

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

PATRÍCIA DINIZ ANDRADE

**AFLATOXINAS E OCRATOXINA A NA DIETA DE LACTENTES E ADULTOS:
DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA E AVALIAÇÃO DA EXPOSIÇÃO**

Dissertação apresentada como requisito parcial
para a obtenção do Título de Mestre em
Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-
Graduação em Ciências da Saúde da
Universidade de Brasília

ORIENTADORA: Eloisa Dutra Caldas

Brasília – DF
2012

PATRÍCIA DINIZ ANDRADE

**AFLATOXINAS E OCRATOXINA A NA DIETA DE LACTENTES E ADULTOS:
DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA E AVALIAÇÃO DA EXPOSIÇÃO**

Dissertação apresentada como requisito parcial
para a obtenção do Título de Mestre em
Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-
Graduação em Ciências da Saúde da
Universidade de Brasília

Aprovada em 09 de julho de 2012

BANCA EXAMINADORA

PRESIDENTE

Prof^ª. Dr^ª. Eloisa Dutra Caldas
Membro Interno do Programa
Universidade de Brasília

MEMBROS:

Prof. Dr. Armi Wanderley da Nóbrega
Membro Externo do Programa
INCQS / Fundação Oswaldo Cruz

Prof. Dr^ª. Teresa Helena Macedo da Costa
Membro Interno do Programa
Universidade de Brasília

SUPLENTE:

Prof. Dr. Mauricio Homem de Mello
Membro Interno do Programa
Universidade de Brasília

*À minha mãe,
pelo exemplo, amor e incentivo.*

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Vander e Silvana, pelo incentivo e apoio incondicional. Aos meus irmãos, Dudu e Gum, pela amizade e por se fazerem sempre presentes em minha vida.

Ao Peter, pelo amor e compreensão.

À Professora Eloisa Dutra Caldas pela orientação e confiança.

Ao CNPq e à FINEP pelo suporte financeiro.

Ao LACEN-DF pelo treinamento e disponibilização dos dados utilizados.

À Coordenação de aleitamento materno e bancos de leite da Secretaria de Saúde do Distrito Federal, em especial às doadoras, aos funcionários dos Bancos de Leite e a equipe do Corpo de Bombeiros Militar do Distrito Federal. O apoio e colaboração de vocês foram fundamentais para a condução deste trabalho.

Aos colegas do Labtox, pela convivência e companheirismo.

À Érica, pelo treinamento da metodologia e pela ajuda constante. À Jéssica, Fernanda e Alessandra pela colaboração na coleta de dados e análises estatísticas.

À Julyane, pela disponibilidade e participação na pesquisa.

À Mari, pela companhia diária, amizade e paciência. À Bia e Gabi, pelo carinho.

À Juju e Mari, pela amizade e apoio. A presença de vocês foi fundamental.

Àqueles que, de alguma maneira, se fizeram presentes, agradeço por este momento.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	vi
LISTA DE QUADROS	vii
LISTA DE TABELAS	viii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	ix
RESUMO.....	xii
ABSTRACT	xiii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 Aflatoxinas.....	3
2.1.1 Metabolismo e toxicodinâmica	4
2.1.2 Toxicidade das aflatoxinas.....	6
2.1.3 Aflatoxina M1	8
2.2 Ocratoxina A	10
2.3 Aflatoxinas e ocratoxina A em alimentos comercializados no Brasil	11
2.4 Legislação Brasileira para micotoxinas	12
2.5 Contaminação mundial de alimentos por aflatoxinas	16
2.6 Micotoxinas e leite materno.....	19
2.7 Validação de metodologias analíticas	22
2.8 Avaliação do risco	24
3. OBJETIVOS	29
4. AFLATOXINS IN FOOD PRODUCTS CONSUMED IN BRAZIL – A PRELIMINARY DIETARY RISK ASSESSMENT	30
5. LEITE HUMANO PARA ANÁLISE DE MICOTOXINAS DA REDE DE LEITE HUMANO DO DISTRITO FEDERAL.....	52
5.1 Metodologia.....	53
5.1.1 Delineamento da população de amostras de leite materno	53
5.1.2 Coleta de amostras de leite materno	53
5.2 Resultados e discussão	54
6. AFLATOXINS AND OCHRATOXIN A IN BREAST MILK: SIMULTANEOUS METHOD OF ANALYSIS USING HPLC/FD.....	59
7. CONCLUSÕES	84
8. REFERÊNCIAS.....	86
ANEXO A	99
APÊNDICE A	100
APÊNDICE B	102
APÊNDICE C	103

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estruturas químicas das Aflatoxinas B1, B2, G1 e G2.....	3
Figura 2: Metabolismo da AFB1.....	4
Figura 3: Ativação da AFB1 e formação de aduto com DNA.....	5
Figura 4: Estrutura química da AFM1.....	8
Figura 5: Possíveis vias do mecanismo de ação da AFM1.....	9
Figura 6: – Estrutura química da ocratoxina A.....	11

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Aflatoxinas e ocratoxina A em alimentos comercializados no Brasil.....	13
Quadro 2: Limites máximos (LM) para aflatoxinas e OTA em alimentos destinados ao consumo humano no Brasil.....	15
Quadro 3: Aflatoxinas e ocratoxina A em alimentos comercializados em diversos países.....	17
Quadro 4: Micotoxinas no leite materno.....	20

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Número de doadoras por região administrativa.....	55
Tabela 2: Idade das doadoras e peso corpóreo do bebê ao nascer.....	57

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAP	<i>American Academy of Pediatrics</i>
AFB1	Aflatoxina B1
AFB2	Aflatoxina B2
AFBO	AFB1-8,9-exo-epóxido
AFG1	Aflatoxina G1
AFG2	Aflatoxina G2
AFM1	Aflatoxina M1
AFM2	Aflatoxina M2
AFP1	Aflatoxina P1
AFQ1	Aflatoxin Q1
AFs	Aflatoxinas totais
ANOVA	Análise de variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ARfD	<i>Acute reference dose</i>
BLH	Bancos de leite humano
BPA	Boas Práticas Agrícolas
BPF	Boas Práticas de Fabricação
CAC	<i>Codex Alimentarius Commission</i>
CAST	<i>Council for Agriculture, Science and Technology</i>
CCD	Cromatografia em camada delgada
CYP450	Enzima do citocromo P450
DF	Distrito Federal
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ELISA	<i>Enzyme-linked immunoabsorbent assay</i>
ELL	Extração líquido-líquido
FAO	<i>Food and Agricultural Organization</i>
FB1	Fumonisina B1
FB2	Fumonisina B2
GDF	Governo do Distrito Federal
GEMs	<i>Global Environmental Monitoring System</i>
GSH	Glutathiona reduzida

GST	Glutation-S-transferase
HBsAg ⁻	Não portadores do vírus da hepatite B
HBsAg ⁺	Portadores do vírus da hepatite B
HCC	Carcinoma hepatocelular
HPLC/DAD	Cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos
HPLC/FD	Cromatografia líquida de alta eficiência com detector de fluorescência
HRAN	Hospital Regional da Asa Norte
HRAS	Hospital Regional da Asa Sul
HRBZ	Hospital Regional de Brazlândia
HRC	Hospital Regional de Ceilândia
HRG	Hospital Regional do Gama
HRP	Hospital Regional de Planaltina
HRPA	Hospital Regional do Paranoá
HRS	Hospital Regional de Sobradinho
HRSM	Hospital Regional de Santa Maria
HRT	Hospital Regional de Taguatinga
IAC	Colunas de imunoafinidade
IARC	<i>Internation Agency for Research on Cancer</i>
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
IPCS	<i>International Programme on Chemical Safety</i>
JECFA	<i>Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives</i>
JMPR	<i>Joint FAO/WHO Meeting on Pesticide Residue</i>
LC-MS/MS	Cromatografia líquida com detector de massas
LM	Limite máximo
LMR	Limite máximo de resíduos
LOD	Limite de detecção
LOQ	Limite de quantificação
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MOE	Margem de exposição
MRC	Material de referência certificado
MS	Ministério da Saúde

OTA	Ocratoxina A
OTB	Ocratoxina B
OT α	Ocratoxina α
PMTDI	<i>Provisional Maximum Tolerable Daily Intake</i>
POF	Pesquisa de orçamento familiar
PTWI	<i>Provisional tolerable weekly intake</i>
QFA	Questionário de frequência alimentar
RAs	Regiões administrativas
RNA	Ácido ribonucleico
RSD	Desvio padrão relativo
SCIA	Setor complementar de indústria e comércio
SD	Desvio padrão
SPE	Extração em fase sólida
TLC	Termo de consentimento livre e esclarecido
UV	Ultra-violeta
WHO	<i>World Health Organization</i>

RESUMO

Micotoxinas são toxinas produzidas por fungos que contaminam alimentos e são potencialmente tóxicas ao homem e animais. Aflatoxinas (AFs; AFB1, AFB2, AFG1 e AFG2) são carcinogênicas em humanos e ocratoxina A (OTA) é considerada um possível carcinógeno humano. Os objetivos do presente estudo foram: 1) avaliar a exposição e risco carcinogênico da população brasileira a aflatoxinas na dieta, 2) desenvolver e validar metodologia analítica para análise de AFs, AFM1 e OTA em leite humano e, 3) avaliar o risco da ingestão de micotoxinas por crianças pelo consumo de leite de doadoras de banco de leite do Distrito Federal. Dados de AFs em alimentos foram obtidos de laudos de análise do Laboratório Central de Saúde Pública do Distrito Federal e de artigos publicados. Consumo de alimentos e peso corpóreo foram obtidos da Pesquisa de Orçamento Familiar 2008/2009 conduzida pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Riscos à saúde resultantes da exposição à AFs foram estimados levando em conta seu potencial carcinogênico e a prevalência do vírus da hepatite B na população. O método analítico otimizado para análise de AFs, AFM1 e OTA utilizou a técnica de extração líquido-líquido com purificação à baixa temperatura e análise por HPLC/FD. Amostras de leite foram coletadas de doadoras de oito Bancos de Leite do Distrito Federal, entre Maio/2011 a Fevereiro/2012. A ingestão total de AFs pela população brasileira total e por altos consumidores de alimentos contendo AFs foi 6,8 e 27,6 ng/kg pc/dia, respectivamente. O risco de câncer para as duas populações chegou a 0,0753 e 0,3056 câncer/ano/ 10^5 indivíduos, respectivamente. A metodologia analítica desenvolvida apresentou limites de quantificação (LOQs) entre 0,005 e 0,03ng/mL, recuperações entre 73 e 99,5% e coeficientes de variação entre 1,8 e 17,3%. No total, foram analisadas 224 amostras de leite e apenas 2 foram positivas para as micotoxinas analisadas - AFB2 no nível do LOQ (0,005ng/mL), presença confirmada por LC-MS/MS. Estes resultados indicam que o consumo de leite materno dos Bancos de Leite não representa um risco à saúde de crianças advindo da exposição à micotoxinas. As crianças são consideradas mais susceptíveis aos efeitos tóxicos das micotoxinas e, portanto, a exposição à aflatoxinas e ocratoxina A, carcinógenos e possíveis carcinógenos em humanos, deve ser mantida no menor nível possível.

Palavras chave: aflatoxinas; ocratoxina A; análise, avaliação de risco; leite humano.

ABSTRACT

Mycotoxins are toxins produced by fungi that contaminate food and are potentially toxic for humans and animals. Aflatoxins (AFs; AFB1, AFB2, AFG1, AFG2 and AFG2) are known to be human carcinogens and ochratoxin A (OTA) is considered a possible human carcinogen. The objectives of this work were: 1) evaluate the exposure and carcinogenic risk of the Brazilian population through the consumption of food contaminated with AFs, 2) develop and validate a methodology for analysis of AFs, AFM1 and OTA in breast milk and, 3) evaluate the risks of exposure to these mycotoxins from the consumption of breast milk in the Federal District, Brazil. AF concentration data in food were obtained from analysis reports issued by the Central Public Health Laboratory of the Federal District and from published work. Food consumption and body weight data were obtained from a survey conducted in 2008/2009 by the Brazilian Institute of Geography and Statistics. Potential health risks arising from exposure to aflatoxins were assessed using the carcinogenic potency of AFs and hepatitis B virus prevalence in the Brazilian population. The optimized method for analysis of AFs, AFM1 and OTA consisted of a liquid-liquid extraction followed by purification at low temperature and analyses by HPLC/FD. Breast milk samples were collected from donors of eight Human Milk Banks of the Federal District, from May/2011 to February/2012. Total AF intake for the total Brazilian population and consumers-only were 6.8 and 27.6 ng/kg bw/day, respectively. Cancer risk reached 0.0753 cancers/year/ 10^5 individuals for the total population and 0.3056 cancers/year/ 10^5 individuals for consumers-only. The developed methodology of analysis had limits of quantification (LOQs) that ranged from 0.005ng/mL to 0.03ng/mL, recoveries from 73-99.5% and relative standard deviations from 1.8-17.3%. A total of 224 breast milk samples were analyzed and only two were positive, containing AFB2 at the LOQ level (0.005ng/mL), and its presence was confirmed by LC-MS/MS. These results indicate that consumption of breast milk does not pose a health risk arising from exposure to mycotoxins for infants who consumed milk from milk banks of the Federal District. Children are considered more susceptible to toxic effects of mycotoxins and, therefore, exposure to aflatoxins and ochratoxin A, known to be carcinogens and possible carcinogens to humans, should be kept as low as reasonable achievable.

Keywords: aflatoxins; ochratoxin A; analysis; risk assessment; breast milk.

1. INTRODUÇÃO

Os contaminantes tóxicos presentes nos alimentos podem ser de origem natural, resultantes do processo metabólico de animais, plantas e microrganismos dos quais os alimentos se originaram, do contato com o solo, água ou ar contaminado, ou até mesmo como resultado do processamento do alimento (Deshpande, 2002). Entre os contaminantes de alimentos de maior relevância para a saúde humana temos as micotoxinas (Kotsonis & Burdock, 2008; Deshpande, 2002).

Micotoxinas são metabólitos secundários produzidos por fungos filamentosos que contaminam os alimentos (Frisvad et al., 2007; Nicholson, 2004). São compostos estruturalmente diferentes, em decorrência das várias vias biossintéticas dos fungos, e seu efeito tóxico no homem é igualmente diverso. A produção de uma micotoxina é restrita a um número limitado de espécies fúngicas e, em alguns casos, pode limitar-se a algumas cepas de determinadas espécies (Nicholson, 2004).

A toxicidade das micotoxinas está relacionada principalmente com propriedades genotóxicas, carcinogênicas, imunotóxicas e nefrotóxicas (Brera et al., 2008). Embora sejam conhecidos mais de 300 tipos de micotoxinas, relativamente poucas são de grande preocupação no que diz respeito à saúde humana e animal (Nicholson, 2004). Dentre essas, se encontram as aflatoxinas, tricotecenos, fumonisinas, zearalenona e a ocratoxina A, produzidas principalmente pelos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* (Brera et al., 2008; CAST, 2003). A contaminação dos alimentos por fungos produtores de micotoxinas pode ocorrer no campo, nas diversas fases da produção, durante o processamento dos produtos e no armazenamento.

A presença de micotoxinas em alimentos, frequentemente, compromete sua qualidade e segurança (D'Mello, 2003). A ingestão de leite, ovos e carne também é considerada importante fonte de exposição, uma vez que animais alimentados com ração contaminada podem transferir estes contaminantes e ou metabólitos aos seus produtos (Brera et al., 2008). Da mesma maneira, desde a década de 80, existem relatos da excreção de micotoxinas no leite de mulheres expostas pelo consumo de alimento contaminado (Coulter et al., 1984), o que pode representar um risco para a saúde do lactente.

As micotoxinas são relativamente estáveis às condições usualmente empregadas no processamento e preparo dos alimentos, inclusive tratamento térmico, podendo ser encontradas no produto final na sua forma original ou modificadas (Bullerman & Bianchini, 2007). A completa eliminação das micotoxinas presentes nos alimentos não é possível e, portanto, sua presença deve ser reduzida ao nível mais baixo possível (Codex, 1995). Desta maneira, deve-se realizar um contínuo monitoramento da presença destes contaminantes na dieta e avaliar os riscos que estes podem trazer para a população exposta.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 AFLATOXINAS

As aflatoxinas são produzidas em alimentos principalmente pelo *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*. As quatro principais aflatoxinas produzidas naturalmente são conhecidas como aflatoxina B1, B2, G1 e G2 (Figura 1), com “B” e “G” referindo-se às cores azul e verde fluorescentes sob a luz UV (Pitt & Hocking, 2009). São compostos heterocíclicos caracterizados pela fusão de resíduos de dihidrofurano ou tetrahydrofurano a uma molécula de cumarina. As moléculas de AFG diferem estruturalmente das AFB, pois possuem um anel δ -lactona ao invés de um anel ciclopentanona (D’Mello, 2003).

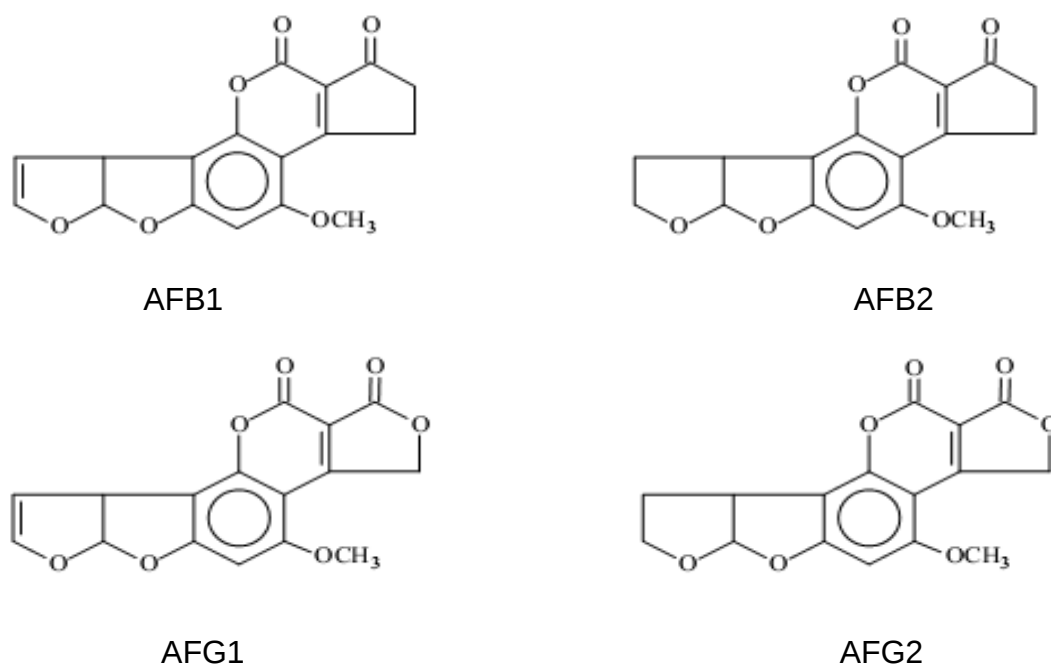


Figura 1 – Estruturas químicas das Aflatoxinas B1, B2, G1 e G2 (IARC, 2002).

O *Aspergillus flavus* é a principal fonte de aflatoxinas, ocorrendo na maior parte dos alimentos de países tropicais. Essa espécie tem uma afinidade especial com três culturas: milho, amendoim e algodão e geralmente produz apenas aflatoxina B. O *Aspergillus parasiticus* ocorre principalmente em amendoim e é bem raro encontrá-lo em outros alimentos. Produz tanto aflatoxina B quanto G e praticamente todos os isolados conhecidos são toxicogênicos (Frisvad et al., 2006).

2.1.1 Metabolismo e toxicodinâmica

A AFB1 é a mais tóxica das aflatoxinas e, portanto, diversos estudos têm sido conduzidos a respeito de seu metabolismo. A Figura 2 representa, resumidamente, os processos metabólicos sofridos pela AFB1 no organismo humano. A absorção das aflatoxinas ocorre no trato gastrointestinal e a biotransformação é realizada principalmente no fígado, por enzimas do citocromo P450 (CYP450; Gallagher et al., 1994; Gross-Steinmeyer & Eaton, 2012; Guengerich et al., 1996; Raney et al., 1992). Estas enzimas mediam as reações de formação do AFB1-8,9-*exo*-epóxido (AFBO) e outros metabólitos como AFM1, AFQ1 e AFP1 (Eaton & Gallagher, 1994; Guengerich et al., 1998).

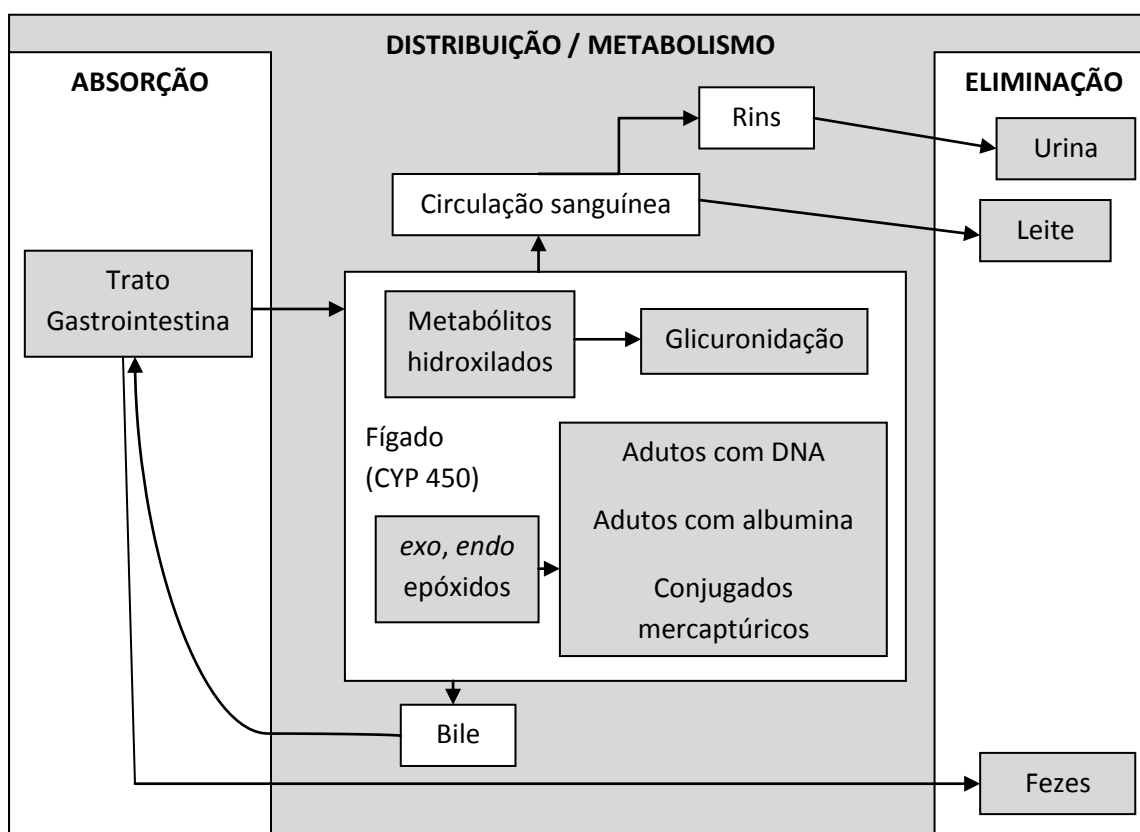


Figura 2 – Metabolismo da AFB1 (Polychronaki, 2007b).

AFM1, AFP1 e AFQ1 são metabólitos menos tóxicos e seu potencial carcinogênico é bem menor que o da AFB1 e, desta maneira, sua formação é considerada como uma via de detoxificação (Gross-Steinmeyer & Eaton, 2012; Hsieh et al., 1984). Metabólitos hidroxilados da AFB1 como AFM1, AFQ1 e AFP1, podem ser conjugados com ácido glicurônico, formando ésteres extremamente

solúveis em água. Estes conjugados são rapidamente excretados através da urina, bile ou fezes, embora a AFB1 tenha sido originalmente isolada e identificada como um metabólito da AFB1 no leite (Eaton & Gallagher, 1994; Wei & Hsieh, 1984).

A hepatocarcinogenicidade da AFB1 é associada à sua biotransformação, através da CYP3A4 a um epóxido (AFBO) que forma adutos covalentes com DNA, RNA e proteínas (Bennett et al., 1981; IARC, 2002; McLean & Dutton, 1995). O aduto quimicamente instável AFB1-N7-guanina (Figura 3) ocorre pela ligação entre AFBO e guaninas da molécula de DNA ao nível do códon 249, do gene supressor de tumores p53 (Essigmann et al., 1977). Se não forem removidos pelas enzimas de reparação do DNA e se estiverem localizados em regiões do DNA transcricionalmente ativas, os adutos formados podem levar a alterações somáticas (Bedard & Massey, 2006). Em um processo de detoxificação, AFBO pode ser capturado pela glutathione-S-transferase (GST), conjugado com glutathione reduzida (GSH) e excretado como ácido mercaptúrico na urina, protegendo o DNA e as proteínas da formação de adutos (Gross-Steinmeyer & Eaton, 2012).

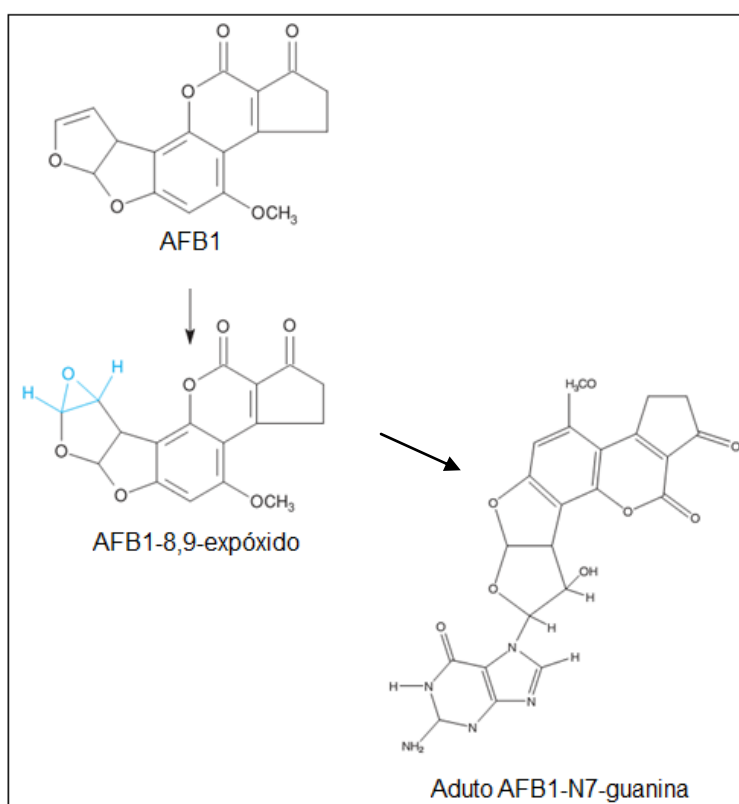


Figura 3 – Ativação da AFB1 e formação de aduto com DNA (Klaassen, 2008).

A AFB1 é mais mutagênica e carcinogênica que a AFG1, pelo fato do AFB1-8,9-epóxido se intercalar mais facilmente com o DNA, produzindo quantidades maiores de adutos para a mesma dose. AFB2 e AFG2 geralmente são consideradas

menos ativas biologicamente, devido à ausência da ligação dupla da posição 8,9 e, consequentemente, a não formação do 8,9-epóxido (Raney et al., 1990; Wild & Turner, 2002). Os adutos formados entre AFBO e RNA e proteínas estão também envolvidos com os mecanismos de toxicidade aguda da AFB1, conduzindo à morte celular pela inativação de macromoléculas essenciais às células. A formação destes adutos inicia-se com a hidrólise da AFB1-epóxido (*endo* e *exo*) para produzir AFB1-8,9-dihidrodiol (Guengerich et al., 1998), o qual reage com grupamentos amino das moléculas de proteína, principalmente resíduos de lisina da albumina (Sabbioni et al., 1987).

2.1.2 Toxicidade das aflatoxinas

A aflatoxicose, doença causada pelo consumo de alimentos contaminados por aflatoxinas, pode ser aguda (dano direto ao fígado, podendo levar a morte) ou crônica (risco de câncer).

Estudos em animais mostraram que espécies susceptíveis, como patos e coelhos, tem uma dose letal média em torno de 0,3mg/kg, enquanto galinhas e ratos têm uma tolerância maior (até 18mg/kg). Em humanos, os adultos têm uma alta tolerância a aflatoxinas e nos casos de intoxicação aguda reportados, as crianças foram as mais afetadas (Cullen & Newberne, 1993 apud Williams et al., 2004).

No Gâmbia, um estudo conduzido com 97 pacientes diagnosticados com cirrose hepática avaliou a exposição à aflatoxinas e a presença de vírus da hepatite como fatores de risco para esta doença. A presença dos vírus da hepatite B e C, bem como consumo de amendoim e presença de mutação no gene p53 foram associadas ao aumento do risco de cirrose (Kuniholm et al., 2008).

Surtos de aflatoxicose em seres humanos têm sido reportados, ao longo dos anos, principalmente em regiões subdesenvolvidas. As manifestações clínicas registradas incluem vômitos, dores abdominais, edema pulmonar, infiltração de gordura, necrose do fígado, proliferação de dutos biliares, edema, letargia e morte (Shank et al., 1971, Williams et al., 2004). Na Índia, o consumo de milho mofado resultou em pelo menos 100 mortes. O estudo histopatológico das amostras de fígado revelou uma extensa proliferação do duto biliar (Krishnamachari et al., 1975).

No Quênia, durante os anos 80, o consumo de milho altamente contaminado com aflatoxinas foi associado a, pelo menos, 20 internações hospitalares e 12 óbitos

(Ngindu et al., 1982). Na Malásia, o consumo de macarrão contaminado por aflatoxinas (suspeita de até 3mg de AFs/porção) também foi relacionado ao aparecimento de encefalopatia hepática aguda em crianças, ocasionando 13 mortes (Lye et al., 1995). Mais recentemente, mais de 120 mortes foram causadas por surtos de aflatoxicose no Quênia. Amostras de milho coletadas nas residências de pacientes afetados pelo surto chegaram a conter mais de 1000µg/kg (Lewis et al., 2005; Probst et al., 2007). Um estudo de caso controle realizado no período do surto conseguiu confirmar a associação entre a concentração de AFs no milho, concentração de adutos de AFB1-lisina no sangue, vírus de hepatite B e o quadro de aflatoxicose dos pacientes (Azziz-Baumgartner et al., 2005).

Embora a principal preocupação quanto à exposição à aflatoxinas esteja relacionada à sua atividade hepatocarcinogênica, câncer de pulmão é um risco em trabalhadores que lidam diretamente com grãos contaminados (Kelly et al., 1997; Williams et al., 2004). As aflatoxinas são classificadas pela Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC) como grupo I, ou seja, existem evidências suficientes, em animais e humanos, que comprovam as propriedades carcinogênicas desta classe de contaminantes (IARC, 1993). Alguns agentes biológicos (vírus das hepatites B e C) são fatores adicionais de risco no desenvolvimento de carcinoma hepatocelular (HCC). Em portadores do vírus da hepatite B (HBsAg⁺), a potência das aflatoxinas é 30 vezes maior do que em não portadores (HBsAg⁻; WHO, 1999). Num estudo recente, uma meta-análise de dados epidemiológicos demonstrou os benefícios das intervenções de saúde pública para controlar a incidência de hepatite B e reduzir a contaminação dos alimentos na redução no risco atribuível de HCC (Liu et al., 2012).

As aflatoxinas também causam diminuição do crescimento em animais, e algumas evidências sugerem que estes efeitos podem ocorrer também em humanos (Kensler et al., 2011). Num estudo longitudinal conduzido em Benim, foram recrutadas 200 crianças, entre 16-37 meses de idade, de quatro vilas diferentes (2 com alta exposição à aflatoxinas e 2 com baixa). Crianças que se alimentavam à base de mingau de milho tiveram níveis mais altos de adutos de aflatoxina-albumina do que as que ainda eram parcialmente amamentadas. Houve uma forte correlação negativa entre a presença de adutos e crescimento (altura) ao longo dos 8 meses de estudo. O maior quartil do biomarcador foi associado a uma redução média de 1,7cm no crescimento quando comparado ao quartil mais baixo (Gong et al., 2004).

Em Gâmbia, foi observada uma forte correlação entre a presença de adutos de aflatoxina-albumina na mãe com baixo peso e altura de crianças até 1 ano (Turner et al., 2007). Estes trabalhos mostram que a exposição às aflatoxinas no útero e durante a primeira infância tem um impacto significativo no crescimento de crianças africanas.

A AFB1 é imunossupressora em animais, com efeitos particularmente fortes na imunidade celular. A exposição às aflatoxinas resulta em uma maior susceptibilidade a infecções bacterianas e parasitárias. Estudos epidemiológicos têm relacionado a exposição às aflatoxinas ao aumento da prevalência de infecções (IARC, 2002).

2.1.3 Aflatoxina M1

A aflatoxina M1 (Figura 4) é o principal metabólito hidroxilado da AFB1, sendo excretada no leite de animais ou humanos que tenham consumido alimentos contaminados por AFB1 (Coulter et al., 1984; Holzapfel et al., 1966; Neal et al., 1998). Entre 0,3-6,2% da AFB1 presente em rações animais é excretada como M1 no leite em até 2 a 3 dias após a exposição, sendo que o pico de excreção ocorre entre 3-6 horas (Battacone et al., 2012; Creppy, 2002; Masoero et al., 2007).

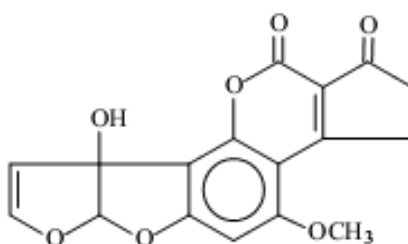


Figura 4 – Estrutura química da AFM1 (IARC, 2002).

A conversão metabólica da AFB1 em AFM1 é usualmente considerada como um processo de detoxificação, uma vez que o potencial carcinogênico (*in vivo*) da AFM1 é aproximadamente 10% do potencial da AFB1 (Wogan & Paglialunga, 1974). Entretanto, a toxicidade aguda destas duas micotoxinas em patos e ratos foi muito similar, tanto quantitativamente como qualitativamente (Purchase, 1967 apud Neal, 1998). Segundo os critérios de avaliação da carcinogenicidade de agentes químicos

para animais de experimentação e humanos, a M1 é classificada como grupo 2B - provável carcinógeno humano (IARC, 1993).

Estudos têm mostrado que a AFM1 é capaz de formar adutos com o DNA através de seu epóxido (Figura 5; JECFA, 2001). Neal et al. (1998) demonstraram em microsossomos hepáticos humanos um potencial tóxico direto da AFM1, ou seja, sem necessidade de ativação, ao contrário do encontrado para a AFB1. Desta maneira, a consideração da formação da AFM1 como uma via de detoxificação da AFB1 deve ser realizada com cautela.

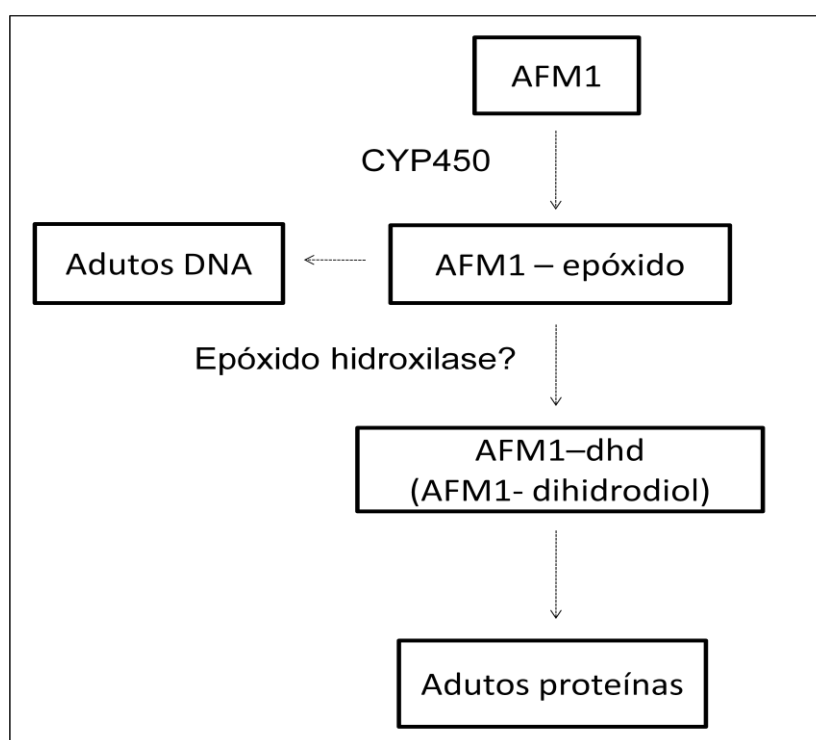


Figura 5 - Possíveis vias do mecanismo de ação da AFM1 (Neal et al.,1998).

A AFM1 tem sido encontrada em leite e derivados como iogurte e queijos (Galvano et al., 2001; Ilha et al., 2011; Martins & Martins, 2004; Ruangwises & Ruangwises, 2008). Estudos conduzidos a respeito da estabilidade da AFM1 no processamento térmico de alimentos não são consistentes, embora a maioria deles relate que tratamentos como pasteurização e esterilização não alteram consideravelmente a concentração de AFM1 nos produtos (JECFA, 2001). A maioria dos estudos mostra que o armazenamento de leite e derivados contaminados sob temperatura de congelamento durante alguns meses não afeta significativamente o conteúdo de AFM1 (Yousef & Marth, 1989 apud JECFA, 2001). A AFM1 é

encontrada, predominantemente, em associação com a caseína e, desta maneira, sua concentração é maior no coalho do que no soro de leite durante a produção de queijos (JECFA, 2001).

2.2 OCRATOXINA A

Ocratoxina A (OTA) é uma toxina produzida naturalmente por diversas espécies de *Aspergillus* e *Penicillium*. Estes fungos são capazes de se desenvolver tanto em diferentes climas, como em diferentes tipos de plantas, o que faz da contaminação de culturas por OTA um problema de ordem mundial (Aish et al., 2004). O *Penicillium verrucosum* é o maior produtor de ocratoxina A (OTA) em cereais em países de clima temperado, enquanto em países de clima tropical os maiores produtores são espécies de *Aspergillus*, como *A. carbonarius* e *A. westerdijkiae* (Pitt & Hocking, 2009).

Cereais, cerveja, vinho, cacau, café, uvas secas, especiarias, e produtos cárneos são possíveis fontes de contaminação por esta micotoxina (Aish et al., 2004). As ocratoxinas constituem uma família de compostos estruturalmente relacionados, baseados em uma molécula de isocumarina ligada a L-fenilalanina (Abranson, 1997 apud D´Mello, 2003). A OTA (Figura 6) e a ocratoxina B (OTB) são as únicas formas de ocorrência natural em alimentos (D´Mello, 2003).

A OTA é lentamente absorvida do trato gastrointestinal e sua distribuição no organismo se dá pela circulação sanguínea, sendo direcionada principalmente para os rins e, em menores quantidades, para o fígado, músculo e tecido adiposo. A transferência de OTA para o leite tem sido reportada em humanos e animais (ratos, coelhos), com exceção de ruminantes, pois estas espécies são capazes de metabolizar a OTA através da microbiota presente no rúmen. O maior metabólito da OTA encontrado nas diversas espécies analisadas é a ocratoxina α , composto consideravelmente menos tóxico que o original. A OTA também pode ser encontrada na urina e fezes, sendo que a quantidade excretada por cada uma dessas vias é diferente entre as espécies e é influenciada pela extensão da circulação entero hepática da OTA e da sua ligação com macromoléculas (JECFA, 2001).

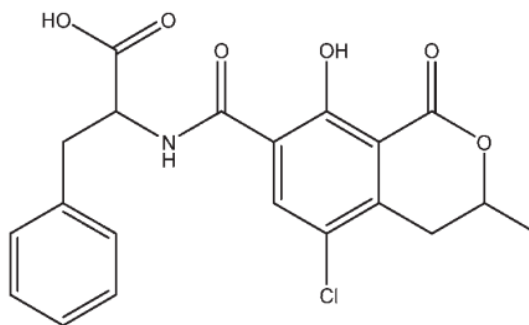


Figura 6 – Estrutura química da ocratoxina A (CAST, 2003).

O principal efeito da exposição humana à ocratoxina A é a nefrotoxicidade, embora também possua efeitos imunotóxicos, teratogênicos e genotóxicos em animais, sendo classificada como possível carcinógeno humano (IARC, 1993). O alvo desta micotoxina, em todos os mamíferos, são os rins, no qual as lesões podem ser produzidas tanto por exposição aguda como crônica (IARC, 2002). Exposição a OTA tem sido relacionada ao desenvolvimento da nefropatia endêmica dos Balcãs e o ao aparecimento de tumores uroteliais (O'Brien & Dietrich, 2005). O nível de ingestão diária tolerável máxima (PMTDI - *Provisional Maximum Tolerable Daily Intake*) estabelecido para OTA é de 100ng/kg pc/dia (JECFA, 2001).

Existem inúmeros mecanismos moleculares pelos quais a OTA pode exercer seus efeitos tóxicos. Ela é capaz de inibir a síntese proteica, através da competição pela enzima fenilalanina-tRNA sintetase, formar adutos com DNA, interferir na peroxidação lipídica e inibir a respiração mitocondrial (Bayman & Baker, 2006; O'Brien & Dietrich, 2005).

2.3 AFLATOXINAS E OCRATOXINA A EM ALIMENTOS COMERCIALIZADOS NO BRASIL

Aflatoxinas e ocratoxina A causam danos aos seres humanos e, por isso, a contaminação de alimentos por estas micotoxinas tem sido monitorada desde sua descoberta. No Quadro 1 encontram-se dados sobre trabalhos publicados nos últimos anos quanto à contaminação de alimentos comercializados no Brasil por AFs e OTA. Poucos trabalhos foram publicados e as unidades federativas com o maior número de estudos são o Distrito Federal, São Paulo e o Rio Grande do Sul. É

possível perceber que grande parte das pesquisas realizadas ainda utiliza métodos de análise de baixa sensibilidade, como CCD, e a purificação por colunas de imunoafinidade é pouco comum em laboratórios brasileiros.

No Brasil, amendoim e derivados ainda são os alimentos com maior incidência de contaminação por AFs (19,8-60%), mas os níveis de contaminação têm decrescido consideravelmente com o passar dos anos. OTA não parece ser um problema em alimentos consumidos no Brasil, pois embora sua incidência em alguns produtos tenha sido alta, como por exemplo no chocolate, os níveis de concentração foram baixos na maior parte das amostras analisadas (0,03-128µg/kg).

2.4 LEGISLAÇÃO BRASILEIRA PARA MICOTOXINAS

Pelos diversos trabalhos acima citados é possível perceber que micotoxinas são frequentemente encontradas em diversos grupos alimentícios e, como sua presença nos alimentos é difícil de ser evitada, órgãos regulamentadores estabelecem limites para manter a contaminação em níveis o mais baixo possível. Os limites máximos (LM) para aflatoxinas em alimentos destinados ao consumo humano foram primeiramente regulados no país em 1976 (CNNPA nº 34), com limites para o somatório de AFB1 e AFG1 (30µg/kg) para alimentos de maneira geral. Em 2002, a RDC nº 274 incluiu limites para AFM1 em leite e seus derivados (5µg/kg) e as AFB2 e AFG2 nos limites máximos para alimentos (20µg/kg; Brasil, 2002). Atualmente os LM para micotoxinas no Brasil são regulamentados pela RDC nº7 (18/02/2011; Brasil, 2011), que revogou as duas legislações anteriores. Nesta resolução, além das aflatoxinas (AFB1+AFB2+AFG1+AFG2), AFM1 e OTA, encontram-se parâmetros para deoxinivalenol, fumonisinas (FB1+FB2), patulina e zearalenona em vários produtos. O Quadro 2 indica os LM atuais para AFs, AFM1 e OTA para alimentos de consumo humano no Brasil.

Quadro 1 - Aflatoxinas e ocratoxina A em alimentos comercializados no Brasil.

Micotoxinas	Alimento analisado (n° positivas/n° analisadas)	Método (LOQ/LOD)	Região ou estado	Referência
AFs	Amendoim e derivados (10/36)	Extração com metanol, purificação com sulfato de cobre e celite, CCD/fluorescência (LOD=5µg/kg)	Minas Gerais	Rocha et al., 2008
AFs	Amendoim e derivados (13/22)	Extração com metanol, purificação com sulfato de cobre e celite, CCD/fluorescência (LOQ=NR)	Rio Grande do Sul	Oliveira & Koller, 2011
AFs	Amendoim e derivados (106/240)	Extração com metanol/água, purificação com colunas de imunoafinidade, HPLC/FD (LOQ=0,5µg/kg)	São Paulo	Oliveira et al., 2009
AFB1, AFG1	Amendoim e derivados, castanhas, feijão, arroz e derivados, trigo e derivados, milho e derivados e alimentos diversos (90/670)	a) Extração com clorofórmio, limpeza com n-hexano (LOD=3,2µg/kg) b) Extração com metanol, purificação com sulfato de cobre e celite (LOD=2 µg/kg) CCD/fluorescência	Distrito Federal	Silva et al., 1996
AFs e OTA	Amendoim e derivados, castanhas, milho (pipoca, canjica e grão) e farinhas (trigo e aveia) AFs: (72/366)*	Extração com metanol, purificação com sulfato de cobre e celite, CCD/fluorescência (AFs: LOQ=2 µg/kg; OTA: LOQ= OTA)	Distrito Federal	Caldas et al., 2002
AFs e OTA	Amendoim, produtos de amendoim, feijão, milho, arroz, trigo para quibe e castanhas AFs: (31/207)*	Extração com metanol, purificação com sulfato de cobre e celite, CCD/fluorescência (AFs: LOD=2 µg/kg; OTA: LOD=25µg/kg)	Distrito Federal	Caldas et al., 1998
AFs	Arroz (1/36)	Extração com metanol, purificação com sulfato de cobre e celite, HPLC/FD (LOQ=0,05-0,16µg/kg)	Minas Gerais	Carvalho et al., 2010
AFs e OTA	Arroz OTA: (2/56)**	Extração com metanol, purificação com sulfato de cobre e celite, CCD/fluorescência (AFs: LOQ=2,5µg /kg; OTA: LOQ=6µg/kg)	Rio Grande do Sul	Nunes et al., 2003
AB1 e OTA	Arroz AFB1: (3/32) OTA: (4/32)	Extração com metanol/água, CCD/fluorescência (AFs: LOQ=2,6µg/kg; OTA: LOQ=6,5µg/kg)	Rio Grande do Sul	Dors et al., 2011
AFs e OTA	Arroz	Extração com metanol/água, purificação com colunas	Vários estados	Almeida et al.,

Micotoxinas	Alimento analisado (n° positivas/n° analisadas)	Método (LOQ/LOD)	Região ou estado	Referência
	AFs: (75/166) OTA: (47/165)	de imunoafinidade, HPLC/FD (AFs:LOD=0,01-0,03µg/kg; OTA: LOD=0,1µg/kg)		2012
OTA	Café (135/408)	Extração com metanol/água, purificação com colunas de imunoafinidade, HPLC/FD (LOD=0,01µg/kg)	São Paulo e Minas Gerais	Taniwaki et al., 2003
AFs	Castanha do Brasil (NR/40)	Extração com acetonitrila/água, LC-MS/MS (LOQ=0,08-0,12 µg/kg)	Norte e Nordeste	Pacheco & Scussel, 2007
AFs	Castanha do Brasil (5/30)	Extração com acetonitrila/água, CCD/fluorescência (LOQ=0,45-0,5 µg/kg)	Amazonas	Pacheco et al., 2010
AFs e OTA	Chocolate e derivados AFs: (97/125) OTA: (123/125)	Extração com metanol/água, purificação com colunas de imunoafinidade, HPLC/FD (LOD=0,01µg/kg)	São Paulo	Copetti et al., 2012
AFs	Figos desidratados (11/19) e uvas passas (3/19)	Extração com metanol/água, purificação com colunas de imunoafinidade, HPLC/FD (LOD=0,1-0,2µg/kg)	São Paulo	Iamanaka et al., 2007
AFs e OTA	Farinha de trigo OTA: (3/54)**	Extração com metanol, purificação com sulfato de cobre e celite, CCD/fluorescência (LOQ=NR)	Rio Grande do Sul	Vieira et al., 1999
AFs e OTA	Produtos de milho AFs: (5/74)*	Extração com metanol, purificação com sulfato de cobre e celite – CCD/fluorescência (AFs:LOQ=1µg/kg; OTA: LOQ=10 µg/kg)	Pernambuco	Kawashima & Soares, 2006
AFs	Produtos de milho (7/123)	Extração com metanol, purificação com sulfato de cobre e celite, CCD/fluorescência (LOD=0,5-3,2µg/kg)	Paraná	Amaral et al., 2006
AFs	Produtos de milho (0/38)	Extração com metanol, purificação com sulfato de cobre e celite, CCD/fluorescência (LOQ=1µg/kg)	Distrito Federal	Caldas & Silva, 2007

AFs=AFB1, AFB2, AFG1, AFG2; CCD = cromatografia em camada delgada; HPLC/FD= cromatografia líquida de alta eficiência com detector fluorescência; LC-MS/MS=cromatografia líquida com detector de massas; NR=não reportado; * OTA não foi detectada nas amostras analisadas; ** AFs não foram detectadas nas amostras analisadas;

Quadro 2 - Limites máximos (LM) para aflatoxinas e OTA em alimentos destinados ao consumo humano no Brasil.

Micotoxina	Alimento	LM, µg/kg
AFM1	Leite fluido	0,5
	Leite em pó	5
	Queijos	2,5
AFB1+AFB2+ AFG1+AFG2	Cereais e fórmulas destinadas à alimentação infantil	1
	Cereais e derivados (exceto milho), feijão, produtos de cacau e chocolate	5
	Nozes, pistaches, avelãs, amêndoas, frutas desidratadas e secas, castanha do Brasil (sem casca e consumo direto), amêndoas de cacau	30
	Castanha do Brasil (sem casca, processamento posterior)	15
	Castanha do Brasil (com casca, consumo direto), especiarias, amendoim (com casca, descascado, cru ou tostado), pasta de amendoim, manteiga de amendoim, milho, milho em grão, farinhas ou sêmolos de milho	20
OTA	Vinho e derivados, suco de uva e polpa de uva, alimentos à base de cereais para alimentação infantil	2
	Produtos de cacau e chocolate	5
	Cereais e produtos de cereais (inclusive cevada malteada), feijão, café torrado (moído ou grão) e café solúvel, amêndoa de cacau, frutas secas e desidratadas	10
	Especiarias	30

Fonte: RDC nº7 de 18 de fevereiro de 2011 (Brasil, 2011).

Além das resoluções sobre os LMs para micotoxinas em alimentos, ainda existem outras legislações no Brasil que tratam sobre as ferramentas de prevenção da produção de micotoxinas em alimentos, como as Boas Práticas Agrícolas (BPA) e de Fabricação (BPF). A Instrução Normativa nº66/2003 do Ministério da Agricultura,

Pecuária e Abastecimento (MAPA), determina, entre outras coisas, que os agentes da cadeia produtiva de castanha do Brasil, amendoim, milho, pimenta-do-reino, café, feijão, trigo, soja, frutas e hortaliças frescas, processadas, semi e minimamente processadas deverão adotar os sistema de Boas Práticas e de controle de contaminantes e resíduos (Brasil, 2003a). O Ministério da Saúde (MS) tornou obrigatória a adoção das BPF em estabelecimentos produtores de alimentos (Portaria nº1428/1993) e a RDC nº172/2003 dispõe sobre regulamento técnico de BPF em estabelecimentos industriais de amendoim e derivados (Brasil, 1993; Brasil, 2003b).

2.5 CONTAMINAÇÃO MUNDIAL DE ALIMENTOS POR AFLATOXINAS

A incidência de aflatoxinas e ocratoxina A em alimentos tem sido reportada em diversos países. No Quadro 3, temos alguns dos trabalhos publicados nos últimos 5 anos. Ao contrário do que aconteceu no Brasil, as análises de micotoxinas foram realizadas, em sua maioria, utilizando metodologias analíticas mais sensíveis, como HPLC/FD e LC-MS/MS. A incidência de AFs e OTA encontradas nestes trabalhos (5-100%) foi maior que a reportada no Brasil, provavelmente porque as metodologias analíticas apresentaram LOQs bem menores (0,04-5,0µg/kg). Países como Malásia, República Democrática do Congo, China e Nigéria, apresentaram os níveis mais altos de contaminação por aflatoxinas, chegando a 1482µg/kg (Kamika & Takoy, 2011). Um fato interessante reportado foi que entre as amostras de manteiga de amendoim analisadas na China (Huang et al., 2010), 30,3% e 6,1% estavam contaminadas com AFM1 e AFM2, respectivamente. Os autores relataram que, de acordo com as informações contidas nos rótulos dos produtos analisados, nenhuma amostra continha leite ou qualquer derivado lácteo na sua formulação.

Quadro 3 – Aflatoxinas e ocratoxina A em alimentos comercializados em diversos países.

Micotoxinas	Alimento analisado (n° positivas / n° analisadas)	Método (LOQ/LOD)	País	Referência
AFB1	Amendoim (43/60)	IAC, CCD/fluorescência (LOD=1µg/kg)	República Democrática do Congo	Kamika & Takoy, 2011
AFs	Amendoim e derivados, castanhas, nozes, produtos de panificação e confeitaria (32/196)	IAC, HPLC/FD (LOD=0,4-0,6µg/kg)	Malásia	Leong et al., 2010
AFs	Amendoim e derivados, nozes, pinhão, amêndoa, castanhas e pistache (9/85)	SPE, HPLC/FD Confirmação por LC-MS/MS (LOQ=0,15-5,0µg/kg)	Coréia do Sul	Chun et al., 2007
AFs	Amendoim e manteiga de amendoim (50/73)	SPE, LC-MS/MS (LOQ=0,01-0,23 µg/kg)	China	Huang et al., 2010
AFs	Arroz (59/71)	IAC, HPLC/FD (LOD = 0,07-0,4µg/kg)	Irã	Mazaheri, 2009
AFB1, AFB2 e OTA	Arroz AFB1: (99/199) AFB2: (23/100) OTA: (44/199)	IAC, HPCL/FD Confirmação por LC-MS/MS (AFs: LOQ = 0,05µg/kg; OTA: LOQ=0,2µg/kg)	Canadá	Bansal et al., 2011
AFs e OTA	Arroz AFs: (56/100) OTA: (42/100)	Extração com metanol, ELISA (LOD=1,0µg/kg)	Turquia	Aydin et al., 2011
AFs e OTA	Arroz AFs: (21/21) OTA: (14/21)	Extração com acetonitrila, HPLC/DAD (AFs: LOD=0,01-0,06µg/kg; OTA: LOD=0,0002µg/kg)	Nigéria	Makun et al., 2011
AFB1	Arroz, milho, farinha de trigo, amendoim e óleo vegetal (amendoim e soja) (209/209)	Extração com metanol, ELISA (LOD=0,1µg/kg)	China	Sun et al., 2011

Micotoxinas	Alimento analisado (n° positivas / n° analisadas)	Método (LOQ/LOD)	País	Referência
AFs	Arroz, milho, trigo, cevada, sorgo e derivados (62/180)	IAC, HPLC/FD (LOD = 0,02-0,05µg/kg)	Tunísia	Ghali et al., 2010
AFB1 e OTA	Cereais matinais AFB1: (31/55) OTA: (33/55)	IAC, HPLC/FD (LOD = 0,02µg/kg)	Grécia	Villa & Markaki, 2009
AFs	Frutas desidratadas, amendoim, castanhas e pinhão (53/180)	IAC, HPLC/FD (LOD=0,5-1,0µg/kg)	Paquistão	Luttfullah & Hussain, 2011
AFs e OTA	Nozes e derivados, frutas secas, cereais e derivados, leguminosas e café AFs: (15/297) OTA: (7/48)	IAC, HPLC/FD Confirmação por LC-MS/MS (AFs: LOQ=0,04-0,22µg/kg; OTA: LOQ=1,53µg/kg)	Itália	Imperato et al., 2011
AFB1	Produtos de arroz, trigo, milho, aveia e amendoim, sementes e castanhas (69/95)	Extração com metanol, ELISA (LOQ=0,5µg/kg)	Malásia	Reddy et al., 2011

AFs=AFB1, AFB2, AFG1, AFG2; CCD = cromatografia em camada delgada; IAC = coluna de imunoafinidade; SPE= extração em fase sólida; HPLC/FD= cromatografia líquida de alta eficiência com detector fluorescência; HPLC/DAD= cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos; LC-MS/MS=cromatografia líquida com detector de massas; ELISA = teste imunoenzimático (Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay).

2.6 MICOTOXINAS E LEITE MATERNO

O leite humano contém um ótimo balanço de gorduras, carboidratos e proteínas para o desenvolvimento dos bebês, sendo considerada a melhor fonte de nutrição para recém-nascidos (AAP, 2012). Estudos têm mostrado que a amamentação fornece uma gama de benefícios para o crescimento, imunidade e desenvolvimento dos bebês, reduz a incidência de doenças crônicas e mortalidade, além de trazer inúmeros benefícios para a saúde da mãe (Lawrence, 1997; Hanson et al., 2002; Jones et al., 2003; WHO 2006). No entanto, é possível que contaminantes aos quais a mãe foi exposta, como as micotoxinas, sejam transferidos para o leite materno, na sua forma original ou como metabólitos (Landrigan et al., 2002; Sherif et al., 2009).

As crianças são mais vulneráveis que os adultos aos efeitos dos contaminantes, pois são consideradas mais susceptíveis. A razão desta maior suscetibilidade se deve ao fato das crianças possuírem uma elevada taxa metabólica, baixo peso corpóreo, baixa habilidade de detoxificação e o incompleto desenvolvimento de alguns órgãos e tecidos, principalmente do sistema nervoso central (WHO, 2006). Existe uma crescente preocupação quanto à presença de contaminantes no leite materno, bem como sobre as consequências para a saúde das crianças advindas da ingestão destes compostos, principalmente durante a fase em que o leite é sua única fonte de alimentação. O constante desenvolvimento de métodos analíticos de identificação e quantificação de contaminantes no leite, bem como a avaliação do risco da exposição do lactente são, portanto, imprescindíveis.

Os métodos atualmente utilizados para determinação de micotoxinas em leite materno baseiam-se, em sua maioria, na extração com solventes orgânicos, purificação cromatográfica em fase sólida ou imunoafinidade, combinada com HPLC de fase reversa e detector de fluorescência, com ou sem derivatização (Dostal et al., 2008; Galvano et al., 2008; Gurbay et al., 2009, 2010; Navas et al., 2005; Polychronaki et al., 2007a). A utilização de detectores de massa para análise ou confirmação de micotoxinas no leite materno foi relatada apenas por Munõz et al. (2010), embora esta técnica seja aplicada para determinação de micotoxinas no leite de vaca (Cavaliere et al., 2006; Wang et al., 2011).

No Quadro 4 encontram-se dados de trabalhos publicados, no Brasil e no mundo, acerca da presença de micotoxinas no leite materno.

Quadro 4 – Micotoxinas no leite materno.

Micotoxinas	Amostras positivas/analizadas (faixa de concentração)	Método (LOQ/LOD)	País	Referência
AFs, AFM1, AFM2 e aflatoxicol	AFM1: 59/264 (0,02-1,8ng/mL) AFM2: 18/264 (0,01-2,07ng/mL) AFB1: 17/264 (0,13-8,2ng/mL) Aflatoxicol: 3/264 (0,06- 0,2ng/mL) AFB2: 2/264 (0,04-0,05ng/mL)	ELL, HPLC/FD (LOQ/LOD=NR)	Gana	Lamplugh et al., 1998
AFM1	16/84 (0,02-1,7ng/mL)	SPE, HPLC/FD (LOD=0,01ng/mL)	Austrália e Tailândia	El-Nezami et al., 1995
AFB1, AFM1 e OTA	OTA: 198/231 (0,006-0,008ng/mL) AFM1: 1/231 (0,194ng/mL) AFB1: 1/231 (0,11ng/mL)	IAC, HPLC/FD (LOD=0,0005-0,005ng/mL)	Itália	Turconi et al., 2004
AFM1 e OTA	AFM1: 1/50 (0,024ng/mL) OTA: 2/50 (0,011-0,024ng/mL)	IAC, HPLC/FD (LOQ=0,01ng/mL)	Brasil	Navas et al., 2005
AFs e AFM1	AFM1: 248/443(0,0042-0,889ng/mL) AFG1*: 30/443 AFB2*: 12/443 AFB1*: 9/443 AFG2*: 7/443	SPE, HPLC/FD (LOD=0,0042ng/mL)	Egito	Polychronaki et al., 2007a
AFM1 e OTA	AFM1: 5/82 (0,007-0,14ng/mL) OTA: 61/82 (0,005-0,405ng/mL)	IAC, HPLC/FD (0,005-0,007ng/mL)	Itália	Galvano et al., 2008
OTA	9/76 (0,0023-0,0603ng/mL)	ELL, HPLC/FD (LOD=0,005ng/mL)	Eslováquia	Dostal et al., 2009
OTA	75/75 (0,6-13,1ng/mL)	ELL, HPLC/FD (LOD=0,01ng/mL)	Turquia	Gürbay et al., 2009
AFM1 e AFB1	AFM1: 75/75 (0,06-0,29ng/mL) AFB1: 75/75 (0,09-4,12ng/mL)	ELL, HPLC/FD (LOD=0,05ng/mL)	Turquia	Gürbay et al., 2010
OTA e OTα	OTA: 11/11 (0,044-0,184ng/mL) OTα: 11/11 (0,04-0,1ng/mL)	ELL, HPLC/FD Confirmação por LC-MS/MS (LOD=0,03-0,04ng/mL)	Chile	Muñoz et al., 2010

Micotoxinas	Amostras positivas/analizadas (faixa de concentração)	Método (LOQ/LOD)	País	Referência
AFM1	157/160 (0,0003-0,0267ng/mL)	ELISA (LOD/LOQ=NR)	Irã	Sadeghi et al., 2009
AFM1	20/182 (0,005-0,008ng/mL)	ELISA (LOD=0,005ng/mL)	Irã	Mahdavi et al., 2010
AFM1	8/132 (0,007-0,01ng/mL)	ELISA (LOD=0,005ng/mL)	Irã	Ghiasian & Maghsood, 2012

AFs=AFB1, AFB2, AFG1, AFG2; ELL = extração líquido-líquido; IAC = coluna de imunoafinidade; SPE= extração em fase sólida; HPLC/FD= cromatografia líquida de alta eficiência com detector fluorescência; LC-MS/MS=cromatografia líquida com detector de massas; ELISA = teste imunoenzimático (*Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay*); NR= não reportado; *avaliação qualitativa.

2.7 VALIDAÇÃO DE METODOLOGIAS ANALÍTICAS

A validação de metodologias analíticas é de extrema importância para a determinação da concentração de contaminantes. O processo de validação é constituído de uma série de estudos experimentais que objetivam avaliar o desempenho de um ensaio laboratorial e sua adequação à finalidade pretendida (EURACHEM, 1998; Thompson et al., 2002; MAPA, 2011). Validar um procedimento analítico significa assegurar que o procedimento desenvolvido é adequado ao objetivo proposto, ou seja, que os resultados gerados pelo laboratório são confiáveis e rastreáveis (INMETRO, 2010; MAPA, 2011). A validação é um processo contínuo e, portanto, a adequação de uma metodologia analítica aos requisitos de qualidade deve ser periodicamente avaliada (Thompson et al., 2002).

Existem diversos protocolos, nacionais e internacionais, que estabelecem quais parâmetros devem ser avaliados no decorrer do processo de validação, além de definir alguns dos critérios de aceitação das metodologias. Os parâmetros comumente avaliados são: seletividade, linearidade, limite de quantificação, recuperação (tendência/veracidade), precisão e robustez (Brasil, 2003c; INMETRO, 2010; MAPA, 2011; Thompson et al., 2002; EURACHEM, 1998).

A seletividade é o parâmetro que assegura que a presença de interferentes não prejudicará o desempenho do ensaio, ou seja, o método desenvolvido será capaz de separar o analito de interesse de substâncias análogas como impurezas, metabólitos, produtos de degradação da matriz e isômeros do analito (INMETRO, 2010; Thompson et al., 2002; MAPA, 2011). A seletividade pode ser avaliada através da comparação de cromatogramas da amostra com e sem o analito, sendo que outras substâncias não devem eluir no mesmo tempo de retenção do analito (INMETRO, 2010; Ribani et al., 2004).

O MAPA considera os estudos de efeito de matriz como parte do estudo de seletividade, pois através destes experimentos é possível verificar alterações na resposta do instrumento (aumento/diminuição de sinal) em função de interferências causadas pelas substâncias que compõe a matriz (MAPA, 2011). Bruce et al. (1998), propõem que o efeito de matriz pode ser avaliado através da comparação da média das respostas obtidas através de curvas analíticas construídas em solvente e matriz. Desta maneira, se o teste de comparação de médias das respostas obtidas para os pontos das curvas de calibração (solvente e matriz) for significativo, é possível

concluir que a matriz exerce influência na resposta gerada e, portanto, as análises devem ser conduzidas utilizando curvas em matriz. Se o teste não for significativo, curvas preparadas em solvente podem ser utilizadas.

A linearidade é a capacidade de uma metodologia em fornecer uma relação direta entre a concentração do analito na amostra e a resposta instrumental (INMETRO, 2010; MAPA, 2011). A linearidade pode ser verificada através da construção de curvas de calibração e posterior análise do gráfico de resíduos produzidos pela regressão (MMQ – método dos mínimos quadrados), avaliação do coeficiente de determinação (R^2) da reta e avaliação estatística da significância da regressão (ANOVA; INMETRO, 2010; Thompson et al., 2002).

O limite de quantificação (LOQ) representa a menor concentração do analito que pode ser medida por um procedimento analítico (INMETRO, 2010; Ribani et al., 2004). Na determinação do LOQ, é importante assegurar que os critérios de precisão e recuperação sejam atendidos neste nível de concentração do analito. O LOQ pode ser obtido pelo método da relação sinal-ruído, ou seja, amostras com e sem adição do analito (fortificadas e branco) são analisadas e o LOQ é definido como a concentração da substância que gera uma resposta pelo menos 10 vezes maior que a resposta obtida pela análise do branco da amostra (Ribani et al., 2004).

Tendência e veracidade são termos adotados respectivamente pelo INMETRO e MAPA para definir o parâmetro de validação que tem como objetivo mensurar quão próximo o valor medido experimentalmente está do valor tido como referência (INMETRO, 2010; MAPA, 2011). Esta propriedade pode ser avaliada através da realização de experimentos de recuperação, utilização de materiais de referência certificados (MRC) e participação em ensaios interlaboratoriais (proficiência). A análise de amostras fortificadas com concentrações conhecidas do analito de interesse pode ser utilizada para estimar a recuperação do procedimento analítico realizado (INMETRO, 2010).

A precisão de um método é a estimativa da dispersão de resultados de testes independentes, conduzidos sob condições definidas, sendo expressa, geralmente, em termos do desvio padrão (SD) ou desvio padrão relativo (RSD; Thompson et al., 2002; MAPA, 2011). Avaliação da repetitividade, precisão intermediária e reprodutibilidade são formas de mensurar a precisão de uma metodologia analítica (INMETRO, 2010; MAPA, 2011). A repetitividade pode ser medida através da análise de replicatas de amostras fortificadas, submetidas às mesmas condições de

medição (analista, dia e equipamentos iguais). Para obter a precisão intermediária, entretanto, um destes parâmetros é alterado. A estimativa da reprodutibilidade de um método só é possível mediante participação em ensaios de proficiência (INMETRO, 2010; MAPA, 2011).

A robustez visa avaliar a sensibilidade das respostas analíticas a pequenas variações nas condições experimentais do procedimento estabelecido (Thompson et al., 2002; MAPA, 2011). Uma das maneiras de verificar a robustez de um método é através da realização de planejamentos fatoriais (INMETRO 2010; MAPA, 2011). Com os dados obtidos nestes planejamentos é possível identificar quais fatores influenciam significativamente o resultado da medição, através de um número reduzido de experimentos (Neto et al., 2010; MAPA, 2011). Resultados de planejamentos fatoriais obtidos durante o processo de otimização da metodologia podem ser utilizados como um estudo prévio da robustez do procedimento analítico (MAPA, 2011).

2.8 AVALIAÇÃO DO RISCO

Considerando os trabalhos citados anteriormente é possível perceber que a contaminação de alimentos por micotoxinas e, conseqüentemente, a exposição humana pode ser extremamente variável, tanto entre regiões, quanto entre períodos do ano diferentes. Williams et al (2004) consideram que a prevalência da exposição à aflatoxinas deve ser dividida em 2 grupos, países desenvolvidos e países em desenvolvimento, pois acreditam que a contaminação de alimentos por aflatoxinas não é facilmente prevenida sem investimentos significativos na infraestrutura de produção, secagem e armazenamento. Desta maneira é imprescindível a realização de um processo completo e contínuo de avaliação do risco para determinar o verdadeiro impacto da exposição à aflatoxinas através da dieta na saúde humana.

A avaliação do risco é um processo de base científica que tem como objetivo calcular/estimar o risco do desenvolvimento de determinado efeito adverso em um organismo alvo, sistema ou (sub)população, após a exposição à um agente particular. Identificação e caracterização do perigo, avaliação da exposição e caracterização do risco são etapas da avaliação de risco (IPCS, 2004).

O risco é definido como a probabilidade da ocorrência de um efeito adverso em um organismo, sistema ou (sub)população causado pela exposição à um agente sob condições específicas (IPCS, 2004). O risco é função da toxicidade e da exposição (Jardim & Caldas, 2009). A primeira etapa a ser desenvolvida no processo de avaliação do risco é a identificação do dano/perigo. Nesta etapa identifica-se o tipo e a natureza dos efeitos adversos que a substância tem capacidade de causar à saúde humana (IPCS, 2004). Estas informações podem ser obtidas através de testes *in vitro*, estudos com animais de laboratório e seres humanos, além da utilização da relação estrutura molecular e atividade (Jardim & Caldas, 2009).

A partir do conhecimento dos efeitos adversos causados pela exposição, deve-se tentar estabelecer uma relação quantitativa entre a exposição e a incidência de resposta do efeito adverso avaliado (IPCS, 2009). A avaliação de experimentos com animais de laboratório é a principal fonte utilizada na obtenção de informações sobre a caracterização da relação dose-resposta de substâncias potencialmente tóxicas presentes nos alimentos (Jardim & Caldas, 2009). Com os resultados obtidos é possível estabelecer parâmetros de ingestão segura (crônica e aguda) de contaminantes para o homem. Alguns dos parâmetros existentes são: ingestão diária aceitável (IDA), ingestão diária tolerável máxima provisória (PMTDI – *Provisional Maximum Tolerable Daily Intake*), ingestão tolerável semanal provisória (PTWI – *Provisional Tolerable Weekly Intake*) e dose de referência aguda (ARfD – *Acute Reference Dose*).

É importante ressaltar que, para substâncias genotóxicas, não é possível estabelecer uma dose de ingestão segura, pois a exposição a uma única molécula pode iniciar o processo de mutação genética. Portanto, para essa classe de substâncias, que inclui as aflatoxinas, é recomendável que a exposição seja mantida ao nível mais baixo possível (ALARA – *As Low As Reasonably Achievable*; IPCS, 2009). No caso particular das aflatoxinas foi possível determinar o fator de potência carcinogênica, ou seja, o número de casos adicionais de câncer devido a certo nível de exposição às aflatoxinas. O fator de potência carcinogênica estimado pelo JECFA é de 0,01 câncer/10⁵ habitantes/ano/ng aflatoxina/kg pc/dia para não portadores do vírus da hepatite B (HBsAg⁻) e de 0,3 câncer/10⁵ habitantes/ano/ng aflatoxina/kg pc/dia para portadores (HBsAg⁺; WHO, 1999).

A avaliação da exposição, terceira etapa da avaliação do risco, é definida como a estimativa qualitativa e/ou quantitativa da ingestão provável de agentes biológicos, químicos ou físicos através da dieta, bem como a exposição por outras fontes, se relevante (CAC, 2008). No caso de contaminantes de alimentos, a avaliação da exposição através da dieta leva em consideração a ocorrência e concentração de uma substância química na dieta e o padrão de consumo dos alimentos que podem conter esta substância. Geralmente, estabelece-se uma faixa de ingestão do contaminante, ou seja, determina-se o consumo da população total (média da população) e de apenas consumidores do alimento em questão (altos consumidores; IPCS, 2009).

A estimativa da exposição humana a contaminantes através da dieta é obtida através da combinação de dados do consumo de alimentos com dados da concentração, de acordo com a equação abaixo (FAO/WHO, 2005):

$$Ingestão = \frac{\sum (Concentração\ do\ contaminante\ no\ alimento \times Consumo\ do\ alimento)}{Peso\ corpóreo}$$

Existem diversas maneiras de obter dados da concentração de contaminantes na dieta e a escolha do método utilizado é baseada no objetivo do estudo. Podem-se utilizar limites legais como LM (Limite Máximo) e LMR (Limite Máximo de Resíduos) ou dados obtidos através de estudos de monitoramento (IPCS, 2009). Neste tipo de estudo, as amostras são coletadas no comércio, de acordo com planos amostrais específicos, e analisadas no laboratório (Jardim & Caldas, 2009). Os dados de concentração obtidos são gerados a partir da análise do alimento como comercializado e não como consumido, assim é recomendável a utilização de fatores de processamento para corrigir o nível de concentração do contaminante no alimento e, desta maneira, fornecer valores de ingestão mais realistas (Jardim & Caldas, 2009; IPCS, 2009).

Os dados de concentração utilizados na estimativa da exposição devem ser provenientes de fontes confiáveis e, portanto, é aconselhável que a metodologia utilizada na análise do contaminante no alimento seja validada de acordo com protocolos internacionalmente aceitos (IPCS, 2009). Outro fator importante é a maneira como os resultados descritos como menores que o LOQ ou LOD são tratados. Uma abordagem comumente utilizada é a adoção de dois limites da

estimativa: o inferior (*lower bound*), onde as amostras menores que o LOQ/LOD são consideradas como zero e o superior (*upper bound*), com amostras não detectadas consideradas como $\frac{1}{2}$ LOQ. Além disso, as metodologias utilizadas devem ser capazes de medir concentrações extremamente baixas do contaminante, isto é, o LOQ do método analítico deve ser o mais baixo tecnicamente possível. Este detalhe é extremamente importante na condução de avaliações da exposição, pois se o LOQ não é suficientemente baixo existe a possibilidade de o risco ser superestimado no estabelecimento do limite superior (IPCS, 2009).

O consumo dos alimentos pode ser obtido através de dados de suprimento de alimentos, disponibilidade de alimentos no domicílio, consumo individual ou estudos de dieta duplicada (Jardim & Caldas, 2009). Quando possível, os dados de peso corpóreo devem estar diretamente relacionados aos valores de consumo do indivíduo. Entretanto, quando estes dados não estiverem disponíveis pode-se utilizar o peso médio da população em estudo (IPCS, 2009).

Dados de suprimentos de alimentos são obtidos através de balancetes agrícolas e, refletem a disponibilidade, por habitante, do alimento não processado (IPCS, 2009). Um exemplo deste tipo de abordagem são as 13 dietas *cluster* do GEMs/Food (Global Environmental Monitoring System), utilizadas pelo JMPR (Joint FAO/WHO Meeting on Pesticide Residues) e JECFA (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives), para o cálculo de exposição crônica às substâncias químicas.

Informações acerca da disponibilidade de alimento no domicílio representam a quantidade de alimento adquirida pela família durante determinado período, porém, não informam a distribuição do consumo entre os indivíduos, consumo fora da residência e nem a quantidade de alimentos desperdiçada (IPCS, 2009). A Pesquisa de Orçamento Familiar (POF), conduzida periodicamente no Brasil pelo IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística), coleta dados, durante sete dias, acerca da aquisição de alimentos pelo domicílio (compra, doação e produção própria). Durante a POF também são coletadas informações como idade, sexo e peso corpóreo dos moradores de cada residência. Além disso, na última POF (2008/2009), também foram coletados dados de consumo individual de 30% dos domicílios visitados, para indivíduos a partir de 10 anos (IBGE, 2011).

A utilização do consumo individual como fonte de dados permite acessar o consumo de subgrupos específicos da população, sendo considerada a fonte ideal

para avaliar a exposição humana a contaminantes através da dieta. Estes dados podem ser obtidos através do registro individual do consumo durante determinado período, recordatório 24h e questionário de frequência alimentar (QFA; IPCS, 2009). Finalmente, dados de consumo também podem ser obtidos através da dieta duplicada, onde uma segunda porção do alimento consumido por cada indivíduo é pesada (Jardim & Caldas, 2009).

A combinação dos dados de contaminação e consumo pode ser realizada de duas maneiras diferentes, ou seja, através dos modelos determinístico ou probabilístico. No primeiro, valores pontuais de concentração e consumo, como a média, são utilizados no cálculo de ingestão. Já no segundo, a exposição é simulada através de modelos matemáticos que retiram valores aleatórios de concentração e consumo para construir uma curva de distribuição da exposição, fornecendo, desta maneira, resultados mais realistas (IPCS, 2009).

Na última etapa do processo, caracterização de risco, estima-se a probabilidade de ocorrência de um determinado efeito adverso, causado por certo agente, em um organismo ou população, sob condições específicas. (IPCS, 2004). Para substâncias não genotóxicas, compara-se a ingestão calculada com o parâmetro de ingestão segura e, caso o primeiro seja maior que o segundo, conclui-se que o agente analisado pode oferecer risco à população estudada. No caso de substâncias genotóxicas, a utilização do princípio ALARA, cálculo do risco de câncer e da Margem de Exposição (MOE) são algumas das opções para a caracterização do risco (IPCS, 2009).

Após a conclusão da avaliação do risco, pode-se passar para a análise do risco, processo que envolve, além da avaliação, as etapas de gerenciamento e comunicação do risco. O gerenciamento do risco leva em consideração as evidências científicas levantadas na avaliação do risco, fatores políticos, sociais e econômicos na tomada de decisão por agências reguladoras. Já a comunicação do risco é a parte do processo onde ocorre a troca de informações sobre o risco entre avaliadores, gerenciadores, mídia e grupos de interesse público (IPCS, 2004). A análise e avaliação do risco não são definitivas e, portanto, à medida que novas evidências são descobertas todo o processo deve ser reavaliado (IPCS, 2009).

3. OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar a exposição de adultos à aflatoxinas através da dieta e a exposição de lactentes à aflatoxinas e ocratoxina A através do consumo de leite materno. Os objetivos específicos foram:

- Avaliar o risco da exposição da população brasileira às aflatoxinas na dieta;
- Desenvolver e validar metodologia para a determinação conjunta de aflatoxinas (AFB1, AFB2, AFG1, AFG2 e AFM1) e ocratoxina A no leite materno;
- Avaliar o risco da ingestão diária de micotoxinas por crianças que recebem leite de doadoras da Rede de Bancos de Leite do Distrito Federal.

4. AFLATOXINS IN FOOD PRODUCTS CONSUMED IN BRAZIL – A PRELIMINARY DIETARY RISK ASSESSMENT

Patricia Diniz Andrade, Mauricio Homem de Mello, Jessica de Aguiar França, Eloisa Dutra Caldas*

Laboratory of Toxicology, Faculty of Health Sciences, University of Brasília, 70910-900, Brasília, DF, Brazil

*Corresponding author. Email: eloisa@unb.br

Abstract

A preliminary dietary exposure assessment for aflatoxins (AFs; AFB1, AFB2, AFG1 and AFG2) was conducted to evaluate the potential carcinogenic risks for the Brazilian population. AF concentration data in food were obtained from analysis reports issued by the Central Public Health Laboratory of the Federal District (LACEN-DF) and from published work. Food consumption and body weight (bw) data were obtained from a national survey conducted in 2008/2009. Cancer risks arising from exposure to aflatoxins were assessed using the carcinogenic potency of AFs estimated by the JECFA, and hepatitis B virus prevalence in the Brazilian population. Additionally, margins of exposure (MOE) were also calculated for the various scenarios investigated. A total of 942 food samples were analyzed for AFs in the Federal District between 2002 and 2011 with 4.5% of them being positive for at least one aflatoxin (LOQ=2µg/kg). The highest percentage of contamination was found in peanuts (8.1%) and Brazil nuts (6.0%), with mean levels ranging from 6.7µg/kg in peanut products to 36.9µg/kg in Brazil nuts. Most of the studies conducted elsewhere in Brazil found similar results. Total AF intake for the total Brazilian population and high consumers of food relevant for AF contamination in Brazil (upper bound; samples < LOQ=1/2 LOQ) were 6.8 and 27.6 ng/kg bw/day, respectively. Cancer risk reached 0.0753 cancers/year/10⁵ individuals for the total population and 0.3056 cancers/year/10⁵ individuals for high consumers. MOE reached 25 and 6 for the total population and high consumers, respectively, indicating a potential risk for consumers. Aflatoxins are genotoxic carcinogens, and government actions should be maintained and continuously improved in order to guarantee that human exposure levels are kept as low as possible.

Keywords: aflatoxins; exposure assessment; cancer risk; Brazil.

Introduction

Mycotoxins are toxic secondary metabolites produced by a range of fungi, and can be found in a wide variety of agricultural commodities, contaminated either before and/or after harvesting (Frisvad, Andersen et al. 2007; Magan and Aldred 2007). Mycotoxins can affect human health in several ways, some being acutely toxic, some chronically toxic and others both (Frisvad, Thrane et al. 2007).

Aflatoxins (AFs) are considered the most important group of mycotoxins in the world food supply. They are produced in nature primarily by the fungi *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*, and are often found in crops like maize, peanuts and cottonseed (Pitt and Hocking 2009). Aflatoxin B1 and naturally occurring mixtures of AFs (AFB1, AFB2, AFG1, AFG2) have been classified by the International Agency for Research on Cancer (IARC) as carcinogenic to humans (IARC 1993) and are considered one of the most potent mutagenic and carcinogenic substances known (WHO 1999). Additionally, AFs have been shown to cause acute liver damage, liver cirrhosis, immunosuppression and can interfere with protein uptake (Williams et al. 2004; Kuniholm et al. 2008). Data obtained from epidemiological studies have shown a positive correlation between AFB1 exposure and liver cancer, a risk that can be increased by a number of factors, mainly the presence of hepatitis B virus (Liu et al. 2012). Carcinogenic potency of AFs is 30 times higher for populations with hepatitis B virus (HBsAg⁺; WHO 1999).

Complete elimination of mycotoxins from the food supply is quite difficult, and risk management strategies to reduce human exposure include the enforcement of legislation and regulation to guarantee that consumers are getting safe food (Nielen and Marvin 2008). The Codex Alimentarius recommends that exposure to AFs should be as low as reasonably achievable, and adoption of Good Agricultural Practices (GAP) and Good Manufacturing Practices (GMP) are important tools to achieve a considerable reduction in AF levels in food (Codex 1995). The establishment of regulatory limits and the implementation of monitoring programs can also help keep mycotoxin contamination under control in the food supply. The first Brazilian legislation on AFs was published in 1976, setting a maximum level (ML) of 30µg/kg for AFB1+AFG1 for all food and feed commodities (CNNPA 1976). In 2002, a ML of 20µg/kg for total AFs (AFB1+AFB2+AFG1+AFG2) was established for peanuts, peanut butter, corn and corn meal for human consumption (RDC 274/2002; ANVISA 2012). More recently, a ML of 20 µg/kg was established for in shell Brazil

nuts and of 10 µg/kg for shelled Brazil nuts and other nuts (RDC 07/2011; ANVISA 2012).

This study aims to evaluate current data on AF contamination in the food supply of the Federal District area and other Brazilian regions, and to estimate the dietary exposure of the Brazilian population to aflatoxins and the cancer risks arriving from the exposure.

Material and methods

Aflatoxin levels in food

Data on aflatoxin levels in food commercialized in the Federal District were obtained from analysis reports issued by the Central Public Health Laboratory of the Federal District (LACEN-DF) from 2002 to 2011. Food samples were collected (at least 1 kg/sample) by the Federal District Health Inspection Department at various local retail stores in the region as part of the sanitary surveillance program. Samples were kept at ambient temperature and analyzed by the Mycotoxins Laboratory of the LACEN-DF according to Soares and Rodrigues-Amaya (1989). In this method, samples were extracted with methanol, re-extracted with chloroform, and analyzed by TLC with visual detection. The method was validated at a limit of quantification (LOQ) of 2µg/kg for each aflatoxin.

Aflatoxin data from other Brazilian regions were obtained from published studies related to samples collected from 2002 to 2011. Weighted mean AF concentrations for each food product in each study was estimated based on the data provided (number of samples analyzed, number of positive samples, LOQ/LOD reported, concentration). At the national level, estimated weighted means were calculated considering the results of the present study. Data on corn grain were not considered in this study as it requires considerable processing before consumption.

Food consumption data

Food consumption data were obtained from a survey conducted by the Brazilian Institute of Geography and Statistics (IBGE 2011) from July 2008 to June 2009. The survey obtained information on the amount of food entering in 55970 Brazilian households over 7 consecutive days (household budget survey; HBS). Within this survey, individual consumption data (2 non-consecutive days reporting) were collected in 13569 households (about 24% of all households) from 34003

individuals aged 10 years or older. Food consumption for the Federal District was estimated from the HBS data obtained in 977 households as only 3 individuals reported the food relevant for this study in the individual consumption data. For the purpose of this study, we considered that all food that entered the household was consumed equally by the household members 2 years or older. Consumption data for Brazil was obtained from the individual consumption data. Body weights and age for all household members were obtained during the survey.

The mean consumption *per* body weight was estimated for each food or food group relevant for this study (peanuts, peanut products, nuts, corn products, and rice). The mean consumption of the total population was estimated considering all households that participated in the HBS or all individuals that provided individual consumption data to the survey (all entries considered). To estimate the mean consumption of high consumers, only the households (in the HBS) or the individuals (in the individual consumption data) that reported acquiring or consuming these products, respectively were considered (blank entries not considered).

Chronic dietary intake of aflatoxins

The total chronic intakes of AFs for the Federal District and Brazil were estimated as the sum of the intakes for each food or food group considered in the study (Total intake = Σ [mean consumption x concentration]/body weight; FAO/WHO 2005). The lower bound (considering samples below the LOQ as 0) and upper bound (samples below the LOQ as $\frac{1}{2}$ LOQ) intakes were calculated in each case.

Carcinogenic risk of aflatoxins

The carcinogenic potency of AFs ($P_{\text{estimated}}$) and the cancer risk from exposure to AFs present in the diet were estimated using Equations 1 and 2, according to the procedure of the FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA; WHO 1999). These estimations consider the carcinogenic potency of aflatoxins for individuals with the hepatitis B virus ($\text{PHBsAg}^+ = 0.3$ cancers/year/100000 individuals) and for non-infected individuals ($\text{PHBsAg}^- = 0.01$ cancers/year/100000 individuals), the percentage of carriers (HBsAg^+) and non carriers (HBsAg^-) of the hepatitis B virus, and the total intake calculated previously. According to the Brazilian Ministry of Health, the prevalence of HBsAg^+ in the Federal District and Brazil are 0.26% and 0.37%, respectively (Brazil 2010).

$$P_{estimated} = [PHBsAg^{+} \times \% pop.HBsAg^{+}] + [PHBsAg^{-} \times \% pop.HBsAg^{-}] \quad Eq. 1$$

$$Cancer\ risk = P_{estimated} \times Total\ intake \quad Eq. 2$$

Margin of exposure (MOE)

The risks from the exposure to AFs were also characterized using the margin of exposure (MOE), defined as the ratio between the total intake and a toxicological reference, usually the lower-bound of a benchmark dose level that caused no more than a 10% cancer incidence in rodents (BMDL10) (EFSA 2005). The larger the MOE, the smaller the risk, and a value lower than 10 000 may indicate a potential risk to human health (EFSA 2005).

Results

Aflatoxin levels in food

A total of 942 food samples were analyzed for aflatoxin by the LACEN-DF between 2002 and 2011, with about 100 samples analyzed each year. A total of 42 samples (4.5%) were contaminated with at least one aflatoxin at level $\geq$ LOQ and 28 samples had total AF levels (AFB1+AFB2+AFG1+AFG2) $> 20\mu\text{g/kg}$, the current ML for all commodities, except shelled Brazil nut ($10\mu\text{g/kg}$). Only 2 positive samples did not contain AFB1. None of the 129 samples analyzed in 2003 contained AFs and the highest incidences of contamination were found in 2007 and 2008 (9.2% and 11.0%, respectively).

The main food groups analyzed by the LACEN-DF were peanuts (38.1% of all samples) and peanut products (31.3%). Peanuts and Brazil nuts were the products with the highest percentage of positive samples (8.1 and 6.0%, respectively) and with the greatest number of samples containing AFs higher than $20\mu\text{g/kg}$ (68.9 and 50.0% of positive samples, respectively). Corn products (n= 136) and bean samples (n=3) did not have detectable levels of AFs ($< 2\mu\text{g/kg}$ for each aflatoxin). Among other nuts, AFs were found in only one pistachio sample ($352\mu\text{g/kg}$). The mean and the range levels of AFs in food products in the Federal District are shown in Table 1. Mean levels of AFs in all samples ranged from $6.7\mu\text{g/kg}$ in peanut products to $36.9\mu\text{g/kg}$ in Brazil nuts. The mean of positive samples was higher for shelled Brazil nuts. There were two samples with more than $1000\mu\text{g/kg}$ of AFs, one of raw peanuts ($1496\mu\text{g/kg}$) and one of shelled Brazil nuts ($1972\mu\text{g/kg}$).

The incidence of AFs in food commercialized in the Federal District has decreased considerably in the last decade, as shown in Figure 1. The percentage of aflatoxin positive samples ($\geq$ LOQ) dropped from around 30.0% in peanuts and peanut products in 1996-2001 (Caldas et al. 1998; Caldas et al. 2002) to 5.7% in 2002-2011. Nuts also showed an important decrease, from 12.5% (1998-2001) to 3.4% (2002-2011). During this period, there was also a reduction in AF levels in the products analyzed. The percentage of peanuts and peanut product samples containing more than 30 μ g/kg de B1+G1 (Brazilian ML until 2002) dropped from 27.3% (1996-1998) to 2.9% (2002-2011).

The mean levels of AFs found in food analyzed in the Federal District and other Brazilian regions in 2002-2011, which also include data on rice and corn products, are shown in Table 2. Most of the studies are from the state of São Paulo and from the Federal District. The main groups of samples analyzed nationally were also peanuts (29.2%) and peanuts products (27.8%), although the highest percentage of positive samples was found in rice (37.6%).

Food consumption data

A summary of food consumption data obtained for the foods relevant to this work is shown in Table 3. Information on corn products and rice was not relevant for the Federal District since no corn product sample analyzed was positive, and rice was not analyzed during the period of the study. Of the 977 households that participated in the HBS in the Federal District, a maximum of 5 household reported the acquisition of peanuts, peanut products, Brazil nuts and/or other nuts. When all the surveyed households were considered (total population), the highest mean consumption was for peanuts (0.13 g/person/day). Individual consumption data obtained for the Brazilian population also showed low consumption of these foods (maximum of 1.1 % of the total population reported peanut products). Most of the individuals reported rice (95.6%), confirming the Brazilian habit of consuming rice at least once a day.

Dietary risk assessment

The lower-upper bound intakes of AFs through the consumption of peanuts, peanut products, Brazil nuts, other nuts, corn products and rice are shown in Table 4. In the Federal District, total intakes for the total population and high consumers were

0.06-0.08 and 33.3-47.1 ng/kg bw/day, respectively, with Brazil nuts contributing the most to the intake for high consumers (54%, upper bound level). At the national level, the intake of AFs through the consumption of corn products and rice were also considered. For rice, a cooking processing factor of 0.7 (Je-Won et al. 2005) was applied to the mean concentration in the country (Table 2) to determine the final concentration to which the population is exposed to. Total intakes were 6.6-6.8 for total population (almost 100% from rice consumption) and 16.3-27.6 ng/kg bw/day for high consumers (55.1 % of the upper bound level from the consumption of rice and corn products).

The risk characterizations from the exposure to AFs (cancer risk and MOE) are shown in Table 5. While in the Federal District the cancer risk for the total population was much lower than what was estimated at the national level (0.0009 and 0.0753 cancers/year/ 10^5 individuals, respectively), for high consumers the risk was twice that for the entire country. The same pattern risk was found when the MOE approach was used. MOEs ranged from 2833 (Federal District, lower risk) to 25 (Brazil) for the total population, and from 10.4 (Brazil, lower risk) to 3.6 (Federal District) for high consumers.

Discussion

This study has shown that peanuts and peanut products remain the major food of concern regarding AF contamination in the Federal District and in other parts of Brazil, confirming other studies conducted in the country (Rodríguez-Amaya and Sabino 2002; Rocha et al. 2008; Oliveira et al. 2009). Considering peanuts and peanut products as a single group, the incidence of aflatoxin found in the Federal District is lower (5.7%) than that reported in São Paulo (44.2%) using the HPLC/fluorescence detector method, which is 5 times more sensitive than the TLC method used in the Federal District. The mean level of positive samples was higher in the Federal District (123.0 µg/kg) than in the states of São Paulo (6.05 µg/kg; Oliveira et al. 2009), Minas Gerais (56.4 µg/kg; Rocha et al. 2008) and Rio Grande do Sul (16.2 µg/kg; Oliveira and Koller 2011). Peanuts and peanut products, in addition to nuts, are not very frequently consumed by the Brazilian population, a pattern that is also found in the WHO Cluster Diet data (Brazil is included in diet K; WHO 2006). Peanuts and peanut products are usually more consumed during the months of June-July in certain folkloric festivities. Brazil nuts and other nuts are

mostly consumed during Christmas and the New Year, and are considered an expensive food by most of the population.

Data on corn products were found only in samples from the Federal District and the state of Paraná (southern Brazil), which is the highest corn producer in the country (IBGE 2010). However, most corn product industries are located in the Southeastern and Southern regions of Brazil, and it is most likely that the products analyzed in both studies are also consumed elsewhere in the country.

The incidence of AFs in food products found in the current study was similar to that found in a study conducted with imported products in Italy (5.0%; Imperato et al. 2011) but considerably lower than those reported in Pakistan (29.4%; Luttfullah and Hussain 2011), Malaysia (16.3%; Leong et al. 2010), and South Korea (10.5%; Chun et al. 2007).

The decrease in AF contamination observed in food products in recent years in the Federal District is probably a consequence of the enforcement of a Brazilian government norm regarding the compulsory adoption of Good Manufacturing Practices (GMP) by peanut industries as of 2003 (RDC 172/2003; ANVISA 2012). AFs in corn products (corn meal and popcorn) do not seem to be a problem in the Federal District, since no contamination was found in this study nor previously in the region (Caldas and Silva 2007). Low incidence of AFs in corn products was found in Parana state, and in other studies conducted in the country before 2002 (Bittencourt et al. 2005; Kawashima and Soares 2006).

The calculated total AF intake for the total Brazilian population was 20 times higher than the intake calculated for the European population (0.32ng/kg bw/day), using consumption data from the GEMS/Food Cluster Diets and mean AF levels in corn (unprocessed), peanuts and peanut products up to 20µg/kg (WHO 1999), and 8 times higher than in the Swedish population (0.8ng/kg bw/day; Thuvander et al. 2001). The exposure was also much higher than in the Japanese population (0.003-0.004 ng/kg bw/day for high consumers, only AFB₁; Sugita-Konishi et al. 2010), but lower than most intakes calculated for African countries for individual commodities (0.1-850 ng/kg bw/day; Shephard 2008).

The estimated total intake for high consumers of peanuts, peanut products and nuts (high consumers) in the Brazilian population was much higher than if we consider the total population, but it is unlikely that this pattern of consumption is repeated daily on a long-term basis and that the food consumed is always

contaminated. The AF intakes in the Federal District (total population) were much lower than those found at the national level, mainly because exposure from the consumption of rice was not considered in the estimation. The presence of aflatoxins in rice has been reported worldwide. In most studies, the incidence of positive samples is high (49.7 to 100%), although the mean levels found in positive sample were $< 5 \mu\text{g/kg}$ (Mazaheri 2009; Bansal et al. 2011; Reddy et al. 2011; Sun et al. 2011). Samples analyzed in Turkey and Nigeria showed both high incidence (56.0 and 100%) and contamination levels (0.05-371.9 $\mu\text{g/kg}$; Aydin et al. 2011; Makun et al. 2011), though there was no positive samples analyzed in Tunisia (Ghali 2010).

The cancer risk estimated for the total Brazilian population (0.37 % HBsAg+) was higher than that estimated for Europe (0.2 – 1 % HBsAg+; Table 5). Clearly, the higher risk comes mainly from the consumption of rice, a staple food in the country. In Japan, the risks are much lower even at the 95th exposure level. The Brazilian HBsAg⁺ prevalence used in the estimation was much lower than that reported by the World Health Organization (WHO), which considered Brazil an area of intermediate and high endemicity (range of 2 to $> 8\%$ HBsAg⁺; WHO 2002). However, this pattern has changed since 1989 when the Brazilian health system began providing vaccines against the hepatitis B virus, and currently this vaccine is administered to those aged 0-29 years and to vulnerable groups (pregnant women, homosexuals, police officers and, health care providers) (Brazil 2012).

Although the MOEs calculated for Brazil are lower than those reported for the European population, in both regions the values indicate a health concern ($< 10\,000$; EFSA 2005). The cancer risks and the MOEs estimated in China (Ding et al. 2012) and Africa (Shepard 2008) are also presented in Table 5. However, a direct comparison with the Brazilian results was not possible as the authors estimated the risks for individual commodities, and were not based on the total intake.

The HBS data used to estimate the consumption of peanuts, peanut products and nuts in the Federal District have certain limitations, the main one being that they reflect the food that is available in the household, which does not imply equal consumption among the household residents, which was assumed in this study. This approach may have overestimated consumption for some groups of the population, such as children. It is also important to point out that the IBGE individual consumption data only cover individuals 10 years of age or older, and therefore the

estimations for the Brazilian population obtained in this study exclude individuals under this age.

One limitation when using published work to estimate concentration levels of contaminants in food is the heterogeneity of published data. Mean concentrations for all samples were not available (weighted mean was estimated) and not all of the studies had reported the method LOQ (sometimes $\frac{1}{2}$ the LOD was used for the upper bound intake estimation). Additionally, many studies conducted in Brazil, including in the Federal District, still use the low sensitive thin layer chromatography method to analyze aflatoxins in food, which leads to an overestimation of the upper bound mean (samples $<LOQ = \frac{1}{2}LOQ$), mainly for food with low contamination incidence, such as corn-products.

Conclusions

The incidence of AFs in food commercialized in the Federal District has decreased considerably in the last decade, although the level of contamination found in some samples is still higher than what is found in other Brazilian states. Rice should be considered in future aflatoxin monitoring programs in the Federal District and other regions as it is a staple food in the Brazilian diet and any level of contamination would have an impact on the total exposure. Although preliminary due to the various limitations raised previously, the results of this study have shown that the dietary risks of the Brazilian population to aflatoxins are higher than those found in some other regions in the world, and may represent a health concern. Aflatoxins are genotoxic carcinogens and government actions should be maintained and continuously improved in order to guarantee that human exposure levels are kept as low as possible.

Acknowledgment

The authors would like to acknowledge the Mycotoxin Laboratory of the Public Health Laboratory of the Federal District (LACEN-DF) for providing the data that allowed the conduction of this study.

Figures and tables

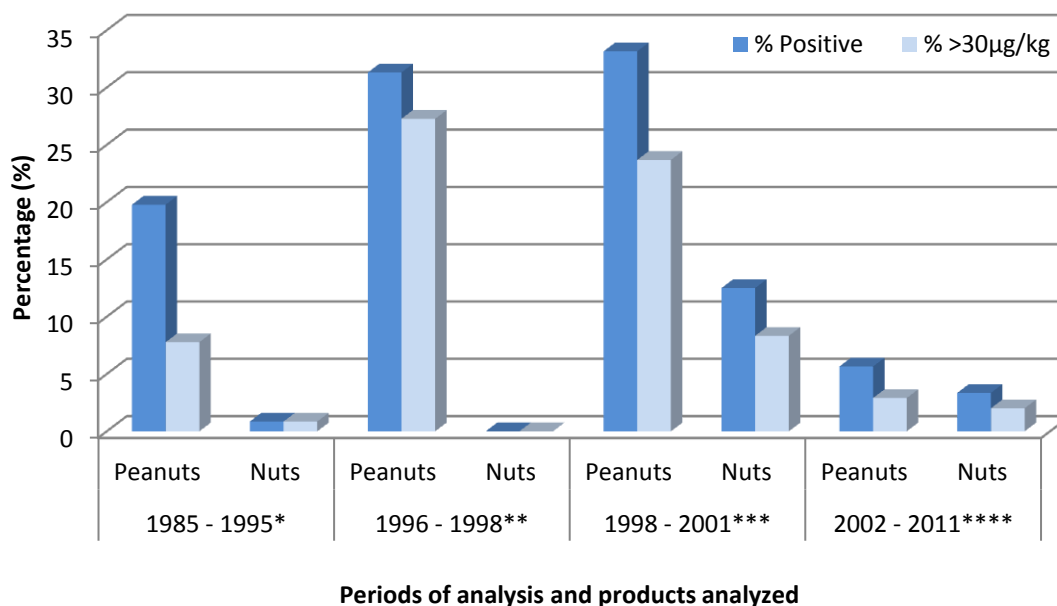


Figure 1. Aflatoxins analysis in the Federal District between 1985 and 2011. Peanuts include toasted, salted, shelled and peanut products; nuts include shelled Brazil nuts, almonds, cashew nuts, hazelnuts, nuts and pistachios; *Silva, Oliveira and Caldas 1996; ** up to June 1998, Caldas et al. 1998; *** from July 1998, Caldas et al. 2002; **** present work.

Table 1. Aflatoxin levels (AFB1+AFB2+AFG1+AFG2) in food samples analyzed in the Federal District between 2002 and 2011.

Products	Positive ^a / analyzed samples	All samples		Positive samples ^a	
		Mean ^b ± sd (µg/kg)	Range (µg/kg)	Mean ± sd (µg/kg)	Range (µg/kg)
Peanuts ^c	29/359	14.2±85.1	<4-1496	129.0 ± 278.5	7.9-1496
Peanut products ^d	8/295	6.7±24.1	<4- 340	101.5 ± 117.1	15.0-340.0
Brazil nuts, shelled	4/67	36.9±241.3	<4- 1972	553.6 ± 949.8	16.5-1972
Other nuts ^e	1/82	8.3±38.7	<4-354 ^f	352.0	-

^a at least for AFB1, ≥2µg/kg; ^b samples < LOQ were considered at ½ the LOQ; ^c toasted, salted and shelled peanuts; ^d peanut butter and peanut candies; ^e includes almonds, cashew nuts, hazelnuts, nuts and pistachios, all shelled; ^f one positive sample containing AFB1 and AFB2.

Table 2. Aflatoxin in food products in Brazil.

State or region	Mean, all samples, µg/kg ^a (positive/analyzed)					
	Peanuts ^b	Peanut products ^c	Shelled Brazil nuts	Other nuts ^d	Corn products ^e	Rice
Minas Gerais	30.6 ^f (8/21)	12.1 ^f (2/15)				0.2 ^g (1/36)
São Paulo ^h	3.4 (34/96)	3.6 (72/144)				
Rio Grande do Sul ⁱ	17.8 (7/12)	3.2 (6/10)				
Federal District	14.2 ^j (29/359)	6.7 ^j (8/295)	36.9 ^j (4/67)	8.3 ^j (1/82)	4.0 ^k (0/174)	
North and Northeast ^l			3.0 (NR/40)			
Amazonas ^m			37.1 (5/30)			
Paraná ⁿ					4.5 (7/123)	
Various states ^o						4.2 (75/166)
Brazil ^a	12.9 (78/488)	5.8 (88/464)	27.0 (-/137)	8.3 (1/82)	4.2 (7/297)	3.5 (76/202)

^a Weighted mean; samples < LOQ were considered at ½ the reported LOQ/LOD; ^b toasted, salted and shelled peanuts; ^c peanut butter and peanut candies; ^d almonds, cashew nuts, hazelnuts, nuts and pistachios; ^e corn meal, corn flour, corn grits, degermed corn (*canjica*), precooked corn flour, popcorn, corn flakes and snacks; ^f Rocha et al. 2008; LOD= 5µg/kg; ^g Carvalho et al. 2010; LOQ= 0.05-0.16 µg/kg; ^h Oliveira et al. 2009; LOQ=0.5µg/kg; ⁱ Oliveira and Koller 2011; LOQ considered as 2µg/kg; ^j Table 1; ^k Table 1 and Caldas and Silva 2007; LOQ=2µg/kg; ^l Pacheco and Scussel 2007; LOQ= 0.08-0.12 µg/kg; mean of positive samples; ^m Pacheco et al. 2010; LOQ=0.45-0.50 µg/kg; ⁿ Amaral et al. 2006; LOD=0.5-3.2 µg/kg; ^o Almeida et al. 2012; LOD=0.1-0.3µg/kg; NR= not reported.

Table 3. Data obtained from the Brazilian Household Budget Survey 2008/2009, for both High consumers and total population of Brazil.

	Total	Peanuts ^a	Peanut products ^b	Brazil nuts ^c	Other nuts ^d	Corn products ^e	Rice
Federal District ^f							
Households, n	977	4	5	1	4		
Consumers, n	2703	14	17	3	13		
Mean bw, kg	59.3	54.8	61.4	69.4	58.9		
<i>Total population ^g, g/day</i>		0.13	0.1	0.05	0.09		
<i>High consumers ^h, g/day</i>		63.18	22.09	47.62	21.47		
Brazil ⁱ							
Consumers, n	34003	129	380	38	57	1086	32502
Mean bw, kg	63.5	66.6	64.5	61.0	60.8	62.4	64.3
<i>Total population ^j, g/day</i>		0.04	0.12	0.005	0.01	1.82	170.16
<i>High consumers ^k, g/day</i>		21.35	19.65	10.57	13.39	114.03	194.28

^a toasted, salted and shelled peanuts; ^b peanut butter and peanut candies; ^c shelled; ^d almonds, cashew nuts, hazelnuts, nuts and pistachios; ^e corn meal, corn flour, corn grits and degermed corn (*canjica*); ^f HBS data; ^g all households in the survey; ^h only households that reported consumption of at least one food item considered in this study; ⁱ individual consumption data for individuals aged 10 years or older; ^j all individuals in the survey; ^k only individuals that reported at least one food item considered in this study.

Table 4. Aflatoxins intake (lower-upper bound) in the Federal District and Brazil through consumption of peanuts, peanut products, Brazil nuts, other nuts, corn products and rice (ng/kg bw/day).

Food	Federal District ^a		Brazil ^b	
	Total population ^c	High consumers ^d	Total Population ^e	High consumers ^f
Peanuts ^g	0.02-0.03	8.1-16.4	0.004-0.01	2.3-4.1
Peanuts products ^h	0.005-0.01	1.0-2.4	0.005-0.01	0.9-1.8
Brazil nuts, shelled	0.028-0.03	22.6-25.3	0.002-0.0021	4.3-4.7
Other nuts ⁱ	0.007-0.01	1.6-3.0	0.0007-0.001	0.9-1.8
Corn Products ^j			0.01-0.12	0.5-7.7
Rice			6.5-6.6	7.4-7.5
Total intake	0.06-0.08	33.3-47.1	6.6-6.8	16.3-27.6

^a HBS data; ^b individual consumption data for individuals aged 10 years or older; ^c all households in the survey; ^d only households that reported consumption of at least one food item considered in this study; ^e all the individuals in the survey; ^f only individuals that reported at least one food item considered in this study; ^g toasted, salted and shelled peanuts; ^h peanut butter and peanut candies; ⁱ almonds, cashew nuts, hazelnuts, nuts and pistachios, shelled; ^j corn meal, corn flour, corn grits, degermed corn (*canjica*), precooked corn flour, popcorn, corn flakes and snacks.

Table 5. Risk characterization for aflatoxins based on cancer risk and margin of exposure (MOE)

	Cancer risk ^a	MOE ^b
Federal District		
<i>Total population</i> ^c	0.0006-0.0009 ^d	2833-2125
<i>High consumers</i> ^c	0.3581-0.5065 ^d	5.1-3.6
Brazil		
<i>Total population</i> ^c	0.0731-0.0753 ^e	25.8-25.0
<i>High consumers</i> ^c	0.1794-0.3056 ^e	10.4-6.2
Europe (WHO 1999)		
<i>Total population</i> ^f	0.0041	-
Europe (EFSA 2007)		
<i>Total population</i> ^g	0.0037 - 0.0205 ^h	483 – 88
<i>High consumers</i> ⁱ	0.01 – 0.024 ^h	173 – 76
Africa (Shepard 2008)		
<i>Total population</i> ^j	0.1 – 70.1 ^k	121.4 - 0.2
Japan (Sugita-Konishi et al. 2010)		
<i>95th</i> ^l	0.00004-0.00005	-
China (Ding et al. 2012)		
<i>Mean</i> ^m	0.003-0.2 ⁿ	24.7 - 0.5
<i>97.5th</i> ^m	0.17-9.13 ⁿ	1273 - 24.1

^a cancers/year/10⁵ individuals, estimated according WHO (1999); ^b based on a BMDL₁₀ in rodent of 170 ng/kg bw/day (EFSA 2007), with exception of China (140 ng/kg/bw; Benford et al. 2010); ^c lower-upper bound; ^d 0.26%HBsAg⁺; ^e 0.37%HBsAg⁺; ^f for a ML of 20 µg/kg in raw corn, peanut and peanut products, 1% HBsAg⁺; ^g for a ML of 4 µg/kg in almonds, hazelnuts and pistachios, lower bound of Cluster Diet F – upper bound of Cluster Diet B; ^h 0.2 %HBsAg⁺; ⁱ high consumers of pistachios and mean consumption of other nuts; ^j range of individual commodities from different African countries; ^k 25%HBsAg⁺; ^l lower bound-upper bound, 1%HBsAg⁺; ^m range of individual commodities (rice, corn and corn product, peanut and peanut oil; ⁿ simulations of prevalence rates (%HBsAg⁺) of different age groups.

References

- Almeida MI, Almeida NG, Carvalho KL, Gonçalves GAA, Silva CN, Santos EA, Garcia JC, Vargas EA. 2012. Co-occurrence of aflatoxins B1, B2, G1 and G2, ochratoxin A, zearalenone, deoxynivalenol and citreoviridin in rice in Brazil. *Food Addit Contam.* 29:694-703.
- Amaral KAS, Nascimento GB, Sekiyama BL, Janeiro V, Machinski JM. 2006. Aflatoxins in corn-based food products traded in Brazil and risks to human health. *Ciênc Tecnol Alim.* 26(2):336-342.
- ANVISA (Brazilian Sanitary Surveillance Agency). *Alimentos*. [Internet] 2012. Available from: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/Anvisa+Portal/Anvisa/Inicio/Alimentos>
- Aydin A, Aksu H, Gusen U. 2011. Mycotoxins levels and incidence of mould in Turkish rice. *Environ Monit Assess.* 178:271-280.
- Bansal J, Pantazopoulos P, Tam J, Cavlovic P, Kwong K, Turcotte AM, Lau BPY, Scott PM. 2011. Surveys of rice sold in Canada for aflatoxins, ochratoxin A and fumonisins. *Food Addit Contam.* 28: 767-774.
- Benford D, Leblanc JC, Setzer RW. Application of the margin of exposure (MOE) approach to substances in food that are genotoxic and carcinogenic – example: aflatoxin B1 (AFB1). *Food Chem Toxicol.* 48:534-541.
- Bittencourt ABF, Oliveira CAF, Dilkin P, Corrêa B. 2005. Mycotoxin occurrence in corn meal and flour traded in São Paulo, Brazil. *Food Control.* 16:117-120.
- Brasil. Ministry of Health – Immunization Programme [Internet]. 2012. *Saúde amplia faixa etária para vacinação de hepatite B*. Available from: <http://portalsaude.saude.gov.br/portalsaude/noticia/3890/162/saude-amplia-faixa-etaria-para-vacinacao-de-hepa-tite-b.html>
- Brasil. Ministry of Health. 2010. *Estudo de prevalência de base populacional das infecções pelos vírus das hepatites A, B e C nas capitais do Brasil*. Available from: http://www.aids.gov.br/sites/default/files/anexos/publicacao/2010/50071/estudo_prevalencia_hepatites_pdf_26830.pdf
- Caldas ED, Silva ACS. 2007. Mycotoxins in corn-based food products consumed in Brazil: an exposure assessment for fumonisins. *J Agric Food Chem.* 55:7974-7980.

- Caldas ED, Silva SC, Oliveira JN, Degering AV. 1998. *Contaminação por aflatoxinas e ocratoxina A nos alimentos consumidos no Distrito Federal*. Rev Saúde Dist Fed. 9(2):44-47.
- Caldas ED, Silva SC, Oliveira JN. 2002. Aflatoxins and ochratoxin A in food and risks to human health. Rev Saúde Públ. 36(3):319-323.
- Carvalho RA, Batista LR, Prado G, Oliveira BR, Silva DM. 2010. Incidence of toxigenic fungi and aflatoxins in rice. Ciênc. Agrotec. 34:946-952.
- Chun HS, Kim HJ, Ok HE, Hwang J, Chung D. 2007. Determination of aflatoxin levels in nuts and their products consumed in South Korea. Food Chemistry. 102:385-391.
- CNNPA (Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos). Resolução nº34/1977 [Internet]. Available from: http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/34_76.htm
- Codex Alimentarius Commission. Codex general standard for contaminants and toxins in food and feed [Internet]. CODEX STAN 193, 1995. Available from: http://www.fao.org/fileadmin/user_upload/livestockgov/documents/1_CXS_193e.pdf
- Ding X, Li P, Bai Y, Zhou H. 2012. Aflatoxin B1 in post-harvest peanuts and dietary risk in China. Food Control. 23:143-148.
- EFSA (European Food Safety Authority). Opinion of the scientific panel on contaminants in the food chain on a request from the commission related to the potential increase of consumer health risk by a possible increase of the existing maximum levels for aflatoxins in almonds, hazelnuts and pistachios and derived products [Internet]. 2007. The EFSA Journal. Available from: <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/446.pdf>
- EFSA (European Food Safety Authority). Opinion of the scientific committee on a request from EFSA related to a harmonized approach for risk assessment of substances which are both genotoxic and carcinogenic [Internet]. 2005. The EFSA Journal. Available from: <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/282.pdf>
- FAO/WHO. Dietary exposure assessment of chemicals in food: report of a joint FAO/WHO consultation [Internet]. 2005. Annapolis, USA. Available from: http://whqlibdoc.who.int/publications/2008/9789241597470_eng.pdf

- Frisvad JC, Andersen B, Samson RA. 2007. Food Mycology - A multifaceted approach to fungi and food. New York, USA: CRC Press. Chapter 11, Association of moulds to foods; p. 199-239.
- Frisvad JC, Thrane U, Samson RA. 2007. Food Mycology - A multifaceted approach to fungi and food. New York, USA: CRC Press. Chapter 8, Mycotoxin producers; p. 135-159.
- Ghali R, Khlifa KH, Ghorbel H, Maaroufi K, Hedilli A. 2010. Aflatoxin determination in commonly consumed foods in Tunisia. J Sci Food Agric. 90: 2347-2351.
- IBGE (Brazilian Institute of Geography and Statistics). *Produção Agrícola Municipal*. [Internet] Vol. 37, pp. 89. Brasil. 2010. Available from: http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/pam/2010/PAM2010_Publicacao_completa.pdf
- IBGE (Brazilian Institute of Geography and Statistics). 2011. *Pesquisa de Orçamentos Familiares 2008-2009*. Raw data; IBGE: Rio de Janeiro, Brazil.
- Imperato R, Campone L, Piccinelli AL, Veneziano A, Rastrelli L. 2011. Survey of aflatoxins and ochratoxin a contamination in food products imported in Italy. Food Control. 22:1905-1910.
- International Agency for Research on Cancer (IARC). Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans – Some naturally occurring substances: Food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins [Internet]. 1993. Lyon, France, v. 56, 599 p. Available from: <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/PDFs/index.php>
- Je-Won P, Chan L, Yong-Bae K. 2005. Fate of aflatoxin B1 during the cooking of Korean polished rice. J Food Protect. 68:1431-1434.
- Kawashima LM, Soares, LMV. 2006. Occurrence of fumonisin B₁, aflatoxins B₁, B₂, G₁, and G₂, ochratoxin A and zearalenone in corn products. Ciênc Tecnol Alim. 26(3):516-521.
- Kuniholm MH, Lesi OA, Mendy M, Akano AO, Sam O, Hall AJ, Whittle H, Bah E, Goedert JJ, Hainaut P, Kirk GD. 2008. Aflatoxin exposure and viral hepatitis in the etiology of liver cirrhosis in the Gambia, West Africa. Environ Health Perspect. 116(11):1553-1557.
- Leong Y, Ismail N, Latif AA, Ahmad R. 2010. Aflatoxin occurrence in nuts and commercial nutty products in Malaysia. Food Control. 21:334-338.

- Liu Y, Chang CCH, Marsh GM, Wu F. 2012. Population attributable risk of aflatoxin-related liver cancer: systematic review and meta-analysis. *Eur J Cancer*. doi:10.1016/j.ejca.2012.02.009.
- Luttfullah G, Hussain A. 2011. Studies on contamination level of aflatoxins in some dried fruits and nuts of Pakistan. *Food Control*. 22:426-429.
- Magan N, Aldred D. 2007. *Food Mycology - A multifaceted approach to fungi and food*. New York, USA: CRC Press. Chapter 7, Why do fungi produce mycotoxins?; p. 121-133.
- Makun HA, Dutton MF, Njobeh PB, Mwanza M, Kabiru AY. 2011. Natural multi-occurrence of mycotoxins in rice from Niger State, Nigeria. *Mycotox Res*. 27:97-104.
- Mazaheri M. 2009. Determination of aflatoxins in imported rice to Iran. *Food Chem Toxicol*. 47: 2064-2066.
- Nielen MWF, Marvin HJP. 2008. *Comprehensive Analytical Chemistry - Food contaminants and residue analysis*. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier. Chapter 1, Challenges in chemical food contaminants and residue analysis; p. 2-25.
- Oliveira CAF, Gonçalves NB, Rosim RE, Fernandes AM. 2009. Determination of aflatoxins in peanut products in the northeast region of São Paulo, Brazil. *Int J Mol Sci*. 10:174-183.
- Oliveira LSF, Koller FFC. 2011. Occurrence of *Aspergillus* and aflatoxin in samples of peanuts *in natura* and peanut sweet. *Rev. Ciênc. Amb*. 5:57-68.
- Pacheco AM, Lucas A, Parente R, Pacheco N. 2010. Association between aflatoxin and aflatoxigenic fungi in Brazil nut (*Bertholletia excelsa* H.B.K.). *Ciênc. Tecnol. Aliment*. 30:330-334.
- Pacheco AM, Scussel VM. 2007. Selenium and aflatoxin levels in raw brazil nuts from the Amazon basin. *J. Agric. Food Chem*. 55:11087-11092.
- Pitt JI, Hocking AD. 2009. *Fungi and food spoilage*. New York, USA: Springer Science + Business Media, 520 p.
- Reddy KRN, Farhana NI, Salleh B. 2011. Occurrence of *Aspergillus* ssp. and aflatoxin B1 in Malaysian foods used for human consumption. *J Food Sci*. 76: 99-104.

- Rocha MD, Maia PP, Rodrigues MA, Martins I. 2008. Incidence of aflatoxins in samples of peanuts and paçoca marketed in the city of Alfenas-MG, Brazil. *Rev Bras Toxicol.* 21(1):15-19.
- Rodríguez-Amaya DB, Sabino M. 2002. Mycotoxin research in Brazil: the last decade in review. *Braz J Microbiol.* 33:1-11.
- Shephard GS. 2008. Risk assessment of aflatoxins in food in Africa. *Food Addit Contam.* 25:1246-1256.
- Silva SC, Oliveira JN, Caldas ED. 1996. *Aflatoxinas em alimentos comercializados no Distrito Federal de 1985 a 1995.* *Rev Inst Adolfo Lutz.* 56(2):49-52.
- Soares LMV, Rodrigues-Amaya DB. 1989. Survey of aflatoxins, ochratoxin A, zearalenone and sterigmatocystin in some Brazilian foods by using a multi-toxin thin layer chromatography method. *J AOAC Int.* 72:22-26.
- Sugita-Konishi Y, Sato T, Saito S, Nakajima M, Tabata S, Tanaka T, Norizuki H, Itoh Y, Kai S, Sujiyama K, Kamata Y, Yoshiike N, Kumagi S. Exposure to aflatoxins in Japan : risk assessment for aflatoxin B1. *Food Addit Contam.* 27:365-372.
- Sun G, Wang S, Hu X, Su J, Zhang Y, Xie Y, Zhang H, Tang L, Wang JS. 2011. Co-contamination of aflatoxin B1 and fumonisin B1 in food and human dietary exposure in three areas of China. *Food Addit Contam.* 28: 461-470.
- Thuvander A, Moller T, Barbieri HE, Hansson A, Salomonsson AC, Olsen M. 2001. Dietary intake of some important mycotins by the Swedish population. *Food Addit Contam.* 18(8):696-706.
- WHO (World Health Organization). Global Environment Monitoring System – Food Contamination Monitoring and Assessment Programme (GEMS/Food) [Internet]. 2006. GEMS/Food Cluster Diets. Available from: <http://www.who.int/foodsafety/chem/gems/en/>
- WHO (World Health Organization). Hepatitis B [Internet]. 2002. Department of Communicable Diseases Surveillance and Response. Available from: http://www.who.int/csr/disease/hepatitis/HepatitisB_whocdscsrlyo2002_2.pdf
- WHO (World Health Organization). WHO technical report series. Evaluation of certain food additives and contaminants. Forty-ninth report of the joint FAO/WHO expert committee on food additives (JECFA) [Internet]. Geneva, Switzerland, 1999. Available from: http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_884.pdf

Williams JH, Phillips TD, Jolly PE, Stiles JK, Jolly CM, Aggarwal D. 2004. Human aflatoxicosis in developing countries: a review of toxicology, exposure, potential health consequences, and interventions. *Am J Clin Nutr.* 80:1106–1122.

5. LEITE HUMANO PARA ANÁLISE DE MICOTOXINAS DA REDE DE LEITE HUMANO DO DISTRITO FEDERAL

No Distrito Federal, existem atualmente 16 Bancos de Leite Humano (BLH), sendo 12 da rede pública e 4 da rede privada, além de mais 2 Postos de Coleta. No total, 10 BLH de Hospitais Regionais são ligados à Secretaria de Saúde do DF, entre eles: Asa Norte (HRAS), Asa Sul (HRAS), Brazlândia (HRBZ), Ceilândia (HRC), Gama (HRG), Planaltina (HRPA), Paranoá (HRPA), Sobradinho (HRS), Santa Maria (HRSM) e Taguatinga (HRT). Foi realizada uma reunião com os representantes dos BLH ligados à Secretaria de Saúde, onde o projeto de pesquisa foi apresentado e as dúvidas das representantes foram sanadas. Apenas 2 destes BLH não participaram do projeto. A localização dos BLH pode ser observada na Figura 1.

Após aprovação da pesquisa pela Coordenação de Bancos de Leite Humano da Secretaria de Saúde do Distrito Federal, o projeto de pesquisa foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa sobre Seres Humanos do Departamento de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília. O documento de aprovação encontra-se no Anexo A.

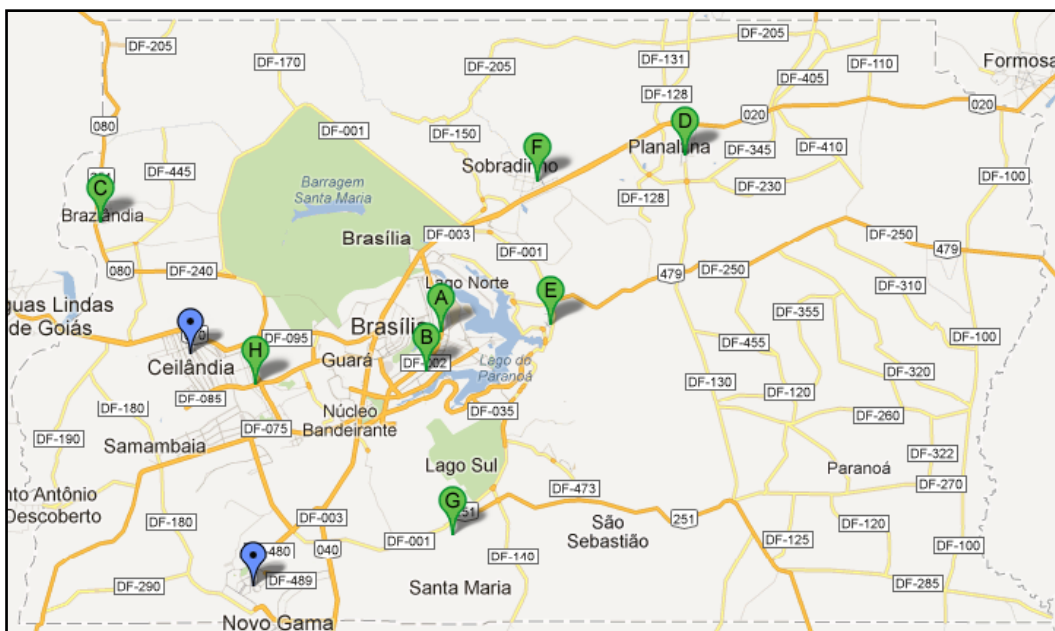


Figura 1 – Localização dos BLH ligados à Coordenação de Aleitamento Materno e Bancos de Leite Humano da Secretaria de Saúde do Distrito Federal (Google Maps, 2012). A=HRAN; B=HRAS; C=HRBZ; D=HRP; E=HRPA; F=HRS; G=HRSM; H=HRT. Marcações em azul = BLH que não participaram da pesquisa.

5.1 METODOLOGIA

5.1.1 Delineamento da população de amostras de leite materno

O cálculo do número total de amostras de leite humano a ser coletada para o estudo foi feito de acordo com Bisquerra et al. (2004), baseando-se no número total de doadoras da Rede do DF no ano de 2010 (N=6005). Desta maneira, com um nível de confiança de 95%, seria necessário coletar, aproximadamente 362 amostras de leite materno para análise de micotoxinas.

O número de amostras a ser coletado por cada BLH foi definido pela Coordenadoria de Aleitamento Materno e Bancos de Leite Humano da Secretaria de Saúde do Distrito Federal, levando em consideração o volume de doações mensais de cada BLH. O número total de amostras a ser coletado por cada BLH foi dividido proporcionalmente pelo período de duração da pesquisa (Maio/2011 - Janeiro/2012) e pelas regionais de saúde atendidas pelo BLH. Buscou-se, desta maneira, conseguir uma boa representatividade de doadoras de todo o Distrito Federal (30 regiões administrativas; GDF, 2010). No Apêndice A encontra-se o cronograma de coleta de amostras por BLH.

5.1.2 Coleta de amostras de leite materno

A coleta das amostras foi realizada em parceria com a Coordenação de Aleitamento Materno e Banco de Leite Humano da Secretaria de Saúde do Distrito Federal (DF).

Antes do cadastramento de uma doadora de leite a uma unidade de BLH é realizada uma avaliação médica onde informações acerca de doenças infecciosas e consumo de drogas são investigadas. A nutriz é considerada apta para a doação de leite quando preenche os seguintes pré-requisitos (Brasil, 2008):

- Estar amamentando ou ordenhando leite para o próprio filho;
- Ser saudável;
- Não fumar mais que 10 cigarros por dia;
- Não usar medicamentos incompatíveis com a amamentação;
- Não usar álcool ou drogas ilícitas;
- Realizar exames (hemograma completo, VDRL, anti-HIV e demais sorologias usualmente realizadas durante o pré-natal, hepatites, por exemplo).

No Distrito Federal, existe uma parceria entre os BLH e o Corpo de Bombeiros Militar na coleta de leite humano. Depois da avaliação médica, cadastramento e instruções sobre coleta e armazenamento da amostra de leite, a doadora pode solicitar que a doação seja recolhida em sua residência pela equipe especializada do Corpo de Bombeiros. Neste caso, para a condução da pesquisa, foi enviado um convite (Apêndice B) para as doadoras, através da equipe do Corpo de Bombeiros, com explicações sobre os objetivos da pesquisa. Caso concordassem em participar, elas recebiam e assinavam o termo de consentimento livre e esclarecido – TCLE (Apêndice C).

Foram coletados, no mínimo, 20mL de leite de cada doadora. As coletas foram realizadas de duas formas, conforme a preferência do BLH: a) as doadoras coletavam o leite diretamente nos frascos cedidos pelo laboratório ou; b) alíquotas da amostra doada eram retiradas por funcionarias do BLH e transferidas para os frascos cedidos pelo laboratório. Todas as amostras coletadas eram de leite cru e foram mantidas em freezer (-20°C), tanto na casa das doadoras quanto nos Bancos de Leite. A coleta foi distribuída ao longo do mês e, portanto, as amostras eram recolhidas dos BLH no início do mês seguinte à coleta, transportadas para o Laboratório de Toxicologia e armazenadas até o momento da análise.

No dia em que as amostras eram recolhidas dos BLH, também eram coletadas informações sobre as doadoras. Dados como idade, endereço, telefone, data do parto, peso do bebê ao nascer, data da coleta da amostra foram obtidos da ficha de cadastro das doadoras. Além disso, as doadoras foram contatadas por telefone para verificação de alguns dados.

5.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Entre maio de 2011 e fevereiro de 2012, foram coletadas 224 amostras de leite humano, o que representou um nível de confiança de 93,5% em relação ao número total de doadoras da Rede em 2010 (N=6005). As amostras foram obtidas de 213 doadoras cadastradas em oito BLH do DF. O número de amostras coletadas por Região Administrativa do DF está descrito na Tabela 1. As amostras foram obtidas de doadoras residentes em 24 Regiões Administrativas (RAs), entre as 30 existentes no DF. Algumas RAs, como Riacho Fundo (I e II) e Sobradinho (I e II), foram agrupadas em função da dificuldade de definição correta de suas extensões. Entre as amostras coletadas, 2 eram de doadoras residentes fora do Distrito Federal

(Goiás e Bahia) e uma o local de residência era desconhecido (ficha cadastral incompleta).

Tabela 1 - Número de doadoras por região administrativa.

Região Administrativa	Nº doadoras	Região Administrativa	Nº doadoras
Águas Claras	8	Planaltina	22
Brasília	14	Recanto das Emas	10
Brazlândia	24	Riacho Fundo I e II	3
Candangolândia	2	Samambaia	10
Ceilândia	4	Santa Maria	8
Gama	1	São Sebastião	2
Guará	14	SCIA**	1
Itapoã	7	Sobradinho I e II	31
Lago Norte	3	Sudoeste e Octogonal	7
Núcleo Bandeirante	2	Taguatinga	19
Outros*	3	Vicente Pires	4
Paranoá	14	Total	213

* Doadoras residentes fora do DF ou residência não reportada; **Setor Complementar de Indústria e Abastecimento.

A Figura 2 mostra o número de amostras coletadas em cada mês durante o período de realização da pesquisa. Embora na programação inicial, a coleta seria encerrada em janeiro, o prazo foi estendido até fevereiro na tentativa de conseguir um número maior de amostras. A média de amostras coletadas por mês foi 22,4, sendo que setembro foi o mês com o maior número de amostras obtidas (n=34) e novembro com o menor (n=13).

A Tabela 2 mostra, por BLH onde ocorreu a doação, a idade das mães e o peso corpóreo dos bebês ao nascer. Entre as 213 doadoras, 37 não possuíam os dados cadastrais completos e não foi possível obter estes dados por contato telefônico. A faixa de idade das doadoras foi entre 15 e 47 (média =28,4 anos) e o peso corpóreo do bebê ao nascer variou entre 1,17 e 5,3 kg (média = 3,19kg). A Figura 3 mostra o período de lactação da mãe no momento da doação de leite materno. O maior número de doações ocorre nos três primeiros meses de amamentação (38,3-16,2%) e algumas mães doaram leite até o décimo quarto mês de lactação. A frequência da idade das doadoras e do peso corpóreo dos bebês no nascimento pode ser observada nas Figuras 4 e 5.

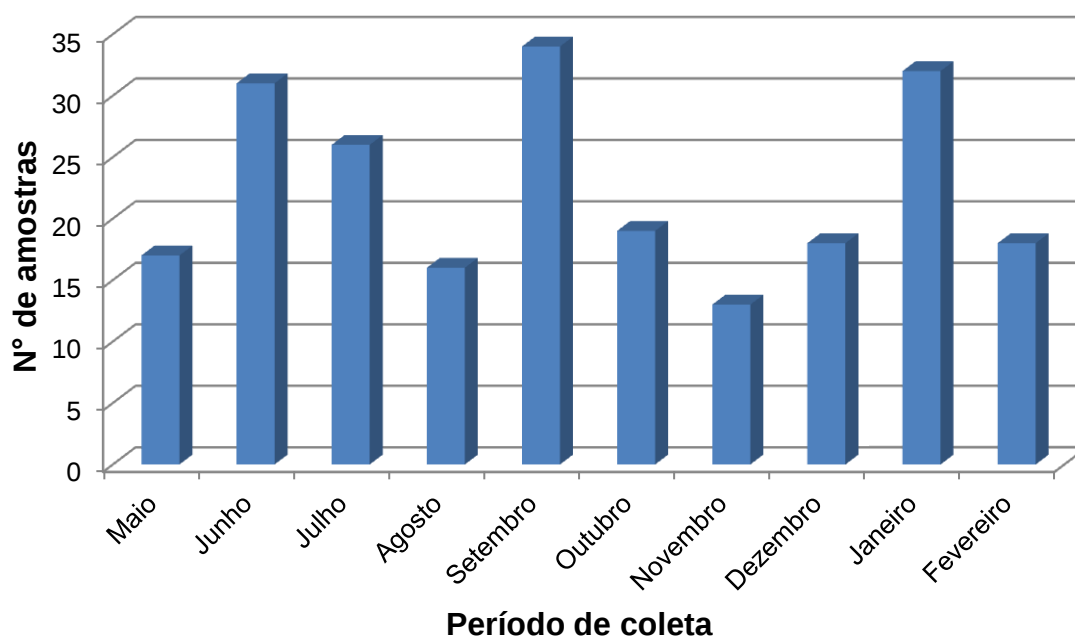


Figura 2 – Número de amostras de leite materno coletado durante o período de realização da pesquisa.

Tabela 2 – Idade das doadoras e peso corpóreo do bebê ao nascer.

BLH	N*	Peso do bebê ao nascer			
		Idade		(kg)	
		Média ± SD	IC	Média ± SD	IC
HRAN	39/47	30,2±6,6	(28,1; 32,4)	3,19±0,71	(2,96; 3,42)
HRAS	15/22	27,7±6,8	(23,9; 31,5)	3,07±0,74	(2,66; 3,48)
HRBZ	22/24	28,9±8,3	(25,3; 32,6)	1,91±0,45	(2,98; 3,38)
HRP	23/24	27,6±6,1	(25,0; 30,3)	3,23±0,43	(3,04; 3,42)
HRPA	23/23	28,3±6,5	(25,5; 31,1)	3,26±0,42	(3,07; 3,44)
HRS	24/29	28,2±5,8	(25,7; 30,7)	3,18±0,44	(2,99; 3,36)
HRSM	5/12	25±6,2	(17,3; 32,7)	3,56±0,58	(2,85; 4,28)
HRT	25/32	27,1±5,4	(24,8; 29,3)	3,12±0,49	(2,92; 3,32)
Total	176/213	28,4±6,5	(27,4; 29,4)	3,19±0,55	(3,11; 3,27)

IC= Intervalo de confiança (95%); *nº dados disponíveis/nº doadoras.

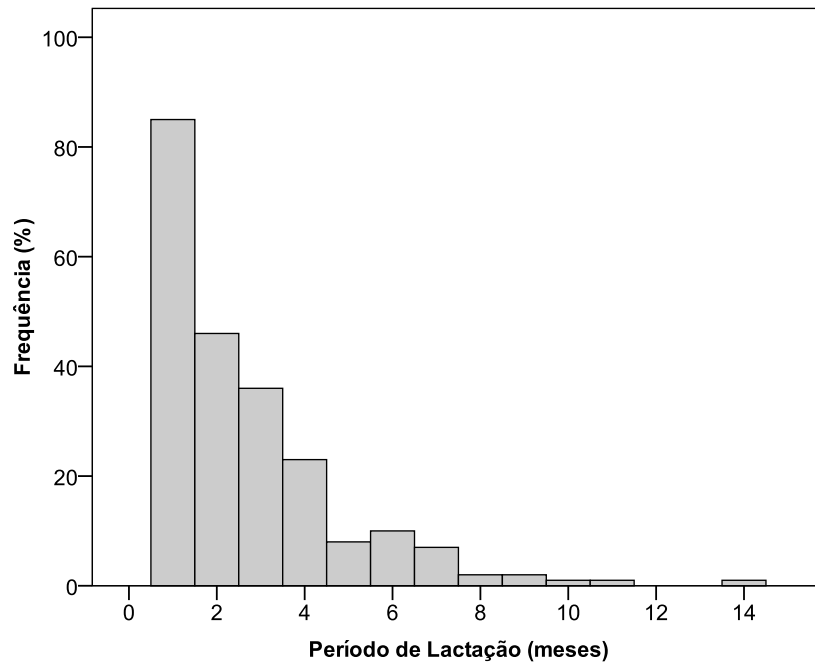


Figura 3 – Frequência dos períodos de lactação das doadoras de leite materno.

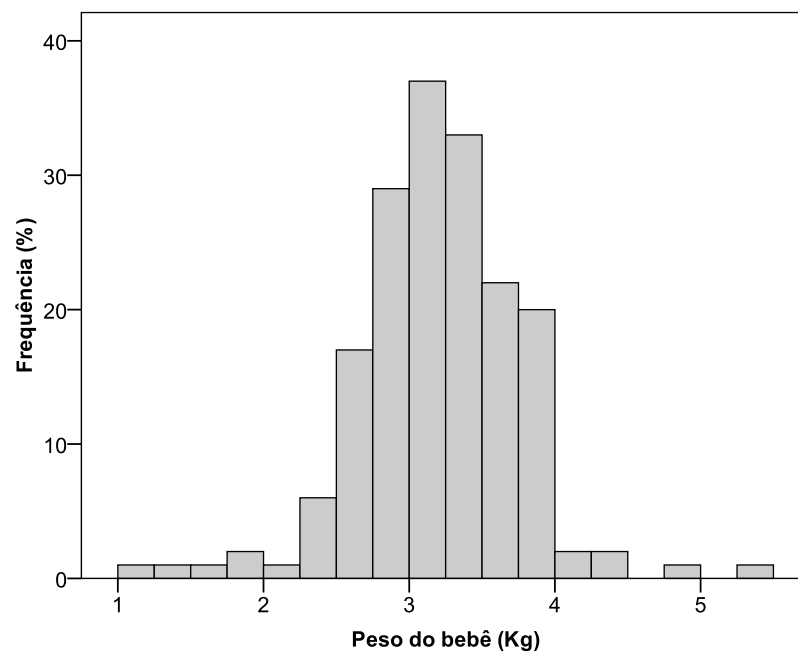


Figura 4 – Peso dos bebês ao nascer das doadoras de leite materno (n=216)

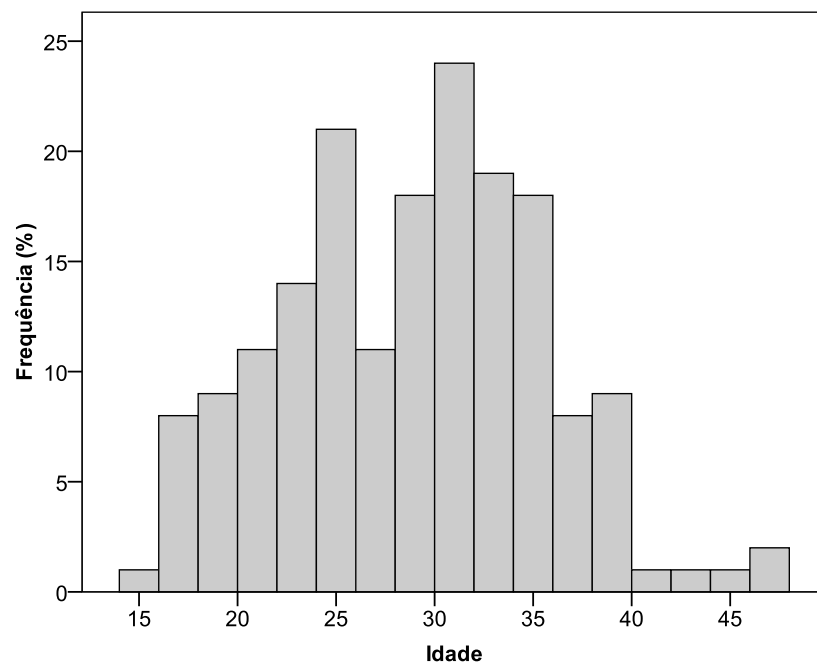


Figura 5 – Idade das doadoras de leite materno (n=216).

6. AFLATOXINS AND OCHRATOXIN A IN BREAST MILK: SIMULTANEOUS METHOD OF ANALYSIS USING HPLC/FD

Patricia Diniz Andrade, Julyane Laine Gomes da Silva, Eloisa Dutra Caldas*

Laboratory of Toxicology, Faculty of Health Sciences, University of Brasília, 70910-900, Brasília, DF, Brazil

*Corresponding author. Email: eloisa@unb.br

Abstract

Breast milk is considered the best source of nutrients for infants. However, toxic contaminants that nursing mothers are exposed to, such as mycotoxins, could be carried over to milk, intact or metabolized. The aim of this study was to optimize and validate a methodology for the simultaneous analysis of aflatoxins M1, B1, B2, G1, G2 and ochratoxin A in breast milk, and evaluate the exposure of infants to these mycotoxins through the consumption of breast milk. Breast milk samples were obtained from donors at eight Human Milk Banks in the Federal District, Brazil, between May/2011 and February/2012. The analytical method was based on liquid-liquid extraction and purification at low temperature (3.25mL of acidified acetonitrile + 0.75mL of ethyl acetate, followed by analysis by HPLC/FD and a photochemical post-column reactor. Excitation and emission wavelengths of the fluorescence detector were set at 360/430nm for aflatoxins, and at 333/470nm for ochratoxin A. Limits of quantification (LOQ) ranged from 0.005-0.03ng/mL, recoveries from 73-99.5%, and relative standard deviations (RSD) from 1.8-17.3%. A total of 224 samples were collected, but only 2 were positive for the mycotoxins analyzed – AFB2 at LOQ level (0.005ng/mL), indicating that the infants who are fed with breast milk from the milk banks are not at risk from aflatoxin and ochratoxin exposure.

Keywords: aflatoxins; ochratoxin A; breast milk; analysis.

Introduction

Breast milk is considered the best source of nutrients for infants, providing a unique blend of nutritional and non-nutritional benefits (AAP, 2012). Epidemiological evidence has shown that breastfeeding enhances the motor and cognitive development of newborns, stimulates the development of the immune system, reduces the incidence of chronic diseases and infant morbidity and mortality, and also provides a range of benefits to the health of mothers (Lawrence, 1997; Hanson et al., 2002; Jones et al., 2003; WHO, 2006). However, contaminants that nursing mothers are exposed to, such as mycotoxins, may be carried over to milk, intact or in metabolized form (Landrigan et al., 2002; Sherif et al., 2009).

Mycotoxins are secondary metabolites produced by a range of fungi (Magan & Aldred, 2007) that contaminate various agricultural commodities, either before harvest or under post-harvest conditions (Frisvad et al., 2007). *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* are the main producers of aflatoxins (AFs; Pitt & Hocking, 2009), mycotoxins that are hepatotoxic and carcinogenic to humans (IARC, 1993). Ochratoxin A (OTA) is a toxin naturally produced by several species of *Aspergillus* and *Penicillium* (Pitt & Hocking, 2009), shown to be nephrotoxic and a possible human carcinogen (IARC, 1993).

Several authors have reported the presence of mycotoxins in breast milk around the world. AFB1, AFB2 and their metabolites (AFM1, AFM2), as well as aflatoxicol were found in samples from Ghana (Lamplugh et al., 1988), AFM1 was detected in samples from Australia, Thailand, Egypt, Italy, Turkey and Iran (El-Nezami et al., 1995; Polychronaki et al., 2007; Turconi et al., 2004; Galvano et al., 2008; Gürbay et al., 2010; Sadeghi et al., 2009; Mahdavi et al., 2010; Ghiasain & Maghsood, 2012), and OTA was reported in breast milk samples from Italy, Turkey, Chile and Slovakia (Turconi et al., 2004; Galvano et al., 2008; Gürbay et al., 2009; Muñoz et al., 2009; Dostal et al., 2008). In Brazil, the incidence of AFM1 and OTA was reported to be low (Navas et al., 2005).

Milk is a complex matrix, and mycotoxins could be found bonded to milk casein proteins, which makes the extraction a difficult procedure (JECFA, 2001). Methods usually used to analyze mycotoxins in milk are based on extraction with organic solvents, clean-up with solid phase extraction (SPE) or immunoaffinity columns, followed by concentration steps (Gürbay et al., 2010; Herzallah, 2009; Ilha, 2011; Polychronaki et al., 2007). Detection and quantification are performed mainly

by liquid chromatography with either a fluorescence detector or mass spectrometry (Cavaliere et al., 2006; Galvano et al., 2008; Ilha, 2011; Wang et al., 2011).

Several countries have established regulatory limits to control the presence of AFM1 in milk and dairy products, but there are no guidelines for breast milk. In Brazil the limit for AFM1 in bulk milk is 0.5µg/kg (ANVISA, 2011), the same established by the *Codex Alimentarius* (Codex, 1995).

This study aimed to optimize and validate a methodology for the simultaneous analysis of aflatoxins M1, B1, B2, G1, G2 and ochratoxin A in breast milk, and to evaluate the exposure of infants to these mycotoxins through consumption of breast milk in the Federal District of Brazil. To the best of our knowledge, no single method that has simultaneously analyzed these micotoxins in milk was found in the published literature.

Materials and methods

Chemicals and reagents

Acetonitrile, methanol and formic acid were purchased from Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA), ethyl acetate from Merck KGaA (Darmstadt, Germany), toluene from Mallinckrodt Baker (Phillipsburg, USA), acetic acid from J.T.Baker (Phillipsburg, USA), and anhydrous sodium sulphate from Vetec (Rio de Janeiro, Brazil). All solvents used were HPLC grade. Ultra-pure water was produced by a Milli-Q system (Millipore Corporation, USA). The syringe filters utilized were MillexTM from Millipore (USA).

Aflatoxin standards were purchased from Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA), and ochratoxin A from Biopure (USA). AFB1, AFB2, AFG1, AFG2 stock solutions were prepared in toluene-acetonitrile (9:1), AFM1 in acetonitrile and OTA in toluene-acetic acid (99:1). Work solutions were prepared and concentrations were determined according to AOAC International (1995). A mixed working standard solution was prepared by diluting individual stock solutions to obtain a solution with concentrations of 50ng/mL for AFM1, AFB1, AFG2 and OTA, 150ng/mL for G1, and 12.5ng/mL for B2. All standard solutions were stored at -20°C and kept out of direct light.

All glassware used was soaked in diluted acid solution (110g/mL sulfuric acid) for several hours to remove possible active adsorption sites. The glassware was then thoroughly rinsed with distilled water to remove all traces of acid (Dragacci, 2001).

After the analyses, all materials were decontaminated with sodium hypochlorite solution.

A pool of breast milk samples obtained from different donors was analyzed and none of the mycotoxins of interest was detected. This pool was considered blank, and used to optimize and validate the analytical method.

Extraction procedures

Three different extraction procedures were tested during method development: 1) solid-phase extraction (SPE) with C-18 cartridges followed by extraction with dichloromethane (Polychronaki et al., 2007); 2) liquid-liquid extraction (LLE) with chloroform and petroleum ether (Gürbay et al., 2010); and 3) liquid-liquid extraction with low temperature purification (LLE-LTP), adapted from Goulart et al. (2008). Tests were conducted in triplicate, with blank breast milk samples fortified at 0.15 ng/ml for aflatoxins M1, B1, G1 and OTA, and at 0.03ng/ml for aflatoxins B2 and G2.

The SPE column was activated with acetonitrile and water and a 10 mL sample diluted in water (1:1) passed through at a flow rate of 3.5mL/min. The cartridge was washed (basic and acid solutions, with 1% ammonia and 1% acetic acid, respectively) the mycotoxins eluted with acidified acetonitrile (1% acetic acid), and extracted twice with 2mL dichloromethane. Extracts were evaporated and dissolved in methanol for analysis.

In the LLE, 1mL of breast milk was extracted with chloroform (saturated with NaCl), heated (37°C), mixed (hand inversion), and centrifuged for phase separation. The organic phase was removed, evaporated, re-dissolved in acetonitrile, and extracted with petroleum ether to remove contaminating lipids. The acetonitrile phase was then blown to dryness, and re-dissolved in methanol for analysis.

In the LLE-LPT, 2mL of breast milk were transferred to a falcon tube, 4mL of a solvent mixture added, and the tube taken to sonication and centrifugation (3500 rpm – 5min). Samples were stored in a freezer (-18°C) for 12 hours, and the liquid supernatant (organic phase) was passed through a syringe barrel containing anhydrous sodium sulfate and filtered through a syringe filter (0.45µm). The extract was completely dried under nitrogen flow at 40°C, and the residue dissolved in 100µL of methanol for analysis.

Optimization of method extraction conditions – Experimental design

A 2^3 factorial design with central point was used to find the best extraction conditions for the LLE-LTP method. The effects of sonication time (X_1), ionic strength (X_2), and solvent composition (X_3) were evaluated based on the recovery rates of the mycotoxins in the breast milk. The independent variables were tested on 3 levels, represented by (-), (0) and (+), as shown in Table 1. The proportions of solvents and salt concentration (NaCl) used were chosen in order to change the polarity/ionic strength of the extracting mixture without disturbing the freezing process, and were based on work published previously (Viera et al., 2007; Rübensam et al., 2011). A total of 11 trials were carried out, corresponding to all possible combinations between levels (-) and (+) without replicates, and the central point (0) was performed in triplicate to allow calculation of the experimental error. Experimental data from the factorial design were fitted to the following second-order polynomial model (Eq. 1; Neto et al., 2010), and analyzed using the response surfaces.

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^a \beta_i X_i + \sum_{i=1}^a \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i,j=1 (i \neq j)}^a \beta_{ij} X_i X_j \quad (\text{Eq. 1})$$

In Eq. 1, Y is the recovery value predicted by the model, β_0 is the constant coefficient, β_i is the linear coefficient, β_{ii} is the coefficient of squared effect, β_{ij} is the coefficient of interaction effect, and X_i and X_j are the coded values of variables responses. Excel® and Statistica® were used to estimate the goodness-of-fit of the regression model and parameter significance.

Chromatographic conditions

The HPLC-FD analyses were carried out in a Shimadzu LC-20AT system (Kyoto, Japan), consisting of a quaternary pump, a degasser (DGU-20A5), an auto sampler (SIL-20A), a column oven (CTO-20A), a system controller (CBM-20A), and a fluorescence detector (RF-10AXL). The chromatographic separation was performed with a Gemini C18 analytical column (150 X 4.6mm, 5 μ m) preceded by a C18 security guard cartridge (4.0X3.0mm, 5 μ m), both from Phenomenex (Torrance, CA, USA). A photochemical post-column reactor (PHRED; Aura) was used to enhance the AFB1 and AFG1 responses (Papadopoulou-Bouraoui et al., 2002). The mobile phase consisted of a gradient of methanol, acetonitrile and water (1% acetic acid) at a flow rate of 0.8mL/min, with oven temperature at 40°C, and a injection volume of 10

μL. Excitation and emission wavelengths of the fluorescence detector were set at 360/430nm for aflatoxins, and at 333/470nm for ochratoxin A.

Samples shown to be positive were confirmed in a LC-MS/MS system comprised of a Shimadzu LC-20AD chromatographic system (Kyoto, Japan), consisting of a binary pump, system controller (CBM-20A), degasser (DGU-20A₃), auto sampler (SIL-20AC) and a column oven (CTO-20A) coupled to a 4000QTRAP triple quadrupole mass spectrometer, equipped with a TurbolonSpray (TISP) interface (Applied Biosystem/MDS Sciex, Foster City, EUA). The analyses were performed on the same analytical column used in the HPLC-FLD at 40°C. The mobile phase consisted of a gradient of Methanol/Water (20:80; 0.1% Formic Acid) and Acetonitrile (0.1% Formic Acid) at a flow rate of 0.8mL/min. The injection volume was 10 μL, and the column was re-equilibrated for 9 min before each run. The mass spectrometer was operated in the positive ionisation mode. Ionisation and spectrometric settings were optimized by infusing separate mycotoxins solutions (200ng/mL) at a flow rate of 10μL/min via a syringe pump and by direct injection (without column) of 20μL of standard solutions at 20ng/mL. Data acquisition was performed in a multiple reaction monitoring (MRM) mode. The parameters for the *m/z*, declustering potential (DP), collision energy (CE), collision cell exit potential (CXP) of parent ions, primary daughter ions, and secondary daughter ions selected for the confirmation of the presence of AFM1, AFG2, AFG1, AFB2, AFB1 and OTA in the breast milk samples are shown in Table 2.

Method validation

The optimized LLE-LTP method was submitted to a full validation process. *Selectivity* was evaluated by analyzing the HPLC-FD chromatographic profile of the blank and fortified breast milk samples, checking for interferences eluting at the same retention time of the mycotoxins of interest (Ribani et al., 2004; INMETRO, 2010). The *matrix effect* was checked for significant differences by comparing the responses (areas) in the HPLC-FD system of a matrix matched curve and a corresponding calibration curve made in the solvent (Bruce et al., 1998). The matrix matched curve was prepared by spiking the extracts obtained from the blank breast milk samples with appropriate volumes of the working standard solution. Both standard curves were constructed within the range of 0.2-15ng/mL for AFM1, AFG1, AFB1, and OTA, and 0.06-5 ng/mL for AFG2 and AFB2, with six calibration points each. *Linearity* was

verified through the preparation of three standard curves, made in the solvent, with seven calibration points each. Standard curves were constructed within the range of 0.1-15 ng/mL for AFM1, AFB1, AFG2 and OTA, 0.3-45 ng/mL for G1, and 0.025-3.75 ng/mL for B2, respectively. Linear regression parameters were estimated by the least square method, and verified through the examination of outliers (Grubbs test), homogeneity of variances (Cochran test), coefficient of determination (R^2) and significance of the regression (ANOVA; Thompson et al., 2002; INMETRO, 2010). The limit of quantification (LOQ) was estimated by analyzing samples spiked in decreasing mycotoxin concentrations, and defined as the lowest concentration of the analyte that produced a peak area at least 10 times higher than the signal to noise ratio (S/N; Ribani et al., 2004). Trueness was determined by recovery experiments. Breast milk blank samples were spiked at 3 different fortification levels (LOQ, intermediate, and high), with eight replicates each, performed on the same day, by the same analyst (Thompson et al., 2002; INMETRO, 2010). *Precision* was evaluated through repeatability and intermediate precision (INMETRO, 2010). *Repeatability* was expressed as the relative standard deviations (RSD%) obtained from the analysis performed in the recovery study under repeatability conditions (same analyst, same day). *Intermediate precision* was evaluated through the analysis of 5 replicates of spiked samples at levels of 0.05ng/mL for AFM1, AFB1, AFG2 and OTA, 0.15ng/mL for G1, and 0.0125ng/mL for B2 performed by different analysts on the same day. *Robustness* of the analytical procedure was assessed by verifying the influence of the factors evaluated in the experimental design described above (INMETRO, 2010).

In order to assess the stability of the sample extracts during the days of storage, twenty-one blank samples of breast milk were spiked at 0.05ng/mL for AFM1, AFB1, AFG1 and OTA, and at 0.0125ng/mL for AFB2 and AFG2, extracted according to the optimized procedure, evaporated until complete dryness, and kept at -20°C until analysis. Extracts were analyzed in triplicate on days 1, 2, 3, 7, 21, and 30 of storage, and dissolved in methanol on the day of injection in the HPLC system. Analysis of variance (ANOVA) was used to determine whether there were statistically significant differences among the estimated concentration levels between days.

Breast milk samples

The number of breast milk samples to be collected in this study (362 samples, 95%) was based on the total number of donors at sixteen Human Milk Banks and two collection points in the Federal District in 2010 (n=6005). However, as only eight Banks joined the project, 224 samples (93.5% significance level) were collected (May 2011 to February 2012). Samples were kept at -18°C until analyzed. Information on the mothers' age and address, and the infants' date of birth was collected at the Human Milk bank. Information on the consumption of peanuts and Brazil nuts in the week prior to milk donation was obtained through a questionnaire applied at the mothers' residence. The project was approved by the Ethics Committee on Human Research of the Faculty of Health Science of the University of Brasilia (n° 027/11), and all mothers signed a consent form before donating samples.

Samples were analyzed according to the optimized analytical method. Three fortified breast milk samples (at the intermediate level) were included in each batch of extraction as an internal quality control to check for the reliability of the extraction procedure (30 samples/batch). The identity of the mycotoxin detected in the HPLC/FD was confirmed by LC-MS/MS and further re-analyzed in HPLC/FD (duplicate sample) for quantification.

Results and discussion

Sample extraction

The average recoveries of mycotoxins obtained with different extraction procedures are shown in Figure 1. AFG2 and OTA were not detected in the fortified samples analyzed using SPE. As the goal of this study was to optimize a single methodology for the simultaneous analysis of aflatoxins and ochratoxin A in breast milk, the SPE method was discarded. The LLE and LLE-PLT methods showed the best recoveries for all mycotoxins, however LLE-PLT showed much better AFM1 recovery than LLE (82.3 and 50.0%, respectively). In order to improve OTA recoveries in the LLE-PLT, the acetonitrile used in extraction was acidified (0.1% formic acid). A considerable improvement in OTA recovery was found, increasing from about 60% to over 80%. Average recovery for the aflatoxins was not affected by acetonitrile acidification (data not shown). LLE-PLT had fewer steps and the overall best recoveries, and was thus the method chosen for analysis.

Optimization of the LLE-LTP method

The effects of 3 independent variables on mycotoxin recoveries were simultaneously evaluated during the optimization of the LLE-LTP method. Table 3 shows the average recoveries obtained in the experimental design, the effects of each factor on recovery, as well as their interactions. Extraction lengths in the ultrasonic bath (X_1) were only statistically significant ($p < 0.05$) for AFG2 and OTA, demonstrating a reduction in recovery with an increase in extraction time. Ionic strength (X_2) was statistically significant ($p < 0.05$) for all mycotoxins analyzed, showing that with ionic strength increases, there is a considerable decrease in all mycotoxins recoveries. For the solvent composition (X_3), with changes in polarity (from a mixture with methanol to a mixture with ethyl acetate), AFM1 and AFG2 recoveries increased ($p < 0.05$), with only OTA presenting a slight decrease (not significant; $p > 0.05$). Most interactions were not significant ($p > 0.05$), but those considered significant ($p < 0.05$) were kept in the regression model.

Significant regression values and not-significant lack-of-fit values showed that the quadratic model calculated for AFM1, AFG2, AFB2 and OTA was valid for the present study. Lack-of-fit was significant for AFG1 and AFB1, meaning that the recoveries of these mycotoxins were not adequately explained by the equation determined in the model. As the main mycotoxin of interest in breast milk is AFM1, the optimized LLE-LTP method used in this study was chosen for presenting the best performance for AFM1 analysis. The response surface plots (Figure 2) show the effects of the independent variables on the recovery of AFM1. The best conditions of extraction of AFM1 were: 10min in the ultrasonic bath, no added salt, and mixture of solvent made of 3.25mL of acetonitrile (0.1% formic acid) + 0.75mL of ethyl acetate. These conditions did not significantly impact the recoveries of the other mycotoxins analyzed (Table 3).

LLE-LTP method validation

Figure 3 shows the chromatograms of blank and mycotoxin fortified breast milk samples. There were no interfering peaks eluting in the same retention time for any of the mycotoxins analyzed, confirming that the HPLC-FD conditions chosen ensured satisfactory selectivity of the method. The solvent and matrix matched standard curves, as well as their respective R^2 and linear regression equations, are shown in Figure 4. Coefficients of determination (R^2) were higher than 0.999, and

regressions of all curves were significant ($p < 0.05$). The Fischer F -test showed that the residual variances of the solvent and matrix matched curves were homogeneous ($\alpha = 0.05$). Hence, the t -test (combined variances) was used to evaluate matrix effects. As there were no significant differences in responses (areas) obtained for the solvent and the matrix matched curves ($\alpha = 0.05$), the solvent standard curves were used for the quantification of mycotoxins in this study. No outliers ($p > 0.05$) were found at any calibration level in the three solvent standard curves analyzed. The behavior of the residues resulting from the adjustment of the analytical curves obtained by the least squares method was homoscedastic ($C_{\text{calculated}} < C_{\text{critical};7;3}$) for all mycotoxins.

The LOQs found with the optimized method were 0.01 ng/mL for AFM1, AFG2 and OTA, 0.03 ng/mL for AFG1, 0.02 ng/mL for AFB1 and 0.005 ng/mL for AFB2. These LOQs are in same range of those found by other authors that used LLE and HPLC-FD in breast milk analyses (El-Nezami et al., 1995; Gürbay et al., 2009; Muñoz et al., 2010), but higher than those reported for immunoaffinity/C18 methods (Turconi et al., 2004; Polychronaki et al., 2007; Galvano et al., 2008).

Table 4 shows the recoveries for three different levels of fortification for each mycotoxin. Outliers for each fortification level were identified with the construction of box plots and were removed from the overall results. Mean recoveries at LOQ levels varied from 73.0% (AFG2) to 99.5% (AFG1) while for intermediate and high levels of fortification, average recoveries ranged between 70.1 and 95.8%. For all mycotoxins evaluated, recoveries were within the acceptable range for methods of analysis recommended by both Brazilian and European committees (MAPA, 2011; EC, 2006).

Precision was evaluated both as repeatability and intermediate precision (Table 4). Relative standard deviations obtained from analyses performed in the recovery trials under repeatability conditions (same analyst, same day) ranged from 3.8% (AFB2) to 17.3 (OTA) at the LOQ levels, and from 1.8-6.3% at the other two levels of fortification, which are also in compliance with Brazilian regulations (MAPA, 2011). Intermediate precision obtained through the analysis of fortified breast milk samples by different analysts are also shown in Table 4. The Grubbs test did not show any outliers ($p > 0.05$) in the recoveries obtained by each analyst and no statistical differences were found between the results obtained by the analysts. RSDs were considerably higher for analyst 2 and, therefore, all the human milk samples were analyzed only by analyst 1.

Robustness of the LLE-LTP method was evaluated during the method optimization. Among other factors, subtle changes in the extraction period (5/10/15min) showed small variations in recoveries for most mycotoxins analyzed. However, changes in ionic strength had a significant impact on mycotoxin recovery.

The stability of AFs and OTA in sample extracts over the period of storage (1-30 days) may be seen in Figure 5. There was a considerable reduction in mycotoxin concentration after 14 days of storage. AFG1 and AFM1 had the highest decreases (47.0% and 40.0%, respectively), while OTA had the lowest reduction (19.0%). Most of the mean recoveries obtained from the extract at 21 and 30 days of storage were statistically different ($p < 0.05$) from those obtained during the first days of the experiment. In light of these results, a maximum storage period of 14 days was established for the extract submitted to analysis for these mycotoxins in breast milk.

Considering all the results mentioned above, the optimized method met the performance criteria required for the validation of methods of analysis and, therefore, may be used to investigate the presence of AFs and OTA in breast milk.

Mycotoxins in breast milk samples

A total of 224 breast milk samples were collected from Human Milk Banks in the Federal District between May/2011 and February/2012. Samples were obtained from 213 different donors, mainly during the first month of breastfeeding (38.3%). The mean age of the mothers was 28.4 years (± 6.55) and the babies' mean weight at birth ($n=176$) was 3.19 kg (± 0.55). Only 47% of the donors answered the questionnaire on the consumption of peanuts, peanut products, Brazil nuts, and their products in the week before the milk samples were donated. Of the 99 respondents, 23% reported having consumed peanuts or Brazil nuts in the week prior to donation, and only 7 of them (30%) had consumed both products in the same period.

Breast milk samples were analyzed according to the validated LLE-LTP – HPLC/FD method. In each batch of extraction, three fortified samples (intermediate level) were included. Mean recoveries of fortified samples were also within the acceptable range established by Brazilian and European authorities (60-120%, $n=24$; MAPA, 2011; EC, 2006), therefore ensuring the quality of the extraction procedure. Of all samples analyzed, only two were positive for AFB2 at the LOQ level (0.005ng/mL). The presence of AFB2 was confirmed by LC-MS/MS. Due to the extremely low number of contaminated samples it was not possible to establish any

correlation between the presence of mycotoxins in breast milk and consumption habits or months of breastfeeding.

AFs contamination in food commercialized in the Federal District has decreased considerably in recent years (Andrade et al., 2012). Aflatoxin intake calculated for the total population ranged from 0.06-0.08 ng/kg bw/day and cancer risk values obtained were extremely low (0.0006-0.0009 cancers/year/ 10^5 individuals), showing that the population of the Federal District is not at great risk. OTA have been reported in coffee, rice, wheat flour, and chocolate sold in Brazil, although the levels of contamination found were mostly low (0.01-109 µg/kg; Copetti et al., 2012; Almeida et al., 2012; Taniwaki et al., 2003; Vieira et al., 1999).

Contamination levels of AFM1 and OTA in breast milk from Human Milk Banks donors have been previously assessed in Brazil (São Paulo), and similar to the present study, the incidence was low (Navas et al., 2005). Of the 100 samples analyzed, only three were found to be contaminated, one with AFM1 (0.024 ng/mL) and two with OTA (0.011-0.024 ng/mL). Higher incidences and levels have been found around the world. In Egypt, 56% of the 443 breast milk samples analyzed were positive for AFM1 (0.0042-0.889 ng/mL; Polychronaki et al. (2007). In Italy, Galvano et al. (2008) found 5 positive samples for AFM1 (0.007-0.14 ng/mL), and 61 positive for OTA (0.005-0.405 ng/mL) from 82 breast milk samples collected in the first month of breastfeeding. Gürbay et al. (2009; 2010) found all 75 samples of breast milk in Turkey positive for AFM1 (0.06-0.29 ng/mL), AFB1 (0.09-4.123 ng/mL) and OTA (0.6-13.1 ng/mL). In Chile, all 11 samples collected in the first 6 days postpartum were positive for OTA (0.044-0.184 ng/mL; Muñoz et al., 2009).

Children are considered more vulnerable than adults to the effects of toxicants due to their higher metabolic rate, lower body weight, immature metabolic pathways, and incomplete development of organs and tissues (WHO, 2006). Considering this high sensitivity and the importance of breastfeeding for the development of newborns, the presence of mycotoxins and other contaminants in breast milk should be continuously evaluated. Hence, the continuous development of analytical methods to identify and quantify mycotoxins, as well as the performing of risk assessments of children's exposure to contaminated foods are essential.

Conclusions

The method developed for the simultaneous analysis of AFM1, AFG2, AFG1, AFB2, AFB1 and OTA in breast milk samples using HPLC-FLD was satisfactorily validated. The LLE-LPT extraction method was shown to be simple and cost-effective, since no columns are needed for clean-up. The breast milk samples analyzed did not have significant mycotoxin levels, and therefore infants who consumed milk from the Human Milk banks were not at risk from exposure to these mycotoxins. Since aflatoxins and ochratoxin A are respectively known to be carcinogenic and possible carcinogenic to humans, exposure to these contaminants should be kept as low as possible, especially for children, considered to be more susceptible.

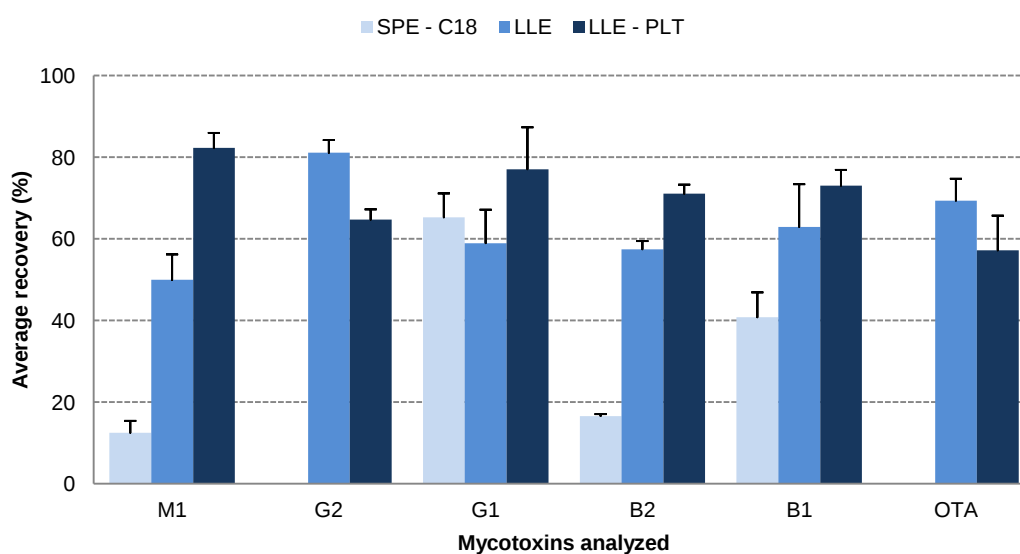


Figure 1. Recoveries of M1, G2, G1, B2, B1 and OTA in fortified breast milk samples. G2 and OTA were not detected in the SPE extraction.

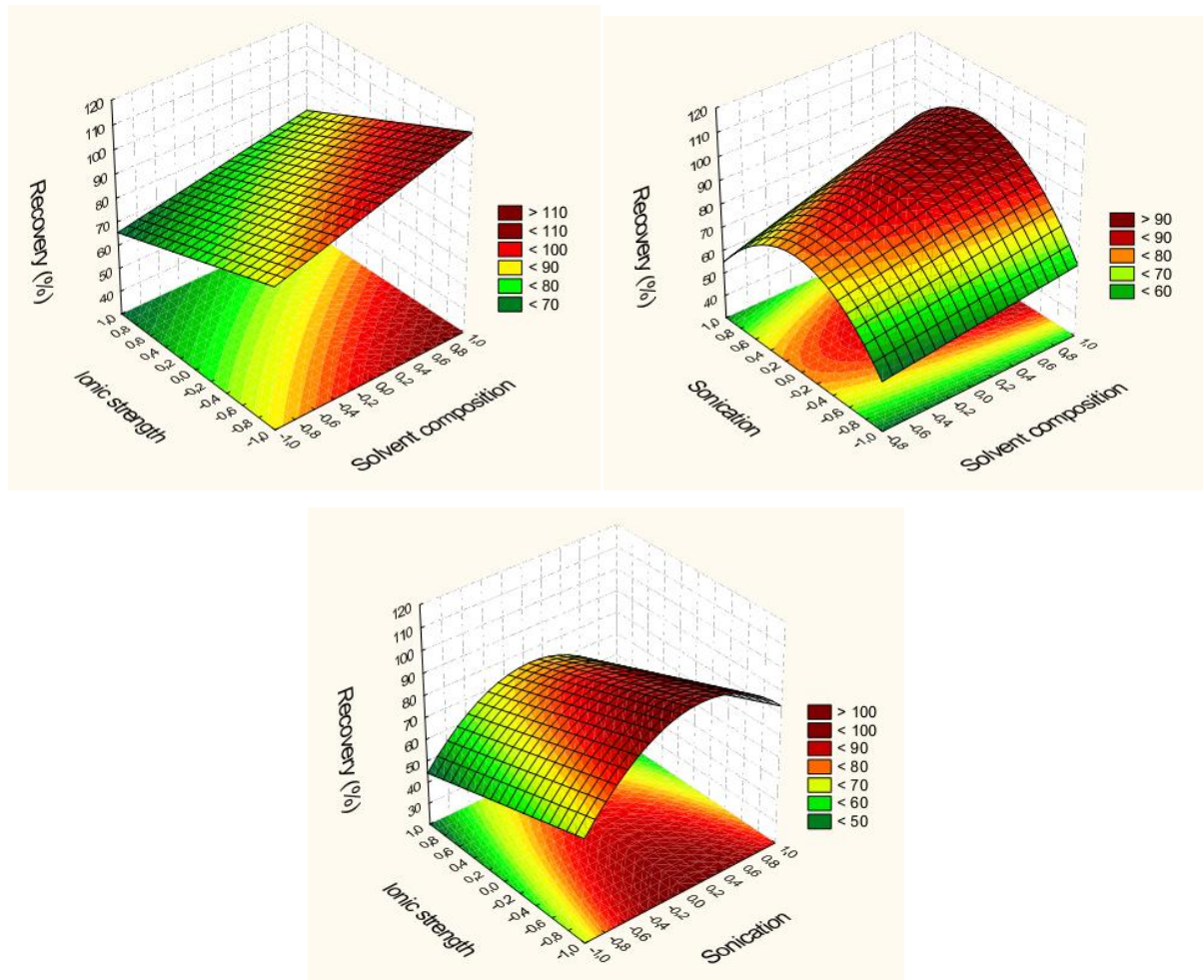


Figure 2. Response surface plots on the recoveries of AFM1, varying the ionic strength, solvent composition and sonication length.

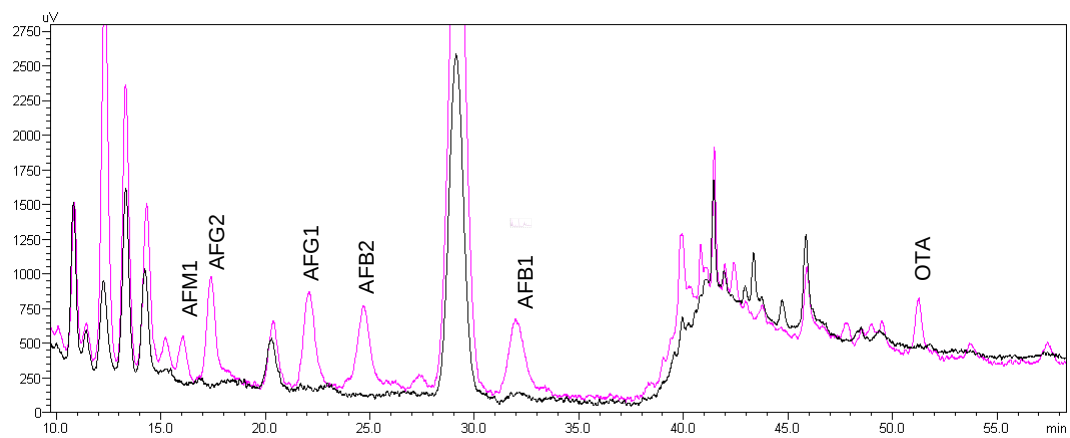


Figure 3. Chromatograms of a blank and a fortified breast milk sample.

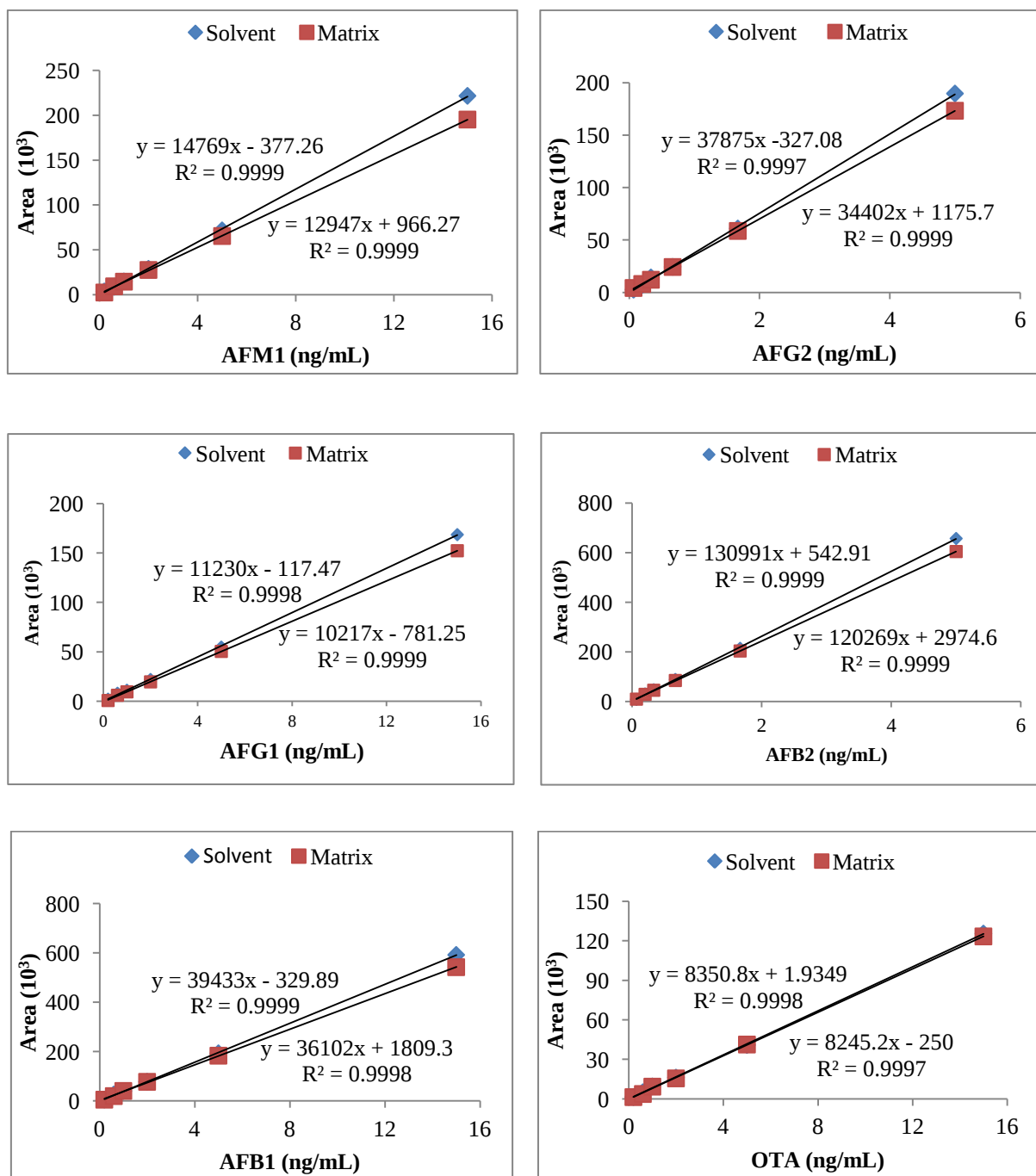


Figure 4. Standard curves of AFM1, AFG2, AFG1, AFB2, AFB1 and OTA, both in solvent and matrix matched.

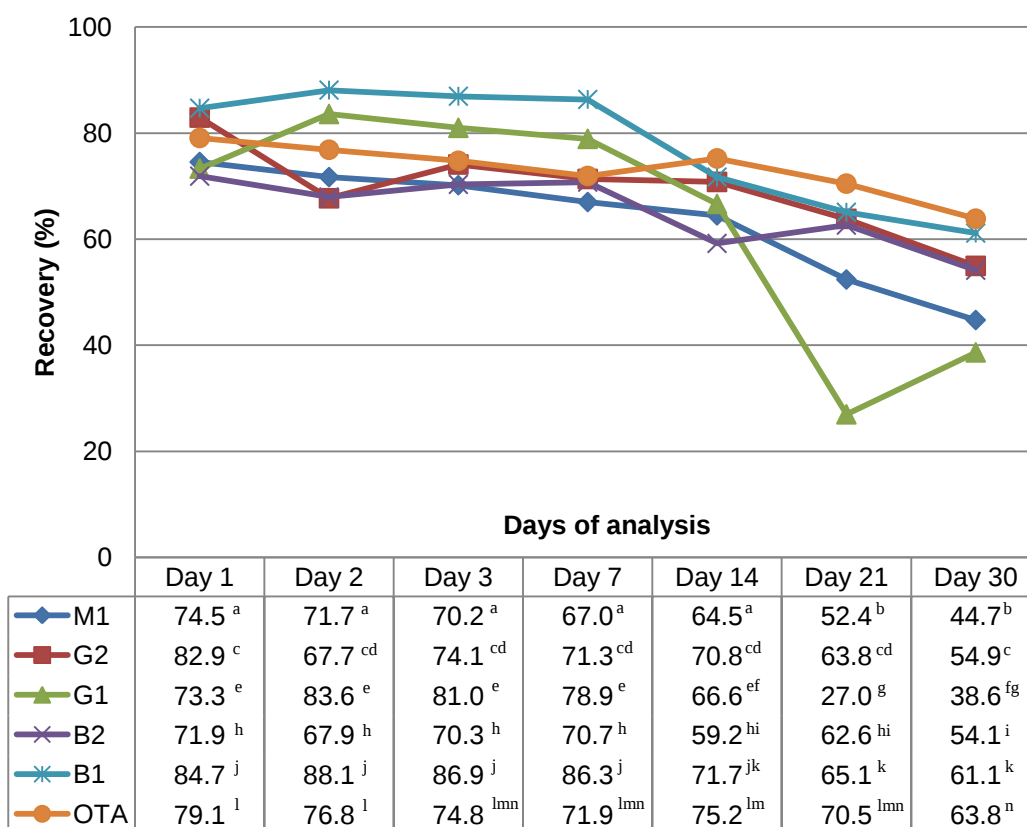


Figure 5. Stability of AFs and OTA in samples extracts over time of storage (1-30 days). Different letters means that recoveries were statistically different at 95% probability level (Tukey test).

Table 1 - Experimental design to evaluate the best conditions for mycotoxin extraction by the LLE-LTP method

Independent variables	Independent variable levels		
	(-)	(0)	(+)
Sonication (X_1)	5min	10min	15min
Ionic strength (X_2)	0.0 g/mL NaCl	0.1g/mL NaCl	0.2g/mL NaCl
Solvent composition (X_3) ^a	A	B	C

^a total of 4mL; A=3.75mL acetonitrile (0.1% formic acid) + 0.25mL methanol; B=4.0mL acetonitrile (0.1% formic acid); C= 3.25mL acetonitrile (0.1% formic acid) + 0.75mL ethyl acetate.

Table 2 - Parameters on the m/z , declustering potential (DP), collision energy (CE) and collision cell exit potential (CXP) of ions selected for mycotoxins analysis.

Mycotoxin	Parent ion (+H m/z)	Product ions (m/z)	DP(V)	CE (V)	CXP(V)
AFM1	329.11	273.1	81	33	14
		259.0		33	14
AFG2	331.13	313.0	86	35	24
		245.0		43	18
AFG1	329.08	243.1	76	41	18
		128.0		79	20
AFB2	315.11	287.1	91	37	18
		259.0		41	20
AFB1	313.11	285.1	101	33	22
		241.0		53	18
OTA	404.23	239.0	51	33	18
		358.1		21	10

Table 3 – Average recoveries, effects of each factor and interactions between factors (% $\pm$ estimated experimental error) in the optimization of the LLE-LTP method.

	AFM1	AFG2	AFG1	AFB2	AFB1	OTA
Average recovery	68.7 $\pm$ 0.7	89.0 $\pm$ 0.5	80.1 $\pm$ 1.7	81.2 $\pm$ 0.6	70.5 $\pm$ 0.8	69.7 $\pm$ 0.1
(X ₁)	11.5 $\pm$ 1.5	-29.1 $\pm$ 1.1	-6.3 $\pm$ 3.4	6.3 $\pm$ 1.33	-3.5 $\pm$ 1.7	-5.0 $\pm$ 0.2
(X ₂)	-27.4 $\pm$ 1.5	-41.7 $\pm$ 1.1	-46.5 $\pm$ 3.4	-18.7 $\pm$ 1.33	-17.1 $\pm$ 1.7	-10.7 $\pm$ 0.2
(X ₃)	20.9 $\pm$ 1.5	10.9 $\pm$ 1.1	13.6 $\pm$ 3.4	3.3 $\pm$ 1.33	3.7 $\pm$ 1.7	-0.8 $\pm$ 0.2
(X ₁) (X ₂)	-4.5 $\pm$ 1.5	20.3 $\pm$ 1.1	9.3 $\pm$ 3.4	-3.8 $\pm$ 1.33	4.6 $\pm$ 1.7	0.6 $\pm$ 0.2
(X ₁) (X ₃)	10.3 $\pm$ 1.5	-4.6 $\pm$ 1.1	11.5 $\pm$ 3.4	1.4 $\pm$ 1.33	2.9 $\pm$ 1.7	3.4 $\pm$ 0.2
(X ₂) (X ₃)	-3.8 $\pm$ 1.5	-2.3 $\pm$ 1.1	14.8 $\pm$ 3.4	16.4 $\pm$ 1.33	4.3 $\pm$ 1.7	2.8 $\pm$ 0.2
(X ₁) (X ₂) (X ₃)	-14.3 $\pm$ 1.5	9.0 $\pm$ 1.1	-8.5 $\pm$ 3.4	13.8 $\pm$ 1.33	-1.8 $\pm$ 1.7	3.2 $\pm$ 0.2
(X ₁) ²	-52.4 $\pm$ 3.0	-24.4 $\pm$ 2.0	-23.8 $\pm$ 6.5	-34.6 $\pm$ 2.6	-34.3 $\pm$ 3.3	-26.3 $\pm$ 0.4
r ²	0.9052	0.9735	0.9481	0.9332	0.8589	0.9955
Regression	10.9676 ^a	28.0342 ^a	16.6935 ^a	20.9570 ^a	24.3636 ^a	150.2847 ^a
Lack of fit	6.9043	8.1998	28.4889 ^a	2.3655	9.8451 ^a	2.3345

X₁ = sonication; X₂ = ionic strength; X₃ = solvent composition; numbers in bold correspond to results significant at a probability level of 95% by the *t*-test; ^a significant at a probability level of 95% by Fisher's *F* test.

Table 4 – Recoveries, repeatability and intermediate precision for AFM1, AFG2, AFG1, AFB2, AFB1 and OTA in breast milk.

Recoveries and repeatability					Intermediate precision				
Mycotoxins	Analyst 1				Analyst 1		Analyst 2		
	Level (ng/mL)	n*	Mean ±	RSD	n	Mean ±	RSD	Mean ±	RSD
			SD (%)	(%)		SD (%)		SD (%)	(%)
AFM1	0.01	8	74.5 ± 4.4	5.9	5	75.5 ± 3.9	5.1	5	69.2 ± 17.6
	0.05	8	70.1 ± 4.0	5.7					
	0.5	6	72.6 ± 1.3	1.8					
AFG2	0.01	8	73.0 ± 11.0	15.1	5	79.5 ± 4.0	5.0	5	78.2 ± 13.1
	0.05	7	77.3 ± 2.5	3.2					
	0.5	7	85.2 ± 2.5	3.0					
AFG1	0.03	8	99.5 ± 14.0	14.1	5	85.6 ± 6.5	7.6	5	83.7 ± 14.6
	0.15	8	95.8 ± 3.3	3.5					
	1.5	8	89.7 ± 5.6	6.3					
AFB2	0.005	6	73.1 ± 2.8	3.8	5	74.4 ± 5.8	7.8	5	80.6 ± 16.6
	0.0125	8	71.2 ± 4.0	5.7					
	0.125	7	81.7 ± 3.0	3.7					
AFB1	0.02	8	77.4 ± 7.1	9.1	5	74.0 ± 1.2	1.7	5	71.2 ± 14.8
	0.05	8	88.0 ± 4.9	5.6					
	0.5	8	79.6 ± 4.4	5.5					
OTA	0.01	8	77.6 ± 13.4	17.3	5	74.4 ± 1.2	1.6	5	62.1 ± 15.6
	0.05	7	76.9 ± 1.9	2.5					
	0.5	7	88.5 ± 2.7	3.1					

*Outliers identified through box plots were removed.

References

- Almeida MI, Almeida NG, Carvalho KL, Gonçalves GA, Silva CN, Santos EA, et al. Co-occurrence of aflatoxins B₁, B₂, G₁ and G₂, ochratoxin A, zearalenone, deoxynivalenol, and citreoviridin in rice in Brazil. *Food Addit Contam.* 2012;29(4):694-703.
- American Academy of Pediatrics (AAP). Breastfeeding So. Breastfeeding and the use of human milk. *Pediatrics.* 2012;129(3):e827-41.
- Andrade PD, Homem de Mello M, França JA, Caldas ED. Aflatoxins in food products consumed in Brazil – a dietary risk assessment. *Food Addit Contam.* No prelo 2012.
- ANVISA (Brazilian Sanitary Surveillance Agency). Resolução nº7, de 18 de fevereiro de 2011. [Internet] Brazil: 2011. [Accessed on January 15, 2012]. Available from: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/Anvisa+Portal/Anvisa/Inicio/Alimentos>.
- AOAC International. Official methods of analysis. 16th ed. Gaithersburg: Association of Official Analytical Chemists; 1995.
- Bruce P, Minkinen P, Riekkola ML. Practical method validation: Validation sufficient for an analysis method. *Mikrochim Acta.* 1998;128(1-2):93-106.
- Cavaliere C, Foglia P, Pastorini E, Samperi R, Lagana A. Liquid chromatography/tandem mass spectrometric confirmatory method for determining aflatoxin M1 in cow milk – Comparison between electrospray and atmospheric pressure photoionization sources. *J Chromatogr A.* 2006;1101(1-2):69-78.
- Codex Alimentarius Commission. Codex general standard for contaminants and toxins in food and feed [Internet]. CODEX STAN 193, 1995. Available from: http://www.codexalimentarius.net/download/standards/17/CXS_193e.pdf.
- Copetti MV, Iamanaka BT, Pereira JL, Lemes DP, Nakano F, Taniwaki MH. Co-occurrence of ochratoxin a and aflatoxins in chocolate marketed in Brazil. *Food Control.* 2012; 26:36-41.
- Dostal A, Jakusova L, Cajdova P, Hudeckova H. Results of the first studies of occurrence of ochratoxin A in human milk in Slovakia. *Bratisl Med J.* 2008;109(6):276-8.
- Dragacci S, Grosso F, Gilbert J. Immunoaffinity column cleanup with liquid chromatography for determination of aflatoxin M1 in liquid milk: collaborative study. *J AOAC Int.* 2001;84(2):437-43.
- Elnezami HS, Nicoletti G, Neal GE, Donohue DC, Ahokas JT. Aflatoxin M(1) in

- human breast-milk samples from Victoria, Australia and Thailand. *Food Chem Toxicol.* 1995;33(3):173-9.
- European Commission (EC). Commission Regulation 2006/401/CE. Laying down the methods of sampling and analysis of the official control of the levels of mycotoxins in foodstuffs. *Official Journal of the European Communities.* L70/12. [Internet]. 2006. [Accessed on may 17, 2012]. Available from: <http://www.fsvps.ru/fsvps-docs/ru/usefulinf/files/es401-2006.pdf>
- Frisvad JC, Andersen B, Samson RA. Association of moulds to foods. In: *Food Mycology - A multifaceted approach to fungi and food.* New York: CRC Press; 2007. p. 199-239.
- Galvano F, Pietri A, Bertuzzi T, Gagliardi L, Ciotti S, Luisi S, et al. Maternal dietary habits and mycotoxin occurrence in human mature milk. *Mol Nutr Food Res.* 2008;52(4):496-501.
- Ghiasain SA, Maghsood AH. Infants' exposure to aflatoxin M1 from mother's breast milk in Iran. *Iran J Public Health.* 2012;41(3):119-26.
- Goulart SM, Queiroz MELR, Neves AA, Queiroz JH. Low-temperature clean-up method for the determination of pyrethroids in milk using gas chromatography with electron capture detection. *Talanta.* 2008;75(5):1320-3.
- Gurbay A, Girgin G, Sabuncuoglu SA, Sahin G, Yurdakok M, Yigit S, et al. Ochratoxin A: is it present in breast milk samples obtained from mothers from Ankara, Turkey? *J Appl Toxicol.* 2009;30(4):329-33.
- Gurbay A, Sabuncuoglu SA, Girgin G, Sahin G, Yigit S, Yurdakok M, et al. Exposure of newborns to aflatoxin M(1) and B(1) from mothers' breast milk in Ankara, Turkey. *Food Chem Toxicol.* 2010;48(1):314-9.
- Hanson LA, Korotkova M, Haversen L, Mattsby-Baltzer I, Hahn-Zoric M, Silfverdal SA, et al. Breast-feeding, a complex support system for the offspring. *Pediatr Int.* 2002;44(4):347-52.
- Herzallah SM. Determination of aflatoxins in eggs, milk, meat and meat products using HPLC fluorescent and UV detectors. *Food Chemistry.* 2009;114(3):1141-6.
- Iha MH, Barbosa CB, Favaro RM, Trucksess MW. Chromatographic method for the determination of aflatoxin M1 in cheese, yogurt, and dairy beverages. *J AOAC Int.* 2011;94(5):1513-8.

- Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO). DOQ-CGCRE-008, Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos. Documento de caráter orientativo – revisão 03. 2010.
- International Agency for Research on Cancer (IARC). Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans – Some naturally occurring substances: Food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins [Internet]. Lyon: 1993. [Accessed on february 13, 2012]. Available from: <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol56/mono56.pdf>.
- Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA). Evaluation of certain mycotoxins in food. WHO technical report series – 906. [Internet]. Geneva: WHO publications; 2001. [Accessed on February 13, 2012]. Available from: http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_906.pdf.
- Jones G, Steketee RW, Black RE, Bhutta ZA, Morris SS; Bellagio Child Survival Study G. How many child deaths can we prevent this year? Lancet. 2003;362(9377):65-71.
- Lamplugh SM, Hendrickse RG, Apeagyei F, Mwanmut DD. Aflatoxins in breast-milk, neonatal cord blood, and serum of pregnant-women. Brit Med J. 1988; 296(6627):968.
- Landrigan PJ, Sonawane B, Mattison D, McCally M, Garg A. Chemical contaminants in breast milk and their impacts on children's health: An overview. Environ Health Perspect. 2002;110(6):A313-A5.
- Lawrence RA. A review of the medical benefits and contraindications to breastfeeding in the United States (Maternal and child health technical information bulletin). Arlington, VA: National Center for Education in Maternal and Child Health. 1997.
- Magan N, Aldred D. Why do fungi produce mycotoxins? In: Food Mycology - A multifaceted approach to fungi and food. New York: CRC Press; 2007. p. 121-134.
- Mahdavi R, Nikniaz L, Arefhosseini SR, Jabbari MV. Determination of aflatoxin M(1) in breast milk samples in Tabriz-Iran. Matern Child Health J. 2010;14(1):141-5.
- Ministry of Agriculture, Livestock and Food Supply (MAPA). Manual de garantia da qualidade analítica. Brasília :Secretaria de Defesa Agropecuária; 2011.
- Muñoz K, Campos V, Blaszkewicz M, Vega M, Alvarez A, Neira J, et al. Exposure of neonates to ochratoxin A: first biomonitoring results in human milk (colostrum) from Chile. Mycotox Res. 2010; 26:59-67.

- Navas SA, Sabino M, Rodriguez-Amaya DB. Aflatoxin M-1 and ochratoxin A in a human milk bank in the city of Sao Paulo, Brazil. *Food Addit Contam.* 2005;22(5):457-62.
- Neto BB, Scarminio IS, Bruns RE. *Como fazer experimentos*. 4th ed. Porto Alegre: Bookman; 2010.
- Papadopoulou-Bouraoui A, Stroka J, Anklam E. Comparison of two post-column derivatization systems, ultraviolet irradiation and electrochemical determination, for the liquid chromatographic determination of aflatoxins in food. *J AOAC Int.* 2002;85(2):411-6.
- Pitt JI, Hocking AD. *Fungi and food spoilage*. New York: Springer Science + Business Media; 2009.
- Polychronaki N, West RM, Turner PC, Amra H, Abdel-Wahhab M, Mykkanen H, et al. Longitudinal assessment of aflatoxin M-1 excretion in breast milk of selected Egyptian mothers. *Food Chem Toxicol.* 2007;45(7):1210-5.
- Ribani M, Bottoli CBG, Collins CH, Jardim I, Melo LFC. Validation for chromatographic and electrophoretic methods. *Quim Nova.* 2004;27(5):771-80.
- Rübensam G, Barreto F, Hoff RB, Kist TL, Pizzolato TM. A liquid-liquid extraction procedure followed by a low temperature purification step for the analysis of macrocyclic lactones in milk by liquid chromatography-tandem mass spectrometry and fluorescence detection. *Anal Chim Acta.* 2011;705(1-2):24-9.
- Sadeghi N, Oveisi MR, Jannat B, Hajimahmoodi M, Bonyani H, Jannat F. Incidence of aflatoxin M-1 in human breast milk in Tehran, Iran. *Food Control.* 2009;20(1):75-8.
- Sherif OS, Salama EE, Abdel-Wahhab MA. Mycotoxins and child health: the need for health risk assessment. *Int J Hyg Environ Health.* 2009;212(4):347-68.
- Taniwaki MH, Pitt JI, Teixeira AA, Iamanaka BT. The source of ochratoxin A in Brazilian coffee and its formation in relation to processing methods. *Int J Food Microbiol.* 2003;82(2):173-9.
- Thompson M, Ellison SLR, Wood R. *Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis - (IUPAC technical report)*. Pure and Applied Chemistry. 2002;74(5):835-55.
- Turconi G, Guarcello M, Livieri C, Comizzoli S, Maccarini L, Castellazzi AM, et al. Evaluation of xenobiotics in human milk and ingestion by the newborn - an epidemiological survey in Lombardy (Northern Italy). *Eur J Nutr.* 2004;43(4):191-7.

- Vieira AP, Badiale-Furlong E, Oliviera LM. Ocorrência de micotoxinas e características físico-químicas em farinhas comerciais. *Ciênc Tecnol Aliment.* 1999; 19(2): 221-225.
- Vieira HP, Neves AA, Queiroz MELR. Otimização e validação da técnica de extração líquido-líquido com partição em baixa temperatura (ELL-PBT) para piretróides em água e análise por CG. *Quim Nova.* 2007; 30: 535-540.
- Wang H, Zhou X-J, Liu Y-Q, Yang H-M, Guo Q-L. Simultaneous determination of chloramphenicol and aflatoxin M-1 residues in milk by triple quadrupole liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Agric Food Chem.* 2011;59(8):3532-8.
- World Health Organization (WHO). Principles for evaluating health risks in children associated with exposure to chemicals (Environmental health criteria; 237). [Internet]. Geneva: 2006. [Accessed on may 18, 2012]. Available from: http://whqlibdoc.who.int/publications/2006/924157237X_eng.pdf

7. CONCLUSÕES

A avaliação dos dados sobre aflatoxinas em alimentos comercializados no Distrito Federal permitiu a visualização do panorama da contaminação por estas micotoxinas em amendoim, produtos de amendoim, castanha e nozes, nos últimos anos na região. Esse estudo mostrou uma diminuição considerável na incidência de amostras positivas desses produtos nos últimos 10 anos, embora os níveis de contaminação encontrados em algumas amostras ainda ultrapassem bastante o limite estabelecido pela legislação brasileira. Esta redução pode ser atribuída à implementação compulsória das Boas Práticas de Fabricação em estabelecimentos produtores/industrializadores de alimentos e também a programas de monitoramento firmados pelo governo federal. No âmbito nacional, também foi possível perceber uma redução nos níveis de concentração encontrados, embora poucos artigos tenham sido publicados recentemente.

No Distrito Federal, não foi possível realizar uma estimativa do consumo individual dos produtos como amendoim e castanhas, devido ao baixo número de relatos de consumo destes produtos. Nesses casos, uma melhor estimativa poderia ser feita se tivéssemos agregado dados de frequência alimentar, ainda não disponíveis. Para a população brasileira, a análise dos dados de consumo individual obtidos demonstrou o impacto que a contaminação de arroz representa na ingestão de AFs, uma vez que o consumo da população brasileira é extremamente alto. Desta maneira, recomenda-se que o arroz seja analisado com mais frequência em programas de monitoramento, uma vez que o menor nível de contaminação por aflatoxinas nestes produtos pode impactar fortemente a exposição total.

De maneira geral, tanto a ingestão como o risco de câncer, calculados para a população brasileira foram maiores que os encontrados em outros países, com exceção de alguns países africanos. Embora a ingestão e o risco de câncer possam ter sido superestimados devido a algumas limitações no desenvolvimento das estimativas, é importante ressaltar que as aflatoxinas são compostos carcinogênicos e, portanto, a exposição deve ser mantida no menor nível possível.

Foi possível estabelecer uma metodologia de análise simultânea para AFM1, AFB1, AFB2, AFG1, AFG2 e OTA no leite materno, sem a necessidade de purificação por colunas de imunoafinidade ou SPE. A ausência de etapas de purificação, além de reduzir o tempo de análise, reduz enormemente o custo das análises, facilitando a implementação desta metodologia em outros laboratórios. O método desenvolvido para análise de micotoxinas, baseado na extração líquido-líquido e purificação por congelamento, foi validado segundo protocolos internacionalmente aceitos.

Não foi possível coletar o número de amostras de leite da Rede Bancos de Leite do Distrito Federal planejado inicialmente, porém pode-se considerar a amostra representativa do número de doadoras (93% de confiança). A análise das amostras de leite materno demonstrou um baixo nível de contaminação por micotoxinas e, portanto, as crianças do Distrito Federal que consumiram leite da Rede de Bancos de Leite do Distrito Federal não estão sob-risco de exposição à micotoxinas pela amamentação. A baixa incidência de amostras contaminadas por aflatoxinas era esperada, uma vez que as doadoras que forneceram este dado relataram um baixo consumo de amendoim, castanha do Brasil e derivados, alimentos críticos no que se refere a presença de aflatoxinas. Entretanto, como as crianças são consideradas mais susceptíveis aos efeitos das micotoxinas, a presença destes contaminantes deve ser constantemente monitorada e mantida no menor nível de concentração possível.

8. REFERÊNCIAS

- Ailsh JL, Rippon EH, Barlow T, Hattersley SJ. Ochratoxin A. In: Magan N, OLSEN M, organizadores. *Mycotoxins in food - Detection and control*. Cambridge: Woodhead Publishing Limited; 2004. p. 307-338.
- Almeida MI, Almeida NG, Carvalho KL, Gonçalves GA, Silva CN, Santos EA, et al. Co-occurrence of aflatoxins B₁, B₂, G₁ and G₂, ochratoxin A, zearalenone, deoxynivalenol, and citreoviridin in rice in Brazil. *Food Addit Contam*. 2012;29(4):694-703.
- Amaral KAS, Nascimento GB, Sekiyama BL, Janeiro V, Machinski JM. Aflatoxinas em produtos à base de milho comercializados no Brasil e riscos para a saúde humana. *Ciênc Tecnol Alim*. 2006.;26(2):336-342.
- American Academy of Pediatrics (AAP). Breastfeeding So. Breastfeeding and the use of human milk. *Pediatrics*. 2012;129(3):e827-41.
- Aydin A, Aksu H, Gunsen U. Mycotoxin levels and incidence of mould in Turkish rice. *Environmental Monitoring and Assessment*. 2011;178(1-4):271-80.
- Azziz-Baumgartner E, Lindblade K, Gieseke K, Rogers HS, Kieszak S, Njapau H, et al. Case-control study of an acute aflatoxicosis outbreak, Kenya, 2004. *Environmental Health Perspectives*. 2005;113(12):1779-83.
- Bansal J, Pantazopoulos P, Tam J, Cavlovic P, Kwong K, Turcotte AM, et al. Surveys of rice sold in Canada for aflatoxins, ochratoxin A and fumonisins. *Food Additives and Contaminants Part a-Chemistry Analysis Control Exposure & Risk Assessment*. 2011;28(6):767-74.
- Battaccone G, Nudda A, Rassu SP, Decandia M, Pulina G. Excretion pattern of aflatoxin M1 in milk of goats fed a single dose of afltoxin B1. *J Dairy Sci*. 2012; 95(5)2656-61.
- Bayman P, Baker JL. Ochratoxins: a global perspective. *Mycopathologia*. 2006;162(3):215-23.
- Bedard LL, Massey TE. Aflatoxin B1-induced DNA damage and its repair. *Cancer Lett*. 2006;241(2):174-83.
- Bennett RA, Essigmann JM, Wogan GN. Excretion of an aflatoxin-guanine adduct in the urine of aflatoxin-b1-treated rats. *Cancer Research*. 1981;41(2):650-4.
- Bisquerra R, Sarriera JC, Martínez F. *Introdução à estatística: enfoque informático com o pacote estatístico SPSS*. Porto Alegre; 2004. 256p.

Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Banco de leite humano: funcionamento, prevenção e controle de riscos. [Internet]. Brasília; 2008. 160p. [Acesso em: 18 de junho de 2012]. Disponível em: <http://www.redeblh.fiocruz.br/media/blhanv2008.pdf>

Brasil. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº66, de 11 de setembro de 2003a. Aprova as normas para o cadastramento dos agentes da cadeia produtiva dos vegetais, seus produtos, subprodutos e derivados para fins de certificação da segurança e qualidade. Diário Oficial da União – D.O.U., de 16 de setembro de 2003.

Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução-RDC nº172 de 04 de julho de 2003b. Aprovar o regulamento técnico de boas práticas de fabricação para estabelecimentos industrializadores de amendoims processados e derivados. Diário Oficial da União – D.O.U., de 07 de agosto de 2003.

Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução -RDC nº 274 de 15 de outubro de 2002. Aprova o regulamento técnico sobre limites máximos de aflatoxinas admissíveis no leite, no amendoim e no milho. Diário Oficial da União – D.O.U., de 16 de outubro de 2002.

Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução – RE nº899 de 29 de maio de 2003c. Determina a publicação do “Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Diário Oficial da União – D.O.U., de 02 de junho de 2003.

Brasil. Ministério da Saúde. Portaria nº1.428, de 26 de novembro de 1993. Aprova o “Regulamento Técnico para Inspeção Sanitária de Alimentos”, as “Diretrizes para o Estabelecimento de Boas Práticas de Produção e Prestação de Serviços na Área de Alimentos” e o “Regulamento Técnico para o Estabelecimento de Padrão de Identidade e Qualidade (PIQ’s) para Serviços e Produtos na Área de Alimentos”. D.O.U., Brasília, 02 de dezembro de 1993.

Brasil. Ministério da Saúde. Resolução nº 7, de 18 de fevereiro de 2011 da ANVISA. Aprova o Regulamento Técnico Sobre Limites Máximos Tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos. Diário Oficial da União – D.O.U., de 22 de fevereiro de 2011.

- Brera C, de Santis B, Debegnach F, Miraglia M. Mycotoxins. In: Picó Y, organizador. *Comprehensive Analytical Chemistry - Food Contaminants and Residue Analysis*. Amsterdam: Elsevier; 2008. v. 51. p. 363-427.
- Bruce P, Minkinen P, Riekkola ML. Practical method validation: Validation sufficient for an analysis method. *Mikrochimica Acta*. 1998; 128(1-2):93-106.
- Bullerman LB, Bianchini A. Stability of mycotoxins during food processing. *International Journal of Food Microbiology*. 2007;119(1-2):140-6.
- Caldas ED, Silva AC. Mycotoxins in corn-based food products consumed in Brazil: an exposure assessment for fumonisins. *J Agric Food Chem*. 2007;55(19):7974-80.
- Caldas ED, Silva SC, Oliveira JN, Degering AV. Contaminação por aflatoxinas e ocratoxina A nos alimentos consumidos no Distrito Federal. *Rev Saúde Dist Fed*. 1998; 9(2):44-47.
- Caldas ED, Silva SC, Oliveira JN. Aflatoxinas e ocratoxina A em alimentos e riscos para a saúde humana. *Rev Saúde Públ*. 2002; 36(3):319-323.
- Carvalho RA, Batista LR, Prado G, Oliveira BR, Silva DM. Incidência de fungos toxigênicos e aflatoxinas em arroz. *Ciênc Agrotec*. 2010;34:946-952.
- Cavaliere C, Foglia P, Pastorini E, Samperi R, Laganà A. Liquid chromatography/tandem mass spectrometric confirmatory method for determining aflatoxin M1 in cow milk: comparison between electrospray and atmospheric pressure photoionization sources. *J Chromatogr A*. 2006;1101(1-2):69-78.
- Chun HS, Kim HJ, Ok HE, Hwang J-B, Chung D-H. Determination of aflatoxin levels in nuts and their products consumed in South Korea. *Food Chemistry*. 2007;102(1):385-91.
- CNNPA (Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos). Resolução nº34 [Internet]. Brasil: 1977. [Acesso em: 22 de fevereiro de 2012]. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/41eccf00474580fd8d18dd3fbc4c6735/CNNPA+n%C2%BA+34%2C+de+1976.pdf?MOD=AJPERES>
- Codex Alimentarius Commission (CAC). Procedure Manual. 18th ed. [Internet]. FAO/WHO, 2008. [Acessado em: 10 de junho de 2012]. Disponível em: http://ftp.fao.org/codex/Publications/ProcManuals/Manual_18e.pdf

- Codex Alimentarius. Codex general standard for contaminants and toxins in food and feed [Internet]. CODEX STAN 193, 1995. [Acessado em: 23 de março de 2012]. Disponível em: http://www.codexalimentarius.net/download/standards/17/CXS_193e.pdf.
- Copetti MV, Iamanaka BT, Pereira JL, Lemes DP, Nakano F, Taniwaki MH. Co-occurrence of ochratoxin a and aflatoxins in chocolate marketed in Brazil. *Food Control*. 2012; 26:36-41.
- Coulter JB, Lamplugh SM, GI Suliman, Omer MI, Hendrickse RG. Aflatoxins in human breast milk. *Ann Trop Paediatr*. 1984; 4(2):61-6.
- Council for Agricultural Science and Technology (CAST). Mycotoxins: risks in plant, animal, and human systems. Ames: Task Force Report; 2003. n. 139, 199 p.
- Creppy EE. Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe. *Toxicology Letters*. 2002;127(1-3):19-28.
- Cullen JM, Newberne PM. Acute hepatotoxicity of aflatoxins. In: Eaton DL, Groopman JD, ed. *The toxicology of aflatoxins: human health, veterinary, and agricultural significance*. London: Academic Press, 1993:1–26.
- D’Mello JPF. Mycotoxins in Cereal Grains, Nuts and Other Plant Products. In: D’Mello JPF, organizador. *Food Safety: Contaminants and Toxins*. CABI Publishing; 2003. p. 65-90.
- Deshpande SS. The Science of Toxicology. In: *Handbook of Food Toxicology*. New York: Marcel Dekker Inc; 2002.
- Dors, GC, Bierhals VS, Badiale-Furlong E. Parboiled rice: chemical composition and the occurrence of mycotoxins. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. 2011; 31(1):172-177.
- Dostal A, Jakusova L, Cajdova P, et al. Results of the first studies of occurrence of ochratoxin A in human milk in Slovakia. *Bratislava Medical Journal- Bratislavske Lekarske Listy*. 2008;109(6):276-8.
- Eaton DL, Gallagher EP. Mechanism of aflatoxin carcinogenesis. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 1994;34:135-72.
- El-Nnezami HS, Nicoletti G, Neal GE, et al. aflatoxin m(1) in human breast-milk samples from Victoria, Australia and Thailand. *Food and Chemical Toxicology*. 1995;33(3):173-9.
- Essigmann JM, Croy RG, Nadzan AM, et al. Structural identification of the

- major DNA adduct formed by aflatoxin B1 in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1977;74(5):1870-4.
- Eurachem Working Group (EURACHEM). The fitness purpose of analytical methods – a laboratory guide to method validation and related topics. LGC Ltd; 1998.
- Food and Agricultural Organization; World Health Organization (FAO/WHO). Dietary exposure assessment of chemicals in food: report of a joint FAO/WHO consultation [Internet]. Annapolis: 2005. [Acessado em 20 de janeiro de 2012]. Disponível em: http://whqlibdoc:Who.int/publications/2008/97892415597470_eng.pdf.
- Frisvad JC, Thrane U, Samson RA.. Important mycotoxins and the fungi which produce them. In: Pitt JI, Hocking AD, Thrane U, organadores. *Advances in Experimental Medicine and Biology – Advances in food mycology*. New York: Springer Science + Bussiness Media Inc; 2006. v. 571. p. 3-31.
- Frisvad JC, Thrane U, Samson, RA. Mycotoxin producers. In: Dijksterhuis J, Samson RA, organizadores. *Food Mycology - A multifaceted approach to fungi and food*. New York: CRC Press; 2007. p. 135-159..
- Gallagher EP, Wienkers LC, Stapleton PL, Kunze KL, Eaton DL. Role of human microsomal and human complementary dna-expressed cytochrome-p4501a2 and cytochrome-p4503a4 in the bioactivation of aflatoxin-b(1). *Cancer Research*. 1994;54(1):101-8.
- Galvano F, Galofaro V, Ritieni A, Bognanno M, De Angelis A, Galvano G. Survey of the occurrence of aflatoxin M1 in dairy products marketed in Italy: second year of observation. *Food Addit Contam*. 2001;18(7):644-6.
- Galvano F, Pietri A, Bertuzzi T, Gagliardi L, Ciotti S, Luisi S, et al. Maternal dietary habits and mycotoxin occurrence in human mature milk. *Molecular Nutrition & Food Research*. 2008;52(4):496-501.
- Ghali R, Khlifa KH, Ghorbel H, Maaroufi K, Hedilli A.. Aflatoxin determination in commonly consumed foods in Tunisia. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2010;90(14):2347-51.
- Ghiasain SA, Maghsood AH. Infants' exposure to aflatoxin m1 from mother's breast milk in Iran. *Iranian Journal of Public Health*. 2012;41(3):119-26.
- Gong YY, Hounsa A, Egal S, Turner PC, Sutcliffe AE, Hall AJ, et al. Postweaning exposure to aflatoxin results in impaired child growth: A

- longitudinal study in Benin, west Africa. *Environmental Health Perspectives*. 2004;112(13):1334-8.
- Google Maps [Internet]. 2012. [Acesso em: 18 de junho de 2012]. Disponível em: <http://maps.google.com.br>
- Governo do Distrito Federal (GDF). Portal do Distrito Federal [Internet]. Brasília; 2010. [Acesso em: 12 de março de 2010]. Disponível em: <http://www.df.gov.br/>
- Gross-Steinmeyer KG, Eaton DL. Dietary modulation of the biotransformation and genotoxicity of aflatoxin B1. *Toxicology*. Article in press. 2012.
- Guengerich FP, Johnson WW, Shimada T, Ueng YF, Yamazaki H, Langouët S. Activation and detoxication of aflatoxin B1. *Mutat Res*. 1998;402(1-2):121-8.
- Guengerich FP, Johnson WW, Ueng YF, Yamazaki H, Shimada T. Involvement of cytochrome P450, glutathione S-transferase, and epoxide hydrolase in the metabolism of aflatoxin B-1 and relevance to risk of human liver cancer. *Environmental Health Perspectives*. 1996;104:557-62.
- Gurbay A, Girgin G, Sabuncuoglu SA, Sahin G, Yurdakok M, Yigit S, et al. Ochratoxin A: is it present in breast milk samples obtained from mothers from Ankara, Turkey? *Journal of Applied Toxicology*. 2009;30(4):329-33.
- Gurbay A, Sabuncuoglu SA, Girgin G, Sahin G, Yigit S, Yurdakok M, et al. Exposure of newborns to aflatoxin M(1) and B(1) from mothers' breast milk in Ankara, Turkey. *Food and Chemical Toxicology*. 2010;48(1):314-9.
- Hanson LA, Korotkova M, Haversen L, Mattsby-Baltzer I, Hahn-Zoric M, Silfverdal SA, et al. Breast-feeding, a complex support system for the offspring. *Pediatrics International*. 2002;44(4):347-52.
- Holzapfel CW, Steyn PS, Purchase IFH. Isolation and structure of aflatoxins M1 and M2. *Tetrahedron Letters*. 1966; 7(25):2799-2803.
- Hsieh DPH, Cullen JM, Ruebener BH. Comparative hepatocarcinogenicity of aflatoxins B1 and M1 in the rat. *Food and Chemical Toxicology*. 1984; 22(12):1027-1028.
- Huang B, Han Z, Cai Z, Wu Y, Ren Y. Simultaneous determination of aflatoxins B1, B2, G1, G2, M1 and M2 in peanuts and their derivative products by ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*. 2010;662(1):62-8.

- Iamanaka BT, de Menezes HC, Vicente E, Leite RSF, Taniwaki MH. Aflatoxigenic fungi and aflatoxins occurrence in sultanas and dried figs commercialized in Brazil. *Food Control*. 2008; 18:454-457.
- Iha MH, Barbosa CB, Favaro RM, Trucksess MW. Chromatographic method for the determination of aflatoxin M1 in cheese, yogurt, and dairy beverages. *J AOAC Int*. 2011;94(5):1513-8.
- Imperato R, Campone L, Piccinelli AL, Veneziano A, Rastrelli L. Survey of aflatoxins and ochratoxin a contamination in food products imported in Italy. *Food Control*. 2011;22(12):1905-10.
- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Pesquisa de orçamentos familiares 2008-2009. Dados Brutos. Rio de Janeiro: IBGE; 2011.
- Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO). DOQ-CGCRE-008, Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos. Documento de caráter orientativo – revisão 03. 2010. 20p.
- International Agency for Research on Cancer (IARC). Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans – Some naturally occurring substances: Food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins [Internet]. Lyon: 1993. [Acesso em 20 de maio de 2012]. Disponível em: <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/PDFs/index.php>
- International Agency of Research on Cancer (IARC). Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans - Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene. Lyon: IARC Press; 2002. v. 82. 601 p.
- International Programme on Chemical Safety (IPCS). Environmental Health Criteria 240: Principles and methods for the risk assessment of chemical in food. [Internet]. WHO Press: 2009. [Acessado em 02 de maio de 2012]. Disponível em: <http://www.who.int/ipcs/publications/ehc/en/index.html>.
- International Programme on Chemical Safety (IPCS). IPCS Risk assessment terminology. [Internet]. Geneva: 2004. [Acessado em 23 de abril de 2012]. Disponível em: <http://www.who.int/ipcs/publications/methods/harmonization/en/index.html>.

- Jardim ANO, Caldas ED. Exposição humana a substâncias químicas potencialmente tóxicas na dieta e os riscos para a saúde. *Quim Nova*. 2009; 32(7):1898-1909.
- Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA). Evaluation of certain mycotoxins in food. WHO technical report series – 906. [Internet]. Geneva: WHO publications; 2001. [Acesso em 20 de maio de 2012]. Disponível em: http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_906.pdf.
- Jones G, Steketee RW, Black RE, Bhutta ZA, Morris SS. Child Survival Study. How many child deaths can we prevent this year? *Lancet*. 2003;362(9377):65-71.
- Kamika I, Takoy LL. Natural occurrence of aflatoxin B1 in peanut collected from Kinshasa, Democratic Republic of Congo. *Food Control*. 2011;22(11):1760-4.
- Kawashima LM, Soares, LMV. Incidência de fumonisina B1, aflatoxinas B1, B2, G1 e G2, ocratoxina A e zearalenona em produtos de milho. *Ciênc Tecnol Alim*. 2006. 26(3):516-521.
- Kelly JD, Eaton DL, Guengerich FP, et al. Aflatoxin B-1 activation in human lung. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 1997;144(1):88-95.
- Kensler TW, Roebuck BD, Wogan GN, et al. Aflatoxin: A 50-Year Odyssey of Mechanistic and Translational Toxicology. *Toxicological Sciences*. 2011;120:S28-S48.
- Klaassen CD, editor. *Casarett and Doull's Toxicology – The basic science of poisons*. New York: McGraw-Hill – Medical Publishing Division; 2008. 7 ed. p. 1191-1236.
- Kotsonis FN, BURDOCK GA. Food Toxicology. In: Klaassen CD, editores. *Casarett and Doull's Toxicology – The basic science of poisons*. New York: McGraw-Hill – Medical Publishing Division; 2008. 7 ed. p. 1191-1236.
- Krishnamachari KA, Bhat RV, Nagarajan V, Tilak TB. Hepatitis due to aflatoxicosis. An outbreak in Western India. *Lancet*. 1975;1(7915):1061-3.
- Kuniholm MH, Lesi OA, Mendy M, Sam O, Hall AJ, et al. Aflatoxin Exposure and Viral Hepatitis in the Etiology of Liver Cirrhosis in The Gambia, West Africa. *Environmental Health Perspectives*. 2008;116(11):1553-7.
- Lamplugh SM, Hendrickse RG, Apeagyei F, Mwanmut DD. Aflatoxins in breast-milk, neonatal cord blood, and serum of pregnant-women. *British Medical Journal*. 1988;296(6627):968-.

- Landrigan PJ, Sonawane B, Mattison D, McCally M, Garg A. Chemical contaminants in breast milk and their impacts on children's health: An overview. *Environmental Health Perspectives*. 2002;110(6):A313-A5.
- Lawrence RA. A review of the medical benefits and contraindications to breastfeeding in the United States (Maternal and child health technical information bulletin). Arlington: National Center for Education in Maternal and Child Health; 1997.
- Leong Y-H, Ismail N, Latif AA, Ahmad R. Aflatoxin occurrence in nuts and commercial nutty products in Malaysia. *Food Control*. 2010;21(3):334-8.
- Lewis L, Onsongo M, Njapau H, Schurz-Rogers H, Lubber G, Kieszak S, et al. Aflatoxin contamination of commercial maize products during an outbreak of acute aflatoxicosis in eastern and central Kenya. *Environmental Health Perspectives*. 2005;113(12):1763-7.
- Liu Y, Chang CC, Marsh GM, Wu F. Population attributable risk of aflatoxin-related liver cancer: Systematic review and meta-analysis. *Eur J Cancer*. 2012.
- Luttfullah G, Hussain A. Studies on contamination level of aflatoxins in some dried fruits and nuts of Pakistan. *Food Control*. 2011;22(3-4):426-9.
- Lye MS, Ghazali AA, Mohan J, Alwin N, Nair RC. An outbreak of acute hepatic encephalopathy due to severe aflatoxicosis in Malaysia. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 1995; 53(1):68-72.
- Mahdavi R, Nikniaz L, Arefhosseini SR, Jabbari MV. Determination of aflatoxin m(1) in breast milk samples in Tabriz-Iran. *Maternal and Child Health Journal*. 2010;14(1):141-5.
- Makun HA, Dutton MF, Njobeh PB, Mwanza M, Kabiru AY. Natural multi-occurrence of mycotoxins in rice from Niger State, Nigeria. *Mycotox Res*. 2011; 27:97-104.
- Martins ML, Martins HM. Aflatoxin M1 in yoghurts in Portugal. *Int J Food Microbiol*. 2004;91(3):315-7.
- Masoero F, Gallo A, Moschini M, Piva G, Diaz D. Carryover of aflatoxin from feed to milk in dairy cows with low or high somatic cell counts. *Animal*. 2007; 1(9):1344-1350.
- Mazaheri M. Determination of aflatoxins in imported rice to Iran. *Food and Chemical Toxicology*. 2009;47(8):2064-6.

- McLean M, Dutton MF. Cellular interactions and metabolism of aflatoxin: an update. *Pharmacol Ther.* 1995;65(2):163-92.
- Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA). Manual de garantia da qualidade analítica. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília; 2011. 227p.
- Muñoz K, Campos V, Blaszkewicz M, Vega M, Alvarez A, Neira J, Degen GH. Exposure of neonates to ochratoxin A: first biomonitoring results in human milk (colostrum) from Chile. *Mycotox Res.* 2010; 26:59-67.
- Navas SA, Sabino M, Rodriguez-Amaya DB. Aflatoxin M-1 and ochratoxin A in a human milk bank in the city of Sao Paulo, Brazil. *Food Additives and Contaminants.* 2005;22(5):457-62.
- Neal GE, Eaton DL, Judah DJ, Verma A. Metabolism and toxicity of aflatoxins M-1 and B-1 in human-derived in Vitro systems. *Toxicology and Applied Pharmacology.* 1998;151(1):152-8.
- Neto BB, Scarminio IS, Bruns RE. Como fazer experimentos. Porto Alegre: Bookman; 2010. 414p.
- Ngindu A, Johnson BK, Kenya PR, Ngira JA, Ocheng DM, Nandwa H, et al. Outbreak of acute hepatitis caused by aflatoxin poisoning in Kenya. *Lancet.* 1982;1(8285):1346-8.
- Nicholson P. Rapid detection of mycotoxigenic fungi in plants. In: Magan N, OLSEN M, organizadores. *Mycotoxins in food - Detection and control.* Cambridge: Woodhead Publishing Limited; 2004. p. 111-136.
- Nunes IL, Magagnin G, Bertolini TE, Furlong EB. Arroz comercializado na região sul do Brasil: aspectos micotoxicológicos e microscópicos. *Ciência e Tecnologia de Alimentos.* 2003;23(2):190-194.
- O'Brien E, Dietrich DR. Ochratoxin A: the continuing enigma. *Crit Rev Toxicol.* 2005;35(1):33-60.
- Oliveira CAF, Goncalves NB, Rosim RE, Fernandes AM. Determination of Aflatoxins in Peanut Products in the Northeast Region of Sao Paulo, Brazil. *International Journal of Molecular Sciences.* 2009;10(1):174-83.
- Oliveira LSF, Koller FFC. Ocorrência de *Aspergillus* spp. e aflatoxinas em amostras de amendoim in natura e paçocas. *Ciênc Amb.* 2011; 5:57-68.

- Pacheco AM, Lucas A, Parente R, Pacheco N. Associação de aflatoxinas e fungos aflatoxigênicos em castanha-do-Brasil. *Ciênc Tecnol Aliment*. 2010; 30:330-334.
- Pacheco AM, Scussel VM. Selenium and aflatoxin levels in raw Brazil nuts from the Amazon basin. *J Agric Food Chem*. 2007;55(26):11087-92.
- Pitt JI, Hocking AD. *Fungi and Food Spoilage*. New York: Springer Science + Business Media; 2009. 520 p.
- Polychronaki N, West RM, Turner PC, Amra H, Abdel-Wahhab M, Mykkanen H, et al Longitudinal assessment of aflatoxin M-1 excretion in breast milk of selected Egyptian mothers. *Food and Chemical Toxicology*. 2007a;45(7):1210-5.
- Polychronaki N. Biomarkers of aflatoxin exposure and a dietary intervention – Studies in infants and children from Egypt and Guinea and young adults from China. [tese]. Kuopio: Faculty of Medicine of the University of Kuopio; 2007b.
- Probst C, Njapau H, Cotty PJ. Outbreak of an acute aflatoxicosis in Kenya in 2004: Identification of the causal agent. *Applied and Environmental Microbiology*. 2007;73(8):2762-4.
- Raney KD, Gopalakrishnan S, Byrd S, Stone MP, Harris TM. Alteration of the aflatoxin cyclopentenone ring to a delta-lactone reduces intercalation with DNA and decreases formation of guanine N7 adducts by aflatoxin epoxides. *Chem Res Toxicol*. 1990;3(3):254-61.
- Raney KD, Shimada T, Kim DH, Groopman JD, Harris TM, Guengerich FP. Oxidation of aflatoxins and sterigmatocystin by human liver-microsomes - significance of aflatoxin-q1 as a detoxication product of aflatoxin-b1. *Chemical Research in Toxicology*. 1992;5(2):202-10.
- Reddy KRN, Farhana NI, Salleh B. Occurrence of *Aspergillus* spp. and aflatoxin B1 in Malaysian foods used for human consumption. *J Food Sci*. 2011; 76: 99-104.
- Ribani M, Bottoli CBG, Collins CH, Jardim ICSF, Melo LFC. Validation for chromatographic and electrophoretic methods. *Quimica Nova*. 2004;27(5):771-780.
- Rocha MD, Maia PP, Rodrigues MA, Martins I. Incidência de aflatoxinas em amostras de amendoim e paçoca comercializadas na cidade de Alfenas-MG, Brasil. *Rev Bras Toxicol*. 2008; 21(1):15-19.

- Ruangwises S, Ruangwises N. Occurrence of aflatoxin M1 in pasteurized milk of the school milk project in Thailand. *J Food Prot.* 2009;72(8):1761-3.
- Sabbioni G, Skipper PL, Büchi G, Tannenbaum SR. Isolation and characterization of the major serum albumin adduct formed by aflatoxin B1 in vivo in rats. *Carcinogenesis.* 1987;8(6):819-24.
- Sadeghi N, Oveisi MR, Jannat B, Hajimahmoodi M, Bonyani H, Jannat F. Incidence of aflatoxin M-1 in human breast milk in Tehran, Iran. *Food Control.* 2009;20(1):75-8.
- Shank RC, Bourgeois CH, Keschamras N, Chandavimol P. Aflatoxins in autopsy specimens from Thai children with an acute disease of unknown aetiology. *Food Cosmet Toxicol.* 1971;9(4):501-7.
- Sherif OS, Salama EE, Abdel-Wahhab MA. Mycotoxins and child health: The need for health risk assessment. *International Journal of Hygiene and Environmental Health.* 2009;212(4):347-68.
- Silva SC, Oliveira JN, Caldas ED. Aflatoxinas em alimentos comercializados no Distrito Federal de 1985 a 1995. *Rev Inst Adolfo Lutz.* 1996; 56(2):49-52.
- Sun G, Wang S, Hu X, Su J, Zhang Y, Xie Y, Zhang H, Tang L, Wang JS. Co-contamination of aflatoxin B1 and fumonisin B1 in food and human dietary exposure in three areas of China. *Food Addit Contam.* 2011; 28:461-470.
- Taniwaki MH, Pitt JI, Teixeira AA, Iamanaka BT. The source of ochratoxin A in Brazilian coffee and its formation in relation to processing methods. *Int J Food Microbiol.* 2003;82(2):173-9.
- Thompson M, Ellison SLR, Wood R; IUPAC technical report. Harmonize guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis. *Pure and Applied Chemistry.* 2002; 74(5):835-855.
- Turconi G, Guarcello M, Livieri C, Comizzoli S, Maccarini L, Castellazzi AM, et al. Evaluation of xenobiotics in human milk and ingestion by the newborn - an epidemiological survey in Lombardy (Northern Italy). *European Journal of Nutrition.* 2004;43(4):191-7.
- Turner PC, Collinson AC, Cheung YB, Gong Y, Hall AJ, Prentice AM, et al. Aflatoxin exposure in utero causes growth faltering in Gambian infants. *International Journal of Epidemiology.* 2007;36(5):1119-25.

- Vieira AP, Badiale-Furlong E, Oliviera LM. Ocorrência de micotoxinas e características físico-químicas em farinhas comerciais. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. 1999; 19(2).
- Villa P, Markaki P. Aflatoxin B1 and ochratoxin A in breakfast cereals from Athens market: occurrence and risk assessment. *Food Control*. 2009;20(5):455-461.
- Wang H, Zhou X-J, Liu Y-Q, Yang H-M, Guo Q-L. Simultaneous determination of chloramphenicol and aflatoxin M-1 residues in milk by triple quadrupole liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Agric Food Chem*. 2011;59(8):3532-8.
- Wei CI, Hsieh DPH. Characterization of water-soluble glucoronide and sulphate conjugates of aflatoxin B1 – studies in primary cultures of rat hepatocytes. *Food and Chemical Toxicology*. 1984; 23(9):821-825.
- Wild CP, Turner PC. The toxicology of aflatoxins as a basis for public health decisions. *Mutagenesis*. 2002;17(6):471-81.
- Williams JH, Phillips TD, Jolly PE, Stiles JK, Jolly CM, Aggarwal D. Human aflatoxicosis in developing countries: a review of toxicology, exposure, potential health consequences, and interventions. *American Journal of Clinical Nutrition*. 2004;80(5):1106-22.
- Wogan GN, Paglialunga .S. Carcinogenicity of synthetic aflatoxin-m1 in rats. *Food Cosmet Toxicol*. 1974;12(3): 381-4.
- World Health Organization (WHO). Principles for evaluating health risks in children associated with exposure to chemicals (Environmental health criteria; 237). Geneva: World Health Organization Publications; 2006.
- World Health Organization (WHO). WHO technical report series. Evaluation of certain food additives and contaminants. Forty-ninth report of the joint FAO/WHO expert committee on food additives (JECFA) [Internet]. Geneva:1999. [Acesso em 20 de maio de 2012]. Disponível em: http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_884.pdf.

ANEXO A – APROVAÇÃO DO PROJETO PELO COMITÊ DE ÉTICA



Universidade de Brasília
Faculdade de Ciências da Saúde
Comitê de Ética em Pesquisa – CEP/FS

PROCESSO DE ANÁLISE DE PROJETO DE PESQUISA

Registro do Projeto no CEP: **027/11**

Título do Projeto: “Avaliação da exposição de crianças à micotoxinas e metais pesados através do consumo de leite materno”.

Pesquisadora Responsável: Patrícia Diniz Andrade

Data de Entrada: 01/04/11

Com base na Resolução 196/96, do CNS/MS, que regulamenta a ética em pesquisa com seres humanos, o Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília, após análise dos aspectos éticos e do contexto técnico-científico, resolveu **APROVAR** o projeto **027/11** com o título: “Avaliação da exposição de crianças à micotoxinas e metais pesados através do consumo de leite materno”, analisado na 3ª Reunião Ordinária, realizada no dia 12 de abril de 2011.

A pesquisadora responsável fica, desde já, notificada da obrigatoriedade da apresentação de um relatório semestral e relatório final sucinto e objetivo sobre o desenvolvimento do Projeto, no prazo de 1 (um) ano a contar da presente data (item VII.13 da Resolução 196/96).

Brasília, 13 de abril de 2011.


Prof. Natan Monsore
Coordenador do CEP-FS/UnB

HRS											
	Sobradinho	24	3	3	3	3	3	3	2	2	2
HRP											
	Planaltina	24	3	2	3	2	3	2	3	3	3
HRBZ											
	Brazlândia	24	3	3	3	3	2	3	2	3	2
HRG											
	Gama	24	2	3	2	3	3	3	3	2	3
HRSM											
	Santa Maria	24	2	3	3	3	2	2	3	3	3
HRPA											
	Paranoá	24	2	2	2	3	3	3	3	3	3
	São Sebastião	12	2	2	2	1	1	1	1	1	1

APÊNDICE B – CONVITE PARA PARTICIPAÇÃO EM PESQUISA

As micotoxinas são substâncias produzidas por fungos e que podem estar presentes naturalmente em diversos alimentos que consumimos, podendo ser transferidas para o leite materno. Desta maneira, gostaríamos de convidá-la a participar desta pesquisa que tem como objetivo analisar a presença de micotoxinas nas amostras de leite materno.

APÊNDICE C – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidada a participar de uma pesquisa realizada na Universidade de Brasília em parceria com a Rede de Bancos de Leite do Distrito Federal. O objetivo deste estudo é avaliar a presença de micotoxinas e metais no leite materno.

A participação no estudo inclui o consentimento da doação de parte de uma amostra de leite coletada para a Rede de Banco de Leite do Distrito Federal e o fornecimento de dados tais como: idade, data do parto, data da coleta da amostra e endereço. O material coletado durante a pesquisa ficará sob a responsabilidade de Patrícia Diniz Andrade, no Laboratório de Toxicologia da Universidade de Brasília.

Os resultados obtidos auxiliarão no desenvolvimento de ações preventivas relacionadas ao controle da presença destas substâncias nos alimentos e serão publicados em artigos científicos.

- **O presente trabalho não representa nenhum risco à sua saúde.**
- **Sua participação será sigilosa, ou seja, em nenhum momento da pesquisa seu nome será divulgado.**
- **Você poderá optar por não fornecer algum dado solicitado;**
- **Sua participação não é obrigatória, podendo desistir de participar da pesquisa a qualquer momento.**

Você receberá uma cópia deste termo onde consta o telefone da pesquisadora principal e do Comitê de Ética em Pesquisa, podendo tirar suas dúvidas sobre o projeto e sua participação, agora ou a qualquer momento.

Caso você concorde em participar, favor assinar o termo de consentimento abaixo.

Declaro que entendi os objetivos, riscos e benefícios de minha participação na pesquisa e concordo em participar.

Nome da voluntária:

Data: ____/____/____

Na última semana, você consumiu amendoim, paçoca ou outros produtos de amendoim? ____ Sim ____ Não

Na última semana, você consumiu castanha-do-pará ou outros produtos derivados da castanha? ____ Sim ____ Não

Assinatura:

Nome da pesquisadora responsável: Patrícia Diniz Andrade

Assinatura:

Contatos: Patrícia Diniz Andrade - 0XX61 – 31072117/82270751 ou no Laboratório de Toxicologia da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

Comitê de Ética em Pesquisas com Seres Humanos na UnB – 0XX61-31071947