catar	13	PAT	1 3	100	1.000	< LOD – 61.300	20.800	LC-MS/MS	(HAMMAM I et al., 2017)
<i>Europa:</i>									
Itália	26	PAT	0	0	15 ¹	-	-	LC-MS/MS	(JUAN et al., 2014)
Portugal	86	PAT	5	6	1.200	< LOD – 5.700	NR	HPLC	(BARREIR A; ALVITO; ALMEIDA, 2010)
Sérvia	114	PAT	3 2	28	400	< LOD – 8.300	1.000	HPLC	(TOROVIĆ et al., 2017)
Espanha	124	PAT	4 2	34	2.080	< LOD – 9.600	7.100	HPLC	(CANO-SANCHO et al., 2009)
Espanha	17	PAT	0	0	1.400	-	-	HPLC	(MARÍN et al., 2011)

¹ Limite de quantificação.

NR - Não reportado. LOD - Limite de detecção. HPLC - Cromatografia líquida de alta eficiência. LC-MS/MS - Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas. PAT – Patulina.

Fonte: Própria autoria.

2.4.4 Prevalência de micotoxinas em produtos à base de cereais

Produtos de cereais destinados para bebês são fontes de alimentos promissoras, uma vez que são facilmente digeríveis e ricos em minerais essenciais que ajudam no crescimento

adequado dos bebês (MONTAGNE et al., 2009). No entanto, produtos à base de cereais são uma das principais fontes de micotoxinas na dieta humana (AL-TAHER et al., 2017; KHANEGHAH et al., 2018a; MOUSAVI KHANEGHAH; FAKHRI; SANT'ANA, 2018b; MOUSAVI KHANEGHAH et al., 2018c). Nesse contexto, a contaminação por micotoxinas regulamentadas em países europeus (AF, OTA, PAT e fusariotoxinas) e não regulamentadas (NIV, beauvericina (BEA), esterigmatocistina (STER), eniatinas (EN) e metabólitos de fumonisina) em produtos à base de cereais destinados para bebês foram confirmadas, de acordo com a Tabela 8. Um estudo asiático realizado por OUESLATI et al. (2018) também relatou a contaminação de metabólitos de DON em produtos à base de cereais destinados para bebês. Também, uma maior prevalência de micotoxinas reguladas foi detectada na Itália para DON (76%), com concentrações de 268000 ng/kg e LOQ de 10 µg/kg (JUAN et al., 2014). Para as micotoxinas não reguladas, a prevalência mais alta foi de 43% para a BEA (RUBERT; SOLER; MAÑES, 2012), enquanto a concentração mais alta foi de 832000 ng/kg para eniatinas (LOQ: 10 µg/kg) (JUAN et al., 2014). A AFM₁ foi reportada em Portugal com uma prevalência de 20% (LOQ: 0,014 µg/kg) (ALVITO et al., 2010) e na Espanha (RUBERT; SOLER; MAÑES, 2012) com uma concentração de 250 ng/kg. Contudo, não há legislação disponível para a AFM₁ em produtos à base de cereais produzidos para o consumo infantil. Os níveis de AFB₁ detectados em produtos à base de cereais na Espanha foram de 3110 ng/kg (HERNÁNDEZ-MARTÍNEZ; NAVARRO-BLASCO, 2010), que excederam o limite de 100 ng/kg, recomendado pela UE (Tabela 5) (EUROPEAN COMMISSION, 2006). Um estudo iraniano (MOTTAGHIANPOUR et al., 2017) relatou uma prevalência de 69% de AFB₁ (LOQ: 0,025 µg/kg) com maior concentração 15150 ng/kg, que superou as concentrações permitidas de 500 e 1000 ng/kg de AFB₁ para produtos à base de cereais destinados para lactentes com e sem leite, respectivamente, padrões estabelecidos por uma organização iraniana. De acordo com AL-TAHER et al. (2017), a Administração de Alimentos e Medicamentos dos EUA (FDA) estabeleceu níveis máximos para AFs, DON e FBs em alimentos processados e não processados. No entanto, nenhum limite foi definido pelo FDA para OTA em alimentos ou limites específicos para micotoxinas em alimentos para lactentes, como cereais (FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2016). Mesmo assim, em um estudo semelhante realizado na UE, foram encontradas 21 amostras que excederam os limites aceitáveis para AFB₁, OTA e ZEA. Baseado na Tabela 7, conforme relatado por KOLAKOWSKI et al. (2016), a concentração de OTA entre cereais excede o valor proposto para as amostras de alimentos destinados à lactentes (500 ng/kg) (HEALTH CANADA, 2012). AL-TAHER et al. (2017) e ZHANG et al. (2018)

Europa:

Itália ³	75	OTA	1	20	50	< LOD	60	LC-	(JUAN et al., 2014)
		NIV	5	4	5.500	- 120	19.910	MS/MS	
		FUS-X	3	24	5.500	< LOD	146.51		
		DON	1	25	1.000	–	0		
		HT-2	8	3	2.000	235.000	102.60		
		β-ZEL	1	7	1.500	< LOD	0		
		ENB	9	13	2.000	–	12.650		
		ENB ₁	2	1	5.000	604.000	2.500		
		ENB ₄	5	5	5.000	< LOD	101.30		
		ENA ₁	1	4	5.000	–	0		
		BEA	0	1	5.000	268.000	7.800		
			1			< LOD	38.080		
			4			–	6.580		
			3			151.000	1.180		
			1			< LOD			
						–			
						23.200			
						< LOD			
						–			
						832.000			
						< LOD			
						–			
						117.000			
						< LOD			
						–			
						311.000			
						< LOD			
						–			
						125.000			
						< LOD			
						–			
						21.300			
Portugal	20	AFM ₁	4	20	4	< LOD	NR	HPLC	(ALVITO et al., 2010)
		AFB ₁	6	30	1	– 23	NR		
		OTA	1	60	9	< LOD	NR		
			2			– 9			
						< LOD			
						– 212			

Portugal	20	PAT	1	75	900	< LOD	2.330	HPLC	(ASSUNÇÃO et al., 2016)
		OTA	5	50	6	– 4.500	61		
			1			< LOD			
			0			– 263			
Espanha	91	AFB ₁	5	63	3	< LOD	90	HPLC	(HERNÁNDEZ-MARTÍNEZ; NAVARRO-BLASCO, 2010)
		AFB ₂	7	40	2	– 3.110	10		
		AFG ₁	3	66	2	< LOD	20		
		AFG ₂	6	43	2	– 410	4		
			6			< LOD			
			0			– 420			
			3			< LOD			
			9			– 70			
Espanha ⁴	35	NIV	2	6	35,00	< LOD	NR	LC-MS/MS	(RUBERT; SOLER; MAÑES, 2012)
		DON	9	26	0	–	NR		
		OTA	2	6	20,00	100.000	NR		
		FB ₁	3	9	0	²	NR		
		FB ₂	1	3	100	70.000	NR		
		AFG ₂	1	3	22,00	–	NR		
		ZEA	2	6	0	210.000	NR		
		BEA	1	43	25,00	350 –	NR		
		AFM ₁	5	3	0	500	NR		
					450	75.000	NR		
		STER	1	6	2,000	–			
			2		500	100.000			
					80	75.000			
					2,500	1.200			
						10.000			
						–			
						15.000			
						5.000 –			
						100.000			
						< LOD			
						– 250 ²			
						10.000			
						–			
						50.000			
Turquia	21	OTA	4	19	50	< LOD	140	HPLC	(OZDEN; AKDENIZ; ALPERTUNGA, 2012)
						– 200			

NR - Não reportado. NA - Não aplicável. LOD - Limite de detecção. HPLC - Cromatografia líquida de alta eficiência. LC-MS - Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas. LC-MS/MS - Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em tandem. GC-MS/MS - Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa em tandem.

DON - deoxinivalenol. 15-ADON - 15-acetil-deoxinivalenol. 3-ADON - 3-acetil-deoxinivalenol. T-2 - toxina T-2. HT-2 - toxina HT-2. FB - Fumonisinas. FB₁ - Fumonisina B₁. FB₂ - Fumonisina B₂. FB₃ - Fumonisina B₃. AFB₁ - aflatoxina B₁. AFB₂ - Aflatoxina B₂. AFG₁ - Aflatoxina G₁. AFG₂ - Aflatoxina G₂. AFM₁ - Aflatoxina M₁. ZEA - Zearalenona. ZAN - Zearalanona. α -ZOL - α -zearalenol. β -ZOL - β -zearalenol. OTA - Ocratoxina A. FUS-X - Fusarenon X. DAS - Diacetoxyscirpenol. NEO - Neossolaniol. STER - Esterigmatocistina. ENA - Eniatia A. ENA₁ - Eniatia A₁. ENB - Eniatia B. ENB₁ - Eniatia B₁. ENB₄ - Eniatia B₄. BEA - Beauvericina.

¹Análise de micotoxinas com 0% de amostras positivas: 15-ADON, NIV, NEO, DAS, T-2, STER, OTA, AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂, ENA, ENA₁, ENB₁ e BEA.

²Limite de quantificação.

³Micotoxinas analisadas com 0% das amostras positivas: AFB₁, NEO, DAS, 15-ADON, 3-ADON, T-2, ZEA, α -ZOL e ENA.

⁴Micotoxinas analisadas com 0% das amostras positivas: AFB₁, AFB₂, AFG₁, 3-ADON, 15-ADON, FUS-X, DOM-1, NEO, DAS, HT-2, T-2, FB₃ e α -ZOL.

Fonte: Própria autoria.

2.5 Avaliação da exposição e caracterização de risco de micotoxinas na dieta de bebês e crianças pequenas

No presente estudo, foram realizadas avaliações da exposição e da caracterização de risco de micotoxinas na dieta devido à ingestão destes compostos por bebês, baseados em dados de ocorrência mundial de micotoxinas no leite materno, fórmulas infantis e produtos à base de cereais, e os resultados estão apresentados nos Quadros A1 e A2 do material complementar em anexo (WHO, 2002). Os valores de consumo de fórmulas infantis, produtos à base de frutas e produtos à base de cereais foram informados pelos fabricantes. Os valores de ingestão diária provável (IDP) foram calculados de acordo com ASSUNÇÃO et al. (2015), utilizando a ocorrência dos dados dos estudos descritos nas Tabelas A-B-C-D e F, e os dados de peso corporal foram descritos de acordo com os “Padrões de Crescimento” da WORLD HEALTH ORGANIZATION (2019). Os valores de IDP para AFM₁ através do leite materno variaram acentuadamente, entre 0,003 à 917 ng/kg de peso corporal/dia (Tabela A1), considerando-se as grandes variações na prevalência e concentrações da micotoxina em diferentes regiões do mundo. A IDP mais baixa para as aflatoxinas (Tabela A1) e outras micotoxinas (Tabela A2) foi observada no consumo de fórmulas infantis, produtos à base de frutas e cereais. Considerando o potencial carcinogênico das aflatoxinas, uma margem de exposição (MoE) foi calculada para

a exposição à esta toxina, como uma razão de limite inferior de confiança da dose de referência ($BMDL_{10}$) e o nível de exposição (IDP) (BENFORD; LEBLANC; SETZER, 2010). De acordo com esses critérios, vários valores de MoE gerados pelas taxas de exposição de bebês às aflatoxinas no leite materno e em fórmulas infantis em diferentes regiões foram menores que 10000 (Tabela A1), indicando, portanto, um grave problema de saúde pública (EFSA, 2013). A caracterização do risco para outras micotoxinas foi realizada comparando os valores de IDP com os valores de referência de dose de ingestão diária tolerável (IDT) para OTA (16 ng/kg p.c./ dia) (FAO/WHO, 2007), FB (2000 ng/kg pc/dia) (FAO/WHO, 2011) DON (1000 ng/kg pc/dia) (FAO/WHO, 2011), ZEA (250 ng/kg pc/dia) (EFSA, 2016) e PAT (400 ng/kg pc/dia) (OMS, 1995). As comparações foram realizadas utilizando o coeficiente de risco (HQ) entre a exposição e uma dose de referência), conforme descrito pelo EFSA (2013) e indicado no material complementar A1 e A2. Todos os valores de HQ obtidos foram < 1 (Tabela A2), o que indica níveis toleráveis de exposição (BORG et al., 2013; EFSA, 2013).

2.6 Desafios e implicações de múltiplas micotoxinas em alimentos para bebês

Embora a co-ocorrência de vários tipos de micotoxinas em alimentos tenha sido relatada com frequência (SMITH et al., 2016), há poucas informações disponíveis sobre a exposição de crianças às múltiplas micotoxinas na dieta. Recentemente, estudos relataram a contaminação por micotoxinas (MARTINS et al., 2018) e a exposição (ASSUNÇÃO et al., 2018) de crianças às múltiplas micotoxinas através do consumo de alimentos à base de cereais. A principal preocupação em relação à exposição às múltiplas micotoxinas é a possibilidade de riscos adicionais à saúde devido aos efeitos sinérgicos de suas combinações (ALASSANE-KPEMBI et al., 2017; POSE-JUAN; FERNÁNDEZ-CRUZ; SIMAL-GÁNDARA, 2016; SMITH et al., 2016). Bebês e crianças pequenas exibem um rápido desenvolvimento dos sistemas orgânicos, resultando em uma maior sensibilidade aos compostos tóxicos, quando comparados com os adultos (FELTER et al., 2015). No entanto, a consequência da exposição de crianças às múltiplas micotoxinas está longe de ser bem caracterizada.

A proposta de quantificar a ocorrência simultânea de múltiplos contaminantes vai em direção do desenvolvimento de métodos multi-analitos que combinam um protocolo genérico de preparação de amostras com um método altamente seletivo, exibindo a capacidade de detecção suficiente, como o LC-MS/MS (MALACHOVÁ et al., 2014; TURNER et al., 2015). A aplicação de métodos em LC-MS/MS para determinação de múltiplas micotoxinas aumentou

visivelmente nos últimos anos, resultando em novos dados de prevalência de micotoxinas não regulamentadas em diversos produtos alimentícios, conforme os estudos relatados na Tabela 8. JUAN et al. (2014) investigaram a presença de 23 micotoxinas diferentes (NIV, FUS-X, ENs, BEA e metabólitos de ZEA) em 75 alimentos comerciais para lactentes na Itália, incluindo leite, produtos lácteos, alimentos à base de cereais, frutas e vegetais. As micotoxinas foram detectadas apenas em amostras de alimentos à base de cereais, e DON e FUS-X foram as micotoxinas mais encontradas. OUESLATI et al. (2018) investigaram a presença de 20 micotoxinas (incluindo ENs e metabólitos de DON) em 32 amostras de cereais e produtos à base de cereais na Tunísia, e observaram que 32% das amostras apresentaram co-ocorrência de pelo menos duas micotoxinas, com uma combinação de até seis micotoxinas diferentes nas amostras positivas. Recentemente, dois relatórios sobre cereais matinais consumidos por crianças portuguesas descreveram a presença de 22 combinações de micotoxinas, incluindo de dois a sete compostos diferentes (ASSUNÇÃO et al., 2015; MARTINS et al., 2018) (Tabela 8). Estes estudos revelaram que a exposição à AFB₁ constitui um provável risco à saúde, principalmente no percentual de consumos mais elevados (P90, P95 e P99) (ASSUNÇÃO et al., 2015). Um estudo mais recente realizado pelos mesmos autores, relacionado às crianças que consomem cereais matinais, cereais infantis e biscoitos (ASSUNÇÃO et al., 2018), revelou que 75% das amostras analisadas apresentaram co-contaminação com a AFB₁, constituindo um provável risco de ingestão igual ou superior à P50. Em resumo, dados recentes sobre a ocorrência de múltiplas micotoxinas em alimentos à base de cereais resulta em uma crescente preocupação com o potencial impacto dos efeitos combinados das micotoxinas na saúde das crianças.

2.7 Considerações finais

O leite materno é de grande importância como principal fonte nutricional para lactentes até 6 meses, embora também possa ser a primeira via de exposição às micotoxinas. Micotoxinas como AFM₁ e OTA foram relatados no leite humano, bem como em fórmulas infantis em diferentes concentrações globais, enquanto os níveis relatados em alguns países europeus, africanos e asiáticos indicaram altos níveis de exposição, o que pode potencialmente resultar em efeitos adversos à saúde dos bebês. Apesar da recomendação do aleitamento exclusivo para os bebês de 0 a 6 meses, a exposição precoce às micotoxinas pode ocorrer nesse período em circunstâncias em que são necessários substitutos do leite materno, como fórmulas para

lactentes. As taxas de exposição dos lactentes à AF no leite materno e em fórmulas infantis geraram uma margem de valores de exposição inferiores à 10000, indicando um grande problema de saúde pública. Além disso, a possibilidade de maiores taxas de exposição de bebês às micotoxinas no momento da introdução de produtos à base de frutas e cereais em sua dieta foi demonstrada pelos dados de prevalência de micotoxinas únicas ou múltiplas. Mais estudos são necessários para avaliar o risco à saúde humana devido à exposição alimentar às múltiplas micotoxinas em alimentos destinados à lactentes, incluindo compostos não regulamentados. Além disso, a exposição às múltiplas micotoxinas em baixas concentrações deve ser avaliada no contexto do paradigma exposto, considerando que um grande conjunto estudos de exposições à saúde humana está aumentando, já que na vida cotidiana a população humana está exposta a vários fatores de exposição.

Agradecimentos

Os autores gostariam de agradecer à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa (Grant #2017/12956- 2). A. S. Sant'Ana agradece o apoio financeiro do CNPq (Grant Nº 302763/2014-7, nº 305804/2017-0) e CAPES (código financeiro 01). Este trabalho também foi apoiado pelo Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, Projeto de Incentivo de Estudos de Biomonitorização Humana de Âmbito Nacional | BioMAN [BioMAN / DAN / 01] e CESAM, através da Fundação para a Ciência e a Tecnologia [UID/AMB/50017/2013], fundos nacionais e co-financiamento pelo FEDER [POCI-01-0145-FEDER-00763], dentro da Parceria PT2020.

Referências

ABRUNHOSA, L. et al. A Review of Mycotoxins in Food and Feed Products in Portugal and Estimation of Probable Daily Intakes. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v. 56, n. 2, p. 249–265, 2016.

ADEJUMO, O. et al. Correlation between aflatoxin M₁ content of breast milk, dietary exposure to aflatoxin B₁ and socioeconomic status of lactating mothers in Ogun State, Nigeria. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 56, p. 171–177, 2013.

AFSHAR, P.; SHOKRZADEH, M.; KALHORI, S.; BABAEI, Z.; SARAVI, S. S. Prevalence of ochratoxin A and aflatoxin M₁ in human breast milk in Sari, Iran. **Food Control**, Kidlington, v. 31, p. 525–529, 2013.

ALASSANE-KPEMBI, I. et al. Mycotoxins co-contamination: Methodological aspects and biological relevance of combined toxicity studies. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, New York, v. 57, n. 16, p. 3489–3507, 2017.

AL-HAZMI, N. A. Determination of Patulin and Ochratoxin A using HPLC in apple juice samples in Saudi Arabia. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 17, n. 4, p. 353–359, 2010.

AL-TAHER, F. et al. Detection and quantitation of mycotoxins in infant cereals in the U.S. market by LC-MS/MS using a stable isotope dilution assay. **Food Control**, Kidlington, v. 72, p. 27–35, 2017.

ALTUN, S. K., GÜRBÜZ, S., & AYAĞ, E. Aflatoxin M₁ in human breast milk in southeastern Turkey. **Mycotoxin Research**, Heidelberg, v. 3, p.103–107, 2017.

ALVITO, P. C. et al. Occurrence of aflatoxins and ochratoxin A in baby foods in Portugal. **Food Analytical Methods**, New York, v. 3, n. 1, p. 22–30, 2010.

AMIRAHMADI, M.; SHOEIBI, S.; RASTEGAR, H.; ELMI, M.; MOUSAVI KHANEGHAH, A. Simultaneous analysis of mycotoxins in corn flour using LC/MS-MS combined with a modified QuEChERS procedure. **Toxin Reviews**, Philadelphia, v. 37, p. 187–195, 2017.

ANDRADE, P. D.; SILVA, J. L. G.; CALDAS, E. D. Simultaneous analysis of aflatoxins B₁, B₂, G₁, G₂, M₁ and ochratoxin A in breast milk by high-performance liquid chromatography/fluorescence after liquid-liquid extraction with low temperature purification (LLE-LTP). **Journal of Chromatography A**, New York, v. 1304, p. 61–68, 2013.

ANTHONY, M. H.; OJOCHENEMI, A. D.; MULUNDA, M. Aflatoxin M₁ in Breast Milk, Cow Milk and Milk Products in Minna, Nigeria and their Predisposing Factors. **Biochemistry & Analytical Biochemistry**, v. 05, n. 04, p. 1-6, 2016.

ANUKUL, N.; VANGNAI, K.; MAHAKARNCHANDKUL, W. Significance of regulation limits in mycotoxin contamination in Asia and risk management programs at the national level. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 21, n. 3, p. 227–241, 2013.

ASSUNÇÃO, R. et al. Single-compound and cumulative risk assessment of mycotoxins present in breakfast cereals consumed by children from Lisbon region, Portugal. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 86, p. 274–281, 2015.

ASSUNÇÃO, R.; SILVA, M. J.; ALVITO, P. Challenges in risk assessment of multiple mycotoxins in food. **World Mycotoxin Journal**, Wageningen, v. 9, p. 791–811, 2016a.

ASSUNÇÃO, R. et al. Characterization of in vitro effects of patulin on intestinal epithelial and immune cells. **Toxicology Letters**, Shannon, v. 250-251, p. 47–56, 2016b.

ASSUNÇÃO, R. et al. Portuguese children dietary exposure to multiple mycotoxins – An overview of risk assessment under MYCOMIX project. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 118, p. 399–408, 2018.

ATASEVER, M. et al. Assessment of aflatoxin M₁ in maternal breast milk in Eastern Turkey. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 66, p. 147–149, 2014.

AZARIKIA, M.; MAHDAVI, R.; NIKNIAZ, L. Occurrence and dietary factors associated with the presence of aflatoxin B₁ and M₁ in breast milk of nursing mothers in Iran. **Food Control**, Kidlington, v. 86, p. 207–213, 2018.

BARREIRA, M. J.; ALVITO, P. C.; ALMEIDA, C. M. M. Occurrence of patulin in apple-based-foods in Portugal. **Food Chemistry**, Washington, v. 121, n. 3, p. 653–658, 2010.

BATTACONE, G. et al. The transfer of aflatoxin M₁ in milk of ewes fed diet naturally contaminated by aflatoxins and effect of inclusion of dried yeast culture in the diet. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 92, n. 10, p. 4997–5004, 2009.

BENNETT, J. W.; KLICH, M. Mycotoxins. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 16, p. 497–516, 2003.

BENFORD, D.; LEBLANC, J. C.; SETZER, R. W. Application of the margin of exposure (MoE) approach to substances in food that are genotoxic and carcinogenic. Example: Aflatoxin B₁ (AFB₁). **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 48, n. 1, p. 34–41, 2010.

BIASUCCI, G. et al. The presence of ochratoxin A in cord serum and in human milk and its correspondence with maternal dietary habits. **European Journal of Nutrition**, Heidelberg, v. 50, n. 3, p. 211–218, 2011.

BOGALHO, F. et al. Exposure assessment of Portuguese infants to Aflatoxin M₁ in breast milk and maternal social-demographical and food consumption determinants. **Food Control**, Kidlington v. 90, p. 140–145, 2018.

BORG, D. et al. Cumulative health risk assessment of 17 perfluoroalkylated and polyfluoroalkylated substances (PFASs) in the Swedish population. **Environment International**, New York, v. 59, p. 112–123, 2013.

BORUTOVA, R. et al. Co-occurrence and statistical correlations between mycotoxins in feedstuffs collected in the Asia-Oceania in 2010. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 178, n. 3–4, p. 190–197, 2012.

BOUÉ, G. et al. Development and Application of a Probabilistic Risk–Benefit Assessment Model for Infant Feeding Integrating Microbiological, Nutritional, and Chemical Components. **Risk Analysis**, New York, v. 37, n. 12, p. 2360–2388, 2017.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC 07/2011**, de 22 de fevereiro de 2011 da ANVISA. Estabelece limites para micotoxinas em alimentos, principalmente em grãos. Portal da Anvisa de 22 de fevereiro de 2011.

BRAUN, D. et al. Monitoring early-life mycotoxin exposures via LC-MS/MS breast milk analysis. **Analytical Chemistry**, Amsterdam, v. 90, n. 24, p. 14569–14577, 2018.

BRYDEN, W. L. Mycotoxins in the food chain: human health implications. **Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition**, London, v. 16, n. 1, p. 95-101, 2007.

CAMPAGNOLLO, F. B. et al. The occurrence and effect of unit operations for dairy products processing on the fate of aflatoxin M₁: a review. **Food Control**, Kidlington, v. 68, p. 310-329, 2016.

CANO-SANCHO, G. et al. Survey of patulin occurrence in apple juice and apple products in Catalonia, Spain, and an estimate of dietary intake. **Food Additives and Contaminants: Part B Surveillance**, v. 2, n. 1, p. 59–65, 2009.

CANTÚ-CORNELIO, F. et al. Occurrence and factors associated with the presence of aflatoxin M₁ in breast milk samples of nursing mothers in central Mexico. **Food Control**, Kidlington, v. 62, p. 16–22, 2016.

CHERKANI-HASSANI, A.; MOJEMMI, B.; MOUANE, N. Occurrence and levels of mycotoxins and their metabolites in human breast milk associated to dietary habits and other factors: A systematic literature review, 1984–2015. **Trends in Food Science & Technology**, Cambridge, v. 50, n. 50, p. 56–69, 2016.

CLARK, H. A.; SNEDEKER, S. M. Ochratoxin A: Its cancer risk and potential for exposure. **Journal of Toxicology and Environmental Health - Part B: Critical Reviews**, v. 9, n. 3, p. 265–296, 2006.

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ. **Normas técnicas Rede BLH-BR para bancos de leite humano: pasteurização de leite humano ordenhado- BLH-IFF/NT- 34.05**. Disponível em <<http://www.fiocruz.br/redeblh/media/pasteuriza.pdf>>. Acesso em: 12 fev. 2011. In: TONON, K. M. **Avaliação da micoflora contaminante e micotoxinas em leite humano e alimentos infantis para lactentes e crianças de primeira infância por LC-MS/MS**. 2013. 129p. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal de Santa Catarina, 2013.

DAROUJ, E.; MASSOUH, L.; GHANEM, I. Investigation of ochratoxin A in Syrian consumed baby foods. **Food Control**, Kidlington, v. 62, p. 97–103, 2016.

DE RUYCK, K. et al. Dietary mycotoxins, co-exposure, and carcinogenesis in humans: Short review. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 766, p. 32–41, 2015.

DE SANTIS, B. et al. Role of mycotoxins in the pathobiology of autism: A first evidence. **Nutritional Neuroscience**, Amsterdam, v. 22, n. 2, p. 132–144, 2019.

DEHGHAN, P. et al. Prevalence of ochratoxin A in human milk in the Khorrambid Town, Fars Province, south of Iran. **Jundishapur Journal of Microbiology**, v. 7, n. 7, p. 1–4, 2014.

DIAZ, G. J.; SÁNCHEZ, M. P. Determination of aflatoxin M₁ in breast milk as a biomarker of maternal and infant exposure in Colombia. **Food Additives & Contaminants: Part A**, Abingdon, v. 32, n. 7, p. 1192–1198, 2015.

DINLEYICI, M. et al. Human mature milk zearalenone and deoxynivalenol levels in Turkey. **Neuroendocrinology Letters**, Weinheim, v. 39, n. 4, p. 325–330, 2018.

DOSTAL, A. et al. Results of the first studies of occurrence of ochratoxin A in human milk in Slovakia. **Bratislava Medical Journal**, v. 109, n. 6, p. 276–278, 2008.

EALEGBE, S. D. et al. Assessing aflatoxin M₁ levels among lactating mothers' in Damaturu Yobe state, Nigeria. **Bayero Journal of Pure and Applied Sciences: Special Conference Edition**, v. 10, n. 1, p. 198–203, 2017.

ELARIDI, J. et al. Analysis of aflatoxin M₁ in breast milk and its association with nutritional and socioeconomic status of lactating mothers in Lebanon. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 80, n. 10, p. 1737–1741, 2017.

EL-TRAS, W. F.; EL-KADY, N. N.; TAYEL, A. A. Kan. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 49, n. 11, p. 2816–2819, 2011.

ELZUPIR, A. O. et al. Aflatoxin M₁ in breast milk of nursing Sudanese mothers. **Mycotoxin Research**, Heidelberg, v. 28, n. 2, p. 131–134, 2012.

ETZEL, R. A. What the Primary Care Pediatrician Should Know about Syndromes Associated with Exposures to Mycotoxins. **Current Problems in Pediatric and Adolescent Health Care**, Orlando, v. 36, n. 8, p. 282–305, 2006.

EUROPEAN COMMISSION, & REGULATION, L. (EC) .Setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. **Official Journal of European Communities**, L364, n. 1881, p. 5–24, 2006. Disponível em: <https://www.fsai.ie/uploadedFiles/Consol_Reg1881_2006.pdf> Acesso em: 20 Maio 2017.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA). Opinion of the scientific panel on contaminants in the food chain on a request from the commission related to ochratoxin A in food. **EFSA Journal**, v. 365, p. 1–56, 2006. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.2903/j.efsa.2006.365/epdf>> Acesso em: 22 Maio 2017.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA). Scientific Opinion on the risks for public health related to the presence of zearalenone in food. **EFSA Journal**, v. 9, p. 2197, 2011.

FAKHRI, Y. et al. Concentration and prevalence of aflatoxin M₁ in human breast milk in Iran: Systematic review, meta-analysis, and carcinogenic risk assessment: A review. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 82, n. 5, p. 785–795, 2019a.

FAKHRI, Y. et al. Aflatoxin M₁ in human breast milk: A global systematic review, meta-analysis, and risk assessment study (Monte Carlo simulation). **Trends in Food Science and Technology**, Cambridge, v. 88, p. 333–342, 2019b.

FELTER, S. P. et al. Assessment of health risks resulting from early-life exposures: Are current chemical toxicity testing protocols and risk assessment methods adequate? **Critical Reviews in Toxicology**, Boca Raton, v. 45, n. 3, p. 219–244, 2015.

- FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Chemical contaminants, metals, natural toxins & pesticides guidance documents & regulations. U.S. **Food and Drug Administration**. Disponível em: <<https://www.fda.gov/Food/GuidanceRegulation/GuidanceDocumentsRegulatoryInformation/ChemicalContaminantsMetalsNaturalToxinsPesticides/default.htm>> Acesso em: 25 Maio 2018.
- GALVANO, F. et al. Maternal dietary habits and mycotoxin occurrence in human mature milk. **Molecular Nutrition and Food Research**, Weinheim, v. 52, n. 4, p. 496–501, 2008.
- GAO, X. et al. Gestational zearalenone exposure causes reproductive and developmental toxicity in pregnant rats and female offspring. **Toxins**, Basel, v. 9, n. 1, 2017.
- GHIASIAN, S.; MAGHSOOD, A. Infants' Exposure to Aflatoxin M₁ from Mother's Breast Milk in Iran. **Iranian journal of public health**, v. 41, n. 3, p. 119–26, 2012.
- GÜRBAY, A. et al. Ochratoxin A: Is it present in human breast milk samples obtained mothers from Ankara, Turkey. **Toxicology Letters**, v. 189, p. S232, 2009.
- GÜRBAY, A. et al. Exposure of newborns to aflatoxin M₁ and B₁ from mothers' breast milk in Ankara, Turkey. **Food and Chemical Toxicology**, Shannon, v. 48, n. 1, p. 314–319, 2010.
- HAMMAMI, W. et al. Patulin and patulin producing *Penicillium spp.* Occurrence in apples and apple-based products including baby food. **Journal of Infection in Developing Countries**, v. 11, n. 4, p. 343–349, 2017.
- HARDY, A. et al. Guidance on the risk assessment of substances present in food intended for infants below 16 weeks of age. **EFSA Journal**, v. 15, n. 5, 2017.
- HASSAN, A. M. et al. Does aflatoxin as an environmental mycotoxin adversely affect the renal and hepatic functions of Egyptian lactating mothers and their infants? A preliminary report. **International Urology and Nephrology**, Budapest, v. 38, n. 2, p. 339–342, 2006a.
- HASSAN, A. M. et al. Study of ochratoxin A as an environmental risk that causes renal injury in breast-fed Egyptian infants. **Pediatric Nephrology**, Berlin, v. 21, n. 1, p. 102–105, 2006b.
- HEALTH CANADA; BUREAU, F. D. **Of chemical safety, health products and food branch. Information document on health Canada's proposed maximum limits (standards) for the presence of the mycotoxin ochratoxin A in foods**, 2009. Disponível em: <https://www.canada.ca/content/dam/hc-sc/migration/hc-sc/fn-an/alt_formats/hpfb-dgpsa/pdf/consultation/myco_consult_ochra-eng.pdf> Acesso em: 22 Maio 2018.
- HEALTH CANADA. **Canadian standards (maximum levels) for various chemical contaminants in foods**, 2012. Disponível em: <<file:///D:/Documentos/Downloads/2012,%20HC.pdf>> Acesso em: 20 Maio 2018.
- HERNÁNDEZ-MARTÍNEZ, R.; NAVARRO-BLASCO, I. Aflatoxin levels and exposure assessment of spanish infant cereals. **Food Additives and Contaminants: Part B Surveillance**, Abingdon, v. 3, n. 4, p. 275–288, 2010.

HESHMATI, A. et al. Co-prevalence of aflatoxins and ochratoxin A in dried fruits in Iran: Dietary exposure risk assessment. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 106, p. 202–208, 2017.

HESHMATI, A. et al. Changes in aflatoxins content during processing of pekmez as a traditional product of grape. **LWT**, v. 103, p. 178–185, 2019.

HIGGINS, J. P. T., G. S. (Ed.). **Cochrane handbook for conducting systematic reviews**. The Cochrane Collaboration, 2011. <http://handbook.cochrane.org/>

IHA, M. H.; BARBOSA, C. B.; HECK, A. R.; TRUCKSESS, M. W. Aflatoxin M₁ and ochratoxin A in human milk in Ribeirao Preto-SP, Brazil. **Food Control**, Kidlington, v. 40, p. 310–313, 2014.

ISHIKAWA, A. T. et al. Exposure assessment of infants to aflatoxin M₁ through consumption of breast milk and infant powdered milk in Brazil. **Toxins**, Basel, v. 8, n. 9, 2016.

ITO, S.; LEE, A. Drug excretion into breast milk: an overview. **Advanced drug delivery reviews**, Amsterdam, v. 55, n. 5, p. 617–627, 2003.

JAFARI, T. et al. Aflatoxin M₁ in human breast milk in Shahrekord, Iran and association with dietary factors. **Food Additives and Contaminants: Part B Surveillance**, Abingdon, v. 10, n. 2, p. 128–136, 2017.

JAFARIAN-DEHKORDI, A.; POURRADI, N. Aflatoxin M₁ contamination of human breast milk in Isfahan, Iran. **Advanced biomedical research**, v. 2, n. 4, p. 86, 2013.

JOINT FAO/WHO EXPERT COMMITTEE ON FOOD ADDITIVES. **Safety evaluation of certain mycotoxins in food**. Rome: WHO, 2001.

JONKER, J. W. et al. The breast cancer resistance protein BCRP (ABCG2) concentrates drugs and carcinogenic xenotoxins into milk. **Nature Medicine**, New York, v. 11, n. 2, p. 127–129, 2005.

JONSYN, F. E.; MAXWELL, S. M.; HENDRICKSE, R. G. Ochratoxin A and aflatoxins in breast milk samples from Sierra Leone. **Mycopathologia**, Den Haag, v. 131, n. 2, p. 121–126, 1995.

JUAN, C. et al. Presence of mycotoxin in commercial infant formulas and baby foods from Italian market. **Food Control**, Kidlington, v. 39, n. 1, p. 227–236, 2014.

KABAK, B. Aflatoxin M₁ and ochratoxin A in baby formulae in Turkey: Occurrence and safety evaluation. **Food Control**, Kidlington, v. 26, n. 1, p. 182–187, 2012.

KAMALI, A. et al. Detection of ochratoxin A in human breast milk in Jiroft city, south of Iran. **Current Medical Mycology**, v. 3, n. 3, p. 1–4, 2017.

- KANG'ETHE, E. K. et al. Exposure of Kenyan population to aflatoxins in foods with special reference to Nandi and Makueni counties. **Food Quality and Safety**, v. 1, n. 2, p. 131–137, 2017.
- KESKIN, Y. et al. Detection of aflatoxin M₁ in human breast milk and raw cow's milk in Istanbul, Turkey. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 72, n. 4, p. 885–889, 2009.
- KHAN, S. et al. Concentration of Aflatoxin M₁ and selected heavy metals in mother milk samples from Pakistan. **Food Control**, Kidlington, v. 91, p. 344–348, 2018.
- KHANEHGAH, A. M. et al. Prevalence and concentration of ochratoxin a, zearalenone, deoxynivalenol and total aflatoxin in cereal-based products: A systematic review and meta-analysis. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 118, p. 830–848, 2018a.
- KHANEHGAH, A. M. et al. Impact of unit operations during processing of cereal-based products on the levels of deoxynivalenol, total aflatoxin, ochratoxin a, and zearalenone: A systematic review and meta-analysis. **Food Chemistry**, Washington, v. 268, p. 611–624, 2018b.
- KHANEHGAH, A. M. et al. Deoxynivalenol and its masked forms: Characteristics, incidence, control and fate during wheat and wheat based products processing - A review. **Trends in Food Science and Technology**, Cambridge, v. 71, p. 13–24, 2018c.
- KOLAKOWSKI, B. et al. Ochratoxin A concentrations in a variety of grain-based and non-grain-based foods on the canadian retail market from 2009 to 2014. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 79, n. 12, p. 2143-2159, 2016.
- KOS, J. et al. Occurrence and estimation of aflatoxin M₁ exposure in milk in Serbia. **Food Control**, Kidlington, v. 38, n. 1, p. 41–46, 2014.
- KUIPER-GOODMAN, T. Risk assessment and risk management of mycotoxins in Food. In: Mogan, N.; Olsen, M. (Ed.) **Mycotoxins in food, detection and control**. New York: CRC Press; Cambridge: Wood head Publishing Limited. 2004. pp. 3-31.
- KUNTER, İ. et al. Assessment of Aflatoxin M₁ and Heavy Metal Levels in Mothers Breast Milk in Famagusta, Cyprus. **Biological Trace Element Research**, Clifton, v. 175, n. 1, p. 42–49, 2017.
- LANDRIGAN, P. J. et al. Chemical contaminants in breast milk and their impacts on children's health: An overview. **Environmental Health Perspectives**, Research Triangle Park, v. 110, n. 6, 2002.
- LOMBARD, M. J. Mycotoxin exposure and infant and young child growth in Africa: what do we know? **Annals of Nutrition & Metabolism**, v. 64, n. 2, p. 42-52, 2014.
- MAGOHA, H. et al. Association between aflatoxin M₁ exposure through breast milk and growth impairment in infants from Northern Tanzania. **World Mycotoxin Journal**, Wagenigen, v. 7, n. 3, p. 277–284, 2014a.

MAGOHA, H. et al. Fumonisin B₁ contamination in breast milk and its exposure in infants under 6 months of age in Rombo, Northern Tanzania. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 74, p. 112–116, 2014b.

MAHDAVI, R. et al. Determination of aflatoxin M₁ in breast milk samples in Tabriz-Iran. **Maternal and Child Health Journal**, New York, v. 14, n. 1, p. 141–145, 2010.

MAHDAVI, R.; AZARIKIA, M.; NIKNIAZ, L. Prevalence and dietary factors associated with the presence of aflatoxin B₁ and M₁ in breast milk of nursing mothers in Iran. **Food Control**, Kidlington, v. 86, p. 207–213, 2017.

MAHMOOD FASHANDI, H.; ABBASI, R.; MOUSAVI KHANEGHAH, A. The detoxification of aflatoxin M₁ by *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium spp.*: A review. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 42, p. 1-10, 2018.

MAHNINE, N. et al. Occurrence of fumonisins B₁, B₂ and B₃ in breakfast and infant cereals from Morocco. **Phytopathologia Mediterranea**, v. 51, n. 1, p. 193–197, 2012.

MAJEED, M. et al. Assessment of Ochratoxin A in Commercial Corn and Wheat Products. **Nutrition & Food Science**, v. 14, n. 2, p. 1–5, 2017.

MALACHOVÁ, A. et al. Optimization and validation of a quantitative liquid chromatography-tandem mass spectrometric method covering 295 bacterial and fungal metabolites including all regulated mycotoxins in four model food matrices. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1362, p. 145–156, 2014.

MALEKI, F. et al. Exposure of Infants to Aflatoxin M₁ from Mother's Breast Milk in Ilam, Western Iran. **Osong Public Health and Research Perspectives**, Seoul, v. 6, n. 5, p. 283–287, 2015.

MALIR, F. et al. Ochratoxin A: 50 years of research. **Toxins**, Basel, v. 8, P. 1-49, 2016.

MARESCA, M. From the gut to the brain: Journey and pathophysiological effects of the food-associated trichothecene mycotoxin deoxynivalenol. **Toxins**, Basel, v. 5, p. 784-820, 2013.

MARÍN, S. et al. Patulin contamination in fruit derivatives, including baby food, from the Spanish market. **Food Chemistry**, Washington, v. 124, n. 2, p. 563–568, 2011.

MARTINS, C. et al. Assessment of multiple mycotoxins in breakfast cereals available in the Portuguese market. **Food Chemistry**, Washington, v. 239, p. 132–140, 2018.

MEUCCI, V. et al. Mycotoxin detection in infant formula milks in Italy. **Food Additives & Contaminants: Part A**, Abingdon, v. 27, n. 1, p. 64–71, 2010.

MILIĆEVIĆ, D. R.; ŠKRINJAR, M.; BALTIĆ, T. Real and perceived risks for mycotoxin contamination in foods and feeds: Challenges for food safety control. **Toxins**, Basel, v. 2, n. 4, p. 572-592, 2010.

- MONTAGNE, D. H.; VAN DAEL, P.; SKANDERBY, M.; HUGELSHOFER, W. **Infant formulae –powders and liquids**. Chichester, West Sussex, UK: Blackwell Publishing, 2009.
- MOTTAGHIANPOUR, E.; NAZARI, F.; MEHRASBIA, M. R.; HOSSEINIC, M. R. Prevalence of aflatoxin B₁ in baby foods marketed in Iran. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Oxford, v. 97, p. 2690–2694, 2017.
- MOUSAVI KHANEGHAH, A.; EŞ, I.; RAEISI, S.; FAKHRI, Y. Aflatoxins in cereals: State of the art. **Journal of Food Safety**, v. 38, p. 1-7, 2018.
- MUÑOZ, K. et al. Exposure of neonates to ochratoxin A: First biomonitoring results in human milk (colostrum) from Chile. **Mycotoxin Research**, Heidelberg, v. 26, n. 2, p. 59–67, 2010.
- MUÑOZ, K. et al. Exposure of infants to ochratoxin A with breast milk. **Archives of Toxicology**, New York, v. 88, n. 3, p. 837–846, 2014.
- MURPHY, P. A.; HENDRICH, S.; LANDGREN, C.; BRYANT, C. M. Food mycotoxins: An update. **Journal of Food Science**, Champaign, v. 71, p. 51–65, 2006.
- OK, H. E. et al. HPLC and UPLC methods for the determination of zearalenone in noodles, cereal snacks and infant formula. **Food Chemistry**, Washington, v. 163, p. 252–257, 2014.
- OLUWAFEMI, F. T. Aflatoxin M₁ levels in lactating mothers in two Nigerian cities. **Archives of Clinical Microbiology**, v. 3, n. 4, 2012.
- OMAR, S. S. Incidence of aflatoxin M₁ in human and animal milk in Jordan. **Journal of Toxicology and Environmental Health - Part A**, Washington, v. 75, p. 22-23, 2012.
- ORTIZ, J. et al. Multiple mycotoxin exposure of infants and young children via breastfeeding and complementary/weaning foods consumption in Ecuadorian highlands. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 118, p. 541–548, 2018.
- OSTRY, V. et al. Mycotoxins as human carcinogens—the IARC Monographs classification. **Mycotoxin Research**, Heidelberg, v. 33, n. 1, p. 65–73, 2017.
- OTEIZA, J. M. et al. Influence of production on the presence of patulin and ochratoxin A in fruit juices and wines of Argentina. **LWT - Food Science and Technology**, London, v. 80, p. 200–207, 2017.
- OUESLATI, S. et al. Presence of mycotoxins in Tunisian infant foods samples and subsequent risk assessment. **Food Control**, Kidlington, v. 84, p. 362–369, 2018.
- OZDEN, S.; AKDENIZ, A. S.; ALPERTUNGA, B. Occurrence of ochratoxin A in cereal-derived food products commonly consumed in Turkey. **Food Control**, Kidlington, v. 25, n. 1, p. 69–74, 2012.
- PESTKA, J. Deoxynivalenol: mechanisms of action, human exposure, and toxicological relevance. **Archives of Toxicology**, New York, v. 84, p. 663-679, 2010a.

POLYCHRONAKI, N. et al. A longitudinal assessment of aflatoxin M₁ excretion in breast milk of selected Egyptian mothers. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 45, n. 7, p. 1210–1215, 2007.

POSE-JUAN, E.; FERNÁNDEZ-CRUZ, T.; SIMAL-GÁNDARA, J. State of the art on public risk assessment of combined human exposure to multiple chemical contaminants. **Trends in Food Science and Technology**, Cambridge, v. 55, p. 11-28, 2016.

PUEL, O.; GALTIER, P.; OSWALD, I. P. Biosynthesis and toxicological effects of patulin. **Toxins**, Basel, v. 2., n. 4, p. 613-631, 2010.

QADIR, A. F.; ALI, M. M. Aflatoxin M₁ Contamination in Some Mothers Breast Milk in the City of Erbil. **Journal of Zankoy Sulaimani**, v. 16, p. 281-286, 2014.

RADONIĆ, J. R. et al. Occurrence of aflatoxin M₁ in human milk samples in Vojvodina, Serbia: Estimation of average daily intake by babies. **Journal of Environmental Science and Health - Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes**, New York, v. 52, n. 1, p. 59–63, 2017.

RAFIEL, H. et al. The concentration of aflatoxin M₁ in the mothers' milk in Khorrambid City, Fars, Iran. **Advanced Biomedical Research**, v. 3, p. 152, 2014.

RAHMANI, J. et al. The prevalence of aflatoxin M₁ in milk of Middle East region: A systematic review, meta-analysis and probabilistic health risk assessment. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 118, p. 653–666, 2018.

RAIOLA, A. et al. Risk analysis of main mycotoxins occurring in food for children: An overview. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 84, p. 169–180, 2015.

RASTEGAR, H. et al. Removal of aflatoxin B₁ by roasting with lemon juice and/or citric acid in contaminated pistachio nuts. **Food Control**, Kidlington, v. 71, p. 279–284, 2017.

RUBERT, J. et al. Evaluation of mycotoxins and their metabolites in human breast milk using liquid chromatography coupled to high resolution mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 820, p. 39–46, 2014.

RUBERT, J.; SOLER, C.; MAÑES, J. Application of an HPLC-MS/MS method for mycotoxin analysis in commercial baby foods. **Food Chemistry**, Washington, v. 133, n. 1, p. 176–183, 2012.

SADEGHI, N. et al. Incidence of aflatoxin M₁ in human breast milk in Tehran, Iran. **Food Control**, Kidlington, v. 20, n. 1, p. 75–78, 2009.

SCHOEVEERS, E. J. et al. Transgenerational toxicity of Zearalenone in pigs. **Reproductive Toxicology**, Hoboken, v. 34, n. 1, p. 110–119, 2012.

SHERIF, S. O.; SALAMA, E. E.; ABDEL-WAHHAB, M. A. Mycotoxins and child health: The need for health risk assessment International. **Journal of Hygiene and Environmental Health**, Germany, v. 212, n. 4, p. 347-368, 2009.

- SHUIB, N. S. et al. Natural occurrence of aflatoxin M₁ in fresh cow milk and human milk in Penang, Malaysia. **Food Control**, Kidlington, v. 73, p. 966–970, 2017.
- SILVA, R. C. et al. Composição centesimal do leite humano e caracterização das propriedades físico-químicas de sua gordura. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, p. 1535–1538, 2007.
- SKAUG, M. A. et al. Presence of ochratoxin A in human milk in relation to dietary intake. **Food Additives and Contaminants**, Abingdon, v. 18, n. 4, p. 321–327, 2001.
- SMITH, L. E.; STOLTZFUS, R. J.; PRENDERGAST, A. Food Chain Mycotoxin Exposure, Gut Health, and Impaired Growth: A Conceptual Framework. **Advances in Nutrition**, v. 3, n. 4, p. 526–531, 2012.
- SMITH, M. C. et al. Natural Co-occurrence of mycotoxins in foods and feeds and their in vitro combined toxicological effects. **Toxins**, Basel, v. 8, n. 4, p. 1-36, 2016.
- TCHANA, A. N.; MOUNDIPA, P. F.; TCHOUANGUEP, F. M. Aflatoxin contamination in food and body fluids in relation to malnutrition and cancer status in Cameroon. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 7, n. 1, p. 178–188, 2010.
- TOMERAK, R. H. et al. Assessment of exposure of Egyptian infants to aflatoxin M₁ through breast milk. **Journal of the Egyptian Public Health Association**, Cairo, v. 86, n. 3-4, p. 51–55, 2011.
- TONON, K. M. et al. Human milk AFM₁, OTA, and DON evaluation by liquid chromatography tandem mass spectrometry and their relation to the Southern Brazil nursing mothers' diet **Journal of Food Safety**, v. 38, p. e12452, 2018.
- TOROVIĆ, L. et al. Risk assessment of patulin intake through apple-based food by infants and preschool children in Serbia. **Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment**, Abingdon, v. 34, n. 11, p. 2023–2032, 2017.
- TURNER, N. W. et al. Analytical methods for determination of mycotoxins: An update (2009-2014). **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 901, p. 12-33, 2015.
- UYAR, B. B.; KARAATAOTLU, N.; GIRGIN, G.; GRBAY, A. K. Aflatoxin M₁ and ochratoxin A levels in breast milk in Ankara, Turkey. **FASEB Journal**, 28, 1017–1018.
- VAN HERWAARDEN, A. E.; SCHINKEL, A. H. The function of breast cancer resistance protein in epithelial barriers, stem cells and milk secretion of drugs and xenotoxins. **Trends in Pharmacological Sciences**, Amsterdam, v. 27, p. 10-16, 2006.
- WARE, L. Y. et al. Occurrence of mycotoxins in commercial infant formulas locally produced in Ouagadougou (Burkina Faso). **Food Control**, Kidlington, v. 73, p. 518–523, 2017.

WARTH, B. et al. Biomonitoring of Mycotoxins in Human Breast Milk: Current State and Future Perspectives. **Chemical Research in Toxicology**, Washington, v. 29, n. 7, p. 1087–1097, 2016.

WISEMAN, D. W. et al. Distribution and resistance to pasteurization of aflatoxin M₁ in naturally contaminated whole milk, cream and skim milk. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 46, n. 6, p. 530–532, 1983.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Evaluation of certain food additives and contaminants. Rome: World Health Organization. **WHO Technical Report Series**, v. 859, 1995. Disponível em:

<http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/37246/WHO_TRS_859.pdf;jsessionid=BC6E5DDA448360AF7383E4D1B085D9FB?sequence=1> Acesso em: 25 Jul

2018.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Evaluation of certain mycotoxins in food. Rome: World Health Organization. **WHO Technical Report Series**, v. 906, 2002.

Disponível em: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/42448/1/WHO_TRS_906.pdf>

Acesso em: 10 Jun 2017.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) **Infant and young child feeding**. Disponível em: <<https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/infant-and-young-child-feeding>>

Acesso em: 10 Jan 2018.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Child growth standards**. Disponível em:

<https://www.who.int/childgrowth/standards/weight_for_age_field/en/> Acesso em: 18 Jun 2019.

WU, F.; GROOPMAN, J. D.; PESTKA, J. J. Public Health Impacts of Foodborne Mycotoxins. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 5, n. 1, p. 351–372, 2014.

YUAN, Y. et al. Patulin content in apple products marketed in Northeast China. **Food Control**, Kidlington, v. 21, n. 11, p. 1488–1491, 2010.

ZARBA, A. et al. Aflatoxin M₁ in human breast milk from the Gambia, West Africa, quantified by combined monoclonal antibody immunoaffinity chromatography and HPLC. **Carcinogenesis**, Oxford, v. 13, n. 5, p. 891–894, 1992.

ZHANG, K., FLANNERY, B. M., OLES, C. J., & ANTHONY, A. Mycotoxins in infant/toddler foods and breakfast cereals in the U.S. retail market. **Food Additives and Contaminants: Part B**, Abingdon, v. 11, p. 183–190, 2018.

Material Suplementar A:**Tabela A1**

Avaliação da exposição e valores da margem de exposição de aflatoxinas na dieta de bebês (crianças com menos de 12 meses) e crianças jovens (> 12 meses), com base nos dados de ocorrência mundial das aflatoxinas M₁ e B₁ no leite materno, fórmula infantil e produtos à base de cereais.

Avaliação da exposição									
Tipo de alimento	Micotoxina	Idade (Meses)	Consumo (g/dia) ¹	Região do mundo	Nível de ocorrência (ng/kg)		Ingestão Diária Provável (ng/kg p.c./dia) ²	Margem de Exposição ³	
Leite materno	AFM ₁	1	568	África	Mín	0,02	Mín	0,003	96.831
					Máx	7.100	Máx	917	0,27*
			611	Ásia	Mín	0,6	Mín	0,083	3.001*
					Máx	67,8	Máx	9,41	27*
			699	América	Mín	0,5	Mín	0,08	3.147*
					Máx	45,0	Máx	7,15	35*
		854	Europa	Mín	3,0	Mín	0,58	429*	
				Máx	369,6	Máx	71,7	3*	
		568	África	Mín	0,02	Mín	0,001	167.254	
				Máx	7.100	Máx	531	0,47*	
		611	Ásia	Mín	0,6	Mín	0,048	5.183*	
				Máx	67,8	Máx	5,45	46*	
		699	América	Mín	0,5	Mín	0,046	5.436*	
				Máx	45,0	Máx	4,14	60*	
		854	Europa	Mín	3,0	Mín	0,34	742*	
				Máx	369,6	Máx	41,5	6*	
		< 1	85	América			0,47	531*	
		1 – < 6	125				0,40	633*	
		6 – 12	129			44,0	0,33	750*	
		> 12	113				0,26	974*	
		< 1	85		Mín	13,6	Mín	0,27	937*
Fórmula infantil	AFM ₁	< 1	85	Europa	Máx	18,0	Máx	0,35	708*
					Mín	13,6	Mín	0,22	1.117*
		1 – < 6	125		Máx	18,0	Máx	0,30	844*
					Mín	13,6	Mín	0,19	1.323*
		6 – 12	129		Máx	18,0	Máx	0,25	1.000*
					Mín	13,6	Mín	0,15	1.719*
		> 12	113						

Produtos à base de cereais	AFB ₁	43	6 – 12	Ásia	Máx	18,0	Máx	0,19	1.299*
					Mín	69,0	Mín	0,01	20.928
					Máx	140,0	Máx	0,01	23.869
								0,41	605*
						63		0,36	690*

¹ Consumo de leite materno de acordo com a "Adequação dos nutrientes do aleitamento materno exclusivo para o termo lactente durante os primeiros seis meses de vida" (Organização Mundial da Saúde, 2002).

² Os valores de ingestão diária provável (IDP) foram calculados de acordo com Assunção et al. (2015), utilizando os dados de ocorrência dos estudos descritos nas Tabelas 3, 6 e 8 do artigo e os dados de peso corporal descritos nos "Padrões de crescimento" da Organização Mundial da Saúde, disponíveis em https://www.who.int/childgrowth/standards/weight_for_age_field/en/.

³ A margem de exposição (MoE) foi calculada para as aflatoxinas, conforme descrito pela EFSA (2013). Os valores de MoE marcados com * (<10.000) indicam alta preocupação para a saúde pública.

AFB₁ - aflatoxina B₁. AFM₁ - Aflatoxina M₁.

	> 12						2,38	0,149
OTA	6 – 12	43	Europa	Mín	60,0	Mín	0,28	0,017
	> 12			Máx	140,0	Máx	0,64	0,040
				Mín	60,0	Mín	0,24	0,015
OTA NIV	> 12	43		Máx	140,0	Máx	0,56	0,035
	6 – 12				19,9		0,09	0,006
	> 12				140,0		0,08	0,005
DON	6 – 12	43	Europa		76,0		0,47	0,029
	> 12						0,41	0,026
HT-2	6 – 12	43			12,6		0,06	0,004
	> 12						0,05	0,003
PAT	6 – 12	43			75,0		0,01	0,001
	> 12						0,01	0,001

¹ Valores de consumo de fórmula infantil à base de frutas e à base de cereais, de acordo com as quantidades recomendadas, informadas pelos fabricantes.

² Os valores de ingestão diária provável (IDP) foram calculados de acordo com Assunção et al. (2015), utilizando os dados de ocorrência dos estudos descritos nas Tabelas 4, 6, 7 e 8 do artigo e os dados de peso corporal descritos nos “Padrões de Crescimento” da Organização Mundial da Saúde, disponíveis em https://www.who.int/childgrowth/standards/weight_for_age_field/en/.

³ O quociente de risco (HQ) foi calculado para cada micotoxina, exceto para as aflatoxinas, conforme descrito pela EFSA (2013). Os valores de referência da ingestão diária tolerável (IDT) foram 16 ng/kg p.c./dia para OTA (FAO/OMS, 2007), FBs (2.000 ng/kg p.c./dia para FB (FAO/OMS, 2011a), 1.000 ng/kg p.c./dia para DON (FAO/OMS 2011b), 250 ng/kg p.c./dia para ZEA (EFSA, 2016) e 400 ng/kg p.c./dia para PAT (WHO, 1995). Valores de HQ < 1 indicam níveis de exposição toleráveis. OTA – Ocratoxina A. PAT – Patulina. DON – Deoxinivalenol. HT-2 - Toxina HT-2. FB – Fumonisin. ZEA – Zearalenona. NIV – Nivalenol.

3 Capítulo 2: Avaliação da exposição alimentar e da caracterização de risco de mulheres lactantes às micotoxinas: Estudo de caso do Estado de São Paulo, Brasil

Carolina Fernanda S. C. Coppa

Universidade de São Paulo/ Departamento de Engenharia de Alimentos, Pirassununga, São Paulo, Brasil

E-mail: carolinacebin@usp.br

Amanda C. Cirelli^a, Bruna L. Gonçalves^a, Eliana Maria B. Barnabé^b, Amin M. Khaneghah^c, Carlos H. Corassin^a, Carlos A. F. Oliveiraa^a

^a Departamento de Engenharia de Alimentos, Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, São Paulo, Brasil

^b Unidade Materno Infantil, Centro de Especialidades Médicas de Pirassununga. Av. Antônio Joaquim Mendes, 1017, CEP 13634-502, Pirassununga, SP, Brazil

^c Departamento de Ciência dos Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade de Campinas (UNICAMP), Campinas, São Paulo, Brasil

E-mail: amanda.cirelli@usp.br, brunaleoneig@usp.br, elianabarnabe@bol.com.br, mousavi.amin@gmail.com, carloscorassin@usp.br, carlosaf@usp.br

Este artigo foi submetido na **Food Research International** (ISSN: 0963-9969)

Manuscrito recebido: 6 de Dezembro, 2019 (ANEXO F).

Resumo

Neste trabalho, foi avaliada a exposição e caracterização de risco de mulheres lactantes às aflatoxinas (AFs), fumonisinas (FBs), ocratoxina A (OTA) e zearalenona (ZEA) relacionada ao consumo de diferentes tipos de produtos alimentícios em Pirassununga, São Paulo, Brasil. As mulheres lactantes ($N = 74$) forneceram amostras de alimentos armazenados e disponíveis em suas residências entre abril de 2018 e agosto de 2019, totalizando 184 amostras. As micotoxinas foram determinadas em amostras de alimentos por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas. De acordo com os dados, 20% ($n = 36$) de todas as amostras de alimentos estavam contaminadas com AFs em concentrações medianas variando de 9,2 à 18,5 $\mu\text{g/kg}$, enquanto a OTA foi detectada apenas em três amostras (arroz, pão e macarrão) em concentrações de 22,3, 23,8 e 48,7 $\mu\text{g/kg}$, respectivamente. ZEA foi detectada em 34 amostras (18%) em níveis medianos de 62-195 $\mu\text{g/kg}$, e FBs em níveis medianos de 58-1546 $\mu\text{g/kg}$ em 22 amostras (12%). Além disso, as concentrações de AFs, OTA, ZEA e FBs excederam seus respectivos LMT em 11 (6%), 3 (2%), 8 (4%) e 5 (3%) amostras, respectivamente. Vinte e oito amostras (15%) foram contaminadas com dois ou três tipos de micotoxinas. Os produtos de milho contribuíram para as maiores doses médias diárias prováveis (IDP) de AFs ($0,119 \pm 0,193 \mu\text{g/kg p.c./dia}$), ZEA ($0,325 \pm 0,097 \mu\text{g/kg p.c./dia}$) e FBs ($2,936 \pm 1,541 \mu\text{g/kg p.c./dia}$), enquanto os produtos à base de trigo contribuíram para o maior valor de IDP para OTA ($0,035 \pm 0,028 \mu\text{g/kg p.c./dia}$). O valor da Margem de Exposição (MoE) para AFs (3,72) demonstrou alto risco de exposição (MoE <10000), e o Quociente de Risco (HQ) obtido para OTA (24,66), ZEA (4,24) e FBs totais (5,01) também indicou um risco não tolerável (HQ > 1) para essas micotoxinas através do consumo dos produtos alimentícios investigados. Os resultados deste estudo indicam altos níveis de exposição de mulheres lactantes às micotoxinas alimentares na área estudada, o que justifica preocupação com a possível transferência de micotoxinas residuais para o leite materno.

Palavras-chave: Micotoxinas; ocorrência; alimentos; avaliação de risco; análises em LC-MS/MS.

3.1 Introdução

Durante a produção e o armazenamento de produtos vegetais, alguns fungos podem produzir compostos conhecidos como micotoxinas (CARBALLO et al., 2019). As micotoxinas mais conhecidas e de importância em alimentos são as aflatoxinas (AFs), produzidas por espécies de *Aspergillus*, ocratoxina A (OTA), produzidas por *Aspergillus* e *Penicillium*, deoxinivalenol (DON), zearalenona (ZEN) e as fumonisinas (FBs)) (CARBALLO et al., 2019; CIGIĆ; PROSEN, 2009; MARIN et al., 2013; YANG et al., 2014). Quando ingeridas, estas toxinas podem acarretar em danos nos sistemas biológicos (EZEKIEL et al., 2019), como problemas no crescimento, supressão imunológica e câncer (PESTKA, 2010a, 2010b; TURNER, 2013; TURNER et al., 2007). Portanto, a exposição humana às micotoxinas em alimentos contaminados representa uma crescente preocupação para a saúde pública, considerando a variedade de efeitos tóxicos que podem levar à doenças crônicas e agudas (WILD; GONG, 2009). Entre as pessoas mais vulneráveis aos efeitos das micotoxinas, as mulheres grávidas e lactantes são consideradas grupos de alto risco devido à capacidade teratogênica de alguns desses compostos e à possível transferência de resíduos de micotoxinas para o leite materno, expondo ainda mais os bebês aos seus efeitos tóxicos (BIASUCCI et al., 2011; HASSAN et al., 2006a; JONSYN, 1999). A exposição dos lactentes à AFM₁ é uma situação muito preocupante porque esta micotoxina é cancerígena, de acordo com estudos disponíveis na literatura. Embora outras micotoxinas possam ser excretadas no leite, a exposição infantil às outras micotoxinas é mais provável que ocorra no momento da introdução de alimentos para bebês na dieta.

Considerando o alto risco associado ao consumo de alimentos contaminados por micotoxinas, vários países estabeleceram limites de tolerância para as principais micotoxinas em produtos alimentícios. Entre eles, os regulamentos correspondentes no Brasil foram revisados em 2011 para ajustar os níveis máximos permitidos (LMT) para as aflatoxinas (somatória de AFB₁, AFB₂, AFG₁ e AFG₂), fumonisinas (somatória de FB₁ e FB₂), OTA, DON e ZEA entre os diferentes tipos de alimentos (ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2011). No entanto, de acordo com vários estudos, altas frequências e concentrações de AFs totais, FBs totais e, mais recentemente, ZEA e DON foram observadas em alimentos brasileiros, especialmente em amendoim, milho, trigo e derivados (OLIVEIRA et al. 2009; DEL PONTE et al. 2012; MARTINS et al. 2012; ALMEIDA-FERREIRA et al. 2013; PIACENTINI et al. 2015). Neste contexto, a incidência de ZEA em arroz, um dos principais alimentos consumidos diariamente no Brasil, foi avaliada em diferentes

períodos de colheita no Brasil por SAVI et al. (2018). De acordo com a pesquisa, quase 60% das amostras estavam contaminadas com ZEA em níveis que variaram de 91 à 126 $\mu\text{g/kg}$, sendo que 36% das amostras de arroz contaminadas com ZEA estavam acima dos LMT no Brasil e da Comissão Européia. Devido às possíveis interações sinérgicas de múltiplas micotoxinas, a ocorrência de uma mistura de micotoxinas em alimentos pode levar à outros riscos para a saúde dos consumidores (ALASSANE-KPEMBI et al., 2017). FRANCO et al. (2019) avaliaram recentemente 203 amostras de alimentos (arroz, feijão, farinha de trigo, farinha de milho e farelo de milho) coletadas de pequenas propriedades rurais nos Estados de São Paulo e Santa Catarina, e descobriram que todos os tipos de alimentos continham pelo menos um tipo de micotoxina, enquanto cinco e três deles estavam contaminados com DON e ZEA, respectivamente, em níveis acima de seus respectivos LMT.

A exposição humana às micotoxinas tem sido avaliada com base em dados de consumo de alimentos, também conhecida como "exposição externa" ou "dose oral". O método mais comum de avaliação da ingestão dietética baseia-se na ocorrência do contaminante em produtos alimentares e nos dados de consumo, com o objetivo de determinar a ingestão diária provável (IDP). Vários relatórios sobre a ocorrência de micotoxinas no leite humano e nos alimentos para bebês indicaram possíveis riscos para a saúde das crianças (ASSUNÇÃO et al., 2015; MILIĆEVIĆ; ŠKRINJAR; BALTIĆ, 2010). Além disso, a caracterização do risco pode ser realizada por comparações entre os valores de referência dos dados de ingestão diária (ASSUNÇÃO et al., 2015). No Estado de São Paulo, Brasil, os valores de IDP foram calculados para micotoxinas individuais em produtos alimentares direcionados para a população em geral, como FBs em produtos de milho (0,0633 $\mu\text{g/kg}$ de peso corporal (pc)/dia) (BORDIN et al., 2014) e AFs em produtos de amendoim (0,0016 $\mu\text{g/kg}$ pc/dia) (JAGER et al., 2013). Considerando o trabalho realizado por FRANCO et al. (2019), os valores de ingestão diária para AFs, DON, FBs e ZEA com co-ocorrência em alimentos variaram de 0,007 à 0,013, 0,069 à 1,002, 0,119 à 0,321 e 0,013 à 0,156 $\mu\text{g/kg}$ pc/dia, respectivamente. Estes dados indicam níveis baixos ou moderados de exposição às micotoxinas em alimentos pela população em geral. Entretanto, existem poucas informações sobre a exposição de mulheres lactantes às micotoxinas alimentares no Brasil. Portanto, a investigação atual foi realizada para avaliar a co-ocorrência de micotoxinas na dieta de mulheres lactantes juntamente com o auxílio de um centro médico público na cidade de Pirassununga, Estado de São Paulo, Brasil, a fim de estimar a IDP para as diferentes micotoxinas e caracterizar o risco associado à essa população-alvo.

3.2 Material e Métodos

3.2.1 Reagentes e soluções

Foram utilizados reagentes de grau analítico, água Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, EUA), acetonitrila grau HPLC e metanol (JT Baker, Xalostoc, México). Foram utilizados padrões de micotoxinas (AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂, OTA, FB₁, FB₂ e ZEN), comprados da Sigma (Sigma, St. Louis, MO, EUA). Preparou-se também soluções estoque individuais em água/acetonitrila.

Padrões marcados isotopicamente [¹³C₁₇] -AFB₁ (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), [¹³C₂₀] - OTA, [¹³C₃₄] -FB₁, [¹³C₁₈] -ZEN e [¹³C₁₅] -DON (Biopure, Romer Labs, Tulln, Áustria) também foram utilizados nas análises como padrões internos. Foi realizado o preparo de soluções padrão individuais (10 µg/mL) de micotoxinas marcadas ou não marcadas, em água/acetonitrila (1:1, v/v) e, a partir destas soluções, preparam-se três soluções de trabalho de padrões de micotoxinas mistas: uma solução de mistura contendo padrões de AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂, OTA, ZEN, FB₁ e FB₂, com uma concentração de 100 ng/mL, e uma solução de DON a 750 ng/mL, além de uma mistura de padrões marcados de [¹³C₁₇] -AFB₁, [¹³C₂₀] -OTA, [¹³C₃₄] -FB₁ e [¹³C₁₈] -ZEN, a 5 ng/mL e [¹³C₁₅] -DON a 100 ng/mL. As soluções ficaram armazenadas em freezer a - 20°C até o momento da análise.

3.2.2 Amostragem

Os procedimentos de amostragem foram realizados no Centro de Especialidades Médicas (CEM) da cidade de Pirassununga/SP, no período de abril de 2018 a agosto de 2019. Neste período, 74 mulheres lactantes com idades ≥ 18 anos e com histórico clínico confirmando a ausência de doenças crônicas nos últimos dois anos, foram convidadas a participar do estudo. As voluntárias foram entrevistadas individualmente e, após aceitação voluntária, cada participante assinou um termo de consentimento livre e esclarecido. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FZEA-USP (aprovação nº 80104017.6.0000.5422) (Anexo A).

Todas as participantes foram instruídas a coletarem amostras de alimentos (aproximadamente 250 g/amostra, transferidas para sacos plásticos estéreis), disponíveis e armazenadas em suas residências em suas embalagens originais ou outra embalagem, e encaminhar as amostras ao CEM imediatamente após a coleta. Foram coletados os seguintes tipos de alimentos: arroz cru ($N = 53$), feijão ($N = 38$), produtos à base de trigo (farinha de trigo, pão, biscoitos e massas) ($N = 69$), grãos de milho e produtos de milho (flocos de milho, milho

branco, bolo à base de milho, farinha de milho e farelo de milho) ($N = 24$). O número total de produtos alimentares analisados foi 184. Como nem todos os tipos de alimentos estavam disponíveis em cada domicílio no momento da amostragem, o número de amostras de cada tipo de alimento variou de acordo com a sua disponibilidade. Após a entrega, as amostras foram armazenadas em caixas isotérmicas com gelo e imediatamente transportadas para o laboratório. Depois de chegar ao laboratório, todas as amostras de alimentos foram homogeneizadas, moídas finamente e congeladas a -20°C até o momento da análise de micotoxinas.

3.2.3 Preparo das amostras

As micotoxinas nos diferentes tipos de alimentos foram determinadas pelo método analítico descrito originalmente por SULKYOK; KRSKA; SCHUHMACHER (2007) e validadas anteriormente no laboratório (FRANCO et al., 2019; FRANCO et al., 2018). Oitenta μL do extrato final foram misturados com 20 μL da solução de trabalho marcada isotopicamente e preparados conforme descrito na seção 3.2.1, e submetidos imediatamente à análise.

3.2.4 Condições da cromatografia líquida e do espectrômetro de massas

Os extratos finais foram injetados em um sistema LC Waters Acquity I-Class Ultra-Performance (Waters, Milford, MA, EUA) equipado com uma coluna BEH C18 ($2,1 \times 50 \text{ mm}$, $1,7 \mu\text{m}$) e acoplado a um espectrômetro de massas Xevo TQ-S (Waters, Milford, MA, EUA). A coluna foi mantida a 40°C durante a análise e as amostras mantidas a 15°C . 5 μL dos extratos e 10 μL dos padrões foram injetados. O gradiente de eluição foi realizado em uma fase móvel composta por água (eluente A) e acetonitrila (eluente B), ambos contendo acetado de amônio 5 mM e 0,1% de ácido acético. Após um período inicial de 0,5 minutos, a 98% de eluente A, a porcentagem de eluente B foi aumentada linearmente para 30% durante 4,5 minutos. Em seguida, o eluente B foi aumentado para 96% ao longo de 2,0 minutos, acompanhando um tempo de espera de 0,5 minutos (7,5 minutos). Após esta etapa, a porcentagem do eluente B foi reduzida para 2% em um período de 2,0 minutos (8,0 minutos), e a coluna foi reequilibrada para as condições iniciais durante 2,0 minutos. O tempo total da corrida cromatográfica para cada amostra foi de 10 minutos e a fase móvel mantida a uma vazão de 0,6 mL/min. As curvas de calibração combinadas com as matrizes foram preparadas para cada tipo de produto alimentar, utilizando as misturas das três soluções de trabalho preparadas em água/acetonitrila (9:1, v/v), com cinco concentrações, variando de 0,062 a 5,0 ng/mL de AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂, OTA, ZEN, FB₁ e FB₂ e de 0,47 a 37,5 ng/mL de DON. Antes da injeção no equipamento

UPLC, cada ponto da curva de calibração foi preparado exatamente como descrito para os extratos das amostras, adicionando 20 μL da solução de trabalho marcada isotopicamente (preparada conforme descrito na seção 3.2.3) a 80 μL das soluções padrão.

O espectrômetro de massas foi operado simultaneamente em modo MRM (Monitoramento de Reações Múltiplas), utilizando ionização por electrospray, com detector operando em modo positivo e negativo, com uma tensão capilar de 3,00 kV para o modo positivo e 2,00 kV para o modo negativo, além da temperatura da fonte a 150°C e a temperatura de solvatação a 500°C. O fluxo de gás de solvatação e o fluxo de gás do cone foram mantidos a 800 L/h e 150 L/h, respectivamente. A tensão cônica, a energia de colisão e as transições MRM (íon precursor principal > íon fragmento) foram otimizadas manualmente. As transições MRM de quantificação e confirmação para as micotoxinas e os parâmetros otimizados no LC-MS/MS utilizados na análise estão apresentadas na Tabela 9, juntamente com os valores de massa, íon molecular e energia de colisão usados para cada micotoxina analisada. Todas as coletas e o processamento de dados foram realizados utilizando o software MassLynx versão 4.1.

Tabela 9 - Parâmetros analíticos do espectrômetro de massas para determinação de micotoxinas em arroz, feijão, trigo, milho e produtos derivados.

Micotoxina	Massa molar (g/mol)	Íon Pseudomolecular	Transição (m/z)	Voltagem do cone (V)	Energia de colisão (eV)	LOD ($\mu\text{g/kg}$)	LOD ($\mu\text{g/kg}$)
AFB ₁	312,28	[M+H] ⁺	312,7>284,9 ^a	94	36	0,4-0,5	0,8-1,0
			312,7>241,1 ^b	94	22	-	-
[¹³ C ₁₇]-AFB ₁	329,15	[M+H] ⁺	330,3> 301,5 ^a	94	20	-	-
AFB ₂	314,29	[M+H] ⁺	314,7>259,0 ^a	2	28	0,4-0,5	0,8-1,0
			314,7>287,0 ^b	2	26	-	-
AFG ₁	328,27	[M+H] ⁺	328,9>243,0 ^a	2	26	0,4,-0,5	0,8-1,0
			328,9>199, ^b	2	38	-	-
AFG ₂	330,29	[M+H] ⁺	330,9>245,0 ^a	56	28	0,4-0,6	0,9-1,0
			330,9>188,9 ^b	56	40	-	-
FB ₁	721,84	[M+H] ⁺	722,5>334,0 ^a	50	40	0,9-1,0	2,0-2,8
			722,5>352,1 ^b	50	30	-	-
[¹³ C ₃₄]-FB ₁	755,58	[M+H] ⁺	756,6> 374,4 ^a	50	30	-	-
FB ₂	705,83	[M+H] ⁺	706,5>336,2 ^a	50	35	0,7-0,9	2,0-2,5
			706,5>318,3 ^b	50	40	-	-
DON	296,32	[M+H] ⁺	397,3>249,1 ^a	6	10	5,8-6,1	18,5-18,8
			397,3>231,1 ^b	6	14	-	-
[¹³ C ₁₅]-DON	311,21	[M+H] ⁺	312,1>98,7 ^a	30	35	-	-
OTA	403,08	[M+H] ⁺	404,0>238,9 ^a	35	22	0,5,-0,7	1,0-1,1
			404,0>357,9 ^b	35	12	-	-
[¹³ C ₂₀]-OTA	423,67	[M+H] ⁺	424,2 > 250,0 ^a	30	20	-	-
ZEA	318,15	[M-H] ⁻	317,1>175,1 ^a	50	23	0,1-0,2	0,3-0,6
			317,1>130,9 ^b	50	33	-	-
[¹³ C ₁₈]-ZEA	336,23	[M-H] ⁻	335,1 >185,1 ^a	50	31	-	-

LOD: limite de detecção; LOQ: limite de quantificação; AF: aflatoxina; DON: deoxinivalenol; OTA: ocratoxina A; FB: fumonisina; ZEA: zearalenona.

^a Transições utilizadas para quantificação.

^b Transições utilizadas para confirmação.

Fonte: Própria autoria.

3.2.5 Questionário de Frequência Alimentar

No momento da coleta das amostras, cada voluntária recebeu um questionário de frequência alimentar (QFA) (Anexo D) contendo os principais grupos de alimentos mais suscetíveis à contaminação por micotoxinas regulamentadas no Brasil (com LMT) (ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2011). O QFA foi preenchido pelas participantes em suas casas, onde também foram coletadas as amostras de alimentos. Também foi preenchido pelas voluntárias um questionário de inquérito recordatório de 24 horas (IR24h) (Anexo C), de acordo com os procedimentos descritos por CARDOSO; STOCCO (2000), DE SALVO; GIMENO (2002), FISBERG; MARTINI; SLATER (2005) e SLATER et al. (2003). Porções como colheres de sopa de farinha de milho ou xícaras de arroz, feijão e flocos de milho foram utilizadas com base em escalas domésticas para serem compreensíveis às voluntárias. O peso corporal (p.c.) de cada participante foi registrado no CEM e o consumo médio de cada produto alimentício por voluntária foi estimado à partir dos tamanhos das porções, conforme foi declarado no IR24h. O consumo médio de cada tipo de alimento foi utilizado para calcular a IDP individual, segundo a Equação 1.

$$IDP (\mu\text{g/kg p.c./dia}) = \frac{\text{Concentração média } (\mu\text{g/kg}) \times \text{Consumo diário (kg)}}{\text{Peso individual (kg)}} \quad (\text{Eq. 1})$$

3.2.6 Caracterização de risco

A caracterização de risco foi realizada para a AFB₁, considerando o potencial carcinogênico dessa toxina (NABIZADEH et al., 2018). Assim, a Margem de Exposição (MoE) foi calculada para a AFB₁ usando o Limite de Confiança Inferior de Dose de Referência (BMDL₁₀), conforme proposto por (BENFORD; LEBLANC; SETZER, 2010), de acordo com a Equação 2. Nesta abordagem, o MoE indica o nível de risco, com MoE ≥ 10.000 sendo de baixa preocupação para a saúde pública e MoE < 10.000 sendo de alta preocupação para a saúde pública (EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY, 2013).

$$MoE = \frac{BMDL_{10} (0,25 \mu\text{g/kg p.c./dia})}{PDI (\mu\text{g/kg p.c./dia})} \quad (\text{Eq. 2})$$

Para OTA, ZEA, DON e FBs totais, a caracterização do risco foi realizada utilizando-se Quociente de Risco (HQ) entre os valores de IDP com os valores de referência de ingestão diária tolerável (IDT), de acordo com a Equação 3. Os valores de IDT para OTA (FAO/OMS, 2007), ZEA (EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY, 2016), DON (FAO/OMS, 2011b) e FBs (FAO/OMS, 2007) são de 0,016 µg/kg p.c./dia, 0,25 µg/kg p.c./dia, 1,0 µg/kg p.c./dia e 2,0 µg/kg p.c./dia, respectivamente. Neste contexto, $HQ < 1$ indica um nível de exposição tolerável e $HQ > 1$ indica um nível de exposição não tolerável (BORG et al., 2013; EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY, 2013).

$$HQ = \frac{IDP \text{ (}\mu\text{g/kg p.c./dia)}}{IDT \text{ (}\mu\text{g/kg p.c./dia)}} \quad (\text{Eq. 3})$$

3.3 Resultados e discussão

3.3.1 Ocorrência de micotoxinas em amostras de alimentos

A frequência de amostras positivas, a variação e os níveis médios das micotoxinas investigadas nas amostras de alimentos coletadas estão apresentadas na Tabela 10. As AFs (somatória de AFB₁, AFB₂, AFG₁ e AFG₂) foram as micotoxinas mais frequentes detectadas nos alimentos analisados (47 amostras positivas, 25%, $N = 184$), sendo que os maiores níveis de contaminação foram encontrados no arroz, feijão e derivados, principalmente no fubá e na canjica. As concentrações medianas de AFs no arroz, feijão, produtos à base de trigo e milho foram 9,2, 18,5, 3,5 e 31,8 µg/kg, respectivamente. É importante ressaltar que duas amostras de arroz, quatro amostras de feijão e cinco amostras de produtos de milho (grãos de milho, bolo à base de milho, canjica e farelo de milho) apresentaram concentrações de AFs suprimindo o LMT proposto para o total de AFs (5 µg/kg para arroz e feijão e 20 µg/kg para milho e derivados), de acordo com a legislação brasileira (ANVISA/MS, 2014). Como o arroz e o feijão estão entre os principais itens alimentares da dieta brasileira, os altos níveis de AFs associados a esses produtos são uma preocupação especial para a população em geral, principalmente para as mulheres lactantes. De acordo com os resultados, a OTA foi detectada em apenas uma amostra de arroz (23,3 µg/kg) e duas amostras de produtos à base de trigo, uma de pão (23,8 µg/kg) e uma de macarrão (48,7 µg/kg). Embora a incidência de OTA tenha sido relativamente baixa, as concentrações encontradas são preocupantes, uma vez que foram 2-3 vezes maiores que o LMT adotado no Brasil para OTA (10 µg/kg).

ZEA foi detectada em 34 amostras (18%, $N = 184$) em concentrações de 8-474 $\mu\text{g/kg}$, em duas amostras de arroz e quatro amostras de produtos à base de trigo (pão e macarrão), bem como em duas amostras de produtos de milho (bolo à base de milho e farelo de milho) contendo níveis acima do LMT para ZEA nesses alimentos (100 $\mu\text{g/kg}$ e 150 $\mu\text{g/kg}$, respectivamente) no Brasil (ANVISA/MS, 2014). A ocorrência de ZEA em produtos à base de trigo está de acordo com os relatados por (TRALAMAZZA et al., 2016), que investigaram a ocorrência de ZEA em 150 amostras de grãos de trigo coletados em São Paulo, Paraná e estados do Rio Grande do Sul. Os autores relataram 84% das amostras positivas para ZEA no estado do Rio Grande do Sul e 12% em São Paulo, em concentrações médias de 71 $\mu\text{g/kg}$ e 58 $\mu\text{g/kg}$, respectivamente, enquanto nenhuma amostra de trigo cultivada no Paraná foi contaminado com ZEA. Em relação às amostras de feijão, embora não exista LMT para ZEA para este produto no Brasil, uma amostra contendo 164 $\mu\text{g/kg}$ de ZEA pode ser considerada superior aos limites toleráveis no Brasil.

Em nosso estudo, foram observados altos níveis de FBs entre produtos à base de trigo e milho, com concentrações variando de 93 a 6245 $\mu\text{g/kg}$. Nesse sentido, cinco amostras positivas de produtos de milho (flocos de milho, fubá, canjica e bolo à base de milho) suprimiram o LMT proposto no Brasil (1500 $\mu\text{g/kg}$) (ANVISA/MS, 2014). Embora não haja limites para FBs em produtos à base de trigo no Brasil, uma amostra de farinha de trigo e uma amostra de massa continham conteúdos de FBs que estariam acima do LMT disponível para produtos de milho. A incidência e os níveis de FBs no presente estudo foram maiores do que os relatados por (FRANCO et al., 2018), que encontraram FBs em concentrações de 7 à 316 $\mu\text{g/kg}$ (abaixo dos recomendados pelas regulamentações brasileiras).

A Tabela 11 apresenta a co-ocorrência de micotoxinas nas amostras de alimentos consumidas pelas voluntárias do estudo, representando todas as amostras com concentrações acima do limite de quantificação (LOQ). Vinte e oito amostras (15%, $N = 184$) continham 2-3 tipos de micotoxinas quantificáveis, enquanto as AFs e FBs, bem como FBs e ZEA foram contabilizados como a combinação mais comum de micotoxinas em amostras de alimentos (11 amostras, para cada combinação), principalmente arroz, farinha de milho, canjica, pão e bolo à base de milho. Existem poucos estudos sobre a co-ocorrência de micotoxinas em produtos alimentícios no Brasil. Segundo (FRANCO et al., 2018), 45% dos alimentos à base de milho coletados em pequenas propriedades foram contaminados com 2-5 micotoxinas quantificáveis, principalmente FB e DON, o que contrasta com nossos dados, embora o DON não tenha sido analisado na investigação atual. A co-ocorrência de 21 micotoxinas e seus metabólitos nos

cereais matinais, principalmente em cereais infantis, formulados principalmente por milho, trigo, arroz e uma mistura de grãos; e o chocolate coletado no mercado de Portugal foi avaliado por (MARTINS et al., 2018). De acordo com os resultados, 96% das amostras foram contaminadas por várias micotoxinas, enquanto uma alta incidência de múltiplas micotoxinas foi observada em 92% das amostras. Consequentemente, destaca-se a demanda por novas revisões nos limites oficiais determinados, principalmente correlacionados com os alimentos das crianças, para avaliar com precisão a exposição às micotoxinas nos alimentos. O problema colocado pela co-ocorrência de micotoxinas em alimentos é que a combinação múltipla desses compostos pode levar à interações tóxicas aditivas ou sinérgicas adicionais quando comparadas à exposição a uma única micotoxina (ALASSANE-KPEMBI et al., 2017; FRANCO et al., 2018, 2019).

Tabela 10 - Ocorrência de micotoxinas em amostras de alimentos consumidas por lactantes de Pirassununga, Brasil.

Micotoxina	Arroz (<i>N</i> = 53)		Feijão (<i>N</i> = 38)		Produtos à base de trigo ^a (<i>N</i> = 69)		Milho e produtos de milho ^b (<i>N</i> = 24)	
	Mediana (Variação)		Mediana (Variação)		Mediana (Variação)		Mediana (Variação)	
	<i>n</i> (%)	(µg/kg)	<i>n</i> (%)	(µg/kg)	<i>n</i> (%)	(µg/kg)	<i>n</i> (%)	(µg/kg)
Σ AF	6 (11)	9,2 (0,2-18,2 ^c)	10 (26)	18,5 (2,2- 35,7 ^c)	8 (12)	3,5 (1,5-5,0)	12 (50)	31,8 (8,3- 55,3 ^c)
OTA	1 (2)	23.3 ^d	0	< LOQ	2 (3)	31,4 (23,8- 48,7 ^d)	0	< LOQ
ZEA	8 (15)	78,9 (3-436 ^e)	1 (3)	62	21 (30)	159 (8-351 ^e)	4 (17)	195 (55- 474 ^f)
Σ FB	1 (2)	85	1 (3)	58	5 (7)	109 (88-1.380)	15 (63)	1.546 (93- 6.245 ^g)

^a Grãos de milho, flocos de milho, canjica, bolo à base de milho, farinha de milho e farelo de milho.

^b Farinha de trigo, pão, biscoitos e massas.

^c Duas amostras de arroz, quatro amostras de feijão e cinco amostras de produtos de milho (grãos de milho, bolo à base de milho, canjica e farelo de milho) com concentrações acima de seus níveis máximos permitidos (LMT) para AFs totais (somatória de AFB₁, AFB₂, AFG₁ e AFG₂) no Brasil (5, 5 e 20 µg/kg, respectivamente) (ANVISA/MS, 2014).

^d Uma amostra de arroz e duas amostras de produtos à base de trigo (farinha de trigo e biscoitos) com concentrações acima do LMT para OTA nesses alimentos (10 µg/kg) no Brasil (ANVISA/MS, 2014).

^e Duas amostras de arroz e quatro amostras de produtos à base de trigo (pão e macarrão) com concentrações acima do LMT para ZEA nesses alimentos (100 µg/kg) no Brasil (ANVISA/MS, 2014).

^f Duas amostras de produtos de milho (bolo à base de milho e farelo de milho) com concentrações acima do LMT para ZEA nesses alimentos (150 µg/kg) no Brasil (ANVISA/MS, 2014).

^g Cinco amostras de produtos de milho (flocos de milho, farelo de milho, canjica e bolo à base de milho) com concentrações acima do LMT para FBs totais (somatória de FB₁ e FB₂) nesses produtos (1500 µg/kg) no Brasil (ANVISA/MS, 2014).

n: Número de amostras com concentrações acima do limite de quantificação (LOQ), consulte a Tabela 9 para LOQ de cada micotoxina.

AF: aflatoxina; OTA: ocratoxina A; FB: fumonisina; ZEA: zearalenona.

Fonte: Própria autoria.

Tabela 11 - Co-ocorrência de micotoxinas em amostras de alimentos consumidas por lactantes de Pirassununga, estado de São Paulo, Brasil.

Número de micotoxinas	Tipos de co-ocorrência de micotoxinas	Número de amostras positivas (<i>N</i> = 184) ^a
2	AF, FB	11
	FB, ZEN	11
3		3
	FB, OTA	
	FB, OTA, ZEN	3
Total (%)		28 (15)

^a Amostras apresentando concentrações acima do limite de quantificação (LOQ), consulte a Tabela 9 para LOQ de cada micotoxina.

AF: aflatoxinas; OTA: ocratoxina A; FB: fumonisinas; ZEA: zearalenona.

3.3.2 Estimativa da ingestão de micotoxinas e caracterização de risco

Os valores da IDP baseados nos níveis de micotoxinas dos alimentos consumidos por mulheres lactantes estão apresentados na Tabela 12. Os maiores valores médios de IDP para AFs, OTA, ZEA e FBs foram observados em produtos de milho ($0,119 \pm 0,193$ µg/kg p.c./dia), produtos à base de trigo ($0,035 \pm 0,028$ µg/kg p.c./dia), produtos à base de milho ($0,325 \pm 0,097$ µg/kg p.c./dia) e produtos à base de trigo ($2,936 \pm 1,541$ µg / kg peso / dia), respectivamente. Consequentemente, esses valores mais altos estavam acima da IDT para OTA (0,016 µg/kg p.c./dia), ZEA (0,25 µg/kg p.c./dia) e FB (2,0 µg/kg p.c./dia), conforme proposto pela FAO/WHO (2007) e EFSA (2016), indicando um problema de saúde pública, principalmente para mulheres lactantes.

Tabela 12 - Ingestão diária provável (IDP) com base nos níveis de micotoxinas em alimentos consumidos por mulheres lactantes em Pirassununga, estado de São Paulo, Brasil.

Tipo de alimento	AFs		OTA		ZEA		FBs	
	<i>n</i>	IDP (µg/kg p.c./dia)	<i>n</i>	IDP (µg/kg p.c./dia)	<i>n</i>	IDP (µg/kg p.c./dia)	<i>n</i>	IDP (µg/kg p.c./dia)
Arroz	6	0,004 ± 0,021	1	0,025	8	0,194 ± 0,040	1	0,545 ± 1,108
Feijão	10	0,026 ± 0,034	0	0	1	0,072	1	0,515
Produtos à base de trigo ^a	8	0,045 ± 0,009	2	0,035 ± 0,028	21	0,325 ± 0,097	5	0,380 ± 0,606
Milho e produtos à base de milho ^b	12	0,119 ± 0,193	0	0	4	0,706 ± 0,245	15	2,936 ± 1,541

^a Grãos de milho, flocos de milho, canjica, bolo à base de milho, farinha de milho e farinha de milho.

^b Farinha de trigo, pão, biscoitos e massas.

n: número de amostras com níveis detectáveis de micotoxinas.

AF: somatória das aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂; FB: somatória das fumonisinas B₁ e B₂; OTA: ocratoxina A; ZEA: zearalenona.

Fonte: Própria autoria.

Todos os tipos de alimentos apresentaram amostras positivas para AFs, embora a contribuição de cada uma delas para a IDP dessas micotoxinas tenha sido menor no arroz (IDP média: 0,004 ± 0,021 µg/kg p.c./dia), seguido pelo feijão (0,026 ± 0,034 µg/kg p.c./dia) e produtos à base de trigo (0,045 ± 0,009 µg/kg p.c./dia). No entanto, a IDP média para AFs em produtos de milho (119 ± 0,193 µg/kg p.c./dia) indica que esse tipo de alimento pode contribuir significativamente para a exposição à AF. JAGER et al. (2013) avaliaram a ingestão de AFs relacionadas ao consumo de amostras de amendoim, feijão, milho, leite e derivados lácteos. Com base nesse artigo, os produtos à base de amendoim e amendoim demonstraram a maior média de ingestão diária provável (0,001 µg/kg p.c./dia), em comparação com os outros alimentos analisados. Valores de IDP de 0,013 ± 0,007 e 0,007 ± 0,002 µg/kg p.c./dia para AF relacionados ao consumo de feijão e arroz, respectivamente, semelhantes aos do presente estudo, foram observados por (FRANCO et al., 2019).

Em relação à OTA, foram observados valores de IDP acima do limite recomendado (0,016 µg/kg p.c./dia) (FAO/OMS, 2007) em arroz (0,025 µg/kg p.c./dia) e produtos à base de trigo (macarrão e pão, 0,035 ± 0,028 µg/kg p.c./dia). A concentração média de OTA nas

amostras de arroz da Espanha foi de 0,74 µg/kg, enquanto a ingestão diária estimada foi de 0,00017 µg/kg p.c./dia (GONZÁLEZ et al., 2006), que é muito menor do que o relatado no presente estudo. Em resumo, um alto nível de exposição às micotoxinas entre mulheres lactantes foi demonstrado pela investigação atual, uma vez que os valores de IDP foram maiores que os de outros estudos, principalmente quando comparados com (FRANCO et al., 2019).

Os valores da IDP para ZEA no presente estudo variaram de 0,072 µg/kg p.c./dia para feijão à $0,706 \pm 0,245$ µg/kg p.c./dia para produtos à base de milho. Exceto no caso do arroz e do feijão, os valores correspondentes de IDP para ZEA foram superiores à ingestão diária máxima tolerável determinada pelo Comitê de Especialistas em Aditivos Alimentares da FAO/OMS (0,25 µg/kg p.c./dia) (JOINT FAO/WHO EXPERT COMMITTEE ON FOOD ADDITIVES, 2017). Os valores de IDP para ZEA de $0,156 \pm 0,310$ µg/kg p.c./dia para arroz e $0,013 \pm 0,001$ µg/kg p.c./dia para farinha de milho foram relatados por (FRANCO et al., 2019a).

Para as FBs, os valores médios de IDP de $0,305 \pm 0,235$ µg/kg p.c./dia para farinha de milho e $0,323 \pm 0,312$ µg/kg p.c./dia para farelo de milho foram demonstrados por (FRANCO et al., 2019), que são muito inferiores aos valores correspondentes relatados no presente estudo. Segundo (MARTINS et al., 2012), a IDP média de FB devido ao consumo de produtos à base de milho no Paraná, Brasil, foi de 0,256 µg/kg p.c./dia. Em outra investigação, a ingestão de FB₁ foi associada ao consumo de produtos à base de milho em voluntários de Pirassununga/SP (BORDIN et al., 2014), e a ingestão diária média relatada foi de 0,0633 µg/kg p.c./dia, também demonstrando baixa exposição à FB₁ nesses indivíduos, no entanto, é difícil uma comparação entre os valores de IDP descritos aqui e os relatados anteriormente no Brasil, porque a contaminação por micotoxinas nos alimentos varia de acordo com vários fatores, incluindo diferenças climáticas e práticas de armazenamento nos domicílios, entre outros.

A Tabela 13 apresenta a caracterização do risco de micotoxinas através da determinação do HQ e MoE, com base nos dados de ocorrência em alimentos consumidos por mulheres lactantes. Uma margem de exposição de risco considerável (MOE <10.000 valor) foi calculado para os consumidores. Além disso, como o HQ correspondente para OTA (24,66), ZEA (4,24) e FB total (5,01) foi > 1, riscos notáveis à saúde podem ser correlacionados com a ingestão dessas micotoxinas pelo consumo dos produtos alimentícios investigados. Esses resultados estão de acordo com os relatados na única caracterização de risco disponível no Brasil por (FRANCO et al., 2019a), que descreveram valores de HQ e MoE de 3,36 para OTA e 0,005 para AFs totais, para residentes de áreas rurais nos estados de São Paulo e Santa Catarina. Os

resultados da presente caracterização de risco demonstraram as demandas por melhorias no processo de produção, condições de armazenamento, além de outras abordagens preventivas, a fim de controlar e reduzir a contaminação de alimentos por micotoxinas. O sistema de treinamento adicional para informar a família das mulheres sobre as diretrizes básicas de proteção contra a contaminação por micotoxinas é crucial. Além disso, o monitoramento constante e, se necessário, as ações de modificação recomendadas, como alterar a condição favorável ao crescimento de fungos, estão entre outras soluções recomendadas.

Tabela 13 - Caracterização do risco de micotoxinas através da determinação do Quociente de Risco (HQ) e Margem de Exposição (MoE), com base nos dados de ocorrência em alimentos consumidos por lactantes em Pirassununga, estado de São Paulo, Brasil.

Micotoxina	HQ ¹	MoE ²
AFB ₁	NA	3,72*
OTA	24,66*	NA
ZEA	4,24*	NA
Σ FBs	5,01*	NA

* Indica um risco não tolerável (HQ > 1 ou MoE < 10000).

¹ Calculado da seguinte forma: HQ = Ingestão diária provável/valores de referência.

² Calculado da seguinte forma: MoE = Limite inferior de confiança da dose de referência (0,25 µg/kg de peso corporal/dia)/dados de exposição.

NA: Não aplicável.

FB: Somatória das fumonisinas B₁ e B₂.

Fonte: Própria autoria.

3.4 Conclusão

Os resultados do presente estudo indicam altos níveis de ocorrência de AFs, FBs e ZEA em alimentos consumidos por mulheres lactantes em Pirassununga, SP, Brasil, com 15% das amostras contaminadas por 2-3 tipos de micotoxinas. Os valores médios de IDP indicam que os níveis de exposição da dieta às múltiplas toxinas entre mulheres lactantes estão acima dos limites máximos recomendados internacionalmente. Como vários alimentos apresentaram níveis acima do LMT brasileiro para as micotoxinas avaliadas, e como as voluntárias eram mulheres em aleitamento, o estudo é preocupante para a saúde dos recém-nascidos, pois altos

níveis de micotoxinas podem ser transferidos para o leite materno, um alimento essencial para o desenvolvimento do bebê.

Agradecimentos

Os autores gostariam de agradecer à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, processo nº 2017/12956-2) pelo apoio financeiro e bolsa de estudos.

Referências

ALASSANE-KPEMBI, I. et al. Mycotoxins co-contamination: Methodological aspects and biological relevance of combined toxicity studies. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, New York, v. 57, n. 16, p. 3489–3507, 2017.

ASSUNÇÃO, R. et al. Single-compound and cumulative risk assessment of mycotoxins present in breakfast cereals consumed by children from Lisbon region, Portugal. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 86, p. 274–281, 2015.

BENFORD, D.; LEBLANC, J. C.; SETZER, R. W. Application of the margin of exposure (MoE) approach to substances in food that are genotoxic and carcinogenic. Example: Aflatoxin B₁ (AFB₁). **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 48, n. 1, p. 34-41, 2010.

BIASUCCI, G. et al. The presence of ochratoxin A in cord serum and in human milk and its correspondence with maternal dietary habits. **European Journal of Nutrition**, Heidelberg, v. 50, n. 3, p. 211–218, 2011.

BORDIN, K. et al. Assessment of dietary intake of fumonisin B₁ in São Paulo, Brazil. **Food Chemistry**, Washington, v. 155, p. 174–178, 2014.

BORG, D. et al. Cumulative health risk assessment of 17 perfluoroalkylated and polyfluoroalkylated substances (PFASs) in the Swedish population. **Environment International**, New York, v. 59, p. 112–123, 2013.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC 07/2011**, de 22 de fevereiro de 2011 da ANVISA. Estabelece limites para micotoxinas em alimentos, principalmente em grãos. Portal da Anvisa de 22 de fevereiro de 2011.

CARBALLO, D. et al. Dietary exposure assessment to mycotoxins through total diet studies. A review. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 128, p. 8–20, 2019.

CARDOSO, M. A.; STOCCO, P. R. Desenvolvimento de um questionário quantitativo de frequência alimentar em imigrantes japoneses e seus descendentes residentes em São Paulo, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, São Paulo, v. 16, n. 1, p. 107–114, 2000.

CIGIĆ, I. K.; PROSEN, H. An overview of conventional and emerging analytical methods for the determination of mycotoxins. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 10, n. 1, p. 52-115, 2009.

DE SALVO, V. L.; GIMENO, S. G. Reproducibility and validity of a food frequency questionnaire. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 36, n. 4, p. 505–512, 2002.

EZEKIEL, C. N. et al. Mycotoxins in uncooked and plate-ready household food from rural northern Nigeria. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 128, p. 171–179, 2019.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY. International Frameworks Dealing with Human Risk Assessment of Combined Exposure to Multiple Chemicals. **EFSA Journal**, v. 11, p. 1–69, 2013.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY. Appropriateness to set a group health- based guidance value for zearalenone and its modified forms. **EFSA Journal**, v. 14, p. 4, 2016.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. Fao Statistical Yearbook 2013. Disponível em: <<http://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>>

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS/WORLD HEALTH ORGANIZATION. Evaluation of certain contaminants in food: seventy-second report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Evaluation of certain contaminants in food. **WHO Technical Report Series**, v. 959, p. 1–105, 2011.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS/WORLD HEALTH ORGANIZATION. Evaluation of certain food additives and contaminants: sixty-eighth report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Evaluation of certain food additives and contaminants. **WHO Technical Report Series**, v. 947, p. 1-225, 2017.

FISBERG, R. M. et al. **Inquéritos alimentares: métodos e bases científicos**. Barueri: Manole, 2005.

FRANCO, L. T. et al. Co-occurrence of mycotoxins in maize food and maize-based feed from small-scale farms in Brazil: a pilot study. **Mycotoxin Research**, Heidelberg, v. 35, n. 1, p. 65-73, 2018.

FRANCO, L. T., PETTA, T., VENDRAMETTO, M. E., OLIVEIRA, C. A. F. Performance and Application of a “ Dilute-and- Shoot ” LC -MS/MS Method for Determination of Mycotoxins in Food Products in São Paulo, Brazil. **International Journal of Food Engineering**, v. 4, n. 3, p. 206–211, 2018.

FRANCO, L. T. et al. Assessment of mycotoxin exposure and risk characterization using occurrence data in foods and urinary biomarkers in Brazil. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 128, p. 21–34, 2019.

GONZÁLEZ, L. et al. Occurrence and daily intake of ochratoxin A of organic and non-organic rice and rice products. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 107, n. 2, p. 223–227, 2006.

HASSAN, A. M. et al. Does aflatoxin as an environmental mycotoxin adversely affect the renal and hepatic functions of Egyptian lactating mothers and their infants? A preliminary report. **International Urology and Nephrology**, Budapest, v. 38, n. 2, p. 339–342, 2006.

JAGER, A. V. et al. Assessment of aflatoxin intake in São Paulo, Brazil. **Food Control**, Kidlington, v. 33, n. 1, p. 87–92, 2013.

JOINT FAO/WHO EXPERT COMMITTEE ON FOOD ADDITIVES. Evaluation of certain contaminants in food: eighty third report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Who Technical Report Series, v. 1009, 2017. Disponível em: <<http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/254893/1/9789241210027-eng.pdf>>

JAGER, A. V. et al. Determination of urinary biomarkers for assessment of short-term human exposure to aflatoxins in São Paulo, Brazil. **Toxins**, Basel, v. 6, n. 7, p. 1996–2007, 2014.

JONSYN, F. E. Intake of aflatoxins and ochratoxins by infants in Sierra Leone: Possible effects on the general health of these children. **Journal of Nutritional and Environmental Medicine**, v. 9, n. 1, p. 15–22, 1999.

MARIN, S. et al. Mycotoxins: Occurrence, toxicology, and exposure assessment. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 60, p. 218–237, 2013.

MARTINS, F. A. et al. Daily intake estimates of fumonisins in corn-based food products in the population of Parana, Brazil. **Food Control**, Kidlington, v. 26, n. 2, p. 614–618, 2012.

MARTINS, C. et al. Assessment of multiple mycotoxins in breakfast cereals available in the Portuguese market. **Food Chemistry**, Washington, v. 239, p. 132–140, 2018.

MILIĆEVIĆ, D. R.; ŠKRINJAR, M.; BALTIĆ, T. Real and perceived risks for mycotoxin contamination in foods and feeds: Challenges for food safety control. **Toxins**, Basel, v. 2, n. 4, p. 572–592, 2010.

NABIZADEH, S. et al. Prevalence and probabilistic health risk assessment of aflatoxins B₁, B₂, G₁, and G₂ in Iranian edible oils. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, n. 35, p. 35562–35570, 2018.

OLIVEIRA, C.A.F. et al. Determination of aflatoxins in peanut products in the northeast region of São Paulo, Brazil. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 10, p. 174–183, 2009.

PESTKA, J. Deoxynivalenol: mechanisms of action, human exposure, and toxicological relevance. **Archives of Toxicology**, New York, v. 84, p. 663–679, 2010a.

PESTKA, J. J. Toxicological mechanisms and potential health effects of deoxynivalenol and nivalenol. **World Mycotoxin Journal**, Wagenigen, v. 3, n. 4, p. 323–247, 2010b.

PIACENTINI, K. C. et al. Quality and occurrence of deoxynivalenol and fumonisins in craft beer. **Food Control**, Kidlington, v. 50, p. 925–929, 2015.

SAVI, G. D. et al. Incidence of toxigenic fungi and zearalenone in rice grains from Brazil. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 270, p. 5–13, 2018.

SLATER, B. et al. Validation of a semi-quantitative adolescent food frequency questionnaire applied at a public school in São Paulo, Brazil. **European Journal of Clinical Nutrition**, London, v. 57, n. 5, p. 629–635, 2003.

SULYOK, M.; KRISKA, R.; SCHUHMACHER, R. A liquid chromatography/tandem mass spectrometric multi-mycotoxin method for the quantification of 87 analytes and its application to semi-quantitative screening of moldy food samples. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Heidelberg, v. 389, n. 5, p. 1505–1523, 2007.

TRALAMAZZA, S. M. et al. Fungal diversity and natural occurrence of deoxynivalenol and zearalenone in freshly harvested wheat grains from Brazil. **Food Chemistry**, Washington, v. 196, p. 445–450, 2016.

TURNER, P. C. et al. Aflatoxin exposure in utero causes growth faltering in Gambian infants. **International Journal of Epidemiology**, London, v. 36, n. 5, p. 1119–1125, 2007.

TURNER, P. C. The molecular epidemiology of chronic aflatoxin driven impaired child growth. **Scientifica**, v. 2013, p. 152879, 2013.

WILD, C. P.; GONG, Y. Y. Mycotoxins and human disease: A largely ignored global health issue. **Carcinogenesis**, Oxford, v. 31, n. 1, p. 71–82, 2009.

YANG, J. et al. Natural Occurrence, Analysis, and Prevention of Mycotoxins in Fruits and their Processed Products. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, New York, v. 54, p. 64–83, 2014.

4 Capítulo 3: Ocorrência de micotoxinas no leite materno e caracterização de risco de mulheres lactantes utilizando biomarcadores urinários no Brasil

Carolina Fernanda S. C. Coppa

Universidade de São Paulo/ Departamento de Engenharia de Alimentos, Pirassununga, São Paulo, Brasil

E-mail: carolinacebin@usp.br

Amanda C. Cirelli^a, Bruna L. Gonçalves^a, Eliana Maria B. Barnabé^b, Tânia Petta^c, Larissa T. Franco^a, Amin M. Khaneghah^d, Roice E. Rosim^a, Carlos H. Corassin^a, Carlos A. F. Oliveira^a

^a Departamento de Engenharia de Alimentos, Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, São Paulo, Brasil

^b Unidade Materno Infantil, Centro de Especialidades Médicas de Pirassununga, CEP 13634-502, Pirassununga, SP, Brasil

^c Departamento de Bioquímica e Imunologia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, CEP 14040-903, Ribeirão Preto, SP, Brasil

^d Departamento de Ciência dos Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade de Campinas (UNICAMP), Campinas, São Paulo, Brasil

E-mail: amanda.cirelli@usp.br, brunaleone1g@usp.br, elianabarnabe@bol.com.br, taniapetta.usp@gmail.com, lafranco@usp.br, mousavi.amin@gmail.com, roice@usp.br, carloscorassin@usp.br, carlosaf@usp.br

Este artigo encontra-se em edição para ser submetido na revista **Food and Chemical Toxicology** (ISSN 0278-6915).

Resumo

Este trabalho teve a finalidade de avaliar a exposição de lactantes ($N = 74$) às principais micotoxinas e caracterizar o risco associado nos quatro períodos de amostragem realizados (abril/2018 à agosto/2019), através da determinação de biomarcadores na urina e no leite materno de voluntárias do município de Pirassununga/SP. A determinação das micotoxinas e dos biomarcadores nas amostras foi realizada por LC-MS/MS. Os níveis medianos de aflatoxinas (AFM_1 e AFP_1), deoxinivalenol (DON), ochratoxina A (OTA) e zearalenona (ZEA) e seus metabólitos α -ZOL e β -ZOL na urina foram 0,16 ($n = 42$, 57%), 38,59 ($n = 13$, 18%), 2,38 ($n = 6$, 8%) e 0,64 ng/mg de creatinina ($n = 7$, 10%), respectivamente. Os valores médios de ingestão diária provável (IDP) baseados em biomarcadores urinários foram de 1,58, 1,09, 5,07 e 0,05 $\mu\text{g/kg p.c./dia}$ para aflatoxina M_1 (AFM_1), deoxinivalenol (DON), ochratoxina A (OTA) e zearalenona (ZEA), respectivamente. Valores de Quociente de Risco (HQ) maiores que 1 foram observados para OTA (316,79) e para DON próximo ao limite com 1,09. Os valores de Margem de Exposição (MoE) calculados para AFM_1 relacionados a seus respectivos valores de IDP obtidos em amostras de urina, demonstrou-se muito abaixo do nível de referência (10.000), indicando riscos potenciais à saúde. AFM_1 não foi detectada no leite materno. No entanto, 6.7% das amostras apresentaram FBs e OTA em concentrações médias de 5,0 e 1,3 ng/mL, respectivamente. Embora uma baixa incidência de micotoxinas tenha sido observada no leite materno, os níveis de biomarcadores urinários de micotoxinas indicam uma alta exposição de mulheres em lactação da área estudada às micotoxinas através da dieta.

Palavras-chave: Biomarcadores; avaliação de risco; LC-MS/MS; lactantes.

4.1 Introdução

Micotoxinas são metabólitos secundários produzidos por alguns fungos filamentosos que podem causar efeitos adversos aos seres humanos e em várias espécies animais, resultando em doenças e em perdas econômicas (ZAIN, 2011). Os principais fungos toxigênicos pertencem aos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*, sendo que as classes de micotoxinas produzidas por esses gêneros são as aflatoxinas (*Aspergillus*), ochratoxinas (*Aspergillus* e *Penicillium*), tricotecenos e fumonisinas (*Fusarium*) (BRYDEN, 2007). Regiões quentes e úmidas favorecem a produção de micotoxinas devido às condições favoráveis para o seu desenvolvimento (COUNCIL OF AGRICULTURAL SCIENCE & TECHNOLOGY;

COUNCIL FOR AGRICULTURAL SCIENCE & TECHNOLOGY, 2003). Alguns fatores como disponibilidade do substrato, infestação por insetos ou outros animais, atividade de água, condições de armazenamento, como temperatura e umidade, ocasionam a contaminação por fungos (BHATNAGAR; YU; EHRLICH, 2002; MAGAN; ALDRED, 2007).

Em alimentos, a contaminação por micotoxinas representa um problema grave para a saúde pública, uma vez que as micotoxinas podem ocasionar diversos efeitos tóxicos que podem levar à doenças crônicas e episódios agudos (WILD; GONG, 2009). Mulheres em aleitamento necessitam de uma atenção especial, pois algumas micotoxinas são teratogênicas e os bebês são suscetíveis aos seus efeitos tóxicos. Durante os primeiros meses de vida é importante verificar a exposição dos lactentes às micotoxinas através da amamentação e este monitoramento deve continuar até que os alimentos complementares sejam introduzidos, como alimentos à base de cereais e alimentos para bebês (JUAN et al., 2014). A exposição dos lactentes à AFM₁ é uma situação muito preocupante porque esta micotoxina é cancerígena, de acordo com estudos disponíveis na literatura. Embora outras micotoxinas possam ser excretadas no leite, a exposição infantil às outras micotoxinas é mais provável que ocorra no momento da introdução de alimentos para bebês na dieta. Em Portugal, ALVITO et al. (2010) observaram a co-ocorrência de aflatoxinas e ocratoxina A em alimentos para bebês e patulina em alimentos à base de maçã (BARREIRA; ALVITO; ALMEIDA, 2010). Outro problema é a falta de estudos que demonstrem os efeitos pré-natais e pós-natais sobre a saúde dos seres humanos. Geralmente, a capacidade de biotransformação de carcinogênicos em recém-nascidos é mais lenta do que em adultos, resultando em maior tempo de circulação de produtos químicos (SADEGHI et al., 2009). GÜRBAY et al. (2010) detectaram AFM₁ e AFB₁ em amostras de leite materno de mães na Turquia. Os níveis médios de AFM₁ estavam entre 60,90 – 299,99 ng/L de leite e AFB₁, entre 94,50 – 4123,80 ng/L de leite, valores determinados pelos autores por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). De acordo com esse estudo, verificou-se a exposição das mães e dos recém-nascidos à AFM₁ e AFB₁, necessitando-se de pesquisas mais avançadas sobre a contaminação por micotoxinas em alimentos, além de estratégias para prevenção.

Os dados disponíveis sobre a toxicocinética de várias micotoxinas em modelos animais, bem como em seres humanos, indicam que a exposição às micotoxinas pode ser medida por biomarcadores em urina humana. Segundo GROOPMAN; KENSLER (1999) e SOLFRIZZO; GAMBACORTA; VISCONTI (2014), os biomarcadores urinários convenientes para AFB₁ são AFM₁, AFP₁ e AFQ₁. Para ZEA, são ZEA + α -zearalenol não-metabolizado (α -ZOL) + β -

zearalenol (β -ZOL) (FRANCO et al., 2019a). FB₁, OTA e DON + de-epoxideoxinivalenol 1 (DOM-1) + 15-acetil-DON (15-Ac-DON) não metabolizados são biomarcadores urinários para FB₁, OTA e DON, respectivamente (FRANCO et al., 2019a; SOLFRIZZO; GAMBACORTA; VISCONTI, 2014a). (SOLFRIZZO; GAMBACORTA; VISCONTI, 2014b)Esses biomarcadores podem ser excretados na urina tanto nas formas livres ou conjugadas. Assim, a urina geralmente é digerida com β -glucuronidase/sulfatase para separar as formas conjugadas e melhorar a concentração e a detecção dos analitos livres (FRANCO et al., 2019a; SOLFRIZZO; GAMBACORTA; VISCONTI, 2014a). Diante disso, o biomonitoramento humano de biomarcadores urinários de micotoxinas podem fornecer dados de exposição apropriados para uma avaliação de risco mais precisa das micotoxinas nos alimentos (FRANCO et al., 2019a).

Dado o exposto, o conhecimento sobre a exposição às micotoxinas em leite materno e de como contribui para a carga de doenças causada por micotoxinas, é de grande importância para fornecer informações úteis e precisas para a avaliação de risco às micotoxinas em populações humanas infantis. Este trabalho teve a finalidade de avaliar a exposição de lactantes às principais micotoxinas e a realização da caracterização de risco em 4 períodos de amostragem, realizados entre abril/2018 à agosto/2019, através da determinação de biomarcadores na urina e no leite materno de voluntárias do município de Pirassununga, Estado de São Paulo.

4.2 Material e métodos

4.2.1 Delinemanento experimental e universo amostral

Neste estudo, realizou-se uma pesquisa longitudinal. Foram realizadas 4 amostragens de urina e leite materno por um período de 8 meses (uma amostragem a cada 2 meses), totalizando um grupo formado por 74 lactantes voluntárias residentes no município de Pirassununga/SP. As voluntárias foram recrutadas entre pacientes provenientes do Centro de Especialidades Médicas, na Unidade Materno Infantil, onde são realizados os testes do pezinho e a vacinação de recém-nascidos. O estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, da Universidade de São Paulo (Parecer nº 80104017.6.0000.5422) (Anexo A). As voluntárias foram entrevistadas individualmente para fins de conhecimento dos objetivos do estudo. A inclusão de cada pessoa

no estudo ocorreu por manifestação voluntária de concordância, sendo a mesma registrada através de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo B) e assinado individualmente pelas voluntárias. Os critérios adicionais para a adesão ao estudo incluíram idade mínima de 18 anos e histórico clínico com ausência de doenças crônicas há menos de 2 anos. As lactantes voluntárias tinham idade média de $30,5 \pm 5,1$ anos e peso médio de $73,0 \pm 16,6$ kg.

4.2.2 Amostragem

Foram realizados 4 procedimentos de amostragem, abril-maio/2018 (1ª amostragem), agosto-setembro/2018 (2ª amostragem), fevereiro-março/2019 (3ª amostragem) e julho-agosto/2019 (4ª amostragem). O número de participantes na 1ª amostragem foi de 23 lactantes, 16 voluntárias na 2ª amostragem, 22 na 3ª amostragem e 13 voluntárias na 4ª amostragem. Para a coleta das amostras de leite materno, os mamilos e a aréola mamária foram limpos com água e sabão bacteriostático. Em seguida, as amostras de leite foram coletadas por bombeamento, descartando-se as primeiras gotas para evitar uma possível contaminação, sendo então conduzidas para frascos devidamente esterilizados, de acordo com o método descrito por TENA et al. (2016) e SAY et al. (2016). O volume de leite doado de cada voluntária foi variável, cerca de 3 – 30 mL, dependendo das condições e disponibilidade de leite materno de cada lactante. As amostras foram acondicionadas em caixa isotérmica refrigerada e transportadas imediatamente ao laboratório.

Para a coleta das amostras de urina, as voluntárias foram orientadas a coletarem a primeira urina da manhã (cerca de 50 mL) em frascos de polietileno previamente descontaminados. As amostras foram acondicionadas em caixa isotérmica refrigerada e transportadas imediatamente ao laboratório. O peso corporal das lactantes foram informados para o cálculo do valor de ingestão diária provável (IDP).

4.2.3 Questionário de Frequência Alimentar

Na ocasião das coletas de urina e leite materno, as participantes foram instruídas a preencher um questionário de frequência alimentar (QFA) (Anexo D), contendo os principais grupos de alimentos sujeitos a contaminação por micotoxinas, previstos na legislação brasileira, publicada no Diário Oficial da União de 22/fevereiro 2011. O objetivo deste questionário é estimar a porção dos alimentos de alto risco, ou seja, mais suscetíveis à ocorrência de micotoxinas, e que foram consumidos pelas voluntárias por unidade de tempo. As frequências

de consumo foram estimadas com base nos termos: "Nunca", "Menos de uma vez por mês", "1-2 vezes por mês", "3-4 vezes por semana", "Todos os dias" e "2 vezes um dia". As porções foram estimadas em gramas, com base em medidas domésticas comuns aos participantes, como xícaras, colheres, etc. (FRANCO et al., 2019a; JAGER et al., 2013). As participantes também preencheram um questionário de inquérito recordatório (IR24h), onde descreveram o consumo dos alimentos nas 24 horas anteriores às coletas das amostras, incluindo aqueles que são considerados de maior risco para contaminação por micotoxinas e que são regulamentados no Brasil (ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2011).

4.2.4 Reagentes e soluções

Em todos os procedimentos de análise, foram utilizados reagentes de grau analítico e água Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, EUA), acetonitrila e metanol de qualidade para HPLC (JT Baker, Xalostoc, México). Padrões de micotoxinas (AFM₁, AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂, AFP₁, AFQ₁, OTA, FB₁, FB₂, ZEA, α -ZOL, β -ZOL, DON, DOM-1, 15-Ac-DON, T-2 e HT-2) foram adquiridos da Sigma (Sigma, St Louis, MO, EUA). Utilizou-se também padrões isotópicos de micotoxinas (PI) de [¹³C₁₇]-AFB₁ e [¹³C₁₇]-AFM₁ (Sigma, St. Louis, MO, EUA), [¹³C₂₀]-OTA, [¹³C₃₄]-FB₁, [¹³C₁₈]-ZEA e [¹³C₁₅]-DON (Biopure, Romer Labs, Tulln, Áustria). Soluções de estoque individuais foram preparados em água/acetonitrila.

4.2.5 Preparo das amostras de urina

A análise de multimicotoxinas e biomarcadores nas amostras de urina foi realizada de acordo com o método descrito por ŠARKANJ et al. (2018) com pequenas modificações, incluindo o método descrito por SOLFRIZZO et al. (2011) e FRANCO et al. (2019). Antes da realização da extração de micotoxinas na urina, as amostras foram centrifugadas a 5600 x g; 3 min. para a remoção de partículas. Após este procedimento, adicionou-se à cada amostra 150 μ L de enzima β -glucuronidase à 3 mL de urina para a hidrólise das micotoxinas. As amostras foram então incubadas em banho-maria à 37°C durante a noite. No dia seguinte, as amostras foram então diluídas com 3 mL de água Milli-Q e 20 μ L de uma solução de PI contendo 10 ng/mL de ([¹³C₁₇]-AFM₁, [¹³C₂₀]-OTA, [¹³C₃₄]-FB₁, [¹³C₂₄]-Toxina T-2 e [¹³C₁₈]-ZEA e 200 ng/mL de [¹³C₁₅]-DON. 6 mL de cada amostra foram passados em colunas OASIS Prime HLB SPE (Waters), pré-equilibradas com 1 mL de metanol e 1 mL de água. Em seguida, as colunas foram lavadas 2 vezes com 500 μ L de água e as micotoxinas foram eluídas com 200 μ L de

acetonitrila, passadas em 3 vezes. Os extratos foram então evaporados à temperatura de 40°C e ressuspensos com 200 µL de solvente de diluição (10% de acetonitrila; 0,1% de ácido acético) e filtrados através de filtros de membrana PTFE de 0,22 µm (Millex, Millipore Corp.). Os extratos foram transferidos para inserts de vidro devidamente inseridos em vials para posterior injeção em LC-MS/MS. Para as curvas de calibração, as soluções de trabalho foram preparadas em acetonitrila com concentrações variando de 0.017 à 0.270 ng/mL para AFM₁ e toxina T-2, 0.050 à 0.800 ng/mL para AFP₁ e AFQ₁, 0.047 à 0.750 ng/mL para OTA, FB₁, FB₂, ZEN, α-ZOL e β-ZOL, 0.099 à 1.500 ng/mL para toxina HT-2 e 0.973 à 15.0 ng/mL para DON e DOM-1.

4.2.6 Preparo das amostras de leite materno

A análise de multomicotoxinas nas amostras de leite materno foi realizada de acordo com o método descrito por FLORES-FLORES; GONZÁLEZ-PEÑAS (2017), com pequenas modificações. Resumidamente, adicionou-se 1 mL de leite em um tubo Falcon de 15 mL, acrescentando-se 4 mL de acetonitrila acidificada com 2% de ácido fórmico. Em seguida, a mistura permaneceu sob agitação, em um agitador orbital (Tecnal, Piracicaba, Brasil) por 15 min. Após a agitação, as amostras foram centrifugadas a 5000 rpm por 10 min. 4 mL do sobrenadante foi adicionado à outro tubo contendo 60 mg de acetato de sódio, agitando novamente a mistura por 10 min. no agitador orbital. As amostras foram centrifugadas novamente a 5000 rpm por 10 min. Em seguida, recolheu-se 3,2 mL do sobrenadante, os quais foram filtrados em filtros de membrana de PVDF de 0,45 µm (Millipore, Burlington, MA). Os extratos foram evaporados até a secar a 45°C e ressuspensos em 200 µL de uma mistura de 60% de solução aquosa de formato de amônio 5 mM e ácido fórmico a 0,1% e 40% de solução aquosa-metanólica 5:95, contendo formato de amônio 5 mM e ácido fórmico 0,1%. Os extratos foram agitados em vórtex por 2 min. e transferidos para tubos tipo Eppendorf e conduzidos à centrífuga novamente à 5000 rpm por 10 min. Em seguida, os extratos foram transferidos para inserts de vidro devidamente inseridos em vials para posterior injeção em LC-MS/MS. Para as curvas de calibração, as soluções de trabalho foram preparadas em acetonitrila com concentrações variando de 0.025 à 0.4 ng/mL para AFB₁ e AFB₂, 0.063 à 1.0 ng/mL para AFG₁ e OTA, 0.094 à 1.5 ng/mL para AFG₂, 0.625 à 10.0 ng/mL para ZEN, α-ZOL e β-ZOL, 4.0 ng/mL para toxina HT-2, 0.031 à 0.5 ng/mL para toxina T-2 e AFM₁, 3.125 à 50.0 ng/mL para FB₁, 1.563 à 25.0 ng/mL para FB₂, e 5.0 ng/mL para DON e DOM-1.

4.2.7 Condições da corrida cromatográfica e parâmetros do espectrômetro de massas

Os extratos finais das amostras de urina e leite materno foram injetados em um sistema de cromatografia de ultra-performance (UPLC) Waters Acquity I-Class (Waters, Milford, MA, EUA) equipado com uma coluna BEH C18 (2,1 × 50 mm, 1,7 µm) e acoplado a um espectrômetro de massas triplo quadrupolo (MS/MS) Xevo TQ-S (Waters, Milford, MA, EUA). A coluna foi mantida a 40°C durante a análise e as amostras mantidas a 15°C. 5 µL dos extratos e 10 µL dos padrões foram injetados. O gradiente de eluição foi realizado em uma fase móvel composta por água (eluente A) e acetonitrila (eluente B), ambos contendo acetado de amônio 5 mM e 0,1% de ácido acético. Após um período inicial de 0,5 minutos, a 98% de eluente A, a porcentagem de eluente B foi aumentada linearmente para 30% durante 4,5 minutos. Em seguida, o eluente B foi aumentado para 96% ao longo de 2,0 minutos, acompanhando um tempo de espera de 0,5 minutos (7,5 minutos). Após esta etapa, a porcentagem do eluente B foi reduzida para 2% em um período de 2,0 minutos (8,0 minutos), e a coluna foi reequilibrada para as condições iniciais durante 2,0 minutos. O tempo total da corrida cromatográfica para cada amostra foi de 10 minutos, com a vazão da fase móvel mantido a 0,6 mL/min. O UPLC-MS/MS foi operado em modo MRM (Monitoramento de Reações Múltiplas), utilizando ionização por eletropulverização, um modo de íon positivo e negativo, com uma tensão capilar de 3,00 kV para o modo positivo e 2,00 kV para o modo negativo, além da temperatura da fonte a 150°C e a temperatura de dessolvatação a 500°C. O fluxo de gás de dessolvatação e o fluxo de gás do cone foram mantidos a 800 L/h e 150 L/h, respectivamente. A voltagem do cone, a energia de colisão e as transições MRM (íon precursor principal > íon fragmento) haviam sido otimizadas anteriormente no laboratório, estando descritas no trabalho de FRANCO et al. (2019). Todas as coletas e o processamento de dados foram realizados utilizando o software MassLynx versão 4.1.

4.2.8 Desempenho dos métodos analíticos

Para a urina, as amostras fortificadas foram preparadas adicionando volumes apropriados de soluções de trabalho, em triplicata, em tubos Falcon (15 mL) contendo amostras de urina e água ultra-pura (1:1, v/v) antes da eluição, para alcançar concentrações variando de 0,017 à 0,270 ng/mL para AFM₁, 0,047 à 0,750 ng/mL para OTA, FB₁ e ZEA, e 0,973 à 15,0 ng/mL para DON. Os procedimentos foram realizados conforme descrito no item 2.5. Soluções padrão em acetonitrila e curvas de calibração combinadas com a matriz foram preparadas

adicionando extratos em branco com volumes adequados das soluções de trabalho de micotoxinas, para obter as mesmas concentrações descritas para as amostras. Para todas as amostras de urina foram adicionados 20 µL de PI antes da eluição a 80 µL de cada nível à partir das amostras fortificadas, extrato e solvente.

Para a realização dos procedimentos de validação do método analítico para o leite materno, utilizou-se uma amostra de leite disponível em maior quantidade, previamente analisada pelo método em apreço e sem níveis detectáveis de nenhuma das micotoxinas estudadas (ou seja, cujo cromatograma não apresentou picos superiores a 3 vezes o ruído da linha de base). A extração de micotoxinas em triplicatas das amostras de leite foi realizada seguindo os procedimentos descritos por FLORES-FLORES; GONZÁLEZ-PEÑAS (2017), incluindo pequenas modificações. Foram preparadas curvas de calibração em solvente, matriz e extrato. As amostras foram fortificadas em triplicata com volumes apropriados para atingir as mesmas concentrações finais apresentadas no artigo original. As concentrações finais de cada micotoxina utilizada para o preparo das curvas em solvente, matriz e extrato variaram de 0,025 à 0,4 ng/mL para OTA, 0,625 à 10,0 ng/mL para ZEA, 0,031 à 0,5 ng/mL para AFM₁, 3,125 à 50,0 ng/mL para FB₁, e 5,0 ng/mL para DON. 100 µL de cada amostra foram adicionados em inserts de vidro devidamente inseridos em vials, para posterior injeção em LC-MS/MS. Gradientes de eluição com acetonitrila, metanol, água e suas misturas contendo os aditivos apropriados (ácido fórmico, ácido acético, acetato de amônio, etc) foram testados e otimizados, visando a melhor sensibilidade e especificidade de todas as micotoxinas em estudo. A voltagem do cone, energia de colisão, modo de ionização positiva e negativa e transições MRM (um íon precursor principal e pelo menos dois íons fragmento) foram otimizados para cada composto individualmente usando o programa IntelliStart do Acquity UPLC, com base nos parâmetros descritos por FRANCO et al. (2019). Após esta etapa, pequenas variações destes parâmetros foram verificadas na página de sintonia do MassLynx para certificar que a maior sensibilidade foi alcançada. Outros parâmetros não otimizados pelo IntelliStart, como a voltagem capilar, fonte e temperatura de dessolvatação, e cone e fluxo do gás de dessolvatação foram otimizados manualmente na página de sintonia do MassLynx. As curvas em matriz, extrato e solvente foram preparadas considerando as áreas obtidas em cada ponto e as respectivas concentrações dos analitos. O método analítico para urina e leite materno foi avaliado em termos de recuperação aparente (RA), efeitos de matriz, ou supressão/aumento de sinal (SSE) e recuperação do extrato (RE). Adicionalmente, linearidade, limite de quantificação (LOQ) e limite de detecção (LOD) também foram avaliados, de acordo com os critérios recomendados

por RIBANI et al. (2004) e EURACHEM (1998). Os parâmetros RA, SSE e RE foram calculados a partir das curvas obtidas em matriz, extrato e solvente, de acordo com as equações (1), (2) e (3), respectivamente (DI GREGORIO et al., 2017).

$$RA (\%) = 100 * \text{slope da curva em matriz} / \text{slope da curva em solvente (Eq. 1)}$$

$$SSE (\%) = 100 * \text{slope da curva no extrato} / \text{slope da curva em solvente (Eq. 2)}$$

$$RE (\%) = 100 * RA / SSE \text{ (Eq. 3)}$$

4.2.9 Análises de creatinina em urina humana

A análise de creatinina nas amostras de urina foi realizada utilizando um teste comercial (Bioplus - Bio 200), conforme descrito por FRANCO et al. (2019). A concentração de creatinina em cada amostra de urina foi utilizada para corrigir diferenças na diluição entre as voluntárias e nas taxas de excreção, e os resultados foram expressos em ng de micotoxina/mg de creatinina.

4.2.10 Avaliação da exposição (estimativas de ingestão diária provável) e caracterização de risco

Para o cálculo da IDP (Eq. 4) através dos biomarcadores na urina, utilizou-se a metodologia descrita por TURNER et al. (2010) e FRANCO et al. (2019):

$$IDP (\mu\text{g/kg p.c./dia}) = \frac{\text{Conteúdo da micotoxina (ng/mL)} \times V}{EU \times \text{Peso individual (kg)} \times 1000} \quad (\text{Eq. 4})$$

IDP = Ingestão Diária Provável ($\mu\text{g/kg}$ peso corporal/dia);

Ocorrência = conteúdo da micotoxina (ng/mL) determinada nas análises de urina;

V = produção diária de urina em adultos, assumida como sendo 1500 mL (TURNER et al. (2010); FRANCO et al. (2019)).

Peso = Peso corporal (kg) reportado pelas lactantes voluntárias.

EU = razão de excreção urinária de AFM₁ para mulheres: 1,5% (FRANCO et al., 2019a; ZHU; ZHANG; HU, 1987);

= razão de excreção urinária de DON para mulheres: 72% (FRANCO et al., 2019a; VIDAL et al., 2018a);

= razão de excreção urinária de OTA: 2,5% (FRANCO et al., 2019a; SCHLATTER; STUDER-ROHR; RÁSONYI, 1996);

= razão de excreção urinária de FB₁: 0,5% (FRANCO et al., 2019a; RILEY et al., 2012);

= razão de excreção urinária de ZEN: 36,8% (FRANCO et al., 2019a; GAMBACORTA et al., 2013a).

Para a avaliação da caracterização de risco, os valores da IDP foram comparados com os valores de referência da dose de ingestão diária tolerável (IDT) para as seguintes micotoxinas: OTA (0,016 µg/kg p.c./dia) (FAO/WHO, 2007), FBs (2,0 µg/kg p.c./dia) (FAO/WHO, 2011), DON (1,0 µg/kg p.c./dia) (FAO/WHO, 2011) e ZEA (0,25 µg/kg p.c./dia) (EFSA, 2016) (FRANCO et al., 2019). As comparações foram realizadas utilizando-se o Quociente de Risco (HQ), calculado como a razão entre a exposição e uma dose de referência, de acordo com a Eq. (5). O $HQ < 1$ demonstra uma exposição tolerável e $HQ > 1$ demonstra um nível de exposição não tolerável (BORG et al., 2013; EFSA (2013; FRANCO et al., 2019).

$$HQ = \frac{IDP \text{ (}\mu\text{g/kg p.c./dia)}}{IDT \text{ (}\mu\text{g/kg p.c./dia)}} \quad (\text{Eq. 5})$$

HQ = Quociente de Risco

IDP = Ingestão Diária Provável (µg/kg p.c./dia)

IDT = Ingestão Diária Tolerável (µg/kg p.c./dia)

Além do HQ, levando-se em consideração o potencial carcinogênico das aflatoxinas, torna-se necessário avaliar a Margem de Exposição (MoE) para as aflatoxinas, como apresentado na Eq. (6), com base em uma proporção do Limite Inferior de Confiança da Dose de Referência (BMDL₁₀) e o nível de exposição (IDP). O MoE indica o nível do risco, já que $MoE \geq 10.000$ representa baixa preocupação para a saúde pública e $MoE < 10.000$ representa riscos para a saúde pública (EFSA, 2013). Para as aflatoxinas, considerou-se o valor de BMDL₁₀ recomendado por BENFORD; LEBLANC; SETZER (2010), conforme FRANCO et al. (2019).

$$\text{MoE} = \frac{\text{BMDL}_{10}}{\text{IDP } (\mu\text{g/kg p.c./dia})} \quad (\text{Eq. 6})$$

- MoE = Margem de Exposição;
- BMDL_{10} = Limite Inferior de Confiança da Dose de Referência (0,25 $\mu\text{g/kg p.c./dia}$);
- IDP = Ingestão Diária Provável ($\mu\text{g/kg p.c./dia}$)

4.3 Resultados

4.3.1 Desempenho dos métodos analíticos

Para o desenvolvimento do método analítico para a análise de micotoxinas no leite materno, duas etapas foram realizadas. Na primeira etapa, todas as condições de seletividade e sensibilidade do espectrômetro de massas para a detecção de cada micotoxina de interesse foram otimizadas. Já na segunda etapa, desenvolveu-se uma condição cromatográfica de análise. Para a identificação das micotoxinas nas amostras selecionou-se o Monitoramento de Reações Múltiplas (MRM), método este que possibilita uma maior sensibilidade e seletividade para um LC-MS/MS equipado com um analisador multi-quadrupolar, proporcionando maior eficiência na análise por MRM. A porcentagem de RA simboliza a razão de um valor obtido a partir de uma curva de calibração em amostras adicionadas de padrão interno, com um valor de referência. Já o SSE é calculado por meio da comparação dos respectivos padrões de matriz, e o RE representa o rendimento da extração. De acordo com os parâmetros de desempenho do método (faixa de concentração, LOQ, LOD, RA, SSE e RE) apresentados na Tabela 14, pode-se verificar que, no geral, os valores de LOD e LOQ calculados para as micotoxinas individuais variaram de 0,002 à 0,2 ng/mL e 0,006 à 0,300 ng/mL, respectivamente. Os valores de RA, SSE e RE para as micotoxinas variaram de 1,5 à 60,5%, 1,4 à 51,2% e 56,3 à 211,6%, respectivamente.

Tabela 14 - Parâmetros de desempenho do método analítico para determinação de micotoxinas no leite.

Micotoxina	RT (min.)	Massa (g/mol)	Íon molecular	Transição (m/z)	Variação (ng/mL)	Média				
						Média R _A (%)	SSE (%)	Média R _E (%)	LOD (ng/mL)	LOQ (ng/mL)
AFM ₁	4,03	328,3	[M+H] ⁺	329,0 >	0,03–0,5	1,8	3,2	56,3	0,002	0,006
				273,1 ^a						
				243,0 ^b						
				404,0 >						
OTA	5,99	403,1	[M+H] ⁺	238,9 ^a	0,06–1,0	17,3	8,4	206,7	0,005	0,017
				404,0 >						
				357,9 ^b						
				722,5 >						
FB ₁	5,40	721,8	[M+H] ⁺	334,0 ^a	50,0	60,5	51,2	118,2	-	3,125
				722,5 >						
				352,1 ^b						
				397,3 >						
DON	1,98	296,3	[M+H] ⁺	249,1 ^a	0,31–5,0	12,4	5,9	211,6	0,083	0,250
				397,3 >						
				231,1 ^b						
				317,1 >						
ZEA	5,98	318,1	[M+H] ⁻	175,1 ^a	5,09	1,5	1,4	108,2	-	-
				317,1 >						
				130,9 ^b						

^a Transições usadas para quantificação.

^b Transições usadas para confirmação.

RT: tempo de retenção; R_A: recuperação aparente; SSE: supressão / aprimoramento de sinal; R_E: recuperação de extração; LOD: limite de detecção; LOQ: limite de quantificação; AF: aflatoxina; DON: deoxinivalenol; OTA: ocratoxina A; FB: fumonisina; ZEA: zearalenona.

Fonte: Própria autoria.

Para a determinação de biomarcadores de micotoxinas nas amostras de urina, utilizou-se os mesmos parâmetros de desempenho descritos por FRANCO et al. (2019). Os parâmetros de desempenho do método (faixa de concentração, LOQ, LOD, RA, SSE e RE) apresentados na Tabela 15 demonstram que os valores de LOQ e LOD calculados para as micotoxinas individuais variaram entre 0,010-0,563 e 0,034-1,875 ng/mL, respectivamente. Os valores de RA, SSE e RE para as micotoxinas variaram de 52 à 776%, 46 à 557% e 104 à 139%, respectivamente.

Tabela 15 - Parâmetros de desempenho do método para determinação de biomarcadores de micotoxinas em amostras de urina.

Micotoxina	RT (min.)	Massa (g/mol)	Íon molecular	Transição (m/z)	Variação (ng/mL)	Média	Média	Média R _E (%)	LOD (ng/mL)	LOQ (ng/mL)
						R _A (%)	SSE (%)			
AFM ₁	4,03	328,3	[M+H] ⁺	329,0 >	0,017-	84	75	111	0,010	0,034
				273,1 ^a	0,270					
				329,0 >						
				243,0 ^b						
OTA	5,99	403,1	[M+H] ⁺	404,0 >	0,047-	776	557	139	0,225	0,750
				238,9 ^a	0,750					
				404,0 >						
				357,9 ^b						
FB ₁	5,40	721,8	[M+H] ⁺	722,5 >	0,047-	52	46	113	0,014	0,047
				334,0 ^a	0,750					
				722,5 >						
				352,1 ^b						
DON	1,98	296,3	[M+H] ⁺	397,3 >	0,973-	220	165	133	0,563	1,875
				249,1 ^a	15,0					
				397,3 >						
				231,1 ^b						

				317,1 >	0,047-					
ZEA	5,98	318,1	[M+H] -	175,1 ^a	0,750	58	55	104	0,028	0,094
				317,1 >						
				130,9 ^b						
				442,2 >						
				215,4 ^b						

^a Transições usadas para quantificação.

^b Transições usadas para confirmação.

RT: tempo de retenção; R_A: recuperação aparente; SSE: supressão / aprimoramento de sinal; R_E: recuperação de extração; LOD: limite de detecção; LOQ: limite de quantificação; AF: aflatoxina; DON: deoxinivalenol; OTA: ocratoxina A; FB: fumonisina; ZEA: zearalenona.

Fonte: Própria autoria.

4.3.2 Ocorrência de micotoxinas no leite materno

Os níveis das diferentes micotoxinas analisadas em leite materno são apresentados na Tabela 16. AFM₁ não foi detectada em nenhuma amostra. Porém, foram detectadas OTA e FBs nas amostras de leite materno analisadas. A frequência de amostras positivas para a presença de micotoxinas foi de 6,7% ($N = 5$) e os níveis destas toxinas variaram de $1,3 \pm 1,8$ à $5,0 \pm 2,3$ ng/mL, respectivamente. As demais micotoxinas (ZEA e DON) também não foram detectadas em nenhuma amostra.

Tabela 16 - Níveis de micotoxinas em amostras de leite materno ($N = 74$) de lactantes voluntárias do município de Pirassununga/SP.

Micotoxina	<i>n</i>	%	Variação (ng/mL)	Mediana (ng/mL)
AFM ₁	0	0	< LOD	< LOD
ΣAF	0	0	< LOD	< LOD
OTA	3	4	0,018 – 2,6	$1,3 \pm 1,8$
ΣFB	2	2,7	3,4 – 6,6	$5,0 \pm 2,3$
DON	0	0	< LOD	< LOD
ZEA	0	0	< LOD	< LOD

n: Número de amostras que apresentaram concentrações acima do limite de detecção (LOD), veja Tabela 14 para consultar o LOD de cada micotoxina.

AF: aflatoxina; OTA: ochratoxina A; FB: fumonisina; DON: deoxinivalenol; DOM-1: de-epoxideoxinivalenol; ZEA: zearalenona; α -ZOL: α -zearalenol; β -ZOL: β -zearalenol.

Fonte: Própria autoria.

4.3.3 Ocorrência de biomarcadores de micotoxinas em urina humana

Os níveis de biomarcadores de micotoxinas acima do LOQ em amostras de urina de mulheres lactantes da cidade de Pirassununga, Estado de São Paulo, Brasil, estão apresentados na Tabela 17. As micotoxinas mais frequentes encontradas nas amostras de urina foram as AFs, sendo apenas AFM₁ e AFP₁ detectadas em 62% das amostras de urina, com 57% das amostras positivas e nível médio em 0,16 ng/mg de creatinina (nível máximo de 27,56 ng/mg de creatinina). A DON foi detectada em apenas 18% das amostras, porém, os níveis variaram de 9,05 à 133,40 ng/mg de creatinina. As amostras de urina apresentaram ZEA com níveis variando de 0,02 à 27,56 ng/mg de creatinina em 10% das amostras e apenas 3% detectaram seus metabólitos, α -ZOL e β -ZOL, em níveis médios de 11,07 e 9,75 ng/mg de creatinina, respectivamente. A OTA estava presente em 8% das amostras em níveis médios de 2,38 ng/mg de creatinina.

Tabela 17 - Níveis de micotoxinas em amostras de urina (*N* = 74) de mulheres lactantes de Pirassununga, São Paulo, Brasil.

Micotoxina	<i>n</i>	%	Variação (ng/mg de creatinina)	Mediana (ng/mg de creatinina)
AFM ₁	42	57	0.02 - 27.56	0.16
AFP ₁	8	11	0.001 - 0.14	0.07
Σ AF	46	62	0.02 - 27.56	0.16
DON	13	18	9.05 – 133.40	38.59
OTA	6	8	0.95 – 36.56	2.38
Σ FB	0	0	<LOQ	<LOQ
ZEA	7	10	0.02 - 27.56	0.64

n: Número de amostras que apresentaram concentrações acima do limite de quantificação (LOQ), consulte a Tabela 15 para LOQ de cada micotoxina.

AF: Aflatoxina. DON: Deoxinivalenol. OTA: Ochratoxina A. FB: Fumonisina. ZEA: Zearalenona.

Fonte: Própria autoria.

4.3.4 Estimativa da exposição às micotoxinas através de níveis urinários

A Tabela 18 apresenta as estimativas de IDP através dos níveis de biomarcadores urinários em amostras positivas (acima dos LOQs). Para o cálculo dos valores de IDP foram utilizados dados de acordo com as taxas de excreção urinária, previamente designadas para AFs, DON, OTA e ZEA. A IDP média observada neste estudo foi de $1,58 \pm 6,84$ $\mu\text{g/kg p.c./dia}$ para AFM₁, $1,09 \pm 0,71$ $\mu\text{g/kg p.c./dia}$ para DON, $5,07 \pm 8,00$ $\mu\text{g/kg p.c./dia}$ para OTA e $0,05 \pm 0,06$ $\mu\text{g/kg p.c./dia}$ para ZEA. Como não foram encontradas fumonisinas na urina, não há um valor de IDP calculado para FB₁.

Tabela 18 - Ingestão diária provável (IDP) de micotoxinas com base nos respectivos níveis urinários de mulheres lactantes de Pirassununga, São Paulo, Brasil¹.

Micotoxina	Razões de excreção urinária (ER)		IDP ($\mu\text{g/kg p.c./dia}$) ²
	%	Referência	
AFM ₁	1,5 ³	(ZHU et al., 1987)	$1,58 \pm 6,84$
DON	72 ³	(VIDAL et al., 2018b)	$1,09 \pm 0,71$
OTA	2,5	(VIDAL et al., 2018c)	$5,07 \pm 8,00$
FB ₁	0,5	(RILEY et al., 2012)	-
ZEA	36,8	(GAMBACORTA et al., 2013b)	$0,05 \pm 0,06$

¹ Os resultados são expressos como média $\pm$ desvio padrão dos valores de IDP calculados considerando amostras de urina com concentrações acima do limite de quantificação (LOQ).

² Calculado da seguinte forma: IDP = (taxa de ocorrência x produção diária de urina) / (ER x peso corporal x 1000).

³ Razão de excreção urinária para mulheres.

AFM₁: Aflatoxina M₁. DON: deoxinivalenol. OTA: Ochratoxina A. FB₁: Fumonisina B₁. ZEA: Zearalenona.

Fonte: Própria autoria.

4.3.5 Caracterização de risco

Os valores de HQ estão apresentados na Tabela 19, cujos valores de IDP foram calculados através dos biomarcadores urinários de micotoxinas. Valores de HQ maiores que 1 foram observados para OTA (316,79) e DON próximo ao limite com 1,09. A Tabela 20 apresenta os valores de MoE para AFM₁ relacionados aos seus respectivos valores de IDP obtidos em amostras de urina, sendo o MoE calculado muito abaixo do nível de referência (10.000).

Tabela 19 - Caracterização do risco de micotoxinas através da determinação do Quociente de Perigo (HQ) com base nos dados de ocorrência em biomarcadores urinários de mulheres lactantes de Pirassununga, São Paulo, Brasil¹.

Micotoxina	HQ ²
DON	1,09*
OTA	316,79*
ΣFB	-
ZEA	0,22

* Indica um risco não tolerável (HQ > 1).

¹ Em relação às amostras que contêm níveis de micotoxinas acima do limite de quantificação (LOQ), consulte a Tabela 15 para LOQ de cada micotoxina na urina.

² Calculado da seguinte forma: HQ = Ingestão diária provável/valores de referência.

DON: deoxinivalenol; OTA: ocratoxina A; FB: fumonisinas; ZEA: zearalenona.

Fonte: Própria autoria.

Tabela 20 - Caracterização do risco de aflatoxinas através da determinação da Margem de Exposição (MoE), com base nos dados de ocorrência em biomarcadores urinários de lactantes de Pirassununga, São Paulo, Brasil¹.

Micotoxina	MoE ²
AFM ₁	1,50*

* Indica alta preocupação com a saúde pública (MoE < 10.000).

¹ Em relação às amostras que contêm níveis de micotoxinas acima do limite de quantificação (LOQ), consulte a Tabela 15 para LOQ de cada micotoxina na urina.

² Calculado da seguinte forma: MoE = Limite inferior de confiança da dose de referência (0,00025 mg/kg p.c./dia)/dados de exposição.

Fonte: Própria autoria.

4.4 Discussão e conclusão

4.4.1 Desempenho dos métodos analíticos

Considerando os valores de SSE, observa-se que houve um elevado efeito de supressão do sinal pela matriz para todas as micotoxinas avaliadas. É possível observar que os níveis das micotoxinas avaliadas fortificadas antes do processo de extração foram significativamente suprimidos, comparando-se com a curva padrão em solvente (RA) e o extrato fortificado (SSE). Contudo, os valores de LOD e LOQ foram adequados, e bastante próximos dos valores descritos no método original (FLORES-FLORES; GONZÁLEZ-PEÑAS, 2017). A legislação brasileira não estabelece valores de LMT para nenhuma micotoxina no leite materno, sendo que há legislação somente para AFM₁ nos leites de consumo (LMT: 0,5 ng/mL), de acordo com a Resolução Brasileira RDC nº 7, de 18 de fevereiro de 2011. Deste modo, podemos observar que o valor de LOQ apresentado na Tabela 14 para AFM₁ está bem abaixo do LMT para leite fluido. Os valores de RE foram acima de 100% para todas as micotoxinas, exceto para a AFM₁, confirmando o efeito de matriz sobre o sinal obtido no LC-MS/MS. Entretanto, os valores de RA e SSE foram coerentes, levando-se em consideração que o procedimento de extração não envolve muitas etapas de transferência ou purificação em colunas, que poderiam aumentar as perdas dos analitos durante o processo. A linearidade das curvas analíticas foram adequadas, considerando que todos os valores de r^2 foram maiores que 0,990. A obtenção dos extratos das amostras de leite seguindo-se o método descrito por FLORES-FLORES; GONZÁLEZ-PEÑAS (2017) com pequenas modificações, de acordo com o processo apresentado no item 4.2.6, é um método simples e de rápida extração. No entanto, apesar de sua praticidade e rapidez, uma desvantagem é o alto efeito de matriz esperado na análise, já que o método não utiliza padrões internos e as análises são realizadas em LC-MS/MS, equipamento extremamente sensível e seletivo. Este efeito é provocado por compostos arrastados juntamente com os analitos no processo de extração. Alguns interferentes podem provocar supressão ou aumento do sinal analítico, acarretando em resultados falsos ou imprecisos.

O método analítico para determinação de biomarcadores na urina apresentou valores de RE acima de 100% para todas as micotoxinas avaliadas (Tabela 15). Isso significa que ocorreu um efeito de matriz sobre o sinal obtido no LC-MS/MS, assim como ocorreu para o leite. Já

considerando os valores de SSE, é possível observar que OTA e DON tiveram o sinal aumentado pelo efeito da matriz. Comparando-se os valores de RA e SSE para OTA e DON, nota-se que os níveis destas micotoxinas fortificadas antes do processo de extração foram significativamente aumentados quando comparados com a curva padrão em solvente (RA). Os sinais de AFM₁, ZEN e FB₁ foram suprimidos no LC-MS/MS para RA e SSE, se comparados com os valores obtidos para OTA e DON. A linearidade das curvas analíticas foram adequadas, considerando que a maioria dos valores de r^2 foram maiores que 0,990. Assim como para método de análise para o leite, o método para urina não utiliza colunas de imunoafinidade, o que poderia melhorar a purificação da amostra no processo de extração. Por isso, alguns compostos também podem ser arrastados no processo de extração, fazendo com que estes interferentes suprimam o sinal das micotoxinas no LC-MS/MS.

4.4.2 Biomarcadores de micotoxinas no leite materno

O estudo revelou a presença de OTA e FBs em amostras de leite materno no Brasil (Tabela 16). Semelhante ao presente estudo, na Espanha, RUBERT et al. (2014) avaliaram a presença de 27 diferentes micotoxinas em 35 amostras de leite materno e, assim como no presente estudo, também relataram uma baixa incidência de micotoxinas. Os autores reportaram a presença de zearalenona, fusariotoxinas (nivalenol e HT-2), mas ressaltaram que a micotoxina detectada com maior frequência foi a ZEN, 37 % ($n = 13$), em níveis que variavam de 2 à 14 ng/mL. Na Áustria, BRAUN et al. (2018) também avaliaram a presença de diferentes micotoxinas (AFs, ZEN, DON, OTA e micotoxinas emergentes) em amostras de leite materno. Em contraste com o presente estudo, os autores reportaram uma maior incidência de micotoxinas nas 75 amostras analisadas. 56% ($n = 42$) continham beauvericina, 9% ($n = 7$) continham eniatina B, 15 % ($n = 11$) continha OTA e 1% ($n = 1$) continha AFM₁. Em outros estudos, a ocorrência de micotoxinas em amostras de leite materno foi avaliada através da análise de uma única micotoxina ou no máximo duas. De um modo geral, nestes estudos, a ocorrência de micotoxinas reportada pelos seus respectivos autores foi maior que nos estudos que analisaram multi-micotoxinas. No Brasil, IHA; BARBOSA; HECK (2014) avaliaram a ocorrência de OTA em 100 amostras de leite materno coletadas em bancos de leite e relataram que 66% ($N = 66$) estavam contaminadas com concentrações que variavam de 1 a 21 ng/L. Também no Brasil, ISHIKAWA et al. (2016) avaliaram a ocorrência de AFM₁ em 94 amostras de leite materno e reportaram que 5% ($n = 5$) das amostras continham AFM₁ em concentrações

que variavam de 13 a 25 ng/L. Em contraste com estes estudos, TONON et al. (2018) avaliaram a presença de OTA e AFM₁ em 86 amostras de leite materno e relataram que em nenhuma das amostras foi detectada a ocorrência de ambas as micotoxinas. No Chile, MUÑOZ et al. (2014) avaliaram a incidência de OTA em 50 amostras de leite materno e semelhante ao reportado por IHA; BARBOSA; HECK (2014), os autores relataram uma alta ocorrência desta micotoxina 80% ($n = 40$), com concentrações que variaram de 10 a 186 ng/L. Na Colômbia, DIAZ; SÁNCHEZ (2015) avaliaram a ocorrência de AFM₁ em 50 amostras de leite materno e em contraste com o presente estudo, reportaram uma ocorrência de 90% ($n = 45$), com concentrações variando de 1 a 19 ng/L. No México, CANTÚ-CORNELIO et al. (2016) analisaram a incidência de AFM₁ em 112 amostras de leite materno e, assim como na Colômbia, os autores reportaram uma alta incidência de AFM₁, 89% ($n = 100$), com concentrações variando de 3 a 34 ng/L. Semelhante aos estudos anteriores, no Equador, ORTIZ et al. (2018) reportaram uma alta incidência de AFM₁ (86%, $n = 67$) em amostras de leite materno.

Alguns estudos de países mediterrânicos também tiveram incidência elevada de OTA e AFM₁ a partir das amostras de leite materno avaliadas. No Irã, KAMALI et al. (2017) avaliaram a ocorrência de OTA em 84 amostras de leite materno e relataram que todas as amostras (100%) continham OTA, em concentrações que variavam de 110 a 7340 ng/L. Também no Irã, (AZARIKIA; MAHDAVI; NIKNIAZ, 2018) analisaram a incidência de AFM₁ em 88 amostras de leite materno e semelhante ao estudo anterior, os autores reportaram a incidência desta micotoxina em todas as amostras, porém, em baixas concentrações (entre 1 e 14 ng/L). Na Turquia, DINLEYICI et al. (2018) avaliaram a presença de OTA em 90 amostras de leite materno e reportaram que 100% das amostras estavam contaminadas, com concentrações que variavam entre 761 a 1724 ng/L. Diferentemente deste estudo, também na Turquia, ALTUN; GÜRBÜZ; AYAĞ (2017) reportaram alta incidência de AFM₁ (88%, $n = 66$) nas amostras de leite materno analisadas, com concentrações variando de 10 a 80 ng/L. O presente estudo não encontrou níveis detectáveis de AFM₁ nas amostras de leite materno analisadas. Resultados de estudos europeus corroboram com os resultados dos estudos brasileiros, apresentando uma maior incidência de OTA em relação a AFM₁. Na Itália, BIASUCCI et al. (2011) avaliaram a ocorrência de OTA em 57 amostras de leite materno e relataram que 79% ($n = 45$) das amostras continham OTA, com concentrações que variavam de 1 a 75 ng/L. Em nosso estudo, OTA apresentou baixa incidência nas amostras analisadas, 4% ($n = 3$) das amostras foram detectadas com OTA, com uma concentração média de $1,3 \pm 1,8$ ng/mL. Em Portugal, BOGALHO et al. (2018) avaliaram a ocorrência de AFM₁ em 67 amostras de leite materno e relataram que 33%

($n = 22$) continham AFM₁, em concentrações variando de 0 a 11 ng/L. Em um estudo realizado na Tanzânia, MAGOHA et al. (2014a) avaliaram a incidência de FB₁ em 131 amostras de leite materno e reportaram uma incidência elevada, 44% ($n = 58$) das amostras continham FB₁ em concentrações que variavam de 6 a 471 ng/mL. Neste estudo, FB₁ apresentou baixa incidência, apenas 1,3% ($n = 1$) das amostras de leite materno avaliadas continha a micotoxina com uma concentração média de $2,8 \pm 0,8$ ng/mL.

A ocorrência de micotoxinas em leite materno é bastante variável, dependendo do alimento ingerido pela mãe, do estado nutricional e ingestão diária da mesma, tipo de análise para detecção da micotoxina, bem como do país, região em que se vive, o qual pode influenciar nas condições climáticas, tipos de fungos e micotoxinas produzidas. Comparando-se com os estudos da literatura e com os resultados encontrados no presente estudo, a incidência de micotoxinas nas amostras de leite materno foi baixa e, em contraste com outras pesquisas, apresentaram baixas concentrações.

4.4.3 Biomarcadores de micotoxinas em urina humana

FRANCO et al. (2019) e ROMERO et al. (2010) confirmaram a ocorrência de AFM₁ em amostras de urina de residentes do Estado de São Paulo, Brasil, com 12% e 78% das amostras de urina positivas para AFM₁, respectivamente, portanto, o presente estudo (57%) é intermediário dos dois relatos (Tabela 17) Além disso, (JAGER et al., 2014) apresentaram uma frequência muito semelhante à este estudo, com 61% de amostras positivas, porém os níveis foram inferiores aos mostrados, com média de $0,0012 \pm 0,002$ ng/mg de creatinina.

Em contraste com este estudo, FRANCO et al. (2019) detectaram DON em 88% das amostras de urina com nível máximo de 72,439 ng/mg de creatinina, maior do presente estudo (18% e nível máximo de 36,56 ng/mg de creatinina). Eles também encontraram OTA e FB em 27% e 23% do total de amostras de urina, respectivamente, sendo neste estudo apresentados 8% e 0% para eles. Essas diferenças podem ocorrer porque FRANCO et al. (2019) analisaram pessoas que moram em áreas rurais e têm contato direto e diário com grãos, e aqui as voluntárias são mulheres lactantes que moram na cidade. Um estudo realizado em Portugal, MARTINS et al., (2019) encontraram maiores porcentagens de micotoxinas na população analisada, que apresentou 53%, 24%, 24% e 1% das amostras de urina acima do LOQ, para ZEA, DON, OTA e FB₁, respectivamente.

4.4.4 Estimativa da exposição às micotoxinas através de níveis urinários

JAGER et al. (2014) e FRANCO et al. (2019) calcularam a IDP para AFs na dieta de voluntários no Estado de São Paulo, baseados em níveis de AFM₁ na urina, obtendo valores de 0,00042 µg/kg p.c./dia (para mulheres) e $0,001 \pm 0,002$ µg/kg p.c./dia, respectivamente, que são inferiores aos do presente estudo, que apresentou IDP média de $1,58 \pm 6$ µg/kg p.c./dia (Tabela 18).

O presente estudo indicou que a IDP média da OTA ($5,07 \pm 8,00$ µg/kg p.c./dia), com base nos níveis urinários, excedeu os valores estabelecidos de IDT de 0,016 µg/kg p.c./dia (FAO/OMS, 2007), o que era esperado, devido aos níveis encontrados no leite materno. Outro estudo confirma a OTA acima do limite tolerável na urina de residentes brasileiros, com níveis médios de OTA em $0,377 \pm 0,951$ µg/kg p.c./dia (FRANCO et al., 2019). O valor diário excedente recomendado para a OTA também foi detectado em outras regiões, como China (média de 0,221 µg/kg p.c./dia) (FAN et al., 2019) e em Portugal, em um estudo realizado com crianças, (0,033) (SILVA et al., 2019).

Para o DON, os resultados mostram que a IDP média baseada em níveis urinários estão próximos dos valores de IDT estabelecidos de 1,0 µg/kg p.c./dia (FAO/WHO, 2011). FRANCO et al. (2019) obtiveram níveis médios de IDP para DON ($84,914 \pm 469,333$ µg/kg p.c./dia) nas urinas brasileiras, muito maior para este estudo ($1,09 \pm 0,71$ µg/kg p.c./dia). Diferentemente destes resultados, os níveis de IDP abaixo do tolerável foram detectados na China, com média de 0,164 µg/kg p.c./dia (FAN et al., 2019) e em três países europeus (Reino Unido, Itália e Noruega) com IDP média de 0,329 µg/kg p.c./dia (SANTIS et al., 2019).

Os níveis médios de IDP detectados para ZEA ($0,05 \pm 0,06$ µg/kg p.c./dia) ficaram abaixo dos valores de referência (0,25 µg/kg p.c./dia) da EFSA (2016). FRANCO et al. (2019) confirmaram que a IDP de ZEA com base em dados de urina ($0,002 \pm 0,004$ µg/kg p.c./dia) na urina brasileira está abaixo do tolerável.

4.4.5 Caracterização de risco

Este estudo apresentou valores de HQ superiores a 1 em biomarcadores urinários, o que indica preocupação de saúde para DON e OTA (Tabela 19). Outro estudo realizado no Brasil também encontrou um QG maior que 1 em biomarcadores urinários para DON e OTA (FRANCO ET AL., 2019). FB e ZEA indicaram um nível tolerável de exposição de mulheres lactantes avaliadas no presente estudo. Estes valores foram diferentes dos reportados em Portugal, com $HQ > 1$ para FB₁ (MARTINS et al., 2019) e $HQ < 1$ para DON (VIEGAS et al., 2018) (VIEGAS et al., 2018).

O MoE de 1,50 para a exposição à AFM₁ em nosso estudo (Tabela 20) apresentou uma exposição mais preocupante do que outro estudo também realizado no Brasil (258,29 e 458,71) (FRANCO et al., 2019). No entanto, os valores de MoE nos dois estudos (<10.000) indicam um alto risco à saúde como consequência da exposição às AFs em residentes no Brasil (BENFORD; LEBLANC; SETZER, 2010).

Em conclusão, as micotoxinas mais frequentes encontradas nas amostras de urina foram as aflatoxinas, sendo AFM₁ e AFP₁ detectadas em 62% das amostras de urina, com 57% das amostras positivas e nível médio de 0,16 ng/mg de creatinina (nível máximo de 27,56 ng/mg de creatinina). O maior valor de IDP encontrado foi de $5,07 \pm 8,00$ µg/kg p.c./dia para OTA, assim como os valores de HQ maiores que 1 foram também observados para esta micotoxina (316,79) e para DON próximo ao limite com 1,09. A IDP média para OTA baseada em níveis urinários excedeu os valores estabelecidos de IDT de 0,016 µg/kg p.c./dia, resultado esperado devido aos níveis encontrados no leite materno. Para DON, os resultados mostram que a IDP média baseada em níveis urinários está próximo dos valores de IDT estabelecidos de 1,0 µg/kg p.c./dia. O MoE calculado para AFM₁ apresentou-se abaixo do nível de referência (10.000). O leite materno apresentou uma baixa incidência de micotoxinas, sendo a maior concentração média encontrada de $5,0 \pm 2,3$ ng/mL para FBs. OTA apresentou uma concentração média de 1.3 ± 1.8 ng/mL. Embora tenha sido observada uma baixa incidência de micotoxinas no leite materno, os níveis detectáveis podem representar sérios problemas para a saúde de lactantes e lactentes. Os resultados demonstraram uma clara exposição dessa população à AF, indicando um potencial problema de saúde. Embora a frequência de amostras positivas seja baixa para OTA e DON, entre elas, o nível de exposição encontrado é preocupante. Algumas incertezas podem ocorrer quanto à avaliação da exposição às micotoxinas, levando-se em consideração os alimentos consumidos pelas voluntárias relatados no IR24h e a forma de armazenamento dos alimentos. Portanto, são necessários estudos para a avaliação da exposição de lactantes às múltiplas micotoxinas para que seja possível a realização mais precisa da correlação da excreção de micotoxinas em urina e leite materno, baseados em dados do consumo dos alimentos.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (#Grant 2017/12956-2) pelo apoio financeiro e bolsas de estudo.

Referências

- ALTUN, S.; GÜRBÜZ, S.; AYAĞ, E. Aflatoxin M₁ in human breast milk in southeastern Turkey. **Mycotoxin Research**, Heidelberg, v. 33, n. 2, p. 103–107, 2017.
- ALVITO, P. C. et al. Occurrence of aflatoxins and ochratoxin A in baby foods in Portugal. **Food Analytical Methods**, New York, v. 3, n. 1, p. 22–30, 2010.
- AZARIKIA, M.; MAHDAVI, R.; NIKNIAZ, L. Occurrence and dietary factors associated with the presence of aflatoxin B₁ and M₁ in breast milk of nursing mothers in Iran. **Food Control**, Kidlington, v. 86, p. 207–213, 2018.
- BARREIRA, M. J.; ALVITO, P. C.; ALMEIDA, C. M. M. Occurrence of patulin in apple-based-foods in Portugal. **Food Chemistry**, Washington, v. 121, n. 3, p. 653–658, 2010.
- BENFORD, D.; LEBLANC, J. C.; SETZER, R. W. Application of the margin of exposure (MoE) approach to substances in food that are genotoxic and carcinogenic. Example: Aflatoxin B₁ (AFB₁). **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 48, n. 1, p. 34–41, 2010.
- BHATNAGAR, D.; YU, J.; ERLICH, K. C. Toxins of filamentous fungi. **Chemical Immunology and Allergy**, Basel, v. 81, p. 167–206, 2002.
- BIASUCCI, G. et al. The presence of ochratoxin A in cord serum and in human milk and its correspondence with maternal dietary habits. **European Journal of Nutrition**, Heidelberg, v. 50, n. 3, p. 211–218, 2011.
- BOGALHO, F. et al. Exposure assessment of Portuguese infants to Aflatoxin M₁ in breast milk and maternal social-demographical and food consumption determinants. **Food Control**, Kidlington, v. 90, p. 140–145, 2018.
- BORG, D. et al. Cumulative health risk assessment of 17 perfluoroalkylated and polyfluoroalkylated substances (PFASs) in the Swedish population. **Environment International**, New York, v. 59, p. 112–123, 2013.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC 07/2011**, de 22 de fevereiro de 2011 da ANVISA. Estabelece limites para micotoxinas em alimentos, principalmente em grãos. Portal da Anvisa de 22 de fevereiro de 2011.
- BRAUN, D. et al. Monitoring early-life mycotoxin exposures via LC-MS/MS breast milk analysis. **Analytical Chemistry**, Amsterdam, v. 90, n. 24, p. 14569–14577, 2018.
- BRYDEN, W. L. Mycotoxins in the food chain: Human health implications. **Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition**, v. 16, p. 95–101, 2007.
- CANTÚ-CORNELIO, F. et al. Occurrence and factors associated with the presence of aflatoxin M₁ in breast milk samples of nursing mothers in central Mexico. **Food Control**, Kidlington, v. 62, p. 16–22, 2016.

COUNCIL FOR AGRICULTURAL SCIENCE AND TECHNOLOGY. **Mycotoxins: risks in plant, animal and human systems**. Ames: CAST, 2003. 191 p. (Task Force Report, 139).

DI GREGORIO, M. C. et al. Determination of aflatoxin B₁-lysine in pig serum and plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Analytical Toxicology**, Niles IL, v. 41, n. 3, p. 236–241, 2017.

DIAZ, G. J.; SÁNCHEZ, M. P. Determination of aflatoxin M₁ in breast milk as a biomarker of maternal and infant exposure in Colombia. **Food Additives & Contaminants: Part A**, Abingdon, v. 32, n. 7, p. 1192–1198, 2015.

DINLEYICI, M. et al. Human mature milk zearalenone and deoxynivalenol levels in Turkey. **Neuroendocrinology Letters**, Weinheim v. 39, n. 4, p. 325–330, 2018.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY. International Frameworks Dealing with Human Risk Assessment of Combined Exposure to Multiple Chemicals. **EFSA Journal**, v. 11, p. 1–69, 2013.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY. Appropriateness to set a group health-based guidance value for zearalenone and its modified forms. **EFSA Journal**, v. 14, p. 4, 2016.

EURACHEM. **The fitness for purpose of analytical methods: a laboratory guide to method validation and related topics**. Teddington, UK: LGC, 1998.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS/WORLD HEALTH ORGANIZATION. Evaluation of certain food additives and contaminants: sixty-eighth report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. **WHO Technical Report Series**, v. 947, p. 1–225, 2007.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS/WORLD HEALTH ORGANIZATION. Evaluation of certain food additives and contaminants: seventyfourth report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. **WHO Technical Report Series**, v. 966, p. 55–70, 2011a.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS/WORLD HEALTH ORGANIZATION. Evaluation of certain contaminants in food: seventy-second report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. **WHO Technical Report Series**, v. 959, p. 1–105, 2011b.

FAN, K. et al. Determination of multiple mycotoxins in paired plasma and urine samples to assess human exposure in Nanjing, China. **Environmental Pollution**, Barking, v. 248, p. 865–873, 2019.

FLORES-FLORES, M. E.; GONZÁLEZ-PEÑAS, E. An LC–MS/MS method for multi-mycotoxin quantification in cow milk. **Food Chemistry**, Washington, v. 218, p. 378–385, 2017.

- FRANCO, L. T. et al. Assessment of mycotoxin exposure and risk characterization using occurrence data in foods and urinary biomarkers in Brazil. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 128, p. 21–34, 2019. tirar a letra a-2019a do texto
- GAMBACORTA, S. et al. Validation study on urinary biomarkers of exposure for aflatoxin B₁, ochratoxin A, fumonisin B₁, deoxynivalenol and zearalenone in piglets. **World Mycotoxin Journal**, Wagenigen, v. 6, n. 3, p. 299–308, 2013.
- GROOPMAN, J. D.; KENSLER, T.W. The light at the end of the tunnel for chemical specific biomarkers: daylight or headlight. **Carcinogenesis**, Oxford, v. 20, p. 1-11, 1999.
- GÜRBAY, A. et al. Exposure of newborns to aflatoxin M₁ and B₁ from mothers' breast milk in Ankara, Turkey. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 48, p. 314–319, 2010.
- ISHIKAWA, A. T. et al. Exposure assessment of infants to aflatoxin M₁ through consumption of breast milk and infant powdered milk in Brazil. **Toxins**, Basel, v. 8, n. 9, p. 246, 2016.
- JAGER, A. V. et al. Determination of urinary biomarkers for assessment of short-term human exposure to aflatoxins in São Paulo, Brazil. **Toxins**, Basel, v. 6, n. 7, p. 1996–2007, 2014.
- JUAN, C. et al. Presence of mycotoxin in commercial infant formulas and baby foods from Italian market. **Food Control**, Kidlington, v. 39, n. 1, p. 227–236, 2014.
- KAMALI, A. et al. Detection of ochratoxin A in human breast milk in Jiroft city, South of Iran. **Current Medical Mycology**, v. 3, n. 3, p. 1–4, 2017.
- MAGAN, N.; ALDRED, D. Post-harvest control strategies: Minimizing mycotoxins in the food chain. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 119, n. 1-2, p. 131–139, 2007.
- MAGOHA, H. et al. Association between aflatoxin M₁ exposure through breast milk and growth impairment in infants from Northern Tanzania. **World Mycotoxin Journal**, Wagenigen, v. 7, n. 3, p. 277–284, 2014.
- IHA, M. H.; BARBOSA, C. B.; HECK, A. R.; TRUCKSESSC, M. W. Aflatoxin M₁ and ochratoxin A in human milk in. **Food Control**, Kidlington, v. 40, p. 310–313, 2014.
- MARTINS, C. et al. Exposure assessment of Portuguese population to multiple mycotoxins: The human biomonitoring approach. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, Germany, v. 222, n. 6, p. 913–925, 2019.
- MUÑOZ, K. et al. Exposure of infants to ochratoxin A with breast milk. **Archives of Toxicology**, New York, v. 88, n. 3, p. 837–846, 2014.
- ORTIZ, J. et al. Multiple mycotoxin exposure of infants and young children via breastfeeding and complementary/weaning foods consumption in Ecuadorian highlands. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 118, p. 541–548, 2018.

- RIBANI, M. et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, São Paulo, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.
- RILEY, R. T. et al. The kinetics of urinary fumonisin B₁ excretion in humans consuming maize-based diets. **Molecular Nutrition and Food Research**, Weinheim, v. 56, n. 9, p. 1445–1455, 2012.
- ROMERO, A. D. C. et al. Occurrence of AFM₁ in urine samples of a Brazilian population and association with food consumption. **Food Control**, Kidlington, v. 21, n. 4, p. 554–558, 2010.
- RUBERT, J. et al. Evaluation of mycotoxins and their metabolites in human breast milk using liquid chromatography coupled to high resolution mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 820, p. 39–46, 2014.
- SADEGHI, N. et al. Incidence of aflatoxin M₁ in human breast milk in Tehran, Iran. **Food Control**, Kidlington, v. 20, n. 1, p. 75–78, 2009.
- SANTIS, B. et al. Determination of Deoxynivalenol Biomarkers in Italian Urine Samples. **Toxins**, Basel, v. 11, p. 441, 2019.
- ŠARKANJ, B. et al. Ultra-sensitive, stable isotope assisted quantification of multiple urinary mycotoxin exposure biomarkers. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 1019, p. 84–92, 2018.
- SAY, B. et al. The effect of lactational mastitis on the macronutrient content of breast milk. **Early Human Development**, Amsterdam, v. 98, p. 7–9, 2016.
- SCHLATTER, C.; STUDER-ROHR, J.; RÁSONYI, T. Carcinogenicity and kinetic aspects of ochratoxin A. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 13, p. 43.44, 1996.
- SILVA, L. J. G. et al. Ochratoxin A and Portuguese children: Urine biomonitoring, intake estimation and risk assessment. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, 2019.
- SOLFRIZZO, M. et al. Simultaneous LC-MS/MS determination of aflatoxin M₁, ochratoxin A, deoxynivalenol, de-epoxydeoxynivalenol, α and β -zearalenols and fumonisin B₁ in urine as a multi-biomarker method to assess exposure to mycotoxins. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Heidelberg, v. 401, n. 9, p. 2831–2841, 2011.
- SOLFRIZZO, M.; GAMBACORTA, L.; VISCONTI, A. Assessment of multi-mycotoxin exposure in southern Italy by urinary multi-biomarker determination. **Toxins**, Basel, v. 6, n. 2, p. 523–538, 2014a. tirar as letras a e b desta referencia no texto
- TENA, D. et al. Lactational mastitis caused by *Streptococcus lactarius*. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, New York, v. 85, n. 4, p. 490–492, 2016.
- TONON, K. M. et al. Human milk AFM₁, OTA, and DON evaluation by liquid chromatography tandem mass spectrometry and their relation to the Southern Brazil nursing mothers' diet. **Journal of Food Safety**, v. 38, n. 3, p. e12452, 2018.

TURNER, P. C. et al. A comparison of deoxynivalenol intake and urinary deoxynivalenol in UK adults. **Biomarkers**, London, v. 15, n. 6, p. 553–562, 2010.

VASILIADES, J. Reaction of alkaline sodium picrate with creatinine: I. Kinetics and mechanism of formation of the mono creatinine picric acid complex. **Clinical Chemistry**, Baltimore, v. 22, n. 10, p. 1664–1671, 1976.

VIDAL, A. et al. Mycotoxin Biomarkers of Exposure: A Comprehensive Review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, Chicago, v. 17, n. 5, 2018a.

VIEGAS, S. et al. Exposure assessment to mycotoxins in a Portuguese fresh bread dough company by using a multi-biomarker approach. **Toxins**, Basel, v. 10, n. 9, 2018.

WILD, C. P.; GONG, Y. Y. Mycotoxins and human disease: A largely ignored global health issue. **Carcinogenesis**, Oxford, v. 31, n. 1, p. 71-82, 2009.

ZAIN, M. E. Impact of mycotoxins on humans and animals. **Journal of Saudi Chemical Society**, v. 15, n. 2, p. 129–144, 2011.

ZHU, J. et al. Correlation of dietary aflatoxin B₁ levels with excretion of aflatoxin M₁ in human urine. **Cancer Research**, Baltimore, v. 47, n. 7, p. 1848–1852, 1987.

5 Considerações finais

O presente estudo demonstrou que altos níveis de ocorrência de AFs, FBs e ZEA foram encontrados em alimentos consumidos por mulheres lactantes em Pirassununga, estado de São Paulo, Brasil e com 15% das amostras apresentando de 2 à 3 tipos de micotoxinas. Estes dados são preocupantes, pois o leite materno é de grande importância como principal fonte nutricional para lactentes de até 6 meses, embora também possa ser a primeira via de exposição às micotoxinas. Além disso, vários alimentos apresentaram níveis acima do LMT brasileiro para as micotoxinas avaliadas, e como o estudo foi direcionado às mulheres em aleitamento, os dados são preocupantes para a saúde não apenas das lactantes, mas também dos recém-nascidos, pois altos níveis de micotoxinas podem ser transferidos para o leite materno, um alimento essencial para o desenvolvimento do bebê.

Além disso, o estudo também permitiu avaliar e caracterizar, pela primeira vez no Brasil, o risco da exposição de mulheres lactantes às micotoxinas através da dieta, principalmente às AFs, FBs, OTA e ZEA relacionado ao consumo de diferentes tipos de produtos alimentícios fornecidos pelas próprias voluntárias da pesquisa. Os dados demonstraram um risco não tolerável ($HQ > 1$) para as micotoxinas avaliadas através do consumo dos produtos alimentícios analisados, indicando altos níveis de exposição de mulheres lactantes às micotoxinas alimentares, confirmando a preocupação com a possível transferência de micotoxinas para o leite materno.

As análises de biomarcadores de micotoxinas nas amostras de urina permitiram verificar que 62% das amostras continham AFM_1 , a qual obteve uma Margem de Exposição (MoE) calculado abaixo do nível de referência (10000). Já para a OTA, os valores de HQ foram maiores que 1 (316,79) e o valor da IDP para esta micotoxina excedeu os valores de IDT (0,016 $\mu\text{g/kg p.c./dia}$). Porém, este resultado era esperado devido aos níveis de OTA encontrados no leite materno.

O leite materno apresentou uma baixa incidência de micotoxinas, sendo a maior concentração média encontrada de $5,0 \pm 2,3 \text{ ng/mL}$ para FBs. OTA apresentou uma concentração média de $1,3 \pm 1,8 \text{ ng/mL}$. O desenvolvimento do método analítico para a análise de micotoxinas no leite materno demonstrou que ocorreu um elevado efeito de supressão do sinal pela matriz para as micotoxinas avaliadas, através dos valores de SSE encontrados. Porém, os valores de LOD e LOQ para as micotoxinas ficaram próximos aos encontrados no estudo original. Levando-se em consideração que o procedimento de extração não envolve muitas etapas de transferência ou purificação em colunas, isto pode acarretar em perdas dos analitos

durante o processo de extração. Mesmo considerando a praticidade e rapidez do método analítico, uma desvantagem do mesmo é o elevado efeito de matriz esperado, pois o método estabelece reduzida purificação dos extratos justificando os resultados adquiridos na validação. Com os resultados obtidos na validação do método para a urina pôde-se observar que os sinais de AFM₁, ZEN e FB₁ foram suprimidos no LC-MS/MS, se comparados com os valores de OTA e DON. Assim como o método de análise para o leite materno, o processo de análise para a urina não utiliza etapas de purificação (exemplo: colunas de imunoafinidade), o que poderia diminuir os efeitos de matriz e melhorar os resultados analíticos.

Embora tenha sido observada uma baixa incidência de micotoxinas no leite materno, os níveis detectáveis podem representar sérios problemas para a saúde de lactantes e lactentes. Os resultados demonstraram uma clara exposição dessa população às AFs, indicando um potencial problema de saúde. Algumas incertezas podem ocorrer quanto à avaliação da exposição às micotoxinas, levando-se em consideração os alimentos consumidos pelas voluntárias relatados no IR24h e a forma de armazenamento dos alimentos. Portanto, são necessários mais estudos para a avaliação da exposição de lactantes às múltiplas micotoxinas para que seja possível a realização mais precisa da correlação da excreção de micotoxinas em urina e leite materno, baseados em dados do consumo dos alimentos.

ANEXOS

ANEXO A – Aprovação do CEP/FZEA

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação de biomarcadores de exposição às micotoxinas em lactantes na região de Ribeirão Preto/SP.

Pesquisador: Carlos Augusto Fernandes de Oliveira

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 80104017.6.0000.5422

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.444.461

Apresentação do Projeto:

A pesquisa visa avaliar a exposição de mulheres lactantes voluntárias da região de Ribeirão Preto às principais micotoxinas que ocorrem nos alimentos no Brasil, através da análise dos alimentos e da determinação de biomarcadores de exposição às micotoxinas mencionadas na urina e no leite materno de lactantes voluntárias.

Objetivo da Pesquisa:

O principal objetivo é avaliar os níveis de micotoxinas em mulheres lactantes, através da analítica previamente validada para a determinação simultânea de 9 micotoxinas nos alimentos: arroz, feijão, trigo, amendoim, milho e derivados, consumidos pelas voluntárias do estudo e determinar a correlação entre a excreção de micotoxinas residuais na urina e no leite, e a ingestão dos alimentos.

As voluntárias serão recrutadas nos Centros Médicos Sociais e Comunitários ligados ao Departamento de Medicina Social da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP/USP). As voluntárias terão mais de 18 anos e os alimentos serão coletados pelas próprias mulheres; uma amostra de aproximadamente 250 g de amendoim e milho em grão ou espiga e farinha de trigo armazenados nas residências dos voluntários, e que não sofreram nenhum tipo de processamento e as amostras serão encaminhadas para o Laboratório de Microbiologia e Micotoxilogia de Alimentos (LMMA/FZEA/USP) para execução das análises.

Endereço: Avenida Duque de Caxias Norte, 225
 Bairro: Campus Universitário da USP CEP: 13.635-900
 UF: SP Município: PIRASSUNUNGA
 Telefone: (16)3585-4299 Fax: (16)3585-4114 E-mail: cepfz@usp.br

Continuação do Parecer: 2.444.481

Concomitantemente com a coleta das amostras será aplicado um questionário sobre a frequência de consumo destes alimentos.

A coleta de urina será realizada pela própria voluntária e encaminhado para a LMMA/FZEA/USP.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os riscos serão mínimos, uma vez que serão coletados amostras de alimentos, urina e leite todos realizados pelas voluntárias, sem qualquer intervenção do pesquisador.

Não haverá benefício direto aos voluntários.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa é inédita no Brasil e trará importantes informações sobre a incidência de micotoxinas na dieta de lactantes e sua excreção.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos de apresentação obrigatória foram apresentados.

Recomendações:

Aprovação da pesquisa.

Conclusões ou Pendências e Lista de inadequações:

NDA

Considerações Finais a critério do CEP:

Este CEPH/FZEA aprova o desenvolvimento do projeto e ressalta a necessidade da inclusão do centro co-participante Centros Médicos Sociais e Comunitários ligados ao Departamento de Medicina Social da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP/USP).

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_DO_PROJETO_1016090.pdf	24/11/2017 09:45:59		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_alterado_Projeto_Carlos_Oliveira.pdf	24/11/2017 09:44:04	Carlos Augusto Fernandes de Oliveira	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura	Projeto_Doutorado_Carolina_Coppa_Pr_of_Carlos_Oliveira.pdf	30/10/2017 15:24:37	Carlos Augusto Fernandes de	Aceito

Endereço: Avenida Duque de Caxias Norte, 225
Bairro: Campus Universitário da USP CEP: 13.635-900
UF: SP Município: PIASSUNUNGA
Telefone: (19)3585-4200 Fax: (19)3585-4114 E-mail: cepfz@usp.br

**USP - FACULDADE DE
ZOOTECNIA E ENGENHARIA
DE ALIMENTOS DA**

Continuação do Parecer: 2.446.401

Investigador	Projeto_Doutorado_Carolina_Coppa_Prof_Carlos_Oliveira.pdf	30/10/2017 15:24:37	Oliveira	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Termo_responsabilidade_Prof_Carlos_Oliveira.pdf	30/10/2017 15:23:50	Carlos Augusto Fernandes de Oliveira	Aceito
Cronograma	Cronograma_de_atividades.pdf	30/10/2017 15:21:44	Carlos Augusto Fernandes de Oliveira	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto_para_pesquisa_envolvendo_seres_humanos_Prof_Carlos_Oliveira.pdf	30/10/2017 15:20:20	Carlos Augusto Fernandes de Oliveira	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

PIRASSUNUNGA, 18 de Dezembro de 2017

Assinado por:
Daniela dos Santos Martins
(Coordenador)

Endereço: Avenida Duque de Caxias Norte, 225
Bairro: Campus Universitário da USP CEP: 13.635-900
UF: SP Município: PIRASSUNUNGA
Telefone: (19)3565-4200 Fax: (19)3565-4114 E-mail: cepcon@usp.br

ANEXO B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

Você está sendo convidada a participar, como voluntária, da pesquisa Avaliação de Biomarcadores de Exposição às Micotoxinas em Lactantes na Região de Ribeirão Preto/SP, Brasil. No caso de você concordar em participar, favor assinar ao final do documento. Sua participação não é obrigatória, e a qualquer momento, você poderá desistir de participar e retirar seu consentimento. Sua recusa não trará nenhum prejuízo em sua relação com o pesquisador ou com a instituição.

Você receberá uma cópia deste termo onde consta o telefone e endereço do pesquisador principal, podendo tirar dúvidas do projeto e de sua participação.

Você tem direito a receber uma via do documento e que tem garantia de indenização diante de eventuais danos decorrentes da pesquisa, conforme artigos IV.3 e V.7 da resolução 466 de 2012 do CNS.

Nome da pesquisa: Avaliação de Biomarcadores de Exposição às Micotoxinas em Lactantes na Região de Ribeirão Preto/SP.

Pesquisador(a) responsável: Prof. Dr. Carlos Augusto Fernandes de Oliveira

Endereço: Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos- FZEA/USP. Av. Duque de Caxias Norte, 225 – Campus da USP, CEP 13635-900, Pirassununga/SP.

Telefone: (19) 3565-4173 / 4179

Pesquisadores participantes: Carolina Fernanda Sengling Cebin Coppa, Roice Eliana Rosim, Larissa Garcia Alves, José Simon Camelo Junior, Fernando Silva Ramalho, Leandra Nária Zambelli Ramalho, Eliana Maria Bianchini Barnabé.

Justificativa: Justifica-se a realização desta pesquisa pela escassez de estudos relacionados à detecção de aflatoxina M₁ e outras micotoxinas no leite materno e na urina de mulheres lactantes, por meio de biomarcadores, tendo em vista, ainda, os seguintes aspectos:

- No Brasil, não há estudos apresentando dados relacionados à contaminação do leite materno com outras micotoxinas além da aflatoxina M₁ e ocratoxina A, que permitam averiguar os riscos das crianças lactentes quanto à exposição de toxinas através do consumo do leite, alimento indispensável para o desenvolvimento do recém-nascido.
- A determinação de biomarcadores para a avaliação da exposição humana às micotoxinas é de grande importância para a Saúde Pública, além de fundamental para avaliar o resultado de esforços para o controle da contaminação dos alimentos, em particular, a eficácia da legislação brasileira que estabelece limites de tolerância para micotoxinas.

Objetivos do projeto: O objetivo do trabalho é avaliar a exposição de mulheres lactantes às principais micotoxinas que ocorrem nos alimentos no Brasil (aflatoxinas, fumonisinas, ocratoxina A, zearalenona e deoxinivalenol), através da análise dos alimentos e da determinação de biomarcadores de exposição às micotoxinas mencionadas na urina e no leite materno de lactantes voluntárias da região de Ribeirão Preto/SP.

Procedimentos: Se concordar em participar da pesquisa, inicialmente você terá que responder a um questionário sobre dados demográficos (gênero, idade, escolaridade), seus hábitos alimentares, qual a frequência e quantidade de produtos à base de grãos (exemplos: arroz, feijão, milho, trigo, amendoim e derivados), além da forma que adquire esses alimentos, plantio ou compra de produtos. Os procedimentos do estudo serão realizados da seguinte forma: será coletada uma amostra de aproximadamente 250 gramas de arroz, feijão, milho, trigo, amendoim e derivados (ou outros cereais, se disponíveis) antes de processar (cozinhar, cortar). Será fornecida embalagem adequada para a coleta dos alimentos. No dia posterior, será coletada a amostra da primeira urina do dia. Será fornecido recipiente adequado para coletar a urina. Para a coleta do leite materno, a voluntária poderá realizá-la a qualquer hora do dia, no momento em que se sentir mais confortável. Será fornecido recipiente adequado para coletar o leite materno.

Custo/reembolso para o participante: Você não terá que arcar com nenhum gasto decorrente da sua participação, além de fornecer uma amostra dos alimentos, da urina e do leite materno. Você não receberá qualquer espécie de reembolso ou gratificação devido à participação na pesquisa.

Confidencialidade da pesquisa: Os pesquisadores irão tratar a sua identidade com padrões profissionais de sigilo. Seu nome ou o material que indique a sua participação não será liberado sem a sua permissão. Você não será identificado(a) em nenhuma publicação que possa resultar deste estudo. Serão divulgados dados diretamente relacionados aos objetivos da pesquisa.

Outras informações:

- Serão excluídas da pesquisa mulheres lactantes que tenham menos de 18 anos de idade ou doenças crônicas há menos de 2 anos;

- As participantes do estudo terão risco mínimo, pois haverá somente coleta de amostras de alimentos, leite e urina das voluntárias, sem qualquer tipo de intervenção. As mulheres lactantes não serão expostas a qualquer tipo de dano nem de obrigatoriedade, a participação será voluntária;
- O experimento deverá fornecer dados inéditos no Brasil sobre a incidência de micotoxinas na dieta de lactantes e respectivos biomarcadores na urina e no leite materno.

Assinatura do Pesquisador Responsável: _____

Consentimento formal de participação no projeto de pesquisa intitulado “Avaliação de Biomarcadores de Exposição às Micotoxinas em Lactantes na Região de Ribeirão Preto/SP”

Nome: _____

Endereço: _____

Cidade: _____ CEP: _____ Fone: _____

Eu, _____ RG: _____,
CPF: _____, abaixo assinado, concordo em participar do estudo “Avaliação de Biomarcadores de Exposição às Micotoxinas em Lactantes na Região de Ribeirão Preto/SP”.

Tenho pleno conhecimento da justificativa, objetivos, dos procedimentos a serem executados, custo/reembolso dos participantes, confidencialidade da pesquisa, bem como da possibilidade de receber esclarecimentos sempre que considerar necessário. Será mantido sigilo quanto a identidade da minha pessoa e zelo a minha privacidade. Ao mesmo tempo, assumo o compromisso de seguir as recomendações estabelecidas pelos pesquisadores e que posso retirar o consentimento a qualquer momento, sem que isso leve a qualquer penalidade. Declaro ainda que recebi uma cópia desse Termo de Consentimento.

Pesquisador responsável: Prof. Dr. Carlos Augusto Fernandes de Oliveira – Professor Titular, Universidade de São Paulo, FZEA – USP, Departamento de Engenharia de Alimentos. Contatos: carlosaf@usp.br / (19) 3565 – 4173 / 4179.

Eu li e entendi todas as informações contidas neste documento.

_____, ____ de _____ de _____. (local e data)

Assinatura: _____

ANEXO C – Questionário de Inquérito Recordatório (IR24h)

QUESTIONÁRIO DE INQUÉRITO RECORDATÓRIO DE 24 HORAS (IR24H)

Nome do Voluntário:	Data:
Quais os produtos abaixo, que você forneceu amostras para o estudo, você consumiu nas últimas 24 horas?	
() Arroz (cozido). Quantidade: _____	
() Feijão (cozido). Quantidade: _____	
() Milho em grão (cozido, assado, etc). Quantidade: _____	
() Fubá de milho. Quantidade: _____	
() Bolo de milho. Quantidade: _____	
() Outro alimento à base de milho (Especifique: _____). Quantidade: _____	
() Bolo de farinha de trigo. Quantidade: _____	
() Pão. Quantidade: _____	
() Outro alimento à base de trigo (Especifique: _____). Quantidade: _____	
() Amendoim em grão. Quantidade: _____	
() Amendoim salgado (tipo japonês, frito e salgado, etc.). Quantidade: _____	
() Amendoim confeitado (coberto com chocolate, colorido, etc.). Quantidade: _____	
() Doce à base de amendoim (Especifique: _____). Quantidade: _____	
() Paçoca. Quantidade: _____	
() Outro alimento à base de amendoim (Especifique: _____). Quantidade: _____	
() Outro alimento à base de cereais (Especifique: _____). Quantidade: _____	
() Leite. Quantidade: _____	
() Queijo (qualquer tipo). Quantidade: _____	
() Outro alimento à base de leite (Especifique: _____). Quantidade: _____	

ANEXO D – Questionário de Frequência Alimentar (QFA)

QUESTIONÁRIO DE FREQUÊNCIA ALIMENTAR

1. Dados gerais

Nome: _____
 Endereço: _____
 Função: _____ Telefone: _____
 Data da Aplicação: _____

2. Quais os alimentos e as porções que você costuma comer? Por favor, responda a porção estimada.

Feijão cozido:

() ½ concha () 1 concha () 2 conchas Outros: _____
 () Nunca () Menos de 1 vez por mês () 1 a 2 vezes por semana () 3 a 4 vezes por semana () todos os dias () 2 vezes ao dia

Arroz cozido:

() ½ xícara () 1 xícara () 2 xícaras Outros: _____
 () Nunca () Menos de 1 vez por mês () 1 a 2 vezes por semana () 3 a 4 vezes por semana () todos os dias () 2 vezes ao dia

Polenta:

() 1 fatia () 2 fatias () 3 fatias Outros: _____
 () Nunca () Menos de 1 vez por mês () 1 a 2 vezes por semana () 3 a 4 vezes por semana () todos os dias () 2 vezes ao dia

Massas (macarrão, caneloni, panqueca, etc.):

() ½ prato () 1 prato () 2 pratos Outros: _____
 () Nunca () Menos de 1 vez por mês () 1 a 2 vezes por semana () 3 a 4 vezes por semana () todos os dias () 2 vezes ao dia

Pão francês, pão de forma, pão caseiro (preparados com farinha de trigo):

() 1 unidade/fatia () 2 unidades/fatias () 3 unidades/fatias Outros: _____
 () Nunca () Menos de 1 vez por mês () 1 a 2 vezes por semana () 3 a 4 vezes por semana () todos os dias () 2 vezes ao dia

Bolo ou pão de milho:

() 1 fatia média () 2 fatias médias () 3 fatias médias Outros: _____
 () Nunca () Menos de 1 vez por mês () 1 a 2 vezes por semana () 3 a 4 vezes por semana () todos os dias () 2 vezes ao dia

Crema de milho:

() ½ concha () 1 concha () 2 conchas Outros: _____
 () Nunca () Menos de 1 vez por mês () 1 a 2 vezes por semana () 3 a 4 vezes por semana () todos os dias () 2 vezes ao dia

Farinha de milho amarela (cuscuz, cuscuz salgado, taro):

() 2 colheres sopa () 4 colheres sopa () 6 colheres sopa Outros: _____
 () Nunca () Menos de 1 vez por mês () 1 a 2 vezes por semana () 3 a 4 vezes por semana () todos os dias () 2 vezes ao dia

Milho enfiado:

() 1 colher sopa () 2 colheres sopa () 3 colheres sopa Outros: _____
 () Nunca () Menos de 1 vez por mês () 1 a 2 vezes por semana () 3 a 4 vezes por semana () todos os dias () 2 vezes ao dia

Milho cozido:

() ½ espiga () 1 espiga () 2 espigas Outros: _____
 () Nunca () Menos de 1 vez por mês () 1 a 2 vezes por semana () 3 a 4 vezes por semana () todos os dias () 2 vezes ao dia

Grãos (lentilha, grão de bico, soja e feijão branco):

() 1 colher sopa () 2 colheres sopa () 3 colheres sopa Outros: _____
 () Nunca () Menos de 1 vez por mês () 1 a 2 vezes por semana () 3 a 4 vezes por semana () todos os dias () 2 vezes ao dia

Leite líquido:

() ½ xícara/copo () 1 xícara/copo () 2 xícaras/copos Outros: _____
 () Nunca () Menos de 1 vez por mês () 1 a 2 vezes por semana () 3 a 4 vezes por semana () todos os dias () 2 vezes ao dia

Leite em pó:

() 1 colher sopa () 2 colheres sopa () 3 colheres sopa Outros: _____

() Nunca () Menos de 1 vez por mês () 1 a 2 vezes por semana () 3 a 4 vezes por semana () todos os dias () 2 vezes ao dia

Queijos:

() 1 fatia média () 2 fatias médias () 3 fatias médias Outros: _____
() Nunca () Menos de 1 vez por mês () 1 a 2 vezes por semana () 3 a 4 vezes por semana () todos os dias () 2 vezes ao dia

Iogurte:

() 1 pote () 2 potes () 3 potes Outros: _____
() Nunca () Menos de 1 vez por mês () 1 a 2 vezes por semana () 3 a 4 vezes por semana () todos os dias () 2 vezes ao dia

Flocos de milho (cereal matinal sucrínhos ou similares):

() ½ xícara/copo () 1 xícara/copo () 2 xícaras/copos Outros: _____
() Nunca () Menos de 1 vez por mês () 1 a 2 vezes por semana () 3 a 4 vezes por semana () todos os dias () 2 vezes ao dia

Barra cereal:

() 1 unidade () 2 unidades () 3 unidades Outros: _____
() Nunca () Menos de 1 vez por mês () 1 a 2 vezes por semana () 3 a 4 vezes por semana () todos os dias () 2 vezes ao dia

Bolo (preparado com farinha de trigo):

() 1 fatia média () 2 fatias médias () 3 fatias médias Outros: _____
() Nunca () Menos de 1 vez por mês () 1 a 2 vezes por semana () 3 a 4 vezes por semana () todos os dias () 2 vezes ao dia

Salgadinhos (Fandangos, Cheetos e similares, EXCETO BATATA FRITA):

() 1 pacote pequeno () 1 pacote médio () 1 pacote grande Outros: _____
() Nunca () Menos de 1 vez por mês () 1 a 2 vezes por semana () 3 a 4 vezes por semana () todos os dias () 2 vezes ao dia

Pipoca:

() 1 pote pequeno () 1 pote médio () 1 pote grande Outros: _____
() Nunca () Menos de 1 vez por mês () 1 a 2 vezes por semana () 3 a 4 vezes por semana () todos os dias () 2 vezes ao dia

Canjica:

() ½ concha () 1 concha () 2 conchas Outros: _____
() Nunca () Menos de 1 vez por mês () 1 a 2 vezes por semana () 3 a 4 vezes por semana () todos os dias () 2 vezes ao dia

Amendoim (com casca, descascado, cru, tostado, pasta de amendoim):

() ½ xícara () 1 xícara () 2 xícaras Outros: _____
() Nunca () Menos de 1 vez por mês () 1 a 2 vezes por semana () 3 a 4 vezes por semana () todos os dias () 2 vezes ao dia

Paçoca:

() 1 unidade () 2 unidades () 3 unidades Outros: _____
() Nunca () Menos de 1 vez por mês () 1 a 2 vezes por semana () 3 a 4 vezes por semana () todos os dias () 2 vezes ao dia

Castanha-do-Pará, nozes, avelã e amêndoas:

() 1/4 xícara () ½ xícara () 1 xícara Outros: _____
() Nunca () Menos de 1 vez por mês () 1 a 2 vezes por semana () 3 a 4 vezes por semana () todos os dias () 2 vezes ao dia

Frutas desidratadas e secas:

() sim () não
() Nunca () Menos de 1 vez por mês () 1 a 2 vezes por semana () 3 a 4 vezes por semana () todos os dias () 2 vezes ao dia

3. Qual a origem dos alimentos de sua casa?

0- Não compra	() Supermercado	() Sacolão
1- Compra sempre	() Feira/ambulante	() Açougue
2- Compra às vezes	() Produtor	() Padaria
3- Raramente	() Produção Própria	() Armazém

ANEXO E - The occurrence of mycotoxins in breast milk, fruit products and cereal-based infant formula: A review. *Trends in Food Science & Technology*

The occurrence of mycotoxins in breast milk, fruit products and cereal-based infant formula: A review

Carolina Fernanda Sengling Cebin Coppa^{a,1}, Amin Mousavi Khaneghah^{b,1}, Paula Alvito^{c,d}, Ricardo Assunção^{e,d}, Carla Martins^{e,d,g}, Ismail Ig^f, Bruna Leonel Gonçalves^g, Diane Valganon de Neeff^h, Anderson S. Sant'Ana^b, Carlos Humberto Corassin^g, Carlos Augusto Fernandes Oliveira^{a,g*}

^a Department of Food Engineering, School of Animal Science and Food Engineering, University of São Paulo, Pirassununga, SP, Brazil

^b Department of Food Science, Faculty of Food Engineering, University of Campinas (UNICAMP), Campinas, São Paulo, Brazil

^c Food and Nutrition Department, National Institute of Health Doutor Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal

^d CESAM, Centre for Environmental and Marine Studies, University of Aveiro, Campus Universitario de Santiago, Aveiro, Portugal

^e NOVA National School of Public Health, NOVA University of Lisbon, Lisbon, Portugal

^f Department of Material and Process Engineering, Faculty of Chemical Engineering, University of Campinas (UNICAMP), Campinas, São Paulo, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:
Mycotoxins
Prevalence
Breast milk
Infant food
Systematic review
Cereal-based products
Fruit-based products
Contamination

ABSTRACT

Background: Breast milk is considered an essential food segment for children up to 6 months; however, it can be contaminated with some mycotoxins, such as aflatoxin M₁ (AFM₁) and ochratoxin A (OTA) as a consequence of ingestion of dietary mycotoxins by lactating mothers. Moreover, the health of infants can be threatened due to simultaneous exposure to a mixture of mycotoxins mainly due to their potential synergistic effects.

Scope and approach: An overview of the prevalence of mycotoxins in breast milk and infant formula, fruit- and cereal-based products routine diets of infants during the last 10 years, besides the associated health risks, were presented. In this regard, the relevant citations published in international databases such as PubMed, Science direct from 2008 to 2019 were screened by the aid of a systematic review approach.

Key findings and conclusions: The high prevalence of AFM₁ and OTA in breast milk reported in several countries highlighted the extent of mycotoxin occurrence in the diet of lactating mothers. Furthermore, the exposure rates of infants to mycotoxins in breast milk and infant formula while generated a margin of exposure values lower than 10,000, indicating a large public health concern. Thus, reducing the dietary exposure of mycotoxins for lactating mothers and approaching the required controlling steps during the processing and distribution of infant formulas are crucial. Further studies are recommended to evaluate the health risks to infants due to dietary exposure to multiple mycotoxins in infant foods.

1. Introduction

Among the vulnerable population groups subjected to mycotoxin exposure, pregnant women as well as children attracted notable attention due to the teratogenic effects of some mycotoxins (Murphy, Hendrick, Lundgren, & Bryant, 2006) besides the higher susceptibility of infants and young children to their toxic effects (Lundberg, Sørensen, Martins, McCally, & Garg, 2002; Ratoia, Teixeira, Marryon, Mota, & Ritzel, 2015; Sherif, Salama, & Abdel-Wahhab, 2009). Generally, the biotransformation capacity of metabolites in newborns is slower than that in adults, resulting in a larger circulation of chemicals

ingested through the diet (Sadeghy et al., 2009). Therefore, infants (children under the age of 12 months) are more susceptible to mycotoxin adverse effects while compared with adults due to their undeveloped detoxification system, as well as lower body mass, and higher rates of metabolism (Eneal, 2008; Fakhri et al., 2016). Since exposing lactating babies to mycotoxin effects at early life stages, after ingestion of contaminated foods by lactating mothers, several types of mycotoxins can be transferred in unaltered or metabolized forms into breast milk (Bianucci et al., 2011; Fakhri et al., 2015; Hassan, Shoaib, Abdel Fawaz, Ibrahim, & Gaber, 2006a). Therefore, the assessment of mycotoxin exposure frequency to children is of major importance,

* Corresponding author.

E-mail address: carolof@usp.br (C.A.F. Oliveira).

¹ Carolina Fernanda Sengling Cebin Coppa and Amin Mousavi Khaneghah contributed equally in this work.

<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.08.004>

Received 26 March 2019; Received in revised form 13 August 2019; Accepted 15 August 2019

Available online 19 August 2019

0924-6460/© 2019 Elsevier Ltd. All rights reserved.

ANEXO F - Dietary exposure assessment and risk characterization of lactating women to mycotoxins: Case study of São Paulo state, Brazil. *Food Research International*

Elsevier Editorial System(tm) for Food
Research International
Manuscript Draft

Manuscript Number: FOODRES-D-19-04424

Title: Dietary exposure assessment and risk characterization of lactating women to mycotoxins: Case study of São Paulo state, Brazil

Article Type: VSI: Challenges on Risk Assessment

Keywords: Mycotoxins; occurrence; food; risk assessment; LC-MS/MS analysis.

Corresponding Author: Professor Carlos Augusto Fernandes Oliveira, PhD

Corresponding Author's Institution: University of São Paulo

First Author: Carolina F Coppa, MSc

Order of Authors: Carolina F Coppa, MSc; Amanda C Cirelli, BSc; Bruna L Gonçalves, MSc; Eliana M Barnabé, BSc; Amin M Khaneghah, PhD; Carlos E Corassin, PhD; Carlos Augusto Fernandes Oliveira, PhD

Abstract: In the current investigation, the exposure and risk characterization of lactating women to aflatoxins (AFs), fumonisins (FBs), ochratoxin A (OTA) and zearalenone (ZEN) due to consumption of different types of food products in Pirassumunga, São Paulo, Brazil, was assessed. Lactating women (N = 74) provided samples of foods stored and available at their households between April-August/2018, totaling 184 samples. Mycotoxins were determined in food samples by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. According to findings, 20% (n = 36) of all food samples were contaminated with AFs at median concentrations ranging from 9.2 to 18.5 µg/kg, while OTA was detected only in three samples (rice, bread and pasta) at concentrations of 22.3, 23.8 and 48.7 µg/kg, respectively. ZEN was detected in 34 samples (18%) at median levels of 62-195 µg/kg, and FBs at median levels of 58-1,546 µg/kg was observed in 22 samples (12%). Moreover, the concentration of AFs, OTA, ZEN and FBs exceeded their respective MPL in 11 (6%), 3 (2%), 8 (4%) and 5 (3%) samples, respectively. Twenty-eight samples (15%) were contaminated with two or three types of mycotoxins. Corn products contributed for the highest mean probable daily intakes (PDI) of AFs (0.119 ± 0.193 µg/kg b.w./day), ZEN (0.325 ± 0.097 µg/kg b.w./day) and FBs (2.936 ± 1.541 µg/kg b.w./day), while wheat-based products contributed for the highest PDI value of OTA (0.035 ± 0.028 µg/kg b.w./day). The Margin of Exposure (MoE) value for AFs (3.72) demonstrated a high cancer risk ($\text{MoE} < 10,000$), and the Hazard Quotient (HQ) obtained for OTA (24.66), ZEN (4.24) and total FBs (5.01) also indicated a non-tolerable risk ($\text{HQ} > 1$) for these mycotoxins via consumption of the investigated food products. Results of this trial indicate high exposure levels of lactating women to dietary mycotoxins in the studied area, which warrant concern about the possible transfer of residual mycotoxins into breast milk.