



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Maria de Sanjosé Morais Pinto Cardoso

Determinação de Aflatoxina M₁
em Leite Materno - Exposição
Materna e dos lactentes

Dissertação no âmbito do Mestrado em Segurança Alimentar,
orientada pela Professora Doutora Angelina Simões Pena e
co-orientada pela Professora Doutora Sofia Cancela
Duarte e apresentada à Faculdade de Farmácia
da Universidade de Coimbra.

Junho de 2019



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

**DETERMINAÇÃO DE AFLATOXINA M1 EM LEITE MATERNO - EXPOSIÇÃO
MATERNA E DOS LACTENTES.**

Maria de Sanjosé Morais Pinto Cardoso

Dissertação no âmbito do Mestrado em Segurança Alimentar, orientada pela Professora Doutora Angelina Simões Pena e co-orientada pela Professora Doutora Sofia Cancela Duarte e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra.

Junho de 2019

Agradecimentos

Gostaria de manifestar a minha mais profunda gratidão àqueles que, de uma forma direta ou indireta, cooperaram na realização deste trabalho, disponibilizando meios materiais, saber e encorajamento e em especial a todas as mães que contribuíram para a realização da dissertação.

Aos Srs Dr. Manuel Salgado e Dr. José Torres, o meu agradecimento por toda a disponibilidade e apoio na recolha de amostras de leite de mães lactantes. Sem o seu apoio, não teria sido possível a realização da dissertação.

À Tia Mané o meu agradecimento por toda a simpatia e disponibilidade demonstradas para recolher amostras de leite junto das mães lactantes.

À Sra. Professora Doutora Angelina Pena, quero manifestar o meu agradecimento por toda a disponibilidade, apoio, simpatia, interesse e incentivo demonstrados e ainda pelos ensinamentos e sugestões que disponibilizou e apoio na dissertação.

À Sra. Professora Doutora Sofia Duarte, orientadora científica, quero expressar o meu profundo reconhecimento pela sua inteira disponibilidade em compartilhar os seus conhecimentos e experiência, pelo incentivo constante, pelo entusiasmo com que sempre apoiou o trabalho realizado e pela grande amizade e apoio incondicional que sempre manifestou, a minha sincera estima e gratidão.

À minha família, pelo apoio e incentivo constante.

Resumo

As micotoxinas são metabólitos secundários de fungos que têm efeitos tóxicos em humanos e animais. A aflatoxina M1 (AFM1), que pode ser transmitida aos recém-nascidos através do leite materno, é um metabólito hidrolisado da Aflatoxina B1 (AFB1) que é ingerido junto com alimentos contaminados. A AFM1 é classificada como “agente carcinogénico para humanos” (grupo I IARC). Apesar do risco potencial de AFM1 para bebés amamentados, há uma falta de estudos de avaliação de exposição na Europa e uma completa ausência de relatos em Portugal. O presente estudo teve como objetivo determinar a ocorrência de AFM1 no leite materno e o grau de exposição de lactentes a esta toxina. A correlação entre a concentração de AFM1 e os fatores sociodemográficos básicos e o consumo de certas categorias de alimentos também foram determinadas. Assim, foram recolhidas 37 amostras de leite de mães a amamentar que vivem em Portugal, entre 2015 e 2016, e analisadas utilizando um *kit* ELISA comercial competitivo, a fim de determinar a presença de AFM1. Nove amostras (24,3%) continham níveis de AFM1 acima do limite de deteção (5 ng/L), variando entre 5,4 e 10,6 ng/L ($7,8 \pm 2,1$ ng/L). No padrão de exposição observado, as amostras de leite positivas para AFM1 foram associadas à colheita de verão, menor escolaridade materna, fase inicial de lactação e consumo materno de arroz e chocolate. Nenhum outro determinante estudado, seja sociodemográfico (idade, peso, altura, número de filhos, características do aleitamento materno, peso dos bebés) ou dieta (frequência de consumo alimentar), apresentou influência estatística significativa. A avaliação da ingestão diária estimada de AFM1 (EDI) revelou uma exposição dietética média infantil ao AFM1 de 0,92 ng/kg peso corporal/dia. Assim, os resultados deste estudo sugerem a necessidade de reforçar a vigilância da ocorrência de AFB1 nos alimentos, como medida de proteção e controlo, não apenas para adultos, mas, em última análise, para lactentes expostos através do leite materno. Embora o AFM1 apresente uma potência carcinogénica inferior, vale ressaltar que, quando comparados aos adultos, os lactentes apresentam menor capacidade de biotransformação de carcinógenos, dieta bastante restrita e maior consumo em relação ao peso corporal.

Palavras-Chave: Aflatoxina B1; Aflatoxina M1; Leite Materno; Exposição; Bebés.

Abstract

Mycotoxins are secondary metabolites of fungi that have toxic effects on both humans and animals. Aflatoxin M1 (AFM1) which can be transmitted to newborns via breast milk, is a hydrolyzed metabolite of Aflatoxin B1 (AFB1) that is ingested along with contaminated food. AFM1 is classified as “carcinogenic agent for Human” (group I IARC). Despite the potential hazard of AFM1 to breastfed babies, there is a lack of studies of exposure evaluation in Europe and a complete absence of reports in Portugal.

The present study aimed to determine the occurrence of AFM1 in maternal milk and the degree of exposure of infants to this toxin. The correlation between the concentration of AFM1 and basic sociodemographic factors and the consumption of certain categories of food was also aimed. Thus 37 milk samples from nursing mothers living in Portugal were collected, between 2015 and 2016, and analyzed using a competitive commercial ELISA kit, in order to determine the presence of AFM1. Nine samples (24.3%) contained levels of AFM1 above the detection limit (5 ng/L), ranging between 5.4 to 10.6 ng/L (7.8 ± 2.1 ng/L).

In the observed exposure pattern, AFM1-positive milk samples were associated with summer collection, lower mother's educational level, early lactation phase and the maternal consumption of rice and chocolate. No other studied determinants, whether sociodemographic (age, weight, height, number of children, characteristics of breastfeeding, the infants' weight) or dietary (frequency of food consumption) showed a significant statistical influence. Assessment of AFM1 estimated daily intake (EDI) revealed a estimated infant average dietary exposure to AFM1 of 0.92 ng/kg bw/day.

Thus the results of this study suggest the need to reinforce surveillance of AFB1 occurrence in food, as a protective and control measure, not only for adults, but ultimately for lactating infants exposed through maternal breast milk. Although AFM1 presents an inferior carcinogenic potency, it is noteworthy that when compared with adults, infants feature a lower capacity of carcinogen biotransformation, a fairly restricted diet and a higher consumption in relation to body weight.

Keywords: *Aflatoxina B1; Aflatoxina M1; Breast Milk; Exposure; Infants.*

Lista de Publicações

No âmbito dos trabalhos conducentes à presente dissertação, foram publicados e apresentadas os resultados, das seguintes formas:

Bogalho F., Duarte S., Cardoso M., Almeida A., Cabeças R., Lino C., Pena A. Exposure assessment of Portuguese infants to Aflatoxin M1 in breast milk and maternal social-demographical and food consumption determinants. *Food Control*. 90 (2018) 140-145. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.02.043>. Factor de impacto 3,496 (2017 Journal Citation Reports).

Pena A., Cardoso M., Duarte S., Almeida A., Falcão A., Rocha H., Lino C. Aflatoxin M1 in human breast milk in Portugal: estimation of maternal and infant exposure. (*Comunicação oral*). International Conference on Occupational & Environmental Toxicology 2016. (Biblioteca Municipal Almeida Garrett, Porto, 21-23 de junho de 2016).

Bogalho F., Duarte S., Cardoso M., Almeida A., Cabeças R., Lino L., Pena A. (*Comunicação em painel*). Biomonitoring of aflatoxin M1 in human breastmilk. 1st Workshop on Human Biomonitoring in Portugal (Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa, 11 de maio de 2018).

Índice de Figuras

Fig. 1 - Estrutura Química da AFBI e AFMI	10
Fig. 2 - Exposição das mães e lactentes a alimentos contaminados com aflatoxinas.....	11
Fig. 3 - Biotransformation da aflatoxin BI	12
Fig. 4 - Metabolismo da AFBI e AFMI	14
Fig. 5 - Biotransformação da Aflatoxina BI após exposição pela via alimentar.....	18

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Toxicidade de <i>A. Flavus</i>	8
Tabela 2 - Condições ótimas de desenvolvimento de <i>A. Flavus</i>	8
Tabela 3 - Condições ótimas de desenvolvimento de <i>Aflatoxina</i>	9
Tabela 4 - Ocorrência de AFBI por alimento e por País (modificado de Rushinga Blake, 2019).....	20
Tabela 5 - Ocorrência e nível de incidência de AFI em alimentos.....	20
Tabela 6 - Ocorrência de Aflatoxina em alimentos para animais na Europa (Adaptada de Streit <i>et al.</i> , 2012).....	21
Tabela 7 - Ocorrência de AFMI em leite no mundo (Adaptada de Iqbal, 2015).....	22
Tabela 8 - Teor máximo de AFBI e AFMI em alimentos para consumo humano e animal (Regulamento (CE) nº 1881/2006 da Comissão, de 19 de Dezembro de 2006).....	26
Tabela 9 - Características sociais e demográficas das mães participantes.....	34
Tabela 10 - Ocorrência e teores de AFMI em amostras de leite materno de acordo com estudos recentes.....	37

Lista de Abreviaturas e Símbolos

AFBI – Aflatoxina B1

AFM1 – Aflatoxina M1

AFs – Aflatoxinas

ALARA – As Low as Reasonably Achievable

ATA – Aleucia tóxica alimentar

CAC – Codex Alimentarius Commission

CDC – Center for Disease Control and Prevention

EDI – Estimated Daily Intake

EDI – Estimated Daily Intake

EFSA – European Food Safety Authority

ELISA – Enzyme Linked Immunosorbent Assay

FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations

FDA (US) – Food and Drug Administration

IARC – International Agency for research on cancer

HPLC-FD – High Performance Liquid Chromatography coupled to Fluorescence Detection

INFOSAN – International Food Safety Authorities Network

JECFA – Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives

LC-MS/MS – Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry

LOD – Limit of detection

ML – Maximum level

n.a. – non-applicable

PRAMS – Pregnancy Risk Assessment Monitoring System

TDI – Tolerable Daily Intake

TLC – Thin Layer Chromatography

WHO – World Health Organization

Índice

Agradecimentos.....	i
Resumo.....	ii
Abstract.....	iii
Lista de Publicações.....	iv
Índice de Figuras.....	v
Índice de Tabelas.....	vi
Lista de Abreviaturas e Símbolos.....	vii
PARTE I - Revisão Bibliográfica	
1. Introdução.....	3
2. As aflatoxinas e os fungos aflatoxigênicos.....	5
3. Caracterização Química e Biotransformação da aflatoxina B1.....	10
4. Toxicidade das Aflatoxinas.....	14
5. Ocorrência de Aflatoxinas em alimentos destinados ao consumo humano e animal.....	19
5.1. Ocorrência em alimentos destinados ao consumo humano.....	19
5.2. Ocorrência em alimentos e ingredientes para consumo animal.....	21
5.3. Ocorrência de AFMI em Leite.....	21
6. Métodos Analíticos de determinação de AFMI em Leite.....	23
7. Enquadramento Legal.....	25
PARTE II - Experimental	
1. Justificação e objetivos do estudo.....	29
2. Material e Métodos.....	30
2.1. Amostragem.....	30
2.2. Dados socio-demográficos.....	31
2.3. Hábitos alimentares.....	31
2.4. Determinação de AFMI.....	31
2.5. Ingestão diária estimada.....	32
2.6. Análise estatística.....	33
3. Resultados e Discussão.....	33
3.1. Determinação de AFMI.....	33
3.2. Ingestão diária estimada de AFMI.....	38
4. Conclusão.....	40
5. Referências Bibliográficas.....	41
ANEXOS	68
ANEXO 1: Termo de consentimento.....	69
ANEXO 2: Questionário Sócio-demográfico.....	70
ANEXO 3: Questionário alimentar.....	71

PARTE I- Revisão Bibliográfica

1. Introdução

A contaminação de alimentos e rações com Aflatoxinas (AF), uma das micotoxinas mais estudada em microbiologia alimentar, atraem a atenção mundial devido ao impacto negativo na saúde, na economia, na disponibilidade de alimentos (food security) e no mercado global (Stoeve, 2013; Bhat *et al.*, 2010; Patchimapon Udomkun *et al.* 2017; Creppy EE 2002). Estima-se que mais de 25% da produção agrícola mundial se encontra contaminada com Micotoxinas (FAO 2002 Minimizing risks posed by mycotoxins, FAO2004, FAO 2011; S. Marin *et al.*, 2013). Cerca de 4.5 bilhões de pessoas no mundo, estão expostos a estes contaminantes naturais provenientes da dieta alimentar, nos países em via de desenvolvimento e com especial relevância, nos continentes Asiático e Africano (FAO database; Amy McMillan *et al.*, 2018; LIU Y *et al.*, 2016; F. Raad *et al.*, 2014; Gnonlonfin *et al.*, 2013; FDA- Bad Bug Book, 2012; CDC; FAO-Food and Nutrition Paper, 81. 2011). Apesar da maior incidência em zonas quentes e húmidas, a globalização do comércio mundial e o aumento global da temperatura, contribuem para a sua ocorrência a nível mundial. De acordo com o Annual Report do Rapid Alert System for Food and Feed (RASFF), em 2016 na Europa, foram reportadas 632 notificações para micotoxinas das quais 84% correspondem a Aflatoxinas detetadas em nozes e sementes, provenientes de países não membros da Comunidade.

O termo Aflatoxina provém das palavras *Aspergillus flavus* e toxina. É produzida por fungos filamentosos do género *Aspergillus* que se encontram em especial, em zonas quentes e húmidas (EFSA 2007; JECFA 2016). Entre os 18 tipos de aflatoxinas identificadas até à data, as Aflatoxinas que ocorrem naturalmente são quatro: AFB1, AFB2, AFG1 e AFG2. As aflatoxinas B1 e B2 (AFB1 e AFB2) receberam esse nome devido à sua forte fluorescência azul sob a influencia da radiação ultravioleta, enquanto que as aflatoxinas G1 e G2 (AFG1 e AFG2) emitem fluorescência amarelo esverdeado (Thomas W. Kensler *et al.*, 2011).

Desde a sua descoberta há 50 anos, que as aflatoxinas são reconhecidas como contaminantes ubíquos da cadeia alimentar em particular, nos países em vias de desenvolvimento, na África subsariana e na China. As características ambientais dessas zonas do globo favorecem a colonização das culturas por fungos, e a falta de Boas Práticas de Agricultura e de armazenamento, favorecem a posterior síntese de Aflatoxinas (FAO2007).

As consequências adversas destas toxinas nas populações são muito variadas, com exposições que podem ter efeitos agudos incluindo a morte, ou efeitos crónicos como os carcinomas hepatocelulares (IARC 2012). Para populações infetadas com o vírus da hepatite B e C, a exposição a Aflatoxinas aumenta exponencialmente o risco de desenvolvimento de

cancro do fígado o que ilustra os efeitos nefastos e sinérgicos desta toxina, mesmo quando ingerida em baixas concentrações (IARC2012; Thomas W. Kensler, *et al.*, 2011). De todas as aflatoxinas, a AFB1, é a mais comum e considerada o carcinogénico natural mais potente que se conhece. A Agência Internacional de Pesquisa contra o cancro (IARC), considera que há evidência científica suficiente, para classificar a AFB1 como carcinogénica para o homem (Grau1) (JECFA 2016; Monografia IARC).

Dada a sua importância, foi criada legislação e definidos limites máximos por produto, contudo, encontra-se atualmente comprovado que mesmo para concentrações de Aflatoxina consideradas não tóxicas, em co-ocorrência, com outras micotoxinas, são observados efeitos tóxicos (Wan, Turner & El-Nezami, 2013). A co-ocorrência de micotoxinas, acontece devido a 3 principais razões: as culturas podem ser infetadas por diferentes estirpes de fungos da mesma espécie; fungos de uma mesma espécie podem produzir micotoxinas diferentes; a composição final do género alimentício pode ser uma mistura de vários lotes de diferentes origens. Vários estudos evidenciam que 75%-100% das amostras testadas contêm mais do que uma micotoxina, o que pode aumentar o risco para a saúde humana e animal, mesmo em doses consideradas seguras (Streit E *et al.*, 2012).

A ocorrência de Aflatoxinas na cadeia agroalimentar é inevitável sendo que, a contaminação pode acontecer em qualquer etapa da cadeia de fornecimento (FDA). Como são muito estáveis e tolerantes a altas temperaturas (80 a 120°C), não são normalmente destruídas por processos de transformação industriais como a extrusão, cozedura e ou pasteurização (S. Marin *et al.*, 2013).

A exposição humana a este tipo de contaminantes pode ocorrer diretamente da ingestão de alimentos como os cereais, especiarias, arroz, milho, amendoins, nozes e frutos secos que se encontram contaminados com AFB1 (F. Sempere Ferre, 2016; Gems-Food Contaminat database; Xiaoxia Ding *et al.*, 2012; Williams JH *et al.*, 2004; Sirot.V. 2013; S.Marin *et al.*, 2013; F. Raad *et al.*, 2014; A.V. Jager, 2013; Sara C. Cunha 2018) ou indiretamente, através do consumo de produtos de origem animal como por exemplo, os ovos e o leite, que se encontram contaminados com Aflatoxina M1 (AFM1) (S.Z. Iqbal *et al.*, 2015; TOMASEVI Igor 2015; S.C. Duarte *et al.*, 2013; Nemat Mahboob *et al.*, 2010; Fallah Aziz A 2010).

A exposição de recém-nascidos e bebés à Aflatoxina M1, ocorre após ingestão de alimentos contaminados por AFB1 pelas mães lactantes (Cantú-Cornelio F. *et al.*, 2016; Oloyede Adejumo *et al.*, 2013; Farajollah Maleki *et al.*, 2015; Afshar P. *et al.*, 2013). A AFB1 é metabolizada no fígado, resultando na formação de vários metabolitos como a AFM1, AFM2, AFM4, sendo a AFM1, a que tem maior impacto na saúde pública, dada a baixa concentração

em que normalmente se encontram os restantes metabolitos (EFSA2004). A aflatoxina M1, metabolito secundário da AFBI, apesar de menos tóxica, é classificada pelo IARC como potencial carcinogénico (grau 2B) (JECFA 2016; Monografia IARC).

As crianças e recém-nascidos, apresentam maior suscetibilidade aos efeitos adversos das aflatoxinas, porque têm menor peso, menor capacidade de desintoxicação e incompleto desenvolvimento de alguns dos seus órgãos e tecidos, como o sistema nervoso central. Sendo o leite o alimento mais consumido por recém-nascidos e crianças, a qualidade e a segurança alimentar dos alimentos ingeridos por mães ou fêmeas lactantes, tornou-se determinante para salvaguardar a sua saúde e mitigar o risco de desenvolvimento de doenças crónicas no futuro.

Este trabalho teve como objetivo avaliar a exposição de recém-nascidos e bebés à aflatoxina M1 proveniente da ingestão do leite materno e avaliar os determinantes sociodemográficos e de consumo alimentar das mães lactantes em Portugal.

2. As aflatoxinas e os fungos aflatoxigénicos

O poder patogénico de certos fungos, em produtos agrícolas, é conhecido desde a idade média. As crónicas europeias relatam epidemias misteriosas chamadas “Fogo de St António”, que conduziram a milhares de mortes na época, provocadas pela ingestão de farinha de centeio infetado com um fungo do género *Claviceps*. Hoje em dia, casos tão dramáticos são raros, contudo, nos países subdesenvolvidos, ainda ocorrem surtos de Aflatoxicoses (doença provocada pela ingestão de aflatoxinas) em humanos. Um dos maiores surtos ocorreu entre 2004 e 2005, no Quénia, tendo sido registados 317 casos e 125 mortes. O milho, ingrediente associado a esta aflatoxicose, tinha sido produzido pela população e tinha concentrações médias de AF de 354 ng/g sendo que 7% das amostras tinham níveis de Aflatoxina superiores a 1000 ng/g (Lauren Lewis, *et al.*, 2005; CDC). Anteriormente, em 1974 na Índia, foram afetadas 397 pessoas, apresentando sintomatologia febril, icterícia, dores e vómitos, tendo-se registado a morte de cerca de 108 indivíduos. O milho, componente maioritário da dieta, terá sido a principal fonte de contaminação por ingestão de concentrações de aflatoxina entre os 2 e 6 mg durante um mês (Krishnamachari KA, Bhat RV, Nagarajan V, Tilak TB 1975).

Existe um vastíssimo número de espécies de fungos (mais de 90000 já descritas) as quais possuem características muito diversas. Desempenham um papel importante na vida do homem, quer de uma maneira benéfica, quer de um modo prejudicial (Max Schubert *et al.*, 2018). Podem ser potencialmente nocivos para o Homem, plantas e animais, contudo,

algumas espécies de *Aspergillus* são usadas em biotecnologia para produção de metabolitos como antibióticos, ácidos orgânicos, fármacos, enzimas alimentares ou agentes de fermentação (Samson *et al.*, 2014; Max Schubert *et al.*, 2018; Meareg G. Amare, Nancy P. Keller 2014).

Fungos do género *Aspergillus* são ubiqüitários, saprófitas e encontram-se no solo em diferentes habitats a nível mundial. Morfológicamente, podem ser facilmente distinguidos pela formação de uma cor amarelo esverdeada quando em culturas agar de extrato de malte sendo atualmente conhecidas, 339 espécies do género *Aspergillus* (Max Schubert *et al.*, 2018; Samson *et al.*, 2014). Uma das espécies, o *A. Flavus*, apesar de conhecido desde 1809, tornou-se motivo de estudo em 1962 como resultado da doença dos perus que matou 100.000 perus e 14.000 patos em Inglaterra sem razão aparente. Esta doença inexplicável ficou posteriormente conhecida por Doença X dos Perus. Investigações subseqüentes levaram ao isolamento do fungo *Aspergillus flavus* no ingrediente amendoim, existente nas rações (FDA – Bad Bug Book - 2016).

As infeções dos produtos agroalimentares por fungos do género *Aspergillus*, não só reduzem o valor nutritivo do alimento, como também conduzem ao aparecimento de vários metabolitos tóxicos que, em condições de humidade e temperatura favoráveis, favorecem a síntese de aflatoxinas (Stoeve 2013; Qifang Wu, Lijuan Xie, Huirong Xu, 2018; Abbas *et al.*, 2017; Abas *et al.*, 2009; Ahmad and Iram, 2008). As AFs são produzidas por fungos filamentosos do género *Aspergillus* que se encontram em especial, em zonas quentes e húmidas (Doris Klingelhofer *et al.*, 2018; EFSA 2007; Flores-Flores *et al.*, 2015; JECFA 2016). Os fungos do género *Aspergillus* são normalmente considerados fungos de armazenamento, porque não infetam em situação normal, as culturas antes da colheita. Contudo, espécies como o *Aspergillus flavus* podem produzir uma grande quantidade de esporos que podem disseminar-se no ar e germinar quando colonizam substratos em condições favoráveis (Phuong-Anh Nguyen, *et al.*, 2017; Bennett, 2010); podem infetar as culturas e produzir aflatoxinas no campo (Storm *et al.*, 2008) em anos de calor com temperaturas superiores a 32°C, humidades elevadas (>80%), ou durante períodos de seca (De Wolf *et al.*, 2005; Tsitsigiannis *et al.*, 2012). Estudos recentes evidenciam contaminações de milho por aflatoxinas, ocorridas em Itália entre 2009 e 2011 devidas às condições climáticas de altas temperaturas e de baixa pluviosidade durante as culturas. Nas etapas de transporte e armazenamento, são as temperaturas e humidades elevadas que favorecem a colonização por fungos e a síntese de Aflatoxina (Paul W. Kachapulula, *et al.*, 2017). Os danos provocados por insetos ou pragas podem aumentar a predisposição para o ataque destes fungos (I. M. Ogunade 2017).

As espécies de fungos mais frequentes são os *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* sendo o *A. flavus* e em menor extensão *A. parasiticus* e *A. nomius*, os responsáveis pela maioria das aflatoxinas encontradas nos produtos agroalimentares (Cotty *et al.*, 2008; Probst *et al.*, 2010). O milho, os amendoins, cereais, arroz, nozes e frutos secos, estão expostos a colonização por *A. Flavus* capazes de sintetizar aflatoxinas B1 (AFB1) e B2 AFB2 enquanto que, fungos como o *A. Parasiticus* produzem AFB1, AFB2, AFG1 e AFG2. O *A. Flavus* e o *A. Parasiticus* são também considerados os fungos patogênicos de maior prevalência nas rações, a nível mundial (Victoria Bernáldez *et al.*, 2018; Henry E. Iheanacho *et al.*, 2014; Abbas HK, Zablutowicz RM and Bruns HA, 2008; Huahui Lan a 2018). Sabe-se que a colonização por fungos e consequente síntese de aflatoxina são influenciadas por uma série de fatores como a atividade da água (aw), temperatura (T), substrato e pH, sendo que a disponibilidade de água e a temperatura, são os fatores mais importantes e os que mais contribuem para a germinação e crescimento de fungos. Sabe-se ainda que a probabilidade de contaminação por Aflatoxina aumenta com a densidade de *Aspergillus* no solo (E.S. Monyo *et al.*, 2012) e que substratos como os cereais, sementes oleaginosas, nozes e especiarias são extremamente favoráveis ao desenvolvimento de fungos e posterior síntese de aflatoxina (Antonia Gallo, *et al.*, 2016; Laila Aldars-Garcia, *et al.*, 2016; Schmidt-Heydt, Abdel-Hadi, Magan, & Geisen, 2009).

Vários estudos têm sido conduzidos para investigar os fatores que promovem o desenvolvimento de fungos da espécie *Aspergillus* e a síntese de aflatoxina em diferentes matrizes alimentares sendo que, os dados de diferentes autores evidenciam que a temperatura, a atividade da água, a implementação de Boas Práticas Agrícolas e Boas práticas de armazenamento, estão entre os principais fatores que influenciam e minimizam o desenvolvimento de fungos toxicogênicos e ocorrência de aflatoxinas. Nem todas as estirpes dos fungos são toxicogênicas, no entanto, de acordo com a literatura consultada, cerca de metade dos isolados de *A. flavus* são aflatoxigênicos e produzem aflatoxina: Tabela I (I. M. Ogunade 2017; Jolanta Wawrzyniak, Agnieszka Waskiewicz, Antoni Ryniecki 2018; Angel Medina *et al.*, 2017). No geral, temperaturas de armazenamento e humidades relativas do ar superiores a 25°C e 75%, respetivamente, e valores de atividade da água superiores a 0,85, estão entre os principais fatores que promovem a colonização dos produtos agroalimentares por fungos e a posterior síntese de aflatoxinas (GTP- Good Trading Practices, 2016; FAO 2000).

Tabela 1 - Toxicidade de *A. Flavus*

País	Alimento	% <i>A. Flavus</i> Toxicogénico	Referência
Malásia	Amendoim	59%	M. Norliaa <i>et al.</i> Polyphasic (2018)
Nigéria e Gana	Milho	59%	Giancarlo Perrone <i>et al.</i> (2014)
Brasil	Arroz	17%	Aline M. Katsurayamaa <i>et al.</i> (2018)
Brasil	Nozes	26.5%	Baquião <i>et al.</i> (2013)

Os resultados dos estudos desenvolvidos até ao momento, revelam que a atividade da água e a temperatura, têm uma influência determinante na regulação dos genes envolvidos no crescimento de *A. flavus* e na síntese das aflatoxinas (Fuguo Xing *et al.*, 2017; Xiao Liu *et al.*, 2017; Bhat *et al.*, 2010). A atividade da água é destacada como um dos parâmetros que influenciam o crescimento de fungos e produção de micotoxinas sendo que a maioria dos fungos toxicogénicos se podem desenvolver para valores de a_w de 0,85 e numa gama de temperaturas muito alargada 12 a 40°C. O valor mínimo de a_w para o *Aspergillus flavus* é de 0,85 mas podem ter um crescimento ótimo para valores de a_w entre 0.93–0.98 e para intervalos de temperatura situados entre os 25 e 40°C (Laila Aldars-Garcia, *et al.*, 2016; Xiao Liu *et al.*, 2017; Ifeoluwa Adekoya *et al.*, 2018; Sweeney & Dobson, 1998).

Na Tabela 2 encontram-se resumidas as condições que favorecem a colonização por fungos de diversas matrizes alimentares.

Tabela 2 - Condições ótimas de desenvolvimento de *A. Flavus*

Alimento	Temperatura	Atividade da água	Referência
Pimenta preta	30-35°C 11-16 *	0.71-0.76*	Pratheeba Yogendrarajah, <i>et al.</i> (2015)
Queijo Cheddar	33°C		<i>Encyclopedia of Dairy Sciences (Second Edition)</i> , (2011)
Sorgo	25-37°C	0.97-0.99	Amani Lahouar, <i>et al.</i> (2016)
Arroz	37°C		Najeeb S. Al-Zoreky, (2017)
Amêndoas	37°C		Antonia Gallo, <i>et al.</i> (2016)

*temperaturas e a_w mínimas

As espécies *Aspergillus*, são intolerantes a níveis baixos de oxigénio e de pH (Pahlow *et al.*, 2003; I. M. Ogunade 2017) o que conduz a que durante o armazenamento os fungos sejam encontrados nas camadas superiores e pouco compactadas e, portanto, com uma superfície de maior contacto com oxigénio.

Os mecanismos moleculares de produção de aflatoxinas atraem a atenção global na medida em que será necessário perceber o processo de biossíntese para assegurar a adequação e implementação de medidas de controlo que possam mitigar o risco de saúde pública. Vários estudos foram desenvolvidos no sentido de elucidar o processo de biossíntese da aflatoxina em laboratório, contudo, a forma como os fatores ambientais afetam a biossíntese da aflatoxina, ainda permanece um enigma (Bin Wang *et al.*, 2017).

Os efeitos de várias combinações de temperatura e aw têm sido estudados em laboratório para determinar os mecanismos de produção de aflatoxina. Vários estudos demonstram que as temperaturas ótimas de desenvolvimento de aflatoxina por fungos como o *A. flavus* e o *A. parasiticus* são superiores a 20°C e as aw mais favoráveis para o desenvolvimento de aflatoxina se situam entre 0.82 e 0.99 (Belén Peromingo, 2016; Bin Wang *et al.*, 2017; Victoria Bernaldez *et al.*, 2017).

Tabela 3 - Condições ótimas de desenvolvimento de Aflatoxina

Alimento	Temp. ótima	Wa ótima	Referência	Observações
Amêndoas	28°C	0.96	Antonia Gallo, <i>et al.</i> (2016)	
Pimenta Preta	24-30°C		Pratheeba, <i>et al.</i> (2015)	
Sorgo	37°C e 25°C	0.97 e 0.99	Amani Lahouar, <i>et al.</i> (2016)	A síntese de aflatoxina poderia ser evitada armazenando o Sorgo com valores de aw <0.91 e não haveria produção de aflatoxina a temperaturas de 15°C.
Milho	30 37	0.99 0.91	Angel Medina, <i>et al.</i> (2017).	Aumento significativo para 37/0.91.
Milho	16 31	0.82 0.99	Pitt & Hocking, (2009)	Não houve crescimento entre 0.90 aw and 20°C.
Centeio	28°C	0.95 e 0.98	Salma Lasram, <i>et al.</i> (2016).	Após período de incubação de 5 dias.
Produtos à base de queijo	25-30°C	0.95	Rocío Casquete, (2017)	pH=5

Do ponto de vista da segurança alimentar e da análise dos dados sobre as condições que favorecem o desenvolvimento de fungos toxicogénicos, o desenvolvimento e implementação de sistemas de controlo da temperatura e wa para as atividades após colheita e armazenamento, parecem ser o melhor processo para reduzir a atividade de fungos e mitigar o risco de desenvolvimento de Aflatoxinas durante o armazenamento dos cereais, e sementes oleaginosas.

3. Caracterização Química e Biotransformação da aflatoxina B1

A Aflatoxina B1 é considerada um xenobiótico (composto estranho no organismo) e pertence ao grupo dos compostos classificados como difuranocumarinas. Conhecem-se cerca de 14 tipos de Aflatoxinas, mas as principais e as mais estudadas são a Aflatoxina B1 (AFB1), Aflatoxina B2 (AFB2), Aflatoxina G1 (AFG1), Aflatoxina G2 (AFG2) e ainda os metabolitos hidrolisados da AFB1 e AFB2, respetivamente AFM1 e AFM2. A AFB1 é considerada a mais tóxica e a mais prevalente de todas as Aflatoxinas (EFSA 2013; Kumar P. *et al.*, 2017; IARC 2012). Em particular a AFB1 é caracterizada pela fusão de um anel ciclopentanona ao anel lactona da estrutura cumarina e pela emissão de uma forte fluorescência na região do azul quando exposta a radiação ultravioleta. A AFM1 é o principal metabolito hidrolisado da AFB1 e é produzido por ativação do citocromo P450 1A2 (Fig.1). É também fluorescente emitindo uma luz azul-violeta quando sujeita a radiação UV (Marchese *et al.*, 2018).

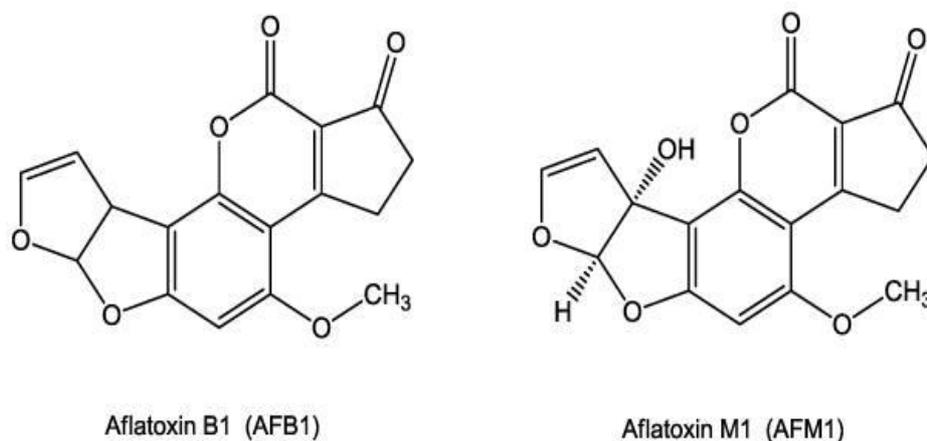


Fig. 1- Estrutura Química da AFB1 e AFM1.

A AFB1 e AFM1 têm propriedades químicas bastante semelhantes: são insolúveis em solventes não polares e pouco solúveis em água. Têm uma elevada estabilidade térmica, mesmo a altas temperaturas (>100°C), o que não permite a sua degradação/destruição após tratamentos térmicos durante o processamento alimentar. Esta propriedade, representa um obstáculo para a redução do teor de aflatoxinas nos alimentos com especial relevância no leite e produtos lácteos uma vez que a pasteurização ou outros tratamentos térmicos são pouco eficazes na redução destes contaminantes alimentares.

A exposição das mães lactantes e dos lactentes ocorre por ingestão de alimentos contaminados com AFBI (**Fig. 2**).

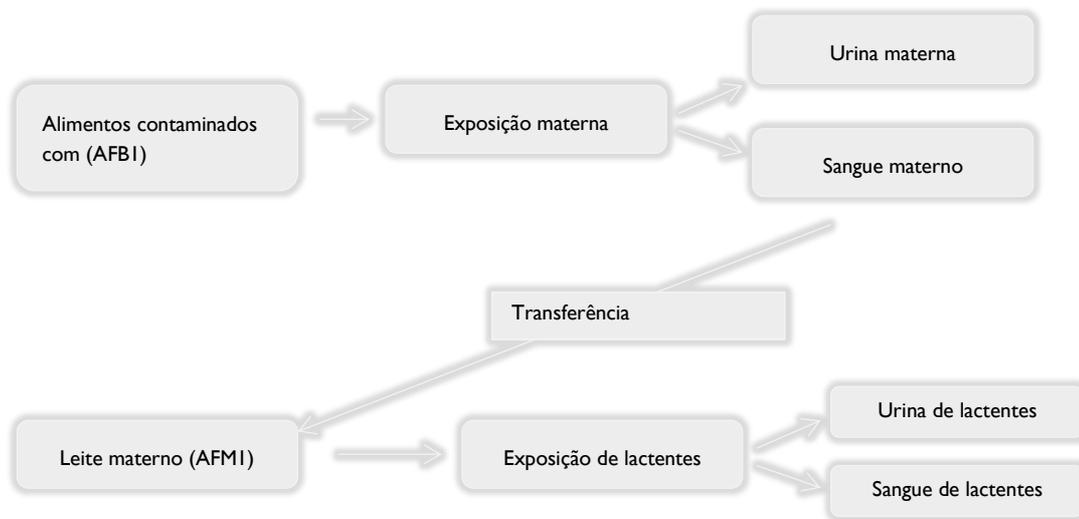


Fig. 2 - Exposição das mães e lactentes a alimentos contaminados com aflatoxinas.

Para que um xenobiótico possa ser metabolizado pelos microssomas, é necessário ser lipossolúvel, pois essa propriedade facilita a sua penetração no retículo endoplasmático e a sua ligação ao citocromo P450, principal família de enzimas responsável pela metabolização de xenobióticos (Wanwimolruk *et al.*, 2014). É devido às suas propriedades lipolíticas e à capacidade de ligação com proteínas plasmáticas que a AFBI se pode acumular no organismo após exposições crônicas ou repetidas. A absorção ocorre no trato gastrointestinal, sendo em seguida, biotransformada por enzimas hepáticas com funções de oxidases, as quais pertencem à superfamília de enzimas do sistema citocromo P-450, que participam no processo de desintoxicação da AFBI. As enzimas envolvidas no processo de biotransformação encontram-se presentes em todo o organismo (sangue, rins, pulmões, pele, tecido nervoso, intestino delgado e fígado) contudo, o fígado, é sem dúvida, o órgão vital responsável por processos de desintoxicação de xeno bióticos, infecções virais, alcoolismo, etc. (Seviora, 2012; Ingawale, 2014). A fração absorvida de AFBI que entra na circulação é extensivamente metabolizada no fígado, resultando predominantemente em aflatoxina MI (AFMI) excretada no leite, ou conjugada com ácido glicurónico e, posteriormente excretada por via biliar ou ainda na urina.

A biotransformação da AFBI, é uma etapa primordial no processo de eliminação e diminuição da sua toxicidade. A AFMI e AFQI, metabolitos provenientes da biotransformação da AFBI por hidroxilação, são compostos menos tóxicos e mais polares, o que favorece a sua solubilidade em água facilitando a rápida excreção pelas glândulas mamárias, urina ou fezes. A AFBI é biotransformada por enzimas hepáticas, levando à

formação de adutos AFB1-N7-guanina e AFB1-lisina (AFB1-Lys), entre outros compostos que podem permanecer como resíduos no fígado, tais como aflatoxina M1 (AFM1) e aflatoxicol (AFL). Os produtos de biotransformação da AFB1 podem ser utilizados como biomarcadores de exposição às aflatoxinas através da dieta (Fig - 3).

Experiências conduzidas em humanos, indicam que 95% da AFB1 e seus metabolitos são eliminados na urina em 24 horas, contudo ainda não existem estimativas para os raios de conversão da AFB1 proveniente da dieta alimentar e os resíduos de AFB1 ou dos seus metabolitos no fígado (Ramalho *et al.*, 2018). Os raios de conversão da AFB1 em resíduos de AFB1 ou dos seus metabolitos no fígado, obtidos em laboratório ou em animais produtores de leite são muito variáveis. Em porcos, o valor estimado de conversão foi de 800:1 (Ramalho *et al.*, 2018). As experiências conduzidas em humanos para determinar a quantidade de AFB1 e AFM1 excretadas na urina evidenciam que só 1.2% a 2.2% da AFB1 presente na dieta alimentar é excretada como AFM1 na urina (Romero Alessandra *et al.*, 2010) e de acordo com Zhu *et al.*, só 1.23–2.18% da AFB1 ingerida é excretada como AFM1 na urina. Segundo Zhu (1987) o coeficiente de correlação (r) entre a ingestão de AFB1 e a AFM1 na urina de uma população chinesa é de 0.65.

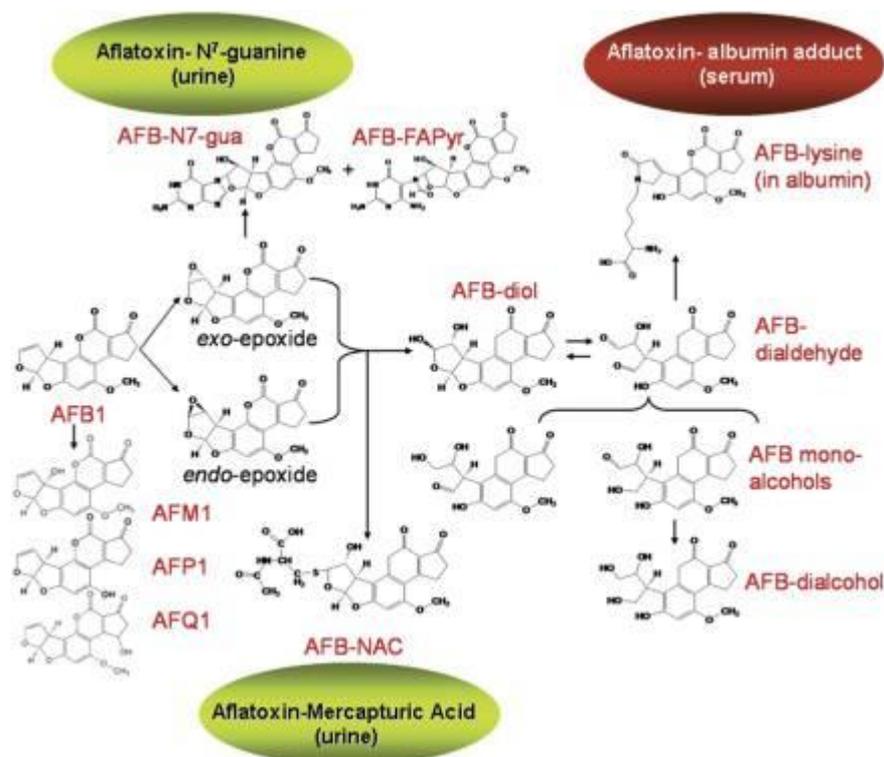


Fig. 3 - Biotransformation da aflatoxin B1.

Estudos experimentais foram conduzidos para avaliar o carry over para ruminantes e outros animais produtores de leite, contudo, não existem até ao momento estudos de transferência de AFB1 ingerida e a sua conversão para AFMI no leite materno.

Nos ruminantes, estima-se que a quantidade de AFMI excretada no leite representa, 1 a 2% da AFB1 ingerida, sendo variável de acordo com a espécie e podendo atingir os 6% no caso de vacas de intensa produção (Frazzolli et al., 2016; Britzi et al., 2013; RAHMANI et al., 2018). O carry-over, ou seja a percentagem de conversão de AFB1 em AFMI em vacas leiteiras é ainda influenciado por fatores fisiológicos e nutricionais, incluindo dieta alimentar, rácio de ingestão e de digestão, saúde do animal, capacidade de biotransformação hepática e volume de produção de leite. Isto implica que a absorção de AFs e a excreção de AFMI no leite, varia diariamente (Duarte et al., 2013). Segundo Battacone (2003, 2009, 2012), a absorção de AFB1 no trato gastrointestinal dos ruminantes é muito rápida assim como a hidrolisação e conversão em AFMI e libertação no sangue, contudo uma grande fração da AFB1 ingerida é degradada no rúmen e não entra em circulação (Frazzolli et al., 2016). Na maioria dos estudos realizados a excreção de AFMI pelas glândulas mamárias acontece entre as 12-24hr após a ingestão de alimentos contaminados com AFB1 e desaparece entre as 27-72hr após a sua interrupção na dieta. Dada a escassez de estudos em humanos, o rácio inerente à biotransformação de AFB1 para AFMI no caso dos animais poderá dar uma aproximação do que pode ser esperado para humanos.

A biotransformação, processo tão importante para a excreção de substâncias nocivas e desintoxicação do organismo, tem um lado perverso, sendo responsável pelo aparecimento de metabolitos reativos que se podem ligar às macromoléculas do organismo como o DNA e RNA podendo provocar mutações ou formação de espécies de oxigénio reativas (ROS) que provocam stress oxidativo (Macherey, 2015; Klotz, 2017). Dependendo da estrutura e do tipo de ligação, diferentes efeitos patológicos poderão ocorrer, como necrose, fibrose, mutagénese, carcinogénese e teratogénese (IARC, 2012; Carvajal Moreno 2016; Klotz, 2017). A ativação metabólica de AFB1 por epoxidação produz o composto AF-8,9-epóxido, altamente reativo, considerado o responsável pelas propriedades genotóxicas das aflatoxinas (Silvia Marchese et al., 2018; Bbosa G.S. et al., 2013; Verma R.J. 2004) (Fig. 4).

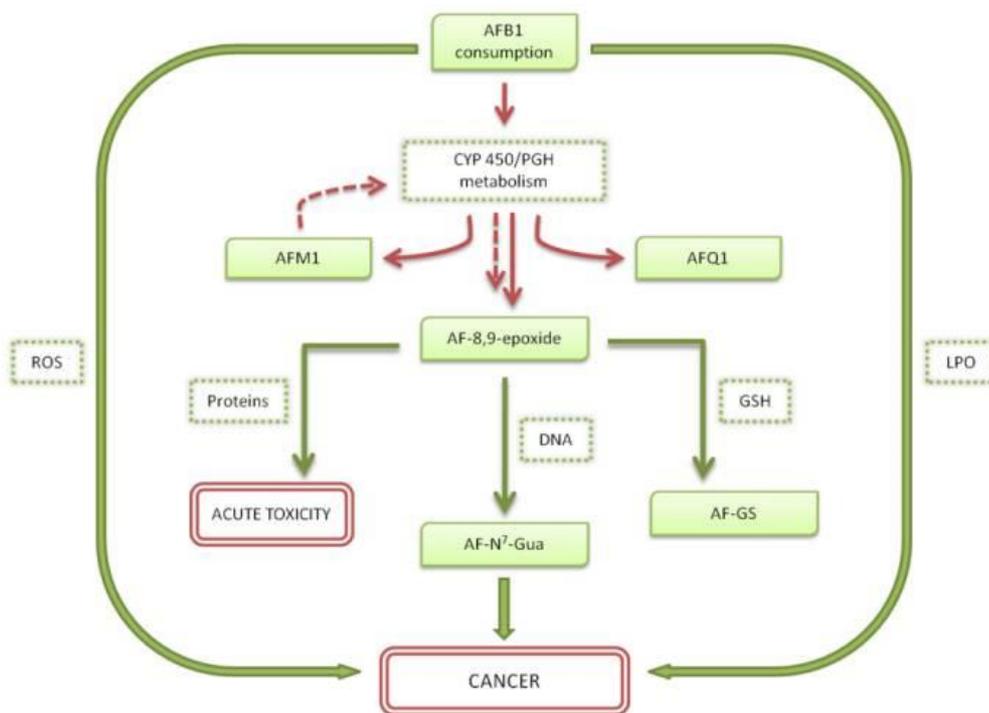


Fig. 4 - Metabolismo da AFB1 e AFM1.

O composto AF- 8,9-epóxido pode ligar-se ao DNA, formando aductos (AFBI-N7-Guanina) conduzindo a mutações do DNA ou pode conjugar-se com a glutathione (GSH) catalisada por Glutathione-S-Transferase (GST) com a subsequente excreção como AFB-marcapturate sendo este caminho vital para a desintoxicação da AFB1 como carcinogénico ainda que uma depleção de GSH possa conduzir a altos níveis de espécies reativas de oxigénio (ROS) causando danos oxidativos (Verma R.J. 2004). Pode ainda reagir e formar o AFBI-8,9-dihydroxydiol, que poderá ser convertido na forma de dialdeído que pode ser excretado na urina como diálcool após ativação da aflatoxina aldeído reductase (AFAR) ou ligar-se a proteínas como a albumina (Wild CP 2002). Um outro caminho é ligar-se a outras macromoléculas como proteínas e RNA, causando desregulação das funções celulares normais e inibição da síntese de proteínas DNA e RNA.

4. Toxicidade das Aflatoxinas

As Aflatoxinas, contaminantes naturais alimentares, são consideradas as mais potentes substâncias carcinogénicas que se conhecem e são classificadas no Grupo I pela Agência Internacional de Pesquisa do Cancro (IARC, 2012). De acordo com a monografia I00F do IARC, existe evidência suficiente do potencial hepatocarcinogénico das Aflatoxinas em humanos, e evidência suficiente em animais experimentais da hepatocarcinogenicidade proveniente da exposição à AFB1, AFG1, AFM1 e as misturas de Aflatoxinas (Wu *et al.*,

2009; IARC, 2012; JECFA, 2016). Estima-se que 4 bilhões de pessoas no mundo se encontram expostas a aflatoxinas provenientes da dieta alimentar (CDC, 2018; Williams *et al.*, 2004; Yan *et al.*, 2012; Chu *et al.*, 2018; Azzis Baumgartner *et al.*, 2005). A exposição dos animais e do homem às Aflatoxinas provém da dieta alimentar que é consistentemente, considerada um dos maiores fatores de risco de desenvolvimento de cancro a nível mundial (Gross-Steinmeyer, 2012; Rocha *et al.*, 2014). De acordo com a Organização Mundial de Saúde (WHO), dos 550,000–600,000 novos casos de cancro, cerca de 25,200–155,000 (4.6–28.2%) dos casos de carcinoma hepatocelular, podem ser atribuídos à exposição a Aflatoxinas (LIU & Wu, 2010; Hui, 2012). A maioria dos carcinomas hepatocelulares ocorrem na África subsariana, Ásia e China onde as populações sofrem de Hepatite B (efeito sinérgico) e se encontram mais expostas a estes contaminantes químicos (Asim *et al.*, 2011; WILD, 2010; Kucukcakan, 2015; Kensler *et al.*, 2011; WHO, Gross-Steinmeyer, 2012).

As Aflatoxicoses, nome dado às doenças provocadas pela ingestão de alimentos contaminados com aflatoxinas, afetam o Homem e várias espécies animais. Quando ingeridas em doses elevadas e num curto espaço de tempo -Aflatoxicoses agudas- são observados danos estruturais e funcionais no fígado, incluindo necrose celular, hemorragias, lesões, fibrose, cirrose e em casos extremos, a morte. São igualmente muito nocivas, mesmo em doses muito pequenas, se absorvidas regularmente, durante largos períodos de tempo, podendo conduzir a atrasos no crescimento, imunossupressão e cancro (Gong *et al.*, 2004; Williams *et al.*, 2004; Cotty and Jaime-Garcia, 2007). As AFs, são consideradas compostos que têm um grau de toxicidade elevado em quase todas as espécies animais testadas, mas existem diferenças substanciais na suscetibilidade das espécies e, dentro de uma dada espécie, a magnitude da resposta é influenciada pela idade, sexo, peso, dieta, exposição a agentes infecciosos, presença de outras micotoxinas e concentração e período de exposição ao contaminante. Para a maioria das espécies estudadas, a sensibilidade é acentuadamente maior nas crianças do que nos adultos e nos machos do que nas fêmeas. (Williams *et al.*, 2004).

A Aflatoxina B₁, é considerada a mais tóxica e a mais prevalente das aflatoxinas conhecidas (cerca de 14). A aflatoxina B₁ (AFB₁) é um composto altamente tóxico (LD₅₀ = 1-50 mg/kg) para a maioria das espécies animais, embora seja extremamente tóxico (LD₅₀ <1 mg/kg) para algumas espécies altamente suscetíveis, como coelhos, porcos, cães e gatos, trutas e patos. Estudos em animais, evidenciam duas ordens de magnitude na dose letal média para a AFB₁. As espécies mais suscetíveis, como os coelhos e os patos, têm uma dose letal média baixa (0,3 mg/kg), enquanto as aves de capoeira (18 mg/kg) e os ratos têm maior tolerância (Gonçalo, Diaz. 2011; Williams *et al.*, 2014). A sensibilidade é particularmente

variável entre os roedores, sendo que os ratos respondem nos níveis de 15-1.000 µg/kg de AFBI na dieta, enquanto que certas cepas de camundongos não apresentam nenhuma resposta em doses até 150.000 µg/kg.

A dose, o tempo de exposição e natureza do sistema digestivo, são os principais fatores da suscetibilidade para a mesma espécie à AFBI. Os ruminantes são geralmente menos sensíveis em comparação com os não ruminantes porque as Afs são parcialmente degradadas pelo rúmen intestinal (Frazzoli *et al.*, 2016; FDA, 2018; EFSA 2018). A maioria dos sinais clínicos, característicos de exposições crônicas a AFs, para esta espécie, são disfunção hepática, como anorexia, icterícia e hemorragia, juntamente com as lesões renais. Nos bovinos, os sinais clínicos ocorrem após a exposição a concentrações de 1,5 a 2,2 mg/kg de ração, e em pequenos ruminantes, após a exposição a concentrações >50 mg/kg de ração. Os alertas precoces podem ser dados pela redução da produção de leite, fotossensibilização e, mais importante, redução da resposta imunológica, incluindo redução da resposta à vacinação. Para efeitos tão subtis, é difícil estabelecer um nível sem efeitos: no entanto, existe uma margem de segurança de pelo menos 75 entre os níveis de exposição a produtos tóxicos ($\geq 1,5$ mg/kg de ração) e o limite legal (0,020 mg/kg de ração) na Europa considerado seguro, mas que começa a ser questionado dada a ocorrência de AfMI no leite (Frazzoli *et al.*, 2016). No gado produtor de leite, os sintomas primários de contaminação com aflatoxinas são a redução no ganho de peso, bem como danos no fígado e rim e diminuição da produtividade. Os cães são especialmente sensíveis devido aos baixos teores de Glutathione sendo a dose letal, de 0.5-1.0 mg/Kg. Desde 1975, que existem registros de casos esporádicos e surtos de aflatoxicose em cães, transmitidas por alimentos. Os dois mais recentes (em 1998 e 2005), ambos nos EUA, foram os surtos mais disseminados, e ocorreram devido à contaminação do milho por aflatoxinas. Apesar da rápida atuação das entidades de saúde, a taxa de mortalidade foi de 64% (46 de 72 cães). Em Israel, entre dezembro de 2005 e fevereiro de 2006, ocorreu um novo surto com 50 cães que foram expostos a uma dieta canina comercial contaminada. O rácio de mortalidade foi de 68% (BRUCHIM *et al.*, 2012). Peixes e aves são também espécies extremamente sensíveis, e a dose efetiva para a indução de hepatomas situa-se entre 10 - 30 µg/kg de AFBI na dieta. Nas aves de capoeira, as aflatoxinas causam danos no fígado, provocam um decréscimo da produtividade e eficiência reprodutiva, decréscimo na produção e na qualidade da casca dos ovos e conduzem a um aumento da suscetibilidade às doenças. Os suínos são menos sensíveis do que as aves.

O nível de toxicidade das AFs em humanos é largamente desconhecido, contudo, os adultos costumam ter alguma tolerância à aflatoxina BI e, nos casos relatados de

intoxicações agudas, geralmente são as crianças que morrem. Não há estudos de toxicidade da AFB1 em humanos, mas é conhecido o caso de um trabalhador de laboratório que intencionalmente ingeriu AFB1 a 12 µg/kg de peso corporal por 2 dias desenvolveu uma erupção cutânea, náuseas e dor de cabeça, mas recuperou, sem efeito negativo. O trabalhador foi seguido durante 14 anos e os resultados das análises efetuadas ao sangue e ao fígado não evidenciaram problemas (FDA, 2012). No geral, em animais de criação e de laboratório, a exposição crônica a aflatoxinas compromete a imunidade e interfere no metabolismo de proteínas e em múltiplos micronutrientes que são críticos para a saúde. Estes efeitos, ainda não foram amplamente estudados em humanos, mas de acordo com a informação disponível, pelo menos alguns dos efeitos observados em animais, também ocorrem no homem (Williams JH *et al.*, 2004). Também não há registros de aflatoxicoses agudas no Homem nos países desenvolvidos, contudo, existem evidências de Aflatoxicoses agudas em humanos, em países como a Índia, China, Tailândia, Gana, Quênia, Nigéria, Serra Leone, e Sudão. Os surtos de Afs documentados, ilustram bem o poder toxicológico destes contaminantes. No noroeste da Índia, em 1974, foram afetadas 397 pessoas e houve 108 mortes associadas ao consumo de milho com teores de Afs entre 0,25 e 15 mg/kg. O consumo diário estimado foi de 2 a 6 mg/dia de aflatoxina durante várias semanas (Krishnamachari *et al.*, 1977). Em 1982, no Quênia, houve 20 internamentos hospitalares, com uma taxa de mortalidade de 60%, devida à ingestão de AF em concentrações de 38 µg/kg de peso corporal. Na Malásia, em 1998, 13 crianças chinesas morreram de encefalopatia hepática aguda depois de comer macarrão chinês; a presença de aflatoxinas foi confirmada em amostras post-mortem dos pacientes. Entre 2004 e 2005, ocorreu um dos maiores surtos de aflatoxicose numa zona rural do Quênia, tendo sido afetadas 317 pessoas; morreram 125 devido à ingestão de milho caseiro contaminado com uma concentração média de 354 ng/g de Aflatoxinas com amostras com concentrações de AFB1 de 4,400 ppb, que é 220 vezes maior que o limite de 20ppb determinado pelas autoridades quenianas (Azzis Baumgartner *et al.*, 2005; FDA- Bad Bug Book 2nd edition).

A biotransformação da AFB1 (**Fig.5**), está fortemente associada aos efeitos tóxicos e carcinogênicos provocados no homem sendo o órgão alvo, o fígado (KUMAR Pradeep *et al.*, 2017). No entanto, constata-se que o intestino também poderá ser considerado um órgão vulnerável aos efeitos adversos da AFB1, uma vez que funciona como a primeira barreira de defesa para xenobióticos (Broom, 2015; Zhang, 2015). A epoxidação da AFB1 e a formação do composto reativo - exo-8,9-epóxido AFB1 é considerada a etapa crítica para o potencial mutagênico e carcinogênico da AFB1, AFM1 e AFG1 ou da sua ausência, na AFB2 e AFG2 (IARC, 2012; JECFA 83th report 2017). Sabe-se ainda, que a transposição G para T na

terceira posição do códon 249 (AGG) do gene TP53, substituindo a arginina por serina, é a mutação mais comum induzida pela aflatoxina associada ao HCC (Anitha *et al.*, 2014). Os estudos da epoxidação da AFMI são ainda limitados, contudo, constatou-se que a AFMI tem um potencial tóxico direto, mesmo na ausência de ativação metabólica, ao contrário da AFB1 (Caloni *et al.*, 2006).

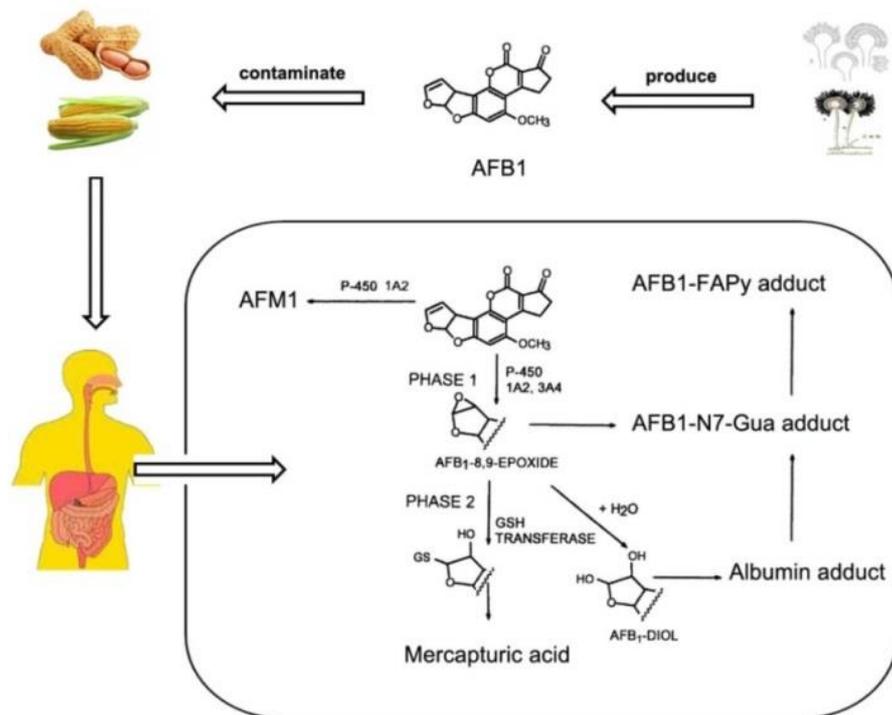


Fig. 5 - Biotransformação da Aflatoxina BI após exposição pela via alimentar.

Embora menos tóxicas que a AFB1, o potencial de toxicidade relativo das restantes congêneres, por ordem decrescente é o seguinte: AFB1 > AFG1, AFMI >> AFB2, AFG2 (IARC, vol10; Theumer *et al.*, 2018). Apesar da AFMI ser geralmente considerada um produto proveniente do processo de desintoxicação do ponto de vista mutagénico e carcinogénico, e de ser uma preocupação para as crianças devido à sua ocorrência no leite e produtos lácteos, alguns autores sugerem alguma precaução na interpretação de que a AFMI não tem efeitos adversos para a saúde da mãe. Ensaio *in vitro*, evidenciam que, apesar do seu potencial de toxicidade ser inferior em 10% à toxicidade da AFB1 (Prandini *et al.*, 2009), constata-se que provoca danos no DNA, mutação genética e transformação celular em células mamárias, em insetos e animais (J. Zhang *et al.*, 2015; M. Caruso *et al.*, 2009; Caloni *et al.*, 2006). A AFMI, previamente classificada pelo IARC como provável carcinogénico para o homem Grau 2, foi reavaliada e é atualmente classificada como Grau1 (IARC,1993; IARC 2002; IARC 2012; EFSA 2018). Apesar das poucas pesquisas efetuadas para avaliar os efeitos adversos da AFMI no intestino, que é a primeira barreira para produtos químicos ingeridos, há evidências de que a AFMI pode prejudicar as células intestinais e o consumo prolongado

de alimentos contendo AFBI e o seu metabolito hidrolisado AFMI, pode representar um risco de lesão para o trato intestinal (Scaglioni, 2014; Zhang, 2015; Jebali *et al.*, 2018).

A co-exposição a mais de uma micotoxina representa uma grande preocupação para a saúde pública, particularmente em relação à segurança de consumidores como crianças e bebês que podem ser expostos simultaneamente a vários xenobióticos através do consumo de alimentos como os cereais, o leite e seus derivados. A toxicidade das misturas de micotoxinas não pode ser prevista com base nas suas toxicidades individuais uma vez que as suas reações podem ser antagônicas, aditivas ou sinérgicas, acentuando ou mitigando o impacto de cada micotoxina (THOMAS *et al.*, 2018). Estudos desenvolvidos, evidenciam que a co-exposição da ABI e ocratoxina A (OTA) pode agravar a imunotoxicidade (HOU Lili *et al.*, 2018; Bianco *et al.*, 2012). Segundo um estudo realizado por Hove, a co-exposição a aflatoxina BI e fumonisina BI (FBI), aumenta o potencial de carcinogenicidade e agrava a imunotoxicidade em várias espécies animais (Bbosa *et al.*, 2013; HOVE M. *et al.*, 2016). Num outro estudo, evidencia-se que a citotoxicidade da AFMI aumenta dramaticamente na presença de OTA e ZEA indicando que os limites atualmente estabelecidos para a presença desta Afla no leite, deverão ser reavaliados (Y.N. Gao *et al.*, 2016).

5. Ocorrência de Aflatoxinas em alimentos destinados ao consumo humano e animal.

5.1. Ocorrência em alimentos destinados ao consumo humano

A exposição Humana a AFs ocorre majoritariamente através da ingestão de alimentos contaminados com AFBI ou, indiretamente, através da ingestão de leite proveniente de animais que ingeriram alimentos contaminados com AFBI (Klingelhofer *et al.*, 2018; Kumar *et al.*, 2017). Os alimentos mais susceptíveis de contaminação por AFs são os cereais e seus derivados, arroz, sementes, nozes, frutos secos, café, especiarias e ervas aromáticas (Ferre F, 2016; Garcia *et al.*, 2018; Ogunade, 2017; Monyo *et al.*, 2012). A produção global de cereais para 2017 estava prevista para atingir 2627 milhões de toneladas com grãos grosseiros previstos em 1371 milhões de métricas toneladas. Estas estatísticas mostram a importância do arroz, trigo, milho, cereais e outros grãos na composição dos alimentos globais que fornecem. A AFBI, no entanto, é bem conhecida por contaminar estes produtos para além de outros alimentos altamente utilizados, como amendoim, frutas secas e especiarias. Apesar de se verificar um predomínio nos trópicos em detrimento das zonas temperadas, devido à globalização, não há regiões no mundo livres da presença de aflatoxinas sendo que, a contaminação é especialmente relevante em populações que

baseiam a sua alimentação num único tipo de produto como por exemplo, o milho em África ou o arroz na Ásia. A ocorrência de aflatoxinas nos produtos agro-alimentares é inevitável, encontrando-se na maior parte das vezes em concentrações muito baixas em alimentos como os cereais, frutos secos, especiarias, cacau, leite e sementes oleaginosas. Estes dados, provenientes dos programas de monitorização implementados pelas autoridades de segurança alimentar europeias, estão de acordo com os resultados de diversos estudos realizados, a nível mundial, para avaliar a ocorrência de AFBI nos alimentos (**Tabela 4**)

Tabela 4 - Ocorrência de AFBI por alimento e por País (Adaptado de Rushinga Blake, 2019).

Alimento	País	Nº de amostras	Nº de Positivos	% Positivos	AFB1 µg/Kg	Referência
Arroz	Suécia	99	56	56,6	46,2	Fredlund <i>et al.</i> (2009)
Arroz	Índia	1200	814	67,8	308	Reddy <i>et al.</i> (2009)
Arroz	Brasil	230	128	55,7	180,74	Almeida <i>et al.</i> (2012)
Nozes	Turquia	302	51	16,9	368	Hepsag <i>et al.</i> (2014)
Nozes	Zimbabue	208	26	12,5	175,9	Maringe <i>et al.</i> (2017)
Nozes	Japão	21	10	47,6	2,59	Kumagai <i>et al.</i> (2008)
Milho	China	108	108	100	50	Sun <i>et al.</i> (2011)
Milho	Burkina Faso	26	13	50	636	Warth <i>et al.</i> (2012)
Milho	Moçambique	13	6	46,2	363	Warth <i>et al.</i> (2012)
Milho	Croácia	633	241	38,1	2072	Pleadin <i>et al.</i> (2014)
Cereais	Tunísia	147	42	28,6	25,1	Gali <i>et al.</i> (2010)
Cereais	Paquistão	237	98	41,4	6,9	Iqbal <i>et al.</i> (2014)
Frutos secos	Tunísia	20	9	45	34,5	Gali <i>et al.</i> (2010)
Frutos secos	Turquia	130	16	12,3	12,5	Kabak, (2016)
Frutos secos	Paquistão	77	33	42,9	9,8	Masood <i>et al.</i> (2015)

Tabela 5 - Ocorrência e nível de incidência de AFI em alimentos.

Alimento	N	Nº positivos	Positivos (%)	Conc. Média (ug/Kg)	LOD	Referência
Pão de Milho	14	6	43	1,4	3,5	Iqbal, 2014
Pão de Trigo	13	5	38,5	0,4	1,85	Iqbal, 2014
Pão de Centeio	15	7	47	0,9	2,9	Iqbal, 2014
Cereais de P.A.	19	9	47,4	0,83	2,16	Iqbal, 2014
Chocolate negro	78	78	-	0,59 ^a	-	Copetti, 2011
Chocolate em pó	25	24	96,0	0,43	0,96	Copetti, 2012
Chocolate negro	25	25	100,0	0,43	-	Copetti, 2012
Chocolate de leite	25	18	72,00	0,08	-	Copetti, 2012
logurte	72	2	-	0,013	-	Ramos, 2010

^amediana

5.2. Ocorrência em alimentos e ingredientes para consumo animal

Vários estudos demonstram que para além dos efeitos adversos na saúde humana, a saúde dos animais é igualmente afetada pela ingestão de rações contaminadas com AFBI. Efeitos na redução da produção de leite, problemas ao nível da reprodução, imunossupressão e inclusivamente a morte, podem ocorrer quando os animais são alimentados com rações contaminadas com AFBI.

Tabela 6 - Ocorrência de Aflatoxina em alimentos para animais na Europa (Adaptada de Streit et al. 2012).

País/Região	Alimento	Aflatoxinas	n	% positivos	µg/Kg	Referências
Europa		AF	169	15	máx-0.3	Rodrigues and Naehrer
Europa	Alimentos animais	AF	127	25	0.5 – 66	Griessler et al.
Portugal	Alimentos vacas	AF	1001	37	1 – 74	Martins et al.
Portugal	Alimentos animais	AF	1936	26	1 – 80	Martins et al.
Spain	Cevada	AF	123	100	máx-0.8	Ibáñez-Vea et al.
Italy	Alimentos vacas	AFB ₁	616	8 (2004)	n.e	Decastelli et al.
Greece	Alimentos animais	AFB ₁	119	0	n.e.	Vlachou et al.
Romania	Milho, Trigo	AFBI	86	38	Máx- 52	Tabuc et al.
Poland	cereais, milho, forragens	AF	1255	3–10	0.2 – 0.9	Grajewski et al.

5.3. Ocorrência de AFMI em Leite

É na Ásia, que existe a maior percentagem de desvios ao limite estabelecido na UE para AFMI como seguro para a saúde das populações, logo seguido do continente africano (Iqbal et al., 2013). Na Europa e nomeadamente em Portugal, os estudos efetuados evidenciam que são ultrapassados os limites máximos definidos pela legislação aplicável ao leite. Relativamente à variação sazonal da AFMI no leite animal sabe-se que os climas quentes e húmidos são os mais favoráveis ao desenvolvimento de fungos produtores de Aflatoxinas, contudo há estudos contraditórios. Mais importante do que a variação sazonal, é o controlo da cadeia de fornecimento e os tempos e condições de armazenamento de alimentos como os cereais ou frutos secos.

Tabela 7- Ocorrência de AFMI em leite no mundo (Adaptada de Iqbal, 2015).

Continente	País	Ano	Tipo de Leite	Método	N	Positivos		Média (ng/L)	Referências	
						Nº	(%)			
Europa	Croácia	2009	Leite cru	ELISA	61	1	1,6	-	Bilandzic, Varenina&Solomon, 2010	
	Portugal	2011	Past. e UHT	ELISA	40	11	27,5	23,4	S.C. Duarte et al., 2013	
	Portugal	1999-2004	Leite cru	HPLC-FD	598	394	65,9	n.g.	Martins et al., 2005	
	Portugal	1999	Leite cru	HPLC-FD	31	25	80,6	n.g.	Martins & Martins, 2000	
	Espanha	2008	UHT	ELISA	72	68	94,4	9,69	Cano-Sancho et al.,2010	
	Grécia	2010	Leite cru e UHT	ELISA	196	91	46,4	10	Tsakiris et al.,2013	
	Itália	2004-2005	Leite cru	ELISA/LC	341	5	1,5	nr	Decastelli et al.,2007	
	Reino Unido	2001	n.r		100	3	3	nr	EFSA,2004	
	América	Argentina	2007	Leite cru	LC-MS/MS	94	60	63,8	nr	Alonso et al.,2010
	Egipto	2010	Leite em pó	ELISA	125	54	43,2	nr	El-Tras, El-Kady&Tayel, 2011	
África	Líbia	2002	Leite cru	LC-FLD	49	35	71,4	nr	Elgerbi,AidooCandlish & Tester, 2004	
	Nigéria	2006	Leite cru	LC-2D	22	3	13,6	nr	Atanda, Ogontubo, Adejumo, (2007)	
	Marrocos	2009-2010	Leite cru	LC-2D	48	13	27,1	nr	El Marnissi et al., 2012	
	Sudão	2009	Leite cru	LC-FLD	44	42	95,5	nr	Elzupir&Elhussein, 2010	
	Turquia	2006-2007	UHT	ELISA	150	89	59,3	nr	Aydemir, Atasaver, Adiguzel, 2010	
	Tailândia	2006-2007	Leite cru	LC-FLD	240	240	100	nr	Ruangwises&Ruangwises, 2010	
	China	2006-2007	UHT	ELISA	233	112	48,1	nr	Guo,Yuan&Yue, 2013	
	Irão	2012	Leite p.	ELISA	45	45	100,0	nr	Riahi-Zanjani&Balali-Mood, 2013	
	Jordânia	2011-2012	Leite cru	ELISA	50	50	100,0	nr	Omar, 2012	
	Paquistão	2012	UHT	LC-FLD	84	35	41,7	nr	Iqbal et al., 2013	
Ásia										

Na realidade, no hemisfério Norte, os cereais são colhidos no Verão e armazenados durante o Outono e Inverno (mais húmidos) até ao Verão seguinte. A probabilidade de desenvolvimento de fungos nestas estações é grande. Os cereais transformados a partir da Primavera terão maior probabilidade de ocorrência de micotoxinas. Isso poderá explicar a maior ocorrência de Aflatoxinas no leite durante o Verão. Os estudos futuros deverão avaliar o impacto das condições climáticas associados às condições de armazenamento de modo a poder clarificar as atuais discrepâncias existentes nos diversos estudos.

6. Métodos Analíticos de determinação de AFMI em Leite

Na análise de alimentos, há muitos fatores que podem influenciar o resultado analítico, como por exemplo, o método selecionado, o processo de extração, o solvente usado e, no caso das Aflatoxinas, acresce ainda, a distribuição não homogénea no alimento, matrizes alimentares complexas e concentrações em níveis muito baixos. Os métodos analíticos para a determinação de Afla incluem técnicas baseadas em ensaios imunoenzimáticos que se aplicam principalmente para controlos rotineiros e rápidos e técnicas baseadas em cromatografia que proporcionam determinação sensível, precisa e seletiva, além de identificação de compostos novos ou modificados, através de detetores de massa em tandem (Anfossi *et al.*, 2016).

Ao longo das últimas décadas, muitos métodos analíticos, incluindo cromatografia de camada fina (Kamkar, 2006), cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) (Herzallah, 2009; Rahmani *et al.*, 2009) e HPLC-MS / MS (Chen *et al.*, 2012; Soleimany *et al.*, 2012; Ossa *et al.*, 2015) foram desenvolvidos. Embora esses métodos sejam sensíveis, eles exigem laboratórios bem equipados, pessoal treinado e métodos demorados de preparação de amostras. Portanto, eles não são normalmente adequados para a triagem rápida de um grande número de amostras.

As técnicas mais rápidas para deteção de micotoxinas são essencialmente de fundamento imunoenzimático apresentando vantagens adicionais, como a simplicidade de execução, de manipulação e a possibilidade de se poder processar ao mesmo tempo um número elevado de amostras, usando microplacas. Devido à sua simplicidade e baixo custo, os ensaios imunoenzimáticos ELISA, têm sido amplamente utilizados na monitorização de alimentos, pois são rápidos, robustos, confiáveis, fáceis de usar e portáteis. Como os resultados são produzidos rapidamente, os *Kits* ELISA permitem fazer o teste de um número maior de amostras de alimentos, facilitando, assim, o controle mais efetivo das substâncias reguladas na cadeia alimentar. O ensaio ELISA é um método analítico confiável, sensível,

rápido e simples e amplamente aplicado na segurança alimentar. Existem muitos formatos do ELISA, como o método do anticorpo monoclonal duplo, método indireto e método competitivo. O método do anticorpo monoclonal duplo e o método indireto são aplicados principalmente no diagnóstico clínico. O método competitivo é aplicado principalmente no âmbito da segurança alimentar. O ELISA competitivo é classificado em duas categorias de acordo com o princípio de funcionamento: ELISA competitivo direto e ELISA competitivo indireto. A principal desvantagem do ELISA tradicional é que a sua sensibilidade é baixa (Huang *et al.*, 2014).

As técnicas cromatográficas normalmente usadas para detecção e quantificação de aflatoxinas são a Cromatografia em Camada Fina (TLC) e a Cromatografia Líquida de Alta Resolução (HPLC). A primeira destas técnicas tem um custo baixo, sendo também menos sensível, requerendo uma grande disponibilidade de tempo e mão-de-obra especializada. Este tipo de cromatografia apresenta, em geral, a mesma base física de separação (adsorção) que a cromatografia de adsorção em coluna. Na cromatografia de camada fina (TLC da designação inglesa Thin-Layer Chromatography) a fase estacionária é, em geral, sólida e forma um revestimento fino de uma face de uma placa plana metálica, em vidro ou em plástico, a qual lhe serve de suporte. Existem vários tipos de adsorventes utilizados em TLC, polares ou apolares. A aplicação da amostra a analisar deve ser cuidadosa de modo a evitar a fácil destruição do revestimento adsorvente e é realizada com uma seringa hipodérmica, micropipeta ou um fio de platina. A escolha do eluente e da fase estacionária é fundamental neste tipo de cromatografia. Para cada adsorvente sólido é possível estabelecer uma ordem de eluentes chamada série eluotópica, de acordo com a capacidade de eluição dos solutos (Pombeiro, 1998). O desenvolvimento do cromatograma na técnica de camada fina é realizado numa câmara fechada para estabilização e controlo de vários parâmetros experimentais, nomeadamente a composição e o grau de saturação da atmosfera, em contacto com o meio cromatográfico, a evaporação do eluente e até a temperatura. Contrariamente à técnica de TLC, o HPLC tem uma sensibilidade e precisão elevadas, contudo, as amostras têm de ser submetidas a um exaustivo sistema de purificações e há que analisá-las uma a uma.

Com base nos resultados de vários estudos, pode-se concluir que a proximidade da concordância entre os valores de concentração de AfMI em leite utilizando ELISA e LC-MS / MS é alta, e que ambas as técnicas podem ser usadas para controlo ou fins regulamentares, tendo em mente suas vantagens e limitações inerentes (Stefanovica, Srdjan *et al.*, 2015). Num outro estudo, compararam-se as técnicas de ELISA com cromatografia líquida de alta eficiência com detetor de fluorescência (HPLC-FLD) e espectrometria de massa em tandem

com cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC-MS / MS) para AFMI para avaliar a proximidade da concordância entre resultados de três métodos diferentes. A análise estatística da variância entre os métodos e os coeficientes de correlação obtidos indicam que existe uma forte correlação entre os métodos. Todos os três métodos são satisfatórios no cumprimento dos requisitos para fins de controlo regulamentar. Tanto quanto é do conhecimento do autor, este estudo representa o primeiro relato de uma investigação e comparação dos métodos ELISA, HPLC-FLD e HPLC-MS / MS para determinação de AFMI em amostras de leite naturalmente contaminadas (Kos J. *et al.*, 2016).

7. Enquadramento Legal

A necessidade de assegurar um elevado nível de proteção da vida e da saúde humanas é a missão das autoridades mundiais de segurança alimentar. Os contaminantes naturais como as Aflatoxinas, podem desenvolver-se nos géneros alimentícios, em qualquer estágio entre a produção e o consumo e, é essencial, no interesse da proteção da saúde pública, manter estes contaminantes em níveis toxicologicamente aceitáveis.

Dada a toxicidade e elevada probabilidade de ocorrência de AFs nos alimentos de grande consumo foram definidos limites máximo por matriz alimentar e de modo a minimizar a exposição do homem e dos animais a estes contaminantes sendo, assim, proibida a comercialização de géneros alimentícios que contenham um contaminante em quantidade inaceitável do ponto de vista da saúde pública e em especial no plano toxicológico. A justificação para o estabelecimento de uma regulamentação específica varia muito, no entanto, a maioria dos regulamentos são elaborados com base na análise de risco e na disponibilidade de dados toxicológicos e epidemiológicos. Em particular, grupos como o JECFA (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives) faz avaliações de risco e da exposição humana a estas toxinas naturais recomendando o estabelecimento de concentrações que minimizem os riscos para a população, animais e para a saúde pública. Baseados nos resultados destes estudos, a Comissão Europeia emite a legislação com os níveis máximos de contaminantes permitidos em alimentos de modo a assegurar um nível de proteção máximo da população.

Na europa, o regulamento 1881/2006, alterado pelo Regulamento N° 165/2010 da Comissão de 26 de Fevereiro de 2010 fixa os teores máximos de contaminantes presentes nos géneros alimentícios e estabelece os teores máximos permitidos de AFBI e AFMI em diversos géneros alimentícios. Dada a vulnerabilidade dos lactentes e crianças jovens a este tipo de contaminantes, os níveis máximos permitidos nos alimentos destinados a este grupo

são mais reduzidos, de modo a salvaguardar a sua saúde sendo que não há legislação aplicável ao leite materno. De acordo com a Diretiva 2002/32/CE do parlamento europeu e do conselho de 7 de Maio de 2002 relativa às substâncias indesejáveis nos alimentos para animais, a AFBI é a única Aflatoxina para a qual foi definida uma concentração máxima em produtos destinados à alimentação animal, devido à sua toxicidade aguda e crónica, à sua capacidade de bioacumulação e de degradação e à consequente contaminação do leite com AFMI. **Tabela 8.**

Tabela 8 - Teor máximo de AFBI e AFMI em alimentos para consumo humano e animal (Regulamento (CE) nº 1881/2006 da Comissão, de 19 de Dezembro de 2006)

AF	Grupo Alvo	Matriz Alimentar	ug/Kg	
AFBI	Público geral	Frutos secos e produtos derivados da sua transformação	2,0	
		Todos os cereais e produtos derivados dos cereais.	2,0	
		Especiarias	5,0	
		Amendoins e Pistácios	8,0	
		Milho como ingrediente de géneros alimentícios	5,0	
		Arroz	5,0	
		Avelãs e Castanhas do Brasil	5,0	
		Café Não se encontra legislado para AFBI	----	
		Chocolate	5,0*	
		Crianças (0-3 anos)	Arroz	0,1
		Crianças (0-3 anos)	Alimentos transformados à base de cereais e	0,1
Crianças (0-3 anos)	Fórmulas para lactentes e fórmulas de transição	0,025		
Gado bovino leiteiro	Alimentos completos	5		
Gado	Alimentos completos	50		
AFMI	Público geral	Leite e produtos lácteos (ng/L)	0,050	
	Crianças (0-3anos)	Leite e produtos lácteos (ng/L)	0,025	

*Não se encontra legislado na EU; está legislado no Brasil

Apesar da regulamentação existente na Europa e nos países desenvolvidos, constata-se que os teores máximos fixados para as AFs são, frequentemente, ultrapassados em determinados géneros alimentícios, normalmente provenientes de certos países terceiros. Dado o impacto destes contaminantes na saúde pública não será suficiente legislar para garantir a comercialização de produtos seguros. A maioria dos países adotou a legislação aplicável e implementou programas de monitorização da qualidade e segurança alimentar dos produtos comercializados, contudo, não será possível minimizar o aparecimento destes

contaminantes se não forem definidas estratégias/mecanismos de controlo aplicáveis a toda a cadeia de fornecimento assim como de implementação de boas práticas agrícolas e de armazenamento a nível global.

PARTE II- Experimental

I. Justificação e objetivos do estudo

O leite é um alimento importante na dieta de todos os grupos etários mas, é especialmente importante para as crianças, porque é um dos principais alimentos consumidos durante os primeiros anos de vida. De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS) o leite materno é considerado o alimento ideal para os recém-nascidos. É uma boa fonte de macro e micro nutrientes e “componentes” antimicrobianos e imunológicos que promovem a saúde do bebé e o seu desenvolvimento. As consequências a longo prazo para a saúde dos recém-nascidos alimentados com leite materno é difícil de avaliar contudo, existem dados epidemiológicos que sugerem que o leite materno pode proteger os recém-nascidos minimizando o desenvolvimento de alergias e de doenças como a obesidade em jovens e adultos (Ballard Olívia, 2013; WHO/*Breastfeeding*).

Apesar dos benefícios amplamente reconhecidos da amamentação, as mães no período de aleitamento encontram-se expostas a contaminantes naturais ou sintéticos, pelo que o leite materno pode corresponder a uma via de exposição para os lactentes. A ocorrência de pequenas quantidades de contaminantes no leite são significativas para consumidores de grandes quantidades deste alimento e dieta restrita, como os lactentes (Afshar P. *et al.*, 2013; Azarikia Manizheh, 2018). Acresce que os bebés em particular e as crianças em geral, têm baixo peso, menor capacidade de desintoxicação e incompleto desenvolvimento de alguns dos seus órgãos e tecidos como o sistema nervoso central apresentando por essa razão maior susceptibilidade aos efeitos adversos dos contaminantes transferidos a partir do leite materno.

Como revisto recentemente por Watson *et al.* (2018), a exposição à aflatoxina durante o desenvolvimento fetal e a infância, tem sido associada com baixo peso no nascimento, deficiências de micronutrientes, lesões hepáticas e imunossupressão. O mesmo estudo indica ainda vários mecanismos propostos pelos quais a exposição à aflatoxina pode causar atraso no crescimento, incluindo a redução da absorção intestinal de nutrientes e níveis reduzidos do fator de crescimento semelhante à insulina-I (IGF-I). Esta hormona peptídica que estimula o crescimento é produzida no fígado. Desta forma a toxicidade hepática causada pela aflatoxina pode resultar em níveis reduzidos de IGF-I.

Comparativamente aos alimentos infantis comercializados para os quais os limites de AFMI são rigorosamente regulamentados e controlados por programas de vigilância, o leite materno é comparativamente raramente avaliado, apesar do potencial risco de AFMI na amamentação de bebês (Warth *et al.*, 2016). Na Europa, os estudos de avaliação da

contaminação de AFMI no leite materno são escassos e, em Portugal, há uma completa ausência de estudos até à data de realização do presente.

Nesta sequência, os objectivos do presente estudo foram avaliar a exposição dos lactentes à AFMI, em três distritos de Portugal - Aveiro, Coimbra e Lisboa, e avaliar possíveis determinantes associados a factores sócio-demográficos e hábitos alimentares das mães lactantes.

2. Material e métodos

Os procedimentos desenvolvidos neste trabalho respeitaram a Declaração de Helsínquia da Associação Médica Mundial de 1975, revista em 2013 (WMA, s.d.) e a Declaração da Associação Médica Mundial sobre as considerações éticas relativas às bases de dados de saúde e aos biobancos (Declaração de Taipé de 2016), da Associação Médica Mundial (WMA, s.d.), tendo sido obtida aprovação do Conselho Científico da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra e respeitada a restante legislação nacional e europeia em vigor. Todas as voluntárias participantes assinaram uma declaração escrita de consentimento informado de permissão, após esclarecimento dos objectivos e metodologias do estudo (*vide* Anexo I).

2.1. Amostragem

No período decorrente entre Fevereiro de 2015 e Janeiro de 2016, foram recolhidas 37 amostras de leite materno (5mL; amostras de conveniência), de mães lactantes residentes em três distritos: Aveiro (n=23), Coimbra (n=9) e Lisboa (n=5), em duas estações (Inverno n=11; Verão n=26).

Após explicação detalhada sobre a forma correcta de recolha, armazenamento e transporte, as amostras foram recolhidas em sacos estéreis, por expressão por bomba, e imediatamente congeladas a -20°C, até à data da análise no Laboratório de Biologia Molecular da Escola Universitária Vasco da Gama, em Coimbra.

Os critérios de inclusão estabelecidos foram o estado saudável das mães, puérperas, em aleitamento, declaração de consentimento informado assinada e questionário preenchido. Os critérios de exclusão definidos foram a ocorrência de doença mamária de natureza infecciosa ou tumoral, idade inferior a 18 anos e parto, pelo menos, às três semanas (para evitar análise de colostro ou leite de transição).

2.2. Dados socio-demográficos

As mães voluntárias foram instruídas para preencher um questionário sócio-demográfico (vide Anexo 2), aquando da recolha da amostra, para obter informação sobre a idade, número de filhos, período de lactação (data do parto), formação escolar, actividade profissional e local de residência. Foram recolhidos dados complementares relativamente às características da amamentação (exclusiva ou complementada com leites e fórmulas para lactentes) e o peso da criança no parto e no momento da colheita de leite.

2.3. Hábitos alimentares

Adicionalmente, as participantes preencheram um questionário semi-quantitativo, de frequência alimentar (Anexo 2), relativamente aos hábitos de consumo na semana imediatamente anterior (sete dias anteriores). As voluntárias foram antecipadamente instruídas sobre a forma correta de preenchimento. Os grupos de alimentos incluídos neste questionário foram o Leite e seus derivados, Cereais e derivados, Frutos secos, Chocolate, Arroz e Café.

2.4. Determinação de AFMI

A determinação de AFMI foi realizada pela técnica de ELISA de competição, através do Kit comercial RIDASCREEN® AFLATOXIN MI 30/15 (R-Biopharm AG®, Alemanha), sendo que o procedimento foi realizado de acordo com as instruções do fabricante, inclusas no Kit.

Para além dos materiais e reagentes fornecidos pelo kit, foram ainda utilizadas pipetas de precisão (20, 100, 200 e 1000µL), pipetas graduadas de 10, 5 e 1mL, água destilada, agitador vórtex, tubos Eppendorff®, pipetas de Pasteur, leitor de microplacas de ELISA (Ascent, Reagente 5, Porto) e Centrífuga (Sigma 3K15, Reagente 5, Porto).

As amostras foram descongeladas e sujeitas a centrifugação durante 10 minutos, a 3500g e 10°C. De seguida, a camada lipídica superior foi removida na totalidade com uma pipeta de Pasteur, e o leite magro recolhido para um tubo eppendorff®. Depois de registar as posições (em poços duplicados) das soluções padrão e amostras, adicionou-se

100µl de anticorpo ao fundo de cada poço. Agitou-se a placa, manualmente, com cuidado, e incubou-se, durante 15 minutos, à temperatura ambiente (20-25°C) no escuro. Retirou-se o líquido dos micropoços e sacudiu-se três vezes seguidas, vigorosamente, o suporte de tiras invertido contra papel absorvente, para assegurar a remoção completa do líquido dos poços. Adicionaram-se 250µL de tampão de lavagem diluído e removeu-se o líquido novamente. O procedimento de lavagem foi repetido duas vezes. Em seguida, adicionou-se 100µl das soluções padrão e amostras preparadas aos poços individuais em duplicado. Agitou-se a placa, manualmente, com cuidado, e incubou-se, durante 30 minutos, à temperatura ambiente (20-25°C) no escuro. Efectuou-se o procedimento de lavagem, descrito anteriormente, três vezes. Acrescentaram-se em seguida 100 µL do conjugado enzimático. Agitou-se manualmente, com cuidado, a placa antes de uma incubação durante 15 minutos, à temperatura ambiente, (20-25°C) no escuro. Efectuou-se novamente o procedimento de lavagem, descrito anteriormente, três vezes. Acrescentaram-se 100µL de substrato/cromogéneo a cada poço. Agitou-se a placa, manualmente, com cuidado, antes de uma incubação de 15 minutos à temperatura ambiente (20-25°C), no escuro. Adicionaram-se 100µL de solução stop a cada poço, agitou-se manualmente, com cuidado, a placa e mediu-se de imediato a absorvância, a 450nm.

Foi construída uma curva padrão com 6 concentrações (0; 5; 10; 20; 40 e 80ng/L) em duplicado. A quantificação de AFMI nas amostras foi feita através da seguinte fórmula:

$$\frac{\text{Absorvância do padrão (ou amostra)}}{\text{Absorvância do padrão } 0 \text{ } \mu\text{g/L}} \times 100\% = \% \text{ Absorvância}$$

Foi efetuada a equivalência do padrão de 0 µg/L a 100%, para que os valores de absorvância fossem apresentados em percentagem. Os valores calculados para os padrões foram introduzidos num sistema de calibração semi-logarítmico para obter a concentração de aflatoxina M1 (ng/L). De acordo com o fabricante, o limite de detecção correspondia a 5ng/L.

2.5. Ingestão diária estimada

O cálculo da ingestão diária estimada (IDE) de AFMI foi efectuado pelo método determinístico, de acordo com a fórmula seguinte:

$$\text{IDE (ng/Kg peso corporal/dia)} = [\text{AFMI}] \times [\text{consumo de leite}] / \text{peso corporal}$$

O teor em AFMI ([AFMI]) correspondeu à concentração média determinada nas amostras positivas ($\geq 5\text{ng/L}$). Relativamente ao consumo diário de leite foram consideradas duas estimativas (Ministério da Saúde, 2016): 150mL/kg (para bebés com peso até 7kg) e 1L (para bebés com peso igual ou superior a 7kg). O peso corporal médio e a concentração de AFMI foram calculados para ambos os grupos.

A percentagem da ingestão diária tolerável (IDT) resultante do consumo de leite materno foi calculado como segue:

$$\%IDT = \text{IDE} / \text{IDT} \times 100$$

O valor de IDT considerado (0,2 ng/kg p.c.) foi proposto por Kuiper-Goodman (1990).

2.6. Análise estatística

A análise estatística foi efectuada com recurso ao Software R[®]. Foi efectuada uma estatística descritiva. Sempre que duas amostras independentes foram comparadas relativamente aos níveis de AFMI, foi aplicado o teste não-paramétrico Wilcoxon Mann Whitney Test. Foram igualmente pesquisadas correlações entre variáveis procurando possíveis tendências entre os níveis de AFMI e um ou mais fatores determinantes. Devido à natureza não paramétrica de praticamente todos os dados foi aplicado o teste de Spearman.

3. Resultados e Discussão

3.1. Determinação de AFMI

O teor de AFMI foi calculado através da curva de soluções padrão obtida por determinações duplas de seis níveis de concentração e da respectiva equação exponencial $y=105.21E(-0,02x)$, com um Coeficiente de correlação calculado como $r^2=0,9940$.

Relativamente às características sociais e demográficas da amostra (Tabela 1), verificou-se que as 37 mães que participaram neste estudo tinham uma idade compreendida

entre 21 e 41 anos (média 33,7 anos), variando entre um e três filhos (média de 1,5 filhos por mãe). O tempo de amamentação, igualmente considerado, variou entre um e 26 meses (tempo médio de amamentação de oito meses).

Das 37 amostras analisadas, nove (24,3%) foram determinadas como positivas, com teor de AFMI médio de $7,8 \pm 2,1$ ng/L.

Considerando os estudos semelhantes publicados desde 2010 (Tabela 2) verificou-se que o **teor médio** de AFMI determinado no presente estudo foi semelhante ao registado num estudo realizado em Chipre ($7,84 \pm 1,72$; Kunter et al., 2017), mas inferior ao registado na Sérvia (175.09 ± 149.98 ; Radonić et al., 2017), na Jordânia ($67,78 \pm 4,6$; Omar, 2012) e no Egípto ($74,413 \pm 7,07$; El-Tras. El-Kady. & Tayel (2011)).

Apesar de não existir legislação aplicável ao leite materno, é de notar que nenhuma das amostras contaminadas com AFMI excedeu o limite legalmente aplicável ao leite para alimentação infantil (25 ng/L; EC, 2006). Alguns estudos prévios registaram elevado número de amostras com valores de AFMI superiores a 25 ng/L, como na Jordânia (96,25%; Omar, 2012), Egípto (52%; El-Tras et al., 2011), bem como na Turquia (21,2%; Kılıç Altun, Gürbüz, & Ayag, 2016). No entanto, é de realçar que o **valor máximo** de AFMI determinado no presente estudo (10,6 ng / L) excedeu o nível máximo de AFMI permitido para alimentação infantil na Áustria e Suíça (10 ng/l); Maleki et al., 2015).

Tabela 9. Características sociais e demográficas das mães participantes.

Variável	Categoria	Número de amostras
Idade	<30	6 (16,2%)
	[30; 35[15 (40,5%)
	> 35	16 (43,2%)
Número de fill	1	19 (51,4%)
	2	16 (43,2%)
	3	2 (5,4%)
Escolaridade	Obrigatória (12° anc	4 (10,8%)
	Bacharelato/ Licenciat	25 (67,6%)
	Mestrado/ Doutorame	8 (21,6%)

Comparando a taxas de incidência do presente estudo, verificou-se que é similar à registada na Turquia (Atasever, Yildirim, Atasever, & Tastekin, 2014) e apenas superior à registada no Brasil (Ishikawa *et al.*, 2016) e Irão (Ghiasain & Maghsood, 2012; Jafari, Fallah, Kheiri, Fadaei, & Amini, 2017). Tais diferenças na taxa de incidência, teores médios e intervalos de contaminação podem ser justificadas pelas características dos métodos analíticos empregues, bem como como nas condições ambientais e de armazenamento de alimentos (Elaridi *et al.*, 2017). Conforme apresentado na tabela 2, os métodos analíticos aplicados basearam-se sobretudo em técnicas de ELISA e, com menor frequência, HPLC.

Considerando os resultados obtidos e o facto de que as consequências para a saúde dos bebés em caso de exposição à AFMI ainda são pouco reconhecidas, é importante reunir informações sobre a exposição materna e infantil precoce, visando a identificação de possíveis padrões e determinantes de exposição (Polychronaki *et al.*, 2007).

O tempo de amamentação, relacionável com a fase da lactação e a idade da criança, apresentou uma diferença estatisticamente significativa ($p=0.002$). Recentemente, na Sérvia (Radonić *et al.*, 2017), foram determinados níveis de AFMI em amostras de colostro até 503 ng/L ($175,09 \pm 149,98$ ng / L), com uma ocorrência de 36,4%. Achados semelhantes foram previamente relatados, conforme revisto por Warth *et al.* (2016). Apesar das grandes lacunas no conhecimento, as possíveis variações na transferência galactogénica da AFMI podem refletir mudanças temporárias nas características fisiológicas, tais como níveis de tecido adiposo, idade, composição e volume do leite, desmame gradual e padrões de amamentação (Polychronaki *et al.*, 2007).

Analisando a estação de colheita de amostras, observou-se que todas as amostras positivas foram colhidas no verão e que nenhuma das amostras colhidas no Inverno ($n=11$) foi positiva. As condições climáticas conducentes a uma maior contaminação dos alimentos ingeridos durante o verão, assim como possíveis variações sazonais de hábitos alimentares e de consumo de bebidas alcoólicas pode levar a uma ingestão diferente de AFMI durante o ano. Já anteriormente havia sido descrita uma contaminação de AFMI significativamente superior nos meses de Verão, designadamente no Egito ($p < 0,001$; Polychronaki *et al.*, 2007) e no Líbano ($p < 0,05$; Elaridi *et al.*, 2017).

Tendo em conta a escolaridade das mães participantes no estudo, verificou-se que apenas uma (11,1%) das amostras contaminadas com AFMI correspondeu a leite materno de mãe com Mestrado. Um padrão semelhante foi descrito anteriormente no Líbano (Elaridi *et al.*, 2017), Colômbia (Diaz & Sanchez, 2015) e Nigéria (Adejumo *et al.*, 2013). No último estudo, apenas 4% das amostras positivas pertenciam a mães com maior

qualificação académica (Universitária/ Pós-Graduação). A possível justificação pode residir na classe socioeconómica, uma vez que a escolaridade influencia o rendimento económico e, indiretamente, a qualidade dos alimentos consumidos e os padrões de consumo de alimentos.

Todas as amostras de leite materno positivas para AFMI corresponderam a mães residentes Aveiro, considerado uma área rural (PRODER, nd). Já previamente haviam sido registados ocorrências e teores de AFMI superiores em áreas rurais da Colômbia (Diaz & Sanchez, 2015) e Irão (Jafari et al., 2017). Conforme recentemente sublinhado por Marroquín-Cardona, Johnson, Phillips e Hayes (2014), as populações que vivem em áreas rurais são geralmente mais desfavorecidas economicamente e, portanto, podem ser forçadas a consumir alimentos de menor qualidade. Além disso, as populações rurais são mais dependentes de alimentos produzidos localmente para a sua subsistência, ou seja, culturas básicas suscetíveis à contaminação fúngica.

Tabela 10. Ocorrência e teores de AFMI em amostras de leite materno de acordo com estudos recentes.

País (ano)	Incidência (%)	Teor médio±DP (ng/L)	Intervalo de contaminação (ng/L)	Método analítico (LD, ng/L)	Referência
Portugal (2015/2016)	9/37 (24,3%)	7,8±2,1	5,4 - 10,6	ELISA (5)	Estudo presente
Chipre (2017)	40/50 (80 %)	7,84±1,72	5,36-28,44	ELISA (5)	Kunter et al. (2017)
Irão (2017)	39/250 (15,6 %)	4,54±0,47	1,1-39,3	ELISA (2,3)	Jafari et al. (2017)
Sérvia (2017)	20/55 (36,4%)	175,09 ± 149,98	5,40-503,0	ELISA (5)	Radonić et al. (2017)
Brasil (2016)	5/94 (5,3 %)	18±5	13-25	HPLC-FD (0,021)	Ishikawa et al. (2016)
Líbano (2016)	104/111 (93,8 %)	4,31±1,8	0,22-7,89	ELISA (0,2)	Elaridi et al. (2017)
Turquia (2016)	66/74 (89,2 %)	19,0±13,0	9,6-80	ELISA (5)	Kiliç Altun et al. (2016)
Colômbia (2015)	45/50 (90 %)	5,2	0,9-18,5	HPLC (0,6)	Diaz & Sanchez (2015)
México (2015)	100/112 (89 %)	Inverno-12,78 Primavera-12,09 Verão-7,91	3,01-34,24	ELISA (0,92)	Cantú-Cornelio et al. (2016)
Irão (2015)	85/85 (100 %)	5,91±2,03	2,0-10	ELISA (5)	Maleki et al. (2015)
Turquia (2014)	18/73 (24,6 %)	3,01±1,42	1,3-6	ELISA (10)	Atasever et al. (2014)
Irão (2012)	8/132 (6,06 %)	9,45±1,50	7,1-10,8	ELISA (5)	Ghiasain & Maghsood (2012)
Jordânia (2012)	80/80 (100 %)	67,78±4,6	9,71-137,18	ELISA (5)	Omar (2012)
Egito (2011)	87/125 (69,6 %)	74,413±7,07	7,3-328,6	ELISA (5)	El-Tras, El-Kady. & Tayel (2011)
Nigéria (2010)	41/50 (82,0 %)	-	n.d. - 92,14	HPLC (10)	Adejumo et al. (2013)

(LOD, Limite de detecção; n.d., não detectado; DP, Desvio padrão)

Uma vez que o teor de micotoxinas no leite está relacionado com os hábitos alimentares maternos, associou-se o questionário alimentar à determinação analítica de AFMI em amostras de leite materno. De acordo com os dados de consumo semiquantitativo recolhidos no questionário alimentar, as amostras de leite positivas para AFMI apresentaram uma correlação fraca a moderada com o consumo de cereais (0,43) e café (-0,54). O consumo de pão e cereais foi determinante para a ocorrência de AFMI no leite materno entre as mães lactantes em estudos anteriores (Cantú-Cornelio et al., 2016; Jafari et al., 2017; Sadeghi et al., 2009). Importa igualmente realçar que a diferença sazonal observada no presente estudo pode ainda estar associada aos longos períodos de armazenamento dos cereais e oleaginosas durante o Inverno e a Primavera. Em Portugal, os cereais importados para consumo humano ou para consumo animal, são colhidos no Verão e permanecem armazenados em silos durante vários meses (até à colheita seguinte) o que aumenta a probabilidade de desenvolvimento de fungos de armazenamento e o risco de desenvolvimento de AFBI nos cereais e respectivos derivados.

Relativamente à correlação negativa determinada entre o teor de AFMI no leite materno e o consumo de café, poderá ser razoável assumir que, durante a amamentação as mães substituam o consumo de café por outras bebidas, como por exemplo chás, que poderão eventualmente estar contaminadas com aflatoxinas.

3.2 Ingestão diária estimada de AFMI

Como referido por Warth et al. (2016) no leite materno pode estar presente, além do principal metabolito, AFMI, a micotoxina AFBI, bem como outras aflatoxinas e seus metabolitos. No entanto, a determinação de AFMI nas amostras de leite materno analisadas no presente estudo, permitiu o cálculo da ingestão diária estimada de AFMI.

O valor do peso corporal utilizado no cálculo da IDE correspondeu à média do peso dos bebés correspondentes a mães com leite contaminado com AFMI, i.e, 8,64 kg. O consumo diário de leite materno foi considerado 1 L, uma vez que todas as amostras de leite positivas corresponderam a mães com recém-nascidos com peso superior a 7 kg (Ministério da Saúde, 2016). A IDE por bebé foi de 0,903ng/Kg p.c./dia. Foi ainda considerado o pior cenário, com o consumo de leite materno com o máximo valor de AFMI determinado (correspondente a uma amostra de leite de uma mãe lactante de um bebé de oito meses, com 8,5 kg). Neste cenário, a IDE do bebé foi determinado uma IDE de 1,25 ng / kg p.c./dia. A preocupação da contaminação potencial do leite materno com AFMI é justificada, tendo

em conta que 1,0 ng / kg p.c./ dia é considerado o nível acima do qual existe risco de cancro hepático para os consumidores (EFSA, 2007).

De facto, tendo em conta o valor da IDT proposto por Kuiper-Goodman (1990; 0.2 ng/kg p.c.) a percentagem da ingestão diária tolerável (IDT) resultante do consumo de leite materno seria 451,5%, considerando o valor médio de AFMI em todas as amostras contaminadas, e 625% para o pior cenário (i.e. contaminação com o valor mais elevado, 10,6 ng/L). Estudos prévios registaram valores de IDE superiores, designadamente no México (2,35 ng/kg p.c./dia; Cantú-Cornelio *et al.*, 2016) e Irão (4.56-6.88 ng/kg p.c./dia; Ghiasain & Maghsood, 2012).

4. Conclusão

Os resultados obtidos deste primeiro estudo de AFMI em leite humano em Portugal pode contribuir para um aumento consciencialização sobre a exposição às aflatoxinas. Das trinta e sete amostras analisadas, nove (24,3%) continham níveis de AFMI acima do limite de deteção, (5 ng / L), variando entre 5,4 e 10,6 ng / L e valor médio de (7,8 ± 2,1 ng / L). Nenhuma das amostras excedeu o Limite máximo de AFMI regulamentado pela CE para leite para bebés e ou fórmulas infantis. A associação estatisticamente significativa com as amostras recolhidas no verão, menor nível de escolaridade e o consumo de arroz e chocolate pelas mães lactantes, foram as principais características do padrão de exposição. Todas as amostras de leite materno positivas para AFMI corresponderam a mães residentes no distrito de Aveiro, considerado uma área rural (PRODER, nd). As amostras de leite positivas para AFMI apresentaram uma correlação fraca a moderada com o consumo de cereais (0,43) e café (-0,54). O consumo de pão e cereais foi determinante para a ocorrência de AFMI no leite materno entre as mães lactantes em estudos anteriores. Importa igualmente realçar que a diferença sazonal observada no presente estudo pode ainda estar associada aos longos períodos de armazenamento dos cereais e oleaginosas durante o Inverno e a Primavera. Considerando os resultados obtidos e o facto de que as consequências para a saúde dos bebés em caso de exposição à AFMI ainda são pouco reconhecidas, é importante reunir informações e realizar mais estudos sobre a exposição materna e infantil precoce, visando a identificação de possíveis padrões e determinantes de exposição.

5. Referências Bibliográficas

ABBAS A. Hamed *et al.*, 2006 - Aflatoxin and fumonisin contamination of corn (maize, *Zea mays*) hybrids in Arkansas. *Crop Protection* 25 (2006) [Acedido em Maio de 2016]
Disponível na Internet: www.sciencedirect.com.

ABBAS H.K.; ZABLOTOWICZ RM; BRUNS HA., 2008 - Modelling the colonisation of maize by toxigenic and non-toxigenic *Aspergillus flavus* strains: implications for biological control. *World Mycotoxin Journal*, 1, 333-340.

ABBAS K. Hamed *et al.*, 2006 - Mycotoxin contamination in corn smut (*Ustilago maydis*) galls in the field and in the commercial food products. *Food Control* 71 (2017) 57e63. [Acedido em Maio de 2016] Disponível na Internet: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.06.006>.

ACCINELLI Cesare *et al.*, 2014 - Aflatoxin contamination of corn under different agro-environmental conditions and biocontrol applications. *Crop Protection* 63 (2014) 9e14. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cropro.2014.04.021>.

ADEJUMO Oloyede *et al.*, 2013 - Correlation between aflatoxin M1 content of breast milk, dietary exposure to aflatoxin B1 and socioeconomic status of lactating mothers in Ogun State, Nigeria. *Food and Chemical Toxicology* 56 (2013) 171–177 [Acedido em Maio de 2016] Disponível na Internet: <http://www.elsevier.com/locate/foodchemtox>.

ADEKOYA Ifeoluwa *et al.*, 2018 - Fungal and mycotoxin contamination of fermented foods from selected south african markets. *Food Control* 90 (2018) 295e303. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.02.040>.

AFSHAR P. *et al.*, 2013 - Occurrence of Ochratoxin A and Aflatoxin M1 in human breast milk in Sari, Iran. *Food Control* 31 (2013) 525e529. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.12.009>.

ALDARS-GARCIA, Laila *et al.*, 2016 - Modeling postharvest mycotoxins in foods: recent research. *Current Opinion in Food Science* 2016, 11:46–50. Available online 20th September 2016 <http://dx.doi.org/10.1016/j.cofs.2016.09.005>.

AL-ZOREKY Najeeb S., Farag A. Saleh, 2017 - Limited survey on aflatoxin contamination in rice. Saudi Journal of Biological Sciences. <http://dx.doi.org/10.1016/j.sjbs.2017.05.010>.

ANITHA S. *et al.*, 2014 - The association between exposure to aflatoxin, mutation in TP53, infection with hepatitis B virus, and occurrence of liver disease in a selected population in Hyderabad, India. Mutation Research 766 (2014) 23–28.
<http://www.elsevier.com/locate/gentox>.

ANSELMO Carina de Souza *et al.*, 2018 - Zebrafish (*Danio rerio*): A valuable tool for predicting the metabolism of xenobiotics in humans - Comparative Biochemistry and Physiology, Part C 212 (2018) 34–46 October 2018, Pages 34-46
<https://www.elsevier.com/locate/cbpc>.

ASIM Mohammad *et al.*, 2011 -Role of Aflatoxin B1 as a risk for primary liver cancer in north Indian population. Clinical Biochemistry 44 (2011) 1235–1240 www.elsevier.com/locate/clinbiochem.

ASSUNÇÃO Ricardo *et al.*, 2018 - Portuguese children dietary exposure to multiple mycotoxins – An overview of risk assessment under MYCOMIX project. Food and Chemical Toxicology 118 399-408. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.05.040>.

ATASEVER Meryem *et al.*, 2014 - Assessment of aflatoxin M1 in maternal breast milk in Eastern Turkey. Food and Chemical Toxicology 66 (2014) 147–149. Acedido a Junho 2017. Disponível na Internet: <http://www.sciencedirect.com>.

ATEHNKENG Joseph *et al.*, 2008 - Distribution and toxigenicity of *Aspergillus* species isolated from maize kernels from three agro-ecological zones in Nigeria. International Journal of Food Microbiology 122 (2008) 74–84. Acedido a Junho 2017. Disponível na Internet: <http://www.sciencedirect.com/>.

AZARIKIA Manizheh; MAHDAVI Reza, NIKNIAZ Leila, 2018- Occurrence and dietary factors associated with the presence of aflatoxin B1 and M1 in breast milk of nursing mothers in Iran. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.11.009>.

BAHT Rajeev; Kasa Ravindra Nadha Reddyet, 2017 - Challenges and issues concerning mycotoxins contamination in oil seeds and their edible oils: Updates from last decade Food Chemistry 215 (2017) 425–437. <http://www.elsevier.com/locate/foodchem>.

BALLARD Olivia; Morrow Ardythe L., 2013 - Human Milk Composition: Nutrients and Bioactive Factors. www.ncbi.nlm.nih.gov > NCBI > Literature > PubMed Central (PMC). [Acedido a 13/01/2016]. Disponível na Internet: www.ncbi.nlm.nih.gov > NCBI > Literature > PubMed Central (PMC).

BAQUIÃO Arianne Costa *et al.*, 2012 - Fungal and mycotoxin contamination was investigated in field samples of nuts, shells and pods of the Brazil nut collected during different periods in Itacoatiara, State of Amazonas, Brazil. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.05.004>.

BAQUIÃO Arianne Costa *et al.*, 2013 - Polyphasic approach to the identification of *Aspergillus* section Flavi isolated from Brazil nuts. Acedido em Junho 2017. Disponível na Internet: <http://www.elsevier.com/locate/foodchem>.

BAQUIÃO Arianne Costa; LOPES Evandro Luiz; CORRÊA Benedito, 2016 - Molecular and mycotoxigenic biodiversity of *Aspergillus flavus* isolated from Brazil nuts. Food Research International 89 (2016) 266–271) Acedido em Junho 2017. Disponível na Internet: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2016.08.005>.

BATTILANI P. *et al.*, 2016 - Aflatoxin B₁ contamination in maize in Europe increases due to climate change. Sci Rep. 2016; 6: 24328. Published online 2016.PMC. Published online 2016 Apr 12. doi: 10.1038/srep24328 .acedido a NCBI PUBMED.

BBOSA G.S.*et al.*, 2013 - Review of the biological and health effects of aflatoxins on body organs and body systems. In: Razzaghi-Abyaneh M., editor. Aflatoxins—Recent Advances and Future Prospects. InTech; Rijeka, Croatia: 2013. pp. 239–265.ncbi.

BERNALDEZ Victoria *et al.*, 2017 - The influence of ecophysiological factors on growth, aflR gene expression and aflatoxin B₁ production by a type strain of *Aspergillus flavus*. LWT - Food Science and Technology 83 (2017) 283 e 291 [Acedido a 09.08.2018]. Disponível na internet <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2017.05.030>.

BIANCO G. *et al.*, 2012 - Modulation of macrophage activity by aflatoxins B1 and B2 and their metabolites aflatoxins M1 and M2. *Toxicon* 59 (2012) 644–650.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2012.02.010>.

BOGALHO Fernando *et al.*, 2018 - Exposure assessment of Portuguese infants to Aflatoxin M1 in breast milk and maternal social-demographical and food consumption determinants. *Food Control* 90 (2018) 140e145. www.elsevier.com/locate/foodcont.

BROOM Leon, 2015 - Mycotoxins and the intestine. *Animal Nutrition* 1 (2015) 262e265.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.aninu.2015.11.001>.

BRUCHIM Y. *et al.*, 2012 - Accidental fatal aflatoxicosis due to contaminated commercial diet in 50 dogs. *Research in Veterinary Science* 93 (2012) 279–287 [Acedido a 09.08.2018]
Disponível na internet:www.elsevier.com/locate/rvsc.

BRYDEN Wayne L., 2012 - Mycotoxin contamination of the feed supply chain: Implications for animal productivity and feed security. *Animal Feed Science and Technology* 173 (2012) 134– 158. <http://www.elsevier.com/locate/anifeedsci>.

C. VERHEECKE, T. Liboz, F. Mathieu - Microbial degradation of aflatoxin B1: Current status and future advances. *International Journal of Food Microbiology* 237 (2016) 1–9.

CALONI F *et al.*, 2006 - Aflatoxin M₁ absorption and cytotoxicity on human intestinal in vitro model. Volume 47. Issue 4.15 March 2006, Pages 409–415.
<http://www.elsevier.com/locate/toxicon>.

CALONI Francesca; CORTINOVIS Cristina, 2011 - Toxicological effects of aflatoxins in horses. *The Veterinary Journal* 188 (2011) 270–273. www.elsevier.com/locate/tvj.

CANTÚ-CORNELIO F. *et al.*, 2016 - Occurrence and factors associated with the presence of aflatoxinM1 in breast milk samples of nursing mothers in central Mexico. *Food Control* 62 (2016) 16–22. [Acedido a 09.08.2018] Disponível na internet
<http://www.elsevier.com/locate/foodcont>.

CARUSO M. *et al.*, 2009 - A clonal cell line (BME-UV1) as a possible model to study bovine mammary epithelial metabolism: metabolism and cytotoxicity of aflatoxin B1. *Toxicol* 53 (2009) 400–408. <http://www.elsevier.com/locate/toxicol>.

CDC Center for disease control. Health studies program - Chemical exposure [Acedido a 10/06/2016]. Disponível na Internet: www.cdc.gov/nceh/hsb/chemicals/aflatoxin.htm.

CHAUHAN Yashvir *et al.*, 2015 - An improved simulation model to predict pre-harvest aflatoxin risk in maize. *Field Crops Research* 178 (2015) 91–99 [Acedido a 09.08.2018]. Disponível na internet: <http://www.elsevier.com/locate/fcr>.

CHEN Chen *et al.*, 2018 - Exposure to aflatoxin and fumonisin in children at risk for growth impairment in rural Tanzania Chen Chena. *Environment International* 115 (2018) 29–37. <http://www.elsevier.com/locate/envint>.

CHERKANI-HASSANI Abha; MOJEMMI Brahim; MOUANE Nezha, 2016 - Occurrence and levels of mycotoxins and their metabolites in human breast milk associated to dietary habits and other factors: A systematic literature review, 1984e2015 <http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2016.01.024>.

CHU Yu-Ju *et al.*, 2018 - Aflatoxin B1 exposure increases the risk of hepatocellular carcinoma associated with hepatitis C virus infection or alcohol consumption. *European Journal of Cancer* 94 (2018) 37e46. www.ejancer.com.

Codex Alimentarius Commission, 2014. Discussion Paper on the Possible Revision of the Code of Practice for the Prevention and Reduction of Mycotoxin Contamination in Cereals (Cac/rcp 51e 2003), 8th Session. Codex Committee on Contaminants in Foods, The Hague, the Netherlands, 31 March-4 April 2014. ftp://ftp.fao.org/codex/meetings/cccf/cccf8/cf08_14e.pdf.

COPETTI Marina V. *et al.*, 2014 - Fungi and mycotoxins in cocoa: From farm to chocolate. *International Journal of Food Microbiology* 178 (2014) 13–20. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.02.023>.

COPETTI Marina V. *et al.*, 2011 - Aflatoxigenic fungi and aflatoxin in cocoa. The occurrence of aflatoxigenic species is high in tropical countries.

COPETTI Marina V. *et al.*, 2012 - Co-occurrence of ochratoxin a and aflatoxins in chocolate marketed in Brazil. *Food Control* 26 (2012) 36e41.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.12.023>.

CORCUERA L. A., *et al.*, 2012 - An approach to the toxicity and toxicokinetics of aflatoxin B1 and ochratoxin A after simultaneous oral administration to fasted F344 rats. *Food and Chemical Toxicology* 50 (2012) 3440–3446. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2012.06.048>.

COTTY J. Peter; JAIME-GARCIA Ramon, 2007 - Influences of climate on aflatoxin producing fungi and aflatoxin contamination. *International Journal of Food Microbiology* 119 (2007) 109–115 [Acedido a 09.08.2018]. Disponível na internet: <http://www.sciencedirect.com>.

CREPPY Edmund E., 2002 - Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe. *Toxicol Lett.* 2002 Feb 28;127(1-3):19-28. Review. Acedido em Agosto 2017. <http://www.elsevier.com/locate/toxlet>.

CUNHA Sara; SÁ Soraia V.M.; FERNANDES José, 2018 - Multiple mycotoxin analysis in nut products: Occurrence and risk characterization. *Food and Chemical Toxicology* 114 (2018) 260–269. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.02.039>.

DIAZ Gonzalo J., Marlib Paloma Sánchez, 2015 - Determination of aflatoxin M₁ in breast milk as a biomarker of maternal and infant exposure in Colombia. *Food Additives & Contaminants: Part A*. Volume 32, Issue 7, 2015. *pages* 1192-1198.

DING Xiaoxia *et al.*, 2012 - Aflatoxin B1 in post-harvest peanuts and dietary risk in China. *Food Control* 23 (2012) 143e148. <http://www.elsevier.com/locate/foodcont>.

DONNER Matthias *et al.*, 2009 - Distribution of *Aspergillus* section *Flavi* in soils of maize fields in three agroecological zones of Nigeria. *Soil Biology & Biochemistry* 41 (2009) 37–44. [Acedido a 09.08.2018]. Disponível na internet: <http://www.elsevier.com/locate/soilbio>.

DUARTE S.C. *et al.*, 2013 - Aflatoxin M1 in marketed milk in Portugal: Assessment of human and animal exposure. *Food Control* 30 (2013) 411e417.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.08.002>.

EDIAGE Emmanuel Njumbe *et al.*, 2013 - Multimycotoxin analysis in urines to assess infant exposure: A case study in Cameroon. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envint.2013.04.002>.

EFSA - Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in the Food Chain on a request from the Commission related to Aflatoxin B1 as undesirable substance in animal feed.

EFSA (CONTAM), 2004 - Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in the Food Chain on a request from the Commission related to Aflatoxin B1 as undesirable substance in animal feed.

EFSA SCIENTIFIC REPORT, 2012 - Modelling, predicting and mapping the emergence of aflatoxins in cereals in the EU due to climate change.

EFSA, 2013 - TECHNICAL REPORT Aflatoxins (sum of B1, B2, G1, G2) in cereals and cereal-derived food products | European Food Safety Authority.

EFSA European Food Safety Authority - Summary of the 2015 Data Collection on Contaminant Occurrence Data. Acedido a 26/08/2016. Disponível em www.efsa.europa.eu/publications.

EFSA, 2007 - 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. *EFSA J.* 446, 1–127.

EFSA, 2014 - Scientific opinion on the risks for human and animal health related to the presence of modified forms of certain mycotoxins in food and feed. *EFSA J.* 12, 3916.

EGNERA Patricia, Alvaro Muñoz b, Thomas W. Kensler a, 2003 - Chemoprevention with chlorophyllin in individuals exposed to dietary aflatoxin. *Mutation Research* 523–524 (2003) 209–216. doi:10.1016/S0027-5107(02)00337-8.

EL-TRAS Wael F. *et al.*, 2011- Infants exposure to aflatoxin M₁ as a novel foodborne zoonosis. *Food and Chemical Toxicology* 49 (2011) 2816–2819.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2011.08.008>.

ELZUPIR A. O. *et al.*, 2012 - Aflatoxin M₁ in breast milk of nursing Sudanese mothers. *May 2012, Volume 28, Issue 2, pp 131-134 Micotoxin Research. May 2012, Volume 28, Issue 2, pp 131–134.*

Encyclopedia of Dairy Sciences (Second Edition), 2011 - Yeasts and Molds: Aspergillus flavus. Pages 785-791.

European Commission, 2006 - Commission Regulation (EC) 401/2006 laying down the methods of sampling and analysis for the official control of the levels of mycotoxins in foodstuffs. *Off. J. Eur. Union. L 70/12-34.*

European Commission, 2006 - Commission Regulation (EC) 1881/2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. *Off. J. Eur. Union. L 364/ 5-24.*

European Commission, 2007 - Commission Regulation (EC) 1126/2007 amending Regulation (EC) No. 1881/2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs as regards Fusarium toxins in maize and maize products. *Off. J. Eur. Union. L252/3-6.*

European Commission, 2010 - Commission Regulation (EU) 165/2010 amending Regulation (EC) No 1881/2006. Setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs as regards aflatoxins. *Off. J. Eur. Union. L50/8-12.*

European Commission, 2010 - Commission Regulation (EU) 105/2010 amending Regulation (EC) No 1881/2006. Setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs as regards ochratoxin A. *Off. J. Eur. Union. L35/7-8.*

European Commission, 2014 - Regulation (EU) 519/2014 amending Regulation (EC) No 401/2006 as regards methods of sampling of large lots, spices and food supplements, performance criteria for T-2, HT-2 toxin and citrinin and screening methods of analysis.

European Commission, 2003 - Opinion of the Scientific Committee on Animal Nutrition on Undesirable Substances in Feed (Adopted on 20 February 2003). European Commission, Health & Consumer Protection Directorate General, Brussels, Belgium, pp 6-24.

EVELIEN VAN DE PERRE *et al.*, 2015 - Impact of maximum levels in European legislation on exposure of mycotoxins in dried products: Case of aflatoxin B1 and ochratoxin A in nuts and dried fruits *Food and Chemical Toxicology* 75 (2015) 112–117.

F.SEMPERE Ferre, 2016 - Worldwide occurrence of mycotoxins in rice. *Food Control* 62 (2016) 291–298.

FALLAH Aziz A, 2010 - Aflatoxin M1 contamination in dairy products marketed in Iran during winter and summer. *Food Control* 21 (2010) 1478–148.

FAO Minimizing risks posed by mycotoxins utilizing the HACCP Concept. Disponible na internet: <http://www.fao.org/>.

FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations - URL: <http://www.fao.org/home/en/> (Accessed Aug 2018).

FAO, 2001 - Safety Evaluation of Certain Mycotoxins in Food. Prepared by the Fifty-sixth meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA). FAO Food and Nutrition Paper No. 74. Rome, Italy.

FAO, 2011 - Global food losses and food waste – Extent, causes and prevention. Rome

FDA, 2016 - Bad Bug Book: Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins Handbook. 2nd Edition. Center for Food Safety and Applied Nutrition. 2012. [Acedido a 10/06/2016].

FERRE F. Sempere, 2016 - Worldwide occurrence of mycotoxins in rice. *Food Control* 62 (2016) 291–298. <http://www.elsevier.com/locate/foodcont>.

FLEURAT-LESSARD Francis, 2017 - Integrated management of the risks of stored grain spoilage by seedborne fungi and contamination by storage mould mycotoxins e An update. *Journal of Stored Products Research* 71 (2017) 22e40.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jspr.2016.10.002>.

FLEURAT-LESSARD, F., FOURAR-BELAIFA, R., BOUZNAD, Z., 2010 - Multivariate analysis of the temporal changes of fungal communities in unsafe storage conditions of some common wheat varieties in relation to relative humidity level and rice weevil infestation.

FLORES-FLORES Myra Evelyn *et al.*, 2015 - Presence of mycotoxins in animal milk: A review.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.01.020>.

GALLO Antonia *et al.*, 2016 - Effect of temperature and water activity on gene expression and aflatoxin biosynthesis in *Aspergillus flavus* on almond médium. *International Journal of Food Microbiology* 217 (2016) 162–169. [Acedido a 10 de Agosto 2018]. Disponível na internet: <http://www.elsevier.com/locate/ijfoodmicro>.

GAO Y.N. *et al.*, 2016 - Aflatoxin M1 cytotoxicity against human intestinal Caco-2 cells is enhanced in the presence of other mycotoxins. *Food and Chemical Toxicology* 96 (2016) 79e89 [Acedido a 09.08.2018]. Disponível na internet:
<http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2016.07.019>. www.elsevier.com/locate/foodchemtox.

GARCÍA Laila *et al.*, 2017 - Probability models for growth and aflatoxin B1 production as affected by intraspecies variability in *Aspergillus flavus*. *Food Microbiology* 72 (2018) 166 e175. [Acedido a 09.08.2018]. Disponível na internet:
<https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.11.015>.

GARCIA Marcelo Valle *et al.*, 2018 - Fungi in spices and mycotoxigenic potential of some *Aspergilli* isolated. *Food Microbiology* 73 (2018) 93e98.
<https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.01.013>.

GARCIA Marcelo Valle, MALLMANN Carlos Augusto, COPETTIA Marina Venturini, 2018 - Aflatoxigenic and ochratoxigenic fungi and their mycotoxins in spices marketed in Brazil. *Food Research International* 106 (2018) 136–140.
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.12.06>.

GARCÍA-MORALEJA A. *et al.*, 2015 - Analysis of mycotoxins in coffee and risk assessment in Spanish adolescents and adults. *Food and Chemical Toxicology* 86 (2015) 225–233. *Food and Chemical Toxicology* 86 (2015) 225–233 [Acedido em Maio de 2016] Disponível na Internet:<http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2015.10.014>.

GARCÍA-MORALEJA A. *et al.*, 2015 - Risk assessment of mycotoxins in coffee beverages Abstracts / *Toxicology Letters* 238S (2015) S56–S383. [Acedido em Maio de 2016] Disponível na Internet: <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxlet.2015.08.268>

GEREMEW T. *et al.*, 2016 - Occurrence of toxigenic fungi and ochratoxin A in Ethiopian coffee for local consumption. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.04.025>.

GHIASIAN SA, MAGHSOOD A.H, 2012 - Infants' Exposure to Aflatoxin M1 from Mother's Breast Milk in Iran. *Iran J Public Health*. 2012; 41(3): 119–126.

GIORNI P. ; BERTUZZI T. ; BATTILANI P. , 2016 - Aflatoxin in maize, a multifaceted answer of *Aspergillus flavus* governed by weather, host-plant and competitor fungi. *Journal of Cereal Science* 70 (2016) 256e262 [Acedido em Junho 2017]. Disponível na Internet: <http://www.elsevier.com/locate/jcs>.

GIZACHEW Dawit *et al.*, 2016 - Aflatoxin contamination of milk and dairy feeds in the Greater Addis Ababa milk shed, Ethiopia. *Food Control* 59 (2016) 773e779. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.06.060>.

GNONLONFIN *et al.*, 2013 - Mycobiota and identification of aflatoxin gene cluster in marketed spices in West Africa. A review on aflatoxin contamination and its implications in the developing world: A Sub-Saharan African perspective. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 53(2013), pp. 349-365. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.04.021>.

GROOPMAN John D. *et al.*, 2014 - Aflatoxin exposure during the first 1000 days of life in rural South Asia assessed by aflatoxin B1-lysine albumin biomarkers. *Food and Chemical Toxicology* 74 (2014) 184–189. <http://www.elsevier.com/locate/foodchemtox>.

GROSS-STEINMEYER Kerstin, EATON David, 2012 - Dietary modulation of the biotransformation and genotoxicity of aflatoxin B1. *Toxicology* 299 (2012) 69 – 79 [Acedido a 10 de Agosto 2018]. Disponível na internet: <https://doi.org/10.1016/j.tox.2012.05.016>.

GTP, 2016 - Good Trading Practices For the collection, storage, trading and transport of cereals, oilseeds, protein crops and other plant products and their by-products.

GURBAY A. *et al.*, 2010 - Exposure of newborns to aflatoxin M1 and B1 from mothers' breast milk in Ankara, Turkey. *Food and Chemical Toxicology* 48 (2010) 314–319. <http://www.elsevier.com/locate/foodchemtox>.

HASSAN Zahoor *et al.*, 2018 - Detection of toxigenic mycobiota and mycotoxins in cereal feed market. *Food Control* 84 (2018) 389e394. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.08.032>.

HELL K. *et al.*, 2013 - Mycoflora and occurrence of aflatoxin in dried vegetables in Benin, Mali and Togo, West Africa. *International Journal of Food Microbiology* 135 (2009) 99 – 104. www.elsevier.com/locate/ijfoodmicro.

HESHMATI Ali *et al.*, 2017 - Co-occurrence of aflatoxins and ochratoxin A in dried fruits in Iran: Dietary exposure risk assessment. *Food and Chemical Toxicology* 106 (2017) 202e208. Acedido a Junho 2016. Disponível na internet: <http://www.elsevier.com/locate/foodchemtox>.

HEYDT Markus Schmidt *et al.*, 2009 - Complex regulation of the aflatoxin biosynthesis gene cluster of *Aspergillus flavus* in relation to various combinations of water activity and temperature. *International Journal of Food Microbiology* 135 (2009) 231–237 [Acedido a 09.08.2018]. Disponível na internet: www.elsevier.com/locate/ijfoodmicro.

IARC, 1993 - Monograph on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Vol. 56. Lyon, France: World Health Organization. 1993. Some naturally occurring substances: Food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins; pp. 245–395.

IARC, 2002 - Monograph on the evaluation of carcinogenic risks to humans world health organization international agency for research on cancer. Volume 82. Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, aphythalene and styrene.

IARC, 2012- Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Volume 100.

IHA Maria Helena *et al.*, 2014 - Aflatoxin M₁ and ochratoxin A in human milk in Ribeirão Preto-SP, Brazil. *Food Control* 40 (2014) 310e313. Acedido a Junho 2016. Disponível na internet: <http://www.elsevier.com/locate/foodcont>.

IHA Maria Helena *et al.*, 2012 - Aflatoxin M₁ in milk and distribution and stability of aflatoxin M₁ during production and storage of yoghurt and cheese. U.S. Food and Drug Administration, Center for Food Safety and Applied Nutrition. (2012).

INGAWALE Deepa; MANDLIK Satish K., NAIK, Suresh R., 2014 - Models of hepatotoxicity and the underlying cellular, biochemical and immunological mechanism(s): A critical discussion. *Environmental toxicology and pharmacology* 37(2014) 118–133. www.elsevier.com/locate/etap.

IQBAL S.Z. *et al.*, 2015 - Aflatoxin M₁ in milk and dairy products, occurrence and recent challenges. A review. *Trends in Food Science & Technology* 46 (2015) 110e119. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2015.08.005>.

IQBAL Shahzad Zafar, ASI Muhammad Rafique JINAP S., 2013 - Variation of aflatoxin M₁ contamination in milk and milk products collected during winter and summer seasons. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.06.009>.

IQBAL Shahzad Zafar, ASI Muhammad Rafique; MALIK Noeen, 2017 - The seasonal variation of aflatoxin M₁ in milk and dairy products and assessment of dietary intake in Punjab, Pakistan. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.04.015>.

Ishikawa A.T. *et al.*, 2016 - Exposure Assessment of Infants to Aflatoxin M₁ through Consumption of Breast Milk and Infant Powdered Milk in Brazil. *Toxins* 2016, 8, 246; doi:10.3390/toxins8090246.

J H Williams *et al.*, 2004 - Human aflatoxicosis in developing countries: a review of toxicology, exposure, potential health consequences, and interventions. *Am J Clin Nutr.* 2004;80(5):1106–1122. *Am J Clin Nutr* 2004. American Society for Clinical Nutrition. <https://doi.org/10.1093/ajcn/80.5.1106> [PubMed].

JAFARIAN-DEHKORDI Abbas, POURRADI Nasibeh, 2013 - Aflatoxin M1 contamination of human breast milk in Isfahan, Iran. *Adv Biomed Res.* 2013; 2: 86. Published online 2013 Nov 30. doi: 10.4103/2277-9175.122503

JAGER A.V. Jager *et al.*, 2013 - Assessment of aflatoxin intake in São Paulo, Brazil. *Food Control* 33 (2013) 87e92 [Acedido a Junho 2016]. Disponível na internet: <http://www.elsevier.com/locate/foodcont>.

JAGER Alexandra V. *et al.*, 2016 - Assessment of aflatoxin exposure using serum and urinary biomarkers in São Paulo, Brazil: A pilot study. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 219 (2016) 294–300.[Acedido a Junho 2016]. Disponível na internet: <http://www.elsevier.com/locate/foodcont>.

JECFA, 2007 - Evaluation of certain food additives and contaminants. Sixty-eighth report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. WHO Technical Report Series, No. 947, 2007.

JECFA, 2017 - JOINT FAO/WHO EXPERT COMMITTEE ON FOOD ADDITIVES Eighty-third meeting Rome, 8–17 November 2016. Aflatoxinas.

JUAN Cristina *et al.*, 2013 - Presence of mycotoxin in commercial infant formulas and baby foods from Italian market. <http://www.elsevier.com/locate/foodcont>.

KABAK Bulent, 2012 - Aflatoxin M1 and ochratoxin A in baby formulae in Turkey: Occurrence and safety Evaluation. *Food Control* 26 (2012) 182e187. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.01.032>.

KACHAPULULA, Paul W. *et al.*, 2017 - *Aspergillus* section *Flavi* community structure in Zambia influences aflatoxin contamination of maize and groundnut. *International Journal of Food Microbiology* 261 (2017) 49–56. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.08.014>.

KATSURAYAMA Aline M. *et al.*, 2018 - Occurrence of *Aspergillus* section *Flavi* and aflatoxins in Brazilian rice: From field to market. *International Journal of Food Microbiology* 266 (2018) 213–221. Acedido em Julho 2018. Disponível na Internet: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.12.008>.

KHAN Sarah *et al.*, 2018 - Concentration of Aflatoxin M1 and selected heavy metals in mother milk samples from Pakistan. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.04.015>.

KHLANGWISSET Pornsri; SHEPHARD Felicia, 2011 - Aflatoxins and growth impairment: A review. *Critical Reviews in Toxicology*, pages 740-755. 2011 Oct;41(9):740-55. doi: 10.3109/10408444.2011.575766. Epub 2011 Jun 28.

KIMANYA Martin Epafra, 2015 - The health impacts of mycotoxins in the eastern Africa region. *Food Science* (2015) 6:7–11. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cofs.2015.11.005>.

KING Thea *et al.*, 2017 - Food safety for food security: Relationship between global megatrends and developments in food safety. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2017.08.014>.

KLINGELHOFER Doris *et al.*, 2018 - Aflatoxin: Publication analysis of a global health threat. *Food Control* 89 (2018) 280-290. Acedido a 09.08.2018. <http://www.elsevier.com/locate/foodcont>.

KLOTZ Lars-Oliver, STEINBRENNER Holger, 2017 - Cellular adaptation to xenobiotics: Interplay between xenosensors, reactive oxygen species and FOXO transcription factors. *Redox Biology* 13 (2017) 646–654. <http://dx.doi.org/10.1016/j.redox.2017.07.015>.

KOS Jovana *et al.*, 2014 - Occurrence and estimation of aflatoxin M1 exposure in milk in Serbia. *Food Control* 38 (2014) 41e46. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.09.060>.

KUCUKCAKAN Basak; HAYRULAI-MUSLIU Zehra, 2015 - Challenging Role of Dietary Aflatoxin B1 Exposure and Hepatitis B Infection on Risk of Hepatocellular Carcinoma. 2015 Jun 15; 3(2): 363–369 [Acedido a 09.08.2018]. Disponível na internet: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>.

KUMAR Pradeep *et al.*, 2017 - Aflatoxins: A Global Concern for Food Safety, Human Health and Their Management. REVIEW ARTICLE. *Front. Microbiology*, 17 January 2017 <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.02170>.

KUNTER Imge; HÜRER Nazife, 2016 - Assessment of Aflatoxin M1 and Heavy Metal Levels in Mothers Breast Milk in Famagusta, Cyprus. Article Biological Trace Element Research.pp 1-8.First online: 01 June 2016. January 2017, Volume 175, Issue 1, pp 42–49.

LAHOUAR Amani *et al.*, 2016 - Effects of temperature, water activity and incubation time on fungal growth and aflatoxin B1 production by toxinogenic *Aspergillus flavus* isolates on sorghum seeds. *Rev Argent Microbiol.* 2016; 48(1):78---85

LAI Xianwen *et al.*, 2014 - Potential for aflatoxin B1 and B2 production by *Aspergillus flavus* strains isolated from rice samples. Assessed 19/08/2016.
<https://dx.doi.org/10.1016%2Fj.sjbs.2014.09.013>.

LASRAM Salma *et al.*, 2016 - Comparative study of toxigenic potential of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus niger* isolated from Barley as affected by temperature, water activity and carbon source Salma Lasram. *Journal of Stored Products Research* 69 (2016) 58e64.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jspr.2016.06.002>.

LIU Xiao *et al.*, 2017 - Effect of water activity and temperature on the growth of *Aspergillus flavus*, the expression of aflatoxin biosynthetic genes and aflatoxin production in shelled peanuts. *Food Control* 82 (2017) 325e332. <http://www.elsevier.com/locate/foodcont>.

LIU Y. & Wu F., 2010- Global burden of aflatoxin-induced hepatocellular carcinoma: a risk assessment. *Environmental Health Perspectives*, 118(6): 818– 824. Available at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2898859>.

LIU Yan *et al.*, 2012 - Population Attributable Risk of Aflatoxin-Related Liver Cancer: Systematic Review and Meta-Analysis. *Eur J Cancer*. Author manuscript; available in PMC 2013 Sep 1. Published in final edited form as: *Eur J Cancer*. 2012 Sep; 48(14): 2125–2136. Published online 2012 Mar 8. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejca.2012.02.009>.

M. HOVE *et al.*, 2016 - Review on the natural co-occurrence of AFB1 and FB1 in maize and the combined toxicity of AFB1 and FB1. *Food Control* 59 (2016) 675e682.

MACHEREY Anne-Christine, DANSETTE Patrick M., 2015) - Biotransformations Leading to Toxic Metabolites: Chemical Aspects. 2015, Pages 585-614. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-417205-0.00025-0>.

MALEKI Farajollah *et al.*, 2015 - Exposure of Infants to Aflatoxin M1 from Mother's Breast Milk in Ilam, Western Iran. *Public Health Res Perspect* 2015 6(5), 283e287. <http://dx.doi.org/10.1016/j.phrp.2015.10.001>

FAO, 2001 - Manual on the application of the HACCP system in Mycotoxin prevention and control.

MARCHESE Sílvia *et al.*, 2018 - Aflatoxin B1 and M1 Biological Properties and Their Involvement in Cancer Development. Published online 2018 May 24. doi: 10.3390/toxins10060214.

MARÍA Ibáñez-Vea, 2011 - Co-occurrence of aflatoxins, ochratoxin A and zearalenone in breakfast cereals from spanish market. *Food Control* 22 (2011) 1949e1955.

MARIJANI Esther *et al.*, 2017 - Mycoflora and mycotoxins in finished fish feed and feed ingredients from smallholder farms in East Africa. <https://doi.org/10.1016/j.ejar.2017.07.001>.

MARIN S. *et al.*, 2013 - Mycotoxins: Occurrence, toxicology, and exposure assessment. *Food and Chemical Toxicology* 60 (2013) 218–237.

MARTINS Carla *et al.*, 2018 - Assessment of multiple mycotoxins in breakfast cereals available in the Portuguese market Carla Martins. *Food Chemistry* 239 (2018) 132–140. <http://www.elsevier.com/locate/foodchem>.

MARY Verónica S. *et al.*, 2012 - Reactive oxygen species sources and biomolecular oxidative damage induced by aflatoxin B1 and fumonisin B1 in rat spleen mononuclear cells. *Toxicology* 302 (2012) 299–307. <http://www.elsevier.com/locate/foodchemtox>.

MAURO Antonio *et al.*, 2013 - Structure of an *Aspergillus flavus* population from maize kernels in northern Italy. *International Journal of Food Microbiology* 162 (2013) 1–7. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.12.021>.

MEDINA Angel *et al.*, 2017 - Climate change, food security and mycotoxins: Do we know enough? *Fungal biology reviews* 31 (2017) 143 e154. <http://www.elsevier.com/locate/fbr>.

MEDINA Angel *et al.*, 2017 - Interactions between water activity and temperature on the *Aspergillus flavus* transcriptome and aflatoxin B1 production. *International Journal of Food Microbiology* 256 (2017) 36–44.[Acedido em Junho 2017]. Disponível na Internet: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.05.020>.

MILIĆEVIĆ DR¹, SKRINJAR M, BALTIC T., 2016 - Real and Perceived Risks for Mycotoxin Contamination in Foods and Feeds: Challenges for Food Safety Control. <https://dx.doi.org/10.3390%2Ftoxins2040572>.assessed 24/07/2016.

MOHAMED Amine Gacem, 2016 - Toxicology, biosynthesis, bio-control of aflatoxin and new methods of detection. Assessed 21/08/2016. Science direct.

MONYO E.S. *et al.*, 2012 - Occurrence and distribution of aflatoxin contamination in groundnuts (*Arachis hypogaea* L) and population density of Aflatoxigenic *Aspergilli* in Malawi. *Crop Protection* 42 (2012) 149e155. <http://www.elsevier.com/locate/cropro>.

MORASSI Letícia L.P. *et al.*, 2018 - Fungi in cake production chain: Occurrence and evaluation of growth potential in different cake formulations during storage. Volume 106, April 2018, Pages 141-148. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.12.075>.

MORENO M. Carvajal, 2016 - Aflatoxins, frequent mutagen and carcinogen of human and animal foods. *Toxicology Letters*.Volume 259, Supplement.10 October 2016, Page S139. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2016.07.357>.

MOUSA Wael *et al.*, 2016 - Temperature, water activity and gas composition effects on the growth and aflatoxin production by *Aspergillus flavus* on paddy. *Journal of Stored Products Research* 67 (2016) 49e55. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jspr.2016.01.003>.

MULUNDA Mwanza *et al.*, 2011 - A Decade of Aflatoxin M1 surveillance in milk and dairy products in developing countries (2001-2011): a Review.

NEMATI Mahboob *et al.*, 2010 - A survey on the occurrence of aflatoxin M1 in milk samples in Ardabil, Iran. *Food Control* 21 (2010) 1022–1024.

NIDHINA N. *et al.*, 2017- Aflatoxin production by *Aspergillus flavus* in rumen liquor and its implications. *Food Control* 71 (2017) 26e31).

NOREDDINE Benkerroum, 2016 - Mycotoxins in dairy products: A review. *International Dairy Journal* 62 (2016) 63e75. *International Dairy Journal* 62 (2016) 63e75. <http://www.elsevier.com/locate/idairyj>.

NORLIIA M. *et al.*, 2018 - Polyphasic approach to the identification and characterization of aflatoxigenic strains of *Aspergillus* section *Flavi* isolated from peanuts and peanut-based products marketed in Malaysia . *International Journal of Food Microbiology* 282 (2018) 9–15. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.05.030>.

NUGRAHA Ananditya, KHOTIMAH K., 2018 - Risk assessment of aflatoxin B1 exposure from maize and peanut consumption in Indonesia using the margin of exposure and liver cancer risk estimation approaches. *Research in Veterinary Science* 93 (2012) 279 – 287 [Acedido em 2018]. Disponível na Internet: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.01.036>.

OGUNADE, 2017 - Silage review: Mycotoxins in silage: Occurrence, effects, prevention, and mitigation. *J. Dairy Sci.* 101:4034–4059 <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13788>.

OKHOTH Sheila *et al.*, 2012 - Toxigenic Potential of *Aspergillus* Species Occurring on Maize Kernels from Two Agro-Ecological Zones in Kenya. 2012 Nov; 4(11): 991.[Acedido em 2018]. Disponível na Internet: www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3509695.

OLOYEDE Adejumo *et al.*, 2013 - Correlation between aflatoxin M1 content of breast milk, dietary exposure to aflatoxin B1 and socioeconomic status of lacting mothers in Ogun State, Nigéria. *Food and Chemical Toxicology* 56 (2013) 171–177.

OMAR SS, 2012 - Incidence of aflatoxin M1 in human and animal milk in Jordan. *Journal of Toxicology and Environmental Health* . (2012) Volume 75(22-23)1404-9. 2012;75(22-23):1404-9. doi: 10.1080/15287394.2012.721174.80.

ORTIZ Johana *et al.*, 2018 - Multiple mycotoxin exposure of infants and young children via breastfeeding and complementary/weaning foods consumption in Ecuadorian highlands. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.06.008>.

PALACIO Agustina; BETTUCCI Lina; PAN Dinorah, 2016 - *Fusarium* and *Aspergillus* mycotoxins contaminating wheat silage for dairy cattle feeding in Uruguay. [Acedido em Maio 2016]. Disponível na Internet:<http://www.bjmicrobiol.com.br>.

PEÑA-RODAS Oscar, MARTINEZ-LOPEZ Roxana, HERNANDEZ-RAUDA Roberto, 2018 - Occurrence of Aflatoxin M1 in cow milk in El Salvador: Results from a two year survey *Toxicology Reports* 5 (2018) 671–678. Acedido a Junho 2018. Disponível na internet: <https://www.elsevier.com/locate/toxrep>.

PEROMINGO Belén *et al.*, 2016 - Effect of temperature and water activity on growth and aflatoxin production by *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* on cured meat model systems. *Meat Science* 122 (2016) 76–83). [Acedido a 09.08.2018]. Disponível na internet: <http://dx.doi.org/10.1016/j.meatsci.2016.07.024>.

PERRONE Giancarlo *et al.*, 2014 - Population structure and Aflatoxin production by *Aspergillus Sect. Flavi* from maize in Nigeria and Ghana. *Food Microbiology* 41 (2014) 52e59. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2013.12.005>.

POLYCHRONAKI N *et al.*, 2007 - A longitudinal assessment of aflatoxin M1 excretion in breast milk of selected Egyptian mothers. *Food and Chemical Toxicology* 45 (2007) 1210–1215. <http://www.elsevier.com/locate/foodchemtox>.

PRANDINI A. *et al.*, 2009 - On the occurrence of aflatoxin M1 in milk and dairy products. Volume 47. Issue 5.May 2009, Pages 984–991. <http://www.elsevier.com/locate/foodchemtox>.

PRENCIPE Simona *et al.*, 2018-Characterization of *Aspergillus section Flavi* isolated from fresh chestnuts and along the chestnut flour process. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2017.08.004>.

PROBST C.; BANDYOPADHYAY R.; COTTY P.J.; 2014 - Diversity of aflatoxin-producing fungi and their impact on food safety in sub-Saharan Africa. *International Journal of Food Microbiology* 174 (2014) 113–122. <http://www.elsevier.com/locate/ijfoodmicro>.

RAFIEI Hossein *et al.*, 2014 - The concentration of aflatoxin M₁ in the mothers' milk in Khorrambid City, Fars, Iran. *Adv Biomed Res.* 2014; 3: 152.
<https://dx.doi.org/10.4103%2F2277-9175.137859>.

RAHMANI Jamal *et al.*, 2018 - The prevalence of aflatoxin M1 in milk of Middle East region: A systematic review, meta-analysis and probabilistic health risk assessment. *Food and Chemical Toxicology* 118 (2018) 653–666 [Acedido a 09.08.2018]. Disponível na internet: www.elsevier.com/locate/foodchemtox.

RAIOLA Assunta *et al.*, 2015 - Risk analysis of main mycotoxins occurring in food for children: An overview. Acedido a Junho 2016. Disponível na Internet: www.elsevier.com/locate/foodchemtox.

RAMALHO Leandra *et al.*, 2018 - Aflatoxin B1 residues in human livers and their relationship with markers of hepatic carcinogenesis in São Paulo, Brazil. *Toxicology Reports* 5 (2018) 777–784. [Acedido a 09.08.2018]. Disponível na internet: <http://www.elsevier.com/locate/toxrep>.

RAMIREZ Maria Laura *et al.*, 2016 - Impact of toxigenic fungi and mycotoxins in chickpea: a review. <http://www.sciencedirect.com/>.

RASFF (Rapid alert system for food and feed) - News Notification 03/87.

Regulamento (CE) n.º 178/2002 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 28 de Janeiro de 2002 - determina os princípios e normas gerais da legislação alimentar.

Regulamento (CE) N.º 852/2004 de 29 de Abril de 2004 - relativo à higiene dos géneros alimentícios.

Regulamento (CE) n.º 1831/2003 de 22 de Setembro de 2003 que estabelece as regras para a autorização e o controlo dos aditivos alimentares.

Regulamento (CE) n°882/2004, de 29 de Abril, relativo aos controlos oficiais realizados.
Risk assessment of contaminants in food and feed. European Food Safety Authority (EFSA),
Parma, Italy accessed at 05/01/2016.

ROCHA Maria Edite Bezerra *et al.*, 2014 - Mycotoxins and their effects on human and animal health. *Food Control* 36 (2014) 159e165. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.08.021>.

RODRIGUES Inês, Karin Naehrer - A Three-Year Survey on the Worldwide Occurrence of Mycotoxins in Feedstuffs and Feed. NCBI.

Romero Alessandra de Cássia *et al.*, 2010 - Occurrence of AFM1 in urine samples of a Brazilian population and association with food consumption. *Food Control* 21 (2010) 554–558. <http://www.sciencedirect.com/science/journal/09567135>.

ROURKE J.L., SINAL J., 2014 - Biotransformation/Metabolism. 2014, Pages 490-502) <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386454-3.00007-5>.

RUSHINGA Blake, Mustafa I. Selimb, 2019 - Aflatoxin B1: A review on metabolism, toxicity, occurrence in food, occupational exposure, and detoxification methods. *Food and Chemical Toxicology* 124 (2019) 81–100.

RUYCK Karl *et al.*, 2015 - Dietary mycotoxins, co-exposure, and carcinogenesis in humans: Short review. *Mutation Research* 766 (2015) 32–41.

SADEGHI Naficeh *et al.*, 2009 - Incidence of aflatoxin M1 in human breast milk in Tehran, Iran. *Food Control*, Volume 20, Issue 1, January 2009, Pages 75–78. <http://www.sciencedirect.com/>.

SAEGER Sarah; AUDENAERT Kris ; CROUBELS Siska, 2016- Report from the 5th International Symposium on Mycotoxins and Toxigenic Moulds: Challenges and Perspectives (MYTOX) Held in Ghent, Belgium, May 2016. Published online 2016 May 12. doi: 10.3390/toxins8050146.

SCHMIDT-HEYDT Markus *et al.*, 2009 - Complex regulation of the aflatoxin biosynthesis gene cluster of *Aspergillus flavus* in relation to various combinations of water activity and temperature. *International Journal of Food Microbiology* 135 (2009) 231–237.

SCHMIDT-HEYDT Markus *et al.*, 2009 - Complex regulation of the aflatoxin biosynthesis gene cluster of *Aspergillus flavus* in relation to various combinations of water activity and temperature. *International Journal of Food Microbiology* 135 (2009) 231–237.

SCHUBERT Max *et al.*, 2018 - *Aspergillus*-specific antibodies – Targets and applications. *Biotechnology Advances* 36 (2018) 1167–1184.
<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.03.016>.

SEVIORA Danielle K; PELKONENB Olavi; AHOKASA Jorma, 2012 - Hepatocytes: The powerhouse of biotransformation. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 44 (2012) 257–261. <http://www.elsevier.com/locate/biocel>.

SHUAIB Faisal M.B. *et al.*, 2010 - Reproductive health effects of aflatoxins: A review of the literature. *Reproductive Toxicology* 29 (2010) 262–270. www.elsevier.com/locate/reprotox.
SHUIB Nor Shifa *et al.*, 2016- Natural occurrence of aflatoxin M1 in fresh cow milk and human milk in Penang, Malaysia. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.10.013>.

SHUNDO Luzia *et al.*, 2009 - Estimate of aflatoxin M1 exposure in milk and occurrence in Brazil. *Food Control* 20 (2009) 655–657.

SIROT Véronique; FREMY Jean-Marc; LEBLANC Jean-Charles, 2013 - Dietary exposure to mycotoxins and health risk assessment in the second French total diet study. *Food and Chemical Toxicology* 52 (2013) 1–11. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2012.10.036>.

SMITH Marie-Caroline - Natural Co-Occurrence of Mycotoxins in Foods and Feeds and Their *in vitro* Combined Toxicological Effects.

SOBRAL M. Madalena, *et al.*, 2018 - Toxicological interactions between mycotoxins from ubiquitous fungi: Impact on hepatic and intestinal human epithelial cells. *Chemosphere* 202 (2018) 538e548. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.03.122>.

STOEV Stoycho, 2015 - Foodborne mycotoxicoses, risk assessment and underestimated hazard of masked mycotoxins and joint mycotoxin effects or interaction. *Environmental toxicology and pharmacology*. <http://www.sciencedirect.com/science/journal/13826689>.

STREIT Elisabeth *et al.*, 2012 - Current situation of mycotoxin contamination and co-occurrence in animal feed-focus on Europe. 2012 Oct;4 (10):788-809.doi: 10.3390/toxins4100788.

SUMIT RAWAL, Ji Eun Kim, Roger Coulombe Jr., 2010 - Aflatoxin B1 in poultry: Toxicology, metabolism and prevention. *Research in Veterinary Science* 89 (2010) 325–331

TANAKA K *et al.*, 2016 - Mycotoxins in rice. Assessed 19/08/2016. NCBI.

TANIWAKI Marta Hiromi, PITT John, MAGAN Naresh, 2018. - *Aspergillus* species and mycotoxins: occurrence and importance in major food commodities. *Food mycology* Volume 23, October 2018, Pages 38-43. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2018.05.008>. <http://www.sciencedirect.com>.

THEUMER *et al.*, 2010 - Subchronic mycotoxicoses in Wistar rats: assessment of the in vivo and in vitro genotoxicity induced by fumonisins and aflatoxin B1, and oxidative stress biomarkers status. *Toxicology* 268, 104–110. <http://www.elsevier.com/locate/toxicol>.

THEUMER M.G. *et al.*, 2018 - Genotoxicity of aflatoxins and their precursors in human cell. *Toxicology Letters* 287 (2018) 100–107. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2018.02.007>.

TOMASEVIC Igor *et al.*, 2015 - Two year survey on the occurrence and seasonal variation of aflatoxin M1 in milk and milk products in Serbia. *Food Control* 56 (2015) 64e70. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.03.017>.

TORRES A.M. *et al.*, 2014 - Review on pre- and post-harvest management of peanuts to minimize aflatoxin contamination. *Food Research International* 62 (2014) 11–19. [Acedido em fevereiro 2016]. Disponível na Internet: <http://www.elsevier.com/locate/foodres>.

TURNER Nicholas W., 2015 - Analytical methods for determination of mycotoxins: An update (2009e2014). *Analytica Chimica Acta* 901 (2015) 12e33.

VA Alonso - Fungi and mycotoxins in silage: an overview. The Society for Applied Microbiology. Sep; 15 (3):637-43.

Van Egmond, H.P., Jonker, M.A., 2003 - Worldwide regulations for mycotoxins in food.

VISENUO AIKO, Alka Mehta, 2016 - Prevalence of toxigenic fungi in common medicinal herbs and spices in India. 19/08/2016.NCBI.

Wanda F. Canas -Microbiologia

WANG Bin *et al.*, 2017 - Effects of nitrogen metabolism on growth and aflatoxin biosynthesis in *Aspergillus flavus*. Journal of Hazardous Materials 324 (2017) 691–700. <http://www.elsevier.com/locate/jhazmat>.

WANWIMOLRUK Sompon; PRACHAYASITTIKUL Virapong, 2014 - CYTOCHROME P450 enzyme mediated herbal drug interactions (part I). *excli Journal* 2014;13:347-391 – ISSN 1611-2156. [Acedido em Agosto 2018]. Disponível na internet: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc>.

WARTH B, 2016-Biomonitoring of Mycotoxins in Human Breast Milk: Current State and Future Perspectives. 19/08/2016.NCBI.

WARTH Benedikt *et al.*, 2016 - Bio-monitoring of mycotoxins in human breast milk: Current state and future perspectives. *Chem. Res. Toxicol.* 2016 *Chem. Res. toxicol.*, 2016, 29 (7), pp 1087–1097. DOI: 10.1021/acs.chemrestox.6b00125.

RYNIECKI Antoni, 2018 - Evaluation of critical points of mold growth and mycotoxin production in the stored barley ecosystem with a hazardous initial microbiological state of grain. *Journal of Stored Products Research* 77 (2018) 166e176 [Acedido a 09.08.2018]. Disponível na internet: <https://doi.org/10.1016/j.jspr.2018.04.008>.

WHO, 2015 - Infant and Young Child Feeding, Fact Sheet No.342, retrived from <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs342/en/>.

WHO (GEMS/Food) Contaminants 2016 - Global Environment Monitoring System

WHO, 2006 - Codex alimentarius. [Acedido a 10/05/2016]. Disponível na Internet.

WHO, 1999 - Technical Report Series, No. 884, 1999 Evaluation of certain food additives and contaminants (Forty-ninth report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives).

WHO, 2002 - Technical Report Series, No. 906, 2002. Evaluation of certain mycotoxins (Fifty-sixth report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives).

WHO, 2007 - Technical Report Series, No. 947, 2007. Evaluation of certain food additives and contaminants (Sixty-eighth report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives).

WHO, 2017 - Technical Report Series, No.1002, 2017. Evaluation of certain contaminants in food (Eighty-third report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives).

WILD Christopher; GONG Yun Yun, 2010 - Mycotoxins and human disease: a largely ignored global health issue. 2010 Jan31(1):71-82. [Acedido em Agosto 2018]. Disponível na internet: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc>.

WHO, 2002. The world health report 2002 - Reducing risks promoting healthy life, Available:<http://www.who.int/whr/en/>.

XING Fuguo *et al.*, 2017 - Distribution and variation of fungi and major mycotoxins in pre- and post-nature drying maize in North China Plain. Food Control 80 (2017) 244e251. <http://www.elsevier.com/locate/foodcont>.

XIONG Jianglin *et al.*, 2018 - Occurrence of aflatoxin B1 in dairy cow feedstuff and aflatoxin M1 in UHT and pasteurized milk in central China. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.05.022>.

YAN LIU *et al.*, 2012 - Population attributable risk of aflatoxin-related liver cancer: Systematic review and meta-analysis. European Journal of Cancer (2012) 48, 2125– 2136.

YOGENDRARAJAH P *et al.*, 2016 - Toxigenic potentiality of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* strains isolated from black pepper assessed by an LC-MS/MS based multi-mycotoxin method. Assessed 08 2016. NCBI.

YOGENDRARAJAH Pratheeba *et al.*, 2015 - Toxigenic potentiality of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* strains isolated from black pepper assessed by an LC-MS/MS based multi-mycotoxin method. *Food Microbiology* 52 (2015) 185 e 196.

YOGENDRARAJAH Pratheeba *et al.*, 2016 - Mycotoxin production and predictive modelling kinetics on the growth of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* isolates in whole black peppercorns (*Piper nigrum* L). *International Journal of Food Microbiology* 228 (2016) 44–57.

YU Jiujiang *et al.*, 2012 - *Toxins* 2012, 4, 1024-1057. Current Understanding on Aflatoxin Biosynthesis and Future Perspective in Reducing Aflatoxin Contamination.[Acedido a 09.08.2018]. Disponível na internet: <http://www.mdpi.com/journal/toxins>.

ZANGER Ulrich M; SCHWAB Matthias, 2013 - Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: Regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation. *Pharmacology & Therapeutics* 138 (2013) 103–141. e: www.elsevier.com/locate/pharmthera.

ZHANG J. *et al.*, 2015-Aflatoxin B1 and aflatoxin M1 induced cytotoxicity and DNA damage in differentiated and undifferentiated Caco-2 cells. *Food and Chemical Toxicology* 83 (2015) 54e60. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2015.05.020>.

ANEXOS

AFM1 - _____

DECLARAÇÃO

Eu,, declaro que dou o meu consentimento para a recolha de leite materno e posterior análise de **Aflatoxina M1**.

Coimbra, de de 2015

Assinatura:

ANEXO 2 - Questionário Sóciodemográfico

Este questionário tem como objectivo avaliar uma potencial correlação entre o consumo de determinados alimentos normalmente associados à presença de **Aflatoxina B1** e os níveis de **Aflatoxina M1** no leite materno

Características Individuais

Data:

Nome:

Idade:

Nº filhos:

Formação escolar:

Profissão:

Data parto:

Peso do bebé à nascença:

Características da Amamentação

Mista (Peito/outro)

Só Peito

Tempo de amamentação (m)

Idade do bebé (m)

Peso da criança (kg)

QUESTIONÁRIO ALIMENTAR

NOTAS PRÉVIAS

Procure responder às questões de uma forma sincera, indicando a frequência de consumo dos alimentos referidos na tabela.

O questionário pretende identificar o consumo de alimentos associados à presença de Aflatoxina B1 previamente à recolha do leite. Assim para cada alimento, deve assinalar, preenchendo com um X a respectiva opção, quantas vezes por dia ou por semana comeu em média, cada um dos alimentos referidos nesta lista, ao longo do último mês.

No **último mês** qual foi a **frequência** de consumo (assinale com X):

Alimento/Quantidade	Frequência diária			Frequência semanal				Mês
	1*dia	2*dia	>3*dia	1 a 2*	3 a 4*	5 a 6*	Nunca	1 a 3*
Leite açoriano (1 copo)								
Leite (1 copo)								
logurte (1 emb)								
Café (1 chávena)								
Arroz (1 un)								
Pão (20gr)								
Chocolate (1 chávena)								
Cereais (100gr)								
Bolachas (2 a 3)								
Bolos (1 fatia)								
Frutos secos (3 a 4 un)								